

2ej. 26



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Z A R A G O Z A**

LA AGREGOMETRIA PLAQUETARIA Y SU UTILIDAD CLINICA

T E S I S

Que para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

JORGE PONCE ROSAS



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E
= = = = =

	<u>PAGINA</u>
PROLOGO	1
INTRODUCCION	3
 <u>CAPITULO I</u>	
<u>GENERALIDADES. FISIOLOGIA DE LA HEMOSTASIA</u>	5
A) Hemostasia primaria	7
- Factores vasculares.	
- Factores plaquetarios.	
B) Hemostasia secundaria	24
- Factores plasmáticos.	
C) Proceso general de la coagulación	28
- 1ª Fase: Generación de protrombina.	
- 2ª Fase: Generación de trombina.	
- 3ª Fase: Generación de fibrina.	
- 4ª Fase: Generación de plasmina (mecanismo de fibrinolisis)	
D) Importancia de las prostaglandinas en el proceso hemostático . . .	32
 <u>CAPITULO II</u>	
<u>AGREGOMETRIA PLAQUETARIA, CONCEPTOS GENERALES Y METODOS DE ESTUDIO . . .</u>	36

A)	Agregación	36
B)	Mecanismo de acción	38
C)	Agentes agregantes	40
D)	Fundamento de la técnica y aparato de medición	45
E)	Interpretación de las curvas de agregación	48
F)	Condiciones que influyen en las pruebas de agregación	50

CAPITULO III

TRANSTORNOS QUE ESTAN ASOCIADOS A DEFICIENCIAS DE AGREGACION PLAQUETARIA 54

A)	Trastornos heredados	55
B)	Trastornos adquiridos	61

CAPITULO IV

UTILIDAD CLINICA DE LA AGREGACION PLAQUETARIA 64

-	Objetivos	64
-	Método	65
-	Procedimiento	66
-	Resultados	69
-	Discusión de resultados	92
-	Conclusiones	96

REFERENCIAS	98
-------------	-----------	----

"Los libros son maestros que nos instruyen sin palmetazos ni castigos, sin palabras ásperas y sin ira.

Si se acerca uno a ellos, nunca están dormidos. Si se le interroga, no ocultan nada. Si se les interpreta mal, no protestan. Si no se les entiende, no se ríen de uno ..."

RICHARD DE BURY

P R O L O G O

Paradójicamente, a causa de tanto derramamiento de sangre, el hombre ha ido interesándose más en encontrar armas de qué valerse para llegar a evitar o controlar estos patológicos involucrados al proceso de coagulación sanguínea. En los últimos 25 años han aumentado enormemente los esfuerzos encaminados a la investigación de los complejos problemas de la coagulación y de la hemostasia, lo que ha conducido a descifrar interesantes hechos sobre el mecanismo de este proceso. De esta manera ha sido posible proporcionar resultados exactos y que siendo éstos bien interpretados, permiten al médico contar con armas suficientes para disminuir con gran eficacia los riesgos de trombosis y prevenir o controlar adecuadamente las hemorragias.

El obtener información exacta y de gran utilidad, son dos cualidades de demanda primaria en el laboratorio de análisis, además de considerar las limitaciones por las que se rige cada resultado. Por ello, la fusión entre quienes han propiciado el desarrollo de una metodología lo suficientemente simplificada, ha permitido la aplicación práctica de cada nuevo conocimiento, y así disponer de facilidades apropiadas para estudiar las funciones plaquetarias básicas, incrementando al máximo la habilidad diagnóstica y terapéutica de las afecciones hemorrágicas y trombóticas.

Una de las finalidades del presente trabajo es la de facilitar la utilización de uno de los exámenes que evalúan el funcionamiento plaquetario, contemplando los resultados obtenidos mediante la técnica de la agregación plaquetaria. Dichos resultados provienen de donadores de sangre profesionales y de pacientes con distintos desórdenes hemostáticos. A partir de datos recopilados en los últimos 5 años de exámenes efectuados en el Laboratorio de Coagulación del Hospital General del Centro Médico Nacional, I.M.S.S., se esperan encontrar valores normales de agregación

plaquetaria característicos de una función normal de las plaquetas o bien un trans-
torno específico.

De ser ésto efectivo, significará la respuesta a la inquietud de encontrar valores_
que estimen la relación que exista entre los distintos desórdenes hemostáticos y la
conducta típica de su función plaquetaria que pueda entrañar tal estado de anormali
dad.

I N T R O D U C C I O N

La hemostasia es el conjunto de mecanismos y procesos que dentro de un estado de funcionalidad armonioso tiene como finalidad el mantener la sangre en circulación líquida dentro del sistema vascular, evitando extravasaciones ya sea de origen espontáneo o traumático (13). Como ley de la naturaleza, el equilibrio dentro de cada sistema es consecuencia de procesos óptimos; de esta forma, en términos de hemostasis, la salud viene a presentar un armonioso equilibrio dependiente de 2 fenómenos: hemorragias y trombosis.

La hemostasia es un proceso que posee un delicado balance en el que participan por un lado factores procoagulantes (elementos celulares del endotelio vascular, plaquetas y los factores plasmáticos), y por el otro, inhibidores naturales. Este fenómeno no mantendrá la integridad vascular, evitará las extravasaciones sanguíneas espontáneas, no permitirá la potenciación de hemorragias, mantendrá la sangre en circulación líquida y además precisará y limitará el proceso de coagulación estrictamente en el área donde se produjo la lesión del endotelio vascular (13, 16). En el estudio de la hemostasia, el interés se concentra entonces en disminuir los riesgos de trombosis (función aumentada de los factores vasculares, plasmáticos y/o de las plaquetas) y prevenir, disminuir o curar las hemorragias (funciones aumentadas de inhibidores naturales, o disminución considerable de los factores plaquetarios, vasculares o plasmáticos).

La importancia de la coagulación sanguínea ha sido reconocida desde varios siglos atrás y cada nueva contribución ha servido para aclarar cada vez mejor las leyes por las que se rige su funcionamiento. Con base a estos recursos, se ha aventajado un poco más en el aspecto fisiológico que juegan las plaquetas, gracias al descubrimiento de una importante clase de sustancias con actividad biológica: las prostaglandinas, que vinieron a trazar un puente decisivo en la investigación. Identificadas inicialmente por su acción vasopresora y su efecto sobre la musculatura lisa, han demostrado también tener participación sobre muchos procesos biológicos importantes, ya que parecen actuar como moduladores del metabolismo intracelular y muy posiblemente como reguladores sistemáticos. Su descubrimiento va desde 1933, pero solamente hasta la década de los años 70 su valor en la hemostasis ha tomado un papel y participación indiscutibles (7, 16).

La existencia de las plaquetas no se estableció definitivamente hasta fines del si-

glo XIX, cuando se encuentra que su función está asociada a la hemostasis y coagulación; pero el papel exacto que éstas juegan se logra descifrar al fin, hasta la década de los años 50 (35).

En los últimos 40 años se ha desencadenado una etapa acelerada de experiencias e investigaciones que van encaminadas a dilucidar muchas de las incógnitas por la fisiología y patología plaquetaria; de esta manera, ha sido demostrado que las plaquetas -células complejas de enorme capacidad metabólica y poseedoras de múltiples constituyentes intracelulares específicos- lejos de ser corpúsculos circulantes de funciones imprecisas, desempeñan un papel fundamental en la preservación de la hemostasia, y contribuyen notablemente al soporte nutricional del endotelio vascular (14, 15).

El interés por los trastornos de la hemostasia dependientes de las funciones cualitativas de las plaquetas ha venido en aumento gracias a las descripciones de los métodos utilizados por Born para estudiar la agregación plaquetaria en el año de 1962 (5, 8, 23). Tales acontecimientos han permitido la utilización de una técnica in vitro para estimar cuantitativamente la acción de las plaquetas en el proceso de agregación. El campo de la indicación de la agregación plaquetaria se amplía cada vez más en el área de investigación pero no ha sido abordada completamente por el laboratorio de análisis de rutina; sin embargo el significado fisiopatológico de tal determinación plaquetaria se ha podido asociar a disfunciones plaquetarias cualitativas tanto congénitas como adquiridas, mismas que están entrelazadas a fenómenos trombóticos por un lado y a algunos síndromes hemorrágicos por el otro (4, 15). Sin embargo, los trastornos heredados del funcionamiento plaquetario son relativamente raros.

La utilización y perfeccionamiento de la técnica de agregación junto con el surgimiento y desarrollo de conocimientos de las prostaglandinas dentro del proceso de coagulación, permiten investigar de una manera profunda y definitiva el carácter funcional plaquetario del paciente que se sospecha el origen de su enfermedad a una insuficiencia plaquetaria.

Como recurso para el diagnóstico fino de padecimientos hemorrágicos, la agregación plaquetaria responde a la importancia que tiene el contar y tener a disposición las armas que sugiere decisiones rápidas, que a su vez sean apoyadas por diagnósticos acertados. Por ello ha de seleccionarse para un paciente con problemas hemostáticos las pruebas de coagulación que le sean de utilidad diagnóstica y que siendo éstas de un carácter lo suficientemente reproducible y sensibles, proporcionarán las deducciones acertadas en la identificación del trastorno hemorrágico de que se trate.

CAPITULO IGENERALIDADES. FISILOGIA DE LA HEMOSTASIA

El proceso hemostático en su conjunto se encarga de establecer el mecanismo que asegura mantener la sangre en condiciones óptimas y constantes, proporcionando que su participación fisiológica no se vea interferida a lo largo de todo el árbol vascular.

En la sangre circulante parece existir un equilibrio entre las fuerzas que actúan para estimular todo el proceso de coagulación y las fuerzas que tienden a retrasar tal proceso o a inhibir su acción (13, 16, 28). Este equilibrio mantiene a la sangre en su estado fluido.

Cuando hay daño vascular o cuando se extravasa sangre del lecho vascular, se rompe este equilibrio en favor de la activación del mecanismo que conducirá a la coagulación justamente a la zona de daño, siendo responsable la interacción ordenada de tres elementos: vaso dañado, plaquetas sanguíneas y proteínas plasmáticas (1).

Al lesionarse un vaso, las plaquetas se adhieren a la pared de éste, sobre la superficie endotelial que queda expuesta; se forma un pequeño tapón que no se extiende más allá del sitio de la lesión y que, al cabo de poco tiempo, evitará que siga sangrando. Con una consiguiente activación del proceso de coagulación, este mecanismo motivará la formación de fibrina sobre el tapón formado por las plaquetas asegurando así la estabilización del coágulo.

Desde que empieza el primer estímulo del sangrado, hasta que éste se logra detener completamente, van sucediendo una serie de eventos en los cuales las plaquetas intervienen en un mecanismo que está sujeto a interacciones ordenadas y específicas. Es probable, como así lo ha demostrado la marcha de muchas investigaciones (1, 19, 22, 30), que las plaquetas intervengan en todas las fases de la coagulación. Estas no son eficientes solamente a nivel de la lesión durante la formación de un tapón plaquetario, sino que también liberan factores que favorecen la vasoconstricción para esti-

mular la coagulación de la sangre y así asegurar la solidez del coágulo neoformado. La adecuada interacción que pueda ocurrir entre los factores plaquetarios, los vasculares y los plasmáticos, será responsable de una hemostasia efectiva.

El proceso global es difícil separarlo para estudiar cada una de sus etapas, sin embargo, de una manera didáctica, se puede separar el mecanismo en dos partes:

- Hemostasia primaria, en la que hay participación del capilar lesionado y las plaquetas.
- Hemostasia secundaria, conocida también como la fase de coagulación plasmática o bioquímica, se proyecta bajo una serie de compuestos proteínicos con actividad enzimática, llamados factores plasmáticos y que logran completar el proceso coagulativo.

Los eventos que tienen lugar en la hemostasia primaria son:

- a) Contracción del vaso lesionado y exposición del subendotelio.
- b) Adhesividad plaquetaria.
- c) Etapa de agregación plaquetaria.
- d) Etapa de liberación plaquetaria.

De aquí en adelante continúa el conjunto de elementos que intervienen en la hemostasia secundaria, durante la cual la formación de fibrina reforzará y consolidará el tapón hemostático primario que se formó en la primera etapa. Entonces, dentro de la hemostasia secundaria ocurrirá:

- e) Coagulación del plasma (generación de tromboplastina, después la formación de trombina y por último la generación de fibrina).
- f) Activación del sistema fibrinolítico o mecanismo de fibrinolisis.

A) HEMOSTASIA PRIMARIA

Esta etapa introductiva representa el primer paso que se pone en juego para detener una hemorragia y en ella participan como y se ha dicho el capilar y las plaquetas. El orden dentro de un tiempo específico de cada una de las fases que intervienen, tienen una importancia determinante para que todos los demás eventos posteriores, que vienen a ser estimulados por los primeros, no retarden ni acorten el período de actividad de cada paso. Actualmente, se conocen bastante bien las funciones de los tres elementos principales de la hemostasia: factores vasculares, factores plaquetarios y factores plasmáticos (10).

1. Factores vasculares:

En condiciones normales el líquido sanguíneo y las células que lo conducen son continuos y no reaccionan ni interactúan con las células endoteliales del vaso. Cuando el vaso permanece intacto, tanto elementos celulares que son transportados en la sangre, como las paredes del endotelio vascular, poseen una carga negativa en sus membranas (potencial "Z" o zona de interfase) que impide la aglutinación espontánea entre ellos. Se ha visto que la carga negativa que poseen la membrana plaquetaria obedece a la presencia del ácido siálico, N-acetilneuramínico. (13, 33).

Por otra parte, cuando los vasos lesionados son de muy pequeño calibre, no siempre se necesita la coagulación plasmática para contener el flujo de sangre al exterior. Bajo éstas circunstancias el mecanismo de la hemostasia puede limitarse a fenómenos que caracterizan el tiempo parietal, como es corriente observar en los animales inferiores desprovistos de proteínas coagulables. En otros casos, sólo cuando coinciden los elementos favorables, el mecanismo tendrá su marcha común hasta el coágulo de fibrina en el contorno vascular.

Las arteriolas y vénulas están constituidas en el interior -en el endotelio y subendotelio- por membrana base, tejido elástico y fibras de colágeno; la parte media es

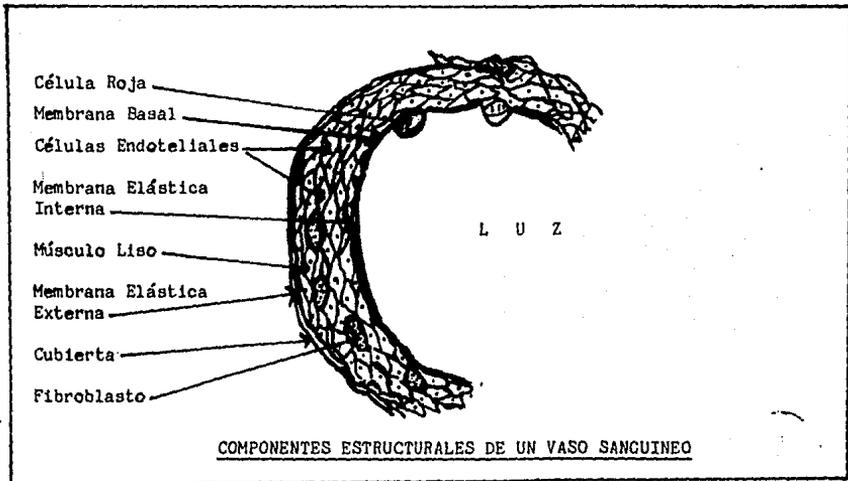


Ilustración Nº 1

tá compuesta de músculo liso, fibras de colágeno y fibroblastos; y, finalmente, la parte exterior la componen los fibroblastos y fibras de colágeno.

Como respuesta inmediata a la sección de un vaso, acontece una respuesta vasopresora local cuya proporción varía en magnitud y en tiempo. Esto ocurre para reducir el calibre de la abertura y como promedio la hace adquirir un diámetro de aproximadamente 30%. La reducción de la abertura es mucho más acentuada a nivel de las arteriolas periféricas, ya que por sí solas están capacitadas para producir una contracción completa en determinado momento y así evitar el flujo de sangre (10). Por otro lado, la sangre que escapó del vaso también contribuye a evitar más pérdida de ésta de una manera mas bien accidental: la sangre que escapa y que después se encuentra ya en el espacio intersticial, es decir, entre las células adjuntas y vasos dañados, apoyará a la estasis circulatoria, ya que facilita de esta forma, que la plaqueta (que normalmente se encuentra en circulación en este lugar) se adhiera a la superficie lesionada y continúe así su acción.

En esta fase vascular el flujo de sangre está reducido en el lugar del trauma por dos mecanismos: vasoconstricción local, que es una respuesta inmediata a la lesión,

y, una presión mecánica sobre los vasos lesionados por la extravasación de sangre a los tejidos de alrededor (21).

La vasoconstricción es producida por 2 vías diferentes. Una es refleja, primaria, que es de tipo nervioso y la otra es secundaria, hormonal, inducida por mediadores químicos vasoconstrictores, especialmente las que tienen las propias plaquetas. La intensidad y duración de la primaria varían de acuerdo a la naturaleza y calibre del vaso lesionado pero siempre es breve; en cambio la secundaria es de carácter completamente hormonal y relewa a la primera, producida por la liberación de la adrenalina, noradrenalina y serotonina, mismas que son transportadas por las plaquetas y que hacen su acción cuando se han adherido éstas últimas al endotelio vascular lesionado. No es imprescindible que ocurra la vasoconstricción en la hemostasia, pero en determinados lugares como las arterias su significado funcional es crítico.

Por cierto, cuando existe una disfunción capilar o una hiperfragilidad de los vasos sanguíneos, pueden propiciarse hemorragias espontáneas graves dando lugar a púrpuras de tipo petequiral. Esta fragilidad puede ser valorada por la prueba del lazo (Rumpel-Leede) consistente en una presión positiva conocida, aplicada a los capilares, observando clínicamente la aparición de petequias en una zona distal sobre un diámetro conocido en el antebrazo. La sensibilidad de esta prueba sólo alcanza trombocitopenias moderadas, en defectos graves de calidad plaquetaria, en problemas de fragilidad o permeabilidad capilar (10, 13, 17, 28).

2. Factores plaquetarios:

El hablar de la importante intervención que tienen las plaquetas en la detención del escape de sangre, sin tener bien entendido el papel de su origen y de su estructura, el correcto estudio del mecanismo de la hemostasia quedaría incompleto. Por ello conviene facilitar su comprensión mencionando algunos aspectos de indiscutible importancia:

Las plaquetas :

a) Descripción y aspecto:

Cuando al líquido sanguíneo se le añade un anticoagulante adecuado, puede apreciarse que las plaquetas representan solamente del 1 al 2% del volúmen total de la sangre. Las plaquetas son redondas u ovals, de 2 a 4 micras de diámetro: en realidad su morfología es variable según su estado funcional.

b) Producción :

Las plaquetas se originan a partir de la serie megacariocítica, (que son las mayores de todas las células hematopoyéticas y surgen del mismo hemocitoblasto, como los granulocitos y las células eritroides), pero también en otros tejidos incluyendo al pulmón (24, 28, 35). El tiempo de transición de megacariocito a plaquetas en el hombre, lo introdujo Aster en 1972, y éste corresponde ser de 4 a 5 días.

En estado normal su número en la sangre periférica varía según el método empleado para valorarlas, pero en términos generales se considera que va de $15 - 45 \times 10^9$. Una vez liberadas por la médula ósea envejecen lentamente en la circulación y mueren entre 8 y 11 días si éstas no han sido consumidas en acto de servicio; algunas de ellas se emplean probablemente para mantener la integridad vascular y taponear las lesiones vasculares y otras parecen eliminarse por el sistema retículo endotelial cuando envejecen. Es importante mencionar que su número en la sangre periférica se mantiene constante por un equilibrio dado por las actividades trombopoyéticas (ACTH u hormona adrenocorticotrópica, corticoides, factores viscerales, nerviosos y humorales) y la acción frenadora del bazo. Las cifras bajas -trombocitopenia- las hallamos en el curso de muchas enfermedades agudas constituyendo muchas veces un hallazgo detectado sin traducción clínica hemorrágica.

c) Constitución plaquetaria :

Las plaquetas están constituidas por la mayor parte de los componentes celulares excep

to DNA. Su población de fragmentos citoplasmáticos es bastante heterogénea. Se dice que tal heterogeneidad de volumen y composición es probablemente un reflejo de la edad de la plaqueta. El tamaño de las plaquetas va en relación inversa a su edad, re presentando a los elementos más jóvenes los madrotrombocitos; su vida media (de 8 a 11 días) fué un importante dato que se encontró al marcarlas con crómo-51 (32, 35). Las Plaquetas más chicas son más ligeras y seguramente las más viejas.

La composición química de las plaquetas es especialmente de proteínas, lípidos y carbohidratos: Los carbohidratos presentes basicamente son integrados por polisacáridos y heterosacáridos. Las proteínas son el constituyente más importante; el 13.5% lo forma el fibrinógeno, el 25% del cual se encuentra en las fracciones granulares, mien tras que el resto es extracelular. Se encuentran también proteínas plasmáticas que permaneciendo en la membrana plaquetaria no son intracelulares, y que además es diffi cil separarlas o desprenderlas mediante lavado, éstas son: Inmunoglobulinas IgG e IgM, plasminógeno y factores V, VIII y XI; el factor plaquetario 2, conocido también como factor activador del fibrinógeno, y el factor plaquetario 4 (o antiheparínico) son verdaderas proteínas plaquetarias y no substancias adsorbidas del plasma. Por otra parte, a los lípidos se les encuentra de tres formas en general: los fosfolípi dos forman el 76% de los lípidos totales, las grasas neutras el 20% y las lipoprotef nas el 4%; el factor plaquetario 3 es probablemente una lipoproteína que forma parte de la membrana plaquetaria y que se hace disponible para las enzimas de la coagula -- ción y cofactores del plasma como consecuencia de la agregación plaquetaria de un trauma de las mismas. El componente activo es el fosfolípido, que acelera la coagula ción del plasma actuando tal vez como una superficie de catálisis.

Las plaquetas contienen además nucleótidos de las bases púricas y pirimídicas, y son capaces de mantener un gradiente catiónico entre ellas para mantener su punto isoeléct rico normal. El poderoso constrictor de la musculatura lisa, la serotonina (5-hidro xitriptamina) se halla presente en las plaquetas y no en el plasma. Después de la -- coagulación o de la agregación plaquetaria, del 20 al 25% de la serotonina total de -

la plaqueta es liberada hacia el plasma. Las plaquetas adquieren la serotonina gracias a un proceso de transporte activo que requiere energía (32).

Vistas al microscópio se les pueden identificar tres zonas:

- Membrana. Doble, permeable a las concentraciones del citoplasma.
- Hialómero. Ópticamente vacío en apariencia, contiene vacuolas y proteínas con actividad específica.
- Granulómero. Situado en la parte central, constituido por microestructuras comunes con otros citoplasmas, cuenta con dos tipos de elementos redondeados: Los gránulos alfa y los gránulos beta. Los primeros son densos y representan el sustrato de la actividad tromboplástica (factor 3 fosfolipídico), los segundos son claros. El contenido de los gránulos se secreta cuando las plaquetas han sido estimuladas. A estas tres zonas visibles se les ha añadido otra zona de "actividades fisiológicas", ubicada en la periferia y que corresponde al sitio donde se encuentran los factores plasmáticos de la coagulación y otras sustancias adsorbidas en la cara externa de la membrana, lo que constituye lo que Roskam llamó "atmósfera periplaquetaria".

Por otro lado, también se intentó dividir las zonas estructurales estableciendo en cada una de ellas algún aspecto específico de la función plaquetaria:

- La zona periférica, que está implicada sobre todo en la adhesión.
- La zona de sol-gel, a la que se asocia principalmente la contracción plaquetaria.
- La zona de organelos, involucrada a funciones de secreción.

