

TESIS DOCTORAL

**LAS PLAQUETAS RETICULADAS
MEDIDAS POR CITOMETRÍA DE
FLUJO: UN MARCADOR
INDIRECTO DE ACTIVIDAD
TROMBOCITOPOYÉTICA**

MANUEL MONTEAGUDO JIMÉNEZ

**LAS PLAQUETAS RETICULADAS
MEDIDAS POR CITOMETRÍA DE
FLUJO: UN MARCADOR
INDIRECTO DE ACTIVIDAD
TROMBOCITOPOYÉTICA**

Dirigida por:
Dr. Carles Tolosa Vilella
Dr. Vicent Fonollosa Pla

Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona

Dedicada a Pepe, que ya no la verá, y a Matilde porque por su sacrificio pude estudiar medicina.

Y muy especialmente a Angela por aguantarme cada día y a Pablo que verá finalmente que es verdad que he acabado la tesis.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. M^a José Amengual, autora real de la puesta en marcha de la técnica de determinación de plaquetas reticuladas por citometría de flujo, porque sin su ayuda y entusiasmo no se hubieran iniciado los trabajos de esta tesis.
- A todos los compañeros del Servicio de Hematología tanto clínicos (Dra. Imma Roig, J. Alfonso Soler, E. Rámila, S. Piernas, M. Gómez) como de laboratorio (L. Muñoz, G. Perea) por sus consejos y su inestimable colaboración en todos los trabajos de esta tesis.
- A los técnicos del laboratorio (J. Obiols, I. Colomina, J. Guiu) por su colaboración desinteresada y por facilitarme siempre mi trabajo en el laboratorio.
- A aquellos miembros del Comité Institucional de Recerca de la Corporació Parc Taulí que en Diciembre del año 2000, al concederme la beca hicieron posible la realización de los trabajos de esta tesis.
- A todos los residentes del Servicio de Medicina Interna del Hospital Parc Taulí de los últimos 10 años, a los que han colaborado directamente en algunos de los trabajos y a los que con su trabajo han colaborado indirectamente permitiéndome dedicar más tiempo a la realización de los trabajos de esta tesis, por que sin ellos esta tesis no hubiera sido posible. A todos por ser siempre un estímulo para mejorar en el trabajo diario.
- A los compañeros del Servicio de Medicina Interna del Hospital Parc Taulí, especialmente al Grupo de Enfermedades Autoinmunes (Dr. J. Oristrell, Dr. A. Casanovas, Dr. C. Tolosa, Dr. R. Jordana, Dra. B. Marí) por su cooperación y palabras de ánimo durante estos años. .

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

-
- ADN = ácido desoxiribonucleico
 - ADP = adenosin difosfato
 - ARN = ácido ribonucleico
 - β -TG= beta-tromboglobulina
 - BFU-Meg = unidades formadoras de Burst megacariocítica
 - CBF = core binding factor
 - CD= cluster of differentiation , grupo de diferenciación
 - CFU-Meg = unidades formadoras de colonias megacariocíticas
 - CHP = célula hematopoyética pluripotente
 - CID = coagulación intravascular diseminada
 - CSF = factor estimulador de colonias
 - CyC = cycromo
 - ECD = colorante de energía acoplada
 - EDTA = ácido etilendiaminotetraacético
 - EPO = eritropoyetina
 - FITC= isotiocianato de fluoresceína
 - FI = flatolitro
 - FOG = friend of GATA
 - FSC = forward scatter –dispersión frontal
 - G-CSF = factor estimulador de colonias de granulocitos
 - GM-CSF = factor estimulador de colonias granulocito/macrófagos
 - GP = glicoproteína
 - HPPc-Meg = célula con alta capacidad proliferativa megacariocítica
 - IgG = inmunoglobulina G
 - IgM = inmunoglobulina M
 - IL = interleukina
 - IPF = fracción plaquetar inmadura
 - JAK 2 = Janus tyrosine kinasa
 - KD = kilodaltons
 - M-CSF = factor de crecimiento de macrófagos
 - Mpl = leucemia mieloproliferativa murina
 - MK = megacariocitos
 - μ m = micra
 - mW = miliwatio
 - NF-E2 = factor eritroide nuclear
 - nm = nanómetro
 - NT = naranja de tiazol
 - PDGF = factor de crecimiento derivado de las plaquetas
 - PECAM 1 = molécula de adhesión plaqueta-endotelio 1
 - PCL = progenitor común linfoide
 - PCM = progenitor común mieloide
 - PE = ficoeritrina

- Per-CP = proteína peridín clorofila
- PF4 = factor plaquetario 4
- PGM = progenitor granulocito/macrófago
- PME = progenitor megacariocito/eritroide
- PR = plaquetas reticuladas
- PRP = plasma rico en plaquetas
- PTAI = púrpura trombocitopénica aguda idiopática
- RER = retículo endoplásmico rugoso
- SDF 1 = factor 1 derivado de células estromales
- SSC = side scatter –dispersión lateral
- STAT = signal transducer and activator of transcription
- TGF- β = factor de crecimiento transformador β
- TGF1 = factor de crecimiento transformador 1
- TPO = trombopoyetina
- VNR = receptor de vitronectina
- VPM = volumen plaquetar medio

1	- INTRODUCCIÓN	1
1.1	PLAQUETAS: GENERALIDADES	2
1.2	ANATOMÍA DE LAS PLAQUETAS	5
1.2.1	Membrana plaquetaria	5
1.2.1.1	Cubierta exterior o glucocáliz	6
1.2.1.2	Unidad de membrana	6
1.2.1.3	Area submembranosa	6
1.2.2	Citoplasma y citoesqueleto	6
1.2.2.1	Citoesqueleto del citoplasma	7
1.2.2.2	Microtúbulos	7
1.2.2.3	Microfilamentos	7
1.2.2.4	Elementos químicos macromoleculares del citoplasma	7
1.2.2.4.1	Glucógeno	7
1.2.2.4.2	Gotas lipídicas	8
1.2.2.4.3	Sustancias solubles	8
1.2.3	Orgánulos plaquetarios	8
1.2.3.1	Gránulos α	8
1.2.3.2	Cuerpos multivesiculares	9
1.2.3.3	Gránulos densos	9
1.2.4	Sistemas membranosos	10
1.2.4.1	Sistema canalicular abierto	10
1.2.4.2	Sistema tubular denso	10
1.2.4.3	Complejos membranosos mixtos	11
1.2.5	Estructuras inespecíficas	11
1.2.5.1	Lisosomas	11
1.2.5.2	Vesículas revestidas	11
1.2.5.3	Microperoxidasas	12
1.2.5.4	Mitocondrias	12
1.2.5.5	Ribosomas	12
1.3	PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS	13
1.3.1	Megacariopoyesis	13
1.3.2	Trombocitopoyesis	17
1.3.3	Mecanismos de control de megacariopoyesis y trombocitopoyesis	20
1.3.3.1	Trombopoyetina	20
1.3.3.2	Otras citoquinas	24
1.3.3.3	GATA-1 y su cofactor FOG-1	24
1.3.3.4	Factor eritroide nuclear 2 (NF-E2)	25
1.3.3.5	Otros factores de transcripción implicados en la megacariopoyesis	26

1.4	TROMBOCITOPENIAS: GENERALIDADES	30
1.4.1	Concepto de trombocitopenia.	30
1.4.2	Cinética plaquetaria. Distribución y destrucción plaquetar.	31
1.4.3	Mecanismos etiopatogénicos de las trombocitopenias	33
1.4.3.1	Trombocitopenias centrales.	33
1.4.3.2	Trombocitopenias periféricas.	33
1.4.3.3	Trombocitopenias por alteración de la distribución.	34
1.4.3.4	Trombocitopenias por mecanismos mixtos.	34
1.5	Citometría de flujo. Principios generales. Aplicación al estudio de las plaquetas.	36
1.5.1	Principios generales de la citometría de flujo.	36
1.5.2	Citometría de flujo y estudio de plaquetas. Metodología.	43
1.5.3	Plaquetas reticuladas. Determinación por citometría de flujo.	49
1.5.4	Plaquetas reticuladas. Determinación automática.	55
2	- HIPÓTESIS	59
2.1	HIPÓTESIS.	60
3	- OBJETIVOS Y RESULTADOS	61
3.1	OBJETIVO 1	62
3.1.1	RESULTADOS 1. PUBLICACIÓN 1.	63
3.1.2	RESULTADOS 1. COMENTARIO.	68
3.2	OBJETIVO 2	69
3.2.1	RESULTADOS 2. PUBLICACIÓN 2	70
3.2.2	RESULTADOS 2. COMENTARIO.	77
3.3	OBJETIVO 3	79
3.3.1	RESULTADOS 3. PUBLICACIÓN 3	80
3.3.2	RESULTADOS 3. COMENTARIO.	85
3.4	OBJETIVO 4.	86
3.4.1	RESULTADO 4. PUBLICACIÓN 4.	87
3.4.2	RESULTADOS 4. COMENTARIO.	93
4	- DISCUSIÓN.	94
4.1	DISCUSIÓN	95
5	- CONCLUSIONES	102
5.1	CONCLUSIONES	103
6	- BIBLIOGRAFÍA	104
6.1	BIBLIOGRAFÍA.	105

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 PLAQUETAS: GENERALIDADES

Las plaquetas fueron descritas en 1841 por Addison como pequeñas partículas sanguíneas, distintas de leucocitos y hematíes¹. Sin embargo, la denominación de plaquetas se la debemos a G. Bizzozero en 1882, que también observó sus cualidades adhesivas, cuando la pared vascular es lesionada². Los mismos elementos fueron identificados por Osler y Hayem al final del siglo XIX, al examinar al microscopio muestras de sangre^{3,4}.

Las plaquetas son células anucleadas de morfología discoide en situación basal, que proceden de la fragmentación de los megacariocitos medulares y circulan libremente en sangre periférica. Al microscopio óptico, en la extensión periférica de sangre anticoagulada con EDTA y teñida con tinción de Wright, aparecen como elementos ovals-redondos de color gris azulado con múltiples gránulos rojo púrpura. Cuando no están activas, su tamaño es variable y suelen tener un diámetro entre 1.5 a 4.2 μm ,

equivalente a una tercera o cuarta parte del tamaño de un eritrocito (Foto 1) y un grosor entre 0,6 y 1,2 μm . En ocasiones, pueden alcanzar un tamaño superior a la mitad de un eritrocito.

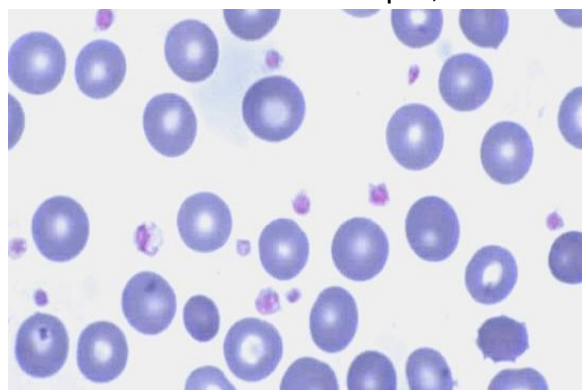


Foto 1. Frotis de sangre normal con hematíes y plaquetas. Tinción de May Grunwald-Giemsa x1000

Las plaquetas están implicadas principalmente en la hemostasia primaria mediante sus funciones de adhesión, agregación, cambio de forma y secreción. Sin embargo, también intervienen de forma directa e indirecta en la coagulación, inflamación, cicatrización de las heridas, fibrosis tisular, trombosis,

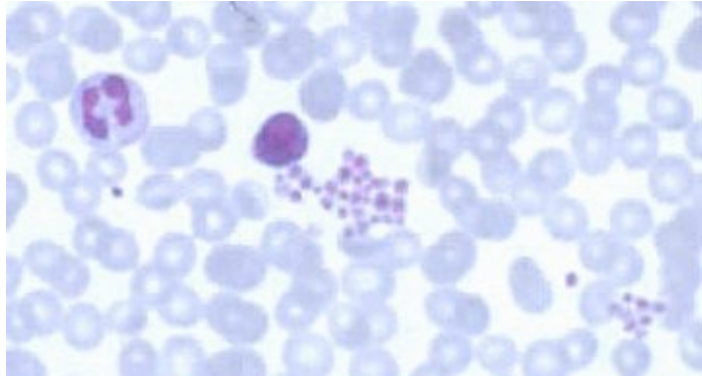


Foto 2. Sangre con dos agregados plaquetarios, un linfocito y un Segmentado Tinción de May Grunwald-Giemsa x200

arteriosclerosis⁵ o incluso como factor a tener en cuenta en la diseminación neoplásica, especialmente a través del ligando de la selectina, como han demostrado diversos trabajos en los últimos años⁶⁻⁸. Las plaquetas tienen una estructura compleja, adaptada a la gran variedad de funciones que deben desempeñar. Por este motivo, en su anatomía identificamos diferentes zonas, cada una de ellas con funciones específicas: la membrana plaquetar permite las interacciones con el exterior, el citoesqueleto es el promotor de la contracción celular, los gránulos específicos almacenan sustancias prohemostáticas, procicatrizantes y activadoras de las propias plaquetas, y los sistemas membranosos amplifican la superficie plaquetaria y tienen componentes químicos que participan en la activación. La alteración de cualquiera de estas estructuras plaquetares puede ocasionar una disfunción

celular y patologías cualitativas de las plaquetas, hereditarias o adquiridas, que se pueden expresar clínicamente como un síndrome hemorrágico. Sin embargo, probablemente es mucho más frecuente en la práctica clínica, las situaciones en las que el número de plaquetas sea inferior al adecuado, es decir la presencia de trombocitopenia, y cuya manifestación clínica será también el síndrome hemorrágico.

El hallazgo de trombocitopenia de forma casual, con o sin asociación a clínica hemorrágica, es más frecuente desde que se ha generalizado la utilización de contadores automáticos. La detección de trombocitopenia nos plantea siempre un problema diagnóstico. En ocasiones, la historia clínica y exploración física nos aportan la solución al detectar enfermedades prevalentes, como hepatopatía, o ingesta de fármacos o tóxicos, como el alcohol. Otras veces, es la revisión de la extensión periférica que detecta una falsa trombocitopenia (Foto 2), mientras que otros pacientes precisan de exploraciones complementarias, más o menos invasivas, para llegar a un diagnóstico etiológico. No es despreciable, la cantidad de pacientes que quedan sin diagnóstico, especialmente entre aquellos que tienen trombocitopenias leves y asintomáticas.

1.2 ANATOMÍA DE LAS PLAQUETAS

La morfología discoide de las plaquetas al microscopio óptico en sangre anticoagulada con EDTA, varía cuando estas se activan. En reposo las plaquetas tienen exteriormente un aspecto liso, con un número variable de aperturas microscópicas, que representan la salida al exterior de un sistema de canales intraplaquetarios, comunicados entre si, semejantes a las cavidades de una esponja. La plaqueta es un órgano complejo anatómicamente, compuesto por diversas formaciones celulares que condicionan las múltiples funciones y acciones en las cuales se encuentran implicadas. Básicamente se puede distinguir en las plaquetas^{5,9}:

1. Membrana plaquetaria.
2. Citoplasma y citoesqueleto.
3. Orgánulos plaquetarios.
4. Sistemas membranosos
5. Estructuras inespecíficas.

1.2.1 MEMBRANA PLAQUETARIA

La membrana es la zona de separación de la plaqueta con el exterior y contiene el 57% del total de fosfolípidos presentes en la plaqueta. Está constituida por 3 capas.

1.2.1.1 CUBIERTA EXTERIOR O GLUCOCÁLIX.

Tiene un grosor de unos 15-20nm. Contiene receptores glucoproteícos como son: El complejo Ib-V-IX que interacciona con el factor Von Willebrand en el proceso de adhesión y el complejo IIb-IIIa que lo hace con el fibrinógeno en la agregación. Las glucoproteínas integran en su estructura química los principales antígenos plaquetarios de membrana.

1.2.1.2 UNIDAD DE MEMBRANA.

Compuesta por una bicapa fosfolipídica, asimétrica y especialmente rica en ácido araquidónico. En las situaciones de activación expone una superficie con carga negativa con actividad procoagulante y el ácido araquidónico participa en la transmisión del estímulo recibido en la membrana hacia las regiones celulares efectoras, mediante el metabolismo de los eicosanoides.

1.2.1.3 AREA SUBMEMBRANOSA.

Es la capa mas interna, está unida a porciones transmembranas de algunas glucoproteínas y contiene filamentos submembranosos, compuestos de actina y miosina, que forman parte del citoesqueleto y constituirían el citoesqueleto de membrana. Aquí se produce la transformación de las señales recibidas en la superficie exterior, en los mensajes químicos y alteraciones físicas que activan la plaqueta.

1.2.2 CITOPLASMA Y CITOESQUELETO.

El citoplasma plaquetario contiene una estructura anatómica, el citoesqueleto y elementos químicos dispersos, algunos de ellos

macromoleculares.

1.2.2.1 CITOESQUELETO DEL CITOPLASMA.

El citoesqueleto es un conjunto de sistemas fibrilares en varios estados de polimerización que permiten la forma discoide de las plaquetas en reposo y le proporciona un mecanismo contráctil, así como los cambios de conformación de los receptores con la activación plaquetar. Está compuesto por microtúbulos y microfilamentos.

1.2.2.2 MICROTÚBULOS.

Son estructuras tubulares de unos 25nm de diámetro, constituidas cada uno de ellos por unos 12-15 subfilamentos de tubulina. Aunque parecen estar dispuestos en haces, se trata en realidad de un solo microtúbulo enrollado en espiral formando un anillo en el ecuador de la plaqueta, cerca de la membrana sin contactar con ella. Es el responsable de mantener la forma discoide de la plaqueta en reposo y colabora a la secreción plaquetaria, ayudando a llevar los orgánulos al centro de la plaqueta contraída.

1.2.2.3 MICROFILAMENTOS.

Compuestos por actina filamentosa y miosina. Son los principales elementos contráctiles de las plaquetas y se disponen en redes irregulares por toda la célula.

1.2.2.4 ELEMENTOS QUÍMICOS MACROMOLECULARES DEL CITOPLASMA.

1.2.2.4.1 *Glucógeno.*

Se encuentra en el citoplasma plaquetar de forma dispersa, en forma de partículas que con frecuencia se agrupan formando grandes masas. Se ha descrito la formación de organelas denominadas glucosomas, que serían acúmulos de glucógeno rodeadas de una membrana simple.

1.2.2.4.2 *Gotas lipídicas.*

Ocasionalmente pueden visualizarse en el citoplasma gotas lipídicas que están constituidas por grasas neutras ricas en ácidos grasos insaturados.

1.2.2.4.3 *Sustancias solubles.*

Incluirían parte de los nucleótidos plaquetarios, parte del calcio iónico y componentes químicos que participan en la activación.

1.2.3 ORGÁNULOS PLAQUETARIOS.

Estarían constituidos por los gránulos específicos, básicamente gránulos α , cuerpos multivesiculares y gránulos densos.

1.2.3.1 GRÁNULOS ALFA

Son los más numerosos, unos 50 por plaqueta, de morfología habitualmente esférica u oval, miden unos 300-500nm de diámetro y están rodeados de una membrana simple. En su estructura interna se pueden distinguir 3 zonas: un nucleoide excéntrico más denso, una zona intermedia o matriz granular y una zona periférica electronluyente, que contiene unas estructuras tubulares. Los gránulos α son el lugar de almacenamiento de sustancias destinadas a ser secretadas en el momento de la activación

plaquetar y localizadas, algunas de ellas, en zonas concretas de la estructura de gránulo α . Entre estas sustancias se encuentran proteínas específicas de las plaquetas, sintetizadas por los megacariocitos como son β -tromboglobulina, localizada en el nucleoide, y el factor plaquetario 4 (PF4). Otras son sustancias compartidas con el plasma, entre ellas fibrinógeno en la matriz granular, albúmina, algunas inmunoglobulinas, fibronectina, factor Von Willebrand localizada en las estructuras tubulares de la zona periférica. También contienen diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformador β (TGF- β), multimerina o proteína de unión al factor V/Va, localizada en la zona electronluscante y probablemente trombopoyetina. En la cara interna de la membrana del gránulo se sitúan un conjunto de factores que con la activación de la plaqueta migran hacia la superficie y se expresan en la membrana, como son el complejo glucoproteico IIb-IIIa, la P-selectina, el CD9, la molécula de adhesión plaqueta-endotelio 1(PECAM-1) y la osteonectina.

1.2.3.2 CUERPOS MULTIVESICULARES.

Estructuras granulares de tamaño similar a los gránulos α , que contienen diversas vesículas redondeadas de 30-79nm de diámetro, a veces acompañadas de un material electrodensso.

1.2.3.3 GRÁNULOS DENSOS

Miden entre 200-300nm de diámetro, con una zona central muy densa

rodeada por un halo transparente. También poseen una membrana simple y están en un número alrededor de 5 en cada plaqueta. Estos gránulos contienen concentraciones elevadas de serotonina, así como, pirofosfato, nucleótidos, parte de calcio iónico y otros cationes.

1.2.4 SISTEMAS MEMBRANOSOS

Están constituidos básicamente por 3 sistemas de membranas, el sistema canalicular abierto, el sistema tubular denso y ocasionalmente complejos de membrana mixtos.

1.2.4.1 SISTEMA CANALICULAR ABIERTO.

Es el más abundante y está constituido por los canales abiertos al exterior que dan a la plaqueta esa configuración de esponja. Es el sistema compuesto por todos los canales de una plaqueta, que ramificados y anastomosados entre si conforman una estructura única con 15-20 salidas al exterior. Como está generado por una invaginación de la membrana plaquetar, posee las tres capas de la membrana plaquetar, en reposo no tiene ningún contenido y su función será aumentar la superficie de contacto con el exterior facilitando los mecanismos de adhesión, agregación, endo y exocitosis y el intercambio de sustancias entre membrana y zonas anatómicas mas profundas de la plaqueta.

1.2.4.2 SISTEMA TUBULAR DENSO

Constituido por un conjunto de canales mas delgados que los del sistema canalicular abierto, con un contenido amorfo de densidad similar al

citoplasma y que no comunica con el exterior. Es el lugar principal de almacenamiento de calcio iónico y de las enzimas del metabolismo de las prostaglandinas. Se localiza también en ellos la peroxidasa específica de las plaquetas.

1.2.4.3 COMPLEJOS MEMBRANOSOS MIXTOS.

Pueden encontrarse en ocasiones complejos membranosos mixtos localizados en una o dos áreas plaquetarias, formados por elementos del sistema canalicular abierto y del sistema de túbulos densos, estrechamente relacionados pero sin contacto.

1.2.5 ESTRUCTURAS INESPECÍFICAS

Las plaquetas contienen otros elementos que podemos hallar en otras células. Entre ellos tenemos:

1.2.5.1 LISOSOMAS.

Lisosomas primarios similares a los gránulos α , pero más pequeños de 175-250nm, sin nucleóide y rodeado de halo más claro. Contienen hidrolasas ácidas y tienen las mismas funciones que en otras células, como son la fagocitosis y destrucción intracelular de partículas extrañas. Los lisosomas secundarios tienen morfologías variadas, especialmente en plaquetas viejas, con imágenes de autofagia local.

1.2.5.2 VESÍCULAS REVESTIDAS

Formaciones entre 70-90nm que se generan desde la membrana

plaquetar o el sistema canalicular abierto y constituyen un mecanismo alternativo de endocitosis de fase fluida, mediado por receptores.

1.2.5.3 MICROPEROXIDASAS

Presentes en escaso número, son un tipo especial de gránulos de unos 90nm de diámetro, en los que no se detecta catalasa por citoquímica.

1.2.5.4 MITOCONDRIAS.

Son redondeadas o alargadas, de un tamaño menor al del resto de células, se hallan en proporción similar a los gránulos densos y su función está al servicio del metabolismo energético de la plaqueta.

1.2.5.5 RIBOSOMAS.

Las plaquetas son muy pobres en ribosomas y raramente contienen retículo endoplasmático rugoso o vesículas del aparato de Golgi.

1.3 PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS

Desde el reconocimiento de las plaquetas, como “polvo de la sangre” hace más de 100 años, mucho han progresado los conocimientos en la biogénesis de las plaquetas¹⁰. Durante este tiempo se han identificado los megacariocitos como las células precursoras de las plaquetas, se han definido funcionalmente y purificado las células progenitoras de megacariocitos en médula ósea, permitiendo de esta forma el progreso en el conocimiento del proceso de maduración de megacariocitos o megacariopoyesis, y aumentado el conocimiento de los diversos factores que juegan un papel en este proceso. Se ha avanzado también en el mecanismo como los megacariocitos realizan su función principal que es la producción y liberación de plaquetas o trombopoyesis. El desarrollo de técnicas de cultivo celulares junto con la aparición de modelos animales de trombocitopenia y la posibilidad de manipulación genética ha permitido la identificación de un importante número de factores de transcripción de importancia capital en los procesos biológicos de megacariopoyesis y trombopoyesis. El conocimiento de estos procesos no es, con mucho, en la actualidad completo, existiendo todavía muchas preguntas sin respuesta en cuanto al papel de algunos de estos factores así como la interrelación entre ellos.

Realizaremos a continuación un rápido resumen con una visión en conjunto y de conceptos más básicos de los procesos de megacariopoyesis y trombopoyesis.

1.3.1 MEGACARIOPOYESIS

El inicio de la megacariopoyesis aparece cuando una célula hematopoyética

pluripotente diploide (CHP) se ve comprometida hacia la línea megacariocítica. La célula hematopoyética pluripotente (CHP) da lugar a 2 líneas celulares principales, el progenitor común linfoide (PCL) y el progenitor común mieloide (PCM). El PCL dará lugar a los linfocitos (NK, T y B células) mientras el PCM será el origen del progenitor granulocito/ macrófago (PGM) y del progenitor megacariocito /eritroide (PME). Aunque, evidencias recientes sugieren que el PME puede también originarse directamente de la célula hematopoyética pluripotente (CHP) dando lugar a la línea megacariocítica o eritroide sin el intermediario PCM¹¹.

