

11201 <sup>13</sup><sub>2j</sub>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY HOSPITAL

**"VALIDACION DE LA AGREGOMETRIA PLAQUETARIA  
POR LOS METODOS OPTICO Y DE IMPEDANCIA"**

**TESIS DE POSTGRADO  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
ESPECIALISTA EN:**

**PATOLOGIA CLINICA**

**P R E S E N T A :**

**DRA. MARIA DEL CARMEN NUÑEZ ORTEGA**

**ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO  
DR. JESUS I. SIMON DOMINGUEZ**



MEXICO, D. F.

ENERO 1999

272177 *[Signature]*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**“FACULTAD DE MEDICINA”  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**THE AMERICAN BRITISH COWDRAY HOSPITAL**

**“VALIDACION DE LA AGREGOMETRIA PLAQUETARIA POR LOS  
METODOS OPTICO Y DE IMPEDANCIA”**

**TESIS DE POSTGRADO  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
ESPECIALISTA EN:**

**PATOLOGIA CLINICA**

**P R E S E N T A:  
DRA. MARIA DEL CARMEN NUÑEZ ORTEGA**

**ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO**

**DR. JESUS I. SIMON DOMINGUEZ**

**MEXICO, D.F.**

**ENERO 1999**

**“VALIDACION DE LA AGREGOMETRIA PLAQUETARIA  
POR LOS MÉTODOS OPTICO Y DE IMPEDANCIA”.**

## INDICE

<b>Capítulo 1</b>	
Introducción . . . . .	1
<b>Capítulo 2</b>	
Antecedentes . . . . .	2
<b>Capítulo 3</b>	
3.1 Funciones de las plaquetas . . . . .	3
3.2 Glucoproteínas de la membrana plaquetaria . . . . .	9
<b>Capítulo 4</b>	
Principios de las pruebas de agregación plaquetaria . . . . .	13
<b>Capítulo 5</b>	
Pruebas de agregación . . . . .	14
<b>Capítulo 6</b>	
Agregación por Impedancia en sangre total . . . . .	23
<b>Capítulo 7</b>	
Medición de liberación de ATP: Luminiscencia . . . . .	25
<b>Capítulo 8</b>	
Tiempo de sangrado por método de Ivy . . . . .	26
<b>Capítulo 9</b>	
Patrones de agregación plaquetaria en trombocitopatías . . . . .	28
<b>Capítulo 10</b>	
Objetivo . . . . .	30
<b>Capítulo 11</b>	
Material y métodos . . . . .	31
<b>Capítulo 12</b>	
Resultados . . . . .	33
<b>Capítulo 13</b>	
Conclusiones . . . . .	36
<b>Capítulo 14</b>	
Bibliografía . . . . .	37

## **Introducción.**

En 1962 Born y O'Brien describieron la técnica fotométrica de investigación de agregación plaquetaria. Este método debe ser considerado como el instrumento que ha brindado mayor información en la investigación del funcionamiento plaquetario.

Este método está basado en los cambios que se producen en la transmisión de la luz de un plasma rico en plaquetas al formarse los agregados por estímulo del agente adicionado. (1)

La utilización de un inscriptor permite la graficación del fenómeno. El fibrinógeno bovino, la adrenalina, el ácido araquidónico, el tromboxano A<sub>2</sub> y la ristocetina entre otros, inducen por sí mismo una agregación inicial y después una segunda curva debido a la liberación de ADP endógeno, tromboxano A<sub>2</sub> y factor agregante plaquetario. En cambio la trombina y colágeno inducen agregación por la intensa liberación del ADP. Este método, al usar diferentes agregantes permite establecer el diagnóstico de trombocitopatías. (2)

## **Antecedentes.**

En 1962, Born describió la agregación plaquetaria por ADP y modificó el colorímetro para monitorear continuamente ésta agregación en el plasma enriquecido con plaquetas. Esas modificaciones incluyeron incubación a 37°C, registrando el cambio en la transmisión de luz contra tiempo en una gráfica.

En 1977, Feinman y colaboradores, describen un instrumento para medir la agregación plaquetaria y la secreción de ATP simultáneamente, éste instrumento utilizó luz infraroja para medir la agregación y un fotomultiplicador sensible a ángulos adecuados a la vía de la luz de agregación para medir la secreción de ATP por Luminiscencia, fué el primer Lumi-Agregómetro

En 1980, Cardinal y Flower describieron el método de Impedancia para medir agregación en sangre total. Una corriente eléctrica muy pequeña se pasa entre dos electrodos. Durante el contacto inicial con la sangre los electrodos se cubren con una monocapa de plaquetas, cuando un agente agregante se añade, las plaquetas agregadas en la monocapa aumentan la impedancia, la cual se registra en una gráfica. La adición de la medición de la Impedancia al Lumi-Agregómetro creó el Lumi-Agregómetro de sangre total.

En 1984, Wojenski y Silver publicaron un protocolo rápido usando como rutina de laboratorio un Lumi-Agregómetro de sangre total, éste se basa en la medición simultánea de la agregación plaquetaria y la secreción de ATP en sangre.

En 1985, Johnson y colaboradores, describieron un método para detectar el flujo de calcio ionizado en plaquetas lavadas atrapadas con la proteína aequorin bioluminiscente, este método es para estudiar el papel del calcio ionizado en la actividad de las plaquetas. El flujo anormal del calcio ha sido reportado en paciente con un defecto hereditario de la secreción plaquetaria y en pacientes con uremia. (3)

## **Funciones de las plaquetas.**

### **Ultraestructura de las plaquetas.**

Las plaquetas son pequeñas células anucleadas de la sangre periférica, las cuales circulan en forma de disco y miden en promedio de 2 a 4 micras de diámetro y 0.6 a 1.3 micras de grosor y su función consiste en taponar rápidamente cualquier solución de continuidad producida en el endotelio vascular, mediante la formación de acúmulos plaquetarios capaces de obturar estas lesiones.

Se originan en la médula ósea a partir de fragmentos de citoplasma del megacariocito, por lo que son anucleadas y con una vida media entre 9 y 12 días, periodo en el que atraviesan miles de vasos sanguíneos, auxiliando a mantener la integridad del endotelio vascular.

Las plaquetas externamente tienen un aspecto liso, pero con aberturas de un sistema de canalizaciones membranosas que comunican a toda la plaqueta, semejando a una esponja. Ultraestructuralmente las plaquetas se dividen en tres zonas bien diferenciadas con actividades funcionales específicas: periférica, intermedia y de organelos.

### **Zona periférica.**

Esta zona representa la parte más externa de las plaquetas y está formada por tres capas. El glicocáliz o cubierta externa, es el responsable de la respuesta plaquetaria inicial a los estímulos externos, a través de receptores glicoproteicos entre los que se encuentra el complejo glucoproteico Ib-IX con aproximadamente 25,000 moléculas sobre la superficie; su función primordial es permitir la adhesión de la plaqueta al subendotelio a través del FvW, y el complejo Gp IIb-IIIa que se une al fibrinógeno y ADP, provoca cambio de forma, agregación y secreción plaquetaria; así mismo por intermedio del ADP participan otros agentes agregantes como adrenalina, serotonina, etc. La Gp V sirve como receptor para la trombina, otro poderoso agente agregante plaquetario. La Gp Ia constituye el receptor para colágeno que también es un agregante plaquetario. La Gp IV es un receptor de la trombospondina. Así mismo, recientemente también se han identificado otros receptores para el tromboxano A<sub>2</sub>, para la trombina (R1 y R2 de alta afinidad), que participan también como agregantes plaquetarios.

Por otra parte, es rica en glucosiltransferasa, una octoenzima que reacciona con el grupo amino de la colágena transfiriendo residuos aminoazúcares, reacción que resulta importante para iniciar los fenómenos de adhesión y agregación plaquetaria. (4)

La membrana plasmática se invagina en múltiples ocasiones para formar lo que se conoce como el sistema canalicular abierto, estos canales incrementan notablemente el área de superficie plaquetaria que conecta la membrana con el citosol.

La segunda capa de esta zona está constituida propiamente por la membrana plaquetaria, o bicapa fosfolipídica, especialmente rica en ácido araquidónico. Ante la activación, la membrana expone una superficie cargada negativamente, indispensable para el soporte de los factores de coagulación.

La capa más interna es la submembranosa donde se produce la transformación de las señales recibidas de la superficie externa.

La zona periférica constituye una de las partes fundamentales en los mecanismos de activación, adhesión y agregación plaquetaria.

### **Zona intermedia o gel.**

Esta área de la plaqueta contiene las moléculas y estructuras que participan en la formación de las proteínas contráctiles y en la interacción con los microtúbulos. Así mismo es primariamente responsable de la forma, tamaño celular y de la contracción que sigue de los procesos de adhesión y agregación que provocan la liberación de los compuestos intracelulares; además también contiene la trombostenina, otra proteína contráctil de la plaqueta.

### **Zona de organelos.**

En esta zona se encuentra el glucógeno, y las mitocondrias además de los gránulos densos que miden de 200 a 300 nm con una zona central muy densa y un halo transparente, existiendo aproximadamente cinco por plaqueta, éstos gránulos contienen el 60% del ADP intraplaquetario, calcio y serotonina. También existen los gránulos alfa que son los más numerosos, unos 50 por plaqueta; son esféricos u ovals y miden de 300 a 500 nm. Los gránulos alfa son el sitio de almacenamiento de las sustancias destinadas a ser secretadas en las plaquetas activadas como: fibrinógeno, osteonectina, trombospondina, beta-tromboglobulina, Factor de Von Willebrand, factor 4 plaquetario, complejo glucoproteico IIb-IIIa, Glicoproteína de membrana 140 (GMP-140), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (EDRF) y el tgf-Beta (transforming growth factor-B). Las lisosomas contienen Beta glucuronidasa, fosfatasa ácida y catepsina.