A continuación se presenta cuadro explicativo:

COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LA PLAQUETA

ZONA PLAQUETARIA	COMPONENTES DE CADA ZONA
PERIFERICA	Revestimiento externo (RE) Membrana trilaminar (MT) Area submembranosa (ASH) Sistema canicular abierto (SCA)
DE SOL - GEL	Microtúbulos (MI) Microfilamentos
DE ORGANELOS	Sistema tabular denso (STD) Gránulos de glucógeno (GLU) Mitochondrias (M) Gránulos alfa (G α) Cuerpos densos (CD)

Ilustración Nº 2

Analizando a la plaqueta de afuera hacia adentro vamos encontrando: un pequeño halo birrefringente que la rodea, conocido como atmósfera periplaquetaria, destacando la presencia de los factores de la coagulación. Le sigue una membrana lipoprotéica formada en el interior por un sistema de poros y microtúbulos. Mas internamente se encuentran acúmulos de proteínas entre las cuales está la trombostenina. Posteriormente se identifica el hialómero por una zona clara, el cual posee adrenalina, depósitos de glucógeno y factores plasmáticos procoagulantes. Finalmente, en la parte central se encuentra el granulómero conteniendo a los dos tipos de gránulos, los electrodenso_s llamados beta y los no electrodenso_s llamados alfa; es precisamente en estos gránulos en donde se encuentran los fosfolípidos plaquetarios, de los cuales los mas importantes son el 3 y el 4, que participan en el mecanismo plasmático de la coagulación.

Los gránulos densos contienen una mezcla concentrada de seretonina, calcio y los nucleótidos de ADP y ATP. Los gránulos alfa, más ligeros y más numerosos que los densos, contienen distintas proteínas probablemente sintetizadas en los megacariocitos; así mismo, las plaquetas carecen de ribosomas (13, 24, 35).

Cuando las plaquetas pierden su propiedad circulante y se transforman en organismos activos teniendo a la metamorfosis viscosa, sufren una serie de cambios. La plaqueta pierde su regularidad, emiten pseudópodos de su citoplasma y sus gránulos tienden a agruparse en el centro del hialoplasma; el haz de túbulos sufre un proceso de distorsión o desaparece (35).

Las plaquetas poseen una serie de componentes que pueden ser propios o adquiridos: Los factores propios son exclusivamente de origen plaquetario y se liberan a su medio ambiente durante la metamorfosis viscosa o artificialmente tras la lisis de las células durante la congelación. Los más importantes son: los factores trombocíticos 2, 3 y 4 y la trombostenina. El factor 4 plaquetario contrarresta la acción de la heparina, mientras que la trombostenina efectúa la contracción inducida por la ATP-asa para la metamorfosis viscosa y la retracción del coágulo, a partir del estímulo prove-

niente de indicios de trombina. Los factores adquiridos, por su parte, representan a las proteínas biológicamente activas o sustancias químicas no elaboradas por las propias plaquetas, pero que presentes en el plasma, se adhieren mas o menos fuerte a su superficie (factores adsorbidos); o incluso pueden penetrar algo más adentro del citoplasma (factores absorbidos). Entre los factores absorbidos se encuentra con la serotonina, adrenalina, noradrenalina, una proteína semejante al fibrinógeno y el factor XIII; mientras que en los factores adquiridos se encuentran: los factores II, V, VIII, IX y X y las antiplasminas (1, 12, 35).

d) Metabolismo y obtención de energía :

Por carecer de núcleo, las plaquetas no contienen ADN y muestran una escasa propiedad de síntesis de proteínas; no son capaces de reproducirse pero poseen una importante actividad metabólica (1); por ello no son partículas inertes.

Para su metabolismo poseen enzimas de glucólisis aerobia, anaerobia y del ciclo de Krebs en su tarea de almacenar energía, ya que ésta se requiere para su actividad de iones, procesos endergónicos, y además para cumplir necesidades de almacenamiento de cantidades suficientes de ATP plaquetario utilizable en las reacciones de liberación y fagocitosis de la plaqueta, así como en la agregación plaquetaria (25, 33). La producción de ATP por un mecanismo oxidativo depende de la existencia de mitocondrias normales. Su ciclo de ácidos tricarboxílicos también contribuye a la formación de ATP conjugando la oxidación de la glucosa en la fosforilación del ADP.

Las plaquetas son capaces de convertir el 55% de la glucosa y el glucógeno en lactato a través de la vía de Embden-Meyerhof. Son así mismo capaces de transportar y oxidar manosa, fructosa, galactosa, piruvato, xilosa, ribosa y sacarosa. El ritmo de las plaquetas en el proceso de la glucólisis con glucosa añadida es aproximadamente 13 veces superior a la que corresponde a los eritrocitos, y 4.7 veces superior al músculo estriado de los primates. La glucogenólisis es otra potente vía que representa aproximadamente el 56% del flujo glucolítico tanto en presencia como en ausencia de glucosa. Las plaquetas grandes y pesadas (jóvenes) liberan menos ADP que las pequeñas y

ligeras (viejas) después del choque osmótico; mientras que las jóvenes liberan más ADP después de la exposición a algunos agregantes tales como trombina, adrenalina o ADP (32).

Se ha sugerido que la importante cantidad de AMP-cíclico plaquetario controla el estado de agregación de las plaquetas (16, 32). Por otra parte, los inhibidores de la fosforilación oxidativa, tales como la oligomicina, antimicina, 2,4- dinitrofenol y malonato, han inhibido parcial o completamente la función metabólica de las plaquetas. En general, las investigaciones han sugerido la necesidad de las plaquetas de producir ATP para las siguientes funciones: retracción del coágulo, agregación plaquetaria inducida por ADP y otros agentes agregantes, transporte activo de potasio, captación activa de serotonina y adrenalina, transporte activo de glicina, ácido glutámico y ácido alfa-aminoisobutírico, además las de mantener y proteger la fisonomía plaquetaria característica.

e) Funciones de las plaquetas :

Las plaquetas cumplen con tres funciones principales para detener el escape de sangre de los mismos lugares que la contienen : la agregación y la formación de un tapón hemostático, la actividad tromboplastínica y la retracción del coágulo (28). Estas funciones se desglosan en un marco de varias etapas en las que predominan:

- Aposición y adhesividad de las plaquetas respecto a las paredes capilares agrietadas.
- Conglutinación entre ellas para formar un trombo oclusivo (agregación).
- Liberación de sustancias vasoactivas.
- Inicio de una pequeña coagulación hasta formar algunas moléculas de fibrina.
- Liberación de fermentos coagulantes y la retracción de éste.

El papel de las plaquetas como defensor primario e inmediato de la integridad vascular se manifiesta en tres acciones principales: adhesión, liberación y agregación.

- ADHESIVIDAD

Al lesionarse el capilar, éste se contrae inmediatamente (factor tisular). Esta reducción de calibre frena inicialmente la rápida salida de sangre y lentifica la circulación en esa zona favoreciendo que los elementos formes de ella, principalmente las plaquetas, puedan ponerse en contacto con el subendotelio dañado. La adhesividad plaquetaria se define como la capacidad que tienen las plaquetas de adherirse a superficies extrañas, en este caso a la propia colágena. In vitro las plaquetas tienen la propiedad de adherirse a las paredes, independientemente que sean hidrófobas, y de desplegarse, aumentando así su superficie inicial. In vivo, inmediatamente de la lesión del vaso, en pocos segundos las plaquetas se adhieren a las fibras subendoteliales del tejido conjuntivo expuesto por el daño de su estructura, es decir, la colágena y la elastina del subendotelio vascular entran en contacto con los elementos que en un principio se repelían entre sí y que circulaban gracias a ello en el torrente sanguíneo, y se produce entonces una interacción que es producto de una diferencia electrostática: En la molécula del colágeno existe un radical amino con carga francamente positiva en la posición épsilon de la molécula; ésto pondrá una diferencia de cargas entre las plaquetas (que poseen una carga negativa habitualmente) y el borde del capilar lesionado, ocasionando una unión eléctrica entre el borde roto del capilar y la membrana plaquetaria (9, 13, 35).

Este fenómeno de adhesión no es exclusivo de las plaquetas, ya que ha podido observarse también en partículas inertes (tinta china, gránulos de sulfato de bario); por ello se ha postulado que se trata de un proceso primeramente físico relacionado con la diferencia de carga electrostática.

En este momento, se pone en marcha además un segundo proceso: la pared del vaso lesionado contiene un factor tisular (tromboplastina tisular), que liberado por ocurrirse la lesión del propio vaso, inicia la coagulación sanguínea por la vía extrínseca.

- AGREGACION

Las plaquetas reaccionan con las paredes del vaso en el sitio que queda expuesta la colágena y las microfibrillas. Sólo transcurren unos dos o tres segundos desde que se secciona el vaso hasta que se inicia la adhesión.

Sólo las primeras plaquetas presumiblemente se adhieren al colágeno puesto al descubierto (32), es decir, sólo las plaquetas de la primera sangre derramada hacen con - tacto con los labios del corte; las siguientes contactan unicamente con esa primera capa que quedó adherida antes. Así, la unión de las plaquetas en distintas capas su cesivas es lo que se conoce como "agregación plaquetaria", que se define como capaci dad que tienen las plaquetas para unirse entre sí.

En las plaquetas estimuladas, ya sea por la liberación de trombina a partir de la la sión o por la adhesión al colágeno, ocurre una transformación morfológica en su ana tomía, que termina por darle a la plaqueta una forma redondeada con emisión de pseu dópodos, lo que determinará su adherencia entre sí. Durante este proceso la sínte sis de prostaglandinas originadas por un componente de la membrana plaquetaria (el ácido araquidónico), hará posible que se libere el ADP intraplaquetario. Tal aconte cimiento induce a pensar que es precisamente la propiedad que tienen las plaquetas para que el mecanismo sea lo suficientemente efectivo para que logre detenerse el es cape de sangre.

Se propuso estandarizar la interpretación de los parámetros de agregabilidad plaque taria; con esta base, se estableció una teoría que enuncia la secuencia evolutiva de este proceso que consta de dos fases distintas tanto en magnitud como en la manera de desencadenarse por diferentes estímulos: En un primer estadio, una gran variedad de estímulos agregantes tanto in vivo como in vitro son todos capaces de condicionar bajo mecanismos múltiples una unión reversible de las plaquetas; como consecuencia de esta reacción inicial que afecta a la membrana, se producen estímulos capaces de

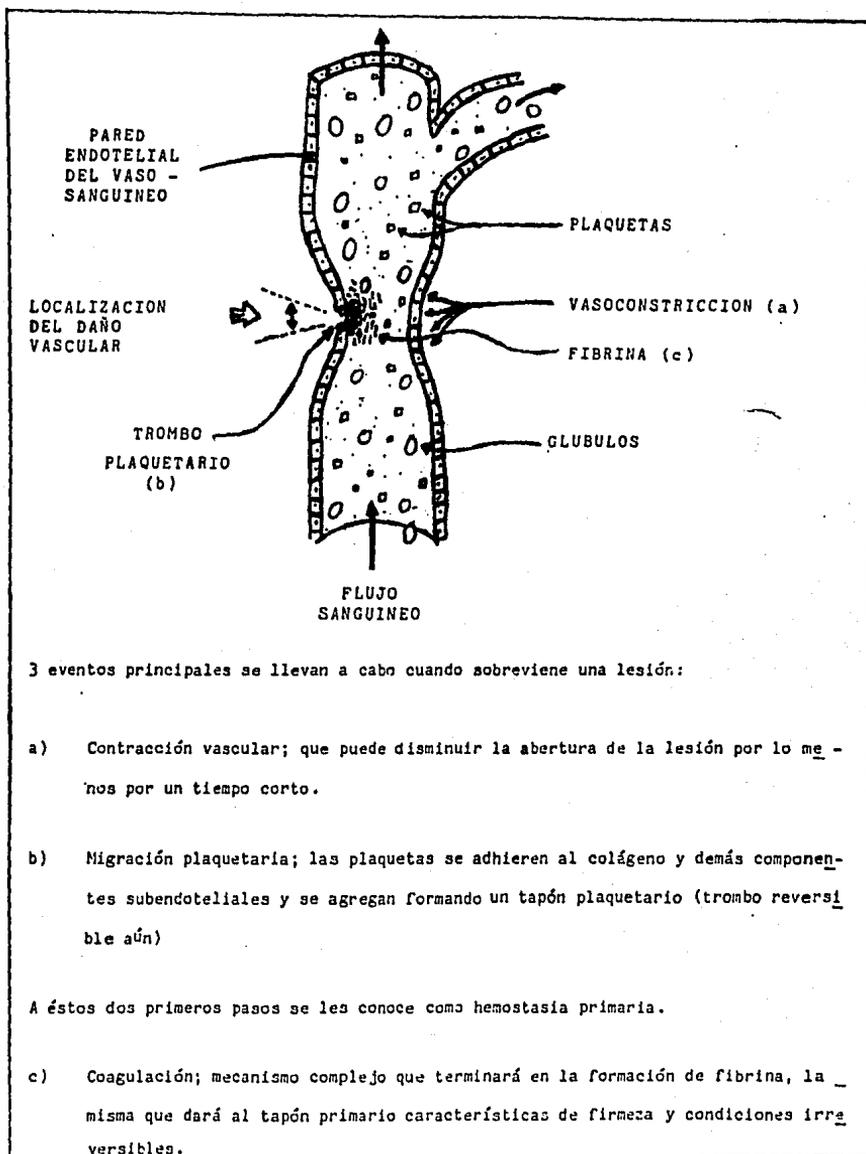


Ilustración Nº 3

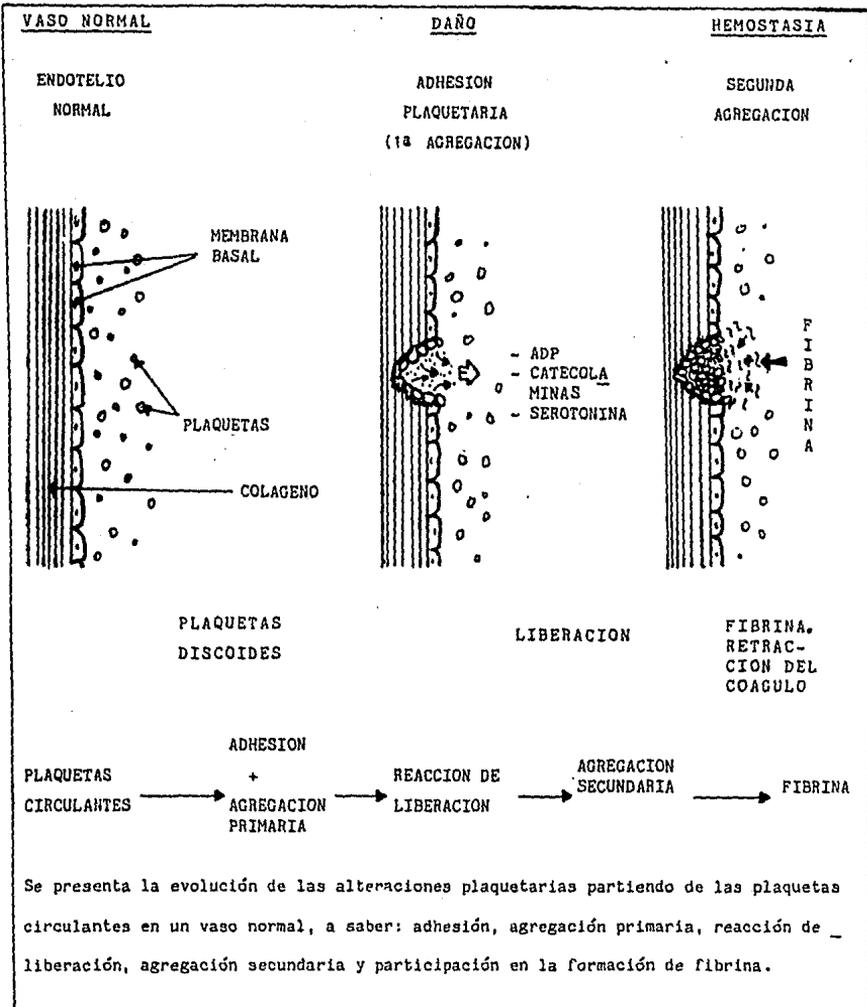


Ilustración Nº 4

de propiciar la liberación plaquetaria de ADP, el cual, mediante su efecto característico, es el responsable de la correspondiente segunda onda de agregación, esta vez de características irreversibles y de magnitud siempre más alta. Los trazos de la primera y la segunda onda obtenidas son relativamente fáciles de distinguir.

Queda claro que una vez que el ADP intraplaquetario es liberado desde las plaquetas a consecuencia de la degradación del ATP, acompañado de la expulsión de catecolaminas vasoactivas y los fosfolípidos plaquetarios, será posible entonces una aglutinación de elementos plaquetarios vecinos. Así, por un mecanismo de reacción autolimitado y automantenido que ocurre entre la periferia de la membrana plaquetaria y el subendotelio vascular lesionado, se formarán pequeños conglomerados, cuya función constituirá lo que Hallem llamó clavo hemostático (24). Existen teorías que han surgido a causa de encontrar un mecanismo acertado de este proceso. Una de ellas propone la existencia de receptores específicos para la mayoría de los agentes agregantes en las membranas plaquetarias, con los cuales interactúan, poniendo de manifiesto, por un lado, la liberación del ácido araquidónico que conduce a la síntesis de compuestos prostaglandínicos cuya participación incrementa la agregación plaquetaria y, por el otro lado, la teoría de que por efecto de la bomba de calcio se provoca un flujo de los iones de calcio hacia el interior de la plaqueta; así, los dos hechos conducen a que tenga lugar la activación de la enzima ATP-asa (presente también en la membrana plaquetaria) que teniendo como substrato el ATP, lo degradará, obteniendo así la energía necesaria para que la proteína contráctil (trombostenina) se contraiga y logre así expulsar su contenido granular.

Como productos de tal expulsión nos interesan: a)- La liberación del ADP intrínseco que producirá la segunda onda de agregación; b)- la liberación de aminas vasoactivas, que aumentarán y relevarán la contracción vascular iniciada anteriormente; y c)- la liberación de los factores 3 y 4 plaquetarios para su participación en la hemostasia plasmática.

- LIBERACION DE SUSTANCIAS VASOCONSTRICORAS

La expulsión de constituyentes plaquetarios ha sido llamada "reacción de liberación", proceso que requiere energía y que es similar a los procesos secretores de otras células. Conservando no obstante su individualidad, las plaquetas son presas de profundas transformaciones sucedidas cuando el trombo, solidamente fijado a los labios de la herida vascular, continúa asegurando un relleno de gran eficacia aún provisional y dependiente de la acción mecánica. Los cambios físicos y anatómicos plaquetarios que se dan lugar en la hemostasia han sido designados como "metamorfosis viscosa", que básicamente es un fenómeno activo que pondrá en juego las potentes reservas energéticas que poseen las plaquetas en forma ATP. La metamorfosis viscosa queda definida entonces como los cambios morfológicos bioquímicos y funcionales que sufren las plaquetas durante la formación del trombo hemostático (24, 32). Las modificaciones morfológicas que ocurren son:

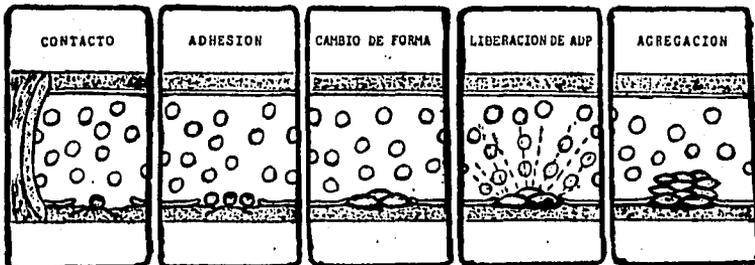
- Cambio de forma, de discoidea a esférica.
- Degranulación, agregación y emisión de pseudópodos.
- Liberación de serotonina, histamina, adrenalina, noradrenalina, factores 3 y 4 plaquetarios, ADP y proactivador del plasminógeno.

Por otra parte, los fenómenos bioquímicos más sobresalientes son:

- Estimulación del mecanismo glucolítico.
- Degradación y síntesis de ATP (24, 25, 32).
- Formación de AMP-cíclico (lo que conduciría al ajuste o modulación del proceso global, (16, 24), o de activación automática.
- Activación de la trombostenina para la vasoconstricción.

La secreción de sustancias químicas como ciertos factores que fueron adsorbidos (sustancias químicas biológicamente activas que no son elaboradas por las plaquetas) se liberan en el medio ambiente durante la metamorfosis viscosa.

SUSTANCIAS VASOACTIVAS LIBERADAS POR LAS PLAQUETAS		
UBICACION	SUSTANCIA	FUNCION
Gránulo óseo	Serotonina	Vasoconstricción, aumento de la agregación.
	ADP	Aumento de la agregación - causa cambios de forma.
	Celulo	Aumenta la reactividad
Gránulo alfa	Factor plaquetario 4	Antiheparina
	Tromboglobulina	Inhibe la actividad de la prostaciclina vascular.
	Fibrinógeno	Aumenta la agregación y la coagulación.
	Factor de crecimiento	Causa proliferación de las células de músculos lisos.
Gránulos lisosólmicos	Factor Von Willebrand	Aumenta la adhesión de las plaquetas.
	Colágeno	Lesión a la pared vascular
	Elastasa	Activa el complemento.
Membranas	Proteasa	
	Tromboxano A_2	Vasoconstricción
	Hidroxiácidos	Aumenta la agregación y liberación. Promueven la quimiotaxis



MECANICA DE LA INTERACCION PLAQUETARIA EN UN VASO DAÑADO:

CONTACTO: Con la pared del vaso dañado; **ADHESION:** Al tejido conectivo subendotelial; **CAMBIO DE FORMA:** Para cubrir la superficie del vaso dañado; **LIBERACION:** de múltiples componentes plaquetarios; **AGREGACION:** de muchas plaquetas para formar un tapón efectivo. Impidiendo mayor pérdida de sangre.

B) HEMOSTASIA SECUNDARIA

3. Factores plasmáticos :

El proceso de la coagulación resulta ser un mecanismo de activación enzimática en cadena, que de superar los mecanismos de contrabalance o inhibidores naturales, llegará a la formación de un coágulo de fibrina. Tal activación no se produce como un fenómeno aislado e independiente, sino que se relaciona a influencias que se dan por diversos cambios entre plaquetas, vasos sanguíneos y hemodinamia misma, constituyendo en su conjunto el mecanismo hemostático. En el plasma humano, otros sistemas enzimáticos tienen un parecido mecanismo de secuencia de activación de sus componentes, como son el sistema de complemento, el sistema de quininas, el sistema fibrinolítico, etc. (16, 26).

La nomenclatura utilizada para los factores plasmáticos se ha simplificado gracias a un acuerdo general para la utilización del sistema, empleando numerales romanos junto con el sinónimo de los factores. Los números están puestos en orden de descubrimiento y no indican la secuencia de las reacciones. Las formas activas se denotan generalmente por una "a" minúscula después del número romano (32). En base al acuerdo dado por el Comité Internacional de la Hemostasis y Trombosis, los factores de la coagulación plasmática son trece (16). A continuación se enumeran con su nombre genérico acompañados de sus características principales.

I. (Fibrinógeno). Proteína plasmática sintetizada principalmente en el hígado y en todo el sistema retículo endotelial; de todos los factores plasmáticos es el más abundante, por lo que se cuantifica en el laboratorio en mg/dl., mientras que el resto de los factores, debido a su existencia muy baja en la sangre, sólo se cuantifican en % de actividad. El fibrinógeno es esencial para la formación del coágulo, puesto que es la sustancia a partir de la cual se forma el coágulo mismo.