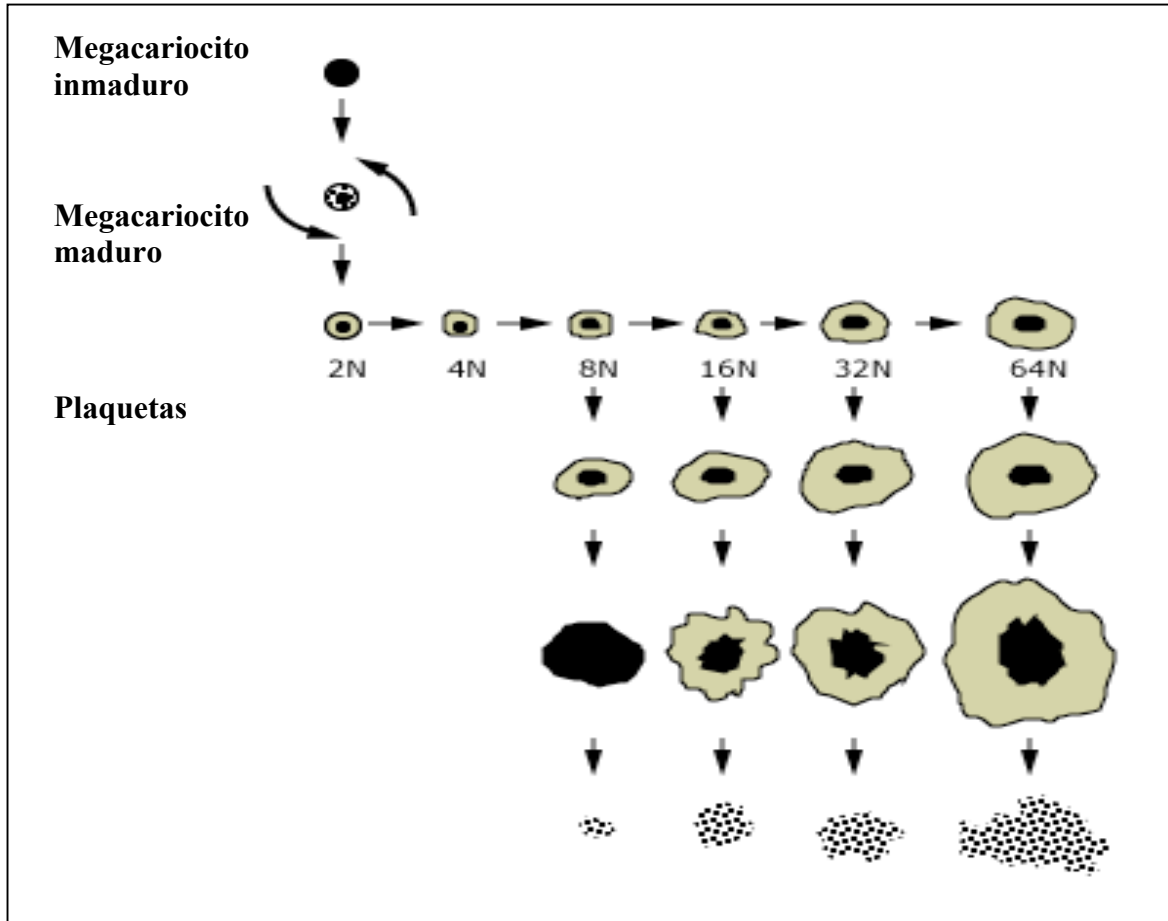
En humanos el progenitor megacariocítico mas primitivo identificado en médula fetal es la célula con alta capacidad proliferativa megacariocítica (HPPc-Meg) con capacidad de producir colonias puras de 300-1000 megacariocitos en un solo foco a los 21 días de cultivo. Las BFU (unidades formadoras de "Burst") megacariocíticas (BFU-Meg) representan el primer progenitor específico de la línea megacariocítica identificado en médula ósea y sangre periférica de adultos o en cordón umbilical. A partir de ellas se formaría un progenitor megacariocítico mas diferenciado como sería la unidad formadora de colonias megacariocíticas (CFU-Meg). CFU-Meg es la primera en la línea megacariocítica que puede ser identificada por un fenotipo de superficie distintivo. CFU-Meg dan lugar a los promegacarioblastos, célula con un papel transicional en el desarrollo mitótico de la línea megacariocítica al tener la doble propiedad de poder desarrollar bajo estímulos adecuados al menos una mitosis completa o por el contrario sufrir endomitosis con ploidía (2N-8N) y continuar en el proceso de diferenciación megacariocítica dando

lugar a los megacariocitos inmaduros o megacarioblastos. Al contrario que otras células en las que la ploidía aparece en respuesta al stress, las células de la serie megacariocítica son poliploides en su normal diferenciación. La poliploidía es una forma de aumentar la producción de plaquetas, ya que el volumen del citoplasma de los megacariocitos se incrementa de forma paralela con la ploidía.^{12, 13} (Esquema 1). Los megacarioblastos son una población celular heterogénea, que representaría el extremo más inmaduro de los megacariocitos. El megacarioblasto sigue sintetizando ADN sin realizar mitosis completas, mientras sufre endomitosis que incrementa su tamaño y ploidía con un contenido de ADN superior a 16N, a partir de una ploidía inicial 2N a 8N heredada de sus precursores los promegacarioblastos. Los megacariocitos inmaduros además de la evolución nuclear y de la ploidía, presentan maduración progresiva del citoplasma, acumulan un depósito de membranas, aportada por el sistema de demarcación de membranas, gránulos y proteínas del citoesqueleto, elementos que estarán presentes en el megacariocito maduro a partir del cual se iniciará la trombopoyesis.

La maduración de los megacariocitos a partir de las células hematopoyéticas pluripotente puede seguirse mediante la expresión característica de antígenos CD. La positividad CD34 se asocia con los progenitores megacariocíticos (HPPc-Meg, BFU-Meg, CFU-Meg) y los megacariocitos inmaduros. Los megacariocitos maduros son CD34 negativos, en contraste los progenitores megacariocíticos que son CD38 negativos, de forma que la maduración de los megacariocitos se correlaciona con positividad CD38.

Meg-CFC

Esquema 1. Representación esquemática de la megacariopoyesis



La célula hematopoyética pluripotencial produce un progenitor comprometido en la diferenciación megacariocítica (Meg-CFC) que sufre mitosis. Eventualmente esta célula comprometida para la mitosis, entra en endomitosis durante la cual ni el núcleo ni el citoplasma se dividen, pero si se produce replicación de ADN y se convierte en un precursor inmaduro poliploide. Una vez completada la endomitosis la célula progenitora inmadura se convierte en una célula madura identificable como megacariocito, que producirá plaquetas. (Modificado de David J Kuter, MD, PhD. 2010 UpToDate®)¹³

1.3.2 TROMBOCITOPOYESIS

Una vez alcanzado el estado de megacariocito maduro se inicia el proceso final de desarrollo que culminará con la síntesis y liberación de las plaquetas en sangre periférica, que denominamos trombocitopoyesis. De forma sintética está representada en el esquema 2, modificado de Patel SR. y cols.¹⁴

El megacariocito maduro, que se encuentra adyacente al estroma de médula ósea, sufre una serie de cambios morfológicos durante las 4-10 horas del proceso de producción de plaquetas. En primer lugar ocurre endomitosis nuclear y síntesis de organelas, junto a remodelación del citoplasma con formación de una serie de pseudópodos gruesos que contienen haces de microtúbulos de localización submembranosa. La matriz de microtúbulos constituidos por dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina emerge de los centrosomas, que entonces migran hacia la periferia. Mediante el corrimiento de los microtúbulos, el citoplasma del megacariocito desarrolla los gruesos pseudópodos preparando la formación de entre 5 y 10 proplaquetas¹⁵. Organelas y gránulos migran a lo largo de las microtúbulos mientras los pseudópodos van elongándose progresivamente formando los procesos proplaquetarios, formando en el extremo distal de los mismos un yema en forma de lágrima. Los procesos proplaquetarios se irán curvando y ramificando, a la vez que sufren constricciones, de forma que finalmente se desprenderán las proplaquetas más distales que acabarán fragmentándose en plaquetas. Las proplaquetas, que se extienden dentro del lado vascular del seno medular, tienen en promedio 250-500 μm de largo y pueden producir de 100 a 200 plaquetas cada una¹⁵. Las

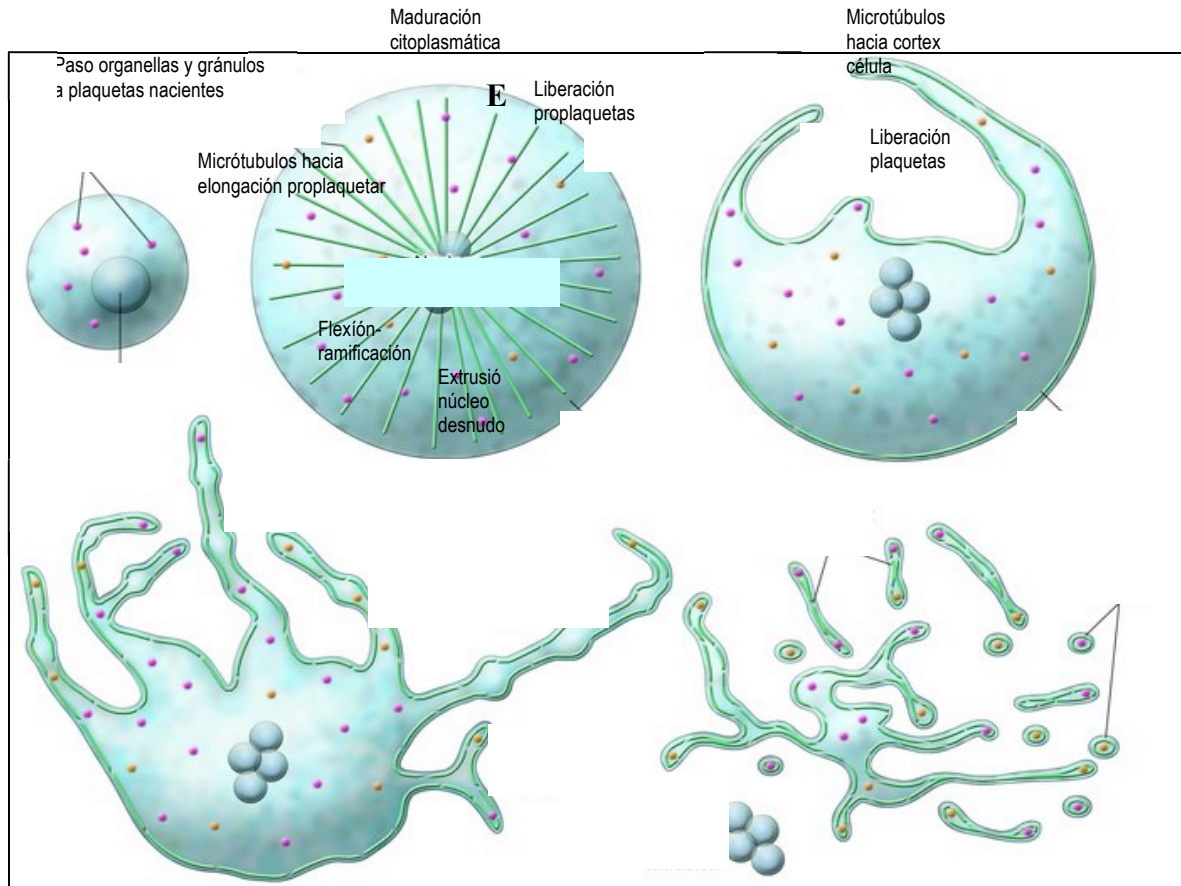
proplaquetas son entonces liberadas al seno vascular, a menudo apareciendo apareadas en forma de pesa. El núcleo es expulsado de la masa de proplaquetas, y las plaquetas individuales son mas tarde liberadas del extremo de las proplaquetas al fragmentarse en plaquetas por los puntos de constricción. En situaciones de trombocitopenia severa las proplaquetas muestran liberación de plaquetas tanto al compartimento profundo medular como al seno vascular.

La apoptosis (o muerte celular programada) juega un papel esencial en la formación y liberación de plaquetas^{16, 17}. Los megacariocitos jóvenes expresan proteínas que inhiben la apoptosis como son Bcl-2 y Bcl-xL. La sobreexpresión de estos factores inhibe la diferenciación de megacariocitos en proplaquetas. En contraste, las plaquetas maduras, no expresan Bcl-2 y los megacariocitos viejos no expresan Bcl-xL. Los megacariocitos también expresan factores proapoptóticos incluyendo caspasa, óxido nítrico, factor de crecimiento transformador (TGF-1) y SMAD proteínas. Las caspasas 3 y 9 activadas están envueltas en la formación de proplaquetas a partir de megacariocitos, pero las plaquetas maduras solo contienen caspasa 3. El óxido nítrico puede inducir tanto la formación de plaquetas como apoptosis en megacariocitos maduros y puede actuar sinérgicamente con la trombopoyetina (TPO) para inducir liberación de plaquetas. Así pues, megacariocitos y plaquetas tienen mecanismos diferentes y compartimentalizados, para la apoptosis y la selectiva expresión o bajo regulación de factores apoptóticos lo que podrá ser usado como un termostato biológico para el proceso de desarrollo proplaquetas-plaquetas.

Endomitosis nuclear

Núcleo

Esquema 2. Esquema de la producción de plaquetas por los megacariocitos.



En el paso de megacariocito (A) a producción de plaquetas (E), se producen una serie de eventos de forma sistemática. (B) La célula primero sufre endomitosis nuclear, síntesis de organelas, maduración y expansión citoplasmática mientras una raíz de microtúbulos emergiendo de los centrosomas se establece (C) Previo a la formación de proplaquetas, los centrosomas se desmontan y los microtúbulos se translocan al cortex celular. La formación de proplaquetas se inicia con el desarrollo de gruesos pseudópodos (D) El deslizamiento de microtúbulos conduce a elongación de proplaquetas mientras las organelas son colocadas al final de las proplaquetas donde, se originarán las plaquetas nacientes. La formación de proplaquetas continúa expandiéndose hacia la célula, mientras la flexión y ramificación amplifica los finales existentes de las proplaquetas (E). El citoplasma completo del megacariocito es convertido en una masa de proplaquetas, que será liberada de la célula. El núcleo es eventualmente extruido de la masa de proplaquetas y las plaquetas individuales son liberadas del extremo de las proplaquetas.(Modificado de Patel SR J. Clin Invest 2005)¹⁴

1.3.3 MECANISMOS DE CONTROL DE MEGACARIOPOYESIS Y TROMBOCITOPOYESIS.

La diferenciación de las células hematopoyéticas pluripotentes hacia la línea megacariocítica, la generación y producción de megacariocitos o la producción y liberación final de plaquetas está regulada por una serie de factores de transcripción y sustancias humorales o citoquinas. La regulación de la megacariopoyesis es un proceso complejo y dinámico, no completamente conocido, aunque si se conocen algunos de los factores que se consideran fundamentales, que requiere de un equilibrio entre factores estimuladores e inhibidores y en el que además juegan un papel las interacciones celulares entre precursores megacariocíticos, células de otras estirpes hematopoyéticas y las células del microambiente medular¹⁸. El complejo proceso de megacariopoyesis está gobernado por las funciones concertadas de múltiples genes. El análisis de cada uno de estos genes (especialmente factores de transcripción y sus genes diana) ha comenzado a aportar mejor conocimiento del proceso y ha revelado los mecanismos moleculares responsables de diversas enfermedades humanas.

Comentaremos brevemente algunos de estos factores fundamentales y con función bien establecida en el proceso de biogénesis de plaquetas.

1.3.3.1 TROMBOPOYETINA

La trombopoyetina (TPO) juega un papel central en la maduración de megacariocitos. Kelemen en 1958¹⁹, acuña el término TPO para describir la sustancia humoral causante del aumento de plaquetas en situación de

trombocitopenia. Sin embargo, no fue hasta 1995 en que fue caracterizado el polipéptido. La descripción del virus de leucemia mieloproliferativa murina en 1986 y su correspondiente oncogén (v-Mpl) y el protooncogén celular (c-Mpl) a principios de 1990 tuvo gran impacto en la investigación de la TPO. Basándose en un número de hallazgos estructurales primarios y secundarios compartidos, c-Mpl fue identificado como un miembro huérfano de la familia de receptores de citoquinas hematopoyéticas y se observó que el receptor c-Mpl se localizaba en células CD34+, megacariocitos y plaquetas. Finalmente en 1994 varios equipos de investigadores lograron purificar el ligando específico del receptor c-Mpl, denominándose TPO, ligando del c-Mpl, factor de crecimiento y diferenciación megacariocítico y megacariopoyetina. Tras la síntesis de la molécula y con la consecución de moléculas recombinantes de la misma, se ha podido utilizar en los cultivos celulares, lo que ha permitido avanzar en el conocimiento sobre la influencia de las citoquinas en las etapas precoces y tardías de la megacariocitopoyesis. Por otro lado, tras el fracaso inicial del uso de TPO en la clínica por la aparición de anticuerpos contra la TPO, la investigación y desarrollo de nuevos agentes miméticos de TPO va a permitir el inicio de nuevas formas de tratamiento en pacientes trombocitopénicos en determinadas circunstancias²⁰⁻²³.

La TPO es una glicoproteína de 80-90 KD que se sintetiza principalmente en el hígado (60%) y en menor medida en el riñón, médula ósea y bazo. Constituida por una serie de 353 aminoácidos, su estructura

está formada por un péptido con función de señal, un dominio aminoterminal similar a la eritropoyetina donde reside la actividad biológica, y un dominio carboxiterminal que confiere estabilidad a la molécula. La TPO se une a receptores específicos c-Mpl produciendo una transducción de señal con una cascada de fosforilaciones que incluyen JAK2 y Tyr112 que acaban produciendo incremento en la supervivencia celular, el desarrollo de poliploidía y la transcripción de proteínas necesarias para la maduración de megacariocitos²⁴ La TPO afecta casi a todos los aspectos de la producción de plaquetas, desde la autorrenovación y expansión de células hematopoyéticas pluripotentes, pasando por la estimulación de la proliferación de células progenitoras megacariocíticas, hasta el soporte de la maduración de estas células en células productoras de plaquetas²⁵. Su acción sin embargo, depende de la célula que sea estimulada, así en células progenitoras hematopoyéticas es el estímulo aislado mas importante para comprometerlas en la línea megacariocítica y junto con otras citoquinas como IL-11, SCF y eritropoyetina promueve la proliferación de células progenitoras²⁵. En los megacariocitos estimula la formación de megacariocitos mas grandes y poliploides y favorece la maduración citoplasmática permitiendo la formación de procesos proplaquetares, e induce la expresión de glicoproteínas de membrana específicas como Ib, IIb y IIIa y previene la apoptosis^{9,25}. Afecta a la plaqueta madura reduciendo los niveles de ADP, colágeno y trombina intraplaquetar necesarias para inducir agregación e incrementa la adhesión plaquetar a fibrinógeno, fibronectina y factor Von Willebrand²⁵.

Los niveles de TPO están inversamente relacionados con el número de plaquetas. Esta relación inversa no es lineal, de forma que en situaciones de destrucción plaquetar se encuentran niveles no tan altos como sería esperable por el grado de trombocitopenia, y al contrario en situaciones de trombocitosis reactiva se encuentran niveles de TPO más altos de los esperables. Los mecanismos reguladores de los niveles de TPO serían básicamente dos. El primero ya establecido para otros factores de crecimiento hematopoyético, como factor de crecimiento de macrófagos (M-CSF), sería un control postranscripcional en el que la TPO circulante se uniría a su receptor con posterior internalización celular y degradación. Así se obtendría una autorregulación de forma que la elevación del número de plaquetas circulantes extraería TPO circulante y al contrario en situaciones de descenso de plaquetas existirían menos plaquetas para adsorber TPO lo que conduce a aumentar los niveles de TPO y de esta forma estimular la trombopoyesis. El segundo mecanismo sería un mecanismo transcripcional de forma que se incrementaría el mARN para aumentar la síntesis de TPO. Dos serían los estímulos principales; la existencia de trombocitopenia severa provoca un incremento de mARN en las células estromales de médula ósea, aunque no está claro en la actualidad los mecanismos celulares o humorales que los median, y por otro lado el mARN de TPO a nivel hepático incrementa bajo el estímulo de reactantes de fase aguda como la IL-6, lo cual explicaría el hallazgo de valores de TPO mayores de los esperados para el grado de trombocitosis en situaciones de inflamación.²⁵.

1.3.3.2 OTRAS CITOQUINAS.

Otras citoquinas incluyendo IL-3, el factor estimulador de las colonias granulocito/macrófago (GM-CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) han demostrado que son importantes en la megacariopoyesis normal, pero al contrario de TPO que juega un papel a lo largo de toda la megacariopoyesis estas citoquinas la afectan en los estadios iniciales de desarrollo de la línea megacariocítica. IL-3 actúa sobre las células progenitoras de médula ósea en el estadio CFU-MK para el desarrollo de MK. El GM-CSF actúa principalmente en la BFU-MK y poblaciones de MK inmaduros. El G-CSF tiene su principal papel en la estimulación de la línea granulocítica, pero se ha visto que tiene un papel en la estimulación de progenitores de médula ósea de múltiples líneas hematopoyéticas. En estadios tardíos de desarrollo de MK, el G-CSF suprime la maduración de MK. Otras citoquinas como (IL-1, IL-6, IL-11, IL-12, eritropoyetina (EPO)) así como quemoquinas (factor1 derivado de células estromales (SDF1) y CXCL12 (PF4) también contribuyen a la megacariopoyesis, como factores coadyuvantes¹¹. Interferón α induce trombocitopenia mediante la inhibición de la síntesis de GATA-1 y factor eritroide nuclear 2 (NF-E2), mientras interferón γ promueve la diferenciación de megacariocitos, incluyendo poliploidización, por activación de STAT1¹².

1.3.3.3 GATA-1 Y SU COFACTOR FOG-1.

GATA-1 junto con NF-E2 serían los factores de transcripción

fundamentales implicados en los procesos de megacariopoyesis y trombopoyesis.

La familia de proteínas GATA son factores de transcripción que contienen dos dominios, en el C-terminal necesaria para unirse a las secuencias de unión y en el N-terminal necesaria para la estabilización del C-terminal en células hematopoyéticas²⁴. La proteína GATA-1 es codificada por un gen ligado al cromosoma X y requiere de la unión a su cofactor FOG-1 para su acción. Los estudios con ratones han demostrado que GATA-1 requiere de la unión con FOG-1 para ejecutar su programa completo in vivo, aunque la interacción de GATA-1 no es exclusiva con FOG-1²⁴. La trombocitopenia ligada a cromosoma X descrita en 2001 por Mehaffey et al.²⁶ es debida a una mutación de GATA-1 que inhibe su asociación con FOG-1. En estudios en ratones se observó que la interacción GATA-1/FOG-1 es necesaria en estadios tardíos de megacariopoyesis, detectándose trombocitopenia severa junto con presencia de megacariocitos mas abundantes pero con pérdida de ploidía, con incremento de células mononucleares y con alteración de la producción de proplaquetas²⁴.

1.3.3.4 FACTOR ERITROIDE NUCLEAR 2 (NF-E2)

El NF-E2 es un factor de transcripción expresado en células eritroides, megacariocitos y mastocitos. NF-E2 es un heterodímero compuesto de una subunidad de 45-kDa (p45) restringida a la serie hematopoyética y una subunidad de 18kDa expresada en megacariocitos (Maf-F, Maf-G). NF-E2

regula la transcripción de genes de megacariocitos como los de β -tubulina, tromboxano sintetasa y Rab27b²⁷. Como se ha descrito previamente la fase final de diferenciación de megacariocitos, previa a la liberación de plaquetas, sería la formación de proplaquetas. Para la formación de proplaquetas es necesaria la presencia de microtúbulos. La β 1-tubulina, gen diana de NF-E2, es el componente principal de estos microtúbulos. Los estudios en animales de experimentación con pérdida homocigota de NF-E2 conducen a letalidad neonatal debido a hemorragia por trombocitopenia periférica, aunque tiene niveles elevados de megacariocitos que expresan PF4 y gpIIb pero que no pueden madurar de forma apropiada. Así mismo, los progenitores megacariocíticos muestran una respuesta reducida a la TPO lo que indicaría que NF-E2 también jugaría un papel en la diferenciación megacariocítica de los progenitores ¹¹.

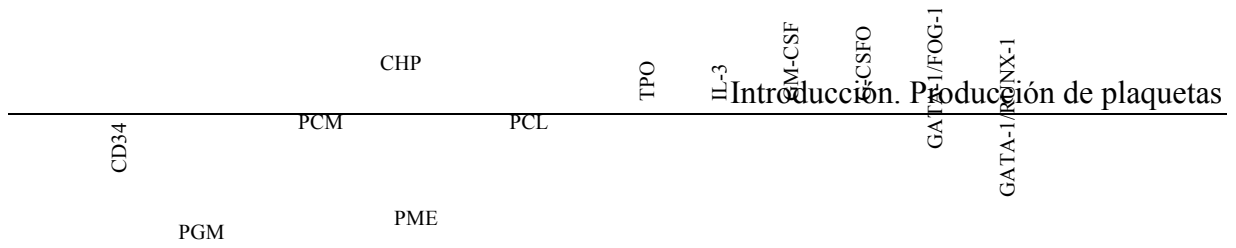
1.3.3.5 OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA MEGACARIOPOYESIS.

Familia de genes Ets: Los factores Ets pueden actuar como reguladores transcripcionales positivos o negativos de la expresión de genes que están involucrados en diversos procesos biológicos, incluyendo los que controlan la proliferación celular, diferenciación, hematopoyesis, apoptosis, metástasis, remodelación de tejidos, angiogénesis y transformación. Inicialmente la mayoría de factores Ets fueron caracterizados como activadores o represores transcripcionales, los estudios posteriores han demostrado que varios de los factores Ets pueden funcionar tanto como activadores o represores,

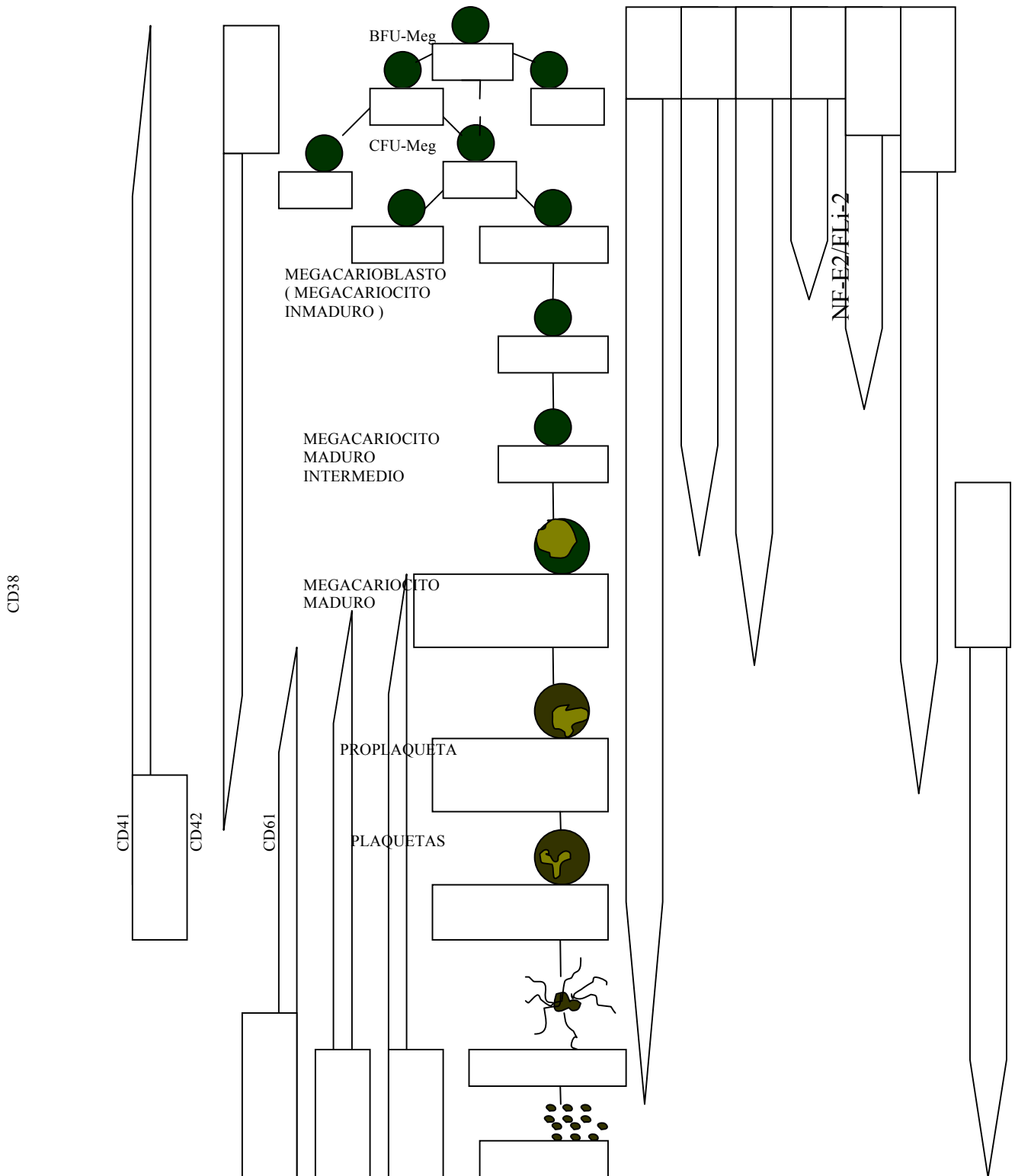
dependiendo del promotor específico y el contexto celular.¹¹.

Fli-1: Es un miembro de la familia de genes Ets de factores de transcripción, realiza funciones críticas para el desarrollo normal y en la oncogénesis. La evidencia acumulada indica que Fli-1 es un regulador positivo de megacariopoyesis mientras es un regulador negativo de diferenciación eritroide¹¹.