Por otra parte en esta zona se encuentran también los denominados sistemas membranosos de las plaquetas que consisten en el Sistema Canalicular Abierto (SCA) y el sistema tubular denso (STD). El sistema canalicular abierto está constituido por canales abiertos a la superficie plaquetaria; éstas son invaginaciones de la membrana plaquetaria que incrementan la superficie de contacto y permiten el intercambio de sustancias en zonas profundas de la plaqueta. El sistema tubular denso son canales de un contenido amorfo, de densidad similar al citoplasma y que no se comunica con el exterior y cuya función es servir de reservorio del calcio plaquetario y en él también se alojan las enzimas del metabolismo de las prostaglandinas. (5)

## Activación plaquetaria.

Durante el proceso de activación plaquetaria, ocurren cambios anatómicos específicos que ocasionan cambio de forma plaquetaria, al pasar de la forma discoide a una forma más redondeada con formación de pseudópodos delgados, incrementando considerablemente la superficie de contacto con otras plaquetas. Además, los organelos intraplaquetarios comienzan a centralizarse, gracias a la contracción de microtúbulos y microfilamentos. Posteriormente los gránulos fusionan sus membranas con el sistema canalicular abierto y liberan su contenido hacia el exterior, potencializando los fenómenos de adhesión, agregación y secreción plaquetaria al activar a otras plaquetas. (6)

Ante el estímulo de los agregantes plaquetarios, la plaqueta inicia una serie de eventos bioquímicos en cadena. La transducción de la señal al interior de la célula, se realiza a través de la proteína G (PG) que desencadena la formación de segundos mensajeros

La PG es una proteína heterotrimérica compuesta de tres unidades: alfa, beta y gamma. La subunidad alfa se une al guanidintrifosfato (GTP) y las subunidades beta y gamma se encargan del anclaje de la Proteína G y además regulan las enzimas intraplaquetarias como: adenilatociclasa y fosfolipasa A2 y C. Existen varias Proteínas G con funciones diferentes:

Gs: actúa estimulando a la adenilciclasa e incrementa los niveles de AMPc.

Gi: actúa inhibiendo a la adenilciclasa y disminuye los niveles de AMPc.

Gq: activa a la enzima fosfolipasa C.

G: activación de la fosfolipasa A2.

Las proteínas G juegan un papel importante en los mecanismos de activación, al inhibir o estimular a diferentes enzimas, por lo tanto se le considera el primer contacto del sistema de activación. La Pgs y la PGI actúan regulando los niveles del AMPc, así al incrementarse éstos niveles la plaqueta no se activa y permanece en estado inactivo, esto debido básicamente a la participación de la PGI2 liberada del endotelio. Por otra parte la Pgg activa la enzima fosfolipasa C que produce dos segundos mensajeros: diacilglicerol y fosfatidilinositoltrifosfato que se encargan de la activación de la proteincinasa C y de la movilización del calcio respectivamente, que serán los responsables del cambio de forma plaquetaria y de la centralización y liberación de los gránulos. (7)

Los niveles de AMP cíclico regulados por la adenilciclasa y la fosfodiesterasa se encargan de la regulación de los niveles de prostaglandinas, básicamente del tromboxano A2 que constituye un poderoso agregante, a través de su regulación por la enzima fosfolipasa A2. La fosfolipasa A2 es activada por una PG y se encarga de la síntesis de prostaglandinas.

Todos estos mecanismos mencionados de activación plaquetaria funcionan equilibradamente, de tal suerte que un defecto en algunos de los mecanismos de activación se traducirán como defectos plaquetarios. (8)

### **Respuestas secretorias.**

Las plaquetas tienen tres tipos de gránulos de almacenamiento, gránulos densos, alfa-gránulos y lisosomas con diferentes contenidos. La secreción de esos granulos de almacenamiento, es referida como secreción de granulos densos, secreción alfa- gránulos y secreción de ácido-hidrolasa. Los principales compuestos son almacenados y los agonistas débiles ADP, adrenalina y Tromboxano A<sub>2</sub> inducen la secreción de gránulos densos y alfa gránulos con retroalimentación positiva, pero no la secreción de ácido-hidrolasa. Los agonistas fuertes Trombina, colágeno y A<sub>23187</sub>, sin embargo, inducen la secreción de los tres tipos de secreción. (9)

### **Secreción de gránulos densos.**

Los gránulos densos en las plaquetas humanas van de 250 a 300 nm de diámetro. Los gránulos densos generalmente contienen grandes cantidades de adenosina , difosfato y trifosfato de adenosina (10)

La serotonina es transportada primero por un sistema de acarreador específico a través de la membrana plasmática al citoplasma y subsecuentemente por un sistema acarreador secundario al gránulo. Además de ser liberada durante la secreción plaquetaria, la serotonina puede liberarse de los gránulos por inhibición de la bomba de la membrana granular ó por intercambio con otras aminas estructuralmente relacionadas.

Fisiológicamente, el ADP es la sustancia secretada más importante desde los gránulos densos. En el plasma es hidrolizada hasta AMP por una fosfohidrolasa ADP y tiene una vida media de cuatro minutos. El ATP que específicamente antagoniza la estimulación de las plaquetas por ADP, también es secretado e hidrolizado en el plasma con vida media de 1.5 minutos; el producto hidrolítico principal es AMP. Por lo tanto, el ATP y ADP, producen AMP en el plasma; posteriormente el AMP rápidamente se desfosforila hasta adenosina la que inhibe la reacción plaquetaria básica al mejorar la formación de AMPc. (10)

### **Secreción de alfa gránulos.**

Estos son esféricos, contienen proteínas simples y glucoproteínas, que se subdividen en proteínas específicas plaquetarias, proteínas catiónicas, factores de coagulación y glucoproteínas. Cada alfa gránulo presenta un patrón de tinción diferente, con frecuencia con una área acéntrica de densidad del color, pero todos los alfa-gránulos individuales parecen tener la misma composición proteica, se fusionan en grandes vacuolas antes de que su contenido sea vaciado durante el proceso secretorio. (11)

### **Proteínas plaquetarias específicas.**

Constituyen dos proteínas, factor plaquetario 4 : de alta afinidad y de baja afinidad; y un producto de separación hidrolítica del último producido por proteasas plaquetarias, se llama beta-tromboglobulina. Se une a la heparina pero su función no es clara. Las dos formas de factor plaquetario 4 y la beta-tromboglobulina se encuentran sólo en plaquetas. Su origen o mecanismo de almacenaje es desconocida; el factor plaquetario 4 de alta afinidad, aparentemente se une a un proteoglicano de 59,900 dalton. (12)

### **Proteínas catiónicas.**

Las proteínas catiónicas son llamadas factor mitógeno, factor de permeabilidad, factor quimiotáctico y factor bacterida, nombres que reflejan sus actividades fisiológicas. El Factor mitógeno también denominado factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), ha sido extensamente estudiado y tiene una secuencia de amino ácidos muy similar a la de los productos genéticos de oncogenes, específicamente estimula el crecimiento de los fibroblastos, células de músculo liso y tejido conectivo, y se une fuertemente a una alfa 2 macroglobulina en el plasma después de la secreción. Los otros tres factores han sido separados pero no bien caracterizados; su papel durante la secreción es desconocida. El origen o el mecanismo de almacenamiento para las cuatro proteínas también se desconoce. (12)

### **Factores de coagulación.**

Los alfa-gránulos contienen fibrinógeno y factor V, los cuales son secretados de las plaquetas en respuesta a los agonistas débiles, el FvW y el cininógeno de alto peso molecular también están presentes y son liberados durante la estimulación con trombina. El fibrinógeno plaquetario constituye alrededor del 8% del contenido proteico total de la célula. La cantidad total de fibrinógeno que las plaquetas pueden liberar al plasma es apenas perceptible al compararse a las grandes cantidades del fibrinógeno normalmente presente en el plasma. Se cree, sin embargo, que grandes concentraciones de fibrinógeno liberado de las plaquetas así como el Factor V y el FvW temporalmente se acumulan en la superficie plaquetaria durante la secreción, puede ser de importancia para la agregación plaquetaria y el papel procoagulante de las plaquetas (13, 14)

### **Glucoproteínas.**

Los alfa-gránulos al menos contienen siete diferentes glucoproteínas , pero algunas de esas están embebidas en la membrana granular y por lo tanto no son secretables, la glucoproteína más soluble ha recibido muchos nombres: proteína sensible a la trombina, trombospondina, glucoproteína G (G denotando gránulo), y lectina endógena. La trombospondina específicamente se une al receptor fibrinógeno expuesto a la superficie plaquetaria durante la estimulación plaquetaria, no es una proteína plaquetaria específica puesto que es sintetizada por células endoteliales (15)

### **Secreción de ácido-hidrolasa.**

Acidos hidrolasas son ezimas habitualmente contenidos en las vesículas llamadas lisosomas primarios y sirven para digerir materiales que la célula ha endocitado. (16)

## Glucoproteínas de la membrana plaquetaria.

Muchos de los receptores involucrados en la adhesión plaquetaria a los componentes de la matriz extracelular en las paredes de los vasos sanguíneos, agregación plaquetaria y la interacción plaquetaria con otras células, ha sido identificada, clonada y secuenciada. Esta información ha permitido su clasificación dentro de numerosas familias, incluyendo la familia de las integrinas, la familia de glucoproteínas ricas en leucina y la familia de las selectinas, compuestas de receptores que comparten estructuras y funciones y se encuentran en una variedad de tipos celulares. Otras glucoproteínas de membrana que participan en la hemostasis y pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas ha sido identificadas, así como las proteínas plaquetarias que no parecen relacionadas a ninguna familia de genes conocida. (17)

### Citoadhesinas plaquetarias.

El receptor fibrinógeno GP IIb/IIIa. El complejo glucoproteína IIb/IIIa probablemente es la integrina más abundante en la membrana plaquetaria. Existe como calcio dependiente, complejo heterodímero que contiene los antígenos responsables para la mayoría de los casos de púrpura posttransfusional y trombocitopenia neonatal. La GP IIb tiene un peso molecular de 136,000 y está compuesta por una subunidad alfa, mayor (125,000) y una subunidad beta, menor (23,000) unidas por un solo puente disulfuro. Las plaquetas, al menos, contienen normalmente 50,000 moles de GP IIb-IIIa, representando del 1 al 2% del total de proteínas plaquetarias.