II. (Protrombina). Resulta ser una glucoproteína que se sintetiza en el hígado, y junto con los factores VII, IX y X, requieren de la vitamina K para su correcta síntesis (la presencia de la vitamina K actúa como coenzima a favor de la carboxilación de los residuos de los ácidos glutámicos presentes en los factores). Está presente en el plasma pero no en el suero; se forma en las mitocondrias de las células hepáticas y su función es la de reaccionar con la tromboplastina activada (o protrombinasa) en presencia de iones calcio para dar lugar a la trombina; este proceso es acelerado por la intervención de los factores V y VII.

III. (Tromboplastina tisular). De todos los factores éste es el único que en condiciones normales no se encuentra en la circulación, y como su nombre lo indica, se encuentra universalmente distribuido en los tejidos en forma inactiva, liberándose cuando éstos son lesionados. El calcio y la tromboplastina tisular son necesarios para la conversión de la protrombina a trombina. También las plaquetas son fuente de tromboplastina durante la coagulación de la sangre total.

IV. (Calcio). Es el único mineral y actúa catalizando el 90% de las reacciones que se llevan a cabo entre el resto de los demás factores. Normalmente en la sangre son conducidos como iones divalentes de calcio (Ca^{++}). La hipocalcemia no es causa de hemorragia porque el nivel que se requeriría para que se alterara su función sería incompatible con la vida.

V. (Proacelerina o factor lábil). Su deficiencia hereditaria es bastante rara y se conoce con el nombre de parahemofilia. El factor lábil es necesario para la conversión de la protrombina en trombina acelerando la función del factor X sobre la molécula de la protrombina. Se sintetiza principalmente en el hígado.

VI. (-----). No se le considera como otro factor, ya que sólo representa una forma modificada de la molécula del factor lábil (V).

VII. (Estable). Es una molécula producida en el hígado; su deficiencia hereditaria es muy rara, mientras que su deficiencia adquirida es encontrada a partir de enfermedades hepáticas. La coagulación de la sangre a partir de extractos de tejidos (vía extrínseca) la cual se inicia con la liberación del factor III, necesita de este factor, así como del factor X y del V.

VIII. (Globulina antihemofílica). A la deficiencia de este factor se le conoce como hemofilia "A" o clásica. Aproximadamente el índice de personas afectadas es de dos por cada 10 000 habitantes (2). Este factor es requerido para la activación de la protrombina por la vía intrínseca. Es consumido totalmente en la coagulación y por lo tanto no está en suero. La macromolécula del factor VIII se compone de tres fracciones: la antigénica, la procoagulante y la fracción tiempo de sangrado (13). Cuando la deficiencia heredada corresponde a la fracción procoagulante la anomalía se conoce como hemofilia clásica. Cuando la deficiencia es a nivel de la fracción antigénica la enfermedad se le conoce como Von Willebrand.

IX. (Christmas). Su carencia produce otro tipo de hemofilia, aún menos frecuente que la clásica. Al igual que los factores II, VII y X, requiere de la vitamina K para ser funcionante. La enfermedad de Christmas o hemofilia tipo "B" es consecuencia de su deficiencia heredada.

X. (Stuart-Prower). La deficiencia de este factor es rara y pocos casos han sido descritos. Se ha informado de cerca de 50 familias en el mundo y en México pocos casos (1 en 500 000 habitantes) (6). Su modo de herencia es recesiva cuando se transmite como única anomalía heredada. Como este factor es bastante estable, los pacientes afectados son fácilmente tratados con plasma, ya que sólo es utilizado en mínimas cantidades durante la coagulación y por consiguiente se le encuentra también en el suero, al igual que los factores IV, VII, IX, y XII. La deficiencia puede ser

también adquirida junto con otros factores.

XI. (Antecedente tromboplastínico del plasma). Su deficiencia da lugar a la hemofilia tipo "C" escasamente frecuente. Se sintetiza en el hígado y participa en la primera fase de la vía intrínseca.

XII. (Factor de contacto). Factor que fácilmente se activa al contacto de superficies extrañas (vidrio, similares o cualquier otra diferente del subendotelio vascular). Su participación es por la vía intrínseca y es precisamente el factor que la inicia. Su deficiencia es asintomática desde el punto de vista hemorrágico pero clínicamente se expresa en más tendencias de trombosis y tromboembolismo, ya que uno de los fragmentos que se produce en la activación del factor XII funciona como proactivador de la fibrinolisis. Se encuentra presente tanto en el plasma como en el suero.

XIII. (Factor estabilizante de la fibrina). Proteína plasmática originadas posiblemente en el hígado y cuya participación es la de formar enlaces covalentes entre los monómeros de fibrina, transformando a ésta en su forma insoluble y estable.

La mayoría de los factores tienen su participación precisamente en la hemostasia secundaria, pero el calcio, el factor Hageman (o de contacto) y el fibrinógeno participan además dentro de la función plaquetaria.

El presente trabajo engloba principalmente la hemostasia primaria, y sólo se hablará brevemente de la hemostasia secundaria con el fin de completar el proceso completo de coagulación.

La finalidad de esta fase es la de generar y depositar fibrina a nivel de tapón plaquetario primario formado por las plaquetas en el hemostasia primaria, en donde la "cascada" plasmática de factores procoagulantes dará fin a esta tarea indispensable.

El proceso se manifiesta ocurriendo bajo 2 vías que no avanzan independientemente, - sino que se interrelacionan de varias maneras. Una de estas vías es llamada la ex - trínseca, que requiere la presencia de un fosfolípido tisular (tromboplastina tisular) que activa al sistema de coagulación de una manera casi instantánea. La otra vía conocida como intrínseca, no requiere ninguna sustancia exógena para activar el factor XII, el cual es activado simplemente al ser expuesto a la superficie externa no endotelializada del vaso (13, 16, 28, 32). Este sistema intrínseco se activará como resultado de la interacción de las sustancias presentes en la sangre con la pared interna del vaso dañado.

C) PROCESO GENERAL DE LA COAGULACION

El proceso de la coagulación plasmática se ha dividido en 4 etapas obedeciendo a motivos de comprensión didácticos:

- 1ª fase o generación de protrombinasa
- 2ª fase o generación de trombina
- 3ª fase o generación de fibrina
- 4ª fase o generación de plasmina (fibrinolisis).

A la primera fase la pueden activar, como se había dicho, 2 diferentes vías:

Dentro del mecanismo intrínseco intervienen solamente factores plasmáticos y el factor plaquetario 3. Al contacto con el cristal (in vitro) o con una superficie lesionada (in vivo), sobreviene la activación del factor del contacto, el factor XII, convirtiéndose en una estearasa que constituye con el factor XI un complejo que actúa como soporte de la activación del factor IX en presencia de calcio. La activación del factor IX por este "producto contacto" es de naturaleza proteolítica. La asociación del factor IX activado con los fosfolípidos plaquetarios, calcio y el factor

VIII (el factor VIII sólo modifica su estructura molecular sin tener actividad enzimática), formarán así un complejo tal que activará al factor X. Después, un segundo cido como protrombinasa o tromboplastina plasmática, será capaz de transformar a la protrombina en trombina, dando fin a la primera fase por esa vía de activación.

Por su parte, el sistema extrínseco puede convertir también a la protrombina en trombina de una manera más simple y rápida: La acción conjunta de la tromboplastina liberada por la lesión de un vaso roto (de ahí que se le llame extracto tisular), el factor VII y el calcio, podrá activar al factor X también. Finalmente, el factor X y el V, fosfolípidos plaquetarios y el calcio, formando nuevamente el complejo (ahora llamado tromboplastina tisular), podrá activar la transformación de protrombina en trombina.

La activación del factor X representa la articulación entre las 2 vías. La activación directa del factor X por el veneno de la víbora de Russel, constituye una tercera vía de activación plasmática.

En la segunda fase ocurre la transformación de la protrombina en una enzima altamente específica para el fibrinógeno: La trombina. Esta resulta de la acción enzimática de la protrombinasa obtenida en la primera fase en presencia del calcio.

En la tercera fase o generación de fibrina, la acción de la trombina sobre el fibrinógeno lo transforma en su producto final: La fibrina. Esta reacción no requiere la participación de calcio y se efectúa en tres tiempos: 1º) La trombina actúa proteolítica y específicamente sobre los enlaces arginil-lisina del fibrinógeno, produciendo 2 pequeños fragmentos: los fibrinopéptidos A y B, que una vez liberados la molécula deja de llamarse fibrinógeno, y los productos que han surgido se les conoce como monómeros de fibrina. 2º) Los monómeros se polimerizan, formándose fibrina to

avía soluble en urea. 3º) El factor estabilizante de la fibrina, el factor XIII, convertirá los enlaces iónicos en covalentes, transformando al polímero soluble en unas finas redes ahora insolubles para la urea. Estas redes de fibrina que precipitan y se depositan sobre el tapón hemostático de las plaquetas sellará el coágulo de finitivamente.

Cuarta fase. La fibrinolisis o conjunto de procesos que originan la disolución o la lisis del coágulo de fibrina, es debida a la aparición de una enzima con propiedades proteolíticas: La plasmina: la misma que se forma a partir de un precursor inactivo (el plasminógeno). Tal activación es resultado de diferentes agentes activadores que pueden ser de origen bacteriano, tisular, químico y además otros como la uroquinasa y el factor XII. La plasmina digiere a las moléculas de fibrina depositada, produciendo fragmentos que pueden ser fagocitados por el sistema retículo endotelial (SRE). Como resultado de tal degradación se producen los llamados productos de degradación de fibrinógeno: "X", "Y", "D" y "E". Los primeros dos bloquean a la trombina y los segundos impiden la polimeración de la fibrina y bloquean a la agregación plaquetaria. Estos productos de degradación resultan ser verdaderos anticoagulantes y además disminuyen los niveles de fibrinógeno, el factor V y el VIII localmente (13). El mecanismo de la cuarta fase, por consiguiente, al igual que las prostaciclínas en la agregación plaquetaria, participan en la limitación del proceso de depósito de fibrina sólo donde es requerida (7; 16; 35).

La fluidez de la sangre será simplemente reflejo del equilibrio entre factores acelerantes e inhibidores, equilibrio que requiere ser reversible cuando las circunstancias lo requieran. Todo ello implica que los substratos y los activadores de las reacciones enzimáticas que producen el coágulo deben ser normales y que los inhibidores no deben sobrepasar los valores fisiológicos (9, 21, 24).

CASCADA DE COAGULACION A PARTIR DE LAS VIAS DE ACTIVACION

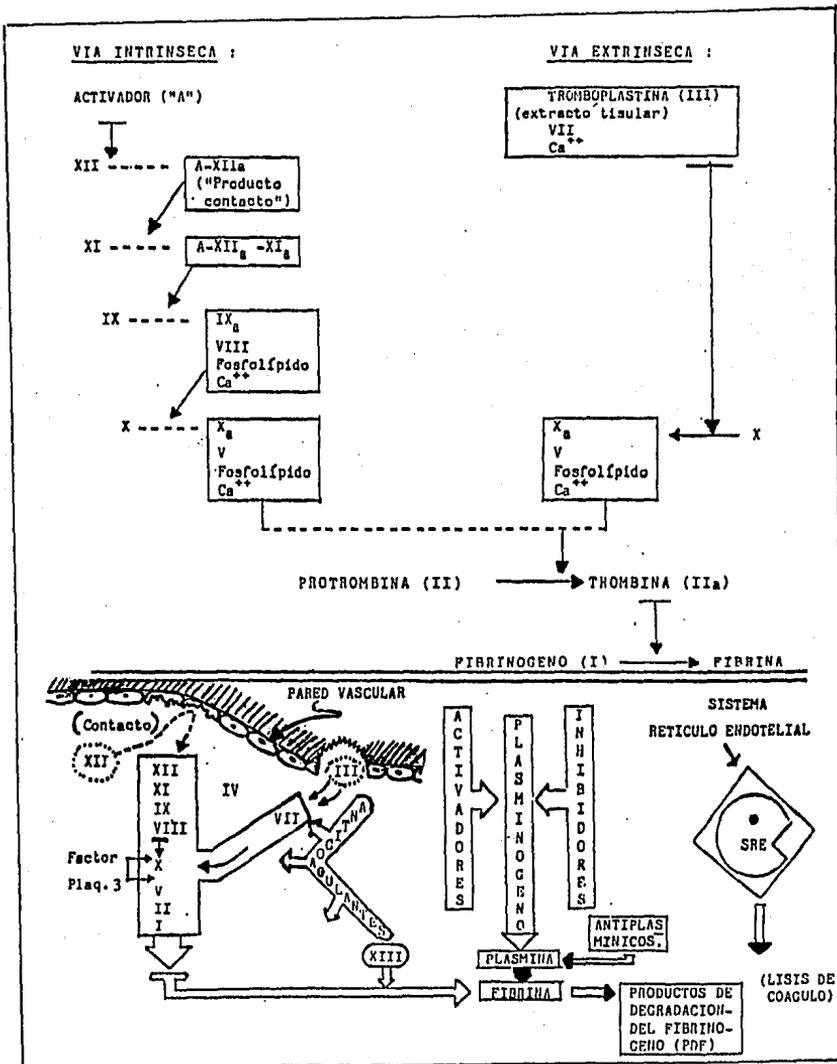


Ilustración No 6

D) IMPORTANCIA DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL PROCESO HEMOSTATICO

Las prostaglandinas constituyen una importante clase de sustancias con actividad biológica (7, 16). Es una familia de compuestos que se encuentran en casi todos los tejidos y que está integrada por grupos de sustancias llamadas prostaglandinas A, B, D, E y F. La estructura básica de cada una de ellas consta de ácidos poliinsaturados de 20 carbonos (el ácido prostanoico) que contienen 3, 4 ó 5 dobles enlaces. Estos ácidos grasos forman parte de los fosfolípidos de la membrana celular de la mayoría de las células del organismo. Las prostaglandinas se derivan precisamente de estos ácidos grasos.

Fueron identificados en un principio por su acción vasopresora y su efecto sobre la musculatura lisa; más tarde se demostró su inherente relación a procesos biológicos importantes y fue posible otorgarles la responsabilidad de ser moduladores del metabolismo celular, ya que juegan un papel de moduladores sistemáticos.

En los años 30 Goldblatt y Von Euler descubrieron un compuesto vasopresor y estimulante del músculo liso, inclinándose a pensar que tal actividad biológica era producto de una sustancia liposoluble con actividades ácidas que llamaron factor prostaglandina (7). Se encontró después que tales compuestos estaban presentes en la mayoría de los tejidos. En 1957 Bergstrom y Sjoval comunicaron el aislamiento en forma de cristales de 2 sustancias biológicamente activas: la PGE, y la PGE 1 alfa, que siendo obtenidas a partir de glándulas vesiculares de carnero resultaban ser potentes estimulantes del músculo liso y además contar con una acción vasopresora. Bergstrom y Cols, aislaron después 4 prostaglandinas más, que son homólogos de las series PGE y PGF; estos compuestos son respectivamente: PGE₂ y PGE₃, PGF₂-alfa y PGF₃-alfa. Todo lo cual impulsó el interés en la determinación de las estructuras básicas exactas de dichos compuestos.

La fuente principal de las prostaglandinas es el ácido araquidónico; mismo que es

producido por los fosfolípidos de la membrana plaquetaria. La etapa de conversión empieza con la activación de la fosfolipasa plaquetaria con hidrólisis consecutiva de fosfolípidos en la superficie de la membrana plaquetaria y la liberación consiguiente del ácido araquidónico. De este último se derivan los endoperóxidos cíclicos intermediarios, entre los cuales se encuentran: La prostaglandina D_2 , la prostaglandina E_2 (PGE_2), la prostaglandina F_2 (PGF_2), la prostaciclina, el tromboxano A_2 y la leukotrininas (sustancias de secreción lenta anafilática). Estas sustancias difieren muy poco en su acción química pero su activación biológica es totalmente distinta y en algunos casos antagónica. La D_2 es un potente vasodilatador; la PGE es vasodilatadora y broncoconstrictora, mientras que la PGF es vasoconstrictor y promueve la agregación plaquetaria (26).

Diferentes estímulos químicos o traumáticos pueden estimular la actividad de la fosfolipasa A_2 motivando así la formación del ácido araquidónico; este último, bajo la acción de la ciclooxigenasa (también llamada sintetasa de las plaquetas) dará origen a las distintas prostaglandinas.

El efecto típico de los compuestos PGE es la vasodilatación periférica. La prostaglandina PGE_2 a concentraciones altas tiene efecto inhibitor de la agregación plaquetaria, pero a concentraciones bajas potencia la reacción de liberación plaquetaria. El tromboxano A_2 (prostaglandina formada por isomerización del endoperóxido intermediario) se considera el principal efector en la inducción de la reacción de liberación, produciendo la agregación plaquetaria consecuente a los productos liberados. También como producto de los intermediarios se encontró que hay una síntesis de la prostaglandina D_2 , que es un potente inhibidor de la reacción agregante plaquetaria inducida por ADP , colágeno y prostaglandina G_2 .

Por su parte, la pared vascular a partir de las células endoteliales, tiene propieda

des antitrombóticas por medio de 2 funciones: a) una acción pasiva, de superficie con características no trombogénicas, impidiendo la activación y la adhesión de elementos circulantes; y b) una función activa, que se pone de manifiesto para la liberación de proactivadores fibrinolíticos y de inhibidores plaquetarios, es decir, liberan prostaciclina.

De este modo, mientras las prostaglandinas sintetizadas en la membrana plaquetaria intervienen para provocar el trombo en el lugar de la lesión vascular, las prostaciclina en las células endoteliales participan simultáneamente para que tal proceso trombooclusivo no vaya más allá del sitio mismo de la lesión.

Queda claro que las prostaglandinas tienen una participación activa en el mecanismo regulador de la función plaquetaria y de la pared vascular: de esta manera, la patología en cuestión (hemorragias y trombosis) está ampliamente vinculada a su actividad.

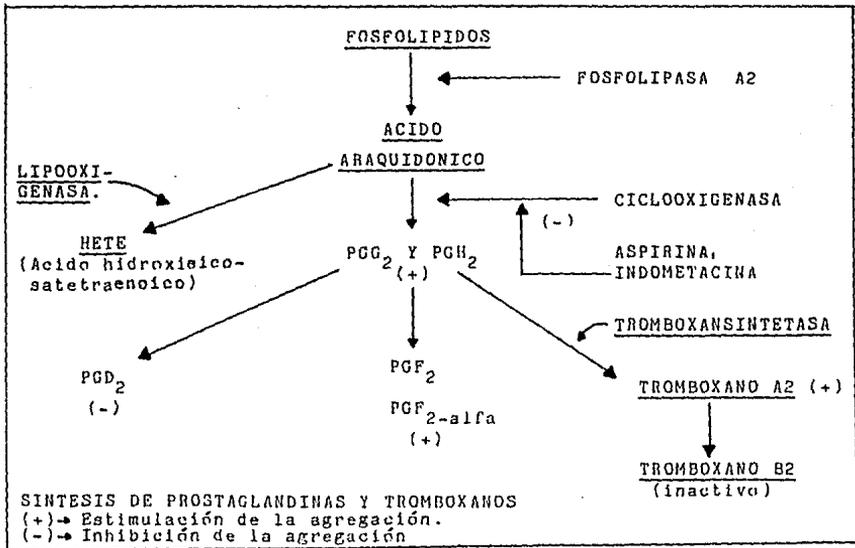


Ilustración Nº 7

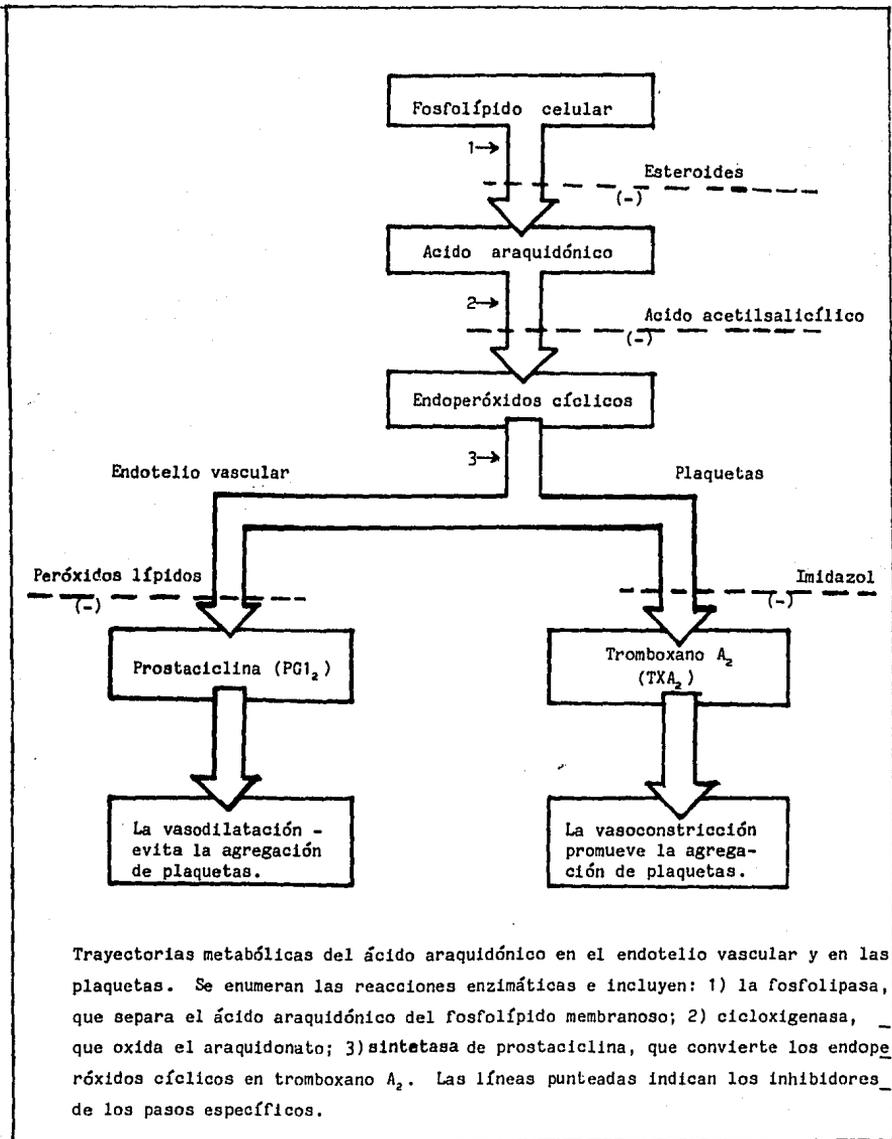


Ilustración Nº 8

CAPITULO II

AGREGOMETRIA PLAQUETARIA, CONCEPTOS GENERALES Y METODOS DE ESTUDIO

La activación plaquetaria constituye la primera defensa hemostática durante una lesión vascular, lo que hace firme la idea de que la correcta función hemostática primaria es necesaria para el control normal del sangrado. La dinámica de las plaquetas que se establece con la superficie vascular, preserva la integridad epitelial sin impedir el flujo del torrente sanguíneo; sin embargo, la reactividad excesiva de las plaquetas en la superficie endotelial puede contribuir a la trombosis, es decir, a la coagulación patológica.

En el revestimiento vascular roto, las plaquetas se adhieren a la superficie expuesta, cambian de forma, desarrollan pseudópodos y se desintegran. Otras plaquetas son rápidamente atraídas a la capa adherente de plaquetas y se agregan ahí para formar un tapón (hemostasia primaria). La superficie de las plaquetas reactivas catalizan las reacciones de la coagulación, lo que conduce a la formación de fibrina. La coagulación sanguínea (hemostasia secundaria) estabiliza el tapón plaquetario, y al final las plaquetas hacen una contribución mecánica adicional: la contracción plaquetaria provocada por la trombostenina contrae el coágulo, consolidando así la firmeza suficiente del coágulo.

A) AGREGACION

Como cualidad única e insustituible propia de las plaquetas, la propiedad de agregarse es una de las principales funciones que operan en el control del sangrado condicionada a lesiones del revestimiento vascular. "La agregación plaquetaria es la capacidad que tienen las plaquetas de adherirse entre sí" (9, 12, 13, 16). Este proceso constituye un proceso activo que cuenta con movimientos energéticos, mecánicos y

químicos, dentro de los cuales se liberan diversas sustancias (ya sea adsorbidas por las plaquetas o bien sintetizadas en ella) que aumentarán el poder coagulativo cuando se requiera.

La agregación plaquetaria en respuesta a estímulos químicos estudiada in vitro, se ha utilizado para evaluar la sensibilidad o reactividad plaquetaria. Durante la agregación in vitro pueden evaluarse los niveles plasmáticos de los mediadores como una medida de liberación in vivo de las sustancias que intervienen. Tal procedimiento ha probado ser de gran utilidad en la estimación de anomalías plaquetarias congénitas, adquiridas y las que son inducidas por drogas o mediadores de la función plaquetaria (12). No obstante que las condiciones que se establecen in vitro en esta prueba tengan un uso limitado en la detección o predicción de las tendencias de trombosis y enfermedades vasculares, su evaluación es de gran ayuda.

Para medir esta facultad plaquetaria se ha generalizado el procedimiento fotométrico de agregación plaquetaria, basado en las variaciones de la densidad óptica que tienen lugar en un plasma rico en plaquetas (PRP) sometido a un flujo continuo, en presencia de algún inductor de la agregación; ya que se encontró que existe una relación directa entre la disminución de la densidad óptica y la agregación plaquetaria, pudiéndose registrar una curva indicativa del proceso. Los distintos agentes agregantes hacen esta tarea menos difícil. Las anomalías plaquetarias involucradas a esta técnica de análisis incluyen: Tromboastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard Soulier, Afibrinogenemia, enfermedad de Von Willebrand, defectos de la reacción de liberación plaquetaria y de gránulos de almacenamiento, y algunas otras que incluyen desórdenes adquiridos, entre los que figuran los que son inducidos por fármacos, de particular interés son: los antiinflamatorios no esteroideos. Se ha reconocido igualmente las tendencias a un aumento de la respuesta de agregación en una variedad de condiciones, por ejemplo el stress, el fumar, desórdenes cardiovasculares y tromboembólicos, diabetes, hipertensión, etc. .

B) MECANISMO DE ACCION

El proceso de agregación puede investigarse con un instrumento llamado agregómetro. Cuando las plaquetas se exponen a un agente agregante, les provoca una cantidad de cambios que las induce a adherirse unas con otras, lo que constituye la agregación misma, lo que propicia que tenga lugar la liberación de su contenido granular. Tales acontecimientos han sido estudiados sobre plasma rico en plaquetas o en suspensiones de plaquetas lavadas en un medio artificial.

El plasma rico en plaquetas puede prepararse centrifugando a pocas revoluciones la sangre total en presencia de anticoagulante. El fenómeno inicial consiste en la interacción de ciertos puntos específicos del agente agregante con las glucoproteínas específicas presentes en la membrana plaquetaria, ya que se ha descubierto que existen receptores específicos para cada uno de los agentes agregantes, estableciéndose un fenómeno de apertura diferente para cada uno de ellos, pero todos convergen en la estimulación para la secreción del ADP endógeno (4, 5, 11).

En la Ilustración Nº 9 se esquematiza una serie de acontecimientos dados por la presencia inducida de agentes así como los sitios de inhibición producida por otras substancias químicas. Se podrá observar que la interacción de algún agente agregante con los receptores específicos de la membrana plaquetaria hará que se active la Fosfolipasa A2, que producirá la separación del ácido araquidónico del fosfolípido plaquetario membranoso por medio de hidrólisis. Luego, el ácido araquidónico es rápidamente oxidado por la ciclooxigenasa, produciendo así los endoperóxidos cíclicos PGG2 y PGH2. La acción de la enzima tromboxan-sintetasa, transforma una parte de los intermediarios endoperóxidos en una prostaglandina capaz de provocar una disminución del AMP-cíclico, el Tromboxano A2. Una vez que la concentración de AMP-cíclico disminuya, baja también la actividad de la "bomba de calcio" (propuesta por Salzman), originando que la membrana plaquetaria se torne ahora permeable a los iones de cal -

ACONTECIMIENTOS OCURRIDOS DURANTE LA ACTIVACION PLAQUETARIA PARA DAR PASO A LA AGREGACION Y LA INHIBICION DE ÉSTA EN EL ENDOTELIO VASCULAR

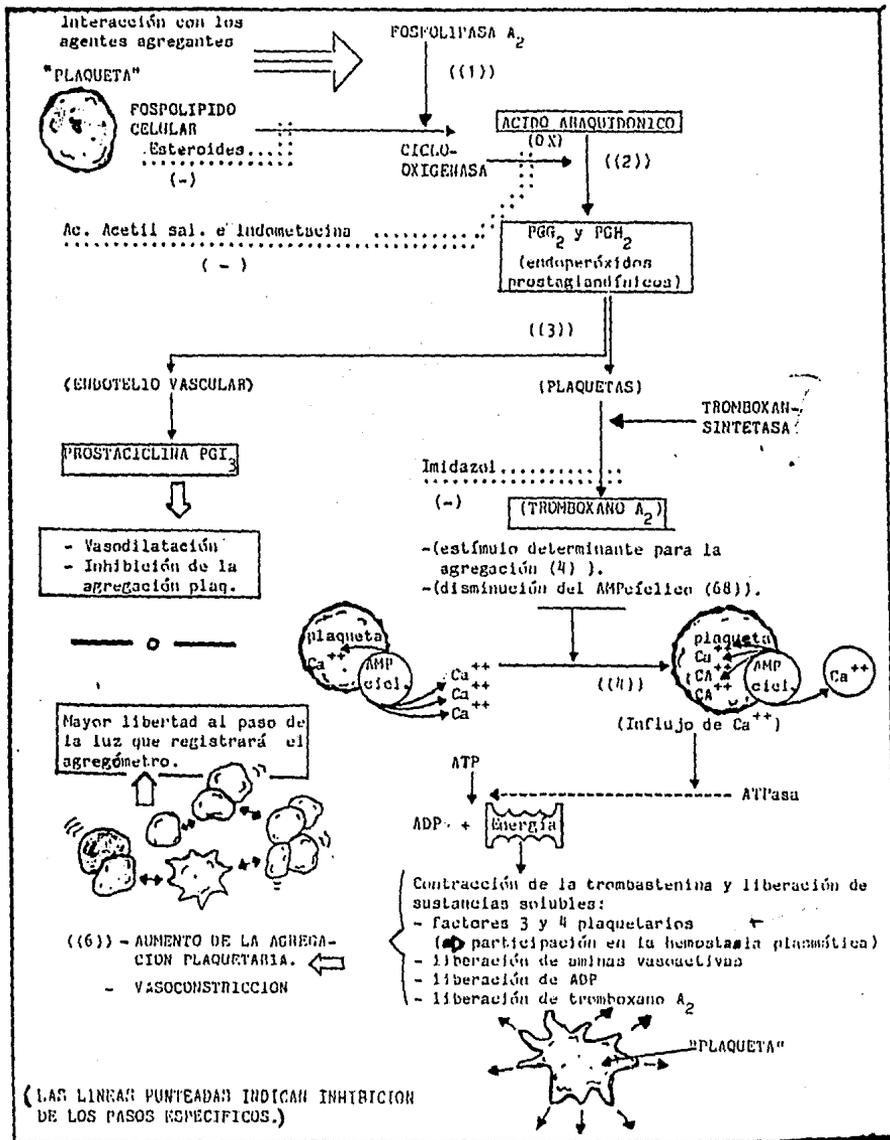


Ilustración Nº 9

cio. Después, cuando el calcio haya penetrado a la plaqueta a razón del influjo producido por la inhibición de la bomba, se estimulará la enzima ATP-asa, misma que degradará la nucleótido trifosfatado (ATP) para que se obtenga la energía para que el factor contráctil plaquetario, trombostenina, provoque la expulsión de las sustancias solubles. Tal contracción plaquetaria proporcionará las sustancias que se seguirán utilizando en el transcurso de la agregación plaquetaria, y que después de producir las redes de fibrina (en el transcurso de la coagulación producida por los factores plasmáticos) sobre las plaquetas "adheridas" consolidará características de solidez necesaria para el coágulo.

C) AGENTES AGREGANTES

Una buena técnica de análisis tiene que descansar en un procedimiento adecuado, reuniendo condiciones óptimas lo más semejantes a la realidad fisiológica, además de ser lo suficientemente reproducibles.

Teniendo un papel similar de condiciones in vivo, la agregación plaquetaria traduce un efecto por el cual puede medirse y registrarse la efectividad de las plaquetas por agregarse. Esta técnica cuenta con varios agentes que estimulan a las plaquetas produciendo agregaciones exclusivas con determinadas características. Se enumeran las más comunes.

- Agregación inducida por colágeno.
- Agregación inducida por adrenalina.
- Agregación inducida por difosfato de adenosina (ADP).
- Agregación inducida por ristocetina.
- Agregación inducida por trombina.
- Agregación inducida por fibrinógeno bovino.
- Agregación inducida por serotonina

- Agregación inducida por noradrenalina.
- Agregación inducida por fosfolípidos catiónicos.
- Agregación inducida por tromboxano.
- Agregación inducida por ión A_{23-187} .
- Agregación inducida por tromboxano.
- Agregación inducida por antígeno-anticuerpo.
- Agregación inducida por virus y bacterias.

La evolución de la agregación plaquetaria puede provocarse por todos esos agentes. La utilización conveniente de cada uno de ellos está en función de la sospecha clínica que sugerirá cual es el resultado que proporcione mayor utilidad, de acuerdo al diagnóstico previamente establecido, ya que ésta como otras técnicas sólo pretende confirmar la orientación del diagnóstico que surge del estudio clínico previo hecho por el médico. En seguida se limitará a simplificar brevemente la acción de los más usuales:

- Colágeno. La colágena es uno de los compuestos subendoteliales que reacciona con las plaquetas causando adhesión de éstas y finalmente su agregación. Una dilución de una concentración adecuada de colágeno es añadida a una porción alícuota del plasma rico en plaquetas del paciente. Los cambios que ocurren son observados después de un período de espera. Cuando hay presencia en el medio plaquetario de partículas de colágeno finamente divididas o extractos salinos de tejido conectivo, las plaquetas interactúan con los receptores específicos y provoca que éstas se adhieran a las fibras liberando ADP y otros componentes endógenos y se agregan por la presencia de nucleótido en el medio. Por consiguiente, es por la liberación de ADP desde las plaquetas por lo que la colágena induce su agregación (11, 35). Por ello se sabe que la agregación causada por la colágena es una medida indirecta de la facultad de liberar ADP por las plaquetas, además de evaluar su capacidad para agregarse en función del ADP. Los trazos constan de una única onda irreversible de agregación,

la cual es precedida de un período de latencia, de duración no uniforme, siendo ésta una característica única para este agente.

- Adrenalina. La adrenalina ejerce una reacción directa sobre las plaquetas y provoca una respuesta de agregación primaria de características reversibles y además una segunda onda verificada por la respuesta de liberación del nucleótido plaquetario. Es por ello que se produce una respuesta de agregación bifásica. Por tanto, la adrenalina evaluará una anomalía en la respuesta primaria a partir de la primera onda de agregación, medirá también la facultad de liberación y además la capacidad de las plaquetas para responder al ADP a partir de la segunda onda de agregación (5). La concentración que se requiere es importante para poder apreciar las 2 ondas características en el trazado típico; la que optimiza este procedimiento para este agente agregante va de 1 a 50 microM/ml en concentración final. Se aprecian defectos de agregación inducida con adrenalina en pacientes con síndrome semejante a la aspirina encontrándose un defecto en la segunda onda de agregación (30)

- ADP. La agregación que se efectúa en las plaquetas que se les ha añadido difosfato de adenosina es directa sin ocurrir período de espera. Dependiendo de la concentración que se utilice podrá obtenerse una segunda onda de agregación causada por la liberación del ADP intraplaquetario. Aunque el ADP es uno de los constituyentes de los gránulos plaquetarios que se libera cuando las plaquetas son expuestas a los agentes agregantes, induce la liberación del nucleótido al igual que el colágeno. La segunda onda hace constar que sucede la liberación del contenido plaquetario entre el cual se encuentra el mismo ADP (8, 9, 12, 15). Tal acontecimiento está asociado con la formación de los compuestos intermediarios prostaglandínicos que son interferidos por la presencia de los antiinflamatorios no esteroidales, ya que éstos actúan inhibiendo la acción de la ciclooxigenasa, y de aquí que tal obstáculo inhiba la formación de la segunda fase de agregación. Entonces, el ADP estima la capacidad que tienen las plaquetas por responder a la presencia de nucleó

tido en el medio, evalúa también la respuesta de liberar el contenido granular y la magnitud de la segunda onda estimulada por el ADP endógeno. Los trazos de agregación característicos, nuevamente dependen de la concentración que se utilice de inductor. A determinadas concentraciones de agente agregante muchas veces no son capaces de provocar la reacción de liberación, por lo que sólo se observará la primera onda con características reversibles, lo que sucede al utilizar concentraciones de 1 microM/ml. Cuando la concentración final de ADP es de 2.5 micro M/ml, el período inicial va seguido de una reducción de la transmisión de la luz, atribuida a cambios de forma de las plaquetas, y luego sobreviene un nuevo aumento de más altura que esta vez siendo irreversible corresponda a la segunda onda de agregación. Este trazo exhibe separadamente la primera y la segunda ondas, la primera provocada por el ADP adicionado y la segunda por la liberación del ADP intraplaquetario. Empleando concentraciones mayores, la meseta que separa a las 2 ondas no se aprecia y desaparece; el trazo es ahora una sola curva en donde las 2 ondas están "fusionadas" porque no se produjo la meseta con la cual terminaría la primera fase.

- Ristocetina. La mayoría de los agentes citados, con excepción del colágeno y de la ristocetina, son capaces de ocasionar la agregación bifásica dependientes a la concentración utilizada (9). La ristocetina es un antibiótico que al descubrirse que ocasionaba trombocitopenia, dejó de utilizarse en la terapéutica (5). Luego cobró más importancia el hecho de que los pacientes con enfermedad de Von Willebrand carecían de un factor necesario para que se agregaran las plaquetas estimuladas con ristocetina. Durante los últimos años se encontraron además otros trastornos asociados a una agregación anormal a este antibiótico, por lo que la prueba no es específica ni exclusiva para el diagnóstico de Von Willebrand. En el síndrome de Bernard-Soulier se encuentra también disminuida la respuesta de agregación por dicho agente. En la tromboastenia la agregación al ristocetina es normal, lo mismo que con el fibrinógeno: pero anormal con el ADP, colágeno, adrenalina y trombina, lo que no sucede con el estímulo de la ristocetina. El trazo típico de la ristocetina en

personas anormales muestra una escasa agregación en los primeros segundos, demostrando que sólo pequeñas cantidades de ADP han sido expulsadas en ese instante desde la plaqueta; después, conforme va transcurriendo el tiempo, la curva de agregación va pronunciándose tanto que al rededor del tercer minuto el porcentaje de agregación casi siempre está por encima del 90%, demostrando que, paralelamente, la expulsión del ADP intraplaquetario, está en proporción directa al porcentaje de agregación, ésto evidenciado por el aparato. Para la agregación óptima de este agente inductor se utiliza una sola concentración, que va de 1500 a 1800 microM/ml en concentración final.

- Trombina. La trombina es capaz de desencadenar por sí misma el proceso de agregación actuando tanto in vivo como in vitro. Con concentraciones que van de 0.3 a 0.5 U/ml en concentración final, se aprecia un trazo bifásico. La fase inicial dentro de estas concentraciones es completamente reversible; los agregados se rompen y las plaquetas gradualmente vuelven a su apariencia normal inalterada. Esta onda primaria demuestra que las plaquetas se rompen de una manera gradual, es decir, no todas ellas tienen el efecto al mismo tiempo (33). Es importante aclarar que no todas las plaquetas sufren los cambios morfológicos o la agregación cuando se exponen a una baja cantidad de trombina; la respuesta plaquetar es netamente individual y 2 células pueden estar en distinto estado de transformación al mismo tiempo. Con respecto al mecanismo de acción, Machman pudo demostrar que la trombina actúa sobre una glicoproteína de la membrana plaquetaria a la que hidroliza. Al ocurrir la segunda onda, la expulsión del ADP intraplaquetario se manifiesta violentamente, lo que queda demostrado por la inclinación casi vertical del trazo de esta segunda onda hecha por el agregómetro, dando por resultado una respuesta secundaria casi siempre mayor del 90% en los primeros minutos.

- Fibrinógeno bovino. En los ensayos que provienen de las muestras de sangre de personas normales, la agregación inducida por fibrinógeno bovino produce invaria

blemente una agregación completa. Los trazos muestran una gran amplitud en la que nuevamente no se aprecia la meseta que separa la primera onda de la segunda. Se observa por consiguiente el trazo bifásico en el cual la primera y la segunda onda están fusionadas por una gran pendiente. La concentración con la que se han obtenido mejores resultados es la de 0.3 mg/ml en concentración final. Un efecto importante en este inductor es que activa la agregación plaquetaria en las plaquetas tromboasténicas, propiedad que comparte solamente con los compuestos que inducen agregación por cambios a carga eléctrica de la membrana plaquetaria.

D) FUNDAMENTO DE LA TECNICA Y APARATO DE MEDICION

Los cambios de voltaje que se dan a partir de las variaciones de la densidad óptica o transmitancia de un plasma rico en plaquetas, están en función directamente proporcional a la agregación plaquetaria; es decir, mientras más plaquetas se agreguen mayor será la magnitud de transmitancia.

Si el plasma rico en plaquetas se coloca en un tubo transparente de vidrio y se somete a remoción y temperatura constantes, cuando un haz de luz atraviesa el tubo, una nube difusa de plaquetas de la propia suspensión dispersa la luz, evitando que la mayoría del haz alcance la fotocelda situada en la cara opuesta. Al añadir un agente agregante al PRP, provoca que éstas se agrupen permitiendo que pase más luz a través de la suspensión. De esta manera, cuanto mayor sea la facultad de las plaquetas por adherirse unas a otras, dejarán pasar mayor cantidad de luz sin que ésta sea desviada en otra dirección, lo que será registrado en el agregómetro.

Como puede verse, el método se basa en los cambios de voltaje, y un trazo de la cantidad de luz que alcanza la fotocelda permite registrar en forma continua el curso de la agregación plaquetaria. Así, si el procedimiento se ha llevado a cabo normalmente en el plasma de personas sanas, éste revelará que está menos turbio que antes de la agregación.

AGREGOMETRO

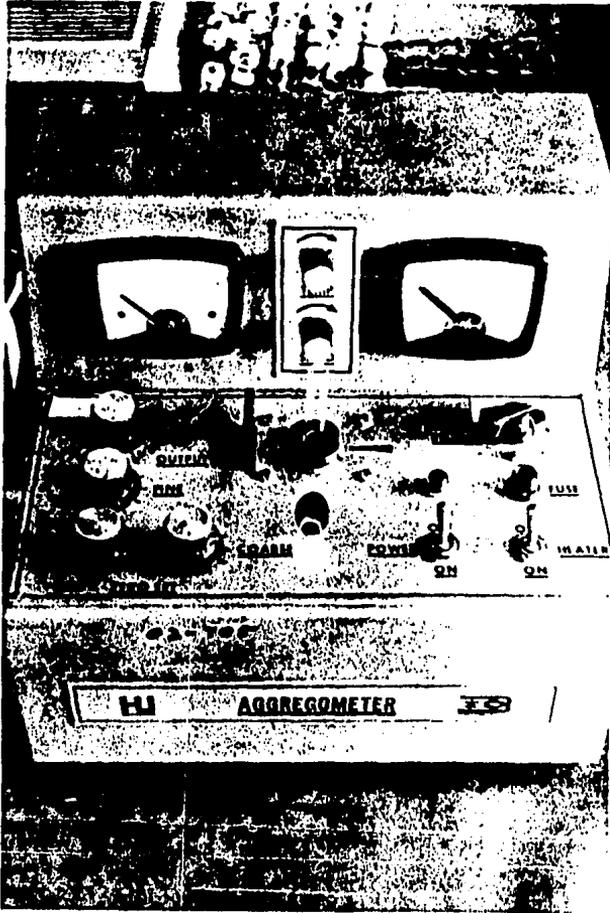


Ilustración No 10

AGREGOMETRO Y SU REGISTRADOR GRAFICO ADJUNTO

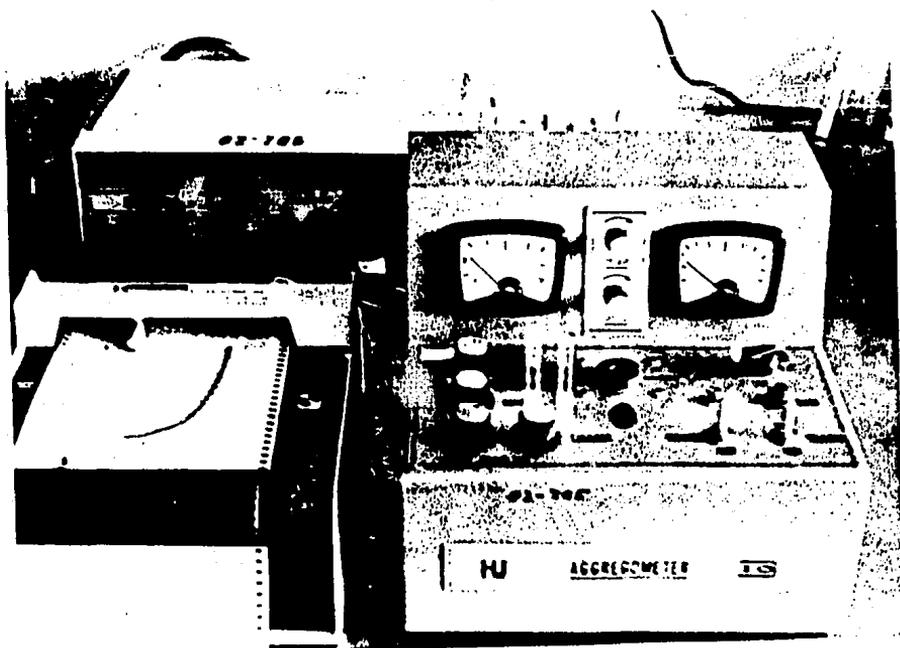


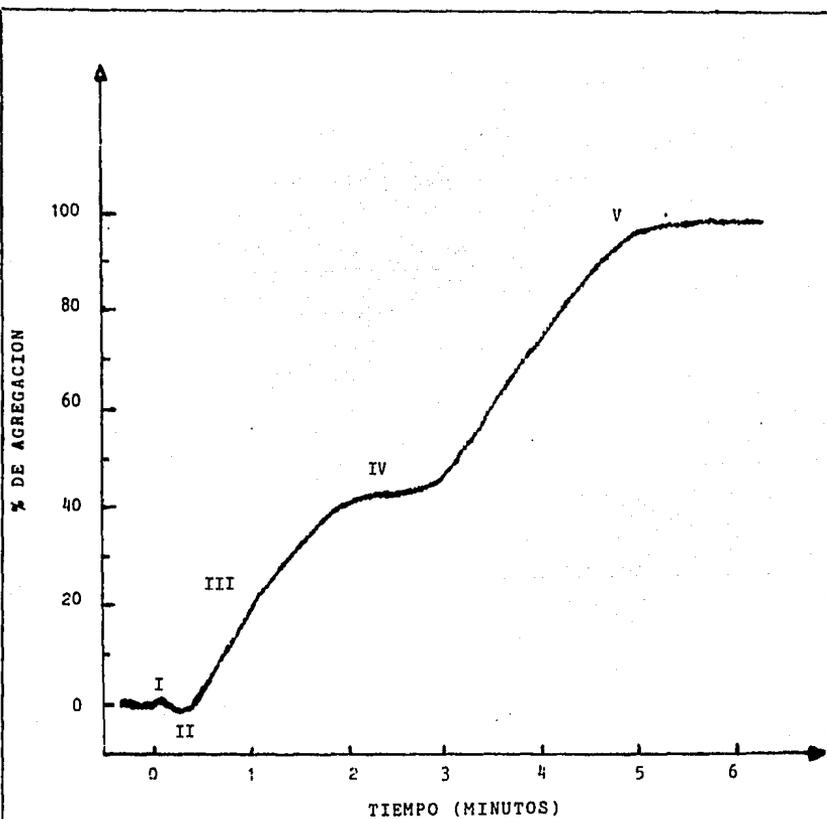
Ilustración Nº 11

Los instrumentos ópticos que miden la agregación plaquetaria como el Agregómetro -- Briston, cuenta con facilidades de ajuste de temperatura y de remoción. Registran _ nefelométricamente cambios de turbidez automáticamente, lo cual es inscrito en forma de trazos en un papel especial que está dividido de manera distinta a lo largo y a _ lo ancho: En sentido transversal, tiene marcadas 10 divisiones que representan el _ porcentaje de transmitancia. Al inicio de la técnica, la plumilla del inscriptor _ del registrador se lleva a 0% de transmitancia con el PRP en concentración de 250,000 plaq/ml, y a un 100% de transmitancia con PPP autólogo. Por otra parte, en sentido _ longitudinal, el papel está dividido de una manera que asegura que cada minuto que _ transcurre en la prueba, la plumilla se desplace una pulgada ó 2.5 mm en un minuto _ automáticamente cronometrado. De este modo, la prueba termina cuando el papel se ha desplazado ya cinco minutos y treinta segundos, mismo que requiere la prueba en su _ totalidad. La técnica fué descrita casi simultáneamente por Born y O'Brien (8, 23).

Cada uno de los agregómetros que existen en el mercado presentan ventajas e inconvenientes. En los que se utilizan más comunmente, la fuente luminosa está formada por una lámpara de filamento de tungsteno de 12 a 13 volts; la longitud de onda utilizada está comprendida entre 600 y 610 milimicrones. Un sistema magnético doble forma el mecanismo de agitación del agregómetro; un imán de hierro conectado a un motor de velocidad regulable, permite una agitación óptima de 1100 revoluciones por minuto, que es transmitida al interior de la celdilla por medio de una varilla imantada cubierta de polietileno

E) INTERPRETACION DE LAS CURVAS DE AGREGACION

Los resultados pueden ser expresados según diferentes parámetros (10): El cambio máximo de la transmisión de la luz, el tiempo requerido para que alcance un máximo de agregación y la velocidad inicial de cambio, son medidas que proporcionan datos que se utilizan comparativamente. Todos ellos estarán en función de un criterio que se sostiene en la estimación de las pruebas comparadas con las de una mezcla de plasma



CAMBIOS NORMALES EN % DE TRANSMITANCIA OCURRIDOS DURANTE LA AGREGACION PLAQUETARIA. I) Leve incremento debido a la dilución al añadir el agente agregante; II) Leve disminución debido a la hinchazón plaquetaria o cambio de forma; III) Incremento progresivo de las formas plaquetarias agregadas -primera fase-; IV) Ocurre la reacción de liberación. Comienza la segunda onda fomentada por la agregación que produce el ADP endógeno; V) Agregación máxima.

testigo. Tales estimaciones surgen de: a) medida de la velocidad (la rapidez de la agregación es traducida por la velocidad a la que se desarrolla la reacción); b) tiempo de demora o de latencia previo a la agregación (algunos inductores producen una agregación casi inmediata, en la que la fase de latencia no va más allá de 10 segundos como es el caso del ADP, la trombina y la adrenalina; no sucediendo lo mismo con el colágeno, en el que tal fase de latencia llega a prolongarse a veces hasta minuto y medio; y c) cálculo de la transmisión máxima de la agregación (la transmisión máxima alcanzada en los trazos, comparados con distintos inductores contribuye con la información que ayudará a dilucidar el carácter de la anormalidad que pueden tener las plaquetas.

Los resultados de las agregaciones en base a la transmisión máxima se dan en porcentaje de agregación y el tiempo en que cada onda se efectúa dicho máximo de agregación. Así vemos que, normalmente, el ristocetín produce en las plaquetas una agregación máxima en un lapso relativamente corto de tiempo, mientras que el ADP lo hace menos pronunciado y tardándose más.

F) CONDICIONES QUE INFLUYEN EN LA PRUEBA DE AGREGACION

La presión fisiológica, la temperatura natural y condiciones de flujo que la sangre contiene en los vasos sanguíneos normalmente, podría todo ello contribuir a un sistema ideal para medir la agregación. Los anticoagulantes no serían necesarios si la generación de trombina ocurrida durante el trauma no contribuyera a la extensión de la agregación. Pero tal técnica no puede ser estudiada por ese camino, y todas las estimaciones no pueden ser hechas en sistemas en los cuales se introducen artefactos que afecten la respuesta plaquetaria.

La presencia de hematies en el PRP, hecho apreciable a simple vista, si son muy abundantes es preferible no utilizarlo; lo mismo en el caso de plasmas hiperlipémicos, icterícos o hiperglubulémicos.

El anticoagulante utilizado influye. La primera onda de agregación es más extensa cuando se ha utilizado heparina o hirudina en lugar de citrato, ya que el citrato reduce la cantidad de iones calcio. Si la heparina se administró al sujeto antes de que la muestra haya sido tomada también interfiere en el curso de la agregación; ya que la sangre conteniendo heparina contiene frecuentemente plaquetas agregadas. El EDTA utilizado como anticoagulante provoca que la mayor parte de los inductores no agregen normalmente.

El pH influye en el trazo de agregación. La máxima ocurre en valores de pH comprendidos entre 7.4 y 8.0 (12). Se tiene reportado que no sucede segunda onda con el ADP como agente inductor en un pH por encima de 8.

Son importantes también el tiempo y la temperatura de almacenamiento del plasma antes de la agregación, aunque igualmente los agentes agregantes difieren en su sensibilidad a esas variables. La temperatura a la que la agregación es estudiada afecta también los resultados. La segunda onda de agregación por ADP o por adrenalina no ocurre abajo de los 30°C. En términos generales, las investigaciones estudian el comportamiento plaquetario de agregación a 37°C. Se ha encontrado además que las variaciones de respuesta plaquetaria a varios agentes ocurren como resultado del lapso de tiempo comprendido entre la venipuntura y la preparación del plasma y el tiempo requerido para la prueba (12). Después de 3 horas las respuestas plaquetarias disminuyen considerablemente. La reacción de liberación no se verifica a temperaturas menores de 33°C.

La velocidad de agitación influye porque afecta el número de colisiones entre las plaquetas. Se agita alrededor de 1100 revoluciones por minuto (11, 12).

La concentración de plaquetas y la de los agentes inductores a la que se investiga es obvio que sea importante. Las cuentas de plaquetas de un rango comprendido entre

200 000 y 400 000 por mililitro es satisfactoria para fines prácticos, pero se estandarizó el procedimiento en el laboratorio utilizando concentraciones de 250 000 plaq./ml para la mayoría de los estudios.

Un control normal de la agregación cumplirá con todo lo anterior. Indudablemente, todos los reactivos deben de estar en condiciones óptimas para su uso, así como todo el material que se utilice. Por otro lado, las personas que están tomando medicamentos (y más si éstos son salicilatos o catecolaminas) deberán suspender su medicación por lo menos durante 7 a 10 días antes del análisis (6, 11, 12), por lo que los pacientes deberán ser interrogados previamente para no dar resultados incongruentes con la realidad.

ALGUNAS RECOMENDACIONES IMPORTANTES:

Existen algunas condiciones que tienen que cuidarse durante la ejecución de la técnica: los tubos deben ser lavados y enjuagados cuidadosamente con agua destilada y por último deberá aplicárseles un enjuague de silicón. Si los tubos o celdas son cambiados para cada agregación el aparato deberá ser calibrado antes de cada determinación. Es preferible utilizar la misma varilla imantada. La dosis de agente agregante deberá ser contenida en un volumen mínimo, (ya que las curvas de agregación únicamente pueden compararse a bajas concentraciones de los agentes utilizados, al momento de inducirlos deberá ser de un solo movimiento rápido). Así mismo, esta dosis de inductor deberá añadirse verticalmente sobre la superficie del plasma rico en plaquetas (PRP), situado en el portaceldas de la manera más reproducible.

En el caso de la trombopenia es aconsejable recurrir a otros métodos exploratorios (como plaquetas concentradas sobre gradiente de albúmina y otros raramente utilizados).

Los errores de transmisión óptica están relacionados con la inestabilidad de co -

riente, por lo que es aconsejable trabajar con un estabilizador.

Siempre que se encuentre algún defecto de agregación o alguna diferencia con los trazos normales, deberá de correrse indiscutiblemente un testigo normal, cotejándose además la dosis de preparación de reactivos e identidad de éstos, corroborándose el hallazgo en todos los casos que sea necesario.

Por último, se aconseja anotar sobre el papel gráfico del trazo la fecha, la identificación o iniciales del paciente, el tipo de agente agregante y la concentración empleada; así mismo, después de incubación y la magnitud a la que se efectuaron las respuestas de agregación.

CAPITULO III

TRASTORNOS QUE ESTAN ASOCIADOS A DEFICIENCIAS DE AGREGACION

PLAQUETARIA

Un tiempo de sangrado prolongado en un paciente cuyo recuento plaquetario es normal, sugiere alguna anomalía de la función plaquetaria (31). Lo que puede ser debido a un trastorno plaquetario cualitativo o bien a un déficit de un factor plasmático necesario para la hemostasia. La hemorragia anormal debida a deficiencias o anomalías plaquetarias, presenta un cuadro clínico distinto del causado por deficiencias o anomalías de los factores Plasmáticos (33). Las plaquetas son responsables de la inhibición de la hemorragia en los pequeños vasos; por consiguiente, un tiempo de sangrado prolongado y hemorragias petequiales son los signos distintivos de deficiencias de este componente plasmático. Las hemorragias debidas a los factores plasmáticos deficientes son más profundas en el cuerpo, presentando hematomas subcutáneos o intramusculares, o hemorragias en las articulaciones. Actualmente, los exámenes de agregación plaquetaria se utilizan para investigar anomalías congénitas o adquiridas de la función cualitativa plaquetaria.

Las alteraciones de la hemostasia pueden ser divididas según las causas de su origen en: anomalías de las plaquetas, anomalías de los vasos sanguíneos y anomalías de los factores de la coagulación plasmática; o bien combinaciones de éstas. Muchas veces los trastornos quedan mejor clasificados con relación a la anomalía funcional y el mecanismo por medio del cual se origina dicha anomalía; lo que es posible generalmente para las disfunciones cuanti y cualitativas de las plaquetas.

Dado que este trabajo sólo trata lo concerniente a alteraciones cualitativas plaquetarias, se limitará solamente a mencionar una breve clasificación con este fin,

donde la agregación plaquetaria no se desarrolla normalmente:

A) TRASTORNOS HEREDADOS DE LA COAGULACION:

La mayor parte de las anomalías congénitas de la función plaquetaria envuelven disminuciones de respuesta a agentes agregantes. Solamente unos cuantos están asociados a disminuciones de sensibilidad plaquetaria. En la mayoría de las condiciones en las que las plaquetas no agregan normalmente, es evidente algún grado de alteración de la hemostasia.

- Anormalidades en la primera onda de agregación (Tromboastenia)

Este trastorno fué descrito por Glanzmann en 1918. Es una anomalía plaquetaria encontrada en un reducido grupo de enfermos con un trastorno hemorrágico congénito transmitido en forma autosómica recesiva, asociada con la ausencia o alteración de la retracción del coágulo y la incapacidad de las plaquetas para agregarse a la mayoría de los inductores. En la tromboastenia de Glanzmann la agregación primaria no ocurre.

Las plaquetas tromboasténicas no se agregan a ninguna concentración de ADP, sucediendo lo mismo con la estimulación de la adrenalina, trombina o colágeno (5, 6, - 32). A pesar de su incapacidad de agregación para tales agentes, las plaquetas sufren muchas de las alteraciones que se observan en las plaquetas normales tras la adición de los inductores (como cambio de forma y liberación del contenido granular). Las plaquetas tromboasténicas sí se aglutinan en respuesta al ristocetín y se adhieren normalmente al colágeno o al subendotelio (32). En ocasiones se ha encontrado una disminución del factor plaquetario 3. Son características del trastorno el tiempo de sangrado prolongado, la cuantificación plaquetaria y porcentajes de factores plasmáticos son normales; las plaquetas no se retienen normalmente a la columna de perlas de cristal, debiéndose tal vez a la ausente agregación dentro

de la propia columna.

Estas plaquetas se agregan al estímulo de la ristocetina y del factor VIII bovino en contraste con la agregación alterada de los enfermos con el síndrome de Bernard Soulier. La alteración de la agregación por el ADP (o sustancias que agregan las plaquetas por liberación del ADP) constituye el defecto funcional principal, que explica quizá el tiempo de hemorragia prolongado. La naturaleza de este mal aún está muy obscura; se piensa que se deba a una anomalía en una o más de las proteínas asociadas a la membrana plaquetaria. Dado que una cierta cantidad de fibrinógeno asociado a las plaquetas es necesaria para la agregación inducida por el ADP normal, la cantidad del fibrinógeno disminuida en las plaquetas tromboasténicas que se ha encontrado en varias investigaciones, podría ser el origen de tal efecto. La tromboastenia es uno de los trastornos más raros, solamente se publicaron 100 casos hasta 1961 y en el transcurso de 8 años posteriores se publicaron 30 casos más. Actualmente, las transfusiones plaquetarias son la única terapéutica disponible.

- Anomalías de liberación o de segunda onda (trombopatía y trombocitopatía) :

La característica identificante de esta anomalía es la incapacidad de las plaquetas de liberar nucleótidos endógenos en respuesta a los diferentes agentes agregantes, por lo que se observa una respuesta primaria al ADP y a la Adrenalina, pero no va a existir la segunda onda de agregación (5, 24). Esta clase de trastorno se descubrió en enfermos cuyas plaquetas eran normalmente agregadas por el ADP en la primera onda únicamente y además no agregaban al colágeno. La alteración de la agregación inducida por el colágeno se atribuye a un defecto de la liberación de ADP. Como consecuencia de tal incapacidad, la segunda onda de agregación inducida por el ADP y adrenalina también estaba alterada. De este modo, como el colágeno

sólo produce una segunda onda de agregación y ésta viene a consecuencia de la liberación del ADP intraplaquetario, lógicamente se obtendrá una ausencia de esa segunda onda.

En esta anomalía no va a existir, respuesta de agregación al colágeno (defecto de tipo aspirina). Se ha encontrado también que se acompaña de una disminución del factor plaquetario 3, tiempo de sangrado prolongado y adhesividad anormal a la columna de perlas de vidrio.

- Enfermedad de almacenamiento en el fondo común:

Una liberación disminuida de ADP intraplaquetario es característica de esta clase de anomalía. Dos tipos generales de defectos podrían explicar esa conducta plaquetaria: En un tipo, las plaquetas son deficientes en el depósito especial de ADP que se almacena ordinariamente en los gránulos densos, y que tras la liberación de su contenido se ocasionaría la segunda onda agregante; (este defecto también se le conoce como enfermedad del comportamiento de depósito). En el segundo tipo, el contenido de ADP de las plaquetas es normal, pero el mecanismo de su liberación parece ser anormal.

Como se ha visto, el comportamiento de depósito es liberado en la reacción de liberación y es responsable de la segunda onda de agregación plaquetaria. La anomalía puede deberse a defectos en el almacenamiento de los nucleótidos o en la síntesis de éstos, y no existe por tanto la segunda onda agregante (5, 9, 11, 33).

La anomalía denominada Síndrome Aspirina, se caracteriza también por un defecto de liberación de los gránulos de ADP, no obstante que las plaquetas tienen presentes cantidades normales de este nucleótido. Tales pacientes tienen en mal estado el factor plaquetario 3 y disminuida la retención plaquetaria, características que marcan la diferencia entre los pacientes que ingieren aspirina. La característica principal -

pal que presentan las dos anormalidades se debe a la falta de respuesta de liberación de ADP para la segunda onda en respuesta a la adrenalina.

La enfermedad de almacenamiento, se caracteriza por la escasa cantidad de gránulos densos, lo que explica también el pobre estímulo que tendrían las plaquetas para su agregación irreversible manifestada en la segunda onda, ya que en tales gránulos se deposita el ADP plaquetario.

Existen otras anormalidades con el mismo defecto de liberación, como son: el síndrome de Wiscott-Aldrich (anomalía inmunológica), el síndrome de Hemansky-Pudlach (Albinismo óculo-cutáneo), el síndrome de Chediak-Higashi. Tales disfunciones fueron mencionadas por Weiss en 1980 (3).

En todos estos defectos se encuentra un tipo de sangrado moderadamente prolongado, disminución de la retención plaquetaria en perlas de vidrio, recuento plaquetario normal o ligeramente reducido sin anormalidades morfológicas plaquetarias en el frotis. La agregación con el colágeno está alterada y la respuesta primaria al ADP es normal pero no se puede producir una segunda onda con concentraciones de ADP que ordinariamente producen las 2 ondas de agregación en sujetos normales. Fuera de las transfusiones plaquetarias, cuando éstas son clínicamente indicadas no existe ninguna otra terapéutica (33).

- Anomalías en la primera y la segunda onda de agregación :

En esta clasificación destaca la enfermedad de Von Willebrand. Esta se debe a un defecto en un factor plasmático que conlleva un tiempo prolongado de sangrado. Tal carencia está asociada a una fracción del factor VIII (5, 16, 34, 35). Es el segundo desorden de coagulación hereditario después de la hemofilia A. Afecta a los dos sexos, predominando en mujeres (34) y es transmitido como rasgo autosómico dominante.

La anormalidad de este factor es mucho más compleja que la hemofilia, ya que se han encontrado subdivisiones de este desorden. El factor de Von Willebrand se encuentra localizado en la fracción antigénica de la globulina antihemofílica (factor VIII) y es necesario para la unión de las plaquetas a la pared intravascular (13). La mayoría de las veces la actividad procoagulante de esta fracción es baja al igual que la antigénica. Las plaquetas de estos pacientes no se agregan al estimular con ristocetina, no obstante, puede ser corregido con plasma normal al igual que la retención a las perlas de vidrio, porque el plasma normal contiene la fracción de Von Willebrand.

En los episodios de sangrado, los pacientes pueden ser tratados mediante transfusiones de plasma, tanto de personas normales como de los hemofílicos, lo que demuestra que el factor necesario para la adhesión de las plaquetas no está relacionado con la actividad procoagulante del factor VIII y sí con la fracción antigénica (17, 18, 33).

En el agregómetro, típicamente se muestra una falta de respuesta a la ristocetina. Algunos investigadores han establecido que tal carencia de aglutinación mientras no sea diagnosticada, puede ser utilizada como prueba clínica para facilitar el diagnóstico.

- Síndrome de Bernard-Soulier :

Trastorno hemorrágico familiar caracterizado por la presencia de plaquetas mayores que su tamaño normal y con una apretada condensación de los gránulos. El síndrome de las plaquetas gigantes de Bernard-Soulier es escasamente común, cuyos efectos hemostáticos no han sido explicados satisfactoriamente. La característica fundamental de las plaquetas con tal anormalidad es la carencia de las glicoproteínas uno b y uno s (y no por un mal funcionamiento de estas) en su membrana. Se les encuentra además un tiempo de sangrado notablemente prolongado, recuento plaquetario variable (normal o trombocitopénico), más del 80% de las plaquetas tienen más de 2.5 micras de diámetro, encontrándose a veces algunas hasta de 15 micras; la agrupación de los

AGREGACIONES PLAQUETARIAS COMPARATIVAS EN DISTINTOS PACIENTES Y AGENTES AGREGANTES

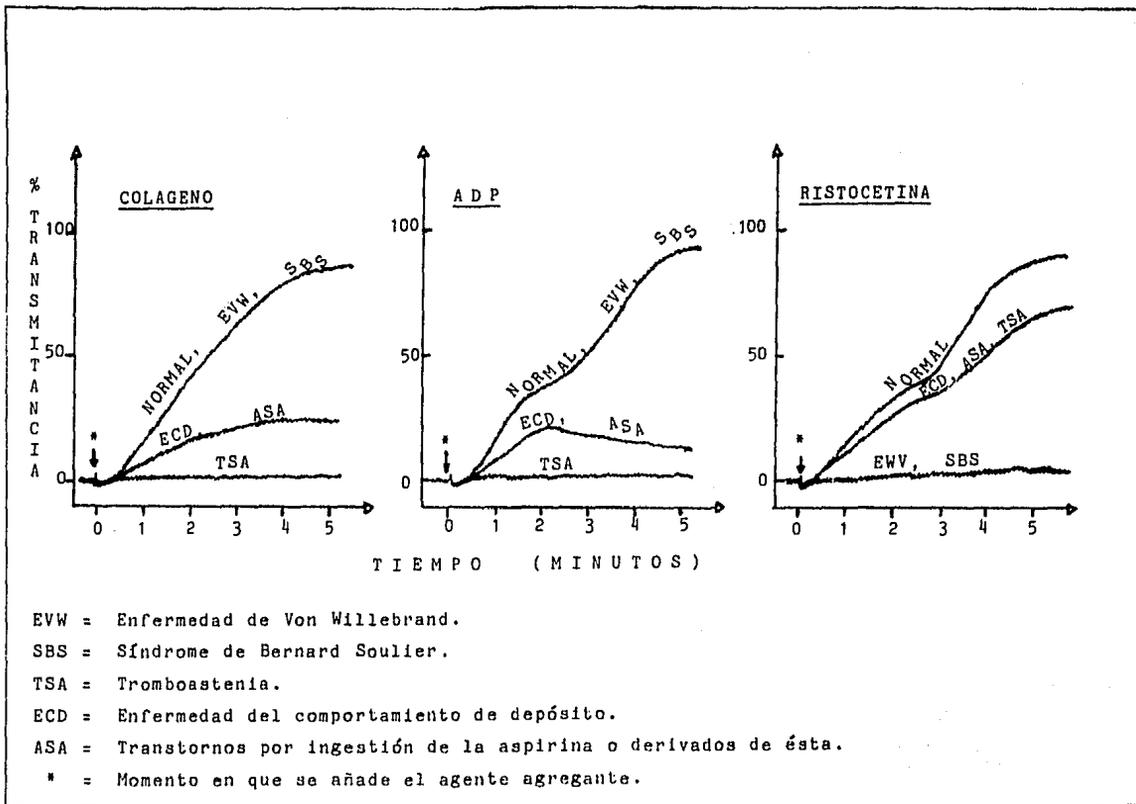


Ilustración Nº 13

gránulos en el centro de la célula confiere a menudo el aspecto de un pseudonúcleo. En esta anomalía que se transmite de manera autosómica recesiva, existe una alteración del consumo de protrombina y la ausencia de la agregación cuando esta es inducida por ristocetina (no obstante, contrariamente al síndrome de Von Willebrand, este defecto no puede ser corregido con la adición de plasma o de factor VIII (33). Se sugiere que el defecto viene a explicarse por una falta en el mecanismo de las plaquetas, mientras que la disminución del consumo de protrombina tal vez se deba a la defectuosa fijación del factor VIII. Los niveles en todos los factores de coagulación y los componentes del factor VIII son normales. Las plaquetas se agregan in vitro con colágeno, adrenalina y el ADP, pero incapaces al estímulo de la ristocetina. Es importante señalar que no todos los trastornos hemorrágicos congénitos con plaquetas gigantes tienen un tiempo de vida corto ya que son muy fácilmente activables y por consiguiente son destruidas fácilmente en este síndrome.

- Desórdenes asociados con trombocitopenia ;

Se han revisado varios casos de estos pacientes en los que la respuesta de agregación está disminuida; entre ellas está la anomalía de May Hegglin, en la que la agregación inducida por el ADP es normal pero el estímulo del colágeno produce una agregación deficiente.

B) TRASTORNOS ADQUIRIDOS DE AGREGACION

Los problemas relativamente menores de la hemostasia ordinariamente se asocian con deficiencias adquiridas de la función plaquetaria. No obstante, muchas veces el trastorno involucrado a una disminución de la agregación no se asocia claramente a una enfermedad dada: otras, que están asociadas a medicamentos o a agentes ambientales pueden ser de corta duración. La lista de drogas que afectan la agregación plaquetaria están aumentando cada vez más, a la par del mismo interés que esto entraña.

ya que de ello depende en gran parte encontrar la más adecuada medicación para el control de las enfermedades vasculares.

Se ha intentado dividir los trastornos adquiridos en los que son inducidos por drogas y los que no lo son. En general, la disminución de la respuesta agregante que no es causada por medicamentos proviene de pacientes con anomalías de liberación avanzadas (trastorno de Wilson, uremia, deficiencias de vitamina B₁₂, septicemia bacterial y anticuerpos circulantes. Las actividades fisiológicas tienen también su importancia ya que hay estadios, como la ovulación en el ciclo menstrual, en los que la sensibilidad agregante plaquetaria se ve disminuida; lo mismo se ha visto después de una cirugía, porque las plaquetas entran a un período refractario corto. En seguida viene una lista de anomalías plaquetarias de carácter adquirido, en donde el agregómetro puede descubrir directamente si la función plaquetaria cualitativa es normal o ésta contrae una anomalía. De todos modos, la técnica demuestra cierta ayuda para el diagnóstico diferencial y pronóstico de la enfermedad de estudio.

- Enfermedades mieloproliferativas ;

Algunos pacientes que muestran función plaquetaria anormal, además de trombosis y trombocitopenia, se observó que en las enfermedades mieloproliferativas éstos tienen mucho peligro de complicaciones tromboembólicas. El grupo en estudio puede mostrar anomalías de agregación en respuesta a la adrenalina, ausencia de agregación en la primera onda en casos de policitemia primaria. La respuesta de agregación con ADP y colágeno tiende a ser normal pero algunos casos demostraban que el tiempo de latencia en el colágeno era más prolongado que el normal, sugiriendo una adhesión insuficiente de las plaquetas mieloproliferativas en las fibras de colágeno.

- Leucemias agudas y preleucemias :

Se ha encontrado una agregación anormal en pacientes en los cuales hubo ausencia de la segunda onda ocasionada por la expulsión del ADP utilizando adrenalina y ADP. Se observó también un retraso prolongado en la agregación inducida por el colágeno.

- Púrpura trombocitopénica inmune :

Los hallazgos de la función cualitativa de las plaquetas en la púrpura trombocitopénica inmune crónica e intermitente han mostrado anomalías de agregación a algunos inductores. Los pacientes con púrpura trombocitopénica inmune crónica tienen una respuesta anormal ante la inducción de adrenalina y ADP pero se manifiestan normalmente ante el estímulo del colágeno. Por otro lado, los pacientes con púrpura trombocitopénica inmune intermitente presentan respuesta de agregación normal.

- Hemorrágicas postquirúrgicas :

O'Brien ha comprobado que los pacientes con postquirúrgicas tienen disminuida la respuesta de agregación al ADP y al colágeno; relacionando estos efectos inhibidores con los anestésicos empleados.

- Disfunción plaquetaria en situaciones de alarma :

Los estudios con un gran número de sujetos en situaciones de alarma mostraron que existía una marcada disminución en la segunda onda de agregación en respuesta a la adrenalina y que generalmente ésta se normalizaba a los 7 días. Se insiste en lo anterior, con la necesidad de considerar el estado emocional de los pacientes durante la venipuntura cuando se va a valorar la agregación plaquetaria.

CAPITULO IVUTILIDAD CLINICA DE LA AGREGACION PLAQUETARIA

- OBJETIVOS:

- Reunir un número significativo de sujetos normales que permitan, con el estudio de la agregación plaquetaria y los agentes más comunmente utilizados, el establecimiento de índices o rangos normales de agregación.

- Estudiar el mayor número de enfermedades posibles que sean producto de diferentes anomalías de la función plaquetaria, para poder caracterizar mediante el estudio de agregación a tales enfermedades.

- Caracterizar las alteraciones plaquetarias a partir de un trazo identificador de comportamiento típico en las diferencias que existen en los trazos normales y anormales.

- Encontrar los límites de las concentraciones óptimas de agentes agregantes que coincidan con una mayor eficacia, y que permitan así evaluar con el menor número de determinaciones los defectos característicos de una enfermedad dada, evitando el innecesario gasto de reactivos.

Con todo lo anterior, incrementar la eficacia del estudio y con ello abatir los costos.

M E T O D O

La base de este método es una técnica fotométrica con agitación continua (10).

OBTENCION DE LA MUESTRA :

Todas las muestras de sangre serán extraídas de venas cubitales en las primeras horas de la mañana después de por lo menos 8 horas de ayuno y 30 minutos de reposo, utilizándose para tal efecto agujas del número 20 y jeringas siliconizadas. Para prevenir posibles contaminaciones con tromboplastina tisular, se evitan al máximo las presiones extremas de torniquete y las punciones traumáticas, descartándose severamente las sangres provenientes de venipunturas imperfectas.

La sangre que se obtiene de esta manera es luego transferida a tubos siliconizados con anticoagulante de citrato trisódico al 3.8% en proporción de 9:1. (Para evitar la activación de la coagulación por contacto, la sangre será manipulada exclusivamente en material de vidrio previamente sometido a la acción de silicones bajo el siguiente procedimiento: El material de vidrio se lava primero, se sumerge en la solución de silicones rápidamente, dejándole escurrir y finalmente secar). Se tapan los tubos con papel parafilm y se mezclan suavemente por inversión. Se centrifuga luego la sangre no coagulada a temperatura ambiente durante 10 minutos a una velocidad de 1800 r.p.m.. Ya que el proceso de agregación se basa en los cambios que experimenta la transmisión de la luz, es importante saber que ésta se relaciona con el número de plaquetas presentes en el sistema, por lo que la magnitud de centrifugación se ha de considerar para que los plasmas ricos en plaquetas (PRP) puedan ser ajustados a un número uniforme de 250 000 plaq./ml.

Posteriormente, el PRP se transfiere a tubos limpios siliconizados por medios de pipetas Pasteur. Se centrifuga una porción de este plasma a 3 000 r.p.m. a 4°C para obtener así el plasma pobre en plaquetas (PPP), el que se transfiere luego de centrifugado a otro tubo limpio siliconizado.

Por otro lado, para hacer el ajuste del plasma a una concentración de 250 000 plaq./ml es necesario hacer la cuenta de éstas en la cámara de Neubauer de la manera ordinaria a partir del plasma rico en plaquetas inicial, tomando como diluyente oxalato de amonio al 1%, de ésta manera ajustar el plasma a la concentración deseada con diluciones apropiadas utilizando PPP autólogo.

Se debe tomar en consideración además, que las plaquetas requieran conservar su metabolismo activo para responder a los estímulos de los agentes agregantes, por lo que es necesario haber terminado la prueba dentro de las 3 horas subsiguientes a la toma de sangre.

P R O C E D I M I E N T O

Se enciende el aparato por lo menos 30 minutos antes de iniciar la prueba ajustando a una temperatura de 37°C y a una velocidad de agitación de 1.100 r.p.m. con sus controles respectivos. Se coloca la plumilla del registrador en posición cero.

En una celdilla de vidrio se colocan 0.9 ml de PRP y se le adiciona una barrita magnética, se toma la celdilla y se coloca en el lugar correspondiente dentro del agregómetro para que adquiera la temperatura de 37°C (se incuba 5 min. 30 seg.); inmediatamente después, se transporta nuevamente tomándola del extremo superior hasta el otro orificio donde precisamente se ejecutará la agregometría, para ajustar a un 0% de transmitancia designándole la división # 1 del papel gráfico sin correr el registrador.

En otra celdilla se coloca 1 ml de PPP autólogo con otra barrita magnética y se le permite adquirir la temperatura de 37°C nuevamente y se transporta luego al portaceldas para ajustar al 100% de transmitancia con su control respectivo, y designán-

dole la división # 9 del papel gráfico.

El aparato estará listo para la prueba una vez que haya sido calibrado, es decir, que con el PRP la plumilla se desplace a la división # 9 por sí sola. De esta manera, cada unidad que se desplace la plumilla en la prueba, representará 1.25% de transmitancia.

A continuación, en una nueva celdilla, se vierten 0.9 ml. de PRP agregándole nuevamente un agitador magnético y haciendo que adquiera la temperatura mencionada. Se coloca en la portaceldilla. Se pone en marcha el papel gráfico, bajando además la plumilla del registrador y en la marca que el papel indique tiempo cero se le adiciona con una pipeta de 0.2 ml. terminal, la cantidad de 0.1 ml de agente agregante a la concentración que se requiera, procurando pipetear fuertemente sobre el nivel del plasma para que el contenido de la substancia llegue al centro o hasta el fondo de la celdilla y así provocar una rápida homogenización de todo el contenido, pero teniendo cuidado de no formar burbujas.

Se deja correr el papel del registrador 5 min. 30 seg. para que se obtenga un trazo completo y característico de cada agente agregante.

Se recomienda efectuar las pruebas en orden de un mismo agente agregante para el plasma problema, empezando con la dilución de la mínima a la máxima y luego trabajar con otro agente agregante diferente. Así mismo, es importante no confundir la concentración a la que el agregómetro ha de registrar el curso de la reacción, ya que ésta se establece una vez que ha sido añadido el agente de inducción de la agregación, y por lo tanto, el cálculo final debe corresponder a la concentración que exista después de la adición del inductor.

El trazo de la agregación sobre el papel se manifiesta en una única onda de caracte

rísticas reversibles o irreversibles, o en dos ondas sucesivas, trazados sobre el _
papel a una velocidad de una pulg. por minuto. A medida que la agregación vaya _
avanzando, la turbidez del plasma lógicamente irá disminuyendo, lo cual se comprue_
ba a simple vista después de terminada la prueba.

La interpretación será siempre cualitativa y cuantitativa y estará en función de _
los trazos de agregación proporcionados por los controles normales. Las curvas ob_
tenidas en los trazos podrán ser cuantificadas midiendo la pendiente de la curva en
relación con el tiempo en que ocurrió la máxima agregación, o por el porcentaje de_
variación de transmitancia del PRP que se marca en el papel registrador.

R E S U L T A D O S

Los estudios de agregación plaquetaria se realizaron en:

- 97 Donadores profesionales de sangre (clínicamente sanos).
- 31 Donadores voluntarios (clínicamente sanos).
- 44 Pacientes con algún padecimiento hemorrágico.

A la mayoría se les practicó pruebas completas con los diferentes agentes agregantes, mientras que en los otros casos únicamente con algunos de estos inductores. Los resultados se obtuvieron en porcentaje de máxima agregación (en cada una de las fases) y el tiempo en que ocurría dicho máximo, lo cual era demostrado en la curva gráfica. Con tales valores se calculó la desviación estandar (D.S.) para estas dos variables, y que son las cifras que se expresan adjuntas a cada gráfica en la misma figura, lo cual facilita la comparación de los distintos ensayos experimentales que representaron finalmente la pauta para la estimación de normalidad o anormalidad de dichos rangos de valores. Sin embargo tal y como se ha encontrado en la revisión de la literatura, el grado de agregación explicado mediante números no es convincente en todos los casos, ya que los resultados muestran variedad de los mismos que debe considerarse.

La Figura Nº 1 (véase adelante) muestra el curso de la agregación plaquetaria con los diferentes agentes de inducción, realizados en los 97 donadores profesionales, ésta puede considerarse como el comportamiento típico de plaquetas en personas sanas.

En las Figuras 2, 3, 4 y 5 se observa el comportamiento de agregación plaquetaria antes y después de la administración de 1 gramo de ac. acetil salicílico. Cabe señalar que se realizó el estudio considerando el sexo.

En las Figuras 6, 7, 8, 9 y 10 se describe el comportamiento plaquetario para los distintos padecimientos considerados en este estudio; ésto fué evaluado comparativamente con la descripción de un testigo normal en cada caso (véase además Tabla Nº 1).

Quiero hacer notar que en algunas enfermedades, respondiendo quizá a la poca incidencia de hallazgo, sólo se efectuaron escasos ensayos y que la falta de una mayor ca - suística, es decir, un mayor número de pacientes, hace más difícil la tarea de caracte - rizarlos dentro de una estimación confiable. En los 5 años considerados en el estu - dio, sólo referí atención a los desórdenes trombocitopáticos que hacían posible la ta - rea de manejarlos estadísticamente, con tendencias a encontrar valores representati - vos.

Los resultados de agregación en los desórdenes considerados en el presente trabajo re - sultaron ser similares a investigaciones anteriores, apoyando con ésto la veracidad - hallazgos de ausencia de respuesta o una disminución de la agregación en personas nor - males de control, también se ha manejado como un dato inexplicable en varias situacio - nes experimentales anteriores, por lo que conviene ser cautos en la interpretación de los datos, sobre todo en la agregación producida por la adrenalina.

Para una mejor comprensión de todo lo anteriormente descrito, en las Tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se describe la agregación por agente inductor, tanto para testigos como para pacientes estudiados.

Dentro de los objetivos se especifica la necesidad de estandarizar el método de agre - gación con respecto a las concentraciones de agentes inductores más eficaces, para - que al mismo tiempo se evite el gasto innecesario de reactivos y se abatan costos. - Del mismo modo, en el presente trabajo se ensayaron diferentes concentraciones de - agentes de inducción agregante, encontrándose como óptimas las que se señalan en la - página 71 (véase además Figuras 11, 12 y 13).

CARACTERISTICAS DE LOS TRAZOS DE AGREGACION PARA CADA
CONCENTRACION REFERIDA COMO OPTIMA EN PERSONAS NORMALES
(VEASE TABLA Nº 1 Y GRAFICA Nº 1)

TROMBINA (0,4 Unidades/ml):

Ondas bifásicas. Presentando siempre la primera onda completamente reversible, y una segunda onda manifestada violentamente por su trazo inclinado casi vertical en poco tiempo.

ADRENALINA (25,0 micromolas/ml):

Curva inmediata a la adición del agente agregante de tipo bifásica. Algunas veces también fusionada.

ADP (2.5 micromolas/ml):

Curva inmediata a la adición del agente agregante presentando pendiente mas alta que la que corresponde a la de la adrenalina en su primera onda. Según la concentración que se utilice puede obtenerse una segunda onda de agregación. Para esta concentración utilizada pocas veces se desarrolló segunda onda.

COLAGENO (10 micromolas/ml):

Traza de una única onda de agregación irreversible (correspondiente a la segunda fase). Presentando además un período de latencia de duración variable.

RISTOCETINA (1800 micromolas/ml):

Traza en donde se superponen ambas ondas (fusionadas), mostrando un solo trazo irreversible. Presenta escasa agregación en un principio y después se pronuncia rápidamente.

FIBRINOGENO BOVINO (0.6 miligramos/ml):

En personas normales produce invariablemente una agregación completa en un trazo de ondas fusionadas, siendo un consiguiente posible únicamente medir la magnitud de la segunda fase de respuesta de agregación.

A continuación se presentan tablas de las agregaciones encontradas con los distintos agentes de estimulación, tanto para el personal normal sano así como para pacientes con algún padecimiento establecido; pudiéndose establecer comparaciones. Posteriormente se ilustra de manera gráfica los distintos procesos de agregación encontrados. Al final se muestran ensayos para 3 agentes agregantes (Trombina, Adrenalina y ADP), en donde se pueden observar las concentraciones utilizadas y de donde nació el criterio para preferir la que optimiza la técnica de la agregometría plaquetaria.

DIFERENCIAS COMPARATIVAS DE AGREGACION PLAQUETARIA EN INDIVIDUOS
CLINICAMENTE SANOS Y PACIENTES CON DESORDENES HEMOSTATICOS

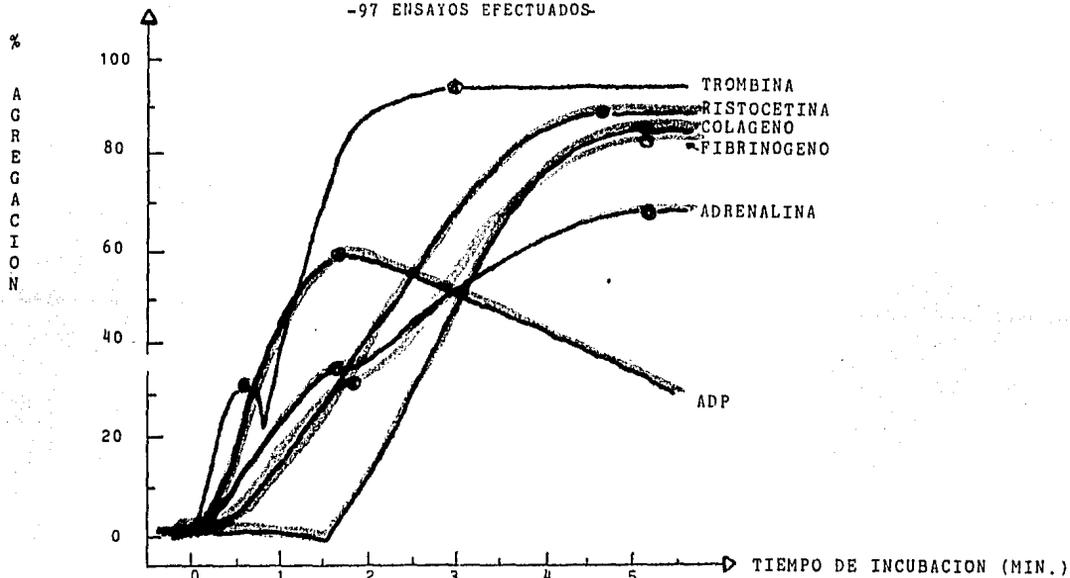
TABLA Nº 1

TROMBINA	ADRENALINA	A D P	COLAGENO	RISTOCETINA	FIBRINOGENO
(DONADORES PROFESIONALES NORMALES Y TESTIGOS NORMALES VOLUNTARIOS)					
(N) * 1ª Onda Normal 2ª Onda Normal	(N) * 1ª Onda Normal 2ª Onda Normal	(N) * 1ª Onda Normal 2ª Onda Ausente.	(N) * 1ª ----- 2ª Normal (pre senta clási co periodo- de latencia	(N) * 1ª Onda Fusionada 2ª Onda Normal	(N) * 1ª Onda Fusionada 2ª Onda Normal
(DONADORES VOLUNTARIOS POST-ASPIRINA)-					
(N) *	1ª Normal 2ª Ausente	1ª Normal 2ª Ausente	1ª ----- 2ª Normal o - disminuida	//////////	//////////
(TROMBOASTENIA DE GLANZMANN)					
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1ª Fusionada 2ª Disminuida	Ausente
(BERNARD SOULIER)					
(N) ó disminuida	(N) ó disminuida	1ª disminu- da 2ª Ausente	1ª ----- 2ª Normal o - disminuida	Ausente	Ausente
(VON-WILLEBRAND)					
(N) *	(N) *	1ª Normal 2ª Variable	(N) *	Disminuida ó Ausente	(N) *
(TROMBOSIS)					
(N) *	(N) *	1ª Normal 2ª Ausente	(N) *	//////////	//////////
(TROMBOCITOSIS)					
(N) *	1ª Disminuida 2ª Ausente	1ª Disminui- da 2ª Ausente	(N) *	//////////	//////////

* = Comportamiento plaquetario normal (N)
/// = Omisión de ensayos

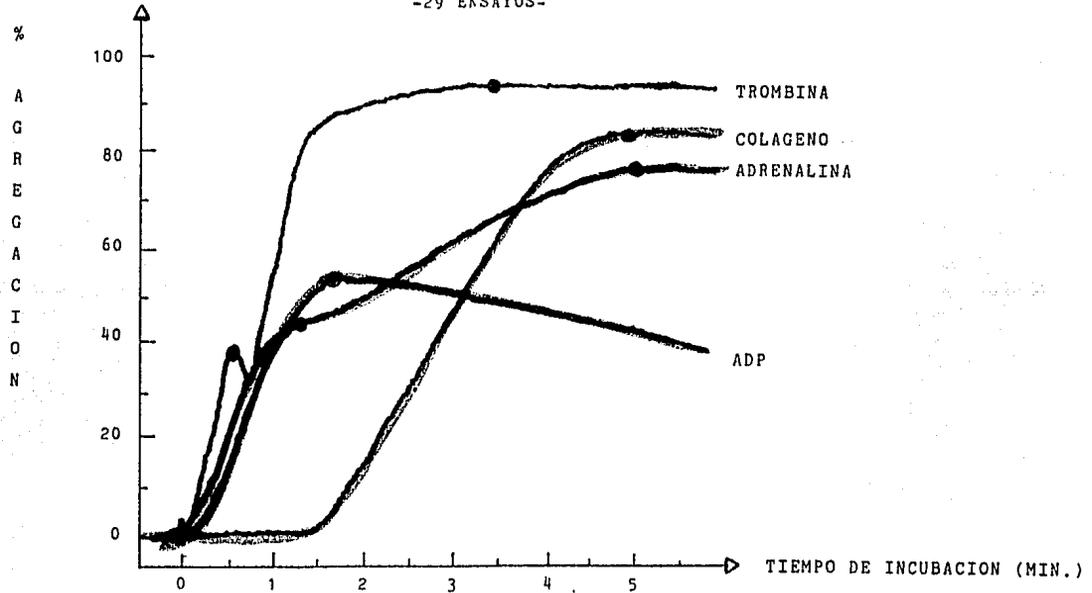
FIGURA No 1

DONADORES PROFESIONALES NORMALES
(AGREGACION TIPICA DE PLAQUETAS SANAS)
-97 ENSAYOS EFECTUADOS-



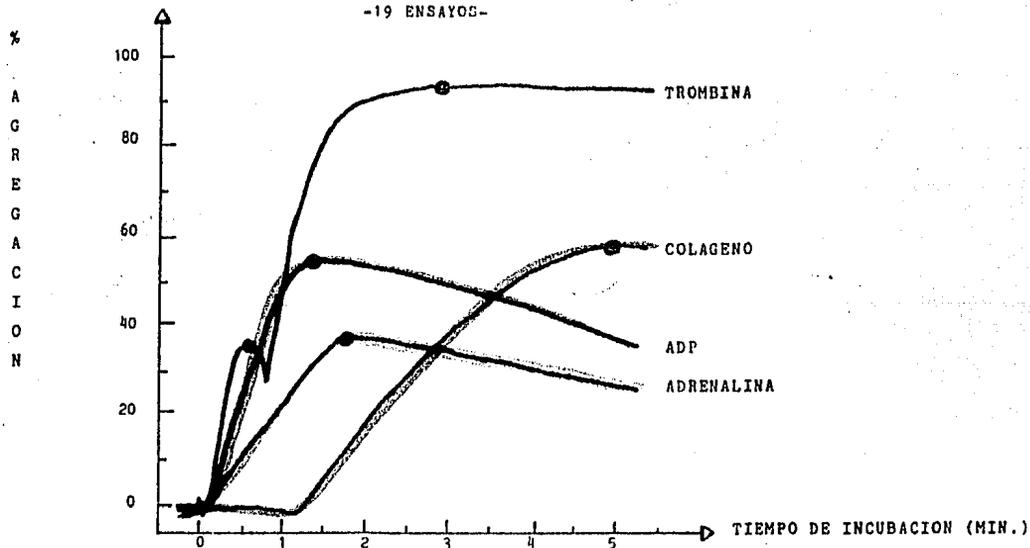
AGENTES AGREGANTES	1a ONDA			2a ONDA		
	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	% (D.S.)	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	% (D.S.)
TROMBINA	39.5	± 9.0	33.6 ± 7.1	179.4	± 0.6	97.5 ± 6.3
ADRENALINA	93.9	± 15.2	35.7 ± 5.6	307.2	± 24.0	66.6 ± 19.2
ADP	100.7	± 22.7	59.2 ± 8.6	NO HUBO	-----	-----
COLAGENO	FUSIONADA	-----	-----	308.4	± 14.4	85.6 ± 10.2
RISTOCETINA	FUSIONADA	-----	-----	279.0	± 33.6	90.8 ± 12.2
FIBRINOGENO	108.0	± 25.4	33.0 ± 4.2	308.4	± 16.2	85.0 ± 12.8

FIGURA Nº 2 TESTIGOS NORMALES VOLUNTARIOS
 ("HOMBRES" PRE-ASPIRINIFICADOS)
 -29 ENSAYOS-



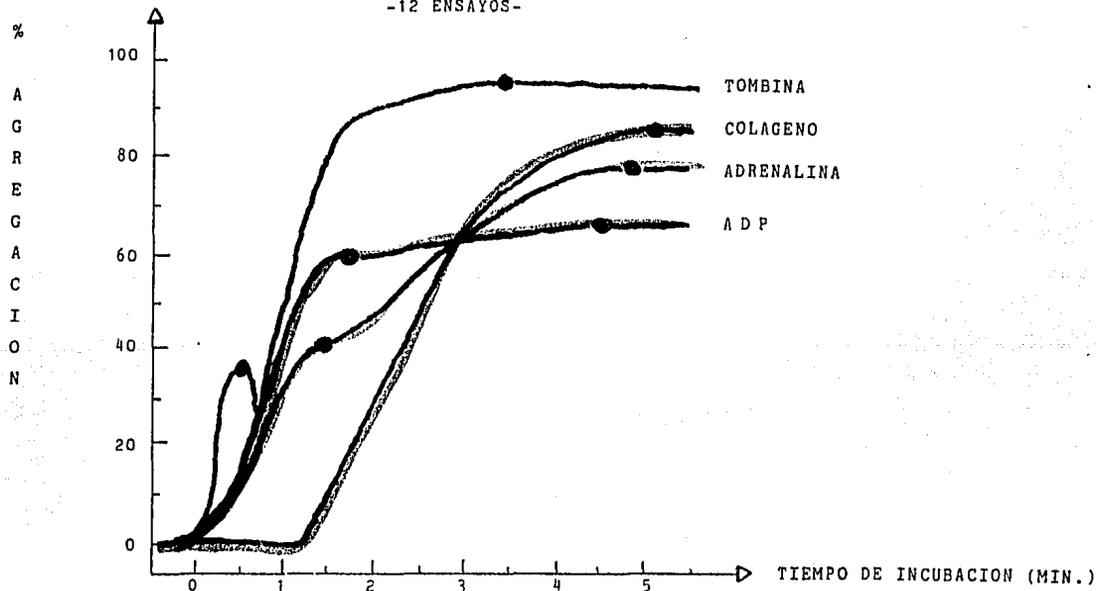
AGENTE AGREGANTE	(seg.)		%	(seg.)		%	(D.S.)
	TIEMPO	(D.S.)		TIEMPO	(D.S.)		
TROMBINA	38.5	± 7.4	38.1	± 8.4	217.2	± 1.0	95.4 ± 4.4
ADRENALINA	84.5	± 16.0	45.2	± 3.6	310.2	± 12.6	77.2 ± 14.5
ADP.	105.0	± 24.3	56.7	± 7.6	NO HUBO	-----	-----
COLAGENO	FUSIONADA -----			-----	302.4	± 22.4	86.2 ± 9.4

FIGURA Nº 3 TESTIGOS NORMALES VOLUNTARIOS
 ("HOMBRES" POST-ASPIRINIFICADOS)
 -19 ENSAYOS-



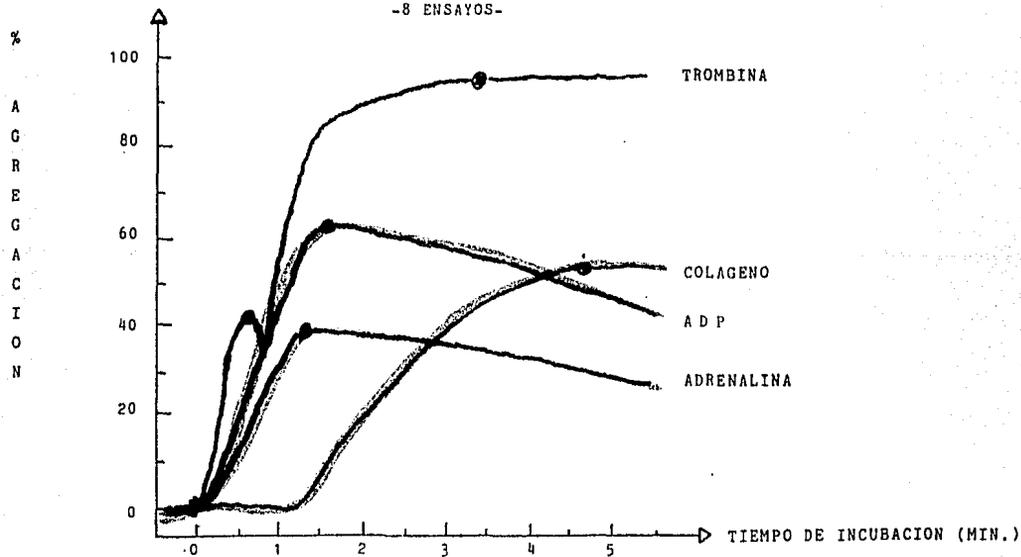
AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA			2ª ONDA		
	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	% (D.S.)	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	% (D.S.)
TROMBINA	37.0	± 7.7	34.7 ± 7.6	178.4	± 0.8	95.0 ± 7.7
ADRENALINA	110.7	± 38.5	38.0 ± 7.4	NO HUBO	-----	-----
ADP	84.0	± 19.4	56.4 ± 6.3	NO HUBO	-----	-----
COLAGENO	FUSIONADA -----			303.0	± 20.4	60.3 ± 14.4

FIGURA Nº 4 TESTIGOS NORMALES VOLUNTARIOS
 ("MUJERES" PRE-ASPIRINIFICADAS)
 -12 ENSAYOS-



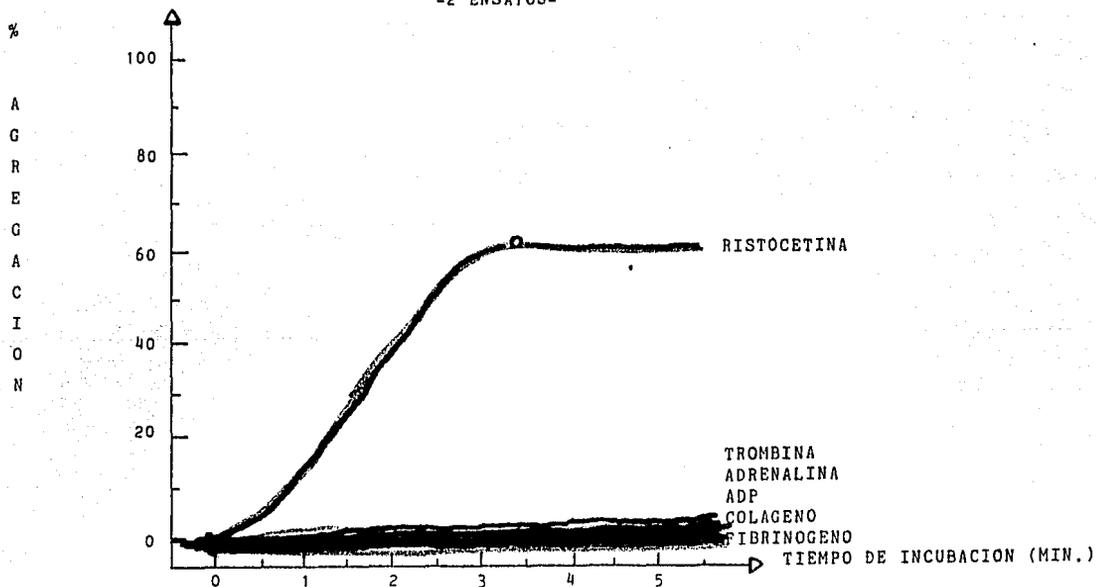
AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA				2ª ONDA			
	(seg.) TIEMPO (D.S.)	%	(D.S.)	(seg.) TIEMPO (D.S.)	%	(D.S.)	(D.S.)	
TROMBINA	34.2 ± 7.3	37.8	±11.4	195.0 ±52.2	95.9	± 5.8		
ADRENALINA	84.3 ±13.7	41.4	± 5.4	285.0 ±54.6	78.3	± 8.7		
ADP	99.0 ± 8.4	60.7	± 3.4	266.4 ±27.6	67.5	± 8.9		
COLLAGENO	FUSIONADA	-----		304.8 ±18.6	85.8	±11.3		

FIGURA Nº 5 TESTIGOS NORMALES VOLUNTARIOS
 ("MUJERES" POST-ASPIRINIFICADAS)
 - 8 ENSAYOS -



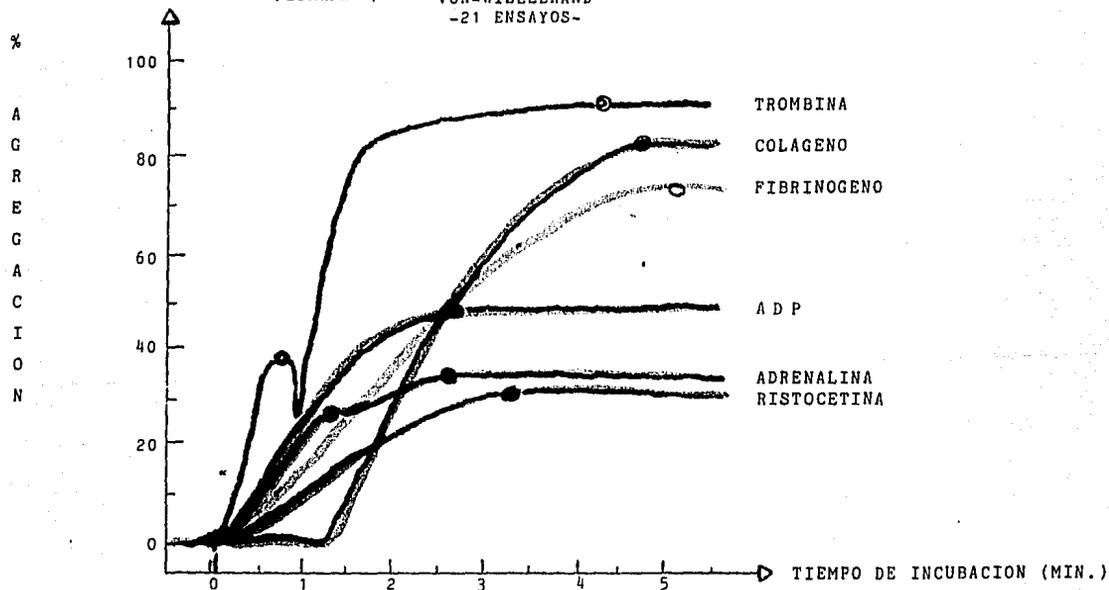
AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA		2ª ONDA	
	(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)	(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)
TROMBINA	37.5 ± 8.2	42.7 ± 8.6	204.0 ± 70.2	96.6 ± 5.5
ADRENALINA	78.7 ± 6.4	38.4 ± 4.4	NO HUBO -----	-----
ADP	93.4 ± 29.8	63.7 ± 7.9	NO HUBO -----	-----
COLAGENO	FUSIONADA -----	-----	280.2 ± 30.10	53.7 ± 10.1

FIGURA Nº 6 TROMBOASTENIA DE GLANZMANN
-2 ENSAYOS-



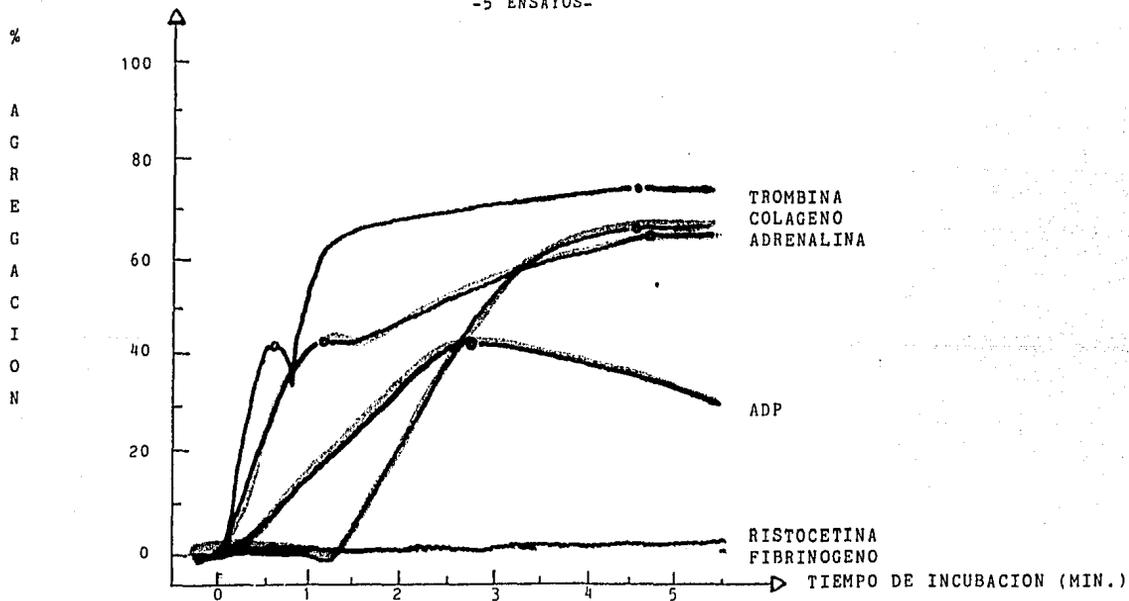
AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA			2ª ONDA		
	(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)		(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)	(D.S.)
TROMBINA	NO AGREGA	-----		NO AGREGA	-----	
ADRENALINA	NO AGREGA	-----		NO AGREGA	-----	
ADP	NO AGREGA	-----		NO AGREGA	-----	
COLAGENO	NO AGREGA	-----		NO AGREGA	-----	
RISTOCETINA	FUSIONADA	-----		292.2	±36.2	61.8
FIBRINOGENO	NO AGREGA	-----		NO AGREGA	-----	11.4

FIGURA Nº 7 VON-WILLEBRAND
-21 ENSAYOS-



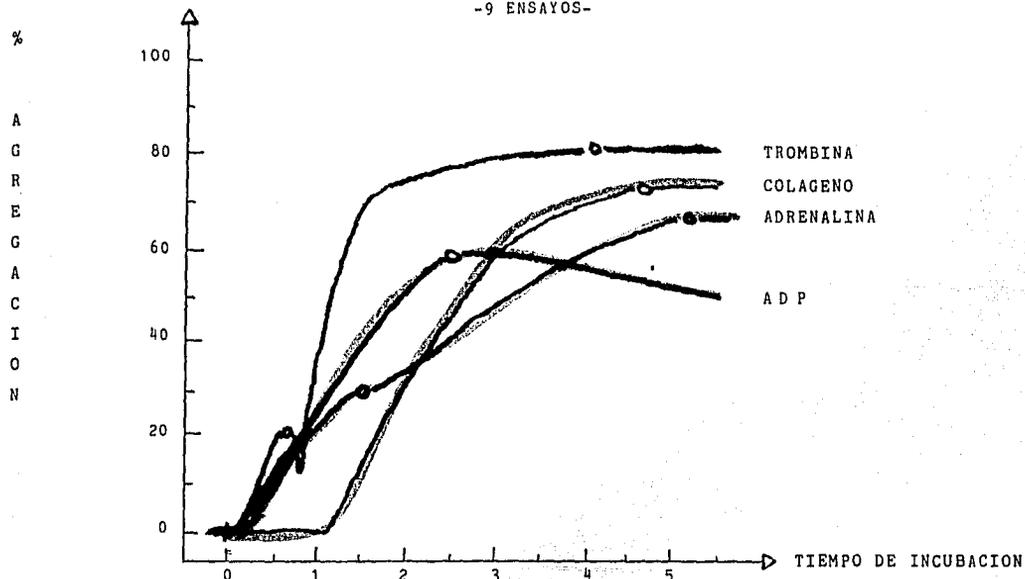
AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA			2ª ONDA		
	(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)		(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)	(D.S.)
TROMBINA	45.0 ± 0.0	38.2 ± 6.0		250.0 ± 70.8	92.5 ± 14.7	
ADRENALINA	82.5 ± 3.0	26.2 ± 3.0		159.0 ± 183.0	35.9 ± 41.5	
ADP	FUSIONADA -----			165.0 ± 190.5	49.6 ± 33.1	
COLAGENO	FUSIONADA -----			292.2 ± 29.4	84.0 ± 10.6	
RISTOCETINA	FUSIONADA -----			206.4 ± 140.6	30.9 ± 40.6	
FIBRINOGENO	FUSIONADA -----			316.2 ± 3.0	75.1 ± 10.5	

FIGURA Nº 8 BERNARD-SOULIER
-5 ENSAYOS-



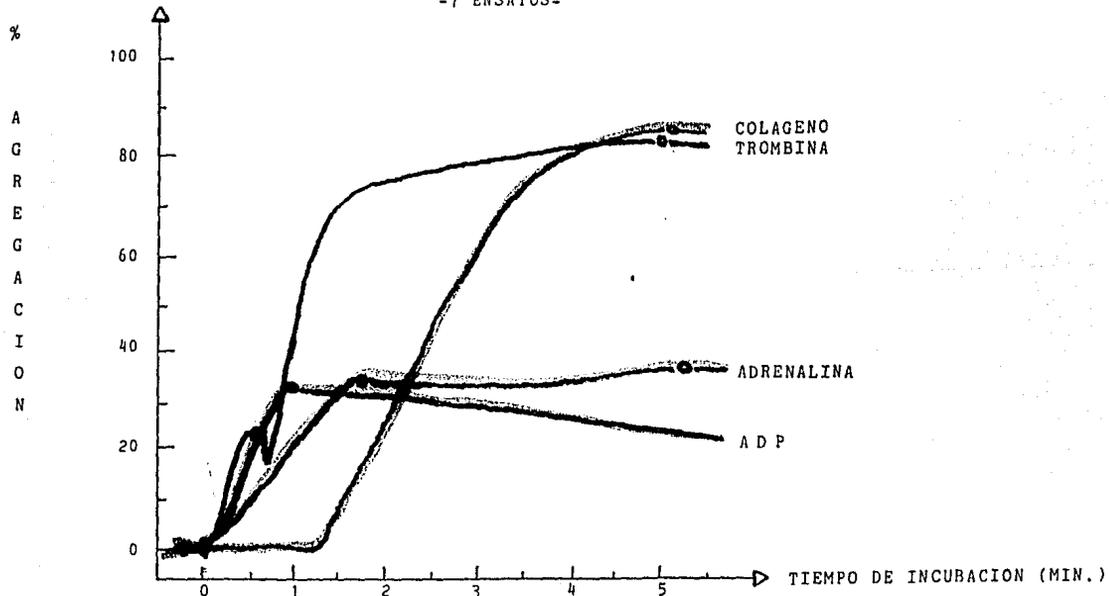
AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA				2ª ONDA			
	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	%	(D.S.)	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	%	(D.S.)
TROMBINA	50.0	± 8.6	43.3	±12.5	280.0	±49.2	75.6	±3.7
ADRENALINA	75.0	±21.7	43.0	± 2.5	288.6	±27.0	65.8	±7.2
ADP	168.0	±37.3	43.5	± 5.6	NO HUBO -----			
COLAGENO	FUSIONADA -----				273.0	±30.6	66.5	±7.0
RISTOCETINA	NO AGREGA -----				NO AGREGA -----			
FIERINOGENO	NO AGREGA -----				NO AGREGA -----			

FIGURA Nº 9 TROMBOSIS
-9 ENSAYOS-



AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA				2ª ONDA			
	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	%	(D.S.)	(seg.) TIEMPO	(D.S.)	%	(D.S.)
TROMBINA	39.0	± 8.2	22.2	± 5.5	245.0	± 47.1	82.9	± 12.3
ADRENALINA	92.5	± 14.7	31.8	± 7.1	314.4	± 7.8	68.5	± 18.6
ADP	95.0	± 22.5	60.6	± 18.5	NO HUBO	-----	-----	-----
COLAGENO	FUSIONADA -----				285.0	± 28.4	75.5	± 7.2

FIGURA Nº 10 TROMBOCITOSIS
-7 ENSAYOS-



AGENTE AGREGANTE	1ª ONDA			2ª ONDA		
	(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)		(seg.) TIEMPO (D.S.)	% (D.S.)	(D.S.)
TROMBINA	40.0 ± 8.6	24.5 ± 1.9		299.0 ± 28.8	83.5 ± 14.5	
ADRENALINA	105.0 ± 0.0	36.2 ± 6.1		318.0 ± 0.0	37.5 ± 1.2	
ADP	56.2 ± 7.5	34.3 ± 9.9		NO HUBO	-----	
COLAGENO	FUSIONADA	-----		310.8 ± 7.2	84.5 ± 3.9	

TABLA Nº 2 AGREGACION INDUCIDA CON ADRENALINA (25 microM/ml.)

Estudios realizados con plasmas de distintas características. Representándose en 2 ondas, en las que cada una tiene un tiempo de incubación (en segundos) y el porcentaje de agregación alcanzado. Además del promedio, se muestra la desviación estandar:

	1 a O N D A				2 a O N D A			
	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)
-Donadores profesionales normales	93.9	(±15.2)	35.7	(±5.6)	307.2	(± 24.0)	68.6	(19.2)
Testigos norm. voluntarios:								
- hombres (pre-aspirina)	84.5	(±16.0)	35.2	(±3.6)	310.2	(± 12.6)	77.2	(±14.5)
(post-aspirina)	110.7	(±38.5)	38.0	(±7.4)	NO HUBO	-----	-----	-----
- mujeres (pre-aspirina)	84.3	(±13.7)	41.4	(±5.4)	285	(± 54.6)	78.3	(± 8.7)
(post-aspirina)	78.7	(± 6.4)	38.4	(±4.4)	NO HUBO	-----	-----	-----
GLAZMANN	NO AGREGA	-----	-----	-----	NO AGREGA	-----	-----	-----
BERNARD-SOULIER	75.0	(±21.2)	43.0	(±2.5)	288.6	(±27.0)	65.8	(± 7.2)
VON-WILLEBRAND	82.5	(± 6.1)	26.2	(±3.0)	159.0	(±183.0)	35.9	(±41.5)
TROMBOSIS	92.5	(±14.7)	31.8	(±7.1)	134.4	(± 7.8)	68.5	(±18.6)
TROMBOCITOSIS	105	(0.0)	36.2	(±8.1)	138.0	(± 0.0)	37.5	(±1.24)

TABLA Nº 3

AGREGACION INDUCIDA CON ADP (2.5 microM/ml.)

	1 a O N D A				2 a O N D A			
	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)
-Donadores profesionales normales	100.7	(±22.7)	59.2	(± 8.6)	NO HUBO	-----	-----	-----
Testigos norm. voluntarios:								
- hombres (pre-aspirina)	105.0	(±24.3)	56.7	(± 7.6)	NO HUBO	-----	-----	-----
(post-aspirina)	84.0	(±10.4)	56.4	(± 6.3)	NO HUBO	-----	-----	-----
- mujeres (pre-aspirina)	99.0	(± 8.4)	60.7	(± 3.4)	266.4	(±27.6)	67.5	(± 8.9)
(post-aspirina)	93.4	(±29.8)	63.7	(± 7.9)	NO HUBO	-----	-----	-----
GLANZMANN	NO	AGREGA	-----	-----	NO	AGREGA	-----	-----
BERNARD-SOULIER	168.0	(±37.3)	43.5	(±5.6)	NO HUBO	-----	-----	-----
VON-WILLEBRAND	PUSIONADA				165	(±190.5)	49.6	(±33.1)
TROMBOSIS	95.0	(±22.5)	60.6	(±18.5)	NO HUBO	-----	-----	-----
TROMBOCITOSIS	56.2	(± 7.5)	34.3	(± 9.9)	NO HUBO	-----	-----	-----

TABLA Nº 4 AGREGACION INDUCIDA CON COLAGENO (10 microM/ml.)

	<u>1 a O N D A</u>				<u>2 a O N D A</u>			
	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)
-Donadores profesionales normales	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	308.4	(±14.4)	85.6	(±10.2)
Testigos norm. voluntarios:								
- hombres (pre-aspirina)	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	302.4	(±22.4)	86.2	(± 9.4)
(post-aspirina)	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	303.0	(±20.4)	60.3	(±14.4)
- mujeres (pre-aspirina)	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	304.8	(±18.6)	85.8	(±11.3)
(post-aspirina)	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	283.2	(±30.0)	53.7	(±10.1)
GLANZMANN	NO AGREGA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	NO AGREGA	- - - - -	- - - - -	- - - - -
BERNARD-SOULIER	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	273	(±30.6)	66.5	(± 7.0)
VON-WILLEBRAND	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	292.2	(±29.4)	84.0	(±10.6)
TROMBOSIS	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	285.0	(±28.4)	75.5	(± 7.2)
TROMBOCITOSIS	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	310.8	(± 7.2)	84.5	(± 3.9)

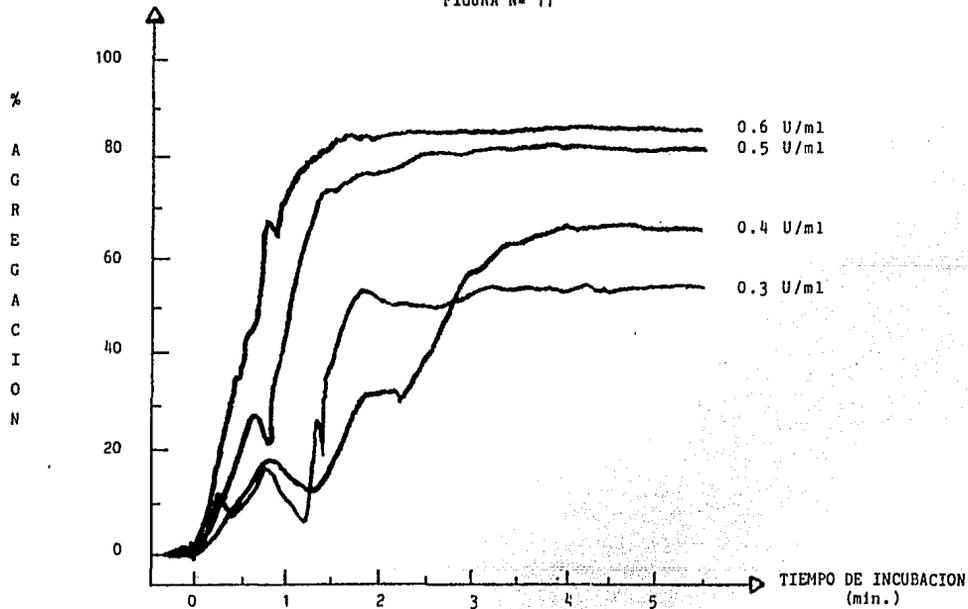
TABLA Nº 5 AGREGACION INDUCIDA CON RISTOCETINA (1800 microM/ml.)

	1ª O N D A				2ª O N D A			
	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)
-Donadores profesionales normales	FUSIONADA	-----			279.0	(±33.6)	90.8	(±12.2)
Testigos norm. voluntarios:								
- hombres (pre-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
(post-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
- mujeres (pre-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
(post-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
GLANZMANN	FUSIONADA	-----			292.2	(±36.0)	61,8	(±11.4)
BERNARD-SOULIER	NO AGREGA	-----			NO AGREGA	-----		
VOH-WILLEBRAND	FUSIONADA	-----			206.4	(±140.6)	30.9	(±40.6)
TROMBOSIS	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
TROMBOCITOSIS	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			

TABLA Nº 6 AGRAGACION INDUCIDA CON FIBRINOGENO BOBINO (0.6 mg/ml.)

	1 a O N D A				2 a O N D A			
	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)	TIEMPO (seg)	(DS)	%	(DS)
-Donadores profesionales normales	108.0	(25.4)	33.0	(\pm 4.2)	308.4	(\pm 16.2)	85	(\pm 12.8)
Testigos norm. voluntarios:								
- hombres (pre-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
(post-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
- mujeres (pre-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
(post-aspirina)	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
GLANZMANN	NO	AGREGA	- - - - -	- - - - -	NO	AGREGA	- - - - -	- - - - -
BERNARD-SOULIER	NO	AGREGA	- - - - -	- - - - -	NO	AGREGA	- - - - -	- - - - -
VON-WILLEBRAND	FUSIONADA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	316.2	(\pm 3.0)	75.1	(\pm 10.5)
TROMBOSIS	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
TROMBOCITOSIS	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX				XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			

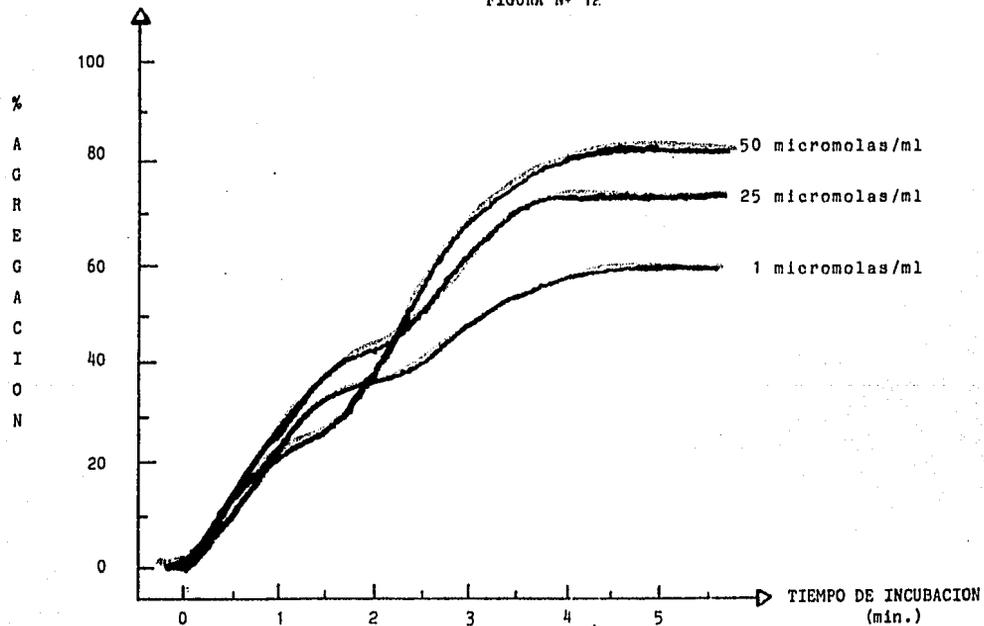
FIGURA Nº 11



AGREGACION INDUCIDA CON TROMBINA UTILIZANDO 4 CONCENTRACIONES DISTINTAS
SOBRE UN POOL DE PLASMAS DE DONADORES PROFESIONALES NORMALES

La concentración de 0.5 U/ml es la que optimiza la trayectoria de la curva de agregación en donde se distingue claramente la 1ª y 2ª fase.

FIGURA Nº 12

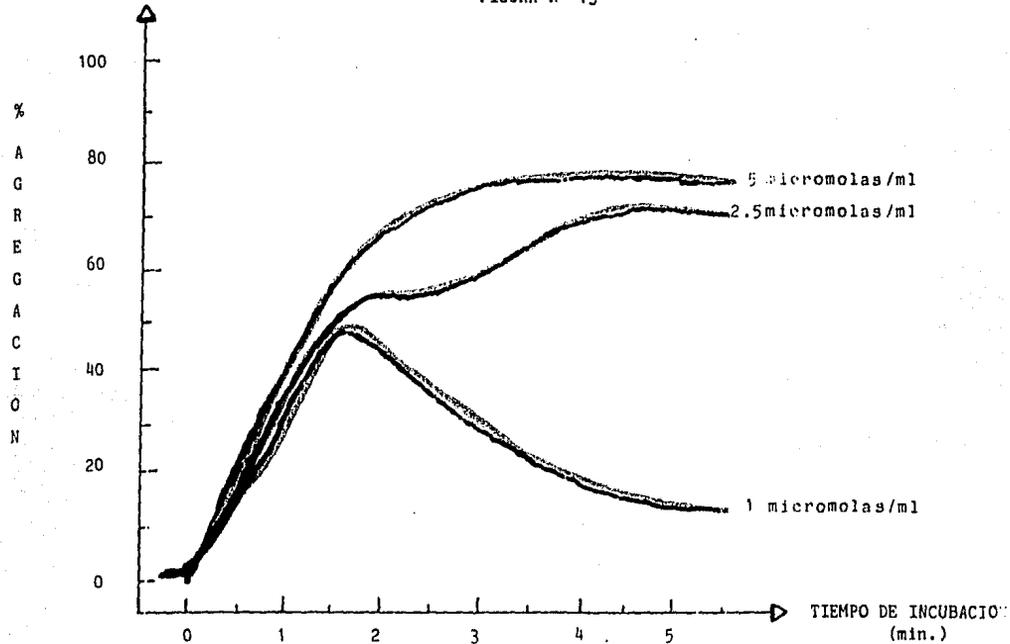


AGREGACION INDUCIDA CON ADRENALINA UTILIZANDO 3 CONCENTRACIONES DISTINTAS

SOBRE UN POOL DE PLASMAS DE DONADORES PROFESIONALES NORMALES

La concentración de 25 micromolas/ml es la que optimiza la trayectoria de la curva de agregación en donde se distingue claramente la 1ª y segunda fase.

FIGURA Nº 13



AGREGACION INDUCIDA CON ADP UTILIZANDO 3 CONCENTRACIONES DISTINTAS

SOBRE UN POOL DE PLASMAS DE DONADORES PROFESIONALES NORMALES

La concentración de 2.5 micromolas/ml es la que optimiza la trayectoria de la curva de agregación en donde se distingue claramente la 1ª y 2ª fase.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La manera de abordar el problema en un principio fué producto de aceptar primero los resultados que provenían de donadores profesionales y voluntarios y establecer a partir de ellos un rango de agregación normal, adjunto a un trazo característico correspondiente a la población mexicana sana. Esto, al mismo tiempo que se investigaba la dosis de agente agregante necesaria para provocar agregación normal prototipo. De esta manera, a partir de las concentraciones de inductores elegidas, se intentaba por ensayo y error el obtener una onda de agregación normal para cada una de ellas.

Una vez obtenidos los valores normales de población mexicana sana, la tarea siguiente fué la de utilizar los mismos para relacionarlos con pacientes que tenían algún padecimiento trombocitopénico que pudiera caracterizarse también mediante un rango de anormalidad. Se tuvo a disposición una amplia variedad de padecimientos, pero en la mayoría de éstos, se manifestó mucha variabilidad de resultados; en otros, la poca casuística también determinó el descartarlos del estudio global, ya que tales hallazgos se alejaban de los objetivos principales. Con todo esto, se pretendía establecer un trazo identificador, y sólo fué posible encontrarlo para algunos trastornos; finalmente lograron evaluarse: a la Tromboastenia de Glanzmann, Bernard Soulier, Von-Willebrand, Trombosis, Trombocitosis y se contó también con un grupo de voluntarios con el que se estudió el efecto de "tipo aspirina" tras la administración de 1 g. de ác. acetil salicílico.

Finalmente, a partir del personal que llenaba los requisitos de normalidad, se pudieron encontrar las concentraciones de los agentes agregantes que propician una respuesta normal y lo suficientemente reproducible en nuestra población Mexicana sana. Para nuestros propósitos, las personas normales debían de llenar los siguientes

tes requisitos previamente elaborados por el protocolo: Edades tanto en hombres como en mujeres comprendidas entre los 15 y los 50 años, asintomáticos, con exploración física normal, sin manifestaciones patológicas asociadas a la coagulación, con antecedentes de ausencia de ingestión de toda clase de fármacos 10 días previos a la prueba; además eran revisados los signos vitales sin pasar por alto una breve historia clínica para todos los donadores profesionales, cubriendo antecedentes de diabetes, sífilis, hepatitis, brucelosis, paludismo, convulsiones, drogadicción y algún tipo de alergia. Lo anterior era checado en el Banco Central de Sangre del C.M., I.M.S.S.; mientras que los pacientes con padecimientos trombocitopáticos ex-puestos en este trabajo fueron detectados y corroborados durante las evaluaciones diagnósticas de enfermos que acuden al Servicio de Hematología de la misma Institu-
ción.

Todas las personas se encontraron en ayuno; se les hizo venopunción de la antecubital utilizando jeringas con aguja de identidad 20 X 32 y trasladándose a tuvo siliconizados conteniendo citrato. Tuvieron reposo previo por lo menos 15 a 20 minutos y las muestras se obtuvieron de la mejor manera posible. La sangre se conservó a temperatura ambiente desde su obtención hasta completar las pruebas y se evitó reba sar el término de 3 horas. Fundamentalmente y de una manera general, todo el perso nal estudiado procedió del personal médico y clínico del hospital y del laboratorio del Servicio de Hematología del Hospital General del Centro Médico Nacional del I.M.S.S. sumado a donadores profesionales del Banco Central de Sangre, así como los pacientes con padecimientos trombocitopáticos.

Quiero agregar que para todas las mediciones, un control paralelo normal era sometido a las mismas condiciones del problema, que decididamente hacía confiar tanto en los reactivos, la técnica y el funcionamiento del aparato.

En nuestras exigencias, hasta 5 min. 30 seg. de incubación se esperaba la posible

agregación antes de reportarse como "sin respuesta" o "ausencia de agregación".

Con respecto al comportamiento que pudiera considerarse "típico" de los distintos transtornos plaquetarios incluidos en el protocolo, se pudo lograr el diferenciar cada uno mediante un análisis discriminativo de resultados, lo cual permite una evaluación confiable y perfecta.

A los donadores voluntarios, a quienes también se les hizo un estudio con la dosificación de aspirina, demostraron una inhibición de la segunda onda de agregación parcial o completamente, referida al empleo de ADP y adrenalina como inductores, tanto en hombres como en mujeres, lo que hace resaltar la importancia de consultar o interrogar al paciente sobre una posible ingestión de compuestos salicilados antes de considerar los resultados de agregación.

Los trazos en los distintos desórdenes plaquetarios encontrados fueron completamente similares a los encontrados en la revisión bibliográfica, lográndose además establecer un rango característico y una manera especial de desarrollo de la agregación para cada trastorno considerado. Sin embargo un hallazgo que sobresale, lo constituye el grupo de pacientes con Von Willebrand, en quienes se encontró una desviación altísima correspondiente a una variabilidad muy grande de valores; de todos modos, ésto no ha de tomarse como un error porque lo que se encuentra en la literatura concuerda con lo encontrado aquí, lo que condujo a olvidar la búsqueda de un promedio que pudiera caracterizarlos con utilización de ristocetín. Sólo se limitó a concluirlo dentro de una respuesta "disminuida" a "ausente" de agregación.

Las concentraciones encontradas y referidas como óptimas, obedecieron a 2 criterios: El primero nació de la espera de encontrar una concentración que para cada agente agregante desarrollara su mejor reproducibilidad; el segundo correspondió al deseo

de encontrar, según conviniera, un estímulo suficiente para que se desarrollaran en el trazo ya sea una o las dos ondas de agregación, evitando para algunos la fusión de las ondas y poder determinar la efectividad tanto en tiempo como en magnitud para cada una de ellas. Con esta base los distintos hallazgos serían factiblemente comparables, lo que llevaría a las deducciones precisas para aclarar la posible causa de anomalía que podrían tener las plaquetas. No obstante conviene mencionar que algunas veces será necesario utilizar concentraciones ligeramente altas que conducen a asegurar si las plaquetas sólo necesitan un mayor estímulo para poder desarrollar una conducta "normal", antes de reportar que simplemente no agregan; lo que aporta una ayuda opcional que muchas veces puede ser necesaria.

CONCLUSIONES

La técnica de la agregación plaquetaria revela una gran utilidad en la búsqueda del diagnóstico de desórdenes trombocitopáticos cualitativos, bien sean congénitos o adquiridos. Revela una utilización mucho más exigente por la importancia que aporta como auxiliar en el diagnóstico de patología predisponente plaquetaria, por lo que su uso en investigación tendrá decididamente que ampliarse.

Los trazos provenientes de tal técnica son óptimamente comparables a los que son obtenidos de las personas sanas aunque su uso continúe limitado a servicios especializados, determinados a una casuística baja de padecimientos.

Se pudieron encontrar rangos normales y trazos característicos prototipos del personal sano, que sin duda aporta gran ayuda para facilitar la interpretación en los posteriores estudios. Fué posible determinar una concentración ideal para cada agente de inducción que se utilizó hacia fines de evitar gastos de reactivos innecesariamente. Así mismo, se determinaron una serie de trazos característicos que obtenidos a partir de distintos agregantes, facilitarán el diagnóstico, que en este caso es por discriminación. Fué posible además, demostrar una vez más que la agregación plaquetaria es parcial o totalmente inhibida en cuanto a su efectividad por compuestos salicilados.

A partir de los acontecimientos de agregación que se obtuvieron de donadores profesionales de sangre y donadores voluntarios sanos, puede derivarse que una posible activación aumentada (quizá por la incidencia de venopunciones) de plaquetas queda

completamente descartada ya que el comportamiento de agregación es completamente similar en los dos grupos, apoyando así el rango establecido para personas normales sanas.

Los desórdenes plaquetarios mostraron gran similitud con lo encontrado en la revisión bibliográfica; solamente en los pacientes con Von-Willebrand los resultados fueron inconstantes, pero para nuestra fortuna, aún así, el amplio rango de resultados está bastante separado del normal en lo referente a la inducción con ristocetina.

Con respecto a los desórdenes que finalmente carecieron de significado dentro de los objetivos planteados, todavía se tendrá que recorrer más en el conocimiento de la función plaquetaria anormal (y más para los trastornos adquiridos) para establecer su correlación exacta con los cuadros clínicos asociados.....

R E F E R E N C I A S

1. Aarón J.M: "Platelet Función". The new england of journal of medicine. 280 (24); 1330-1334, 1969.
2. Ambriz, R.; Aviles, A.; Reyna, M.L.; Ballesteros, L. y Pizzuto, J. "Utilidad de un perfil básico de estudio para la certeza diagnóstica en la hemofilia A". Gaceta Médica de México. 119 (12); 447-482, 1983.
3. Ambriz, R. y Cols. "Enfermedad primaria de la agregación plaquetaria". Informe de 3 casos de una familia mexicana. XXIV Jornada Anual Ameh 286-303, 1983.
4. Anaya, R., Flores, F.M., Linares, G. y Alberg, M. "Valores normales de agregometría plaquetaria en población mexicana". Rev. Invest. Clín. (Méx.): (29); 127-135, 1977.
5. Arkel, Y.S.. "Valoración de la agregación de plaquetas en trastornos de la hemostasia". Clínicos Médicos de Norteamérica 60; 881-911, 1976.
6. Balcells, A. "La clínica y el laboratorio". Ed. Marín, S.A. 12ª edición. Barcelona 1981. 189-195.
7. Bergstrom, S y B. Samuelson. "Las prostaglandinas". Endeavour 27, 109-113, 1968.

8. Born, G.B. "Agregación of blood platelets by adenosine diphosphate and its reverse". *Nature (Lond)* 194; 927, 929, 1962.
9. Braga, C.A. y Gonzaga, L. "Manual de hemostasia y coagulación". Centro de Hematología Santa Catarina. Río de Janeiro, Brasil 1976.
10. Caen, J.M. y Larrieu, J. "La hemostasia . Métodos de exploración y diagnóstico práctico". Toray-Masson S.A., Barcelona 1ª edición, 1977. págs. 3-64
11. Ciscar, R.F. y Farreras, V.P. "Diagnóstico Hematológico". Tomo II. Editorial Jims, 3ª edición. págs. 1667-1771.
12. Color Atlas and Textbook of Hematology. J.B. Lippincott Company Editorial. 2ª edición. U.S.A.. págs. 326-336.
13. Gerzo, F. y Palomares, B.R. "Enfermedades hemorrágicas, diagnóstico y tratamiento". F. Méndez Cervantes Editor. 1ª edición, México 1983. págs. 1-37
14. Cimbrone, M.A.; Aster, R.H.; Contran, R.S. "Preservación of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet rich medium". *Nature*: 222; 3, 1969.
15. Colstein, C. "funciones y disfunciones plaquetarias". Publicaciones de la junta de beneficencia pública del D.F. Caracas Venezuela, 1973. págs. 3-58.

16. Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (CLAHT). "Hemorragia y trombosis". Dorantes-Puzzuto editores. I.M.S.S. México, 1981. págs. 17-44.
17. Harker, L.A. "Hemostasia Manual". F.A. Davis Company Philadelphia, S.A.. págs. 1 - 19.
18. Haeper, H.A. "Manual de química fisiológica". Editorial el Manual Moderno, S.A. 4ª edición, México 1975. págs. 208-225.
19. Johnson, S.A., Van Horn D.F., Harland, J.P. and Marr J. "Platelet función". Transfusión 6: 3-17, 1966.
20. "Manual Hyland sobre pruebas de coagulación". Hyland laboratories. Travenol International E.U.A., 1965.
21. Merck Sharp and Dohme International. "El manual Merck". Merck and Co. Inc. 6ª edición en español. Rahway, N.L. E.U.A., 1978. págs. 330-347
22. Mills D.F., Fobb, I.A. and Roberts, O.C. "The releace of nucleotides, 5-hidroxy-tryptumine adn enzimes from human blood platelet during agregati6n". J. Phisiol 195; 715. 1968.
23. O. Briend, J.R. "Some results from a new method of study". Natrue: 195; 452-455, 1962.

24. Raby, C. "Hemorragias y trombosis". Toray-Masson, S.A. 1ª edición, 1968. pags. 1-33
25. Reyna, MO. y Pizzuto, J. "Efecto de la Glucosa en la actividad coagulante de las plaquetas Sangre 13: 431-442, 1968.
26. Rojas, W.M. "Inmunología". Corporación para las investigaciones biológicas 5ª edición. Fondo Educativo Interamericano. Medellín, Colombia 1983. págs. 51-70
27. Shirley A. Johnson, Daniel L. Van, Harlen J. Puderson. "The función of platelets". Transfusión : 6: 3-17, 1966.
28. Davidsohn, I. Y Henry, J. "Todd-Sanford. El diagnóstico clínico del laboratorio". Salvat editores 6ª edición, Barcelona 1979. págs. 425-458.
29. Weiss Harvey J. "Aspirín ingestión compared with bleeding disorders search for a use ful plaquetet antiagregant". Blood: 35: 333-339, 1970.
30. Weiss, H.J. and Alderot L.M.. "Impaired platelet connective tissue reaccióin in man after aspirín ingestión". Lancet 2: 495, 1967.
31. Weis, H.J.. "Platelet physiology and abnormalities of platelet función". N. England J. Med.: 293; 531, 1975.

32. Williams, J.W.; Beuther, E. "Hematología". Tomo II. Editorial Salvat, 1ª edición, Barcelona 1975.

33. Williams, J.Q., Beuther, E. "Hematología". Tomo II. Editorial Salvat 2ª edición. Barcelona, 1983. págs. 1280-1253; 1334-1348; 1391-1461.

34. Zimmerman and Ruggery: "Von Willebran '2 disease". Clínicas in Haematology: 12; 175-200, 1983.

35. Zucker, MB. "Fisiología de las plaquetas". Scientific American 47; 46-57, 1980.