RUNX1: La familia de transcritores CBF (core binding factor), está formado por tres proteínas de unión ADN homólogas RUNX 1-3 y un componente de unión no-ADN, CBF- β . El complejo RUNX1 y CBF- β participa en la programación ontogénica hematopoyética y representa la diana mutacional más común en las leucemias aguda humanas²⁸. RUNX1 es un factor de transcripción necesario para la maduración megacariocítica que actúa independiente y sinérgicamente con GATA-1²⁹. En el esquema 3, modificado de Szalai y cols¹¹.se intenta sintetizar el proceso de megacariopoyesis y trombopoyesis con los factores que más influyen en su desarrollo.



Esquema 3. Visión global esquemática de megacariopoyesis y los principales factores de transcripción implicados. (Modificado de Szalai, 2006)¹¹



- 1- célula hematopoyética pluripotente diploide (CHP)
- 2- progenitor común linfoide (PCL)
- 3- progenitor común mieloide (PCM)
- 4- progenitor granulocito/ macrófago (PGM)
- 5- progenitor megacariocito /eritroide (PME).
- 6- célula con alta capacidad proliferativa megacariocítica (HPPc-Meg)
- 7- (unidades formadoras de Burst) megacariocíticas (BFU-Meg)
- 8- unidad formadora de colonias megacariocíticas (CFU-Meg).
- 9- megacarioblasto (megacariocito inmaduro)
- 10- megacariocito maduro intermedio
- 11- megacariocito maduro
- 12- proplaqueta
- 13- plaquetas

1.4 TROMBOCITOPENIAS: GENERALIDADES

1.4.1 CONCEPTO DE TROMBOCITOPENIA.

Trombocitopenia o plaquetopenia es la disminución de la cifra de plaquetas sanguíneas por debajo del límite inferior mas ampliamente aceptado en la mayoría de tratados de Hematología, $150 \times 10^9/L$. Este número refleja las plaquetas que circulan libremente en el árbol vascular. No existen variaciones apreciables en el número de plaquetas de un mismo individuo. Las mujeres y los niños presentan cifras relativamente superiores y valores de volumen plaquetar medio (VPM) proporcionalmente inferiores. La gestación provoca una moderada trombocitopenia fisiológica por lo que, durante la misma, hay que disminuir el límite inferior de normalidad hasta $120 \times 10^9/L$.

En los últimos años el uso sistemático de contadores automáticos de células ha favorecido la detección, con relativa frecuencia, de trombocitopenias leves entre 100 y $149 \times 10^9/L$, en ausencia de diátesis hemorrágica. En este rango de trombocitopenias leves aunque es posible detectar trombocitopenias autoinmunes o de otra etiología, también es la franja de valores en las que se detecta con más frecuencia trombocitopenias sin clara significación patológica. Por este motivo algunos autores han sugerido una reducción del límite inferior de normalidad a alrededor de $100 \times 10^9/L$, especialmente si se inician exploraciones con finalidad diagnóstica.

1.4.2 CINÉTICA PLAQUETARIA. DISTRIBUCIÓN Y DESTRUCCIÓN PLAQUETAR.

El aporte plaquetario depende del eje productivo, es decir de la megacariocitopoyesis y trombocitopoyesis. Una vez en el torrente circulatorio, las plaquetas se distribuyen en 2 compartimentos: Uno circulante, que alberga 2/3 de las plaquetas producidas y otro extravascular, ubicado básicamente en el bazo, que contiene el restante 1/3 de plaquetas producidas.

La producción diaria de plaquetas que se ha calculado entre $35-45 \times 10^9/L$, es suficiente para compensar las pérdidas fisiológicas, que ocurren por el mantenimiento de la integridad vascular ($7 \times 10^9/L$), la utilización en procesos inflamatorios y por la destrucción ligada al envejecimiento que se produce básicamente en bazo, y en menor medida en hígado, médula ósea y otros tejidos⁹.

- a. La destrucción plaquetar como parte de su evolución vital depende, en gran medida, de los cambios producidos en la membrana; pérdida de ácido siálico, presencia de inmunoglobulinas y pérdida de la asimetría de fosfolípidos, con aparición de fosfatidilserina en el exterior.

La supervivencia plaquetar, o tiempo medio en que las plaquetas liberadas de la médula ósea permanecen en la circulación, es de 8-10 días en humanos. Este tiempo se puede determinar con precisión con métodos isotópicos, como es el marcaje de las plaquetas con Indio¹¹¹. Sin embargo, existen otros métodos directos no isotópicos para medir la vida media plaquetar, como son cuantificar la inactivación irreversible de la ciclooxigenasa plaquetar o de la monoamino oxidasa,

o de forma indirecta, midiendo los porcentajes de plaquetas más jóvenes ^{30,31}.

La secuencia evolutiva de producción, liberación, distribución y destrucción independiente de cada una de las plaquetas conlleva heterogeneidad en los elementos circulantes. Por lo tanto, estas células son heterogéneas en cuanto a tamaño, densidad, contenido y capacidad funcional.

Se acepta que la biomasa plaquetaria o masa plaquetaria total (número de plaquetas x VPM) es el parámetro cuantitativo más importante de las plaquetas y es el que ejerce mayor influencia en los mecanismos reguladores de la trombocitopoyesis. Existe una correlación inversa entre el VPM y el número de plaquetas circulantes. En individuos sanos el número de plaquetas se correlaciona directamente con la ploidía y el número de megacariocitos, mientras que el VPM se correlaciona directamente con el volumen megacariocítico, que viene determinado por la ploidía. La masa plaquetar, en ausencia de estrés hemostático, tiende a mantenerse constante en un individuo, aunque la relación entre el número de plaquetas y el VPM no sea exacta. Así pues, el VPM deja de disminuir a partir de recuentos superiores a $450 \times 10^9/L$. La distribución de volúmenes plaquetares es unimodal y lognormal con alto grado de dispersión, variando en condiciones normales entre 2,2 y 21 fl con VPM entre 6,5 y 10,5fl. Sin embargo, los resultados que se detectan son variables según el método de medición empleado. Los volúmenes plaquetares que se obtienen son siempre superiores a los valores reales debido a la activación plaquetar que se produce durante la extracción, al contactar estas células con los anticoagulantes y otros elementos externos.

1.4.3 MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS DE LAS TROMBOCITOPENIAS

El mantenimiento fisiológico del número de plaquetas circulantes requiere básicamente de un correcto balance entre la producción y las pérdidas, así como de una correcta distribución entre el compartimiento circulante y el compartimiento extravascular. La pérdida de equilibrio en cualquiera de los niveles puede conducir a un mismo resultado; la reducción del número total de plaquetas circulantes.

1.4.3.1 TROMBOCITOPENIAS CENTRALES.

Se producen por alteración en alguno de los precursores plaquetares. Cuando el problema afecta la “stem cell” pluripotente se asocia a otras citopenias. En cambio, si el precursor afectado ya está comprometido en la línea megacariocítica suele desarrollarse una trombocitopenia aislada. Según el tipo e intensidad de la lesión celular puede existir desde una aplasia total de la línea megacariocítica a una trombocitopoyesis ineficaz, en la que los progenitores y megacariocitos están presentes pero no son capaces de producir plaquetas en cantidades adecuadas.

1.4.3.2 TROMBOCITOPENIAS PERIFÉRICAS.

Son producidas básicamente por dos mecanismos:

1. Incremento de la destrucción.
2. Consumo.

Ambas situaciones provocan respuestas compensadoras similares:

- a. En las primeras horas aumenta el VPM y se producen citoquinas estimuladoras de la megacariocitopoyesis y de la producción de plaquetas, principalmente la trombopoyetina (TPO). Este aumento de VPM puede estar relacionado con un incremento del número de plaquetas reticuladas y plaquetas de estrés (o proplaquetas) por desprendimiento acelerado de estructuras plaquetares desde el citoplasma megacariocítico. La respuesta que ocurre a partir de las 48 horas está mediada por la TPO y se expresa con un aumento de la ploidía y del tamaño de megacariocitos, y consecuentemente de su capacidad de producir plaquetas.
- b. Si la causa de la trombocitopenia persiste en el tiempo, se induce un aumento de la producción de citoquinas estimuladoras y, seguidamente una estimulación de la proliferación de progenitores en un intento de mantener la hiperproducción de plaquetas.

1.4.3.3 TROMBOCITOPENIAS POR ALTERACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN.

En realidad no existe una disminución de la masa plaquetaria por lo que en esta situación clínica no se pone en marcha ninguna de respuesta compensadora, o en todo caso, ésta no es evidente.

1.4.3.4 TROMBOCITOPENIAS POR MECANISMOS MIXTOS.

En muchas ocasiones, el mecanismo que origina la trombocitopenia no es puro, si no que existe afectación a diversos niveles. En la etiología autoinmune, los antígenos compartidos por

plaquetas y megacariocitos pueden dar lugar a una afectación megacariocítica que se suma a la trombocitopenia por hiperdestrucción periférica. Incluso en algunos casos, puede asociarse a cierto grado de secuestro. En otras ocasiones las plaquetas generadas por megacariocitos anómalos pueden ser defectuosas y provocar secundariamente un acortamiento de su supervivencia.

1.5 Citometría de flujo. Principios generales. Aplicación al estudio de las plaquetas.

En los últimos 15 años la citometría de flujo se ha introducido de forma rápida y progresiva en múltiples ámbitos de estudio de la Hematología, especialmente en el campo diagnóstico, gracias a los avances tecnológicos que han permitido la difusión y aplicación clínica de esta técnica.

En relación con el estudio de las plaquetas se ha aplicado tanto en la identificación de alteraciones cualitativas del funcionalismo plaquetar como en la evaluación de la activación plaquetaria, el análisis de anticuerpos antiplaqueta o el estudio de la cinética plaquetar. Sin embargo, la aplicación clínica de la citometría de flujo en el estudio de las plaquetas se ve limitada por dificultades metodológicas en el análisis de las muestras. Por este motivo, recientemente se ha divulgado un documento de consenso que permite estandarizar los métodos de estudio de la función plaquetar por citometría de flujo^{32,33}.

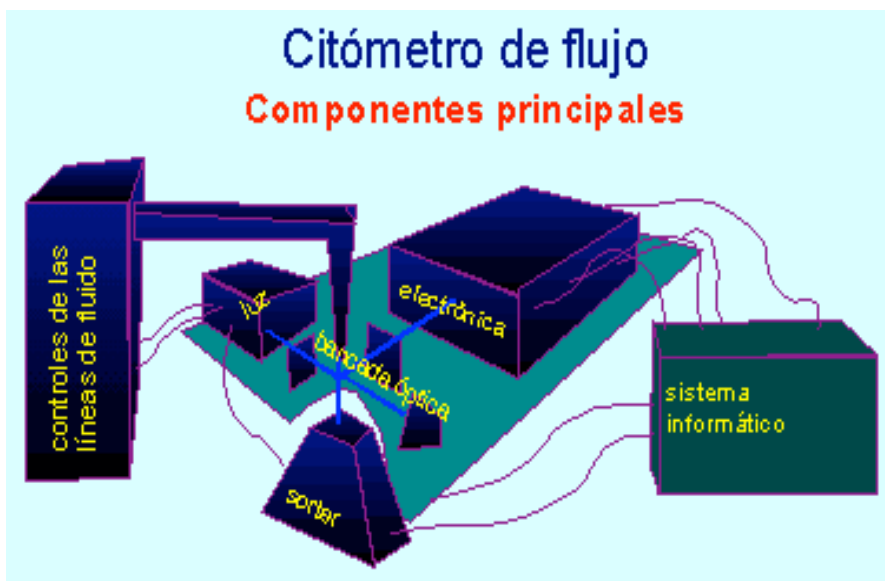
1.5.1 PRINCIPIOS GENERALES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría de flujo permite medir las características físicas y/o químicas de las células que se analizan, así como evaluar otras propiedades biológicas de las mismas. Básicamente, el citómetro mide los cambios de absorción y dispersión de luz provocados por la célula o partícula subcelular que se estudia tras ser sometida a un haz de luz determinado, así como la fluorescencia emitida por fluorocromos unidos a componentes celulares que se están estudiando sometidos al mismo haz

luminoso.

En la figura 1, podemos ver la composición esquemática de un citómetro de flujo.

Figura 1. Componentes principales de un citómetro de flujo^{34,35, 35}



1. **Fuente de luz.** Es necesario una fuente de luz altamente direccionada, concentrada en un haz estrecho, monocromática, coherente e intensa, motivos por los que lo habitual es utilizar como fuente de luz un láser. Los más utilizados son los láseres de Argón o Kriptón, que pueden estar refrigerados por agua o por aire. Actualmente se utilizan cada vez más los láseres de Argón de baja intensidad (10-15 mW) refrigerados por aire y que pueden ser usados en la mayor parte de aplicaciones citométricas.

Otra fuente de luz utilizada con menor frecuencia son las lámparas de

arco de Mercurio o Xenón, pero su emisión decrece con el tiempo y son menos estables.

2. **Cámara de flujo.** Es la zona del instrumento donde se orienta el flujo de células y se consigue el paso de éstas de forma individual. En los citómetros que utilizan el láser como fuente de luz, existen dos tipos de cámaras de flujo: las cerradas y las abiertas. Las cámaras cerradas son las más utilizadas, consiguen flujos laminares con velocidades de flujo inferiores y producen menos ruido lumínico, pero tienen el inconveniente que no permiten una fácil eliminación de los coágulos o suciedad.

3. **Sistema óptico.** Está constituido por lentes, espejos dicróicos y filtros, que enfocan el haz de luz para iluminar la muestra y descomponen la fluorescencia en sus componentes individuales.

Los instrumentos con fuente de iluminación láser tienen una configuración ortogonal, es decir que son perpendiculares los ejes de iluminación, detección y paso de muestra.

4. **Detectores:** Es el conjunto de elementos que detectan y convierten las señales luminosas en impulsos eléctricos y estos en señales digitales. Existen 2 tipos de detectores de luz los fotomultiplicadores y los fotodetectores diodos o de estado-sólido.

Fotomultiplicadores: Se usan para la detección de la señal de

fluorescencia y luz dispersada a 90°. Tienen una buena ratio señal/ruido, aunque su eficiencia cuántica es baja.

Fotodetectores diodos: Se usan para detectar la dispersión frontal de la luz. Son muy resistentes y eficientes (señales fuertes), pero tienen una baja ratio señal/ruido lo cual les hace poco útiles para señales débiles.

5. Sistemas de inyección de la muestra. Es muy importante que la velocidad de la muestra sea constante. Hay dos sistemas: Por presión y por inyección isovolumétrica con jeringa, ésta última permite velocidades inferiores de flujo y contar mejor las células.

6. Componente electrónico: Los pulsos luminosos detectados por los fotodetectores pasan a un amplificador que convierte posteriormente la señal analógica en digital. Se pueden realizar amplificaciones lineales o logarítmicas. Existe también la posibilidad de seleccionar un umbral de señal, es decir un nivel por debajo del cual las señales son desechadas. Tras el procesamiento informático de la señal digital se realiza la adquisición, almacenamiento y análisis de los datos en tiempo real o en modo de matriz de datos.

Foto 3. Aspecto externo de un citómetro real, en este caso Becton Dickinson FACSCalibur, que es el que tenemos disponible en nuestro centro.



El principio básico de la citometría de flujo consiste en hacer pasar partículas o células en una suspensión con flujo laminar por delante de una fuente de luz, habitualmente un láser de Argón, como ya hemos comentado. Posteriormente, mediante los detectores, se recoge el patrón de dispersión de la luz que ha originado cada una de las células³⁶ y la luz emitida por los fluorocromos estimulados por la fuente de luz.

1. Los patrones de dispersión recogidos son básicamente dos: La dispersión frontal o “forward scatter” (FSC), que nos da idea del tamaño de la célula, y la

dispersión lateral o "side scatter" (SSC), que nos acerca a la complejidad de la célula.

A pesar de que la luz se dispersa en todas las direcciones tras contactar con la célula, la cantidad de luz dispersa en ángulos pequeños 10-20° ("Forward Scatter", FSC), alrededor del eje del haz de láser, se relaciona con el tamaño relativo de la célula de forma que cuanto mayor es la partícula, mayor será la dispersión. Las plaquetas, por ejemplo, tienen valores de FSC inferiores a cualquier otra célula de la sangre, debido a su pequeño tamaño, lo que permite su reconocimiento. Sin embargo, existen otros factores que influyen en la correlación entre el tamaño de la célula y el valor de FSC, como pueden ser la simetría celular o la presencia de componentes celulares que absorben la luz incidente. Este aspecto debe ser considerado cuando se usa la medición de FSC para estimar tamaños relativos de células, en poblaciones de células heterogéneas.

La intensidad de la luz del láser que se dispersa ortogonalmente es decir, perpendicularmente en relación al haz de luz ("Side Scatter", SSC), representa principalmente la luz reflejada por estructuras internas o de la superficie de la célula y es interpretada como un índice de granularidad. La diferenciación entre diferentes tipos de células de sangre humana es más fiable cuando se utiliza la combinación biparamétrica de FSC y de SSC, que con la utilización aislada de cada uno de los parámetros.

2. *Fluorescencia*. Las células se pueden marcar con un reactivo, como puede

ser un anticuerpo monoclonal o policlonal unido a un fluorocromo que se fija de forma específica a la estructura celular que nos interesa estudiar. La utilización de fluorocromos permite detectar y cuantificar diversos parámetros celulares. La fluorescencia emitida por estas moléculas, cuando son excitadas por el haz de luz, genera información acerca de su presencia en células o partículas individuales. La determinación de la fluorescencia permite detectar diferencias cuantitativas entre células o partículas. Así por ejemplo, con los fluorocromos más comunes podemos detectar diferencias de fluorescencia (inferiores a 2.000 moléculas de fluorescencia) entre células o partículas.

Los fluorocromos, o colorantes fluorescentes, se agrupan básicamente en 3 categorías: a) Colorantes orgánicos de bajo peso molecular, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), b) pigmentos biológicos como la ficoeritrina (PE) y proteína peridín clorofila (PerCP) y c) sistemas de tinción tandem, como colorante de energía acoplada (ECD) y Cycromo (CyC). Tras la excitación de las moléculas de fluorocromo por la fuente de luz (láser), estas retornan a su estado basal emitiendo una luz de longitud de onda superior. Esta luz pasa a través de diversas lentes y se dirige hacia una serie de filtros y detectores que reconocen determinadas longitudes de onda. Varios sensores se encargan de detectar estas señales y de transformar la intensidad lumínica en una señal digital que posteriormente puede ser analizada por un ordenador. Los resultados se muestran en forma de histograma o bien como gráfico de puntos. Los citómetros equipados con un solo láser suelen tener 3 detectores de fluorescencia por lo que es posible estudiar hasta 5 parámetros

diferentes en una misma célula: tamaño, complejidad, y fluorescencia de 3 longitudes diferentes

1.5.2 CITOMETRÍA DE FLUJO Y ESTUDIO DE PLAQUETAS. METODOLOGÍA.

Los avances en los últimos años en la citometría de flujo tanto desde el punto de vista metodológico, instrumental como en el reconocimiento e identificación de nuevos antígenos, con la creación de sus respectivos anticuerpos monoclonales, ha permitido que la citometría de flujo pueda ser utilizada en la actualidad como técnica de medición, estudio e investigación de las plaquetas tanto desde el punto de vista funcional como morfológico³⁷.

1. Morfología

Como ya hemos comentado la citometría permite el estudio morfológico de las células o partículas que se estudian, y las plaquetas no son una excepción. Los cambios morfológicos que se producen durante la activación plaquetar, en la que la plaqueta pierde su forma discoide, adquiriendo una forma esférica por reorganización del citoesqueleto, con emisión de pseudópodos y degranulación, tienen su traducción en cambios concomitantes en las señales FSC y SSC

2. Antígenos plaquetarios

La utilización de anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes ha permitido la detección y cuantificación de numerosos antígenos plaquetarios por

citometría de flujo. La función de muchas de las glicoproteínas de membrana plaquetar actualmente es conocida y están disponibles anticuerpos monoclonales contra las mismas, de forma que la tinción con anticuerpos marcados con fluorocromos permite un análisis de alta especificidad y sensibilidad. Sabemos que algunos antígenos se expresan en la superficie tras la activación plaquetaria, pero no en la plaqueta en reposo, por lo que su identificación permitirá estudiar la activación plaquetaria. Otra de las utilidades del inmunofenotipaje de plaquetas es permitir identificar de forma inequívoca que las partículas que estudiamos son plaquetas. Así, marcadores como CD41, CD42 y CD61, específicos para glicoproteínas constitutivas de la membrana plaquetaria, permiten distinguir las plaquetas del ruido de fondo o "debris". Adicionalmente, en determinadas situaciones patológicas, es posible caracterizar anomalías en la expresión de glicoproteínas de la membrana, como ocurre en el síndrome de Bernard Soulier y en la trombostenia de Glanzmann.

3. Procesos de activación

Durante la activación de la plaqueta se producen cambios en la membrana que incluyen: a) Alteraciones cuantitativas de glicoproteínas de membrana en reposo; b) Alteraciones conformacionales de receptores y sus ligandos; c) Exposición de componentes de la membrana plaquetar, habitualmente no expuestos; d) Unión a la membrana de las plaquetas de proteínas solubles liberadas durante la secreción; e) Expresión de actividad procoagulante y formación de

micropartículas; f) Otros fenómenos bioquímicos intracelulares de activación, como flujos iónicos, formación de peróxidos y radicales libres o cambios de potencial de membrana. Muchos de estos cambios pueden ser detectados por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos conjugados con un fluorocromo.

4. Detección de anticuerpos antiplaquetarios por citometría de flujo

La citometría de flujo permite la identificación y cuantificación de inmunoglobulinas unidas a plaquetas usando antisueros IgG e IGM anti-humanos, con alta sensibilidad. La determinación puede realizarse directamente, para detectar anticuerpos unidos a las plaquetas o indirectamente tras incubar con suero problema detectando anticuerpos dirigidos contra plaquetas

5. Análisis citométrico del proceso de trombopoyesis

La citometría permite el estudio del proceso de trombocitopoyesis de forma indirecta basándose en el contenido relativo de ARN, que se relacionaría con el grado de maduración de la población que contiene ARN., es decir mediante la determinación de plaquetas reticuladas^{38,39,40}.

Ventajas y limitaciones de la citometría de flujo en el estudio de las plaquetas

Ventajas

- La citometría de flujo permite determinar rápidamente características específicas de un gran número de células individuales. Al permitir analizar poblaciones

plaquetarias, en las que las plaquetas se evalúan una a una, es posible identificar subpoblaciones.

- Permite evaluar tanto el estado de activación de las plaquetas circulantes como la reactividad plaquetaria. Para el estudio de la activación plaquetaria in vivo, la posible activación ex vivo puede ser evitada mediante la fijación inmediata de las muestras de sangre, antes de proceder a su manipulación

- Se dispone comercialmente de muchos anticuerpos y fluorocromos que permiten detectar numerosos parámetros plaquetarios, incluyendo diversos marcadores de activación. Los nuevos anticuerpos monoclonales desarrollados contra nuevos epítomos funcionales se pueden incorporar fácilmente en los ensayos.

- El estudio por citometría requiere pequeñas cantidades de muestras, que pueden ser sangre entera, suspensiones de plaquetas lavadas, filtradas en gel o plasma rico en plaquetas (PRP).

- En el análisis de sangre entera la manipulación es mínima, de forma que minimiza en parte, la activación artefactual y la posible pérdida de subpoblaciones plaquetarias. Al contrario, la utilización de suspensiones de plaquetas, como en los estudios de función plaquetaria, son susceptibles de activación artefactual in vitro, como resultado de los procedimientos de separación.

Limitaciones

- Los citómetros de flujo son aparatos muy caros, por lo que no están aún

disponibles en muchos laboratorios.

- La citometría de flujo no permite una fácil cuantificación absoluta de los antígenos detectados. Aunque, existen métodos disponibles para la cuantificación del número de anticuerpos unidos por célula.

- Las plaquetas son heterogéneas en tamaño, entre 1-4 μm , y los elementos de menor tamaño están en el límite de resolución del instrumento (1 μm), por lo que pueden ser difíciles de diferenciar del ruido de fondo ("debris"). También por su reducido tamaño, la señal de fluorescencia también es más débil con respecto a marcajes fluorescente de otras células. Por esa razón la adquisición de los datos debe ser efectuada con amplificación logarítmica. Sin embargo, los citómetros más modernos presentan resoluciones superiores, que permiten distinguir y estudiar con mayor exactitud la población plaquetaria.

- En ocasiones, hay dificultades en preservar el marcador, por ejemplo la P-selectina no se preserva bien, especialmente si es fijada.

- La citometría de flujo solo mide la función de las plaquetas circulantes. Mientras los estudios actuales de β -TG y PF4, plasmáticos o los análisis de metabolitos de Tromboxano A2 plasmáticos y urinarios, reflejan también la activación plaquetaria en la pared del vaso y de las plaquetas separadas de circulación.

- La elección de los parámetros adecuados para analizar el fenómeno de interés y la valoración de los resultados, teniendo en cuenta las condiciones experimentales

subyacentes, serán posiblemente las principales limitaciones de la citometría de flujo en el estudio de la función plaquetaria.

En resumen, teniendo en cuenta las ventajas y limitaciones para la utilización de la citometría de flujo en el estudio de las plaquetas algunos de los aspectos que deberemos tener en cuenta para obtener los mejores resultados, especialmente cuando se trate de estudios funcionales, son los siguientes:

a) Reducir al mínimo la manipulación de la muestra, dado que las plaquetas son células muy sensibles y se activan fácilmente en respuesta a diversos estímulos. Por este motivo, es mejor trabajar con sangre total de extracción reciente, con mínima estasis, anticoagulada con citrato sódico tamponado y con fijación leve (paraformaldehído al 0,3%).

b) Trabajar a temperatura ambiente tanto la dilución de la muestra, para su posterior marcaje, como las incubaciones con los diversos reactivos.

c) Utilizar reactivos (anticuerpos monoclonales y policlonales o proteínas) ya conjugados con fluorocromos, para poder realizar un marcaje directo y evitar así fases de lavados que activarían las plaquetas.

d) Para trabajar con sangre total es necesario diferenciar las plaquetas de otras células sanguíneas y del ruido de fondo del aparato. El mejor método es utilizar un anticuerpo que reconozca alguna estructura específica plaquetar, como la glicoproteína IIb-IIIa (GPIIb-IIIa), para que el citómetro pueda discriminar aquellas

partículas positivas para dicho anticuerpo⁴¹. Los dos anticuerpos monoclonales más utilizados para identificar las plaquetas son CD41 y CD61. El anticuerpo anti-CD61 reconoce una proteína de 110-kDa, conocida como GPIIIa, que es la subunidad-β (integrina β3) del complejo GP IIb-IIIa y del receptor vitronectina (VNR). El antígeno CD61 se encuentra en todas las plaquetas, tanto en reposo como activadas. Aunque, también se ha descrito en células endoteliales y algunas líneas celulares leucémicas linfoides T, eritroides y mieloides. Así, las plaquetas de pacientes con trombostenia de Glanzmann, que tienen un defecto congénito de GPIIb-IIIa, muestran una reducción del 90% de unión al CD61. En los portadores heterocigotos de esta enfermedad la reducción es aproximadamente del 50%. El anticuerpo anti-CD41 reconoce el antígeno de membrana formado por el complejo glicoproteico IIb-IIIa de la línea megacariocítico-plaquetaria.

1.5.3 PLAQUETAS RETICULADAS. DETERMINACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las plaquetas reticuladas (PR) son las formas más jóvenes de las plaquetas circulantes y tienen como características más destacables, la presencia de ARN mensajero (ARNm) residual y de retículo endoplásmico rugoso (RER), con capacidad de sintetizar pequeñas cantidades de proteínas de gránulos α y membrana principal. En modelos animales se ha observado que el ARNm es inestable y se degrada en 24 horas^{42,43}, desapareciendo de forma paralela al envejecimiento de las plaquetas. Las plaquetas reticuladas son funcionalmente más activas, recién liberadas a sangre periférica tras su génesis en el citoplasma de los

megacariocitos y, según diversos estudios, tienen una vida media de alrededor de unas 24h. Constituyen por tanto, el equivalente plaquetario de los reticulocitos de la serie roja, por lo que pueden ser un buen marcador de la trombocitopoyesis, como los reticulocitos lo son de la eritropoyesis.