La presencia de GP IIb-IIIa en la superficie de la membrana, es requisito absoluto para la agregación plaquetaria. La pérdida o falta de función del complejo GPIIb/IIIa, es responsable de los desórdenes congénitos denominados Trombastenia de Glanzmann. La trombastenia de Glanzmann es un desorden hemorrágico autosómico recesivo, resultante en la mayoría de los casos de la disminución en el contenido plaquetario de GP IIb y GP IIIa. (18)

Aunque GP IIb y GP IIIa, están expresadas constitutivamente en las plaquetas en reposo, el complejo heterodímero se une a proteínas solubles adhesivas (fibrinógeno, Factor de von Willebrand o fibronectina), sólo después de la activación plaquetaria. Los péptidos correspondientes a los 15 aminoácidos del carboxi-terminal de la cadena gamma del fibrinógeno también inhibe completamente a las interacciones del fibrinógeno con plaquetas estimuladas, derogando la unión del FvW y la fibronectina al complejo GP IIb/IIIa. (19)

La agregación plaquetaria bajo condiciones normales es mediada por la interacción del fibrinógeno con el receptor de GP IIb-IIIa. En ausencia de fibrinógeno plasmático, como en los pacientes con afibrinogenemia, se ha visto que el FvW es sustituido por el fibrinógeno. (20)

**Receptor de la vitronectina.** El receptor de vitronectina representa una integrina menor sobre las plaquetas. Su subunidad alfa (alfa I) tiene una secuencia del 35% idéntica con la Gp II y forma un complejo independiente del calcio con subunidades beta idénticas al GP IIIa. El receptor de vitronectina une varias proteínas adhesivas tales como la vitronectina, fibronectina, FvW y trombospodina. Su función es constitutiva y no requiere activación plaquetaria. (21)

**Los receptores de la familia VLA. (Antígenos muy tardíos).** Tres integrinas Beta I han sido identificadas sobre las plaquetas. Su función primaria es de ser receptores para el colágeno, fibronectina y laminina. La subunidad Beta 1 corresponde a Gp IIa, la cual tienen un peso molecular de 130,000 y sostiene al sistema aloantigénico plaquetario Br a / Br b. (22)

**El receptor colágeno.** El receptor colágeno plaquetario VLA 2 (GP Ia/IIa) está presente en casi 2000 copias por plaquetas. Este receptor funciona no sólo como un receptor proteico adhesivo, sino también como un receptor agonista. Su papel en la agregación plaquetaria inducida por colágeno fue sugerida primero cuando las plaquetas de un paciente no respondieron ante el colágeno y se les encontró carencia de GP Ia. Aunque una variedad de proteínas que se unen a la colágena se han descrito sobre las plaquetas, el GP Ia/IIa parece jugar un rol primario en las interacciones colágeno plaqueta. (23)

**El receptor fibronectina. (VLA 5).** Es otra integrina menor sobre las membranas plaquetarias. Se componen de un complejo heterodímero GP Ic y GP IIa. Este receptor interactúa con fibronectina y laminina y no requiere activación plaquetaria para la actividad. Más aún, las plaquetas de los pacientes con Trombastenia de Glanzmann, carentes de Gp IIb-IIIa, diseminan la superficies cubiertas de fibronectina bajo condiciones estáticas y de flujo via receptor fibronectina VLA 5. (24)

**Receptor laminina.** Las plaquetas también se adhieren pero no se diseminan sobre superficies cubiertas de laminina. El papel del VLA 6 en las interacciones plaquetarias con la laminina fue establecida en estudios usando un anticuerpo monoclonal contra VLA 6. La subunidad alfa del VLA 6, a veces designada Ic\*. (25)

### **Las glucoproteínas ricas en leucina.**

Esta familia de genes representa una relativamente nueva familia de proteínas compuesta de una secuencia de 24 aminoácidos ricos en leucina. esta familia incluye una variedad de proteínas sin similitudes funcionales aparentes. Tanto el complejo GP Ib/IX y el GP V de la membrana plaquetaria son miembros de la familia de glucoproteínas ricas en leucina.

**Receptor del FvW: GP Ib/IX.** Este es la sialoglicoproteína más abundante en la membrana plaquetaria, con 25,000 moléculas por plaqueta aproximadamente. Consiste de dos subunidades unidas por disulfuro, la GP Ib alfa ( 145,000 PM) y la GP Ib beta (24,000PM), siendo ambas proteínas transmembrana. Las cadenas alfa y beta están codificadas por dos genes diferentes. El gen para Gp Ib alfa ha sido localizado en el cromosoma 17 y el beta en el 22. El Gp Ib forma un complejo fuertemente unido con el GP IX en un complejo heterodímero 1:1. (26)

El GP Ib alfa es susceptible a la proteólisis por un número de enzimas que liberan un dominio extracelular llamado glicocalicina. Gp Ib alfa se ha reportado también que se une a la trombina y es el sitio de interacción de anticuerpos dependientes al fármaco quinina/quinidina. Su función primaria, sin embargo, está en la mediación de la adhesión plaquetaria al subendotelio vascular a través de la inmovilización del FvW. Las plaquetas de pacientes con el Síndrome de Bernard-Soulier, fallan al unir el FvW con Gp Ib/IX carente. (27, 28)

**Glucoproteína V.** Es una glucoproteína de membrana plaquetaria con peso molecular de 82,000 que también parece estar asociada con el complejo Gp Ib/IX y es deficiente en pacientes con el Síndrome de Bernard-Soulier. Aunque la función de Gp V es desconocida, es la única glucoproteína de membrana plaquetaria mayor que se hidroliza por la trombina durante la estimulación plaquetaria. . (29)

### **Las selectinas.**

Las selectinas comprenden una familia de receptores de superficie celular que poseen un dominio amino terminal similar a la lectina, un dominio adyacente similar al factor de crecimiento epidérmico, y un consenso corto múltiple de unidades homólogas repetidas a las proteínas regulatorias complementarias. El GMP 140, también llamado PAD-GEM o CD62, es un constituyente plaquetario de peso molecular de 140,000 que reside en las membranas de los alfa-gránulos. Se expresa en la superficie plaquetaria sólo después de la activación plaquetaria y la secreción de alfa-gránulos. Se ha demostrado que el GMP 140 regula la adherencia de neutrófilos y monocitos a plaquetas activadas de manera calcio dependiente. (30)

### **Otras proteínas plaquetarias involucradas en la hemostasis y trombosis.**

El GPIV, también conocido como GPIIb o CD36, es una glucoproteína plaquetaria mayor de PM de 88,000, que parece no relacionarse a alguna familia de genes conocida. Es altamente glucosilada, expresa al antígeno OKM 5, es resistente a las proteasas cuando se expresa en las membranas plaquetarias. Además de las células del linaje megacariocitos, también se ha identificado al GPIV en las células del melanoma, monocitos y células endoteliales.

Funciona en las plaquetas como receptor de la trombospondina proteína alfa granular. También se une a las fibras colágena tipo I, y anticuerpos contra GPIV inhibiendo la agregación plaquetaria inducida por colágeno. (30)

## **Principios de las pruebas de agregación plaquetaria.**

Se sabe que las plaquetas se agregan bajo una variedad de condiciones y en la presencia de un número de diferentes reactivos. Agregación plaquetaria es un término usado para denotar la adherencia de una plaqueta a otra. El fenómeno puede inducirse por agentes de agregación añadidos al plasma enriquecido en plaquetas o en sangre total. La agregación depende de la presencia de calcio, fibrinógeno y uno o más factores plasmáticos y un agente agregante.

La agregación plaquetaria variará con los diferentes agentes agregantes y con su concentración. Para agregometría óptica, el ADP, epinefrina, colágeno y ristocetina, se usan extensamente para propósitos de rastreo y dan la información inmediata para consideraciones diagnósticas básicas.

La selección de esos reactivos tiene una base teórica, tanto el ADP como la epinefrina están contenidos dentro de la plaqueta en organelos de almacenamiento y se liberan durante la formación del tapón hemostático primario y puede inducirse por lo tanto agregación plaquetaria posterior. Consecuentemente "in-vitro", la respuesta plaquetaria a esos reactivos que han probado ser de ayuda en determinar la naturaleza de un desorden hemorrágico del paciente.

Por otro lado el colágeno no está contenido en la plaqueta pero se halla en el tejido conectivo de sostén de la vasculatura sanguínea y se considera ser el primer factor de agregación o procoagulante que la plaqueta encuentra después de un trauma vascular.

Otros reactivos tales como trombina, el ionóforo de calcio A23187, ácido araquidónico, ristocetina, Factor VIII bovino y serotonina, también se han usado para estimular la respuesta plaquetaria para propósitos más específicos.

La agregación plaquetaria es la prueba "in-vitro" más útil de la función plaquetaria accesible en el presente, es herramienta diagnóstica que puede ofrecer un vistazo difícil o imposible de obtener por otras técnicas; así que ésta ayuda en el diagnóstico del paciente y selección apropiada del tratamiento o terapia. La experiencia con ésta técnica ha delimitado un espectro de herencia y estados de disfunción plaquetaria adquirida.