En 1969, Ingram y Coopersmith describieron por primera vez, un nuevo tipo de plaquetas, que contenían condensaciones punteadas y dispersas (reticulum) en el citoplasma. Esta observación, procedía de un modelo animal de pérdida de sangre, mediante tinción con azul de metileno y visión directa por microscopio óptico de las extensiones periférica. Estos autores, describieron en dicho artículo las características morfológicas de las plaquetas reticuladas y su incremento igual que los reticulocitos, con la pérdida de sangre⁴⁴. Dada la dificultad de visualización directa de las plaquetas reticuladas, no es hasta después del progreso técnico que supone la aparición de la citometría de flujo y su introducción dentro del ámbito de las patologías hematológicas, en que es posible realizar determinaciones cuantitativas de las plaquetas reticuladas utilizando dicha técnica. Es en 1990, en que Kienast y cols, utilizando la citometría de flujo como técnica, Naranja de Tiazol (NT) como colorante del ácido ribonucleico plaquetario y sangre total como sustrato, publican el primer trabajo clínico en el que determinan el porcentaje de plaquetas reticuladas y número total de las mismas, en sujetos normales y en pacientes con diversos trastornos cuantitativos de las plaquetas⁴⁵.

Para la detección de PR por citometría de flujo, se han utilizado diversos

colorantes fluorescentes de ácidos nucleicos, como son; Auramina-O, Corifosfina-O y Naranja de Tiazol, pero es con éste último con el que existe más experiencia en la determinación de plaquetas reticuladas. El NT es un colorante lipofílico que atraviesa fácilmente la membrana celular sin necesidad de permeabilización. El complejo formado por el colorante-nucleótido, en el caso del NT, tiene una banda de absorción de 475 nm y una banda de emisión de fluorescencia de 530 nm, que permite que las PR puedan ser detectadas en un citómetro convencional. Para la determinación de las PR se pueden utilizar diversos sustratos. Los dos más habituales son; sangre total como se hizo en la descripción inicial de Kienast y cols., o plasma rico en plaqueta (PRP) fijado con paraformaldehído como hicieron por primera vez Ault y cols. en 1992⁴⁶. Desde estas primeras comunicaciones, han sido diversos los trabajos publicados que han intentado demostrar la utilidad de las PR como marcador de la actividad trombocitopoyética en diversas situaciones patológicas, tanto en procesos hematológicos como no hematológicos. En la mayoría de las publicaciones iniciales se utilizó PRP como sustrato, siguiendo el trabajo de Ault y cols., lo cual comportaba un mayor consumo de tiempo y complejidad en la realización de la técnica, pero aseguraba que se identificaba realmente plaquetas. Las repetidas centrifugaciones necesarias para obtener el PRP tienen como consecuencia una pérdida de plaquetas que pueden tener importancia en los resultados cuando se determinan en pacientes severamente trombocitopénicos. En los últimos años, especialmente a partir de 1998, a partir de la publicación del trabajo de Matic y cols.⁴⁷ en el que comunican una metodología

de determinación de PR a partir de sangre total más sencilla y estable. Esto ha permitido que cada vez sean más las publicaciones que las determinan utilizando sangre total como sustrato, usando un segundo marcador fluorescente unido a un anticuerpo monoclonal dirigido contra antígenos plaquetares que identifique las plaquetas permitiendo una identificación más específica de las mismas y su diferenciación del resto de células sanguíneas. Los anticuerpos monoclonales más utilizados, como ya hemos comentado son CD-61, contra GPIIIa, subunidad- β (integrina β 3) y el CD41 que identifica el complejo glicoproteico IIb-IIIa. El principal problema de la determinación de plaquetas reticuladas y como consecuencia que su determinación se haya restringido a la investigación limitando su aplicación en la práctica clínica, viene derivado, no de la dificultad o complejidad de la técnica sino de la falta de estandarización de la misma. Se observa una variabilidad metodológica significativa en los diferentes protocolos publicados en lo que se refiere al tiempo de incubación, sustrato utilizado (sangre total o PRP), concentraciones de los colorantes y uso adicional de un segundo anticuerpo marcador de plaquetas. A pesar de la variabilidad metodológica existente, el análisis detenido de los diversos trabajos publicados permite llegar a algunas conclusiones que son de utilidad en el momento de pasar de la investigación a la práctica clínica en la determinación de las plaquetas reticuladas por citometría de flujo:

1. Los nucleótidos de los gránulos densos también pueden captar el colorante, dando una fluorescencia inespecífica, especialmente cuando existe una concentración elevada de éste en el medio o cuando el período de incubación

es muy prolongado (>2,5horas). En ambos casos, se obtienen cifras de plaquetas reticuladas falsamente elevadas⁴⁸. Así pues, tanto la dilución del colorante como un tiempo de incubación limitado son importantes en el estudio de las plaquetas reticuladas.

2. No está determinado el umbral de fluorescencia que nos permita diferenciar cuando una plaqueta es reticulada o no. Para excluir la autofluorescencia y el ruido de fondo del aparato, algunos autores han utilizado como controles hematíes teñidos⁴⁹, aunque la mayoría se decanta por plaquetas no teñidas, marcadas con un monoclonal murino inespecífico^{45,47,50}, poniendo de forma arbitraria como umbral de positividad por encima del 99%.
3. En los últimos años la combinación de sangre total como sustrato, unido al marcaje específico de la glicoproteína de membrana con un anticuerpo monoclonal específico, ha permitido simplificar la técnica y evitar manipulaciones de la muestra. Este marcaje con anticuerpo monoclonal de las plaquetas, sirve para distinguir claramente las plaquetas del resto de células o de fragmentos de hematíes, así como del ruido de fondo del aparato. Todo ello, facilita que esta técnica pueda ser aplicada y reproducida en cualquier centro siempre que disponga de citometría de flujo^{47,50-51}.
4. El porcentaje de plaquetas reticuladas en personas sanas determinado por citometría de flujo varía entre 1% y 20% según los diferentes estudios publicados, esto está en relación con la falta de estandarización de la técnica,

lo cual obligará a que cada centro disponga de unos valores de referencia propios de su población con su metodología

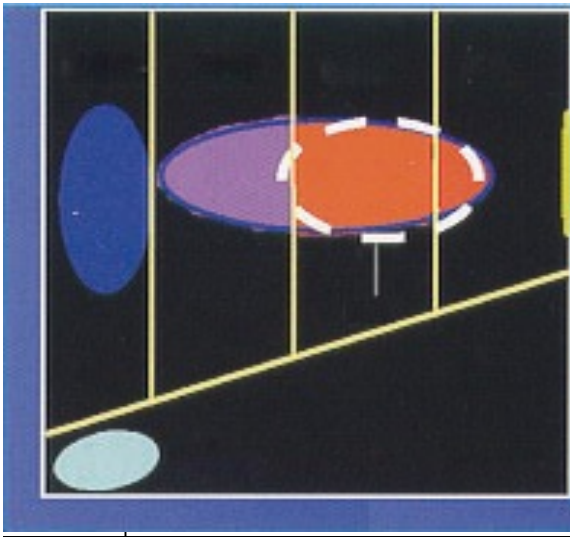
5. A pesar de la falta de estandarización de la técnica y a las diferencias en los porcentajes de plaquetas reticuladas obtenidos, todos los trabajos publicados sobre la determinación de plaquetas reticuladas en situaciones de trombocitopenia demuestran resultados coincidentes. Por un lado se identifica un incremento notable del porcentaje de plaquetas reticuladas en las situaciones que cursan con trombocitopenia por un consumo periférico, como son la púrpura trombocitopénica autoinmune idiopática (PTAI) o en la coagulación intravascular diseminada (CID)^{50,52,53,54,55}, siendo la PTAI el proceso con mayor elevación del porcentaje de plaquetas reticuladas. Por otro lado, las enfermedades que cursan con trombocitopenia por inhibición de la trombopoyesis, muestran una disminución del porcentaje de plaquetas reticuladas^{45,46,56}. Así mismo, los estudios realizados en pacientes transplantados o con trombocitopenia postquimioterapia, demuestran un incremento del número de plaquetas reticuladas que precede la elevación de plaquetas periféricas, equivalente a lo que ocurre con los reticulocitos y los hematíes^{56,57,58}.
6. En los últimos años algunas publicaciones muestran que existe un incremento de PR, como indicador de un aumento de la actividad megacariocítica, en procesos que cursan con aumento de la renovación o

activación plaquetaria, en situaciones en las que no existe trombocitopenia o incluso con franca trombocitosis, como son pacientes con hipertiroidismo⁵⁹, preeclampsia⁶⁰, anemia de células falciformes⁶¹, cardiopatía isquémica^{62, 63}, accidente vascular cerebral^{64,65} o trombocitemia esencial⁶⁶.

1.5.4 PLAQUETAS RETICULADAS. DETERMINACIÓN AUTOMÁTICA.

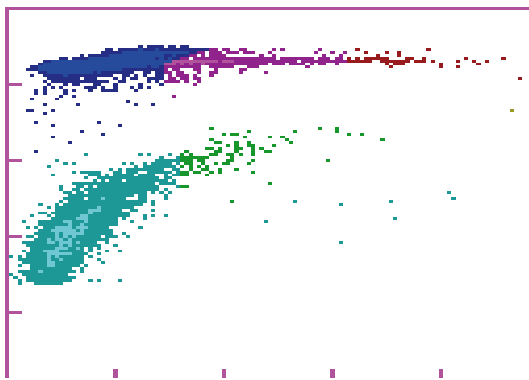
Ya en 1995 algunos autores, comunicaron buenos resultados de la determinación rápida de plaquetas reticuladas, combinadas o no con la cuantificación simultánea de los reticulocitos, utilizando analizadores automáticos de reticulocitos y usando la tecnología del citómetro de flujo y un programa informático adecuado^{67,68}. Estos fueron los primeros pasos que han permitido que el estudio de las plaquetas reticuladas haya podido ser incorporado en los últimos años, a dos analizadores automáticos, el Sysmex XE-2100 y XE-5000. En estos autoanalizadores, la utilización del canal óptico de los reticulocitos y un software adecuado, -el IPF Master- permite determinar las PR expresadas como fracción plaquetar inmadura (IPF). Usando los colorantes polimetino y oxacina, que penetran la membrana celular tiñendo el ARN en el hematíe y en la plaqueta reticulada, las células teñidas pasan a través del haz de luz de un láser diodo semiconductor y se identifican las plaquetas por su volumen celular (forward scatter light) y se mide de forma simultánea, la intensidad de fluorescencia (contenido de ARN). Tal como puede verse en la figura 3 y 4, las plaquetas ocupan la zona de las partículas de menor tamaño (Figura. 3) y aparecen como puntos azules las plaquetas más

maduras y menos fluorescentes, y como puntos verdes las plaquetas con mayor fluorescencia^{69,70, 71} (Figura 4). Estas últimas constituyen el parámetro IPF. Los parámetros que ofrece el autoanализador son el porcentaje de IPF (%IPF) y el porcentaje de plaquetas de alta fluorescencia (% H-IPF), así como otros parámetros de investigación como son el valor absoluto de plaquetas inmaduras (IPF#) y la intensidad media de fluorescencia (PLT-X). El rango de normalidad de IPF comunicado oscila entre 1,1% y 7,1%^{72,73, 74}. En los últimos años se han publicado trabajos de IPF que reproducen los resultados de las plaquetas reticuladas determinadas por citometría de flujo en trombocitopenias^{72, 75,76}, en pacientes transplantados o postquimioterapia^{73,77,78}, en síndrome coronario agudo⁷⁹, como marcador de mal pronóstico en síndromes mielodisplásicos con valores elevados de IPF^{80,81} o como posible marcador de evolución a cirrosis hepática en hepatopatía crónica⁸².



de dispersión producido por el Sysmex XE-2100.

Figura 4. Imagen de IPF del Sysmex XE-2100.(modificado de Harrison P. 2008)³¹



Puntos azules correspondientes a plaquetas maduras. Puntos verdes correspondientes a plaquetas inmunofluorescentes de mayor tamaño (IPF).

Esta automatización de la determinación de las plaquetas reticuladas puede permitir soslayar la dificultad de estandarización de la determinación de plaquetas reticuladas por citometría de flujo y puede ser el paso necesario para su incorporación a la aplicación clínica de rutina.

En resumen, aunque en la actualidad existen limitaciones metodológicas que deben ser tenidas en cuenta para la determinación de plaquetas reticuladas por citometría de flujo, existe evidencia en estudios de investigación de que se trata de una técnica sencilla y de rápida realización que puede ser especialmente útil en situaciones de trombocitopenia y que nos puede permitir discriminar fácilmente entre procesos con producción elevada, normal o baja de plaquetas.

Teniendo en cuenta los avances en los últimos años que se han aplicado al estudio de las plaquetas reticuladas por citometría de flujo comentadas anteriormente, que han permitido la simplificación del proceso, nos proponemos realizar un estudio prospectivo que nos permita valorar la utilidad clínica de la determinación de plaquetas reticuladas determinadas por citometría de flujo en diferentes subgrupos de pacientes con trombocitopenias atendidos en nuestro centro.

2- HIPÓTESIS

2.1 HIPÓTESIS

La determinación de plaquetas reticuladas o plaquetas con ARN residual, realizada por cualquiera de los métodos descrito, es un índice indirecto de la actividad megacariocítica medular.

1) Aunque la cuantificación de plaquetas reticuladas mediante citometría de flujo a partir de sangre total, con mínima manipulación de la muestra, usando como marcador de ARN el colorante Naranja de Tiazol y un anticuerpo monoclonal anti-GPIIIa (CD61) para identificación de las plaquetas no está estandarizada, es una técnica reproducible.

2) La demostración de que las plaquetas reticuladas son un marcador indirecto periférico de la actividad megacariocítica puede tener una utilidad clínica evidente, pudiendo ser una ayuda inicial en el diagnóstico diferencial de las trombocitopenias y puede sustituir al aspirado medular en el diagnóstico y manejo de las trombocitopenias en determinadas circunstancias.

3- OBJETIVOS Y RESULTADOS

3.1 OBJETIVO 1

Valorar si la determinación de plaquetas reticuladas mediante citometría de flujo utilizando un doble marcaje es una técnica reproducible y capaz de diferenciar trombocitopenias de diferentes etiologías.

3.1.1 RESULTADOS 1. PUBLICACIÓN 1.

ISSN 0953-6205 - (17) (8) 529-614 (2006)

**EUROPEAN JOURNAL OF
INTERNAL
MEDICINE**



Vol. 17, Issue 8
December 2006
www.elsevier.com/locate/ejim

CONTENTS

Review article	
Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis: Update of an old disorder E. Andrieu, J. Zimmer, S. Afferberger, L. Federici, M. Alt, F. Maloisel (France, Luxembourg)	529
Original articles	
BNP in septic patients without systolic myocardial dysfunction R. Shor, Y. Rozenman, A. Bolshinsky, D. Harpaz, Y. Tiliu, Z. Mates, A. Fux, M. Boaz, A. Hlatabe (Israel)	536
Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: An indirect thrombocytopoietic marker M. Montequado Jiménez, M.J. Amengual Guadán, L. Muñoz Martín, J.A. Soler Campos, I. Rog Martínez, C. Tolosa Vilela (Spain)	541
Determination of oxidative stress in thyroid tissue and plasma of patients with Graves' disease E. Ademoglu, N. Özbey, Y. Erbil, S. Tanrikulu, U. Barbaros, B.T. Yanik, A. Bozboru, S. Özarmagan (Turkey)	545
Blood oxygen level dependent (BOLD) MRI: A novel technique for the detection of myocardial ischemia M. Egred, G.D. Walter, A. Al-Mohammad, S.I.K. Semple, T.W. Redpath, S. Walton (UK)	551
Nutritional status of adult patients admitted to internal medicine departments in public hospitals in Castilla y Leon, Spain — A multi-center study D. de Luis, A. Lopez Guzman, Nutrition Group of Society of Castilla-Leon (Endocrinology, Diabetes and Nutrition) (Spain)	556
Aluminum load in ICU patients during stress ulcer prophylaxis G. Stoehr, K. Luebbbers, M. Wilhelm, J. Hoelzer, C. Ohmann (Germany)	561
Post-traumatic stress disorder and other co-morbidities in a sample population of patients with irritable bowel syndrome H. Cohen, A. Jotkowitz, D. Buskila, S. Pelles-Avraham, Z. Kaplan, L. Neumann, A.D. Sperber (Israel)	567
Brief reports	
Diagnostic challenge posed by the clinical presentation of foot drop in a patient with Hodgkin's lymphoma R.K. Bobba, E.L. Ansuru, A.K. Sawh, M. Naseem (USA)	572
Pleural dissemination of thymoma showing tumor regression after combined corticosteroid and tacrolimus therapy T. Taguchi, T. Suehiro, K. Toru, N. Ogami, H. Takata, K. Hashimoto (Japan)	575
Colitis cystica profunda and solitary rectal ulcer syndrome-polypoid variant: Two confusing clinical conditions I. Starker, D. Benharouch, S. Wallfisch, J. Delgado (Israel, USA)	578
Autoimmune manifestations in acquired idiopathic splenic atrophy: A puzzling association P. Coppo, D. Saadoun, B. Varet (France)	580
"Sweet" hydrothorax complicating chronic peritoneal dialysis B. Smolin, I. Henig, Y. Levy (Israel)	583
Letters to the Editor	
Age is the only independent predictor for the length of hospital stay in patients admitted to a UK district general hospital with diabetic ketoacidosis G. Idampitaya, J. Sitthole, I. Idris (UK)	585
Bleeding non-cirrhic fundus ("downhill") varices in a patient on chronic intermittent hemodialysis J.G. Lullisan, S. Ploem, J.G. Zijlstra (The Netherlands)	586
Obesity surgery in the United Kingdom: A survey of the attitudes of surgeons and their practices Z.F. Soonawalla, A. Ganeshan, J.N. Baxter (UK)	587
Aloe vera-induced acute toxic hepatitis in a healthy young man O. Kanat, A. Ozet, S. Ataergin (Turkey)	589
Delayed onset of rosiglitazone-induced pulmonary oedema D.J.S. Fernando, U. Bulugahapitiya, K. Prior (UK)	590
Acknowledgements	591
Author Index	593
Subject Index	601
Contents Volume 17	606

ELSEVIER

This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator. All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>



ELSEVIER

European Journal of Internal Medicine 17 (2006) 541–544

EUROPEAN JOURNAL OF
**INTERNAL
MEDICINE**

www.elsevier.com/locate/ejim

Original article

Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: An indirect thrombocytopoietic marker [☆]

M. Monteagudo Jiménez ^{a,□}, M.J. Amengual Guedán ^b, L. Muñoz Martín ^c, J.A. Soler Campos ^c, I. Roig Martínez ^c, C. Tolosa Vilella ^a

^a Internal Medicine Department, Hospital of Sabadell, University Institute Parc Taulí S/N, 08208, (UAB), Sabadell, Barcelona, Spain

^b Immunology Laboratory, Hospital of Sabadell, University Institute Parc Taulí (UAB), Sabadell, Spain ^c Hematology Service, Hospital of Sabadell, University Institute Parc Taulí (UAB), Sabadell, Spain Received 13 December 2005; received in revised form 16 March 2006; accepted 27 March 2006

Abstract

Background: The aim of this study was to determine whether measurement of reticulated platelets (RP) by flow cytometry directly from whole blood, with no fixation or manipulation, is as useful a thrombocytopoietic marker as other more complex techniques.

Methods: RP percentage was prospectively assessed in thrombocytopenic patients (platelets $<100 \times 10^9/L$) and non-thrombocytopenic controls using a direct, whole-blood, dual-labelling flow cytometric method. Direct, whole-blood double coverage was achieved using a monoclonal antiglycoprotein (GP)-III antibody (CD61-PerCP®) for platelet identification and thiazol orange (Retic-count®) as platelet mARN stain. After establishing thrombocytopenia etiology, patients were grouped according to whether their rate of thrombopoiesis was increased or decreased.

Results: RP were measured in 53 thrombocytopenic patients with several etiologies and in 53 non-thrombocytopenic controls. The mean RP in 14 thrombocytopenic patients with no increased thrombopoietic activity was 4.8% (95% CI: 3.2–6.4) and the RP absolute number was $1.98 \times 10^9/L$ (95% CI: 1.3–2.6). The mean RP in 17 thrombocytopenic patients with increased thrombopoietic activity was 29.4% (95% CI: 24.7–34.1) and the RP absolute number was $7.24 \times 10^9/L$ (95% CI: 4.9–9.5).

Conclusions: RP measurement by flow cytometry, directly from whole blood without manipulation, is a useful screening test to differentiate thrombocytopenia with high or low thrombopoietic activity.

© 2006 European Federation of Internal Medicine. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Reticulated platelets; Thrombocytopenia; Idiopathic thrombocytopenic purpura; Flow cytometry

1. Introduction

Reticulated platelets (RP), by analogy to reticulocytes, are the youngest circulating platelet population and they contain abundant amounts of mRNA. RP were first described in 1969 [1] by direct visualization from peripheral blood. In 1990, Kienast and Schmitz [2] reported the first measurement of RP by flow cytometry that showed clinical utility in thrombocytopenic

disorders. Since that first description, two substrates have been reported for RP determination: platelet-rich plasma (PRP) and whole blood. Several dyes for mRNA stains, including thiazole orange (TO) and auramine O, have been used and different incubation times have been described. Nevertheless, none of these techniques has been standardized. All reports have suggested that flow cytometric analysis of RP is useful for the differential diagnosis of thrombocytopenic disorders. Recently, simple protocols using whole blood for RP determination have been reported [3,4] with results as good as those from more complex techniques using PRP.

The purpose of this prospective study was to evaluate whether RP measured directly from whole blood by flow cytometry, and avoiding sample manipulation, is as useful an

[☆] The authors declare that they have no conflict of interest regarding this study.

□ Corresponding author. Tel.: +34 937231010; fax: +34 937160646.

E-mail address: MMonteagudo@CSPT.ES (M.M. Jiménez).

indirect thrombocytopoietic peripheral marker as other more complex techniques.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

We prospectively investigated in- and outpatients with thrombocytopenia at Parc Tauli Hospital in Sabadell who met the inclusion criterion, i.e., thrombocytopenia $< 100 \times 10^9/L$, confirmed after peripheral blood film review, and who could be included in one defined etiologic group. The exclusion criterion was pseudothrombocytopenia after peripheral blood film review. Also excluded were patients who could not be included in one defined etiologic group.

Controls and thrombocytopenic etiologic groups were defined as follows:

Group A. Thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity.

A1. Central thrombocytopenia when there was diminished or defective platelet production. Diagnoses included in this group were: acute or chronic lymphoproliferative disorders, multiple myeloma, acute leukemia, aplastic anemia, myelodysplastic disorders, and medullar infiltration by solid tumors, based on blood results, bone marrow findings, and cytogenetic analysis. Post-chemotherapy thrombocytopenia was defined as thrombocytopenia after chemotherapy treatment that persisted for more than 7 days after RP determination.

A2. Thrombocytopenia by abnormal distribution when there were splenomegaly and hypersplenism analytical data. Diagnoses included in this group were liver cirrhosis and other diseases with portal venous system hypertension.

Group B. Thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity.

B1. Thrombocytopenia due to enhanced peripheral platelet destruction by an immunological mechanism. This included acute idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), a diagnosis that was made on the basis of clinical history, physical examination, complete blood count, and clinical course after treatment. All patients with ITP fulfilled the criteria advised by the American Society of Hematology Practice Guidelines [5].

B2. Thrombocytopenia due to enhanced peripheral platelet destruction by no immunological mechanism. Diagnoses included were: disseminated intravascular coagulation (DIC), idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura, and hemolytic-uremic syndrome, all defined by classical clinical symptoms and confirmed in blood studies. Group C. Chronic thrombocytopenia for more than 6 months.

C1. Chronic thrombocytopenia with no clear etiology. Thrombocytopenia for more than 6 months with neither significant bleeding symptoms nor autoimmunity data, if there is no definite diagnosis.

C2. Chronic autoimmune thrombocytopenia. Thrombocytopenia for more than 6 months with some autoimmune marker (antiplatelet antibodies, antinuclear antibodies, anti-cardiolipin antibodies, or lupus anticoagulant).

Group D. Control groups.

D1. Normal control group: those with a normal platelet number in blood sample.

D2. Thrombocytosis control group: those with platelets above $450 \times 10^9/L$.

2.2. Methods

RP were identified following the previously described technique by Robinson et al. [3], without sample manipulation, avoiding fixation and blood centrifugation. Briefly, blood was collected in hematological tubes (Vacutainer type) containing ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)-2K. All blood samples were kept at room temperature until analysis was performed, less than 6 h after collection. Some 5 μ l of whole blood was incubated for 15 min in the dark at room temperature with 5 μ l of PerCP®-labelled antiglycoprotein III monoclonal antibody (CD61-PerCP® Becton Dickinson SA) and 30 μ l of phosphate-buffered saline (PBS). A control tube was used for each sample with 5 μ l of isotypic mouse control (IgG1-mouse PerCP® Becton Dickinson SA). After incubation, 1 ml thiazole orange (TO; Retic-count®, Becton Dickinson SA) 1/10 solution in Isoton II® was added to the test tube and 1 ml Isoton II® (Beckman-Coulter) solution was added to the control tube. After incubation for 1 h in the dark at room temperature, they were immediately read in the cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson SA). Platelets were identified on their logarithmic side scatter (SSC) and CD61 positivity expression. Analysis was performed with computer software (CellQuest Pro, Becton Dickinson SA). A dot plot cytogram (CD61-PerCP® versus TO fluorescence) was generated, and the RP rate was expressed as a percentage of both a TO and CD61-PerCP®-positive population among 10,000 identified platelets. The threshold of TO fluorescence was chosen so that more than 99% of the CD61-PerCP®-positive population was negative for TO. In each session, a sample with a normal number of platelets was used as a control.

2.3. Statistical analysis

RP percentage and total RP number were determined in all samples. Results are expressed as means with 95% confidence interval (CI). Differences between groups were compared by means of the Student's t-test. A P value below 0.05 was considered significant. SPSS 11.5 for Windows computer software was used for the statistical analysis.

3. Results

RP were determined in 53 controls. Forty-four had a normal platelet count and 9 had thrombocytosis. There were 53 thrombocytopenic patients. In group A, 12 had central thrombocytopenia (4 myelodysplastic disorders, 3 bone marrow

Table 1
Demographic data of thrombocytopenic and control groups

Groups	No.	Age (years)	M/F
		Mean (range)	(% males)
Normal controls	44	55 (3–81)	25/19 (56.8%)
Central thrombocytopenia	12	70 (50–83)	8/4 (66.7%)
ITP	13	40 (3–84)	5/8 (38.5%)
Chronic immunological thrombocytopenia	8	52 (11–78)	5/3 (62%)
Peripheral platelet destruction by a non-immunological mechanism	4	55 (8–91)	3/1 (75%)
Hypersplenism	2	62 (58–65)	2/0 (100%)
Chronic thrombocytopenia without clear etiology	14	56 (28–82)	3/11 (21.4%)
Thrombocytosis	9	65 (17–89)	6/3 (66.7%)

ITP, acute idiopathic thrombocytopenic purpura.

infiltration, 2 multiple myeloma IgG-κ, 1 aplastic anemia, 1 post-chemotherapy, and 1 acute promyelocytic leukemia) and 2 were secondary to hypersplenism. In group B, 13 had ITP and 4 thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by a non-immunological mechanism (3 DIC and 1 hemolytic-uremic syndrome). In group C, 8 had chronic autoimmune thrombocytopenias and 14 chronic thrombocytopenias with no clear etiology. Sex and age for each group in which RP were determined is shown in Table 1. Mean peripheral platelets in each group, RP percentage, and RP absolute number with 95% CI are presented in Table 2. A comparative analysis of thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity (group B) and thrombocytopenia with low or normal thrombopoietic activity (group A) showed significant differences in RP percentage ($P < 0.0001$) and RP absolute number ($P < 0.0001$). The highest RP percentage was present in ITP. RP in group C were slightly higher than in the central group, but clearly lower than in group B (Fig. 1).

4. Discussion

We measured RP using a very simple technique. We determined RP by flow cytometry directly from whole blood,

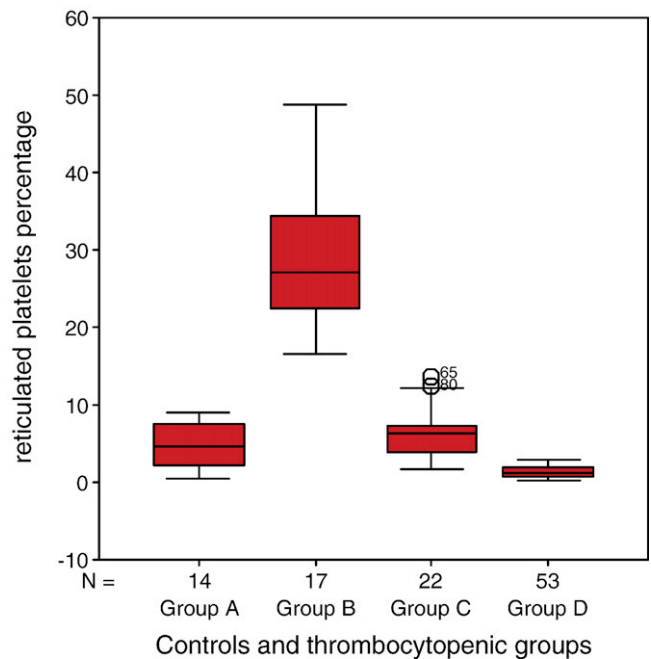


Fig. 1. Box plot of RP percentage with mean (black line) in each group analyzed. Group A: thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity. Group B: thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity. Group C: chronic thrombocytopenia for more than 6 months. Group D: control group.

avoiding any manipulation, and a dual-labelling method for platelet identification. Our preliminary data in this small thrombocytopenic group allowed us to discriminate between thrombocytopenia due to increased thrombopoietic activity and thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity. Reference range values with this simple technique are in agreement with those reported in the literature [2,6,7].

RP measurement is a non-invasive test that provides indirect information about thrombopoietic activity in bone marrow. Even though RP values are related to the sort of technique utilized, it is generally agreed that they are a good marker of platelet turnover [2,6,8,9]. RP measured from

Table 2
RP percentage and absolute number in each group analyzed

Group	(no)	Platelets ($\times 10^9/L$)	RP %	(95% CI)	RP $\times 10^9/L$	(95% CI)
Group D	53					
Normal control	(44)	250.30	1.19	(1.01–1.38)	2.92	(2.48–3.56)
Thrombocytosis	(9)	922.25	1.8	(1.20–2.41)	17.86	(11.93–23.80)
Group A	14		4.85 \square	(3.21–6.49)	1.98 $\#$	(1.33–2.63)
Central thrombocytopenia	(12)	46	5.32	(3.54–7.10)	2.06	(1.3–2.82)
Hypersplenism	(2)	74.5	2.04	(0.96–3.12)	1.52	(0.85–2.20)
Group B	17		29.41 \square	(24.72–34.10)	7.24 $\#$	(4.97–9.51)
ITP	(13)	22.10	30.67	(24.57–36.76)	5.58	(3.90–7.25)
Peripheral platelet destruction by a non-immunological mechanism	(4)	49	25.32	(20.68–29.98)	12.65	(5.20–20.11)
Group C	22		6.38	(4.83–7.93)	3.65	(2.71–4.60)
Chronic immunologic thrombocytopenia	(8)	54	8.07	(5.18–10.96)	4.11	(2.21–6)
Chronic thrombo-cytopenia without clear etiology	(14)	63.21	5.41	(3.41–7.28)	3.39	(2.18–4.60)

$\#P < 0.0001$, $\square P < 0.0001$.

RP, reticulated platelets; ITP, acute idiopathic thrombocytopenic purpura.

platelet-rich plasma is one of the six laboratory findings that discriminated ITP from other diagnoses in isolated thrombocytopenia [10]. RP determination appears to be a reliable measure to predict imminent platelet recovery in hematologic patients after intensive chemotherapy [11]. RP measurement is not routinely used despite its potential clinical interest for thrombopoietic evaluation. This is due to its technical complexity, variability, and lack of standardization. Simplifying this technique or making it fully automatic [12] would clearly extend its clinical use.

In sum, RP determination is a reliable measure of platelet turnover and may be as good an initial screening test for thrombocytopenic patients as reticulocytes are in studies of anemic patients.

5. Learning points

1. Reticulated platelets may be measured by simple flow cytometry directly from whole blood.
2. Reticulated platelets are an indirect peripheral marker of thrombopoietic bone marrow activity.
3. Determination of reticulated platelets may be as useful an initial screening test in thrombocytopenic patients as reticulocytes are in studies of anemic patients.

Reference

- [1] Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol* Sep 1969;17(3):225–9.
- [2] Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* Jan 1 1990;75(1):116–21.
- [3] Robinson MS, MacKie IJ, Machin SJ, Harrison P. Two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol* Aug 2000;22(4):211–3.
- [4] Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* Oct 15 1998;34(5):229–34.
- [5] George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3–40.
- [6] Catani L, Vianelli N, Luatti S, Rizzi S, Castellani S, Valdre L, et al. Characterization of autotransplant-related thrombocytopenia by evaluation of glycoconjugate and reticulated platelets. *Bone Marrow Transplant* Dec 1999;24(11):1191–4.
- [7] Macchi I, Chamlian V, Sadoun A, Le DA, Guilhot J, Guilhot F, et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol* Sep 2002;69(3):152–7.
- [8] Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* Jun 1993;117(6):606–10.
- [9] Saxon BR, Blanchette VS, Butchart S, Lim-Yin J, Poon AO. Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* Jan 1998;20(1):44–8.
- [10] Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* Sep 2005;118(9):1026–33.
- [11] Chaoui D, Chakroun T, Robert F, Rio B, Belhocine R, Legrand O, et al. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy. *Transfusion* May 2005;45(5):766–72.
- [12] Abe Y, Wada H, Sakakura M, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, et al. Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood. *Clin Appl Thromb Hemost* Jul 2005;11(3):263–70.

3.1.2 RESULTADOS 1. COMENTARIO

(M. Monteagudo Jiménez, MJ Amengual Guedán, L Muñoz Martín , JA Soler Campos, I Roig Martínez, C Tolosa Vilella. Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry : an indirect thrombocytopoienic marker. Eur J Intern Med. 2006 Dec;17(8): 541-4)

Los resultados del primer artículo, publicado en diciembre de 2006, en el que se estudian las plaquetas reticuladas en grupo de 53 pacientes trombocitopénicos demuestran que los valores de PR son diferentes en trombocitopenias de diferentes etiologías. Este estudio preliminar ya demuestra, aunque el número de pacientes es bajo, que hay diferencias entre trombocitopenias con diagnóstico clínico de origen central, es decir etiologías cuyo mecanismo sería una disminución de la actividad megacariocítica, y trombocitopenias con diagnóstico clínico de origen periférico, es decir etiologías cuyo mecanismo sería por destrucción periférica con aumento de la actividad megacariocítica. Una de las limitaciones de este trabajo, además del escaso número de pacientes, sería la presencia de un grupo de pacientes, que por otra parte es el más numeroso, con trombocitopenias crónicas de etiología no aclarada.

3.2 OBJETIVO 2

Valorar si la determinación de plaquetas reticuladas por citometría de flujo a partir de sangre total puede ser una técnica útil de cribado inicial para el diagnóstico etiológico de las trombocitopenias.

3.2.1 RESULTADOS 2. PUBLICACIÓN 2

RETICULATED PLATELETS AS A SCREENING TEST TO IDENTIFY THROMBOCYTOPENIA AETIOLOGY

M. MONTEAGUDO¹, M^a J. AMENGUAL², L. MUÑOZ³, J.A. SOLER³, I. ROIG³
and C. TOLOSA¹

From the ¹Internal Medicine Department, ²Immunology Laboratory and ³Hematology Service, Hospital de Sabadell, Institut Universitari Parc Tauli—UAB, Sabadell, Barcelona, Spain

Received 9 October 2007 and in revised form 11 March 2008

Summary

Background: Thrombocytopenia is a common haematological abnormality and no simple diagnostic test is available to diagnose thrombocytopenia pathogenesis.

Aim: To evaluate sensitivity and specificity of reticulated platelets (RP) as a diagnostic test for thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity.

Design: Prospective observational study in thrombocytopenic patients.

Methods: A direct, whole-blood, dual-labelling flow cytometric method was used. Direct, whole-blood double coverage was achieved using a monoclonal anti-glycoprotein (GP)-III antibody (CD61 PerCP) for platelet identification and thiazole orange (Retic-count) as platelet mARN stain.

Results: RP were measured in 101 thrombocytopenic patients and 104 non-thrombocytopenic controls. The mean RP percentage in 60 thrombocytopenic

patients with no increased thrombopoietic activity was 7.5% (CI for 95%: 5.2–9.7) and RP absolute number was $3.2 \times 10^9/l$ (CI for 95%: 2.1–4.3). The mean RP percentage in 41 thrombocytopenic patients with increased thrombopoietic activity was 30.3% (CI for 95%: 25.1–35.5) and RP absolute number was 6.2 (CI for 95%: 4.8–7.7). The RP percentage cut-off for a diagnosis of thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity was 11% [sensitivity 93%, specificity 85%, positive predictive value (PPV) 83%, negative predictive value (NPV) 95%].

Conclusions: RP measurement by flow cytometry, directly from whole-blood, is a useful screening test to differentiate between thrombocytopenia with high or low thrombopoietic activity. A RP percentage in excess of 11%, has a high sensitivity and good specificity for a diagnosis of thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity.

Introduction

Thrombocytopenia is a common haematological abnormality and sometimes associated with severe bleeding. A number of causes may lead to low platelet count, but two major mechanisms are implicated in the pathogenesis, namely increased peripheral platelet destruction and decreased bone marrow production. No simple diagnostic test is available to diagnose thrombocytopenia pathogenesis. Examination of the bone marrow megakaryocytic pool is often required in order to quantify

thrombocytopoiesis. Bone marrow is not usually examined in thrombocytopenic patients with suggested accelerated peripheral platelet consumption, because it is an invasive and discomforting procedure. Moreover, it is unsuitable for frequent follow-up in thrombocytopenic patients. In this regard, a sensitive and non-invasive test, capable of evaluating the thrombopoietic activity, would be of substantial clinical value. Quantifying RNA platelet content by flow cytometry has been proposed for

Address correspondence to M. Monteagudo, Internal Medicine Department, Hospital de Sabadell, Parc Tauli S/N, 08208 Sabadell, Barcelona, Spain. email: MMonteagudo@tauli.cat

© The Author 2008. Published by Oxford University Press on behalf of the Association of Physicians. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Page 1 of 7

evaluating platelet turnover. Reticulated platelets (RP) are the youngest circulating platelet population that contain rough endoplasmic reticulum and mRNA, and are thus able to synthesize small amounts of protein. RP first description was reported in 1969¹ by direct visualization in peripheral blood, using a new methylene blue dye. In 1990, Kienast and Schmitz² published the first report on the diagnostic value of flow cytometric analysis of RP using the thiazole orange (TO) fluorescent dye in patients with thrombocytopenia. RP measurement by flow cytometry is not a standardized technique, because several dyes for mRNA stain, several substrates for RP determination and different incubation times have been described. Even so, all reports have suggested that analysis of RP provides a good estimate of the rate of platelet production in bone marrow.^{3–5} Recently, simple protocols using whole-blood for RP determination have been reported^{6,7} with good results. The aim of the present study was to assess prospectively the diagnostic usefulness of RP determined by flow cytometry, directly from whole-blood in thrombocytopenic patients and to evaluate sensitivity and specificity of RP, as a diagnostic test for thrombocytopenia caused by acceleration of peripheral consumption.

Materials and methods

Patients

From June 2002 to June 2005, we prospectively enrolled both admitted and out patients being attended to at Parc Tauli Hospital in Sabadell (Barcelona, Spain) with thrombocytopenia who met with the inclusion criterion. Inclusion criterion: patients with platelet counts fewer than $100 \times 10^9/l$, confirmed after peripheral blood film review, could be included in one defined aetiologic group. Exclusion criterion: pseudothrombocytopenia after peripheral blood film review. Also excluded were patients who could not be included in one defined aetiologic group.

Controls and thrombocytopenic groups were defined as follow:

Group A—thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity

- (i) Central thrombocytopenia when there was diminished or defective platelet production. Diagnoses included in this group were: acute or chronic lymphoproliferative disorders, multiple myeloma, acute leukaemia, aplastic anaemia, myelodysplastic disorders and medullar infiltration by solid tumours, based on blood results,

bone marrow findings and cytogenetic analysis. Post-chemotherapy thrombocytopenia was defined as thrombocytopenia after chemotherapy treatment that persisted for >7 days after RP determination. No platelet transfusion or infection was present when RP determination was done. All patients in this group remained thrombocytopenic for >10 days after RP determination.

- (ii) Thrombocytopenia by abnormal distribution when there was splenomegaly and hypersplenism analytical data. Diagnoses included in this group were liver cirrhosis and other diseases with portal venous system hypertension.

Group B—thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity

- (i) Thrombocytopenia due to enhanced peripheral platelet destruction by an immunologic mechanism. This included acute idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), a diagnosis that was made on the basis of clinical history, physical examination, complete blood count and clinical course after treatment. All patients with ITP, fulfilled the criteria indicated by the American Society of Hematology Practice Guidelines.⁸
- (ii) Thrombocytopenia due to enhanced peripheral platelet destruction by non-immunological mechanism. Diagnoses included were disseminated intravascular coagulation (DIC), idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic-uremic syndrome, all defined by classical clinical symptoms and confirmed through blood studies.

Group C—control groups

- (i) Normal control group. Those with a normal platelet count in blood sample.
- (ii) Thrombocytosis control group. Those with $>450 \times 10^9/l$. They were reactive platelets above $450 \times 10^9/l$ thrombocytosis. They were a control group to clarify that RP percentage was not correlated with the platelet count.

Methods

RP were identified following the previously described technique by Robinson et al.,⁵ without sample manipulation, avoiding fixation and blood centrifugation.

Blood collection

Blood samples were collected in haematological tubes (Vacutainer type, Madrid, Spain; Becton Dickinson, Madrid, Spain) containing ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)-K2 (1.8 mg/ml). Complete blood count was measured using an ADVIA 120 autoanalyzer (Bayer, Madrid, Spain)

and thrombocytopenic samples were confirmed after peripheral blood film reviewal. All blood samples were kept at room temperature, until analysis was performed within than 6 h after collection.

Reticulated platelet quantification

Some 5 ml of whole-blood were incubated with 5 ml of PerCP -labelled anti-glycoprotein III monoclonal antibody (CD61 PerCP Becton Dickinson, SA) and 30 ml of phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min in the dark, at room temperature. A control tube was used for each sample with 5 ml of isotypic mouse control (IgG1-mouse PerCP Becton Dickinson, SA). After incubation, 1 ml TO (Retic-count , Becton Dickinson, SA) at 1/10 dilution in Isoton II was added to the test tube and 1 ml Isoton II (Beckman-Coulter) solution was added to the control tube. After incubation for 1 h in the dark at room temperature, they were immediately read in the cytometre (FACSCalibur, Becton Dickinson, SA). Platelets were identified by their logarithmic side scatter (SSC) and CD61 positivity expression. Analysis was performed with computer software (CellQuest Pro, Becton Dickinson, SA). A dot plot cytogram (CD61-PerCP versus TO fluorescence) was generated, and RP rate was expressed as a percentage of TO and CD61-PerCP double-positive cells in 10 000 identified platelets. The threshold of TO fluorescence was established, the level was >99% of CD61-PerCP positive population was negative for TO in the control tube. In each session a sample with a normal number of platelets was used as a control.

Reproducibility of the method Reproducibility was analysed with five blood samples obtained from two normal subjects (low levels of RP) and three thrombocytopenic patients (one with high levels of RP and two with mid-values) by processing 10 replicates, each sample was prepared 10 times. It was expressed as the coefficient of variation (CV).

Table 1 RP values for 10 replicates assays in five subjects

Case no	RP percentage (%)					Platelet count (10 ⁹ /l)
	Mean	SD	Maximum	Minimum	CVs %	
Low RP	1.40	0.19	0.99	1.66	13.6	253
Low RP	0.35	0.05	0.30	0.44	14.3	234
Mid RP	5.60	0.70	4.36	6.76	12.5	26
Mid RP	9.45	0.56	8.82	10.83	5.9	43
High RP	69.72	4.34	62.99	74.63	6.2	7

RP, reticulated platelets; CVs, Coefficients of variation.

Statistical analysis

RP percentage and total RP number were determined in all samples. Results were expressed as mean and 95% mean confidence interval (CI), unless differently indicated. Differences between groups were compared by means of the Student's t-test. A P-value equal or lesser than 0.05 was considered statistically significant. To determine the accuracy of the RP percentage in discriminating thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity from thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity, a receiver operating characteristic (ROC) curve was made. The cut-off value of RP percentage with the best sensibility and specificity to diagnose thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity, was determined. SPSS 13 for Windows computer software was used for the statistical analysis.

Results

Performance of the method and normal values

The reproducibility of the assay was good, with CVs ranging from 5.9% to 14.3%. Low levels of RP percentage showed higher CVs (13.6–14.3%) than high levels showed (CV = 6.2%) (Table 1). To define the normal range of RP values, RP were determined in 104 controls. In this group, 82 subjects had a normal platelet number and 22 had thrombocytosis. RP percentage in the control group with normal platelet number was 1.3% (CI for 95%: 1.1–1.5) and in the thrombocytosis group was 1.9% (CI for 95%: 1.2–2.4).

Clinical diagnosis of patients with thrombocytopenia

RP were determined in 101 thrombocytopenic patients. There were 60 patients in the group A, 45 had central thrombocytopenia

(11 myelodysplastic disorders, 10 medullar infiltration by solid tumour or lymphoproliferative disorders, 8 post-chemotherapy, 5 acute leukaemia, 4 multiple myeloma, 3 vitamin B12 deficiency, 2 aplastic anaemia, 2 chronic leukaemia) and 15 had thrombocytopenia by abnormal distribution (14 liver cirrhosis, 1 idiopathic portal hypertension). In group B, there were 41 patients, 29 had ITP and 12 had thrombocytopenia due to enhanced peripheral platelet destruction by non-immunologic mechanism (11 DIC and 1 haemolytic-uremic syndrome) (Table 3). Sex and age for each group in which RP were determined is shown in Table 2. Mean of RP percentage in group A (thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity) was 7.5% (IC for 95%: 5.2–9.7%) and mean RP absolute number was $3.2 \times 10^9/l$ (CI for 95%: $2.1\text{--}4.3 \times 10^9/l$). Mean of RP percentage in group B (thrombocytopenia

with increased thrombopoietic activity) was 30.3% (CI for 95%: 25.1–35.5%) and mean RP absolute number was $6.2 \times 10^9/l$ (CI for 95%: $4.8\text{--}7.6 \times 10^9/l$). Eight patients in group A had very high RP percentage (Figure 1), there were three myelodysplastic disorders with excess blasts (open circles), two acute myelogenous leukaemia (asterisk), one myelomonocytic chronic leukaemia (asterisk), one B-lymphoproliferative disorder (asterisk) and one multiple myeloma (asterisk). Comparative analysis between both thrombocytopenic groups shows statistically significant differences in RP percentage ($P < 0.0001$) and RP absolute number ($P < 0.001$). Means of peripheral platelets in each group, RP percentage and RP absolute number with 95% CI intervals are summarized in Table 4. The mean of RP percentage and RP absolute number in central thrombocytopenic group, after the exclusion of eight patients with very high

Table 2 Demographic data summary in thrombocytopenic and control groups

Group	Number	Mean age years (Rank)	Sex M/F (%M)
Controls	104		
Normal control	82	54 (2–84)	45/37 (54.9)
Thrombocytosis	22	61 (17–89)	13/9 (59.1)
Group A	60		
Central thromb.	45	65 (12–94)	32/13 (71.1)
Hypersplenism	15	58 (22–81)	12/3 (80.0)
Group B	41		
ITP	29	50 (3–91)	16/13 (55.2)
Peripheral consum	12	50 (1–73)	8/4 (66.7)

Central Thrombo., Central thrombocytopenia; Hypersplenism, Thrombocytopenia by abnormal distribution; ITP, Idiopathic thrombocytopenic purpura; Peripheral consum, Peripheral platelet destruction by non-immunological mechanism.

Table 3 Clinical diagnosis of patients with thrombocytopenia

Group A	No	Group B	No
Central thrombocytopenia	45	Immologic mechanism	29
Myelodysplastic disorders	11	ITP	29
Medullar infiltration	10		
Post-chemotherapy	8		
Acute leukaemia	5		
Multiple myeloma	4		
Vitamin B12 deficiency	3		
Aplastic anaemia	2		
Chronic leukaemia	2		
Hypersplenism	15	Peripheral Consum	12
Liver cirrhosis	14	Disseminated intravascular coagulation	11
Idiopathic portal hypertension	1	Hemolytic-uremic syndrome	1

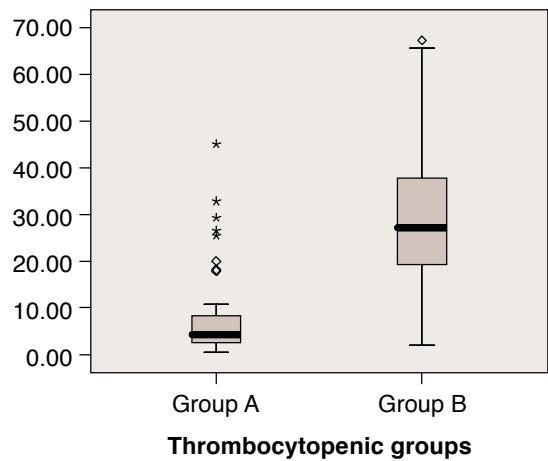


Figure 1. Box plot RP percentage with mean (black line) in thrombocytopenic groups. Group A, Thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity. Group B, Thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity.

Reticulated platelets screening test

Table 4 Summary results for RP percentage and absolute number in each analysed group

Group (No of Patients)	Platelets ($10^9/l$)	Mean RP% (CI for 95)	RP $10^9/l$ (CI for 95%)
Normal control (82)	254.14	1.33 (1.12–1.54)	3.20 (2.74–3.66)
Thrombocytosis (22)	856.40	1.98 (1.52–2.44)	17.03 (12.81–21.26)
Group A (60)	50.55	7.51 (5.27–9.74)	3.24 ^y (2.14–4.34)
Central Thrombo. (45)	45.33	8.83 (5.96–11.7)	3.61 (2.16–5.06)
Hypersplenism (15)	66.20	3.54 (2.25–4.82)	2.13 (1.34–2.92)
Group B (41)	27.24	30.30 (25.13–35.47)	6.24 ^y (4.83–7.65)
ITP (29)	18.51	33.13 (26.44–39.82)	4.53 (3.54–5.51)
Peripheral consum (12)	48.33	23.47 (16.60–30.34)	10.38 (6.94–13.82)

P < 0.0001, ^yP < 0.001.

Central thrombo., Central thrombocytopenia; Hypersplenism, Thrombocytopenia by abnormal distribution; ITP, Idiopathic thrombocytopenic purpura; Peripheral consum, Peripheral platelet destruction by no immunological mechanism.

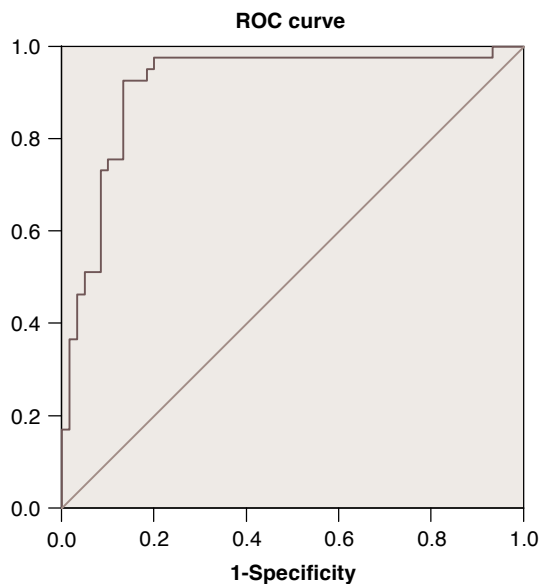


Figure 2. ROC curve for RP percentage usefulness in diagnosis of thrombocytopenia with increased thrombopoiesis. AUC: 0.92 (CI for 95%: 0.85–0.98). SE: 0.031.

percentage, were 5.4% (CI for 95%: 4.1–6.8) and 2.01×10^9 (CI for 95%: 1.6–2.3), respectively. An overall measure of assay performance in discriminating between both groups of thrombocytopenia is the ROC curve, shown in Figure 2. The area under the curve (AUC) is 0.92 (CI for 95%: 0.85–0.98) with SE 0.031. The RP percentage with the best sensitivity and specificity for a diagnosis of thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity was 11%; sensitivity 93%, specificity 85%, positive predictive value (PPV) 83%, negative predictive value (NPV) 95%.

Discussion

We measured RP by flow cytometry directly using whole-blood, avoiding extramanipulation, with a dual-labelling method for platelet identification.

Our results showed that RP determination is a good non-invasive test for differential diagnosis between thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity and thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoietic activity. A RP value >11.08% by this simple technique has a good sensitivity and specificity for diagnosis of thrombocytopenia with increased thrombopoietic activity. Although, generally, RP values are related to the technique used for its measurement, our results in non-thrombocytopenic controls are practically identical to values reported, using a different flow cytometry method.⁹ Regardless of RP values, several report results, agree that RP are a good platelet turnover marker,^{10–13} including our previous report.¹⁴ Recently, Kuwana et al. reported that RP measured from platelet-rich plasma is one of the six initial laboratory findings that discriminated ITP from other diagnoses in isolated thrombocytopenia.¹⁵ It seems that RP determination is a reliable measure to predict imminent platelet recovery in thrombocytopenic patients, after intensive chemotherapy.^{16–18} To date, RP are not routinely used for thrombopoietic evaluation, despite their potential clinical usefulness, because of their technical complexity, variability and lack of standardization. There are some limitations in this technique, because TO labelling of platelets is not specific. Mitochondrial DNA, dense granule nucleotides and other platelet compartments may non-specifically be labelled with fluorescent dyes like TO.^{19–21} This non-specifically labelling may explain our false positive results in patients with acute leukaemia and myelodysplastic disorders with central thrombocytopenia, most of them with very high count of peripheral white blood cells. In spite of the limitation, this simple technique may be of clinical usefulness as an initial screening test. RP allow the quantitative assessment of reduced production or increased destruction of platelets in thrombocytopenic patients. Some recent reports measure RP,

namely immature platelet fraction (IPF) or high fluorescence platelet fraction, directly from whole-blood and using a completely automatically method.^{22–27} Values of IPF were very similar to our percentage of RP in several thrombocytopenic groups and a IPF value of 7.7% was reported as the best point for highest sensitivity and specificity to discriminate between normal/suppressed group and increased group.²⁸ This data confirms that RP may be measured easily from whole-blood using some flow cytometric method and they may be used as the first step in thrombocytopenic patient study, because automatically RP counting is now available with some haematological analysers.

In summary, RP determination is a reliable marker of platelet turnover and may be as good as an initial screening test for thrombocytopenic patients, as reticulocytes are in studies of anaemic patients. In thrombocytopenic patients, a clinical evaluation along with a high RP percentage may allow to diagnose thrombocytopenia by increased thrombopoietic activity.

Conflict of interest: None declared.