La agregación plaquetaria es clínicamente importante en la detección y diagnóstico de defectos plaquetarios cualitativos adquiridos o congénitos. La base para diferenciar las disfunciones plaquetarias es la capacidad de la plaqueta de responder a reactivos agregantes específicos.

Se describirán 3 tipos de pruebas de agregación:

- \* Agregación Óptica con plasma rico en plaquetas
- \* Agregación por Impedancia en sangre total
- \* Medición de la liberación de ATP por luminiscencia.

La agregación "in-vitro" es un esfuerzo para caracterizar la capacidad "in-vivo" de las plaquetas para formar el tapón hemostático primario. (31)

## **Pruebas de agregación óptica.**

La valoración de la respuesta de agregación de las plaquetas, puede realizarse con las mismas en su medio natural, en el plasma, o bien resuspendidas en distintos medios

Las cámaras de muestras del agregómetro crono-log se diseñan de tal forma que un rayo de luz infrarojo brilla a través de dos cubetas, una conteniendo PRP y otra conteniendo PPP. Los fotodiodos de silicón detectan la luz capaz de pasar a través de las muestras: PRP es arbitrariamente considerado ser 0% de transmisión de luz ó 0% de agregación; PPP se considera ser el 100% transmisor de la luz ó 100% agregación.

El diseño de rayo o fuente infrarojo dual en los pozos gemelos, asegura la reproducibilidad y, permite la medición simultánea de la agregación y luminiscencia. Cada canal tiene un pozo separado para la prueba (PRP o plaquetas lavadas; 0% transmisión de luz) y muestras de referencia. Presionando un solo botón establece el 0% y el 100% de transmisión de luz en líneas basales.

Cuando un estímulo se adiciona a la cubeta que contiene PRP y las plaquetas responden, cambios en la transmisión de luz ocurren y se recuperan con el tiempo por el aparato de registro.

Cuando las plaquetas sufren cambio en la forma en respuesta a un estímulo por un agente agregante, su tamaño más grande permite el paso de menos luz a través del PRP; éste es registrado como menor transmisión de luz a través de la muestra relativa al PPP. Si la dosis de agente agregante es lo suficientemente fuerte para causar que la plaquetas se adhieran una con otra y formen agregados, más luz es capaz de pasar a través de la muestra de PRP. El cambio en la transmisión de luz registrada, con el tiempo, muestra una tendencia hacia el PPP ó el 100% de transmisión de la luz. (2)

Se describirán 3 tipos de pruebas de agregación:

- \* Agregación Óptica con plasma rico en plaquetas
- \* Agregación por Impedancia en sangre total
- \* Medición de la liberación de ATP por luminiscencia.

La agregación "in-vitro" es un esfuerzo para caracterizar la capacidad "in-vivo" de las plaquetas para formar el tapón hemostático primario. (31)

## **Pruebas de agregación óptica.**

La valoración de la respuesta de agregación de las plaquetas, puede realizarse con las mismas en su medio natural, en el plasma, o bien resuspendidas en distintos medios.

Las cámaras de muestras del agregómetro crono-log se diseñan de tal forma que un rayo de luz infrarojo brilla a través de dos cubetas, una conteniendo PRP y otra conteniendo PPP. Los fotodiodos de silicón detectan la luz capaz de pasar a través de las muestras: PRP es arbitrariamente considerado ser 0% de transmisión de luz ó 0% de agregación; PPP se considera ser el 100% transmisor de la luz ó 100% agregación.

El diseño de rayo o fuente infrarojo dual en los pozos gemelos, asegura la reproducibilidad y, permite la medición simultánea de la agregación y luminiscencia. Cada canal tiene un pozo separado para la prueba (PRP o plaquetas lavadas; 0% transmisión de luz) y muestras de referencia. Presionando un solo botón establece el 0% y el 100% de transmisión de luz en líneas basales.

Cuando un estímulo se adiciona a la cubeta que contiene PRP y las plaquetas responden, cambios en la transmisión de luz ocurren y se recuperan con el tiempo por el aparato de registro.

Cuando las plaquetas sufren cambio en la forma en respuesta a un estímulo por un agente agregante, su tamaño más grande permite el paso de menos luz a través del PRP; éste es registrado como menor transmisión de luz a través de la muestra relativa al PPP. Si la dosis de agente agregante es lo suficientemente fuerte para causar que la plaquetas se adhieran una con otra y formen agregados, más luz es capaz de pasar a través de la muestra de PRP. El cambio en la transmisión de luz registrada, con el tiempo, muestra una tendencia hacia el PPP ó el 100% de transmisión de la luz. (2)

“In-vitro”, los registros de agregación son caracterizados por su apariencia:

- \* Cambio de forma
- \* Una primer onda de agregación (agregación primaria) que puede ser opuesta y regresar hacia la línea basal de PRP .
- \* Se presenta una segunda onda irreversible cuando las plaquetas secretaron gránulos y causan agregación adicional.

Las Curvas de agregación también son caracterizadas por:

- \* La máxima cantidad de cambio en la transmisión de la luz causada por el agente agregante (porcentaje de agregación).
- \* La pendiente (o frecuencia de la agregación), en porcentaje cambio de agregación por minuto.

#### **Agentes agregantes múltiples y dosis usualmente usadas para estimular las plaquetas.**

Diferentes agentes agregantes estimulan diferentes vías de activación plaquetaria, ya sea en sitios de unión o vías metabólicas. Concentraciones diferentes de agonistas se usan para obtener una serie de curvas (curvas de dosis-respuesta.).

El patrón de respuestas a éste panel de pruebas se compara para establecer los patrones de respuesta normal y anormal. Esta información se considera para relacionar la función plaquetaria como componente de hemostasia.

El agregómetro tiene un sistema magnético, que hace girar una barrita agitadora incluida en la cubeta de PRP en el momento del ensayo. Esta barrita agitadora simula la turbulencia sanguínea, fundamental para que se produzca la colisión entre las plaquetas y se mezcle el agente agregante incluido en la muestra. La temperatura a la que se realiza el ensayo es de 37° C .

Entre las distintas marcas de agregómetros existen algunos, en los que se puede regular la velocidad de agitación, en este caso se debe ajustar a 800-1000 rpm, dado que, en principio, la agitación es directamente proporcional a la respuesta agregante.

### **Obtención de la muestra.**

Para los estudios de función plaquetaria, es fundamental que el paciente no tome medicamentos que contengan aspirina desde los 10-12 días previos al estudio, y en lo posible que suspendan 48 h antes otros medicamentos (especialmente si son antiinflamatorios). Además, debe presentarse con un ayuno de más de 8 h.

Se extrae sangre venosa dejando drenar la sangre directamente a los tubos plásticos que contengan citrato de Na al 3.8% en una relación de nueve partes de sangre por cada una de citrato, luego se mezcla suavemente.

La relación entre la sangre y el anticoagulante depende del hematocrito, de allí que la relación 1/10 deberá ajustarse correctamente, debido a que el exceso de citrato, en el medio, modificará la disponibilidad de Calcio, ocasionando variaciones en la amplitud de las curvas de agregación.

### **Obtención del PRP.**

Se centrifuga la muestra (en centrifuga no refrigerada porque el frío estimula las plaquetas) a baja velocidad (200 g aproximadamente) durante 8-10 min. Es importante que la muestra de PRP esté libre de glóbulos rojos y blancos, debido a que los primeros modifican la disponibilidad de ADP y los segundos inhiben la agregación plaquetaria.

Posteriormente, se separa el PRP con pipetas plásticas o con pipetas automáticas y se le transfiere a tubos plásticos, que se tapan para evitar la oxidación del plasma. El resto de sangre se centrifuga nuevamente durante 20 min, a alta velocidad, para obtener el PPP que será utilizado para calibrar el aparato y para diluir el PRP a 200,000 plaquetas/microlitro.

### **Tiempo del ensayo de agregación.**

Debido a que las plaquetas necesitan ser metabólicamente activas, deberá realizarse el ensayo de agregación dentro de las 2 h desde la extracción de sangre y no antes de los 20 min., ya que responden menos, probablemente, porque aún no se haya metabolizado toda la PGI<sub>2</sub> que pudiera estar presente en la muestra.

Cada agregante se utiliza por separado y en cada prueba se utiliza una cubeta con 450 microlitros del plasma diluido en 300,000 plaquetas/microlitro (PRPd), al que se le incorpora la barra agitadora. Esta deberá enjuagarse en solución fisiológica o agua destilada, previa cada ensayo (o en el mejor de los casos descartarse en cada ensayo).

Los agentes agregantes o agonistas, después de prepararlos, deben guardarse en gradillas enfriadas.

### **Ensayo.**

El primer paso es la calibración del agregómetro. Se ajusta el 100% de densidad óptica con PRP y el 0% con PPP, correspondiente, en ambos extremos del papel graficado, que deberá correr a 2 cm/min. Al colocar la barra agitadora dentro del PRP, lo primero que se observa son las oscilaciones características de las plaquetas discoides en suspensión.

El primer paso, será ensayar la agregación espontánea durante 20 min, con el número de plaquetas original. Se considerará que existe agregación espontánea, cuando supere el 15% de agregación. En el caso que el ensayo de positivo, debe repetirse para descartar la presencia de sustancias, que activarían a las plaquetas, en el tubo en el que se realizó la prueba o adheridas a la barra agitadora. Si continúa siendo positiva, debe considerarse como una de las expresiones de hiperactividad plaquetaria. (2)

### **Agregación inducida por ADP.**

Al exponer las plaquetas al ADP, éste se unirá a los receptores específicos presentes en la membrana plaquetaria, causando la activación de la plaqueta, lo que desembocará en la liberación del ácido araquidónico (AA), desde los fosfolípidos de la membrana por activación de las fosfolipasas y la metabolización a TxA<sub>2</sub>, con la consecuente contracción y liberación del contenido plaquetario al medio.

Al estimular las plaquetas con ADP, en el registro de agregación, lo primero que se observa es un desplazamiento hacia el margen de menor transmitancia; esto se explica por el cambio de forma plaquetaria que las convierte en esferas con pseudópodos, lo que origina una mayor densidad óptica en la muestra; este proceso dura aproximadamente 16 seg y luego el trazo se dirige hacia el margen de máxima transmitancia. La curva de agregación inducida con ADP es bifásica. La primera onda se considera como el proceso que involucra la formación de puentes de fibrinógeno interplaquetario. Cuando una plaqueta se estimula, el cambio de forma lleva a una mayor superficie de contacto con la concomitante exposición de receptores para el fibrinógeno. Hasta el momento, se considera como receptor al complejo IIb IIIa presente en la membrana plaquetaria.

La segunda onda o fase de la agregación plaquetaria corresponde a la fase de liberación o secreción del contenido de los gránulos. Al liberarse al medio sustancias proagregantes ADP, Serotonina y Calcio, se amplifica el estímulo original.

Las concentraciones más comunmente utilizadas de ADP son: 2.5, 1.25 y 0.675 mM (concentración final en plasma). Normalmente con 2.5 mM no puede distinguirse primera y segunda ola; con 1.25 mM se pueden ver ambas olas de agregación, mientras que con 0.675 mM sólo la primera seguida de desagregación. En este último caso, de no cumplirse ésto, se puede considerar que existe hiperagregación plaquetaria y deberán probarse concentraciones menores. Cuando las plaquetas se estimulan con ADP, a cualquier concentración en un medio que contenga cantidades fisiológicas de Calcio, sólo la primera onda puede ser vista, por lo que la segunda ola es un artefacto del sistema que se usa.

### **Agregación con adrenalina.**

La adrenalina estimula los receptores alfa dos adrenérgicos, de tal forma que inhiben la adenilato ciclasa, y se previene el aumento de los niveles de AMPc intraplaquetarios, además de movilizarse el calcio ionizado desde las organelas que lo almacenan y de activarse las plaquetas, esto lleva a la liberación de AA endógeno con la formación de TxA<sub>2</sub> y la contracción y secreción plaquetaria.

La curva de agregación inducida con adrenalina es bifásica, las características de estas dos ondas son las mismas que las enumeradas para el ADP: la primera onda correspondería a la fijación del fibrinógeno al complejo IIb IIIa de la membrana plaquetaria y la segunda onda a la formación de TxA<sub>2</sub> y secreción plaquetaria.

### **Agregación con colágeno.**

Al inducir la agregación plaquetaria con colágeno, se intenta simular lo que ocurre en el organismo cuando es expuesto al subendotelio rico en colágeno.

Este agente agregante se utiliza en altas y bajas concentraciones, considerándose como baja a aquella que puede inhibirse con aspirina. Cuando se estimulan las plaquetas aspirinizadas con concentraciones altas de colágeno, se produce una respuesta plaquetaria normal, independizándose de la vía de la ciclo oxigenasa.

Cuando se incluye colágeno a la muestra de PRP, se produce un periodo de latencia, hasta que comienza una curva de agregación monofásica; se considera que esta latencia es el tiempo necesario para que las plaquetas se adhieran a las fibras de colágeno.

### **Agregación con Acido Araquidónico.**

Cuando se induce agregación con algún agonista, excepto el Acido Araquidónico, se verifica la actividad de las fosfolipasas para separar el Acido Araquidónico de la membrana.

Cuando se estimulan las plaquetas con Acido Araquidónico, se estudia la vía enzimática de la ciclo oxigenasa. La rápida metabolización de este compuesto a endoperóxidos cíclicos y TxA<sub>2</sub>, con la esperada respuesta agregatoria y secreción plaquetaria, es lo que origina una onda única de agregación, sin periodo de latencia, ante concentraciones que oscilan entre 0.5 y 1 mM. Concentraciones mayores producen lisis plaquetaria. También se estudia la trombosan-sintetasa que si lo haría, ya que esta última enzima está presente y fisiológicamente activa en la plaquetas aspirinizadas.

### **Agregación con Ionóforo A23187.**

Este compuesto es un potente ionóforo de calcio que moviliza, a través de membranas permeables, calcio, de los depósitos y también extracelular. Se considera que no sólo moviliza calcio, sino que también moviliza magnesio, pero éste último en una proporción del 10% de la cantidad de calcio movilizada.

La respuesta de agente es dosis dependiente, a bajas concentraciones provoca cambio de forma y agregación reversible, y a concentraciones más altas agregación y liberación del contenido granular, registrándose dos ondas de agregación. La acción del A23187 no depende del calcio extracelular, pero la respuesta se ve aumentada en medios que contienen calcio. Podría identificar aquellas patologías hemorrágicas, debidas a un trastorno en la movilización de calcio.

### **Agregación con Ristocetina.**

Este antibiótico actúa a través de la fijación del factor de von Willebrand (FvW) a la glicoproteína Ib, comportándose como cofactor de la reacción. En aquellos pacientes en que el nivel del cofactor de ristocetina es menor al 30%, la respuesta estará disminuida o ausente. La ausencia de respuesta también se produce en aquellas plaquetas que tengan disminuidas, ausente o alterada la glicoproteína Ib. La concentración final en plasma que se utiliza es de 125 mg/ml.

Si no existe "agregación", se deberá descartar la enfermedad de von Willebrand o de Bernard Soulier. Para esto se diluye el PRP del paciente con un pool de PPP normal (de por lo menos 10 donadores), como para aportar FvW, en caso de que el número de plaquetas del paciente no permita ser diluido, por ser bajo, se le agregan 50-100 microlitros de este pool de plasmas, y se induce aglutinación con la misma concentración de ristocetina. Si se corrige, es un déficit de FvW, el que fue aportado por el PPP normal.

La ristocetina debe utilizarse también a una concentración más baja: 0.6 mg/ml, para investigar un vonWillebrand IIb o pseudo von Willebrand, ya que ambos presentan hiperagregación con ristocetina. Para distinguir entre estas dos patologías, se deberá inducir agregación con PPP normal o crioprecipitado que, sin la presencia de ristocetina, producirá agregación en el pseudo von Willebrand y se hallará ausencia de respuesta en el von Willebrand IIb.

### **Agregación con Trombina.**

La trombina, generada por el sistema de coagulación, tiene propiedades enzima. Interactúa con la superficie plaquetaria en por lo menos dos sitios específicos. Uno de ellos es una unión a la glicoproteína Ib, glicoproteína integral de membrana, que aporta aproximadamente el 15% de carga negativa total de la membrana. La otra interacción con la membrana plaquetaria está relacionada con su actividad proteolítica. El sustrato es la glicoproteína V. Se desconoce todavía el significado de esta actividad proteolítica sobre la activación plaquetaria.

Cuando el PRP se activa con trombina a concentraciones intermedias 0.2-0.5 U/ml, se produce la formación de ácido fosfatídico con fosforilación de las proteínas 20K y 40K, mediante un mecanismo endoperóxido independiente.

La formación de ácido fosfatídico se debe a una interacción directa de la trombina con sus receptores específicos y la inmediata activación de la fosfolipasa C, proceso que no está afectado por los inhibidores de ácido araquidónico, tales como ácido acetil salicílico o indometacina. Probablemente es el más importante activador plaquetario in vivo.

### **Agregación con Factor Aactivador Plaquetario (PAF).**

El PAF es uno de los agonistas más potentes, ya que activa in vitro, las plaquetas humanas a concentraciones de 1-10 mM.

Una serie de células, como neutrófilos, basófilos y macrófagos, después de una estimulación específica, producen PAF. Las plaquetas lo sintetizan, pero en cantidades no detectables en condiciones fisiológicas.

Se han identificado receptores específicos para este agonista, aunque su caracterización ha sido difícil por la naturaleza hidrofóbica de la droga, que facilita su penetración a través de membranas lipídicas y por su metabolización por plaquetas y a nivel del plasma.

Cuando las plaquetas se activan con PAF, se fosforilan las proteínas endógenas 20K y 40K, en asociación con liberación de constituyentes de los gránulos plaquetarios. El PAF estimula el ciclo del fosfatidil-inositol, que provee tanto la información de 1-2 diacilglicerol para la activación de la proteinquinasa C como la movilización de Calcio.

### **Agregación con Esteres de Forbol (FMA).**

Los ésteres de forbol, sustancias promotoras de tumores, no actúan como la mayoría de los agonistas comunes. Provocan una reacción lenta y parcial de la respuesta plaquetaria.

A bajas concentraciones, el forbolmiristato acetato o el forboldibutirato, producen respuesta en la agregación sin provocar cambio de forma. Se unen a la membrana plaquetaria y activan la proteínasa C en forma directa, sin producir hidrólisis de fosfatidil inositol, liberación de ácido araquidónico o formación de metabolitos de ácido araquidónico. La acción sobre la proteínasa C se debe a la naturaleza similar del forbol con el 1-2 diacilglicerol y puede así reemplazarlo en la activación.

El uso de este inductor es, sobre todo, a nivel de investigación, faltando aún experiencia para conocer su real utilidad en el estudio de pacientes con alteraciones plaquetarias. (32)

## **Agregación por Impedancia en sangre total.**

La agregación plaquetaria "in vitro" es un esfuerzo para caracterizar la capacidad "in vivo" de las plaquetas para formar el tapón hemostático primario.

Las plaquetas se prueban en sangre anticoagulada, sin la necesidad de aislarlas de otros componentes sanguíneos. Como no es necesario centrifugar la muestra para producir una suspensión de células transparente ópticamente, se prueba la población entera de plaquetas. El proceso de la prueba consume menos tiempo técnico, y factores lábiles en la sangre que pueden influenciar sobre la función plaquetaria se conservan.