References

- Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969; 17:225–9.
- Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990; 75:116–21.
- Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol* 1992; 98:637–46.
- Koike Y, Yoneyama A, Shirai J, Ishida T, Shoda E, Miyazaki K, et al. Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost* 1998; 79:1106–10.
- Robinson MS, MacKie IJ, Machin SJ, Harrison P. Two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol* 2000; 22:211–3.
- Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* 1998; 34:229–34.
- Robinson MS, MacKie IJ, Machin SJ, Harrison P. Two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol* 2000; 22:211–3.
- George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996; 88:3–40.
- Ryningen A, Apelsest T, Hausken T, Bruserud O. Reticulated platelets are increased in chronic myeloproliferative disorders, pure erythrocytosis, reactive thrombocytosis and prior to hematopoietic reconstitution after intensive chemotherapy. *Platelets* 2006; 17:296–302.
- Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117:606–10.
- Saxon BR, Mody M, Blanchette VS, Freedman J. Reticulated platelet counts in the assessment of thrombocytopenic disorders. *Acta Paediatr Suppl* 1998; 424:65–70.
- Saxon BR, Blanchette VS, Butchart S, Lim-Yin J, Poon AO. Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20:44–8.
- Catani L, Vianelli N, Luatti S, Rizzi S, Castellani S, Valdre L, et al. Characterization of autotransplant-related thrombocytopenia by evaluation of glycoconjugates and reticulated platelets. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:1191–4.
- Jimenez MM, Guedan AM, Martin ML, Campos SJ, Martinez RI, Vilella TC. Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: an indirect thrombopoietic marker. *Eur J Intern Med* 2006; 17:541–4.
- Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 2005; 118:1026–33.
- Wang C, Smith BR, Ault KA, Rinder HM. Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy. *Transfusion* 2002; 42:368–74.
- Chaoui D, Chakroun T, Robert F, Rio B, Belhocine R, Legrand O, et al. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy. *Transfusion* 2005; 45:766–72.
- Salvagno GL, Montagnana M, Degan M, Marradi PL, Ricetti MM, Riolfi P, et al. Evaluation of platelet turnover by flow cytometry. *Platelets* 2006; 17:170–7.
- Harrison P, Robinson MS, MacKie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets* 1997; 8:379–84.
- Robinson MS, MacKie IJ, Khair K, Liesner R, Goodall AH, Savidge GF, et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol* 1998; 100:351–7.
- Robinson M, Machin S, Mackie I, Harrison P. In vivo biotinylation studies: specificity of labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine. *Br J Haematol* 2000; 108:859–64.
- Watanabe K, Takeuchi K, Kawai Y, Ikeda Y, Kubota F, Nakamoto H. Automated measurement of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis. *Eur J Haematol* 1995; 54:163–71.
- Abe Y, Wada H, Sakakura M, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, et al. Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11:263–70.
- Sakakura M, Wada H, Abe Y, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, et al. Usefulness of measurement of reticulated platelets for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11:253–61.

Reticulated platelets screening test

25. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004; 126:93–9.
26. Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006; 16:101–9.
27. Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:282–7.
28. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 2006; 118:463.

3.2.2 RESULTADOS 2. COMENTARIO

(Monteagudo M, Amengual MJ, Muñoz L, Soler JA, Roig I, Tolosa C. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology *QJM*. 2008 Jul;101(7):549-55)

Tras confirmar en el estudio inicial que la técnica era reproducible y de simple realización, en este segundo trabajo analizamos su posible utilidad clínica en pacientes trombocitopénicos. Realizamos un análisis de la variabilidad intraensayo con resultados de coeficiente de variabilidad máximo del 14% para valores altos. No se realizó análisis de variabilidad interensayo dadas las características de la técnica que obliga a realizarla inmediatamente después de la recogida de la muestra. En este trabajo aumentamos de forma significativa el número de pacientes en cada uno de los grupos y sobre todo, se incluyeron los pacientes en cada uno de los grupos diagnósticos solo cuando existía un diagnóstico clínico de seguridad. Los resultados demostraron que los porcentajes de PR medidas por citometría de flujo eran significativamente diferentes en los diferentes grupos de trombocitopenias, permitiendo diferenciar las trombocitopenias centrales de las trombocitopenias por destrucción periférica. El análisis de los resultados nos permitió afirmar que el valor de PR con mejor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de trombocitopenia por destrucción periférica era el del 11%. Así mismo, el análisis de resultados permitió observar que existen falsos positivos, es decir pacientes con diagnóstico clínico de trombocitopenia central pero con valores de PR elevados, superiores al 11% algunos de ellos con valores muy altos y que correspondían a trombocitopenias en pacientes con síndromes mielodiplásicos y algunas leucemias agudas. Los resultados nos permiten

concluir que los valores elevados de PR determinados por citometría de flujo, puede ser una ayuda útil para el diagnóstico de trombocitopenias por destrucción periférica, cuando se usa junto con la valoración clínica global del paciente.

3.3 OBJETIVO 3

Analizar la correlación que existe entre la determinación de plaquetas reticuladas por citometría de flujo a partir de sangre total y el número de megacariocitos en médula ósea determinados por aspirado medular.

3.3.1 RESULTADOS 3.PUBLICACIÓN 3

Med Clin (Barc). 2009;133(3):81–85



MEDICINA CLINICA

www.elsevier.es/medicinaclinica



Original

Relación entre plaquetas reticuladas y número de megacariocitos en pacientes con trombocitopenia[§]

Manuel Monteagudo^a, Gianni Lucchetti^b, M^a. José Amengual^c, Luz Muñoz^d, J. Alfonso Soler^d, Inmaculada Roig^d y Carlos Tolosa^a

^a Servicio de Medicina Interna, Hospital de Sabadell, Institut Universitari Parc Tauli (UAB), Sabadell, Barcelona, España

^b Servicio de Medicina Interna, Hospital General de Vic, Barcelona, España

^c Servicio de Inmunología, Hospital de Sabadell, Institut Universitari Parc Tauli (UAB), Sabadell, Barcelona, España

^d Servicio de Hematología, Hospital de Sabadell, Institut Universitari Parc Tauli (UAB), Sabadell, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de noviembre de 2008

Aceptado el 26 de febrero de 2009

On-line el 9 de junio de 2009

Palabras clave:

Plaquetas

Plaquetas reticuladas Citometría de flujo

Aspirado medular

RESUMEN

Fundamento y objetivo: El aspirado medular es un test de gran valor para el diagnóstico patogénico de las trombocitopenias. El objetivo fue analizar la correlación entre los valores de plaquetas reticuladas (PR) en sangre periférica con el número de megacariocitos en médula ósea en un grupo de pacientes con trombocitopenia.

Pacientes y método: Estudio prospectivo observacional en pacientes con trombocitopenia entre junio de 2002 y junio de 2005. La determinación de PR se realizó mediante citometría de flujo con el uso de sangre total. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína-IIIa (CD61 PerCP[®]) para la identificación de plaquetas y naranja de tiazol (Retic-count[®]) para la tinción del ácido ribonucleico plaquetario residual. El estudio medular se realizó mediante aspirado medular.

Resultados: Se determinaron las PR en 54 pacientes con trombocitopenia que tenían estudio medular. Tres pacientes se excluyeron del estudio. Treinta y dos pacientes tenían trombocitopenias centrales con megacariocitos disminuidos o displasia, con una media de PR del 9,5% (intervalo de confianza [IC] del 95%: del 5,6 al 13,4%). Trece pacientes tenían megacariocitos elevados, con una media de PR del 25,7% (IC del 95%: del 13,1 al 38,3%). Seis pacientes tenían megacariocitos normales, con una media de PR del 13,6% (IC del 95%: del 0,6 al 26,8%). Se observaron diferencias entre el grupo con megacariocitos aumentados y el grupo de trombocitopenias centrales ($p \leq 0,001$). Un valor de PR superior o igual al 11% mostró sensibilidad del 70% y especificidad del 81% para el diagnóstico de aspirado medular con megacariocitos aumentados. Conclusiones: Las PR son un marcador indirecto de la producción de megacariocitos en médula ósea. La presencia de PR superior o igual al 11% en pacientes con trombocitopenia, especialmente de inicio agudo, indicaría trombocitopenia regenerativa, mientras que ante la presencia de valores bajos de PR sería recomendable realizar un aspirado medular.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Relationship between reticulated platelets and megakaryocyte number in thrombocytopenic patients

ABSTRACT

Keywords:

Platelets

Reticulated platelets

Flow cytometry

Marrow aspiration

Background and Introduction: Marrow aspiration is a test that helps the pathogenic diagnosis of thrombocytopenia. Our goal was to analyze the correlation between reticulated platelets (RP) values in peripheral blood with megakaryocytic number in bone marrow in a group of thrombocytopenic patients. **Patients and methods:** Prospective observational study in thrombocytopenic patients, between June 2002 and June 2005. RP determination was performed by flow cytometry using whole blood. We used a monoclonal anti-glycoprotein-IIIa antibody (CD61PerCP) for platelet identification and orange thiazole (Retic-count[®]) as platelet mRNA stain. Marrow study was conducted by marrow aspiration.

Results: RP were measured in 54 thrombocytopenic patients with bone marrow study. Three were excluded from the study. Thirty-two patients had central thrombocytopenia with diminished megakaryocytes (MK) and/or dysplasia, mean of RP 9.5% (CI 95%:5.6%–13.4%). Thirteen patients had high MK, mean of RP 25.7% (CI 95%:13.1%–38.3%). Six patients had normal MK, mean of RP 13.6% (CI 95%:0.6%–26.8%). There

[§] Los datos de este trabajo se comunicaron parcialmente en el 6th Congress European Federation of Internal Medicine. Lisboa, del 23 al 26 de mayo de 2007. Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mmonteagudo@tauli.cat (M. Monteagudo).

were differences between the group of increased MK and the group of central thrombocytopenias ($p < 0.0001$). A value of RPZ11% showed a sensitivity of 70% and specificity of 81% for the diagnosis of marrow aspirate with increased MK.

Conclusions: RP are an indirect marker of megakaryocyte number in bone marrow. A value of RPZ11% in patients with thrombocytopenia, especially with an acute onset, would indicate regenerative thrombocytopenia, while in the presence of low levels of RP a marrow aspiration should be performed.

2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La trombocitopenia es una alteración hematológica frecuente que en determinadas situaciones puede asociarse a hemorragia grave. Aunque el listado de causas de trombocitopenia es muy amplio, los 2 grandes mecanismos patogénicos implicados en su aparición son el incremento en la destrucción periférica de plaquetas y el defecto de producción medular de éstas. La técnica de elección para cuantificar la producción de megacariocitos en médula ósea es el aspirado medular. Sin embargo, ésta es una técnica invasiva que le produce malestar al paciente y que no suele realizarse de forma habitual en el paciente con sospecha de trombocitopenia secundaria a destrucción plaquetaria periférica. Por este motivo, se han buscado métodos indirectos no invasivos de evaluación de la actividad megacariocítica, de los que uno de éstos es la determinación de plaquetas reticuladas (PR).

Las PR son las formas más jóvenes de las plaquetas circulantes que contienen ácido ribonucleico (ARN) residual y, por tanto, son el equivalente plaquetario de los reticulocitos de la serie roja. Se describieron por primera vez en 1969¹ a partir de su visión directa en extensiones periféricas de un modelo animal de pérdida de sangre mediante el uso de azul de metileno como colorante. En 1990, Kienast y Schmitz² publicaron el primer trabajo de utilidad diagnóstica de la determinación de PR en pacientes con trombocitopenia mediante el uso de naranja de tiazol (NT) como colorante del ARN plaquetario. La determinación de PR se realiza por citometría de flujo, pero ésta es una técnica que no está estandarizada. Se han utilizado distintos sustratos, sangre total o plasma rico en plaquetas para su determinación, diversos colorantes como marcadores de ARN y diferentes tiempos de incubación. A pesar de esto, los diversos trabajos publicados demuestran que las PR son un buen marcador periférico indirecto de actividad megacariocítica medular³⁻⁷. Sin embargo, no hay estudios entre los trabajos publicados que comparen los resultados de las PR a nivel periférico con el estándar utilizado para valorar la producción de megacariocitos de forma directa: el aspirado medular.

El objetivo de este estudio fue analizar la correlación existente entre los valores de PR en sangre periférica determinadas por citometría de flujo a partir de sangre total y el número de megacariocitos en médula ósea en un grupo de pacientes con trombocitopenia.

Pacientes y método

Pacientes

Entre junio de 2002 y junio de 2005 se recogieron de forma prospectiva pacientes que ingresados o ambulatoriamente se atendieron en el Hospital Parc Tauli de Sabadell con trombocitopenia y que cumplían los criterios de inclusión.

Se incluyó a los pacientes con recuento de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/l$ confirmado tras la revisión de extensión periférica que podían incluirse en alguno de los grupos etiológicos definidos y de los que se disponía de un estudio de médula ósea.

Se excluyó a los pacientes con seudotrombocitopenia diagnosticada tras la revisión de la extensión periférica, a los pacientes que no podían incluirse en alguno de los grupos previamente definidos, a los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o infección por el virus de hepatitis C y a los pacientes que no tenían realizado estudio de médula ósea.

Definición clínica de grupos etiológicos

Grupo A. Trombocitopenia central, que incluye los procesos en los que hay una producción disminuida o defectuosa de plaquetas. Los diagnósticos incluidos en este grupo fueron trastornos linfoproliferativos crónicos o agudos, mieloma múltiple, leucemia aguda, anemia aplásica, síndromes mielodisplásicos, anemia megaloblástica o infiltración medular por tumores sólidos. El diagnóstico de estos procesos se basó en los resultados analíticos, los hallazgos en médula ósea y los análisis citogenéticos.

Grupo B. Trombocitopenia periférica, que incluye los procesos en los que hay un incremento en la destrucción periférica de plaquetas, con conservación de la producción medular en la mayoría de las ocasiones por probable mecanismo inmunitario. Los diagnósticos incluidos en este grupo fueron los siguientes: púrpura trombocitopénica aguda idiopática (PTAI), con un diagnóstico que se basó en la historia clínica, el examen físico, el recuento sanguíneo completo y el curso clínico tras tratamiento (todos los pacientes con PTAI cumplían los criterios de la Sociedad Americana de Hematología⁸), y trombocitopenia crónica, para aquellas trombocitopenias de más de 6 meses de duración (cuando en el estudio realizado pudo demostrarse algún dato asociado de autoinmunidad [anticuerpos antiplaqueta, anticuerpos antinucleares y anticuerpos anticardiolipina] se etiquetó como trombocitopenia crónica autoinmune y si no había ninguno de estos datos se etiquetó como trombocitopenia crónica no filiada).

Grupos en relación con el resultado del estudio medular:

1. trombocitopenias con megacariocitos disminuidos en número;
2. trombocitopenias con megacariocitos normales o aumentados con presencia de displasia de la serie megacariocítica;
3. trombocitopenias con megacariocitos normales en número, y
4. trombocitopenias con megacariocitos aumentados en número.

Método

Realización de aspirado medular

Tras desinfectar con povidona yodada y anestesiarse la zona de punción (esternón o cresta ilíaca) con 10 ml de mepivacaína al 2%, se llegó a la zona medular ósea mediante la utilización de una aguja de aspirado (Gallini 18 G) y se obtuvo una muestra de médula ósea con una jeringa de 20 ml. Un técnico procesó inmediatamente el material obtenido, para esto se colocó la primera muestra en una placa de Petri y se realizaron de 6 a 10 extensiones con el grumo medular. Se realizó la tinción May-Grunwald-Giemsa y estas extensiones se revisaron al microscopio.

Se realizaron otras tinciones específicas en función de la enfermedad existente. Se tiñeron como mínimo 2 extensiones. Se revisó un número de campos variables a pocos aumentos (200) en función de los hallazgos, pero como mínimo se revisaron 20 campos a este aumento en cada extensión. Se realizó un análisis cuantitativo del número de megacariocitos, en el que se valoró como normal a 20 la presencia de 4 a 5 megacariocitos por campo y a 40 la presencia de 2 a 3 megacariocitos por campo. Se valoró la displasia megacariocítica como presencia de micromegacariocitos, megacariocitos mononucleados o hipolobulados y megacariocitos con núcleos dispersos en más del 10% de los megacariocitos, tras revisar como mínimo 30 de éstos.

Determinación de plaquetas reticuladas

Las PR se identificaron de acuerdo con la técnica previamente descrita por Robinson et al⁵ modificada, sin manipulación de la muestra y evitando la fijación y la centrifugación de la sangre.

Extracción de la sangre: la muestra de sangre se recogió tras venopunción en tubos de hematología (tipo Vacutainer[®], Becton Dickinson and Company, San José, CA, EEUU) que contienen ácido edético-vitamina K2 (1,8 mg/ml). El análisis completo de la sangre se realizó con el autoanalizador ADVIA 120 (Bayer corporation, Newbury, Reino Unido), y las muestras con trombocitopenia se confirmaron tras la revisión de la extensión de sangre periférica. Todas las muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el análisis de éstas, que se realizó dentro de las 6 h siguientes a la extracción.

Cuantificación de PR: se incubaron 5 ml de sangre total con 5 ml de anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína-IIIa marcado con CD61 PerCP[®] (Becton Dickinson and Company) y 30 ml de amortiguador fosfato salino durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Para cada muestra se usó un tubo control con 5 ml de control isotópico de ratón (IgG1-mouse PerCP[®] Becton Dickinson and Company). Después de la incubación, se añadió 1 ml de naranja de tiazol (NT) como colorante de ARN (TO; Retic-count[®], Becton Dickinson and Company) a una dilución de 1/10 en Isoton II[®] en cada tubo a testar y 1 ml de solución Isoton II[®] (Beckman-Coulter, Highwiccombe, Reino Unido) en cada tubo control. Después de incubación durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente, se analizó inmediatamente en el citómetro (FACSCalibur, Becton Dickinson and Company). La identificación de la población plaquetaria se realizó a partir del tamaño celular, con escala logarítmica del SSC (side scatter) y la positividad para la expresión de antígeno de membrana CD61. El porcentaje de PR se obtuvo por recuento diferencial de aquellos elementos que se marcaban con NT de un total de 10.000 elementos identificados como población plaquetaria (CD61⁺). De forma arbitraria, el umbral para fluorescencia de NT se marcó como valores de positividad para CD61 PerCP[®] y NT por encima del 99% de la población negativa para NT en tubo control con plaquetas normales. La adquisición de datos se realizó mediante el programa informático Cell Quest Pro. En cada sesión se pasó una muestra del grupo control con cifras de plaquetas dentro de los valores de referencia.

Análisis estadístico

Se realizó test de ANOVA para comparar las medias de PR entre grupos 2 a 2 según resultado del aspirado medular. Se realizó una curva ROC para valorar la sensibilidad y la especificidad del valor de PR en el diagnóstico de aspirado medular con megacariocitos aumentados. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows.

Resultados

Se determinaron las PR en 131 pacientes con trombocitopenia. Se realizó estudio medular en 54 pacientes con trombocitopenia. Se excluyó a 2 pacientes por infección por VIH y se excluyó a un paciente con PTAI y aspirado medular con megacariocitos normales por presentar un valor de PR no valorable por interferencia en la técnica de citometría de un potente anticuerpo antiplaquetario anti-glicoproteína-IIb-IIIa. El grupo incluido en el análisis fue, por tanto, de 51 pacientes con trombocitopenia. Treinta (58,8%) de los pacientes eran varones y 21 (41,2%) eran mujeres. El aspirado medular demostró megacariocitos disminuidos en 20 pacientes y megacariocitos normales o altos pero con displasia en 12 pacientes, que conformaron el grupo A de trombocitopenias centrales. El grupo B de trombocitopenias periféricas lo formaron 13 pacientes con megacariocitos elevados y 6 pacientes con megacariocitos normales. En la **tabla 1** se muestran las etiologías del grupo de trombocitopenias centrales. En la **tabla 2** se muestran los valores de plaquetas y las PR en cada uno de los grupos según el resultado del aspirado medular. Del grupo con trombocitopenias centrales, 6 pacientes tenían valores de PR superiores al 11% y son, por tanto, falsos positivos con ausencia de correlación con el número de megacariocitos en médula ósea. En el grupo de trombocitopenias periféricas con megacariocitos elevados, 8 pacientes correspondían a PTAI (uno con PR del 9%) y 5 pacientes tenían trombocitopenias crónicas (3 con PR inferiores al 11%). Del grupo de trombocitopenias periféricas con megacariocitos normales, 2 eran PTAI (ambas con PR superiores al 11%) y 4 eran trombocitopenias crónicas (todas con PR inferiores al 11%). El resultado del test de ANOVA para comparar las medias de PR en grupos 2 a 2 mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con megacariocitos

Tabla 1
Etiología de los trombocitopenias centrales (grupo A)

Diagnóstico	n
SMD	8
Síndrome linfoproliferativo	5
Mieloma múltiple	4
SMD con blastos periféricos	3
Leucemia aguda	3
Aplasia medular	2
Infiltración por ADC	2
Linfoma linfoplasmocitoide	1
Posquimioterapia	1
Megas disminuidos	1
LMC + trasplante	1
Déficit de vitamina B12	1

ADC: adenocarcinoma; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndrome mielodisplásico.

Tabla 2
Resumen de resultados de plaquetas y plaquetas reticuladas en porcentaje en cada uno de los grupos analizados según resultado de aspirado medular

	n	Plaquetas ($10^9/l$)	PR, % (IC del 95%)
Grupo A	32	41,7	9,5 (5,6 a 13,4)
Megas disminuidos	20	46,3	10,7 (5,1 a 16,3)
Megas dismórficos	12	33,9	7,4 (2,2 a 12,6)
Grupo B	19	24,5	21,7 (12,4 a 31,01)
Megas altos	13	21	25,7 (13,1 a 38,3)
Megas normales	6	32	13,6 (0,6 a 26,8)

IC: intervalo de confianza; PR: plaquetas reticuladas. p % 0,001.

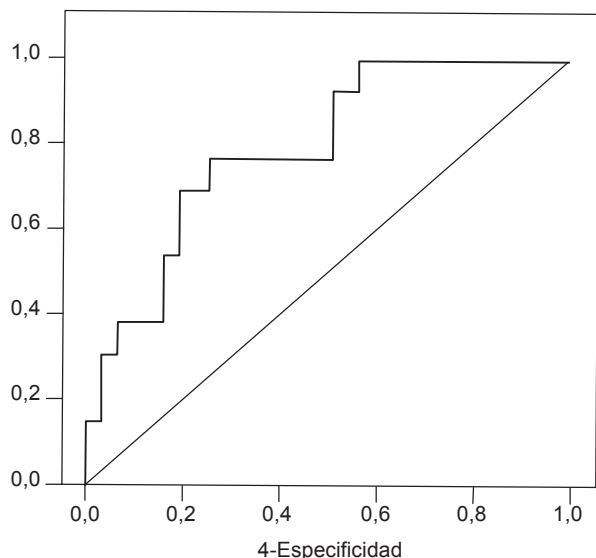


Figura 1. Curva ROC de porcentaje de plaquetas reticuladas para el diagnóstico de aspirado medular con megacariocitos elevados. Área bajo la curva: 0,798 (IC 95%: 0,66–0,93) Error estándar 0,069.

aumentados y el grupo de trombocitopenias centrales ($p \frac{1}{4} 0,001$). La figura 1 muestra la curva ROC de valores de PR para el diagnóstico de aspirado medular con megacariocitos aumentados. Con un área bajo la curva prácticamente de 0,8, error estándar de 0,069 e intervalo de confianza del 95%: 0,66 a 0,93, la sensibilidad y la especificidad para el valor de corte del 11% sería del 70 y del 81%, respectivamente.

Discusión

En este estudio se ha realizado la determinación de PR a partir de sangre total mediante citometría de flujo y mediante el uso de doble marcaje de acuerdo con una técnica sencilla previamente publicada por este grupo^{9,10} y se ha comparado con el resultado del número de megacariocitos en médula ósea en un grupo de pacientes con trombocitopenia. Los resultados del estudio confirman que los porcentajes elevados de PR permiten diferenciar valores elevados de megacariocitos en médula ósea de valores disminuidos en pacientes con trombocitopenia, tal como otros estudios habían demostrado su utilidad en relación con el diagnóstico clínico o en diversas situaciones de supresión medular^{10–16}. Sin embargo, los valores de sensibilidad del 70% y de especificidad del 81% en el actual estudio serían inferiores a los de nuestro estudio previo¹⁰, probablemente en relación con el reducido número de la muestra.

Los resultados del estudio muestran que un porcentaje de PR elevado superior al 11%, grado de corte previamente establecido según diagnósticos clínicos¹⁰, como indicador de trombocitopenia regenerativa tiene una buena correlación con el número de megacariocitos en médula ósea cuando la trombocitopenia es aguda, básicamente PTAI (sólo uno de los pacientes tenía PR inferiores al 11%), pero estos valores pierden correlación cuando se trata de trombocitopenias crónicas. Asimismo, hay falsos positivos de PR elevadas en situaciones de trombocitopenia central, casi todos éstos en relación con procesos que cursaron con aumento de blastos en sangre periférica, bien por leucemias agudas o bien por síndromes mielodisplásicos leucemizados, posiblemente por tinción inespecífica¹⁷. Estas situaciones no crearán problema de diagnóstico diferencial ante la existencia de trombocitopenia. Una de las limitaciones de este estudio es el reducido número de

aspirados medulares realizados entre los pacientes con trombocitopenias periféricas, puesto que éste no se realizó de forma sistemática a todos los pacientes, sino que la indicación se derivó de la práctica clínica habitual.

Los resultados del estudio apoyarían la utilidad de los valores elevados de PR en pacientes con trombocitopenia aislada como marcador de trombocitopenia regenerativa. Ante una trombocitopenia aislada, especialmente de inicio agudo, los valores elevados de PR apoyarían la existencia de trombocitopenia con megacariocitos elevados, mientras que los valores bajos de PR obligarían a descartar un problema central. La aplicación de los principios de la citometría de flujo en los modernos autoanalizadores por impedancia permite en la actualidad utilizar colorantes fluorescentes para el marcaje celular^{18,19}. De esta forma, algunos autoanalizadores permiten la determinación de la fracción plaquetaria inmadura^{20–22}, equivalente a la determinación de PR por citometría, lo que puede permitir que en un futuro próximo se asista a una verdadera generalización de su aplicación clínica.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiación

Una beca del Comité Institucional de Recerca de la Corporación Parc Taulí financió este trabajo.

Bibliografía

- Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol*. 1969;17:225–9.
- Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: A diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorder. *Blood*. 1990;75:116–21.
- Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol*. 1992;98:637–46.
- Koike Y, Yoneyama A, Shirai J, Ishida T, Shoda E, Miyazaki K, et al. Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost*. 1998;79:1106–10.
- Robinson MS, MacKie IJ, Machin SJ, Harrison P. Two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol*. 2000;22:211–3.
- Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: Improvements of detection and assay stability. *Cytometry*. 1998;34:229–34.
- Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117:606–10.
- George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: A practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood*. 1996;88:3–40.
- Jiménez MM, Guedan AM, Martín ML, Campos SJ, Martínez RI, Vilella TC. Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: An indirect thrombopoietic marker. *Eur J Intern Med*. 2006;17:541–4.
- Monteagudo M, Amengual MJ, Muñoz L, Soler JA, Roig I, Tolosa C. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *QJM*. 2008;101:549–55.
- Ryningen A, Apseth T, Hausken T, Bruserud O. Reticulated platelets are increased in chronic myeloproliferative disorders, pure erythrocytosis, reactive thrombocytosis and prior to hematopoietic reconstitution after intensive chemotherapy. *Platelets*. 2006;17:296–302.
- Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117:606–10.
- Saxon BR, Mody M, Blanchette VS, Freedman J. Reticulated platelet counts in the assessment of thrombocytopenic disorders. *Acta Paediatr Suppl*. 1998;424:65–70.
- Saxon BR, Blanchette VS, Butchart S, Lim-Yin J, Poon AO. Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998;20:44–8.

15. Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med.* 2005;118:1026–33.
16. Wang C, Smith BR, Ault KA, Rinder HM. Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy. *Transfusion.* 2002;42:368–74.
17. Robinson MS, MacKie IJ, Khair K, Liesner R, Goodall AH, Savidge GF, et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: Evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol.* 1998;100:351–7.
18. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hematol.* 2007;29:77–91.
19. Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"—more than just vestigial mRNA!. *Platelets.* 2008;19:395–404.
20. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2004;126:93–9.
21. Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol.* 2006;125:282–7.
22. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res.* 2006;118:463–9.

3.3.2 RESULTADOS 3.COMENTARIO

(Monteagudo M, Lucchetti G, Amengual MJ, Muñoz L, Soler JA, Roig I, Tolosa C. Relationship between reticulated platelets and megacaryocyte number in thrombocytopenic patients **Med Clin (Barc)**. 2009 Jun 20;133(3):81-5)

Tras los resultados obtenidos en el trabajo previo que demostraban la correlación existente entre el diagnóstico etiológico clínico y los valores de PR, en este trabajo analizamos el valor de las PR en relación con el test de referencia para el diagnóstico de trombocitopenias como es el aspirado medular. Aunque el estudio puede tener algunas limitaciones porque el número de pacientes estudiado no es muy amplio (54), los resultados de PR elevadas muestran buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de trombocitopenia con número de megacariocitos elevados en el aspirado medular, especialmente cuando se trata de trombocitopenias agudas aisladas.

3.4 OBJETIVO 4.

Valoración de la correlación existente entre los valores de PR determinadas por citometría de flujo a partir de sangre total con los resultados de fracción plaquetar inmadura (IPF), que sería el equivalente de las PR determinadas de forma automática mediante el autoanalizador Sysmex 2100.

ORIGINAL ARTICLE

Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia

Issac Pons¹, Manuel Monteagudo¹, Gianni Lucchetti², Luz Muñoz³, Granada Perea³, Isabel Colomina³, Joaquim Guiu³, Joaquina Obiols³

¹Internal Medicine Department, Corporació Sanitària Parc Taulí- Instituto Universitario - Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), Sabadell, Barcelona; ²Internal Medicine Department, Hospital General de Vic, Vic, Barcelona; ³Hematology Service, Corporació Sanitària Parc Taulí- Instituto Universitario - Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), Sabadell, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Reticulated platelets (RP) are a surrogate marker for megakaryocytic activity, but the limitation of this determination is the lack of standardization of methodology. The determination of the immature platelet fraction (IPF) is performed in a simple, automated, and reproducible way between laboratories. We analyzed the correlation between IPF and RP, and usefulness of IPF in patients with thrombocytopenia. **Methods:** RP were determined by flow cytometry using double staining with thiazole orange and CD61 PerCP. IPF was performed with Sysmex XE2100 analyzer. We used a control group with normal platelets, and thrombocytopenic patients were classified into three groups: Group 1. Central thrombocytopenia, Group 2. Thrombocytopenia as a result of enhanced peripheral platelet destruction, and Group 3. Peripheral non-immune thrombocytopenia by abnormal distribution. **Results:** Fourteen controls and 66 patients were analyzed. Group 1: 25 patients, they had mean and confidence interval 95% (95% CI) for IPF 8.67% (6.49–10.46%) and RP 4.08% (2.86–5.30%). Group 2: 20 patients, they had mean and 95%CI for IPF 16.80% (12.20–21.39%) and RP 16.14% (9.89–22.40%). Group 3: 21 patients, they had mean and 95% CI for IPF 9.04% (6.95–11.14%) and RP 5.23% (3.41–7.05%). The overall Pearson linear correlation between IPF and RP was $r = 0.65$. There were statistically significant differences in values of IPF and RP between Group 2 and the other two groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** There is a good correlation between IPF and RP mainly in thrombocytopenia by peripheral destruction. Determination of IPF is an easy technique in their implementation, standardized and reproducible, so it could be a useful screening technique in patients with thrombocytopenia.

Key words reticulated platelets; immature platelet fraction; flow cytometry; thrombocytopenia

Correspondence M. Monteagudo, Internal Medicine Department, Hospital de Sabadell, Parc Taulí S/N. 08208, Sabadell, Barcelona, Spain. Tel: 937231010; Fax: 937160646; e-mail: mmonteagudo@tauli.cat

Accepted for publication 7 May 2010

doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01468.x

Introduction

Reticulated platelets (RP) are the youngest forms of circulating platelets that contain messenger RNA (mRNA) residual (1). It has been observed in animal models that mRNA is unstable, degrades within 24 h (2, 3), and disappears in parallel with the aging of platelets. Reticulated platelets are functionally active and are the platelet equivalent of red cell reticulocytes.

Reticulated platelets were determined by flow cytometry. The main problem of the determination of RP is

the lack of standardization of the technique. There is a significant variability in the various published protocols referring to the incubation time, substrate used (whole blood or platelet-rich plasma), concentrations and types of dyes, and additional use of a second antibody marker of platelets, causing that the percentage of RP in healthy people ranges between 1% and 20% (4, 5). Despite the lack of standardization of the technique, numerous studies have shown the usefulness of RP in the diagnosis of thrombocytopenia, providing a good

© 2010 John Wiley & Sons A/S

estimate of the rate of platelet production in bone marrow (6–11).

In the last years, new methods have appeared in commercial autoanalyzers for platelet count, including the opening impedance, optical scattering, and fluorescence, allowing the determination of the immature platelet fraction (IPF) (12), which is the equivalent of RP.

The Sysmex XE-2100 autoanalyzer has introduced platelet count by optical fluorescence, in addition to the opening impedance (13). This measure of RP is performed using the reticulocyte channel in the autoanalyzer by flow cytometry, expressing it as IPF. It uses fluorescent dyes containing polymethine and oxazine, which penetrate the cell membrane staining the RNA in both cells (erythrocyte and platelet). The stained cells pass through the beam of light from a semiconductor laser diode. After measuring the cell volume (forward scatter light) and RNA content (fluorescence intensity), it creates graphs (scattergrams) with cell volume (forward scatter light) in y-axis and fluorescence in x-axis. Using the appropriate software (computer algorithm) is possible to discriminate between mature platelets and IPF. Mature platelets appear as blue dots, and the immature platelets are displayed as green dots, the latter constituting the IPF parameter (14). With this method, the platelets that contain more RNA than normal are identified as immature and are classified as IPF. Theoretically, IPF is proportional to RP, and the percentage of IPF has been reported by some authors as a clinically useful marker of thrombopoiesis (15–17).

The aim of our study is to analyze the correlation between IPF and RP determined by flow cytometry and to examine the usefulness of IPF in the etiology diagnosis of thrombocytopenia.

Material and methods

Patients

From May to July 2007, we prospectively enrolled both admitted and out patients being attended to at Parc Tauli Hospital in Sabadell (Barcelona, Spain) with thrombocytopenia who met with the inclusion criterion. Inclusion criterion: Patients with platelet counts below $100 \cdot 10^9/L$, confirmed after peripheral blood film review, could be included in one defined etiologic group.

The different groups were defined as:

1. Central thrombocytopenia when there was diminished or defective platelet production. Diagnoses included in this group were the following: acute or chronic lymphoproliferative disorders, multiple myeloma, acute leukemia, aplastic anemia, myelodysplastic disorders and medullar infiltration by solid tumors, based on blood results, bone marrow findings, and cytogenetic

Immature platelet fraction and reticulated platelet correlation analysis. Postchemotherapy thrombocytopenia was defined as thrombocytopenia after chemotherapy treatment that persisted for more than 7 days after RP and IPF determination. No platelet transfusion or infection was present when RP and IPF determination was carried out.

2. Thrombocytopenia as a result of enhanced peripheral platelet destruction by an immunologic or non-immunologic mechanism. Thrombocytopenia immunologic included acute and chronic immune thrombocytopenia, a diagnosis that was made on the basis of clinical history, physical examination, complete blood count, and clinical course after treatment. All patients with immune thrombocytopenia fulfilled the criteria indicated by the American Society of Hematology Practice Guidelines (18). Thrombocytopenia non-immunologic included disseminated intravascular coagulation (DIC), defined by classical clinical symptoms and confirmed through blood studies.

3. Peripheral non-immune thrombocytopenia by abnormal distribution when there was splenomegaly and hypersplenism analytical data. Diagnoses included in this group were liver cirrhosis (LC) and other diseases with portal venous system hypertension.

4. Normal control group. Healthy individuals with a normal platelet count in blood sample (platelets $> 150 \cdot 10^9/L$).

Methods

Reticulated platelets were analyzed in each patient and control, with flow cytometry, using double staining with thiazole orange for RNA and CD61 PerCP for platelet identification as previously described in the technique (6). Briefly, Blood collection: Blood samples were collected in hematologic tubes (Vacutainer type, Becton Dickinson, San José CA, USA) containing ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)-K2 (1.8 mg/mL). Complete blood count was measured using Sysmex 2100 (Sysmex, Kobe, Japan) autoanalyzer, and thrombocytopenic samples were confirmed after peripheral blood film review. All blood samples were kept at room temperature, until analysis was performed within than 6 hours after collection.

Reticulated platelet quantification: Some 5 μ L of whole blood was incubated with 5 μ L of PerCP -labeled anti-glycoprotein IIIa monoclonal antibody (CD61 PerCP Becton Dickinson, San José CA, USA) and 30 μ L of phosphate-buffered saline for 15 min in the dark, at room temperature. A control tube was used for each sample with 5 μ L of isotypic mouse control (IgG1-mouse PerCP Becton Dickinson, San José CA, USA). After incubation, 1 mL thiazol orange (TO; Retic-count, Becton Dickinson, San José CA, USA) at 1/10 dilution in Isoton II (Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) was

added to the test tube and 1 mL Isoton II (Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) solution was added to the control tube. After incubation for 1 h in the dark at room temperature, they were immediately read in the cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José CA, USA). Platelets were identified by their logarithmic side scatter and CD61 positivity expression. Analysis was performed with computer software (CellQuest Pro, Becton Dickinson, San José CA, USA). A dot plot cytogram (CD61-PerCP versus TO fluorescence) was generated, and RP rate was expressed as a percentage of TO and CD61-PerCP double-positive cells in 10 000 identified platelets. The threshold of TO fluorescence was established; the level was more than 99% of CD61-PerCP positive population was negative for TO in the control tube. A control with normal platelet count was tested in each assay.

Autoanalyzer Sysmex XE2100 was used for IPF determination. It was carried out simultaneously with RP analysis by flow cytometry.

Statistical analysis

We determined the degree of correlation between IPF and RP of each patient using Pearson's linear correlation. We calculated means and confidence intervals of 95% (95% CI) of different groups. *anova* test was performed to determine differences in the value of IPF between different groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using *spss* (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA) software for Windows (version 17.0).

Results

Table 1 shows summarized results of mean of platelet count, mean of percentage, and absolute number of IPF and RP, with 95% CI in the different groups analyzed.

Table 1 Summary results PR and IPF in different groups

	N	Mean platelet count (range)	Mean % IPF (95%-CI)	Mean absolute IPF (95%-CI)	Mean % RP (95%-CI)	Mean absolute RP (95%-CI)
(Group 1) Defective production	25	44 · 10 ⁹ /L (3–80)	8.67* (6.49–10.46)	3.2 · 10 ⁹ /L (2.4–3.9)	4.08 (2.86–5.30)	1.67 · 10 ⁹ /L (1.0–2.1)
(Group 2) Peripheral destruction	20	37 · 10 ⁹ /L (2–89)	16.80*,** (12.2–21.4)	4.8 · 10 ⁹ /L (3.3–6.4)	16.14 (9.89–22.40)	4.26 · 10 ⁹ /L (1.6–6.9)
(Group 3) Splenomegaly	21	53 · 10 ⁹ /L (17–87)	9.04** (6.95–11.14)	4 · 10 ⁹ /L (3.2–4.9)	5.23 (3.41–7.05)	2.16 · 10 ⁹ /L (1.4–2.9)
(Group 4) Controls	14	277 · 10 ⁹ /L (174–395)	2.56 (1.7–3.43)	7.1 · 10 ⁹ /L (4.8–9.4)	1.43 (0.88–2)	3.85 · 10 ⁹ /L (2.5–5.4)

It shows statistically significant differences between % IPF Group 2 (peripheral destruction) and the others groups, Group 1 (defective production) and Group 3 (splenomegaly). IPF, immature platelet fraction; RP, reticulated platelets. * $P < 0.01$ ** $P < 0.01$.

Group 1: 25 patients, mean age 62 years, range 9–81, with diagnoses of bone marrow toxicity after chemotherapy for solid tumor (N = 8), bone marrow toxicity after chemotherapy for hematological disease (N = 5), myelodysplastic syndrome (N = 5), bone marrow toxicity after radiotherapy and chemotherapy for solid tumor (N = 3), medullar infiltration by hematological disease (N = 2), and medullar infiltration by solid neoplasm (N = 1) and aplastic anemia (N = 1). Mean IPF: 8.67%, (95% CI: 6.49–10.46%). Mean RP: 4.08%, (95% CI: 2.86–5.30%).

Group 2: 20 patients, mean age 50 years, range 18–88, with diagnoses of chronic immune thrombocytopenia (N = 16), Evans syndrome (N = 2), peripheral autoimmune thrombocytopenia associated with connective tissue (N = 1), DIC by sepsis of abdominal etiology (N = 1). Mean IPF: 16.80%, (95% CI: 12.20–21.39%). Mean RP: 16.14%, (95% CI: 9.89–22.40%).

Group 3: 21 patients, mean age 66 years, range 37–80. With the diagnosis of liver cirrhosis by hepatitis C virus (HCV) (N = 9), alcoholic LC (N = 7), LC hepatitis B virus (HBV) (N = 2), LC HBV and HCV (N = 1), LC cryptogenic (N = 1), alcoholic LC HCV (N = 1). Mean IPF: 9.04%, (95% CI: 6.95–11.14%). Mean RP: 5.23%, (95% CI: 3.41–7.05%).

Control group: 14 patients, mean age: 49 years, range (15–83). Mean IPF: 2.56%, (95% CI: 1.70–3.43%). Mean RP: 1.43%, (95% CI: 0.88–2%).

Figure 1 shows the overall Pearson's linear correlation between IPF and RP with $r = 0.65$ statistically significant ($P < 0.01$). Figure 2 shows Pearson's linear correlation of IPF and RP values in each of thrombocytopenic groups and controls.

anova analysis showed differences that are statistically significant ($P < 0.01$) between IPF of different groups. Analysis of multiple comparisons showed statistically significant differences between IPF for central thrombocytopenia (Group 1) and thrombocytopenia because of

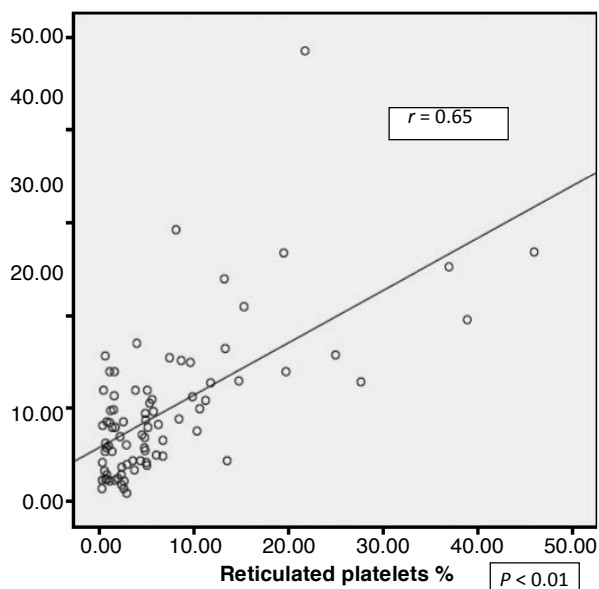


Figure 1 Pearson linear correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets.

enhanced peripheral platelet destruction. (Group 2) $P < 0.01$, and between peripheral non-immune thrombocytopenia by abnormal distribution (Group 3) and thrombocytopenia because of enhanced peripheral platelet destruction (Group 2) $P < 0.01$. There were no statistically significant differences between the central and peripheral non-immune thrombocytopenia. Three groups had statistically significant differences about the control groups.

The results of our study showed an overall correlation between the IPF and RP ($r = 0.65$). The analysis of correlation of IPF and RP in each group shows a good correlation in group 2 ($r = 0.55$) and group 3 ($r = 0.43$) but not in group 1 ($r = 0.24$) and controls ($r = 0.09$). There were statistically significant differences in IPF and RP values between the groups of thrombocytopenia with high megakaryocytic activity (Group 2) and the groups of thrombocytopenia with normal or low megakaryocytic activity (Groups 1 and 3). Overall, there is a good correlation between both techniques in our work, but is not perfect, resulting the best correlation in the group of peripheral destruction (Group 2). Also, values of IPF are higher than RP by flow cytometry in the group of patients analyzed. One reason for the differences in values and higher values of IPF will be in the methodology. Software in Sysmex 2100 defines arbitrarily highly fluorescent platelets as those with the highest 3% intensity of fluorescence (19), while by flow cytometry the threshold is arbitrarily placed in 1% (11). These differences not misclassified thrombocytopenic patients with high megakaryocytic activity in thrombocytopenia with low megakaryocytic activity.

© 2010 John Wiley & Sons A/S

We have not done in this work an inter assay and intra assay variability study of both techniques. We conducted in our previous work (11) and intra assay variability with our flow cytometry method for RP determination. Our coefficient of variation ranged from 14.3% for low levels of RP to 5.9% for high levels of RP. Similarly, the published results of intra assay variability for IPF determination in two studies ranged from 14.2% to 22.1% for low levels and 2.04–7.1% for high levels of IPF (16, 19).

Discussion

Determination of RP by flow cytometry assessed indirectly megakaryocytic activity, is useful in patients with thrombocytopenia, showing marked increase in the percentage of RP in thrombocytopenia with increased platelet turnover, as immune thrombocytopenia or DIC, being immune thrombocytopenia the process with the

Currently, the analyzer Sysmex XE2100 allows obtaining the IPF that correlates with RP. So far, there are very few studies that compare the correlation between the two techniques (23), but some published studies support the use of IPF for the diagnosis of patients with thrombocytopenia (15–17). Our results support the hypothesis that IPF is a useful marker for diagnosis of patients with thrombocytopenia. These studies provide a range of IPF for the healthy population between 1.1% and 6.1%, showing a most remarkable increase in IPF patients with immune thrombocytopenia (22.3%) and acute thrombotic thrombocytopenic purpura (17.2%) (16). In our work, in the group of enhanced peripheral platelet destruction, the mean percentage of the IPF is 16.80%.

Patients with peripheral non-immune thrombocytopenia by abnormal distribution, all of them with LC, have IPF mean of 9.04%, which does not differ statistically from the central thrombocytopenia, but there are statistical significant differences with the control group. These results support the theory that the thrombocytopenia in LC may be multifactorial and may have a component of increased platelet turnover, described in a previous work with determination of RP (24) taking into account that half of our patients in this group have HCV.

The mean of IPF in the central thrombocytopenia group was of 8.67%, clearly below the group of thrombocytopenia with increased megakaryocytic activity. These data confirm that the IPF is a useful peripheral marker of megakaryocytic activity, suggesting that in thrombocytopenia less than $100 \cdot 10^9/L$, an IPF fewer than 9% is a sign of inadequate marrow megakaryocytic response. Considering also that there may be false positive RP and IPF, for example, some acute leukemia or

161

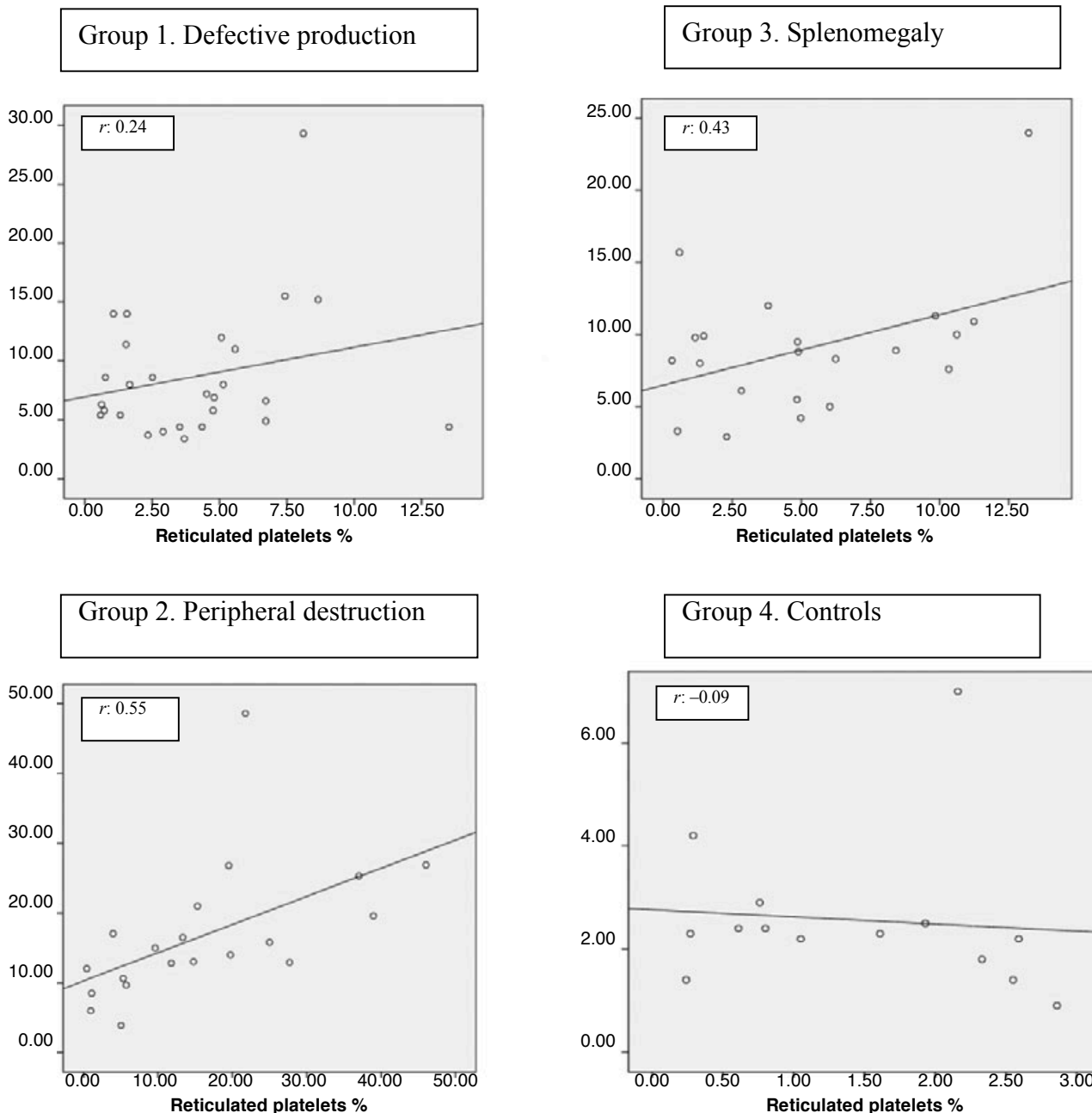


Figure 2 Pearson linear correlation between immature platelet fraction (IPF) and reticulated platelets (RP) in each group. The analysis of correlation of IPF and RP in each group shows a good correlation in group 2 ($r = 0.55$) and group 3 ($r = 0.43$) but not in group 1 and controls.

myelodysplastic disorders, probably reflecting inefficient megakaryopoiesis, these results should be viewed as an initial aid to diagnosis of thrombocytopenia so taking into account the patient's global assessment will be easy to differentiate these processes.

Recent studies support the usefulness of IPF determination in other pathologies, such as acute coronary syndrome, which shows an increase in IPF values, especially in the acute phase of myocardial infarction with

ST-segment elevation, associating with increased hemostatic potential that contributes to the formation of thrombus (25). A recent paper communicates about the potential usefulness as a marker of progression to cirrhosis in patients with chronic liver disease (26). It has been postulated also the value of the determination of IPF in the myelodysplastic syndrome, where IPF rates > 10% would be associated with a greater number of karyotypic abnormalities (including abnormalities of chromosome

7), thus conferring a worse prognosis in myelodysplastic syndromes (27, 28).

IPF is an automated technique for RP determination, standardized, reproducible and it is a methodology that saves time, so it could be a useful screening technique in patients with isolated thrombocytopenia to discriminating peripheral platelet destruction from other causes of thrombocytopenia.

References

- Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets* 1997;8:379–83.
- Ault KA, Knowles C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol* 1995;23:966–1001.
- Dale GL, Friese P, Hynes LA, Burstein SA. Demonstration that thiazole orange-positive platelets are less than 24 hours old. *Blood* 1995;85:1822–5.
- Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:606–10.
- Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* 1998;34:229–34.
- Jiménez MM, Guedán MJ, Martín LM, Campos JA, Martínez IR, Vilella CT. Measurement of reticulated platelets by simple flow cytometry: an indirect thrombopoietic marker. *Eur J Intern Medicine* 2006;17:541–4.
- Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorder. *Blood* 1990;75:16–121.
- Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CHP, Hillman RS. The significance of platelet with increased RNA content (reticulated platelets). *Am J Clin Pathol* 1992;98:637–46.
- Macchi I, Chamlian V, Sadoun A et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol* 2002;69:152–7.
- Saxon BR, Mody M, Blanchette VS, Freedman J. Reticulated platelet count in the assessment of thrombocytopenic disorders. *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:65–70.
- Monteagudo M, Amengual MJ, Muñoz L, Soler JA, Roig I, Tolosa C. Reticulated platelets as screening test to identify thrombocytopenia etiology. *QJM* 2008;101:549–55.
- Wang C, Smith BR, Ault KA, Rinder HM. Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy. *Transfusion* 2002;42:368–74.
- Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int Jnl Lab Hem* 2007;29:77–91.
- Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int Jnl Lab Hem* 2009;31:277–97.
- Immature platelet fraction and reticulated platelet correlation
- Ault KA, Mitchell J, Knowles C, Van Hole L. Implementation of the immunological platelet count on a haematology analyser- the Abbott CELL-DYN 4000. *Lab Haematol* 1997;3:125–8.
- Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004;126:93–9.
- Abe Y, Wada H, Tomatsu H et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 2006;118:463–9.
- George JN, Woolf SH, Raskob GE et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3–40.
- Kickler TS, Oguni S, Borowitz MJ. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2006;125:282–7.
- Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement; a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006;16:101–9.
- Saxon BR, Blanchette VS, Butchart S, Lim-Yin J, Poon AO. Reticulated platelets count in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20:44–8.
- Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T et al. Diagnostic value test for reticulated platelets, plasma glycoconicin and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2001;115:656–64.
- Kim HR, Park BR, Lee MK, Park AJ, Ahn JY. Comparison of an immature platelet fraction and reticulated platelet in liver cirrhosis. *Korean J Lab Med* 2007;27:7–12.
- Kajihara M, Okazaki Y, Kato S, Ishii H, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. Evaluation of platelet kinetics in patients with liver cirrhosis: similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:112–8.
- Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2009;101:151–6.
- Nomura T, Kubota Y, Kitanaka A, et al. Immature platelet fraction measurement in patients with chronic liver disease: a convenient marker for evaluating cirrhotic change. *Int J Lab Hematol*. 2009 Aug 19 (Epub ahead of print).
- Sugimori N, Kondo Y, Shibayama M, Omote M, Takami A, Sugimori C, Ishiyama K, Yamazaki H, Nakao S. Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome: a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis. *Eur J Haematol* 2009;82:54–60.
- Saigo K, Takenokuchi M, Imai J, et al. Usefulness of immature platelet fraction for the clinical evaluation of myelodysplastic syndromes. *Lab Hematol* 2009;15:13–6.

3.4.2 RESULTADOS 4.COMENTARIO

(Pons I , Monteagudo M, Lucchetti G, Muñoz L, Perea G, Colomina I, Guiu J, Obiols J. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. Eur J Haematol 2010 August ; 85(2):158-163)

Dado que en nuestro centro disponemos del autoanalizador Sysmex XE 2100 que permite la determinación del parámetro fracción plaquetar inmadura (IPF) que sería el equivalente automático de las PR medidas por citometría de flujo, decidimos analizar la correlación existente entre ambas técnicas. Los resultados demuestran una buena correlación global entre ambas técnicas, aunque con una tendencia a valores más altos de IPF que PR por citometría de flujo, en relación probablemente a la metodología que utiliza para identificación de plaquetas de alta fluorescencia el autoanalizador. Aunque el grupo de pacientes trombocitopénicos es heterogéneo, los valores medios observados de IPF permiten diferenciar entre trombocitopenias de origen central y trombocitopenias por destrucción periférica. Estos resultados junto con los hallazgos presentados en otras publicaciones, permiten confirmar que la determinación de IPF de forma automatizada, es una técnica reproducible, rápida y de fácil realización que podrá ser una herramienta útil como técnica de cribado inicial, junto con la valoración clínica global en los pacientes con trombocitopenias aisladas.

4- DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN

Desde aquella descripción inicial de Kienast y cols. en 1990, han sido múltiples las publicaciones en las que se hace referencia a las plaquetas reticuladas, de una u otra forma. Así, en una búsqueda en PubMed a fecha de 15 de febrero de 2010, se identificaron 169 publicaciones. Si observamos la progresión de estas publicaciones podemos advertir que mientras en los primeros 10 años se produjeron 52 publicaciones, en los últimos 10 años éstas suman 117 de las cuales 66 han aparecido en los últimos 5 años. Este hecho se relaciona, muy probablemente, con una mayor disponibilidad de la técnica necesaria para su realización, la citometría de flujo, pero seguramente también sea debido a que aún siendo una técnica no estandarizada ha aumentado la evidencia de la utilidad de la determinación de plaquetas reticuladas en diversas patologías.

Las PR son las plaquetas de mayor tamaño, contienen ARN residual y, por tanto, son más activas biológicamente. Se ha demostrado que las PR poseen una mayor expresión de receptores de adhesión en comparación con las células maduras, tanto en adultos como en recién nacidos⁸³. Este incremento en la actividad biológica de las PR ha hecho que se investigue su posible papel en diversas situaciones clínicas, como la cardiopatía isquémica, la hepatopatía crónica o la insuficiencia renal crónica. Así, ya en estudios iniciales, se había detectado una relación entre la angina inestable y la presencia de cambios en el número y tamaño de las plaquetas en comparación

con el dolor torácico no isquémico⁸⁴. Trabajos más recientes sugieren que la elevación de las PR, medidas por citometría de flujo, pueden ser un marcador de peor pronóstico en pacientes con cardiopatía isquémica^{62, 63, 85, 86} y síndrome metabólico⁸⁷, al favorecer la trombosis o una posible resistencia a la antiagregación. La facilidad de la determinación de las PR, por citometría de flujo o de forma automatizada mediante el IPF, también ha permitido las investigaciones sobre la etiopatogenia de la trombocitopenia en otras enfermedades, como la hepatopatía crónica^{82, 88-90} o las situaciones post-transplante hepático^{91, 92}. Resultados menos homogéneos se han descrito en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal. Así, algunos autores han detectado una disminución de PR^{93, 94} en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal tras las sesiones de hemodiálisis, que se atribuye a pérdidas de PR durante la hemodiálisis, hecho que puede jugar un papel significativo en la diátesis hemorrágica que pueden presentar estos pacientes. Otros autores encuentran valores disminuidos de PR debidos a fallo en la producción megacariocítica⁹⁵. En contraposición, algunos autores encuentran valores elevados de PR⁹⁶. También son interesantes algunos estudios recientes cuyos resultados muestran una correlación entre los valores de PR determinadas mediante un método automatizado (IPF) y la gravedad del episodio en pacientes con coagulación intravascular diseminada⁹⁷ u hospitalizados por sospecha de infección bacteriana y presencia de hemocultivos positivos⁹⁸. Sin embargo, existen 2 campos de investigación importantes en los que el número de publicaciones y la homogeneidad de los resultados de la determinación de las PR son, con mucho, los más amplios: la

fase de recuperación medular en pacientes transplantados y/o postquimioterapia y los pacientes diagnosticados de una trombocitopenia.

Los pacientes transplantados o con aplasia postquimioterapia son el primer gran grupo de estudio, donde las investigaciones muestran que las PR son un buen marcador de regeneración megacariocítica, dado que se observa un incremento en el porcentaje de estas células unos 3 a 5 días antes de que se detecte un aumento en el número de plaquetas circulantes en sangre periférica. Por este motivo, algunos autores sugieren que la determinación de PR por citometría de flujo^{56,57,58,99,100,101, 102,103,104,105,106,107,108,109,} o mediante la determinación automatizada de la fracción plaquetar inmadura (IPF)^{77,78,110} puede facilitar la identificación de pacientes que se beneficien realmente de una transfusión de plaquetas y, por otro lado, propiciar el ahorro en transfusiones de plaquetas en estas situaciones clínicas.

El segundo gran grupo son los pacientes con trombocitopenia, patología en la que la investigación científica ha sido más prolífica en cuanto a la utilidad de la determinación de PR. Las conclusiones de los diferentes estudios son concordantes; sin embargo, debe tenerse en cuenta que las diferencias metodológicas de la determinación de las PR son substanciales, entre ellos. Investigaciones realizadas en pacientes pediátricos muestran que la determinación de PR es útil en el diagnóstico etiopatogénico de la trombocitopenia y en su manejo, tanto en recién nacidos normales o de baja edad gestacional como en prematuros^{111,112,113,114,115,116}.

La presente tesis doctoral trata sobre el estudio de la trombocitopenia, de variada etiología, que afecta a pacientes adultos. Nuestra metodología para la determinación de PR es muy sencilla, a diferencia de otros métodos publicados, mucho más complejas y de difícil realización, como ocurre al usar plasma rico en plaquetas. Hemos determinado las PR por citometría de flujo, usando sangre total como sustrato, con un doble marcaje para la identificación de las plaquetas y sin realización de ningún tipo de manipulación de la muestra. El primer objetivo del estudio, reflejado en la publicación del año 2006, tuvo como finalidad la puesta en marcha de la técnica para la determinación de las PR por citometría de flujo usando sangre total y analizar si era una técnica reproducible, a pesar de su falta de estandarización. El estudio constaba de un número limitado de pacientes y heterogéneo en relación a la etiología de la trombocitopenia. Sin embargo, los resultados obtenidos nos permitieron concluir que, de acuerdo con la hipótesis inicial, la determinación de PR mediante la citometría de flujo es una técnica reproducible, de fácil realización y que los valores de PR que se obtienen permiten distinguir las trombocitopenias de diferentes etiopatogenias.

En el segundo estudio, publicado en 2008, nos propusimos investigar la aplicabilidad de la citometría de flujo como técnica de uso rutinario en la valoración de pacientes adultos con trombocitopenia. Realizamos un análisis prospectivo de un grupo 101 pacientes trombocitopénicos, con un diagnóstico clínico bien establecido. Los resultados demostraron, como en otras publicaciones^{52, 58, 50, 55}, que los valores de PR en sangre periférica son más

altos en las trombocitopenias por destrucción periférica, especialmente en aquellos pacientes con púrpura trombocitopénica aguda idiopática (PTAI), que en las de otro origen. Así, en nuestro grupo de pacientes trombocitopénicos con un diagnóstico clínico establecido, un valor de PR superior a un 11% poseía una alta sensibilidad y buena especificidad para discriminar las trombocitopenias con actividad trombocitopoyética aumentada. Otros estudios muestran resultados similares aunque el porcentaje de PR discriminatorio sea distinto. Por lo tanto, las PR determinadas por citometría de flujo pueden ser un buen marcador en sangre periférica de la actividad megacariocítica. Sin embargo, para que estos resultados sean aplicables a la actividad asistencial rutinaria, hay que conocer las limitaciones de la técnica. Así, además de la obligatoriedad de tener que disponer de un citómetro de flujo y la necesidad de que cada centro establezca unos valores de referencia propios -al no ser una técnica estandarizada- es imprescindible tener en consideración que esta técnica puede ofrecer resultados falsos positivos. En nuestro estudio pudimos objetivar que en algunas enfermedades hematológicas, como las leucemias agudas pero, especialmente, en los síndromes mielodisplásicos, podemos obtener cifras elevadas de PR que pueden ser debidos, bien a una tinción inespecífica del colorante naranja de tiazol (ADN mitocondrial, nucleótidos de gránulos densos o de otros compartimentos plaquetares) o bien a una actividad megacariocítica realmente elevada, aunque ineficaz. Es más, algunos estudios recientes sugieren que valores elevados de PR en pacientes con síndrome mielodisplásico se relaciona con un peor pronóstico^{80,117} de la enfermedad. Por todo ello, se puede concluir que la determinación de PR es

clínicamente útil cuando la interpretación del resultado se combina con la valoración global del paciente trombocitopénico, como una primera aproximación de cribado en el paciente que se presenta con un valor disminuido aislado de plaquetas circulantes.

En el tercer estudio, publicado en 2009, nos propusimos analizar la correlación que existe entre este marcador de actividad megacariocítica en sangre periférica y la exploración complementaria estándar en la práctica clínica, el aspirado medular. Esta investigación se realizó en un número menor de pacientes debido a que el aspirado medular es un método diagnóstico invasivo y no se realiza de forma sistemática en todos los pacientes con trombocitopenia. Sin embargo, a pesar de las limitaciones de este estudio, que se llevó a cabo en 51 pacientes, pudimos demostrar que existe una buena correlación entre las PR y el número de megacariocitos en la médula ósea, especialmente cuando se trata de pacientes con trombocitopenia aguda. Finalmente, en el último estudio que se incluye en la tesis –pendiente de aceptación- decidimos analizar la correlación existente entre los resultados de la determinación de PR por citometría de flujo, técnica que habíamos utilizado hasta este momento, y la determinación automatizada mediante la determinación del IPF por el autoanalizador Sysmex XE 2100. Pudimos identificar una buena correlación entre ambas técnicas, aunque no total. Sin embargo, la facilidad de la determinación automatizada de las PR, así como su rapidez y reproducibilidad, pueden permitir que en el futuro la determinación de IPF constituya el test de cribado en pacientes que son atendidos por una

trombocitopenia aislada, al ofrecer una aproximación inicial del grado de actividad megacariocítica medular, de forma similar a la que hoy en día brindan los reticulocitos en el estudio de pacientes con anemia, siempre teniendo en cuenta la valoración global del paciente.

5- CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES

V1. La determinación de plaquetas reticuladas a partir de sangre total utilizando un doble marcaje, mediante citometría de flujo y sin manipulación de la muestra es una técnica de fácil realización y reproducible.

V2. La determinación de plaquetas reticuladas por esta técnica permite diferenciar trombocitopenias de origen central de trombocitopenias de origen periférico.

V3. Unos valores de plaquetas reticuladas por encima del 11% mediante esta metodología, tienen una alta sensibilidad (93%) y buena especificidad (85%) para el diagnóstico de trombocitopenia periférica, con actividad megacariocítica medular elevada.

V4. Debe tenerse presente la posibilidad de que existan falsos negativos, pero especialmente falsos positivos, en algunos pacientes con síndromes mielodisplásicos y algunas leucemias agudas de estirpe linfoide o mieloide.

V5. Las plaquetas reticuladas en sangre periférica son un marcador indirecto de la actividad megacariocítica medular.

V6. La presencia de plaquetas reticuladas periféricas superiores al 11%, en trombocitopenias aisladas y agudas, tiene una buena correlación con el número de megacariocitos a nivel medular.

V7. Existe una buena correlación entre la determinación de plaquetas reticuladas realizada mediante citometría de flujo, según nuestra metodología, y los valores de plaquetas reticuladas realizadas de forma automática mediante el valor IPF del autoanalizador Sysmex-2100.

V8. Los valores de IPF obtenidos en nuestros pacientes tienden a ser globalmente superiores, a los valores de plaquetas reticuladas medidas por citometría de flujo.

V9. La sencillez de realización del IPF, su reproducibilidad y su buena correlación con la citometría de flujo pueden convertir su determinación en una técnica de cribado útil para la orientación etiológica inicial en el paciente trombocitopénico, siempre que se tenga en cuenta la valoración global del mismo.

6 - BIBLIOGRAFÍA

6.1 BIBLIOGRAFÍA

1. Addison W. On the colourless corpuscles and on the molecules and cytoblasts in the blood . London Med Gaz 1841;NS(30):144-152.
2. Bizzozero G. Ueber einer neuen formbestandtheil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und der blutgerinnung. Virchows Arch fur patholAnat und Physiol 1882;(90):261-332.
3. Osler W SEA. Uber einige im blute vorhandene bacterienbildende massen. Centralbl Med Wissensch 1873;11:577-578.
4. Hayem G. Recherches sur l'evolution des hematies dans le sang de l'homme, et des vertebres. Arch Physiol (deuxieme serie) 1878;5:692-734.
5. JA Ware BC. Platelet morphology, biochemistry and function.. In: edited by E.Beutler MLBCTK, editor. in Willians Hematology. fifth edition ed. Mcgraw-Hill, Inc.; 1995:1161-1201.
6. Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. Expert Rev Anticancer Ther 2008;8(8):1247-1255.
7. McNicol A, Israels SJ. Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 2008;8(2):99-117.
8. Witz IP. The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. Cancer Metastasis Rev 2008;27(1):19-30.
9. N.Pujol. 1. N. Pujol. Trombocitopenias. 2ª edición. Ed. Harcourt. 2002. In: Ed.Harcourt, editor. Trombocitopenias. 2ª edición ed. 2002.
10. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. Blood 2008;111(3):981-986.
11. Szalai G, LaRue AC, Watson DK. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. Cell Mol Life Sci 2006;63(21):2460-2476.
12. Bluteau D, Lordier L, Di SA et al. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. J Thromb Haemost 2009;7 Suppl 1:227-234.
13. David J Kuter. Megakaryocyte biology and the production of platelets. UptoDate on line 17 3, 2008<http://www.uptodateonline.com/online/content/>.
14. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. J Clin Invest 2005;115(12):3348-3354.

15. Kleiman NS, Freedman JE, Tracy PB et al. Platelets: developmental biology, physiology, and translatable platforms for preclinical investigation and drug development. *Platelets* 2008;19(4):239-251.
16. Italiano JE, Jr., Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 2003;1(6):1174-1182.
17. Geddis AE. The regulation of proplatelet production. *Haematologica* 2009;94(6):756-759.
18. Battinelli EM, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2007;14(5):419-426.
19. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol* 1958;20(6):350-355.
20. Bussel JB, Kuter DJ, George JN et al. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. *N Engl J Med* 2006;355(16):1672-1681.
21. Newland A. Thrombopoietin mimetic agents in the management of immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2007;44(4 Suppl 5):S35-S45.
22. Stasi R, Evangelista ML, Amadori S. Novel thrombopoietic agents: a review of their use in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Drugs* 2008;68(7):901-912.
23. Nurden AT, Viallard JF, Nurden P. New-generation drugs that stimulate platelet production in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Lancet* 2009;373(9674):1562-1569.
24. Kostyak JC, Naik UP. Megakaryopoiesis: transcriptional insights into megakaryocyte maturation. *Front Biosci* 2007;12:2050-2062.
25. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005;115(12):3339-3347.
26. Mehaffey MG, Newton AL, Gandhi MJ, Crossley M, Drachman JG. X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood* 2001;98(9):2681-2688.
27. Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost* 2005;3(8):1717-1724.
28. Goldfarb AN. Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene* 2007;26(47):6795-6802.
29. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 2003;101(11):4333-4341.
30. Dale GL. Platelet kinetics. *Curr Opin Hematol* 1997;4(5):330-334.
31. Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets* 2008;19(6):395-404.

32. Schmitz G, Rothe G, Ruf A et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998;79(5):885-896.
33. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 1999;6(5):342-348.
34. Misha Rahman PhD, Andy Lane PhDASMS ScSBBS Sc. Introduction to flow cytometry. Published by Serotec Ltd. Endeavour House, Langford Business Park, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GF, UK.; 2006.
35. Monteiro María-do-Céu, Martinez Marcial, O'connor JE. La citometria de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Rev Diagn Biol* [online]2002 51, 87-99. 17-2-2010. Ref Type: Online Source <http://scielo.isciii.es/>
36. Mandy FF, Bergeron M, Minkus T. Principles of flow cytometry. *Transfus Sci* 1995;16(4):303-314.
37. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87(12):4925-4936.
38. Harrison P. Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol* 2000;111(3):733-744.
39. Lazarus AH, Wright JF, Blanchette V, Freedman J. Analysis of platelets by flow cytometry. *Transfus Sci* 1995;16(4):353-361.
40. Ault KA. Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *Ann N Y Acad Sci* 1993;677:293-308.
41. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, III, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 2000;21(3):259-270.
42. Ault KA, Knowles C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol* 1995;23(9):996-1001.
43. Dale GL, Friese P, Hynes LA, Burstein SA. Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood* 1995;85(7):1822-1825.
44. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969;17(3):225-229.
45. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990;75(1):116-121.
46. Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol* 1992;98(6):637-646.
47. Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated

- platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* 1998;34(5):229-234.
48. Robinson MS, Mackie IJ, Khair K et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets: evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol* 1998;100(2):351-357.
 49. Bonan JL, Rinder HM, Smith BR. Determination of the percentage of thiazole orange (TO)-positive, "reticulated" platelets using autologous erythrocyte TO fluorescence as an internal standard. *Cytometry* 1993;14(6):690-694.
 50. Saxon BR, Blanchette VS, Butchart S, Lim-Yin J, Poon AO. Reticulated platelet counts in the diagnosis of acute immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20(1):44-48.
 51. Robinson MS, Mackie IJ, Machin SJ, Harrison P. Two colour analysis of reticulated platelets. *Clin Lab Haematol* 2000;22(4):211-213.
 52. Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117(6):606-610.
 53. Rajantie J, Javela K, Joutsu-Korhonen L, Kekomaki R. Chronic thrombocytopenia of childhood: use of non-invasive methods in clinical evaluation. *Eur J Haematol* 2004;72(4):268-272.
 54. Sakakura M, Wada H, Abe Y et al. Usefulness of measurement of reticulated platelets for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005;11(3):253-261.
 55. Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 2005;118(9):1026-1033.
 56. Macchi I, Chamlian V, Sadoun A et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol* 2002;69(3):152-157.
 57. Wang C, Smith BR, Ault KA, Rinder HM. Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy. *Transfusion* 2002;42(3):368-374.
 58. Saxon BR, Mody M, Blanchette VS, Freedman J. Reticulated platelet counts in the assessment of thrombocytopenic disorders. *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:65-70.
 59. Stiegler G, Stohlawetz P, Brugger S et al. Elevated numbers of reticulated platelets in hyperthyroidism: direct evidence for an increase of thrombopoiesis. *Br J Haematol* 1998;101(4):656-658.
 60. Rinder HM, Bonan JL, Anandan S, Rinder CS, Rodrigues PA, Smith BR. Noninvasive measurement of platelet kinetics in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(1 Pt 1):117-122.

61. Noronha JF, Costa FF, Saad ST, Lorand-Metze IG, Grotto HZ. Evaluation of reticulated platelets in patients with sickle cell diseases. *Thromb Res* 2007;121(2):259-267.
62. Lakkis N, Dokainish H, Abuzahra M et al. Reticulated platelets in acute coronary syndrome: a marker of platelet activity. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(10):2091-2093.
63. Cesari F, Marcucci R, Caporale R et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost* 2008;99(5):930-935.
64. Nakamura T, Uchiyama S, Yamazaki M, Okubo K, Takakuwa Y, Iwata M. Flow cytometric analysis of reticulated platelets in patients with ischemic stroke. *Thromb Res* 2002;106(4-5):171-177.
65. McCabe DJ, Harrison P, Sidhu PS, Brown MM, Machin SJ. Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. *Br J Haematol* 2004;126(6):861-869.
66. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC et al. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol* 2009;84(2):102-108.
67. Watanabe K, Takeuchi K, Kawai Y, Ikeda Y, Kubota F, Nakamoto H. Automated measurement of reticulated platelets in estimating thrombopoiesis. *Eur J Haematol* 1995;54(3):163-171.
68. Rapi S, Ermini A, Bartolini L et al. Reticulocytes and reticulated platelets: simultaneous measurement in whole blood by flow cytometry. *Clin Chem Lab Med* 1998;36(4):211-214.
69. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hematol* 2007;29(2):77-91.
70. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol* 2009;31(3):277-297.
71. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol* 2008;130(1):104-116.
72. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004;126(1):93-99.
73. Zucker ML, Murphy CA, Rachel JM et al. Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. *Lab Hematol* 2006;12(3):125-130.
74. Abe Y, Wada H, Tomatsu H et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 2006;118(4):463-469.
75. Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G et al. Immature platelet fraction as novel laboratory

- parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2009;144(4):619-621.
76. Garibaldi B, Malani R, Yeh HC et al. Estimating platelet production in patients with HIV-related thrombocytopenia using the immature platelet fraction. *Am J Hematol* 2009;84(12):852-854.
 77. Takami A, Shibayama M, Orito M et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(8):501-507.
 78. Saigo K, Sakota Y, Masuda Y et al. Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients. *Transfus Apher Sci* 2008;38(2):127-132.
 79. Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2009;101(1):151-156.
 80. Sugimori N, Kondo Y, Shibayama M et al. Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome: a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis. *Eur J Haematol* 2009;82(1):54-60.
 81. Saigo K, Takenokuchi M, Imai J et al. Usefulness of immature platelet fraction for the clinical evaluation of myelodysplastic syndromes. *Lab Hematol* 2009;15(2):13-16.
 82. Nomura T, Kubota Y, Kitanaka A et al. Immature platelet fraction measurement in patients with chronic liver disease: a convenient marker for evaluating cirrhotic change. *Int J Lab Hematol* 2009.
 83. Saving KL, Mankin PE, Gorman MJ. Differences in adhesion receptor expression between immature and older platelets and red blood cells of neonates and adults. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24(2):120-124.
 84. Pizzulli L, Yang A, Martin JF, Luderitz B. Changes in platelet size and count in unstable angina compared to stable angina or non-cardiac chest pain. *Eur Heart J* 1998;19(1):80-84.
 85. Guthikonda S, Lev EI, Patel R et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost* 2007;5(3):490-496.
 86. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M et al. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(9):743-749.
 87. Vaduganathan M, Alviar CL, Arikan ME et al. Platelet reactivity and response to aspirin in subjects with the metabolic syndrome. *Am Heart J* 2008;156(5):1002.
 88. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J, Panasiuk B. Reticulated platelets as a marker of megakaryopoiesis in liver cirrhosis; relation to thrombopoietin and hepatocyte growth factor serum concentration. *Hepatogastroenterology* 2004;51(58):1124-1128.

89. Kajihara M, Okazaki Y, Kato S et al. Evaluation of platelet kinetics in patients with liver cirrhosis: similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(1):112-118.
90. Kopke-Aguiar LA, de Leon CP, Shigueoka DC, Lourenco DM, Kouyomdjian M, Borges DR. Reticulated platelets and thrombopoietin in schistosomiasis patients. *Int J Lab Hematol* 2009;31(1):69-73.
91. Stiegler G, Stohlawetz P, Peck-Radosavljevic M et al. Direct evidence for an increase in thrombopoiesis after liver transplantation. *Eur J Clin Invest* 1998;28(9):755-759.
92. Richards EM, Alexander GJ, Calne RY, Baglin TP. Thrombocytopenia following liver transplantation is associated with platelet consumption and thrombin generation. *Br J Haematol* 1997;98(2):315-321.
93. Tassies D, Reverter JC, Cases A et al. Reticulated platelets in uremic patients: effect of hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Hematol* 1995;50(3):161-166.
94. Tassies D, Reverter JC, Cases A, Calls J, Escolar G, Ordinas A. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on circulating reticulated platelets in uremic patients: association with early improvement in platelet function. *Am J Hematol* 1998;59(2):105-109.
95. Ando M, Iwamoto Y, Suda A, Tsuchiya K, Nihei H. New insights into the thrombopoietic status of patients on dialysis through the evaluation of megakaryocytopoiesis in bone marrow and of endogenous thrombopoietin levels. *Blood* 2001;97(4):915-921.
96. Himmelfarb J, Holbrook D, McMonagle E, Ault K. Increased reticulated platelets in dialysis patients. *Kidney Int* 1997;51(3):834-839.
97. Hong KH, Kim HK, Kim JE, Jung JS, Han KS, Cho HI. Prognostic value of immature platelet fraction and plasma thrombopoietin in disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009;20(6):409-414.
98. Di MA, Garzia M, Leone F, Arcangeli A, Pagano L, Zini G. Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *J Infect* 2009;59(3):201-206.
99. Romp KG, Peters WP, Hoffman M. Reticulated platelet counts in patients undergoing autologous bone marrow transplantation: an aid in assessing marrow recovery. *Am J Hematol* 1994;46(4):319-324.
100. Richards EM, Jestice HK, Mahendra P, Scott MA, Marcus RE, Baglin TP. Measurement of reticulated platelets following peripheral blood progenitor cell and bone marrow transplantation: implications for marrow reconstitution and the use of thrombopoietin. *Bone Marrow Transplant* 1996;17(6):1029-1033.
101. Catani L, Vianelli N, Luatti S et al. Characterization of autotransplant-related thrombocytopenia by evaluation of glycojalicin and reticulated platelets. *Bone Marrow Transplant* 1999;24(11):1191-1194.

102. Stohlawetz P, Stiegler G, Knobl P, Hocker P, Panzer S. The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions. *Ann Hematol* 1999;78(6):271-273.
103. Consolini R, Calleri A, Bengala C, Legitimo A, Conte PF. Evaluation of thrombopoiesis kinetics by measurement of reticulated platelets and CD34(+) cell subsets in patients with solid tumors following high dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell support. *Haematologica* 2001;86(9):959-964.
104. Figuerres E, Olszewski M, Kletzel M. A flow cytometric technique using thiazole orange to detect platelet engraftment following pediatric stem-cell transplants. *Cytotherapy* 2001;3(4):277-283.
105. Chaoui D, Chakroun T, Robert F et al. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy. *Transfusion* 2005;45(5):766-772.
106. Rynningen A, Apelsest T, Hausken T, Bruserud O. Reticulated platelets are increased in chronic myeloproliferative disorders, pure erythrocytosis, reactive thrombocytosis and prior to hematopoietic reconstitution after intensive chemotherapy. *Platelets* 2006;17(5):296-302.
107. Thomas-Kaskel AK, Mattern D, Kohler G, Finke J, Behringer D. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(4):241-248.
108. Michur H, Maslanka K, Szczepinski A, Marianska B. Reticulated platelets as a marker of platelet recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol* 2008;30(6):519-525.
109. Martinelli G, Merlo P, Fantasia R, Gioia F, Crovetto G. Reticulated platelet monitoring after autologous peripheral haematopoietic progenitor cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2009;40(3):175-181.
110. Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006;16(2):101-109.
111. Joseph MA, Adams D, Maragos J, Saving KL. Flow cytometry of neonatal platelet RNA. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18(3):277-281.
112. Peterec SM, Brennan SA, Rinder HM, Wnek JL, Beardsley DS. Reticulated platelet values in normal and thrombocytopenic neonates. *J Pediatr* 1996;129(2):269-274.
113. Wasiluk A. Thrombocytopoiesis in healthy term newborns. *J Perinat Med* 2005;33(3):252-254.
114. Wasiluk A, Mantur M, Kemonia-Chetnik I, Szczepanski M, Warda J, Bochenko-Luczynska J. Does prematurity affect thrombocytopoiesis? *Platelets* 2007;18(6):424-427.

115. Wasiluk A, Mantur M, Kemono H, Szczepanski M, Jasinska E, Milewski R. Thrombopoiesis in small for gestational age newborns. *Platelets* 2009;1-5.
116. Brown RE, Rimsza LM, Pastos K et al. Effects of sepsis on neonatal thrombopoiesis. *Pediatr Res* 2008;64(4):399-404.
117. Saigo K, Takenokuchi M, Imai J et al. Usefulness of immature platelet fraction for the clinical evaluation of myelodysplastic syndromes. *Lab Hematol* 2009;15(2):13-16.