Los agregómetros de sangre total, consisten de un receptáculo de muestra incubado a 37°C. Se hace una remoción de las muestras usando barras removedoras magnéticas o barras removedoras desechables no magnéticas. En el receptáculo se colocan una cubeta conteniendo la muestra y una barra removedora.

El método de impedancia (resistencia eléctrica) de la agregación no es óptico. Un electrodo se inserta en la cubeta que contiene la muestra, éste electrodo consiste básicamente de dos alambres de metal inmersos en la muestra, un voltaje de corriente alterna en el rango milivoltaje se aplica al circuito de la sonda. El instrumento mide la resistencia eléctrica o impedancia entre dos cables sumergidos.

Durante un periodo breve de equilibración, una monocapa de plaquetas se forma en porciones expuestas de los cables, produciendo un valor de impedancia estable. A esta basal estable de impedancia se asigna un valor de cero (0) ohms de resistencia.

Se añade un agente agregante en la cubeta y se estimula la agregación plaquetaria a la monocapa plaquetaria sobre los cables inmersos. Esta acumulación de plaquetas añade resistencia eléctrica al circuito. Dichos cambios se miden y se cuantifican en ohms (medición de la resistencia eléctrica).

Las pruebas, por lo general, toman de 4 a 6 minutos después de añadir un agonista.

Los resultados de las pruebas de impedancia se cuantifican por:

- \* Ohms de agregación en un tiempo dado en la prueba.
- \* Frecuencia de la reacción en cambios de ohms por minuto.

El aumento en impedancia es directamente proporcional a la masa de plaquetas agregadas. La agregación por impedancia en sangre es más sensible a los efectos de agregación de ristocetina, así que puede ser más sensible a la enfermedad de von Willebrand que el tiempo de sangrado o el ensayo de VWF (cofactor ristocetina). La sensibilidad se aumenta también para la hiperagregación y fármacos como aspirina y dipiridamol cuando se compara a transmisión de luz en PRP. Esta agregación por impedancia no depende en características ópticas de la muestra, así que las pruebas pueden hacerse en muestras lipémicas y trombocitopénicas. Como no se necesita la centrifugación, ésta prueba se usa especialmente en condiciones en donde la cuenta de plaquetas está aumentada. (33, 34).

## **Medición de liberación de ATP : Luminiscencia.**

Esta liberación se mide por una técnica de rango de luz luminiscente Visible en PRP y sangre total. El principio básico del lumi-agregómetro es para medir secreción por un ensayo sensible a luminiscencia (luciferin-luciferasa) midiendo ATP extracelular en combinación con la medición simultánea de agregación.

La medición de luminiscencia es un principio simple, pero la cantidad de luz visible es pequeña y estable, el tubo de alta ganancia fotomultiplicador se necesita para medir luminiscencia simultánea con agregación; puesto que el origen de medición de luz de agregación óptica está en el rango infrarrojo, la interferencia con la medición fotomultiplicador en el rango visible se evita.

El fotomultiplicador es sensible a la luminiscencia, creado por el reactivo chrono-lume (luciferin-luciferasa) reaccionando con el ATP secretado por gránulos densos en sangre total, sangre diluida, PRP o plaquetas lavadas. Medición luminiscente de secreción de ATP da evidencia inequívoca de liberación de gránulos densos normales o dañados. Este aumenta la sensibilidad de la prueba para defectos de secreción y deficiencia de pool de almacenaje.

El lumi agregómetro de sangre total chrono-log puede medir tanto a la agregación y a la liberación de ATP, la agregación puede medirse en el PRP por el método óptico que registra cambios en la transmisión de la luz o por el método de impedancia ya sea en PRP o en sangre total. (31)

## **Tiempo de sangrado por método de Ivy.**

Cuando los vasos son cortados o lesionados, las plaquetas se adhieren al colágeno expuesto y una con otra para formar agregados llamados coágulos hemostáticos primarios. Estos coágulos detienen el sangrado de los pequeños vasos de la piel que fueron lesionados al hacer la prueba. Entonces, el tiempo de sangrado es para probar la capacidad de la función plaquetaria normal en el primer paso de la hemostasia.

La utilidad clínica del tiempo de sangrado, ha sido limitada por dificultades en la estandarización de la prueba. Originalmente, Duke describió que los vasos del lóbulo de la oreja eran puncionados. Ivy y colaboradores, aumentaron la sensibilidad de la prueba mediante la punción de la piel del antebrazo mientras aplicaban una presión de 40 mm de Hg a los vasos seccionados. Borchgrevink y Waller, modificaron la técnica de Ivy, sustituyendo las incisiones con navajas por heridas punzantes. Utilizando ésta técnica, ocasionalmente se obtuvieron tiempos de sangrado variables en incisiones posteriores en el mismo paciente debido a la dificultad para reproducir la profundidad de las incisiones. (35)

Hace algunos años, Frick describió sangrados anormales después de la administración de aspirina en pacientes cuyas anomalías hemostáticas se corrigieron cuando la aspirina se suspendió. Quick recientemente reportó que la prolongación del tiempo de sangrado después de la aspirina podría usarse para detectar pacientes con Síndrome de von Willebrand, quienes tenían un tiempo de sangrado normal o ligeramente prolongado antes de la aspirina.

La técnica, finalmente fue estandarizada, realizando una incisión de 9 mm de largo y de 1 mm de profundidad, dichas incisiones son reproducibles, por medio de los Simplates. (36)

In vitro, la aspirina interfiere con la agregación plaquetaria inducida por una concentración débil de colágeno y con una segunda onda de agregación inducida por una concentración crítica de ADP o por epinefrina. Cada una de éstas reacciones es mediada por la liberación de ADP por las plaquetas. Se ha demostrado la disminución de la liberación de ADP de las plaquetas en incubación con tejido conectivo en plasma rico en plaquetas de sujetos que recibieron aspirina. En consecuencia, uno está tentado a atribuir la prolongación del tiempo de sangrado a la interferencia de la liberación del ADP de las plaquetas in vivo, por la aspirina.

Se ha visto que la aspirina no sólo prolonga el tiempo de sangrado en sujetos normales, sino que aumenta fuertemente la cantidad de sangre perdida (36)

## **Patron de agregación plaquetaria en las Trombocitopatías.**

### **Trombocitopatías hereditarias.**

#### **Enfermedad de Bernard Soulier.**

Esta enfermedad se caracteriza por defecto en la adhesión plaquetaria (Gp 1b-IX), plaquetas gigantes y trombocitopenia; además no existe agregación plaquetaria inducida por ristocetina, tampoco al agregarse multímeros de factor de von Willebrand; sin embargo, en ocasiones puede observarse defectos en la agregación plaquetaria con trombina. Las plaquetas si agregan y secretan en forma normal en presencia de ADP, adrenalina y colágeno.

#### **Enfermedad de von Willebrand.**

Esta enfermedad se caracteriza por un defecto en la adhesión plaquetaria por una disminución en los niveles circulantes del factor VIII coagulante y por un defecto en la agregación plaquetaria inducida por ristocetina, pero con agregación normal con ADP, trombina, adrenalina y colágeno. A diferencia de la Enfermedad de Bernard Soulier la cuenta y la morfología plaquetaria son normales.

#### **Trombastenia de Glanzmann.**

En esta enfermedad las plaquetas son deficientes del complejo glucorreceptor IIb-IIIa, así como del fibrinógeno plaquetario (contiene sólo del 10% al 25%), por lo tanto existe un defecto en la activación del glucorreceptor para el ADP y en la unión al fibrinógeno extracelular, además de un defecto en la actina intracelular. El diagnóstico se establece por un tiempo de sangrado prolongado con retracción anormal del coágulo, ausencia en la agregación plaquetaria inducida por ADP, adrenalina, colágeno y trombina, con agregación normal inducida por ristocetina.

#### **Atrombia esencial.**

Las anomalías plaquetarias están íntimamente ligadas a la trombostenia de Glanzmann, ya que presentan también alteración en la Gp IIb-IIIa. El sistema de proteínas contráctiles es normal. No hay agregación con ADP, adrenalina y trombina.

#### **Anormalidades en la agregación secundaria.**

#### **Deficiencia de gránulos densos.**

La anomalía consiste en un defecto en la secreción de los cuerpos densos que incluyen serotonina, ATP, y ADP, además de encontrarse disminuido el contenido de estos gránulos, se asocia a un defecto en la movilización de calcio que puede explicar la alteración en la liberación de estos gránulos. El diagnóstico se establece al no observarse segunda onda de agregación inducida por ADP y con adrenalina y encontrarse agregación normal con ristocetina.

### **Deficiencia de gránulos alfa.**

También denominada Síndrome de la Plaqueta Gris, caracterizado por trombocitopenia moderada, plaquetas gigantes y de color gris a la microscopia de la luz y ausencia casi total en el contenido de los gránulos alfa (<15%). Las plaquetas no presentan la segunda onda de agregación plaquetaria con algunos agentes agregantes como la trombina, epinefrina y colágeno, además no liberan factor 4 plaquetario, ni betatromboglobulina ni el factor mitogénico.

### **Defectos primarios en la secreción plaquetaria.**

Estos defectos en el metabolismo del ácido araquidónico son indistinguibles del defecto del compartimiento de depósito desde el punto de vista clínico, sin embargo, el contenido de los gránulos es normal. Estos defectos pueden ser por deficiencia del ácido araquidónico o en su liberación o deficiencia de la enzima ciclooxigenasa o en tromboxano sintetasa que se traduce en un defecto en la disponibilidad de prostaglandinas, constituyendo el metabolito más importante el tromboxano A<sub>2</sub> que es un poderoso agente agregante, de tal manera que la deficiencia de este producto produce alteración en la segunda onda de agregación. Estas alteraciones también se conocen como defecto similar al provocado por la aspirina (Síndrome de aspirina like).

### **Medicamentos trombocitopáticos.**

Existe una lista de medicamento bastante considerable capaces de ocasionar alteraciones funcionales de las plaquetas. Entre los de mayor importancia se encuentra la aspirina, la cual a dosis bajas inhibe la síntesis de prostaglandinas al acetilar a la enzima ciclooxigenasa y con ello inhibe la secreción plaquetaria. Existen otros medicamentos de uso común como furosemide, pentoxifilina, cefalosporinas, nifedipina y verapamil que producen trombocitopatía.

## **Hipotesis.**

Los rangos de agregación plaquetaria en nuestra población se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura cuando se utilizan como agentes agregantes Acido araquidónico, ADP, Ristocetina y Colágeno en métodos de Impedancia y Optico.

## **Objetivo.**

Validar las pruebas de agregación plaquetaria en nuestra población utilizando el agregómetro Chrono-Log mediante los métodos de impedancia y óptico utilizando como agentes agregantes: Acido araquidónico, ADP, Colágeno y Ristocetina

## Material y métodos.

Se incluyeron en el estudio diecinueve voluntarios sanos quienes no habían ingerido ninguna droga, preferentemente aspirina por lo menos dos semanas previas al estudio.

Se aplicó a todos los voluntarios un cuestionario sobre los siguientes antecedentes.

Edad, Ingesta de medicamentos, Antecedentes hemorrágicos, Antecedentes quirúrgicos, Antecedentes transfusionales, Hemartrosis y Petequias.

Se obtuvo sangre total y se les realizó tiempo de sangrado por método de Ivy.

La sangre fué tomada de la vena antecubital y se depositó en tubos siliconizados que contenían citrato de Na al 3.8%.

El Plasma Rico en Plaquetas fué obtenido centrifugando la sangre total a 200 g durante 10 minutos y ajustando la cuenta de plaquetas a 200,000/ml 3 con plasma pobre en plaquetas. (PPP; 1000 g, 20 minutos) La agregación plaquetaria fué realizada en cubetas siliconizadas, utilizando un agregómetro (Chrono-log AGGRO/LINK) .

Se realizó en cada paciente la agregación plaquetaria en sangre total en primer lugar y en segundo la agregación el PRP. La sangre total fué diluida 1:2 con solución salina isotónica

Las pruebas fueron realizadas en sangre total 30 a 60 minutos después de haber obtenido la muestra y 60 a 100 minutos después en plasma rico en plaquetas.

Los agentes agregantes utilizados por ambos métodos fueron Colágeno, ADP, Ristocetina y Acido Araquidónico (Chrono-Par and Chrono-Lume Reagents) .

Se utilizaron las siguientes concentraciones de agentes agregantes:

Colágeno	1 mg/ml
ADP	1mM
Ristocetina	125 mg/ml
Acido araquidónico	50 mM

Cada voluntario sano ingirió 1 gr de aspirina y a las 24 horas se realizaron las agregometrias plaquetarias por ambos métodos y con los mismos agentes agregantes.

El tiempo de sangrado por Ivy fué realizado en condiciones basales y posteriormente a las 24 horas de que los pacientes sanos ingirieron 1 gr de aspirina utilizando simplates (Organon Teknika Corp).

Se tomaron como valores de referencia para las agregaciones plaquetarias las siguientes:

	IMPEDANCIA (Ohms)	OPTICO ( % )
Colágeno	21 +/- 3	> 70 %
ADP	9 +/- 4	> 70 %
Ristocetina	> 5	> 70 %
Acido araquidónico	11 +/- 4	> 70 %

Tiempo de sangrado por método de Ivy: de 6 a menos de 9 minutos.

## Resultados.

Los voluntarios incluidos fueron 10 mujeres y 9 hombre con edades comprendidas de los 25 a los 40 años (Media 31 años).

Ninguno tuvo antecedentes Hemorrágico ni transfusionales positivos.

Tres tuvieron antecedentes quirúrgicos positivos (2 casos de cesárea y 1 caso de nefrectomía)

Los resultados en las agregometrias basales y post-dosis de aspirina de acuerdo a los rangos de referencia establecidos obtuvimos

Con Colágeno por el método Optico en los 19 voluntarios obtuvimos agregación plaquetaria con rangos de > 70%, mientras que en las agregometrias post-aspirina obtuvimos en 18 voluntarios un porcentaje de agregación en el rango de 0 a 44% y sólo un voluntario con 91%. (Tablas 1 y 2)

Por el método de Impedancia en agregometrias basales utilizando Colágeno obtuvimos en 6 agregometrias rangos del  $21 \pm 3$  ohms, y en 13 agregometrias el rango fué de 26 a 40 ohms. Mientras que en las agregometrias post-aspirina con Colágeno obtuvimos:

12 agregometrias con el rango de 0 a 1 ohms.

5 agregometrias con rangos de 2 a 9 ohms y 2 agregometrias con 15 y 33 ohms respectivamente, lo cual hizo muy evidente el efecto de la aspirina.

Con ADP en las agregometrias basales por el método Optico los resultados fueron:

17 agregometrias con rangos de > 70%

2 agregometrias con rangos de 68 y 67% respectivamente

En las agregometrias post-aspirina con ADP:

2 agregometrias con rangos de 112 y 104 % respectivamente

6 agregometrias con rangos de < 70 %

11 agregometrias con rangos del 57 al 80 %.

Por el método de Impedancia con ADP en las agregometrias basales:

10 agregometrias con rangos normales ( $9 \pm 4$  ohms)

2 agregometrias con rangos de 4 y 2 ohms

7 agregometrias con rangos de 14 a 45 ohms. (Tabla 1)

Al comparar con los resultados post-aspirina se observa en las tablas 1 y 2 que solamente

4 agregometrias disminuyeron su rango de agregación (0 a 4 ohms)

12 agregometrias no tuvieron modificaciones importantes en sus rangos de agregación (7 a 11 ohms) y en 3 agregometrias los rangos de agregación se incrementaron.

La agregación plaquetaria con Ristocetina por método Óptico en los 19 voluntarios se obtuvieron rangos de > 70 %

Post-aspirina: 8 agregometrías con rangos de 28 a 69%

2 agregometrías con rangos de 3%

Agregometrías basales por Impedancia :

19 agregometrías con rangos normales (> 5 ohms)

Post-aspirina:

En 9 agregometrías disminuyó el rango de agregación (< 5 ohms)

y 10 agregometrías rangos normales (> 5 ohms)

Agregometrías basales con Acido Araquidónico por método Óptico:

19 agregometrías con rangos de > 70%

Post-aspirina: las 19 agregometrías con rangos notablemente disminuidos (0 a 8%).

Por el método de Impedancia en las agregometrías basales:

18 agregometrías con rangos normales (7 a 15 ohms)

1 agregometrías con rango de 1 ohm.

Post-aspirina:

17 agregometrías con rangos de 0 a 2 ohms

2 agregometrías con rangos de 8 a 14 ohms respectivamente.

El colágeno es un agente agregante muy sensible para detectar el efecto de aspirina utilizando tanto Plasma rico en plaquetas como sangre total a diferencia del ADP en el cual no se evidenció diferencia significativa entre las agregometrías basales y las post-dosis de aspirina utilizando sangre total, no así con PRP

Obtuvimos en la agregometría de dos voluntarios inducida por ADP utilizando Plasma rico en plaquetas por método de impedancia valores incluso más altos post-dosis de aspirinas que en la agregometría basal, lo cual sugiere que el Plasma pobre en plaquetas no fué correctamente centrifugado, por lo que éste es un factor que debe tomarse en cuenta para la realización de agregometrías por impedancia.

En las agregometrías plaquetarias realizadas con ristocetina tampoco se evidenció una diferencia importante entre las basales y las realizadas después de la ingesta de aspirina, por lo que no se recomienda la ristocetina como un agente útil en la evaluación de trombocitopatías por aspirina

Al comparar las agregometrías basales y post-dosis de aspirina tanto por el método óptico como por el método de impedancia utilizando Acido araquidónico, se encontraron diferencias significativas en los valores de agregación, ya que éste fué el agente agregante mas sensible para valorar los efectos inducidos por aspirina en nuestros voluntarios.

Al comparar la cifra plaquetaria en la cuenta basal con la obtenida después de la aspirina no se hubo modificaciones, por lo que la aspirina por si misma no produce trombocitopenia. (Tabla 3)

En cuanto al tiempo de sangrado por método de Ivy nuestra media en la toma basal fué de 4 min 87 segundos, y el valor de la media post-dosis de aspirina fué de 9 minutos 32 segundos, por lo que ésta prueba fué sensible para detectar el efecto de aspirina en pacientes sanos.

**Tabla 1**  
**Agregometrias plaquetarias basales**  
**Comparación entre método óptico e impedancia**

No.	BASALES							
	OPTICO				IMPEDANCIA			
	PLASMA RICO EN PLAQUETAS				SANGRE TOTAL			
	COLAGENO	ADP	RISTO	AA	COLAGENO	ADP	RISTO	AA
1	105	106	108	94	23	5	20	12
2	85	81	91	84	40	10	16	27
3	84	86	101	91	28	6	26	24
4	84	90	71	92	24	8	42	18
5	90	102	85	91	18	5	17	14
6	99	100	106	96	24	13	34	17
7	101	112	111	112	20	12	26	14
8	100	100	104	90	32	25	34	24
9	101	91	103	100	30	10	42	1
10	92	89	81	94	35	45	42	27
11	81	84	85	77	28	14	22	25
12	85	68	91	83	26	13	19	10
13	102	89	103	97	22	6	20	6
14	79	66	66	66	30	2	22	24
15	101	95	100	100	31	20	44	19
16	100	92	98	91	34	40	40	5
17	86	91	100	92	38	16	23	23
18	93	96	111	99	30	20	24	20
19	113	107	112	109	26	4	37	23

**Tabla 2**  
**Agregometrias plaquetaria post-aspirina**  
**Comparación entre método óptico e impedancia**

No.	POST-DOSIS ASPIRINAS							
	OPTICO				IMPEDANCIA			
	PLASMA RICO EN PLAQUETAS				SANGRE TOTAL			
	COLAGENO	ADP	RISTO	AA	COLAGENO	ADP	RISTO	AA
1	2	62	88	0	1	4	4	0
2	5	112	114	8	5	13	5	0
3	6	76	99	1	3	10	14	0
4	6	77	28	4	0	16	0	0
5	5	57	83	0	1	0	18	8
6	7	68	65	0	15	2	0	0
7	3	78	54	1	0	7	1	0
8	16	72	109	1	33	21	35	0
9	91	78	96	1	8	1	20	2
10	11	65	3	2	1	11	0	0
11	16	104	111	0	1	14	7	0
12	0	68	69	0	0	19	0	0
13	4	84	112	1	2	7	15	1
14	7	75	3	3	1	7	10	1
15	44	72	35	1	9	9	19	0
16	15	73	98	0	1	14	0	0
17	2	70	35	2	1	20	12	14
18	9	80	37	0	0	15	0	0
19	2	69	36	0	0	11	2	2

**Tabla 3**  
**Número de plaquetas y tiempo de Sangrado por Ivy**

No.	BASALES		POST-ASPIRINA	
	PLAQUETAS	IVY	PLAQUETAS	IVY
1	237	7.30	236	14.00
2	141	4.00	142	11.00
3	272	5.00	262	11.00
4	263	6.00	305	10.30
5	203	5.30	198	11.00
6	267	3.30	228	7.30
7	411	4.00	417	7.00
8	247	3.30	228	7.00
9	247	4.30	271	6.30
10	185	4.00	178	8.00
11	161	7.00	163	13.00
12	201	3.00	188	8.00
13	205	5.00	200	10.00
14	302	5.30	296	11.00
15	266	8.30	269	8.30
16	230	4.30	247	7.30
17	265	5.30	263	10.00
18	162	4.00	159	8.30
19	251	4.00	250	8.30

## Conclusiones.

La agregación plaquetaria puede estudiarse por el método de impedancia y por el óptico tomando en cuenta los siguientes aspectos:

Es recomendable la realización de agregometrías utilizando Colágeno por el método óptico (PRP) en pacientes en quienes se sospeche alguna trombocitopatía, no así el método de impedancia el cual según los resultados es menos sensible para detectar el efecto de la aspirina.

El ADP, de acuerdo con nuestros resultados es recomendable sólo cuando se utilice Plasma rico en plaquetas para valorar la probable existencia de un defecto en plaquetario, no así en sangre total, y de importancia en el método óptico es la correcta centrifugación para obtener un Plasma pobre en plaquetas.

En cuanto a la utilidad de Ristocetina está bien documentada su utilidad en el diagnóstico de la Enfermedad de von Willebrand, y corroboramos con nuestros resultados que es un agente no recomendable para valorar los efectos de aspirina sobre la función plaquetaria.

El uso del Acido araquidónico como agente agregante para valorar los efectos de aspirina es muy recomendable ya que como nuestros resultados lo evidencian es el agente agregante más sensible a los efectos de la misma comparándolo con los otros tres agentes utilizados, tanto por el método de impedancia como por el método óptico, por lo que es un agente capaz de detectar por ambos métodos un defecto en la función plaquetaria.

En cuanto al Tiempo de sangrado por el método de Ivy, es una prueba sensible para valorar los efectos de aspirina y detectar trombocitopatías, por lo que la consideramos como una primera opción en el diagnóstico de trombocitopatías.

Indudablemente cada método tiene sus ventajas, así, el método de Impedancia es muy recomendable puesto que la población plaquetaria es estudiada en un medio más fisiológico que contiene a todas las células sanguíneas y es muy útil en aquellos pacientes con trombocitopenia y en pacientes pediátricos, y otra ventaja es de que se puede realizar en pacientes con hiperlipoproteinemia. Por lo tanto podemos decir, que utilizando sangre total en diferentes tipos de pacientes la prueba de agregometría plaquetaria con sangre total puede utilizarse como prueba de screening convenientemente para la detección de disfunciones plaquetarias.

## **Bibliografía.**

- 1.- **H. Holsen.** Physiological functions of platelets. *Annals of Medicine* 21:23-30,1989
- 2.- **M. Maugeri; M.A. Lazzari,** Manual de Hemostasia y trombosis (GrupoCLAHT) 1a. edición 1984
- 3.- **Born G.V.R. Quantitative investigations in to the aggregation of blood platelets.** *J Physiol* 162,67 (1962).
- 4.- **Ashby B; Daniel J.L. Mechanisms of platelet activation and inhibition** *Hematology/Oncology Clinics of North America.*4;1:1990.
- 5.- **Holmsen H.** Responses ans Metabolism Vol. I 1986.
- 6.- **Holmsen H., Karpatkin S. Metabolism of platelets.** *Hematology* McGraw-Hill 1983:1149-76
- 7.- **Holme S.** In vitro platelet responses: Shape change. Platelet responses and metabolism. Vol Y 1986.
- 8.- **Gear A.R.L.** In vitro platelets responses: Aggregation. In Platelet responses and metabolism. Vol I . 1986:97-114.
- 9.- **McManama G.P. Johnson P.C., Salzman E.W.** In vitro platelets responses: Adhesion of artificial surfaces. Platelet Responses and Metabolism Vol I 1986:63-81
- 10.- **Stolz J.F.** Uptake and storage serotonin by platelets. IN: Vanhoutte P.M.:1985 : 37-42
- 11.- **Kaplan K.L.** In vitro platelet responses : a-granule secretion In: Holmsen H. de Plateletresponses and metabolism Vol I 1986:145-62
- 12.- **Niewiarowski S., Holt J.C.** Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins. In: Colman R.W. Hemostasis and thrombosis. Philadelphia, 1987:618-30.
- 13.- **Kaplan K.L. Dautier M.J., Rose S.** ADP and epinefrine induced release of platelet fibrinogen. *Blood* 1981:58:797
- 14.- **Chesney C. Piter D., Colman R.W.** Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1981,78:5180
- 15.- **Fitzgerald L.A. Phillips D.R.** Platelet membrane glycoproteins. In: Colman R.W. Hemostasis and thrombosis 1987:572-93

- 16.- **Weiss H.J.L.** Heterogeneity in storage pool deficiency: Studies on granule-bound substances in 18 patients. *Blood* 1979; 54: 1296.
- 17.- **Bennet J.S.** The molecular biology of platelet membrane proteins. *Blood* 1990;27:186-204.
- 18.- **Ginsberg M.H., Loftus J.C.** Cytoadhesins, integrins and platelets. *Thromb Haemost* 1988;59:1-6.
- 19.- **Bray P.F. Shuman M.A.** Molecular analysis of the genes for platelet glycoproteins GP IIb-IIIa in a normal population. *Blood* 1990;75:881
- 20.- **Burk C.D. Newman P.J.,** A deletion in the gene for glycoprotein IIb associated with Glanzmann's thrombasthenia. *J Clin Invest* 1991;87:270
- 21.- **Lawler J., Hynes O.** An integrin receptor on normal and thrombasthenic platelet that binds thrombospondin. *Blood* 1991;74:2022-2027.
- 22.- **Kiefel V. Santoso S.** The Bra/Brb alloantigen system on human platelets *Blood* 1989;73:2219-2223.
- 23.- **Coller B.S., Beer J.H.** Collagen-platelet interactions. *Blood* 1989;74:182-192
- 24.- **Giancotti F.G., Languino L.R.** Platelets express a membrane proteins complex immunologically related to the fibroblast fibronectin receptor and distinct from GPIIb/IIIa. *Blood* 1987; 69:1535-1538.
- 25.- **Sonnenberg A.** Laminin receptor on platelets in the integrin VLA-6. *Nature* 1988;360:487-489.
- 26.- **Du X, Beutler L,** Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood* 1987;69:1524-1527
- 27.- **Berndt M.C., Chong B.H.** Molecular characterization of quinine/quinidine drug dependent antibody platelet interactions. *Blood* 1985;66:1292-1301.
- 28.- **Weiss H.J., Turrito V.T.,** Platelets adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in GPIIb-IIIa. *Blood* 1986;67:322-330.
- 29.- **Bienz D., Schnipperinf W.** Glycoprotein V is not the thrombin activation receptor on human blood platelets. *Blood* 1986;68:720-725.
- 30.- **Knapp W, Dorken B.,** CD antigens 1989. *Blodd* 1989;74:1448-1450
- 31.- **Feinman R.D., Lubowsky J,** The lumiaggregometer. A new instrument for simultaneous measurement of aggregation and secretion . *J. Lab. Clin Med.* 90, 125, 1977.

- 32.- **Feinman R.D., Detwiler T.C., Ingerman- Wojenski C.,**  
The lumi-aggregometer as a research and clinical tool 1984
- 33.- **Cardinal D.C. and Flower R.J.,** The electronic aggregometer  
A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Meth* 3 (135),158, 1980.
- 34.- **Ingerman-Wojenski C, Smith B.** Evaluation of electrical aggregometry  
comparison with optical aggregometry, secretion of ATP and accumulation  
of radiolabeled platelets. *J Lab Clin Med* 101.44, 1983
- 35.- **Mielke C.H., Kaneshiro I.A.,** The standarized normal Ivy bleeding time  
and its prolongation by aspirin. *Blood*;34,2:204-214, 1969.
- 36.- **Channing R.P., Levin J,** A critical reappraisal of the bleeding time  
*Semin Thromb and Hem* 16;1, 1990.

ESTA TESIS NO SE DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA