



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“PLAQUETAS: MORFOLOGÍA, BIOQUIMICA, FUNCION, PATOLOGIA Y
PRUEBAS PARA EL DIAGNOSTICO” (CONCEPTOS ACTUALES)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:**

**MARYBELL GONZALEZ LEYVA
LAURA MORENO ARANDA**

ASESOR: Q.B.P. ANTONIO SANCHEZ ORTEGA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DOY GRACIAS Y DEDICO ESTA TESIS A:

DIOS que me permitió cursar esta maravillosa carrera y terminar la tesis.

MIS PADRES que fomentaron en mi la importancia de estudiar, además de apoyarme incondicionalmente y creer en mi, por ser un ejemplo a seguir..

MIS HERMANOS Yolanda, Ernesto, Patricia, Gustavo, y Sandra, por ayudarme moral, económicamente y activamente durante toda la carrera y en la realización y culminación de esta tesis.

MIS SOBRINOS Beto, Yessy, Lesly y Ale por su fe en mi y ser la inspiración para superarme cada día.

MARYBELL por tu ayuda, por tu paciencia, por tu comprensión en los momentos malos y buenos y por haber compartido esta tesis.

ANA CLAUDIA por todas las veces que nos sacaste de apuros, por darme animo cuando me deprimía, por consolarme cuando creía que no había solución.

MIS AMIGOS Guadalupe, Paco (bodoco), Enrique, Domingo (sunday), Alma, Sandra, Angélica, Ale (Aboytes, Arriaga, Flores, Cordero), Liza, Shaq, Irma, Marco, Diana, y todos aquellos que no menciono, pero sabes que eres tú, que contribuyeron en alguna forma para que pudiera terminar la carrera y realizar esta tesis.

MIS PROFESORES por todo el conocimiento que compartieron conmigo.

MI ASESOR por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por enseñarme que ser un buen profesor no esta peleado con una buena amistad, y por aguantarnos.

LAURA.

DEDICO ESTA TESIS:

A MI FAMILIA que me brindo siempre cariño y apoyo cuando más lo necesite, espero que mi triunfo lo sientan como el suyo propio.

A MIS PADRES a quienes jamás encontraré la forma de agradecer sus esfuerzos y sacrificios que me han brindado cada segundo de mi vida, y que cada ideal, esfuerzo y logro obtenidos han sido también suyos e inspirados en ustedes.

A TI MAMÁ por haberme dado todo y enseñarme a luchar por lo que se quiere, por guiar mi camino y estar siempre junto a mi en los momentos difíciles.

A MIS AMIGOS que me han acompañado a lo largo de mi vida, por sus consejos y palabras de aliento, siempre estarán en mi corazón

A LAURA por formar parte de este sueño que hoy se ve culminado, por tu paciencia, apoyo y sobre todo por dejarme tenerte como amiga.

A ANA CLAUDIA de quien he aprendido que no es lo que cuenta lo que tienes en la vida, si no a quienes tienes en ella, a tu familia (paco, alma, mashi) por su apoyo incondicional.

A ENRIQUE ARMANDO por todo lo que me has dado, por la confianza que me has transmitido día con día, con tan solo haber creído en mi.

A MI PEQUEÑO ERICK quien es mi fuerza para seguir adelante, y espero que algún día comprendas que no hay soluciones fáciles para problemas difíciles, que hay que luchar por lo que queremos.

A MI ASESOR lo unico que acierto a decir es **GRACIAS** por su infinita paciencia y apoyo brindado en el transcurso de la realización de esta tesis, por ser mi asesor, profesor y amigo.

... y principalmente a ti que no creíste en mi, y que hoy tienes entre tus manos mi sueño hecho realidad.

MARYBELL.

INDICE

I.- INTRODUCCION

II.- DEFINICION

III.- MICROSCOPIA LUMINOSA

IV.- MICROSCOPIA ELECTRONICA

V.-MORFOLOGIA

GLICOCALIX

MEMBRANA PLASMATICA

SISTEMA CANALICULAR ABIERTO CONECTADO A LA SUPERFICIE

SISTEMA TUBULAR DENSO

CITOESQUELETO

MEMBRANA DEL CITOESQUELETO

MICROFILAMENTOS

MICROTUBULOS

GRANULOS

GRANULOS α

CUERPOS DENSOS

LISOSOMAS

MICROPEROXISOMAS

MITOCONDRIAS

RIBOSOMAS Y RNAm

VESICULAS RECUBIERTAS

GLUCÓGENO

VI.- MEGACARIOCITOS

ORIGEN Y PROLIFERACION DE LOS MEGACARIOCITOS

PROGENITORES INMADUROS
PROMEGACARIOBLASTOS
MADURACION NUCLEAR: DESARROLLO DE POLIPLOIDIA
MEGACARIOCITOS MADUROS
CARACTERISTICAS DE LA MADURACION DE LOS MEGACARIOCITOS
ANATOMIA
MICROSCOPIA LUMINOSA
VARIACIONES EN EL TAMAÑO Y LA MORFOLOGIA
DISTRIBUCION MEGACARIOCITICA
MICROSCOPIA ELECTRONICA
MEMBRANAS DEL MEGACARIOCITO
GRANULOS DE LOS MEGACARIOCITOS
GRANULOS α
CUERPOS DENSOS
LISOSOMAS
MICROPEROXISOMAS
CITOESQUELETO

VII.- FORMACION Y LIBERACION PLAQUETARIA

MECANISMOS DE PRODUCCION PLAQUETARIA
SITIOS DE PRODUCCION PLAQUETARIA
REGULACION DEL TAMAÑO DE LA PLAQUETA
REGULACION DE LA TROMBOPOIESIS Y MEGACARIOCITOPOIESIS

VIII. – FUNCIONES

ADHESIÓN PLAQUETARIA
COLAGENO

FACTOR VON WILLEBRAND
FIBRONECTINA
FIBRINOGENO
RECEPTORES DE ADHESION EN PLAQUETAS

AGREGACIÓN PLAQUETARIA

UNION DE FIBRINOGENO SOLUBLE A PLAQUETAS EN SUSPENSION
REQUERIMIENTO DE CATION
SITIOS DE UNION A INTEGRINA EN FIBRINOGENO
INHIBICION DEL FIBRINOGENO DE UNION POR PEPTIDOS DERIVADOS DE
FIBRINOGENO Y OTRAS MOLECULAS.
MECANISMOS GENERALES DE SEÑALIZACIÓN DE LA ACTIVACIÓN
PLAQUETARIA
ACTIVACION PLAQUETARIA POR AGONISTAS SOLUBLES
TROMBINA Y RECEPTORES DE TROMBINA
ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE TROMBINA
MECANISMO DEL RECEPTOR DE TROMBINA
SEÑALES DE TRANSDUCCION GENERADAS POR EL RECEPTOR DE
TROMBINA
ACTIVACION PLAQUETARIA POR EL ÁCIDO ARAQUIDONICO
ACTIVACION PLAQUETARIA POR EL FACTOR PLAQUETARIO ACTIVANTE
ACTIVACION PLAQUETARIA POR ADP
ACTIVACION PLAQUETARIA POR EPINEFRINA
SEÑAL DE TRANSDUCCION
EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES EN LA UNION DE
FIBRINOGENO A α IIb β 3
EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES EN FIBRINOGENO DE UNION
A α IIb β 3 Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA
ADHESION PLAQUETARIA A FIBRINOGENO INMOVILIZADO
ACTIVACION DE PLAQUETAS POR COLAGENO A TRAVES DE RECEPTORES
DE ADHESION A COLAGENO
CAMINOS DE SEÑALIZACION

RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR COLAGENO

SEÑALIZACIÓN INDUCIDA POR GLICOPROTEINA Ib

INHIBICION NATURAL QUE OCURRE EN LOS MECANISMOS DE ACTIVACION Y AGREGACION PLAQUETARIA

PROSTAGLANDINAS INHIBIDORAS

OXIDO NITRICO

INTERNALIZACION DE LA INTEGRINA α IIb β 3

ECTOPROTEIN CINASA

REACCION DE LIBERACION PLAQUETARIA

CAMBIO DE FORMA PLAQUETARIA

EL CITOESQUELETO EN LA ACTIVACION PLAQUETARIA

FORMACION DEL COAGULO

RETRACCION DEL COAGULO

IX.-TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACION PLAQUETARIA

RECUESTO DE PLAQUETAS

-METODO DE CONTRASTE DE FASES

-RECUESTO INDIRECTO DE PLAQUETAS

TIEMPO DE SANGRADO DE IVY CON EL SIMPLATE

RETRACCION DEL COAGULO

ADHESIVIDAD PLAQUETARIA: METODO <<IN VIVO>>

TECNICA DE ADHESIVIDAD DE SALZMAN

ADHESIVIDAD AL VIDRIO. TECNICA DE BREDDIN

TECNICA DE ADHESIVIDAD DE HELLEM (HELLEM II)

TECNICA DE ADHESIVIDAD DE PROST

TECNICA DE ADHESIVIDAD AL COLAGENO DE SPAET

AGREGACION PLAQUETARIA

AGREGADOS CIRCULANTES DE PLAQUETAS

VALORACION DE LA AGREGACION POR LA TECNICA FOTOCOLORIMETRICA DE BORN

DISPONIBILIDAD DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO (METODO DE LA CELITA)

PRUEBA DE DISPONIBILIDAD DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO. TIEMPO DE DETERMINACION DE ANTICUERPOS PLAQUETARIOS POR ENSAYO DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO

ENSAYO DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO PARA ANTICUERPOS ANTIDROGAS

FACTOR 4 PLAQUETARIO (ACTIVIDAD HEPARINICA)

INDICE DE MEGATROMBOCITOS

PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DE COOMBS PARA DETECTAR IgG Y C3 EN PLAQUETAS

X. CLASIFICACION DE LOS TRASTORNOS PLAQUETARIOS

A. ALTERACION CUANTITATIVA DE LAS PLAQUETAS.

TROMBOCITOPENIA.

A) TROMBOCITOPENIA CAUSADA POR DISMINUCIÓN O DÉFICIT EN LA PRODUCCIÓN DE LAS PLAQUETAS.

CONGÉNITOS

PANCITOPENIA CONSTITUCIONAL (SÍNDROME DE FANCONI).

TROMBOCITOPENIA MEGACARIOCÍTICA CON MALFORMACIONES CONGÉNITAS.

DÉFICIT DE TROMBOPOYETINA.

TROMBOCITOPENIA HEREDITARIA.

INFILTRACIÓN DE LA MEDULA (LEUCEMIA CONGÉNITA, RETICULOENTOLELIOSIS).

RUBÉOLA NEONATAL.

ASOCIADA CON LA INGESTIÓN MATERNA DE DIURÉTICOS TIACÍDICOS.

ADQUIRIDOS

ANEMIA APLÁSICA.

INFILTRACIÓN DE LA MEDULA (CARCINOMA, LEUCEMIA, MIELOFIBROSIS, TUBERCULOSIS, ETC.).

RADIACIONES IONIZANTES, FÁRMACOS MIELOSUPRESORES

FÁRMACOS QUE ACTÚA ESPECÍFICAMENTE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS.

TROMBOCITOPENIA CÍCLICA.

DESNUTRICIÓN.

INFECCIONES VÍRICAS.

HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA.

B) TROMBOCITOPENIA CAUSADA PREDOMINANTEMENTE POR AUMENTO DE LA DESTRUCCIÓN PLAQUETARIA.

CONGÉNITAS NO INMUNOLÓGICAS ERITROBLASTOSIS FETAL.

TROMBOCITOPENIA DE LOS PREMATUROS.

TROMBOSIS DE LA VENA RENAL.

INFECCIÓN.

SÍNDROME DE TROMBOCITOPENIA CON HEMANGIOMA.

INMUNOLÓGICAS

SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS.

TROMBOCITOPENIA NEONATAL ISOINMUNE.

PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA IDIOPÁTICA MATERNA.

ADQUIRIDAS NO INMUNOLÓGICAS

TROMBOCITOPENIA ASOCIADA CON INFECCIÓN.

COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA.

PÚRPURA TROMBÓTICA TROMBOCITOPÉNICA.

SÍNDROME HEMOLÍTICO-URÉMICO.

FÁRMACOS DIRECTAMENTE TÓXICOS PARA LAS PLAQUETAS CIRCULANTES.

ADQUIRIDAS INMUNOLÓGICAS

PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA INMUNOLÓGICA INDUCIDA POR FÁRMACOS.

PÚRPURA TRANSFUNCIONAL.

PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA IDIOPÁTICA AGUDA Y CRÓNICA.

TROMBOCITOPENIA PRODUCIDA PREDOMINANTEMENTE POR SECUESTRO DE PLAQUETAS

ESPLENOMEGALIA Y SECUESTRO ESPLÉNICO.

HIPOTERMIA.

TROMBOCITOPENIA CAUSADA PREDOMINANTEMENTE POR PÉRDIDA DE PLAQUETAS

TROMBOCITOPENIA ASOCIADA CON HEMORRAGIA Y TRANSFUSIONES MÚLTIPLES DE SANGRE.

PERFUSIÓN EXTRACORPÓREA.

TROMBOCITOSIS Y TROMBOCITEMIA

B. ALTERACION CUALITATIVA DE LAS PLAQUETAS.

TROMBASTENIA Y TROMBOCITOPATÍAS

TROMBASTENIA.

ENFERMEDAD DEL POOL DE ALMACENAMIENTO.

SÍNDROME DE BERNARD-SOULIER.

TROMBOCITOPENIA TROMBOPÁTICA.

ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND.

AFIBRINOGENEMIA CONGÉNITA.

TROMBOCITOPATÍA ASOCIADA CON ENFERMEDADES O SÍNDROMES CONGÉNITOS ESTABLECIDOS.

TROMBOCITOPATÍAS ADQUIRIDAS DEBIDAS A DROGAS.

DEFICIENCIAS ENZIMÁTICAS CONGÉNITAS.

TROMBOCITOPATÍA ADQUIRIDA SECUNDARIA A OTRAS ENFERMEDADES.

XI.-

JUSTIFICACIÓN.....132

XII.- TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1.- Constituyentes lisosomales plaquetarios
TABLA 2.-Localización de proteínas de los granulos α en plaquetas/megacariocitos

TABLA 3.-Clasificación de las trombocitopenias

TABLA 4.- Clasificación. de la trombosis y la trombocitemia

TABLA 5- Clasificación de los trastornos plaquetarios funcionales

TABLA 6.-Lista parcial de farmacos que inhiben la función plaquetaria

FIGURA 1.-Plaqueta vista por microscopia electronica

FIGURA 2.-Representación esquemática de la ultraestructura de las plaquetas como se observa en el corte ecuatorial (a) y longitudinal (b)

FIGURA 3.-Estructura del fibrinogeno

FIGURA 4.-Estructura de la GPIb-V-IX

FIGURA 5.-Estructura y activación

FIGURA 6.-Medición de la agregación plaquetaria

FIGURA 7.- Señales de transducción

FIGURA 8.- Activación del receptor se trombina

XIII. BIBLIOGRAFIA

I.- INTRODUCCION

El objetivo de este trabajo es dar a conocer los aspectos más actuales que involucran a las plaquetas como lo son: su morfología, bioquímica, su funcionamiento, las técnicas de laboratorio que existen para su evaluación, así como algunas de las patologías en donde intervienen.

Las plaquetas son pequeños fragmentos de célula, adaptadas para adherirse a vasos sanguíneos dañados. Se producen en la médula ósea por invaginación y fragmentación del citoplasma de los megacariocitos.

Las plaquetas contienen casi todos los rasgos ultraestructurales de un glóbulo blanco (excepto el núcleo) y una compleja maquinaria enzimática para el metabolismo de la energía y de los lípidos. Al entrar al torrente circulatorio las plaquetas tienen una vida media de unos 10 días.

Su principal función biológica es mantener la integridad y restablecer la continuidad cuando se produce una lesión de la pared vascular. Esta función se cumple por medio de una serie de reacciones interrelacionadas: 1) las plaquetas se adhieren a estructuras subendoteliales expuestas de la pared vascular, 2) las plaquetas experimentan la reacción de liberación selectiva de diferentes sustancias almacenadas en organelos intracelulares especializados para tal fin; se han identificado dos tipos principales de gránulos de almacenamiento: gránulos densos y gránulos α , 3) Las plaquetas se adhieren entre sí, lo cual se conoce como agregación, reacción desencadenada por la liberación de ADP y tromboxano A₂. Esta secuencia de reacciones lleva a la detención primaria de la hemorragia por formación del tapón hemostático inicial. Junto con la reacción de liberación de las plaquetas, el fosfolípido activo coagulante se expone sobre la superficie de la plaqueta (disponibilidad de factor 3 plaquetario), lo cual facilita la interacción de factores coagulantes con formación de una red de fibrina, que estabiliza el tapón primario de plaquetas. Finalmente, las plaquetas interactúan con fibrina polimerizante, que puede ser esencial para la retracción del coágulo, pero queda por demostrar la importancia de este fenómeno in vitro para la hemóstasis in vivo.

Estas acciones contribuyen a la hemóstasis para formar un tapón plaquetario y después reforzar el tapón por acción del polímero de fibrina (coágulo) que convierte al fibrinógeno en fibrina de la trombina. Para alcanzar esta tarea, la plaqueta tiene receptores de superficie

que pueden unirse a glicoproteínas (GP); estas incluyen al complejo GP Ib / IX / V, que ayuda a la adhesión plaquetaria por unión del factor Von Willebrand bajo condiciones constantes de herida grave, y el receptor GP IIb / IIIa el cual es plaqueta específico y mediador de la agregación plaquetaria por unión de fibrinógeno y / o Von Willebrand. Otros receptores como glicoproteínas adhesivas (GP Ia / IIa ($\alpha 2 \beta 1$), GPVI y GP65 para colágeno; GP Ic / IIa ($\alpha 5 \beta 1$) para fibronectina; y GP Ic / IIa ($\alpha 6 \beta 1$) para laminina) los cuales contribuyen para la adhesión plaquetaria, pero su precisa contribución es menos definida.

La actividad coagulante de la plaqueta empieza desde la exposición de la carga negativa de los fosfolípidos en la superficie de la plaqueta y micropartículas plaquetarias, junto con la liberación y activación del factor 5 plaquetario y quizás la exposición de receptores específicos por factores de la coagulación activos. Las plaquetas cambian de forma con la activación, es el resultado de complejos cambios en la membrana de la plaqueta y el citoesqueleto.

II.- DEFINICION

Son fragmentos citoplasmáticos, discoides, planas, ligeramente convexas, que circulan en la sangre libremente y se originan en la médula ósea a partir de los megacariocitos, llamadas así por que se asemejan a placas pequeñas sin un núcleo definido. Tienen un diámetro de 2-4 μm y su vida es de 8-10 días. La cantidad normal en la sangre periférica oscila entre 150,000-400,000/ mm^3 . En la médula ósea se encuentran los megacariocitos, los cuales introducen su citoplasma en los sinusoides y se fragmenta progresivamente hasta la liberación de las plaquetas que entran en circulación a través de estos mismos sinusoides. La plaqueta no conserva la capacidad de síntesis de DNA. Las plaquetas colaboran en la formación del tapón hemostático adhiriéndose al tejido conectivo subendotelial y agregándose con otras plaquetas. Cuando se les estimula, mediante cantidades muy pequeñas de trombina formada muy temprano en el proceso de coagulación, o por el tejido conectivo, se activan y libera de sus gránulos intracelulares sustancias potentes como adenosin difosfato (ADP), tromboxano A₂, endoperóxido de prostaglandina PGG₂ y enzimas lisosómicas. Adicionalmente, las plaquetas proveen la superficie para la activación de los factores solubles de coagulación y el factor 3 plaquetario y son

importantes en la reacción de coagulación. La plaqueta pasa por un envejecimiento progresivo en el cual pierde lentamente muchos de sus elementos esenciales para su propia vida y función y finalmente es retirada por el sistema reticuloendotelial en el bazo y en el hígado.

III.- MICROSCOPIA LUMINOSA

En frotis sanguíneo teñido con Wright-Giemsa, las plaquetas aparecen como células ovoides o redondas, anucleadas, pequeñas, con un citoplasma azul-grisáceo pálido que contiene gránulos rojo-púrpura distribuidos homogéneamente. Después de la agregación o extensión plaquetaria, los gránulos se concentran en el centro de la célula.

Los volúmenes de plaquetas circulantes de un individuo simple son heterogéneos y exhiben una distribución de tamaño log normal. Las plaquetas circulantes tienen un volumen de $7.06 \pm 4.85 \mu\text{m}^3$ (femtolitros), un diámetro de $3.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (media \pm SD), y espesor de $0.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$. De un individuo a otro, varía el tamaño plaquetario, aunque plaquetas anormalmente largas o pequeñas se presentan en ciertos estados de enfermedad.

IV.- MICROSCOPIA ELECTRONICA

Por búsqueda con microscopia electrónica, las plaquetas sanguíneas circulantes aparecen como discos planos, con contornos lisos y rara espinifilopodia. El sistema canalicular abierto, se ve como un sistema de canales compuesto de invaginaciones múltiples de la membrana plasmática que se extiende a lo largo de la plaqueta.

El contenido de los gránulos plaquetarios puede ganar acceso al exterior cuando el gránulo se funde con la membrana plasmática o cualquier región del sistema canalicular abierto.

Aunque la plaqueta es anucleada, la microscopía electrónica revela un citoplasma empaquetado con un número diferente de organelos esenciales para el mantenimiento de una hemóstasis normal. FIG.1.

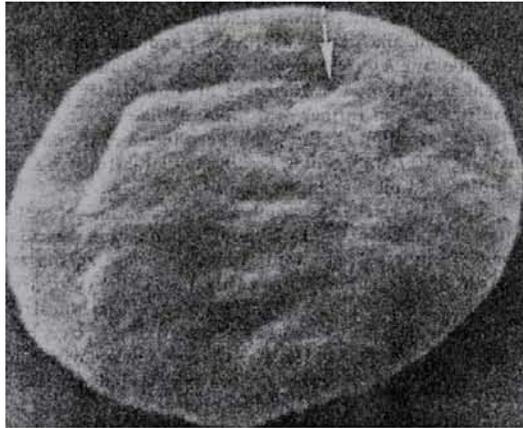


FIG.1 Plaqueta por microscopia electrónica

V. - MORFOLOGIA

V.1 GLICOCALIX:

El glicocalix es una capa, de 15 a 20 nm de espesor, contiene glicoproteínas, glicolípidos, mucopolisacáridos y proteínas plasmáticas absorbidas (51).

El glicocalix es una red con carga negativa en la superficie debido a los residuos de ácido sialico en las proteínas y lípidos; la carga es para minimizar el enlace de plaquetas circulantes unas con otras (52). Esta estructura es rica en carbohidratos por las glicoproteínas asociadas a membrana, la cual sirve como receptor para mediar la transferencia de señales por agentes estimuladores. El glicocalix interactúa con activadores plaquetarios para facilitar la adhesión y agregación plaquetaria.

V.2 MEMBRANA PLASMÁTICA:

La membrana plasmática es una unidad trilaminar compuesta de una bicapa de fosfolípidos en que colesterol, glicolípidos y glicoproteínas están incrustados. La preparación de

plaquetas por la técnica de criofractura, demostró más partículas intramembranas incrustadas en la cara exterior de la membrana que en la cara interior; estas observaciones suponen los muchos receptores externos que median las interacciones plaquetarias. Se piensa que la membrana plasmática contiene la bomba de sodio y calcio – ATPasa que controla el contorno iónico intracelular de la plaqueta. Aproximadamente el 57 % de los fosfolípidos de la plaqueta están contenidos en la membrana plasmática.

Los fosfolípidos son asimétricamente organizados en la membrana plasmática; los fosfolípidos cargados negativamente están casi siempre presentes en la cara interior, mientras que los otros son más uniformemente distribuidos.

Los fosfolípidos cargados negativamente, especialmente la fosfatidil serina es capaz de acelerar varios pasos en la secuencia en la coagulación y esta presente en la capa interna de las plaquetas en reposo, es un mecanismo de control para impedir una coagulación inadecuada. Durante la activación plaquetaria inducida por agonistas selectos, el aminofosfolípido puede exponerse en la superficie de la plaqueta o en la superficie de las micropartículas de la plaqueta. Los fosfolípidos asimétricos en plaquetas latentes pueden mantener por un ATP-dependiente del aminofosfolípido que provee de energía a las bombas fosfatidil serina y fosfatidiletanolamina desde el exterior para el interior de la placa. Las interacciones de fosfolípidos cargados negativamente con el citoesqueleto u otros elementos citoplasmáticos pueden también contribuir a la asimetría.

El enriquecimiento de fosfolípidos con ácido araquidónico es totalmente sorprendente, Este facilita el almacenamiento de ácido araquidónico para liberar y convertir en tromboxano A₂ (Tx_{a2}).

V.3 SISTEMA CANALICULAR ABIERTO CONECTADO A LA SUPERFICIE:

El sistema canalicular abierto conectado a la superficie, esta entrelazado a lo largo del citoplasma celular en una manera compleja. El examen microscópico de una serie de secciones de la misma célula, con experimentos de criofractura, y estudios con trazadores densos de e⁻ (55) mostraron que este sistema membranal fenestrado (57) esta en continuidad directa con la membrana plasmática y el medio externo. Como resultado, el área superficial plaquetaria expuesta al plasma es significativamente alta.

Las funciones del sistema canalicular abierto conectado a la superficie son: proporcionar una ruta de entrada y salida para moléculas, un reservorio interno de membrana para facilitar la difusión plaquetaria y la formación de filopodia después de la adhesión, además de un reservorio de glicoproteínas de membrana que incrementan en la superficie plaquetaria después de la activación (58).

V.4 SISTEMA TUBULAR DENSO:

A diferencia del sistema canalicular, el sistema tubular denso es un sistema de canales cerrados que consiste de tubulos angostos limitados a la membrana, aproximadamente de 400 a 600 Å en diámetro. También es una red de canales cerrado de residuos del retículo endoplásmico caracterizado histoquímicamente por la presencia de actividad peroxidasa (1). Los canales del sistema tubular denso son menos extensivos que el sistema canalicular abierto y tienden a agruparse en regiones cerradas en aproximación al sistema canalicular abierto. El sistema tubular denso es comparado con el retículo sarcoplásmico de músculo por que puede secuestrar iones calcio y liberarlo cuando las plaquetas son activadas. La calreticulina, es una proteína unida a calcio que se encuentra en el sistema tubular denso, probablemente ayuda a secuestrar calcio. La liberación de calcio desde el sistema tubular denso involucra la unión de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), formando una molécula mensajera durante la señal de transducción a receptores en la membrana del sistema tubular denso. El AMP cíclico (cAMP) inhibe la liberación de calcio desde el sistema tubular denso, por mecanismos de bombeo que aumenta el calcio o por inhibición de liberación inducida por IP3.

La membrana del sistema tubular denso es probablemente también un mayor sitio de síntesis de prostaglandina y tromboxano, en realidad, la actividad peroxidasa es usada para identificar al sistema tubular denso como un componente donde se encuentran las enzimas necesarias para la síntesis de prostaglandinas.

V.5 CITOESQUELETO:

El citoesqueleto plaquetario contiene de 30 a 50 % del total de proteínas plaquetarias y esta formado de 3 componentes estructurales mayores, identificados por alta resolución, congelamiento rápido, técnicas de grabado, tinción negativa y microscopía electrónica de sección-delgada (71). Una cadena de microfilamentos de actina esta presente a lo largo del citoplasma, un rollo de microtúbulos localizado en la periferia plaquetaria, y un esqueleto

membranal abarcando una cadena de filamentos de actina cortos que están debajo de la superficie interior de la membrana plasmática (70). Aunque son estructuras distintas, hay interconexiones presentes entre esos elementos. Estudios bioquímicos de esas estructuras han sido facilitados por tratamiento con detergente de plaquetas, el cual solubiliza más proteínas plaquetarias pero no filamentos de actina (72). Un filamento intermediario de proteína, la vimentina también ha sido identificada como un componente del citoesqueleto plaquetario (73,74).

V.6 MEMBRANA DEL CITOESQUELETO:

Es una red plana fina de espectrina alargada, de tetrameros interconectados por las terminales de filamentos de actina que están presentes debajo de la membrana plasmática y las membranas del sistema canalicular abierto. La proteína de unión a actina es capaz de interactuar con; glicoproteínas transmembranales GPIb α y la actina debajo de la membrana, de ese modo se conectan a la red de espectrina, formando la membrana del citoesqueleto que probablemente estabiliza las membranas de la forma discoide. Además, la asociación de GPIb α con la membrana del esqueleto limita la expansión de la red de espectrina y probablemente ayude a organizar receptores en línea ordenada en la superficie de la plaqueta, de ese modo aumenta la cooperación del receptor. Otras proteínas que son fundamentales en el esqueleto de la membrana incluyen la talina, vinculina, proteína relacionada con la distrofia, moléculas implicadas en señales de transducción, y varias isoenzimas de protein-quinasa C. La proteína vimentina (Mr 58,000), es un componente importante de filamentos intermedios esta presente en plaquetas y puede contribuir con la activación plaquetaria, GPIIb/ IIIA y α 2 β 1 pueden también unir el citoesqueleto. De ese modo, las interacciones con el citoesqueleto determinan en todo caso receptores libres para moverse en el plano de la membrana; ellos pueden también tener un papel en el movimiento seguro de receptores desde la superficie para el interior de la plaqueta y viceversa, a través del sistema canalicular abierto. El esqueleto de la membrana puede ser también importante en la propagación de plaquetas después de la adhesión.

V.7 MICROFILAMENTOS:

Numerosos componentes del citoesqueleto plaquetario incluyendo actina, miosina y sus proteínas asociadas, han sido identificados.

Del 20 al 30 % del total de proteínas plaquetarias están formadas de actina (75), una proteína de peso molecular de 42,000. Otras proteínas del citoesqueleto plaquetario, tal como la miosina, talina y la proteína de unión a actina, están presentes en bajas cantidades (2 a 5 % del total de proteínas plaquetarias). La actina existe en 2 formas, G-actina (monómeros de actina) y F-actina (actina polimerizada). En la plaqueta no estimulada el 30-40% de la actina es polimerizada en los filamentos (77); El equilibrio de monómeros de actina es impedido por la polimerización de proteínas semejantes a la profilina (100 μ m) o timosina β 4 (76) que secuestran actina monomérica, o por proteínas que cubren a los filamentos en la célula intacta, semejante a gelosina (78,79). Las plaquetas no estimuladas contienen una red de filamentos de actina inmediatamente adyacentes a la cara interior de la membrana plasmática y filamentos que se extienden hacia el citoplasma cerca de los organelos plaquetarios (68,80). La estimulación plaquetaria resulta en cambios profundos en la organización citoesquelética. Morfológicamente, las plaquetas pierden su forma discoide, convirtiéndose en redondas, y extendiendo filopodios (81).

En la activación plaquetaria, la proporción de actina filamentosa aumenta rápidamente de 60 a 70% (77,82). Monómeros de actina polimerizada sobre filamentos en las plaquetas periféricas (82,84) y paquetes de nuevos filamentos para satisfacer el desarrollo de filopodia (67,85,86). La fosforilación de cadenas ligeras de miosina resulta en la unión de miosina a actina (87,88), proporcionando la tensión requerida para la centralización granular y retracción de filopodios (87, 90,91).

V.8 MICROTÚBULOS:

La banda circunferencial de los microtúbulos está presente debajo de la membrana plasmática probablemente contribuyen a la forma discoide de las plaquetas, pero también pueden ser involucrados en la formación de plaquetas desde los megacariocitos. Son microtúbulos de 25 nm compuestos de polímeros huecos de 13 protofilamentos, están hechos de polímeros de Mr 110,000 subunidades, cada uno compuesto de dos proteínas de Mr 55,000 (α y β -tubulina) que esta asociado con varias proteínas de alto peso molecular (proteínas asociadas a microtúbulos). Están situados en forma adyacente a la membrana plasmática, pero no la tocan (64).

Aproximadamente 60% de la tubulina de la plaqueta esta en forma de microtúbulos, y hay un equilibrio, dinámico entre la polimerización y subunidades libres de tubulina.

Los microtúbulos aparecen como contornos tubulares de 8 a 24. En los polos de las plaquetas, los microtúbulos están presentes principalmente en su forma polimerizada en plaquetas no estimuladas. La activación plaquetaria resulta en el desarme del microtúbulo, que después se vuelven a unir; tales alteraciones en los microtúbulos dan como resultado cambios de forma en la plaqueta. Los microtúbulos pueden ser desorganizados en desordenes plaquetarios gigantes (67).

V.9 GRANULOS:

Las plaquetas contienen 4 distintas poblaciones de gránulos: α -gránulos, cuerpos densos, lisosomas y microperoxisomas. Los gránulos- α y los cuerpos densos están distinguidos morfológicamente uno de otro por su densidad electrónica que es revelada por microscopía electrónica, mientras que los lisosomas y microperoxisomas requieren de tinción citoquímica enzimática para ser visualizados (96). Aunque ha sido reconocido que las plaquetas pueden tomar material hacia su citoplasma del medio externo (98), ahora se sabe que pueden incorporar proteínas de plasma específicas hacia sus gránulos- α (99,100).

Después de la estimulación plaquetaria por agonistas, los gránulos se funden con los canales del sistema canalicular abierto conectado a la superficie y expulsan su contenido. La contracción interna es requerida para su expulsión y descarga hacia el medio circundante.

V.10 GRANULOS- α :

Los gránulos- α son el tipo de gránulo predominante en la plaqueta. Son usualmente redondos u ovals y varían de 300 a 500 nm de diámetro. Los gránulos- α tienen morfológicamente 3 distintas zonas por microscopía electrónica: una zona nucleoide denso-electrónico que ocupa el volumen del gránulo, una zona periférica de baja densidad electrónica que esta situado adyacente a la membrana granular, y de 1 a 6 estructuras tubulares que reside en la zona periférica electro-luminosa.

Aunque estudios antiguos sugieren una localización en los gránulos- α para varias proteínas (91,103), métodos inmunoquímicos ultraestructurales localizaron diversas proteínas en varios compartimentos de los gránulos- α . La β -tromboglobulina y el factor 4 plaquetario

han sido localizados en el nucleóide denso (55, 107, 127, 128). El factor Von Willebrand esta presente en la estructura tubular de la zona periférica granular, similar a su localización en los cuerpos Weibel-Palade de las células del endotelio vascular (112,117). La trombospondina, es la primera descrita como una lectina plaquetaria endógena (129,130) y el fibrinógeno (111,112,117,131,132) está presente en la matriz granular. Fibrinógeno plasmático es incorporado (95,133) hacia todos los gránulos α plaquetarios (110) y pequeñas cantidades de virtualmente todas las proteínas plasmáticas pueden ser llevados hacia estos organelos (134). Otras proteínas presentes en los gránulos α incluyen la albúmina (134), inmunoglobulina G (IgG) (113,134), factor de crecimiento derivado de plaquetas, GPIIb-IIIa (58,122,135), precursor de proteína β -amiloida (105, 106), factor V multimerino (108,109,136,137), un factor V/Va de unión a proteínas (109, 114), factor- β 1 de crecimiento transformante (119) y un activador de plasminógeno similar al activador de plasminógeno de tejido (118).

Estudios in vitro demostraron que anticuerpos para glicoproteínas IIb-IIIa son transportados de la membrana plasmática hacia los gránulos- α (138). Además de la internalización, la ciclización de GP IIb-IIIa ha sido demostrada usando anticuerpos anti-GP IIb-IIIa y deshaciendo, un ligando que contiene Arg-Gly-Asp (139).

Las proteínas presentes en la membrana de los gránulos α incluye P-selectina (123), GP IIb/IIIa (58,122,140), proteína-33 de membrana granular (GMP-33) (120), CD9 (126), molécula-1 de adhesión celular endotelial-plaquetaria (126), Rap 1b (121), glicoproteínas Ib, IX y V (121), y osteonectina (125, 141), fosfoglicoproteínas de 32 Kda originalmente descrito en hueso. Dos proteínas de membrana de los gránulos α , GMP-33 (120) y P-selectina (GMP-140) (123), han mostrado ser translocados de la membrana granular a la membrana plasmática después de la activación plaquetaria.

V.11 CUERPOS DENSOS:

Ultraestructuralmente, los gránulos densos tienen aproximadamente 200-300 nm de diámetro y pueden presentar una diana, que es, un área central oscura rodeado por un halo claro.

El número promedio de cuerpos densos por el recuento plaquetario humano normal por micrografía electrónica es de 5. Porque son los organelos más electro-densos en plaquetas

(1.2 g/cm³ peso específico), estos pueden ser distinguidos morfológicamente de otros gránulos en esta base.

Los principales constituyentes de los gránulos densos son un pool no metabólico de nucleótidos de adenina (trifosfato de adenosina y difosfato, ATP y ADP), PP_i, calcio y magnesio y serotonina (5-hidroxitriptamina). Los nucleótidos de adenina son sintetizados y segregados por los megacariocitos; la serotonina es incorporada hacia el interior de los gránulos densos desde el plasma por plaquetas circulantes (148). Aunque hay más existencia de ADP que de ATP en los gránulos densos, la cantidad relativa de estos componentes difiere entre las especies (149). Además, los gránulos densos contienen guanosina trifosfato y difosfato (GTP y GDP). Tanto el ADP y el ATP producen monofosfato de adenosina (AMP) en plasma; este es desfosforilado a adenosina, el cual por último forma AMP cíclico e inhibe la respuesta estimuladora de las plaquetas. La membrana de los gránulos densos contiene P-selectina (124) y granulofisina (124,151). Los gránulos densos de las plaquetas bovinas contienen únicamente proteínas de membrana que son menos numerosos en plaquetas de vacas con síndrome de Chediak-Higashi (152).

V.12 LISOSOMAS:

Los lisosomas son vesículas pequeñas de aproximadamente 175 a 200 nm.

Estos pueden ser identificados sólo con tinción citoquímica específica tales como fosfatasa ácida arilsulfatasa (96), tinción inmunocitoquímica por catepsina D (153), o la detección de lisosomas asociados a proteínas de membrana (120). Los lisosomas son los únicos gránulos plaquetarios que contienen hidrolasas ácidas con actividad óptima a pH 3.5 a 5.5.

Los lisosomas plaquetarios contienen una larga variedad de enzimas (150), incluyendo β-hexosaminidasa (154) y β-glicerofosfatasa (Tabla1). La glicoproteína de membrana lisosomal (LIMP-CD63) y proteínas 1 y 2 asociadas a membrana lisosomal (LAMP-1 y LAMP-2) llegan a ser expresadas en la membrana después de la activación (156, 157,158,159).

Los constituyentes lisosomales son liberados más lenta e incompletamente (máximo 60% de los gránulos) que los gránulos -α o componentes de gránulos densos después de la estimulación plaquetaria, y también requiere de agonistas más fuertes tales como trombina o colágeno, sugiriendo que ellos pueden tener un papel en la lisis de trombina más que en la respuesta hemostática inmediata (161).

**TABLA 1.- CONSTITUYENTES LISOSOMALES
PLAQUETARIOS**

CONSTITUYENTES	LOCALIZACIÓN
β-glucoronidasa	Matrix
β-galactosidasa	Matrix
N-acetilglucosaminidasa	Matrix
Captasinas	Matrix
Arilsulfatasa	Matrix
β-hexosaminidasa	Matrix
β-glicerolfosfatasa	Matrix
Elastasa	Matrix
Colagenasa	Matrix
Endoglucosidasa	Matrix
LIMP-CD63	Membrana
LAMP-1	Membrana
LAMP-2	Membrana

V.13 MICROPEROXISOMAS:

Los microperoxisomas son pequeños gránulos (90 nm) que son relativamente pocos en número en plaquetas y pueden ser demostrados solo citoquímicamente. Se piensa que contribuyen al metabolismo de los lípidos, especialmente en la síntesis de plasmalogeno, y pueden participar en la síntesis del factor activador de plaquetas (PAF).

Son reactivos en un medio alcalino de diaminobenzidina. La enzima responsable de la actividad citoquímica de la peroxidasa en los microperoxisomas es la catalasa, cuya función

es romper al peróxido de hidrógeno. El último destino de los microperoxisomas dentro del citoplasma de la plaqueta es desconocido.

V.14 MITOCONDRIAS:

La mitocondria en las plaquetas son similares que en otros tipos de células con la excepción del pequeño tamaño (0.1 μm^3). Las plaquetas contienen, en promedio 7 mitocondrias que están involucradas en el metabolismo energético oxidativo.

La mitocondria es el sitio de actividad para todos los componentes de la cadena respiratoria y para casi todas las enzimas en el ciclo del ácido cítrico.

V.15 RIBOSOMAS Y RNAm:

La plaqueta contiene únicamente un pequeño número de ribosomas, tiene únicamente restos del aparato de Golgi y pequeñas cantidades de RNA mensajero (mRNA), por lo que la falta de ellos el núcleo no puede sintetizar mRNA. La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para mRNA plaquetario ha permitido el análisis de biología molecular de glicoproteínas de membrana plaquetaria y proteínas selectas del plasma que son sintetizados en plaquetas, como factor Von Willebrand . La regulación de síntesis de nuevas proteínas por plaquetas es reportada después de la activación de trombina y parece que señala la producción de ligando comprometido a GP IIb / IIIa el cual es requerido para iniciar el proceso. Señalando sin embargo GP Ia / IIa ($\alpha_2 \beta_1$) también puede iniciar la síntesis de proteínas plaquetarias.

V.16 VESICULAS RECUBIERTAS:

Las vesículas recubiertas son organelos de 70-90 nm. Se han demostrado sus características a nivel ultraestructural en las plaquetas, por una cubierta moderada de electron-denso.

La cubierta polihedral en la superficie de estas vesículas esta compuesta de uniones de una proteína de 180 Kda que consiste de cadena pesada y ligera. La capa marcada y las vesículas transfieren los componentes de los gránulos de las plaquetas al plasma (167,168,170).

El número de vesículas recubiertas en plaquetas se incrementa después de la estimulación con ADP (166).

V.17 GLUCOGENO:

Las plaquetas contienen pequeñas partículas de glucógeno o masas de partículas de glucógeno estrechamente asociadas. Este juega un papel esencial en el metabolismo de las plaquetas. FIG.2.

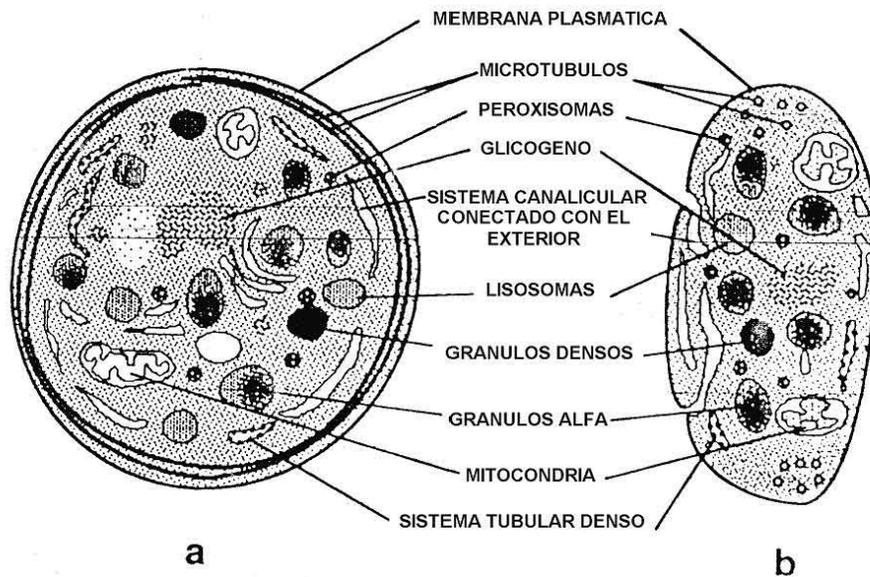


FIG.2 Representación esquemática de la ultraestructura de las plaquetas como se observa en el corte ecuatorial (a) y longitudinal (b).

VI.- MEGACARIOCITOS

VI.1 ORIGEN Y PROLIFERACIÓN DE LOS MEGACARIOCITOS:

La megacariocitopoiesis comprende el confinamiento, proliferación y maduración de células progenitoras hematopoyéticas y la adquisición de características estructurales y funcionales de las plaquetas.

Todas las células hematopoyéticas son derivadas de células de la línea pluripotencial que tienen la capacidad de autorenovarse y diferenciarse hacia todos los linajes celulares sanguíneos. El control de los eventos iniciales del desarrollo de células sanguíneas no está bien comprendido pero se piensa que ocurre a través de un proceso fortuito de linaje comprometido combinado con la disponibilidad de factores de crecimiento regulados. Morfológicamente son células reconocibles de la línea de los megacariocitos que carecen de la capacidad de autorenovación y se mantienen por el continuo influjo de los progenitores del pool de precursores hematopoyéticos multipotenciales. Estos progenitores proliferantes sirven para amplificar el número de células de la frecuencia baja de estos precursores y están constituidos de dos poblaciones definidas operacionalmente: las comprometidas y las no comprometidas. La mayor parte de los conocimientos de estas etapas tempranas han sido adquiridos por medio de estudios sobre células cultivadas. La población no comprometida llamada unidad formadora de colonias granulocitoeritroide-macrófago-megacariocito (CFU-GEMM), desarrolladas en cultivos hacia colonias con células de muchas líneas (205,206). Hay células intermedias en estas poblaciones que pueden compartir características de eritrocitos, megacariocitos y mastocitos, porque se ha mostrado que estos linajes celulares comparten factores de transcripción específicos (206,207). Ha sido reportado que los progenitores eritroides humanos expresan glicoproteínas de membrana plaquetaria (208). Aunque la transición de progenitores multipotenciales a progenitores megacariocitos comprometidos no es claramente entendido, el receptor c-MPL que es expresado en células progenitoras de megacariocitos (209,210) puede ser requerido. Se piensa que el ligando involucra varios aspectos de la megacariocitopoiesis (211), progenitores de megacariocitos tardíos, megacariocitos maduros y plaquetas que tiene una elevada expresión del receptor c-MPL.

VI.2 PROGENITORES INMADUROS:

La mínima maduración de los progenitores de megacariocitos comprometidos es la unidad de crecimiento explosivo de megacariocitos (BFU-MK) (203,204,211,213). Las BFU-MKs

humanas forman colonias multifocales de 100 células o más después de 21 días en cultivo. Estas células son CD34 positivo y HLA-DR-negativo, y son resistentes al tratamiento con 5-fluorouracil (203). El siguiente paso medible en la maduración, la unidad formadora de colonias de megacariocitos (CFU-MK) (213) forma colonias en 10 a 12 días de cultivo que consiste en un sencillo grupo de aproximadamente 12 células cada uno. Estas células son CD34 positivo (los niveles declinan con la maduración), HLA-DR-positivo, y son sensibles al 5-fluorouracil. La GP IIIa no está presente en este estado de maduración (214). Un marcador extremadamente prematuro de los megacariocitos en la maduración es la glicoproteína IIb, la cual se expresa en la CFU-MK (215) y un bipotencial progenitor eritroide-megacariocítico (217).

VI.3 PROMEGACARIOBLASTOS:

Estas células de transición se desarrollan cuando la proliferación cesa y los progenitores llegan a realizar endomitosis. Los promegacarioblastos constituyen del 5 al 20 % del total de la población megacariocítica en médula ósea (142,200,214). Estas son pequeñas células mononucleares que expresan marcadores específicos plaquetarios, pero no son aún identificables morfológicamente como megacariocitos. Se especula que estas células representan una etapa de transición de desarrollo megacariocítico entre células progenitoras y megacariocitos identificables morfológicamente. La mayoría sufren activamente endomitosis (218). En humanos, hay células semejantes a las linfoides menores de 18 μm en diámetro que expresan las proteínas citoplasmáticas: Von Willebrand, PF4 y la glicoproteína GP IIb (219,220). El más temprano marcador identificable para promegacarioblastos humanos es la peroxidasa, la cual está localizada en el retículo endoplásmico y funciona en la síntesis de prostaglandinas (219).

VI.4 MADURACION NUCLEAR DESARROLLO DE POLIPLOIDIA:

Los megacariocitos son los únicos en los que el fin de la capacidad proliferativa esta marcada por un switch para endomitosis en el cual el núcleo continúa dividiéndose pero el citoplasma no lo hace. Cada división produce una duplicación del total del material nuclear, resultando en células con núcleos poliploides sencillos (que se distinguen de células poliploides, tal como los osteoclastos) con DNA contenido en múltiplos de 2 (2N, 4N, 8N,

etc.). La presencia de DNA 2N sugiere que el genoma entero es replicado en cada una de las rondas de la endomitosis (aunque esto no ha sido probado). Es probable que la ventaja evolutiva de la endomitosis esta relacionada con la habilidad para soportar un volumen citoplasmático incrementado gradualmente. Esto permite a los megacariocitos sencillos producir miles de plaquetas anucleadas (183,184) otra característica única del linaje megacariocítico. En megacariocitos, la clase de ploidia modal de megacariocitos identificable es la 16N (180,187); por lo tanto, muchos megacariocitos sufren 3 ciclos endomitóticos para alcanzar este contenido de DNA (221). El tiempo requerido para cada ronda de la replicación de DNA y la endomitosis es similar al de las células diploides (221). El tamaño de los megacariocitos es proporcional al contenido de DNA , aunque los megacariocitos llegan a ser morfológicamente reconocibles cuando el contenido de DNA excede al 4N. Como el citoplasma maduro, el núcleo llega a ser lobulado, pero el número de lóbulos llevados no es constante en relación con la ploidia. Aproximadamente el 10 % de los megacariocitos reconocidos sufren endomitosis en cualquier tiempo . Durante la endomitosis, la membrana nuclear se disuelve y se forma un huso mitótico multipolar en la metafase (222). El resultado del proceso reduplicativo endógeno de megacariocitos, el cual es el único entre las células hematopoyéticas, es un largo, lobulado e irregular núcleo.

VI.5 MEGACARIOCITOS MADUROS :

La maduración del citoplasma comienza durante la endomitosis , pero continua después de que el desarrollo nuclear está completo; estos procesos son por lo tanto, no sincrónicos ni secuenciales, y están disociados el uno del otro. La maduración terminal de los megacariocitos comprende un incremento en la cantidad de citoplasma, el desarrollo de un complejo sistema de membranas de demarcación y la síntesis de organelos y proteínas (183,184,223). La cromatina nuclear cambia de un estado vagamente empaquetado a uno muy condensado durante la maduración nuclear. En humanos, el tiempo de maduración total puede ser de aproximadamente 10 días.

VI.6 CARACTERISTICAS DE LA MADURACION DE LOS MEGACARIOCITOS:

Una terminología generalmente aceptada ha sido desarrollada para describir las múltiples etapas de desarrollo de megacariocitos reconocidos, el mayor criterio existente son la

calidad y cantidad de citoplasma, el tamaño, lobulación y el patrón de cromatina del núcleo. El primer megacariocito reconocido morfológicamente es el megacarioblasto o megacariocito etapa I. Estos constituyen casi el 19 % de la población de megacariocitos con una extensión de 6 a 24 μm en diámetro (224,225).

Esta célula contiene núcleo dentado o lobulado, redondo y largo (226,227) con varios nucleolos prominentes. Mediante microscopía luminosa, el citoplasma se observa intensamente basofílico y escaso; por microscopía electrónica, se ven cantidades variables de retículo endoplásmico, un pequeño complejo Golgi, unas pequeñas mitocondrias y abundantes ribosomas libres. La endomitosis puede ser observada. Los megacarioblastos contienen o no algunos gránulos α en su citoplasma y sólo rudimentos del sistema membranal de demarcación.

Por microscopía luminosa, el promegacariocito o megacariocito etapa II, contiene un núcleo lobulado y más abundante con un citoplasma menos intensamente basofílico que el del megacarioblasto. Ultraestructuralmente, el número de gránulos está incrementado, y el sistema membranal de demarcación está más desarrollado. Esta etapa, la cual constituye aproximadamente el 25 % de la población de megacariocitos contiene células con una extensión de 14 a 30 μm en diámetro (224,225) y de 8 a 64N en poliploidia en humanos normales. Aunque algunos estudios concluyen que la endomitosis es completada en el desarrollo del megacariocito de etapa I, otros investigadores han encontrado que la síntesis de DNA continúa, el nivel de ploidia de DNA final establecido en la etapa II. De este precursor, se forma el megacariocito granular maduro (etapa III).

A nivel de microscopio luminoso, los megacariocitos etapa III, los cuales constituyen casi el 56 % de la población de megacariocitos, son extremadamente largos (40 a 56 μm) (225) y tienen una baja proporción núcleo / citoplasma. La basofilia persiste en las células más tempranas de esta etapa, pero se pierde con la maduración. Por microscopía electrónica; los megacariocitos etapa III contienen un bien desarrollado sistema membranal de demarcación y abundante citoplasma granular. El retículo endoplásmico y el complejo de Golgi están sustancialmente reducidos. El núcleo es muchas veces empujado hacia un polo de la célula. En la etapa de producción plaquetaria, el citoplasma del megacariocito llega a ser irregular y algunos creen hasta ahora que es un mecanismo indeterminado, el citoplasma difundido como las plaquetas, dejando atrás un núcleo desnudo. Las plaquetas son normalmente producidas por células de 8 N ploidia o más alta, aunque esto no es conocido en todo caso

las clases de ploidia más bajas de megacariocitos son capaces de la producción plaquetaria en condiciones patológicas. Además, no se sabe si los megacariocitos de diferentes clases de ploidia producen plaquetas de diferente tamaño, densidad o función.

VI.7 ANATOMIA

El megacariocito es una célula hematopoyética, larga, cuyo citoplasma se fragmenta para formar plaquetas sanguíneas circulantes. La histogénesis de las plaquetas a partir de los megacariocitos fue descrita primero por James Wright en 1910. Aunque esas células se caracterizan por su tamaño gigante y abundante citoplasma, las cuales están dotadas con la capacidad de formar varios miles de plaquetas (183, 184), están presentes en baja proporción (0.02 a 0.05 % del total de la población celular nucleada) en la médula ósea. El número de megacariocitos normal para humanos es de $6.1 \times 10^6 / \text{kg}$. El megacariocito es una célula poliploide, que en el núcleo contiene múltiplos del normal $2N$ del complemento de DNA. El núcleo lobulado, largo individual permite distinguir a los megacariocitos de los osteoclastos, el cual contiene múltiples núcleos pequeños. La modal ploidia de megacariocitos en humanos normales es de $16N$ (180,187).

VI.8 MICROSCOPIA LUMINOSA :

Los megacariocitos inmaduros son largos, se observan como células basofílicas con una razón alta de núcleo / citoplasma. La maduración de esas células resulta en una disminución de la basofilia y de la proporción nuclear / citoplasmática, con incrementos concomitantes en el tamaño citoplasmático y la acidofilia, lobulación nuclear y condensación de la cromatina. Los megacariocitos maduros son células sumamente largas con un diámetro promedio fijo en médula de $35 \mu\text{m}$ y puede alcanzar hasta $160 \mu\text{m}$. El núcleo lobulado irregularmente esta compuesto de cromatina densa y de manchas oscuras azul-purpúreo al teñir con Wright-Giemsa. Los nucleolos no son observables. El citoplasma es abundante, azul claro, excepto por un angosto borde en la periferia, empaquetado con gránulos azurofilicos finos. En la maduración individual, los megacariocitos pueden ser detectados en todos los órganos mayores, pero la megacariocitopoyesis está localizada primariamente en la médula ósea.

VI.9 VARIACIONES EN EL TAMAÑO Y LA MORFOLOGIA:

La morfología de los megacariocitos es verdaderamente variable en frotis teñidos. Cuando la producción plaquetaria es acelerada, los megacariocitos aumentan en volumen y número (188). En varias formas de trombocitopenia causadas por una acelerada destrucción plaquetaria, uno puede ver morfológicamente megacariocitos anormales y degenerados en diferentes etapas de maduración, y megacariocitos que parecen ser no productores de plaquetas. Numerosos megacariocitos morfológicamente anormales a menudo son observados en médula de especímenes obtenidos por biopsia de pacientes con mielofibrosis. Esto ha sugerido que los megacariocitos pueden desempeñar un papel en la patogénesis de mielofibrosis por estimulación en la proliferación de fibroblastos y la secreción de colágeno (189).

“Micromegacariocitos” y megacariocitos con núcleos semejantes a osteoclastos son comunes en pacientes con síndromes mielodisplásticos. Células de médula pueden aparecer dentro de megacariocitos a causa de un proceso llamado emperipolesis (190). Se ha demostrado ultraestructuralmente que en esos casos las células estaban en realidad contenidas en canales dilatados de la membrana de demarcación de megacariocitos. Aunque se vio en médula normal, este fenómeno aumenta en asociación con la pérdida de sangre (193) y a una variedad de desordenes neoplásicos (190,194). Los megacariocitos fetales son más pequeños que los megacariocitos adultos (195,197) y hay una alta proporción de células ploides pequeñas (196,198).

VI.10 DISTRIBUCION MEGACARIOCITICA:

Los megacariocitos, o fragmentos de sus núcleos o citoplasmas, algunas veces se encuentran en la sangre circulante varían en tamaño y son irregulares en la forma. Los núcleos tiñen intensamente y pueden estar desnudos, esto es, rodeado por sólo una pequeña cantidad de citoplasma. Estos fragmentos son raramente vistos en frotis de sangre periférica rutinarios, pero son encontrados regularmente en la sangre de mujeres embarazadas y parturientas, recién nacidos (199), y algunos sujetos normales al usar técnicas de concentración.

Fragmentos de megacariocitos se pueden observar en frotis de sangre rutinarias de individuos con varias formas de cáncer (200) otros procesos como la leucemia mielocítica crónica, policitemia vera; y enfermedad de Hodgkin's, después de procedimientos quirúrgicos, herida de pecho y masaje cardíaco; y en asociación con leucocitosis marcada causada por infección. Se encuentran menos comúnmente en individuos con leucemia

aguda, púrpura trombocitopénica, anemia perniciosa y envenenamiento con plomo. Los megacariocitos pueden ser identificados en los glomérulos renales, y fluidos serosos de individuos con algunos de esos desordenes.

Los megacariocitos y fragmentos de ellos están presentes en vasos pulmonares, probablemente como resultado de ser transportados en la sangre venosa desde la médula ósea. Los megacariocitos están presentes también en el bazo.

VI.11 MICROSCOPIA ELECTRONICA:

Una impresionante característica del citoplasma en el megacariocito maduro es una cadena extensa de membranas, llamada sistema membranal de demarcación, probablemente formados de la invaginación de la membrana plasmática. Estas membranas de demarcación están en continuidad con la membrana plasmática y en asociación con otro sistema membranal, el retículo endoplásmico liso. Las estructuras formadas de la aposición cerrada de esos sistemas de canales han sido designadas complejos membranales.

Otros organelos de megacariocitos incluyen a los elementos de la maquinaria sintética proteica, como el retículo endoplásmico y el complejo Golgi, la mitocondria y en formas inmaduras, numerosos ribosomas libres. Gránulos inmaduros, presentes tempranamente en la maduración, se localizan inicialmente en el complejo Golgi (96), pero están distribuidos por todo el citoplasma con una maduración aumentada. Gránulos electrón-densos son rara vez observados en el megacariocito, aunque el cuerpo granular este presente. El citoplasma también contiene microfilamentos y microtúbulos.

VI.12 MEMBRANAS DEL MEGACARIOCITO:

Lípidos de la membrana: Los megacariocitos poseen una mayor capacidad para la síntesis y el metabolismo de los lípidos que la plaqueta; en realidad, ellos determinan la composición de los lípidos en la plaqueta (228–233). Aunque la cantidad de lípidos neutros y fosfolípidos es similar en plaquetas y megacariocitos, los megacariocitos contienen más fosfatidilinositol y menos fosfatidilserina (171). Los megacariocitos contienen la mitad de ácido araquidónico y un proporcionado incremento en ácido oleico en comparación con las plaquetas (171).

Han sido reportadas diferencias en la síntesis en varias etapas de la maduración de los megacariocitos. La síntesis de glicolípidos es más grande en megacariocitos inmaduros que

en los maduros (233) y la mayor parte de la síntesis de lípidos y consumo de ácido araquidónico y ácido palmítico también ocurre primariamente en megacariocitos inmaduros (234). La síntesis de novo de ácido palmítico ocurre predominantemente en megacariocitos maduros (234). Los fosfolípidos y el colesterol presentes son 4 veces tan grandes en megacariocitos maduros como en células inmaduras (234). Estas diferencias en la síntesis de lípidos en etapas maduracionales de inmaduros o maduros pueden reflejar el papel de estos lípidos en la diferenciación del megacariocito (171).

Glicoproteínas de membrana IIb y IIIa. Las glicoproteínas IIb – IIIa, es el receptor para una variedad de ligandos incluyendo al fibrinógeno, está presente sobre las membranas plasmáticas del megacariocito comienza en la etapa de la célula progenitora CD34 – positivo (235,236). Los genes para la GPIIb y GP IIIa han sido mapeados en el cromosoma 17 (237,238). Las proteínas producto de estos genes, la GP IIb y GP IIIa, son sintetizadas en el megacariocito y se unen en el retículo endoplásmico rugoso como un complejo no covalente dependiente de Ca^{++} . Posteriormente, la molécula Pro-GPIIb está adherida en las cadenas pesadas y ligeras; y los carbohidratos son modificados en el complejo de Golgi para producir las subunidades maduras GPIIb α y GPIIb β (174,179). La síntesis y expresión aumentan (236) a medida que declina la positividad a CD34, hasta estar presentes sobre la membrana granular, la membrana plasmática y el sistema membranal de demarcación de megacariocitos maduros (122).

Por microscopía inmunoelectrónica se ha localizado a la GP IIb – IIIa en la matriz y membrana de pequeños precursores de gránulos α en megacariocitos inmaduros cultivados (122); al madurar, la localización granular de estas moléculas se restringe a la membrana. Los megacariocitos maduros e inmaduros muestran un extenso nivel en la membrana plasmática y el sistema membranal de demarcación para GP IIb – IIIa (239), aunque se piensa que la reunión entre formas tempranas de GP IIb y GP IIIa es un paso necesario para la maduración del heterodímero y la expresión superficial en la célula (240). Esto no ocurre en megacariocitos y plaquetas de pacientes con Trombastenia o Enfermedad de Glanzmann (241); como una consecuencia, estos pacientes tienen una deficiencia en la agregación plaquetaria. La capacidad de la GP IIb – IIIa para unirse al fibrinógeno depende de un cambio conformacional en la molécula, aunque no se sabe en que estado maduracional la GP IIb – IIIa sufre este cambio (173).

Mientras que la GP IIIa es expresada en otros tipos de células diferentes de los megacariocitos (242), la GP IIb está restringido a una etapa temprana de maduración (201,216,237,242) para el linaje del megacariocito.

Glicoproteína Ib. La glicoproteína Ib, el receptor para el factor Von Willebrand, no es expresada hasta la iniciación de la endomitosis (236). Aunque las células endoteliales han sido reportadas para que expresen GP Ib (244), esto es de otra manera considerado como específico para plaqueta. La GP Ib está presente en la superficie de los promegacariocitos, sobre la membrana plasmática, las membranas de demarcación y las membranas de los gránulos - α (121) de megacariocitos.

Sistema membranal de demarcación. El sistema membranal de demarcación fue descrito por Behnke (8415) como resultado de invaginaciones tubulares en localizaciones múltiples a lo largo de la membrana plasmática del megacariocito. Este sistema membranal ha mostrado estar en continuidad con el medio externo. El desarrollo del sistema membranal de demarcación se inicia tempranamente en el desarrollo del megacariocito, durante la endomitosis y hay elementos presentes en la etapa promegacariocítica. Durante el tiempo de maduración, que es de 72 horas, el plasma total y las membranas de demarcación pueden aumentar en un 2600 %. Las glicoproteínas plaquetarias IIb - IIIa y Ib son expresadas en la membrana plasmática y en las membranas de demarcación del megacariocito maduro, aunque su aparición en la membrana plasmática ocurre antes del desarrollo del sistema membranal de demarcación (246). Aunque ultraestructuralmente el sistema membranal de demarcación aparece para dividir en compartimentos al citoplasma del megacariocito en territorios plaquetarios (183), este concepto ha sido cuestionado por investigadores quienes apoyan un modelo por medio del cual vuelve al revés el sistema membranal de demarcación y procesos de forma, o proplaquetas, que subsecuentemente da origen a plaquetas (223). Además, esto ha sugerido que el sistema membranal de demarcación forma al sistema canalicular conectado a la superficie de la plaqueta, un sistema de canales que atraviesa el citoplasma plaquetario.

Retículo endoplásmico liso. El retículo endoplásmico liso, junto con la envoltura nuclear y el retículo endoplásmico rugoso, contienen peroxidasa plaquetaria (172); la identificación

citoquímica de estas enzimas han permitido la clasificación de ciertas leucemias como megacarioblasticas.

Glicoproteína V. La glicoproteína V, una glicoproteína rica en leucina, es específicamente expresada en megacariocitos; la expresión de la GP V incrementa con la diferenciación del megacariocito (245).

Proteínas del megacariocito.

El perfil de proteínas total de megacariocitos mediante geles de acrilamida es similar al de las plaquetas, pero contiene varias bandas que no están presentes en las plaquetas. La presencia de PF4 en megacariocitos fue demostrada inmunoquímicamente (249,250), y posteriormente, la síntesis de esta proteína por los megacariocitos fue reportada (251). Además de las proteínas de membrana enlistadas arriba, los megacariocitos han sido demostrados que sintetizan otras numerosas proteínas incluyendo: actina, factor V (178,252), trombospondina (253) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (189, 254). En contraste, es generalmente aceptado que los megacariocitos no sintetizan fibrinógeno, pero lo toma desde el plasma vía endocitosis mediada por receptores (99, 175).

Proteoglicanos del megacariocito.

Los proteoglicanos (mucopolisacáridos) son moléculas largas en las cuales varios polímeros llamados glicosaminoglicanos están asociados a una nucleoproteína. Los proteoglicanos están compuestos de 80 a 90 % de carbohidratos y de 10 a 20 % de proteínas.

Los proteoglicanos ha sido reportado que son sintetizados por los megacariocitos y estas moléculas se piensa que juegan un papel potencial en la migración de la célula en la médula estromal, la regulación del empaquetado de proteínas en gránulos de almacenaje, el desarrollo del sistema membranal de demarcación y la producción plaquetaria (255). También se ha especulado que pueden cumplir un papel en la adhesión o repulsión plaquetaria de las paredes por los vasos.

Diferentes grupos de megacariocitos purificados en gradientes de densidad sintetizan proteoglicanos de peso molecular diferente (257). Los proteoglicanos serglicina y betaglicano, han mostrado ser expresados en líneas celulares de megacariocitos y en megacariocitos humanos normales (258).

VI.13 GRÁNULOS DE LOS MEGACARIOCITOS:

Basado en diferencias de densidad, la apariencia ultraestructural y el contenido, los gránulos almacenados en el megacariocito pueden ser subdivididos en 4 poblaciones que son heredados por la progenie plaquetaria. Estos incluyen a los gránulos α , los cuerpos densos, lisosomas y microperoximas. Además, los megacariocitos contienen vesículas recubiertas que son observadas ocasionalmente fusionadas con las membranas citoplásmicas. Aunque la endocitosis ha sido reportada hace varios años (98), es incorporarlas hacia los gránulos α por este mecanismo (130).

VI.14 GRANULOS α :

Los gránulos α llegan a ser prominentes solo en esta etapa tardía de diferenciación del megacariocito (96), aunque son morfológicamente identificables cerca del complejo Golgi de megacarioblastos (estado I de los megacariocitos). Sin embargo, el factor Von Willebrand, Pf4, y trombospondina son expresados antes de la formación de los gránulos α en promegacarioblastos (220).

Aunque el RNAm para el VwF (y la GP Ib membranal) este presente durante todos los estados de maduración, la P-selectina, una glicoproteína membranal de los gránulos α , se expresa primariamente en los megacariocitos maduros (259).

Varias proteínas han sido localizadas en los gránulos α de megacariocitos por técnicas inmunoquímicas (Tabla 2) (250,260). Es claro que las proteínas de los gránulos α están empaquetadas en los gránulos α mediante tres diferentes mecanismos, que incluyen la síntesis endógena, la endocitosis mediada por receptores, y pinocitosis (134). Los megacariocitos endogenamente sintetizan proteínas tales como la β - tromboglobulina (β -TG) y proteína básica plaquetaria, una forma de β -TG (261), proteína Von Willebrand (262), multimerina (114) PF4 (249,251), el factor V (252) , clusterina , factor β 1 de crecimiento transformante (124) y osteonectina (202). Probablemente son transportadas vía vesículas desde el aparato sintético a los gránulos α (128). El fibrinógeno en una configuración dimérica de cadena γ A, no es sintetizado por megacariocitos (176,177), pero es tomada desde el plasma por endocitosis mediada por receptor y vesículas recubiertas (104, 175). La captación de fibrinógeno desde el plasma es apoyada por estudios que demostraron que pacientes con afibrinogenemia congénita y con trombostenia de

Glanzmann, quienes carecen del receptor del fibrinógeno GP IIb – IIIa, son deficientes en fibrinógeno plaquetario (107). La inhibición de la proteína de unión a fibrinógeno bloquea la captación endocítica de fibrinógeno (263). A diferencia del VWF y la trombospondina, los cuales son sintetizados por megacariocitos inmaduros, el fibrinógeno es adquirido más tarde en la maduración del megacariocito (116). Aunque ninguno de estos mecanismos ha sido concluyentemente demostrado que participan en la incorporación de proteínas de megacariocitos hacia el interior de los gránulos α , la evidencia de la transferencia continúa de fluidos ambientales a los gránulos plaquetarios humanos vía vesículas y huecos recubiertos usando marcadores fase-fluido han sido reportados (167).

TABLA 2 LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS GRÁNULOS α EN PLAQUETAS / MEGACARIOCITOS

PROTEINAS	LOCALIZACION
Albúmina	Gránulo

Proteína precursor de β -amiloide	Gránulo
β -tromboglobulina	Gránulo-nucleoide
Clusterina	Gránulo
Factor V	Gránulo
Fibrinógeno	Gránulo-matrix
Fibronectina	Gránulo
IgG	Gránulo
Multimerina	Gránulo-matrix
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Gránulo
Factor 4 plaquetario	Gránulo-nucleoide
Trombospondina	Gránulo
Factor Von Willebrand	Gránulo-tubular
Activador de plasminógeno semejante a tPA	Gránulo
Factor de crecimiento transformante β -1	Gránulo
Vitronectina	Gránulo
GMP-33	Membrana
GP Ib,IX	Membrana
GP IIb/IIIa	Membrana
GP IV (CD36)	Membrana
GP V	Membrana
P-selectina	Membrana
Osteonectina	Membrana
CD9	Membrana
PECAM-1	Membrana
Rap Ib	Membrana

VI.15 CUERPOS DENSOS:

Los gránulos densos constituyen una clase de gránulos distinguibles de los gránulos α por su morfología y su contenido: un pool no metabólico de nucleótidos de adenina sintetizados por megacariocitos, calcio y serotonina . Los gránulos de las plaquetas son físicamente

densos, y a causa de su contenido de serotonina y calcio son electrón – densos cuando aparecen con la transmisión del microscopio electrónico.

Los cuerpos densos característicos de las plaquetas no son normalmente observables en megacariocitos, pero los promegacarioblastos son hábiles para incorporar serotonina exógena (264,265) y los megacariocitos toman calcio, serotonina y bromuro de etidio (265-268), indicando la presencia de algunas formas de cuerpos densos en estas células (269). Porque los megacariocitos no sintetizan serotonina, esta es incorporada del plasma por los megacariocitos o las plaquetas.

VI.16 LISOSOMAS:

Los lisosomas y su contenido están presentes en la célula reconocible más temprana de la serie megacariocítica, aun antes de los gránulos α y el sistema membranal de demarcación (96). Los megacariocitos inmaduros ocasionalmente contienen productos de reacción para aril sulfatasa y fosfatasa ácida en la cisterna de Golgi, retículo endoplásmico y vesículas de 175 a 250 nm en diámetro. El producto de reacción para estas enzimas se encuentra casi exclusivamente en lisosomas primarios en megacariocitos maduros.

El gránulo lisosomal es la única clase de gránulo juzgado por su ultraestructura citoquímica, localización de arilsulfatasa y ácido fosfatasa, la inmunolocalización de catepsina D y la identificación de proteínas de membrana asociadas a lisosomas. Se forman muy tempranamente durante la maduración previa a la aparición de gránulos α .

VI.17 MICROPEROXISOMAS :

Son pequeños gránulos (90 nm) que contienen catalasa. Estos gránulos parecen similares a los microperoxisomas de otras células.

Los microperoxisomas se comienzan a formar primero en la diferenciación del megacariocito, antes del desarrollo de los gránulos α y están presentes en todas las etapas de maduración.

VI.18 CITOESQUELETO :

La microscopía electrónica ha revelado microfilamentos y microtúbulos en el citoplasma del megacariocito. En megacariocitos maduros, esta presente una zona periférica pobre en organelos y rica en microfilamentos. Como las plaquetas, los megacariocitos pueden

responder a una variedad de agonistas por el cambio de forma. Se extienden en respuesta a los agonistas ADP, trombina, y ácido araquidónico y, en presencia de fibronectina, a colágeno (270– 272). En cultivo líquido, los megacariocitos inmaduros y maduros responden a la trombina con una membrana arrugada, centralización granular y secreción de proteínas de gránulos α hacia el sistema membranal de demarcación (273)

Los megacariocitos deben sintetizar proteínas citoesqueletales heredadas por las plaquetas, por lo tanto contienen actina, α -actina, filamina (proteína de unión a actina), miosina, tubulina (270, 274) y talina (275), entre otros numerosos constituyentes citoesqueletales.

VII.- FORMACION Y LIBERACION PLAQUETARIA

VII.1 MECANISMOS DE PRODUCCION PLAQUETARIA:

Los megacariocitos están situados en la médula ósea del endotelio sinusoidal (275). Estos megacariocitos localizados extravascularmente se extienden por procesos citoplasmáticos periféricos hacia los senos de la médula vía fenestraciones endoteliales; constricciones en puntos a lo largo del proceso confiere una apariencia de cuenta (llamado proplaquetas) (277,278). Los procesos proplaquetarios intactos, piezas más largas de megacariocitos citoplasmáticos y hasta megacariocitos enteros (279) también pueden entrar a la circulación (181, 280). A diferencia de esto, el mecanismo de la formación plaquetaria permanece controversial, y varias teorías han sido propuestas para explicar este proceso.

El modelo de flujo (223,277,281) proporciona unas bases para el fenómeno proplaquetario. En este modelo, la demarcación que hace el sistema de membranas no sirve para delinear los campos plaquetarios, aunque las membranas del sistema de demarcación membranal eventualmente llegan a ser incorporado hacia las membranas plasmáticas plaquetarias. En este caso, el sistema membranal de demarcación está almacenado en la membrana plasmática, el cual puede ser invaginado o evaginado para formar la membrana plasmática en plaquetas putativas desarrollándose como un proceso que llega a ser atenuado.

De acuerdo a otro modelo, el sistema membranal de demarcación finalmente forma la membrana plasmática de las plaquetas derivadas de la fragmentación del citoplasma megacariocítico y no la periferia (283). Esto ha sugerido que las membranas de demarcación primero sufren fusión, seguido por fisión, para producir dos hojas de membrana onduladas que pueden llegar a ser membranas de la futura plaqueta.

Sin embargo, este modelo no es compatible con el concepto del proceso de formación antes de la liberación, como se demostró mediante técnicas ultraestructurales y cinematografía tiempo-lapso (277) de megacariocitos maduros in vitro.

Recientes evidencias sugieren que el citoesqueleto puede desempeñar un papel en la formación de las plaquetas. La formación proplaquetaria por megacariocitos cultivados es estimulada por citocalasinas e inhibidos por agentes despolimerizadores de microtúbulos (282,286,287). Han sido reportadas varias estimaciones para el número de plaquetas producidas por el megacariocito, fluctuando de varios cientos a miles de plaquetas (184). Algunos estudios que utilizan masas de megacariocitos medidas de volumen y microscopía electrónica sugieren que el citoplasma entero del megacariocito es eventualmente roto a lo lejos, cada célula forma de 1000 a 5000 plaquetas (184,254). El núcleo del megacariocito desnudo sufre fagocitosis por células reticuloendoteliales (288).

VII.2 SITIOS DE PRODUCCION PLAQUETARIA

El sitio primario de la producción plaquetaria es todavía controversial. Una teoría propone que después de la maduración de los megacariocitos, ellos entran a la circulación y su citoplasma fragmentado en la microvasculatura pulmonar (289-293). Las evidencias citadas apoyan esta hipótesis incluyendo la detección de megacariocitos en las venas periféricas y sistemas circulatorios pulmonares, una disminución en el número y tamaño de megacariocitos como flujos sanguíneos a través de la circulación pulmonar (293), y la presencia de núcleos desnudos en el pulmón (295). Muestras de sangre han mostrado conteos plaquetarios que son más altos en el pulmón (296), sin cambios en el hematocrito, y una gran concentración de proplaquetas en sangre en el lado derecho del corazón que en el lado izquierdo (280), involucrando que algunos fragmentos megacariocíticos adicionales hacia plaquetas mientras atraviesan la circulación pulmonar. La expresión de antígenos de adhesión específicos difiere entre megacariocitos de médula ósea y megacariocitos de circulación (297).

Se ha reportado un marcado incremento en el número de megacariocitos de pulmón en asociación con varias enfermedades, en particular con coagulopatías (298), en las cuales los niveles plaquetarios son generalmente más bajos y la demanda en la producción plaquetaria es más grande.

Muchos investigadores han asumido que ya que otras células hematopoyéticas diferenciadas completamente son formadas en la médula ósea, las plaquetas son también

probablemente formadas y liberadas en este sitio. La localización de megacariocitos adyacentes a células de revestimiento sinusoidal en médula ósea (276) y la presencia de un número significativo de núcleos desnudos en la médula (288) y proplaquetas en la sangre venosa central (181) sustenta esta hipótesis. La contribución de sitios diferentes en el cuerpo para la producción plaquetaria no es conocida en el presente.

VII.3 REGULACION DEL TAMAÑO DE LA PLAQUETA

Las plaquetas circulantes varían enormemente en su tamaño, densidad y edad. Aunque las plaquetas tienen una distribución log normal de su tamaño, los mecanismos de conteo celular por el tamaño de plaquetas son mal comprendido. Es poco claro si numerosas plaquetas vienen desde numerosos megacariocitos altamente ploidés o pequeños megacariocitos de baja ploidia, existe evidencia de ambos. En general, el volumen promedio de plaquetas (MPV) incrementa mientras el conteo decrece y el número de plaquetas se asume que son jóvenes y más reactivas. Estos efectos se ven clínicamente en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática crónica (ITP) en quienes el MPV es debido al aumento para un incremento del número de plaquetas, llamados megatrombocitos; la presencia de megatrombocitos es útil en distinguir ITP desde algunos otros desordenes trombocitopénicos. En trombocitosis reactiva el MPV no aumenta. El efecto de la trombopoyetina en el tamaño de la plaqueta es variado. En humanos administrados por una forma recombinante de trombopoyetina, el MPV usualmente disminuye en una manera inversamente proporcional al conteo plaquetario.

VII.4 REGULACIÓN DE LA MEGACARIOCITOPOIESIS Y TROMBOPOIESIS

Principios fisiológicos:

1. El conteo plaquetario en algunos restos individuales constantes a lo largo de la vida poco perturbada por procesos fisiológicos (e. g., embarazo) o patológicos (e. g., mielodisplasia).

1. Entre individuos normales hay una gran variación en el conteo plaquetario, varía entre $150-450 \times 10^9$ / litro (1). Esto es diferente en el conteo eritrocitario, que es mucho menos variable entre individuos.
2. Existe una relación inversa entre el conteo plaquetario normal y el volumen plaquetario promedio normal (MPV) (2), y esto produce una circulación más o menos constante de masa plaquetaria.
3. Las defensas del cuerpo son el total de la masa de plaquetas, no el conteo plaquetario. Normalmente en aproximación 1-3 del total de la masa plaquetaria es secuestrada en un pool esplénico cambiante. En animales o humanos con bazo agrandado, el conteo plaquetario disminuye proporcionalmente al incremento en el tamaño del bazo, pero el total de masa plaquetaria en el cuerpo permanece normal y sin alterar.
4. Los megacariocitos de médula ósea responden a cambios en la demanda por plaquetas por alteraciones en su número, tamaño y ploidia. En animales desarrollados trombocitopenicos por la inyección de anticuerpos antiplaquetas, los megacariocitos de médula ósea aumentan su número, tamaño y ploidia. En animales fabricados trombocitoticos por transfusión de plaquetas, cambio contrario en ocurre.
5. La Meg-CFC no responde al estímulo de trombocitopenia (6,7) mejor dicho incrementa meg-CFC observado subsecuentemente a las alteraciones que son destacadas en los megacariocitos diferenciados (6). De manera similar, la trombosis no resulta en una disminución compensatoria en meg-CFC. Estas observaciones en vivo implican que la respuesta inicial a la demanda plaquetaria es enfocada por la mayoría de megacariocitos maduros no mitóticos.

VIII.-FUNCIONES PLAQUETARIAS

En condiciones normales las plaquetas circulan como células individuales que no interactúan con otras plaquetas u otro tipo de células. La principal función de las plaquetas es evitar la pérdida de sangre por adhesión a los sitios de daño vascular e interacción con otras plaquetas, lo que lleva a la formación del tapón hemostático. El funcionamiento

plaquetario es a través de una discreta serie de pasos involucrados en la adhesión al área dañada y en su activación, esto es, la generación de señales químicas intracelulares que se inician por la adhesión plaquetaria y por factores solubles que estimulan a la plaqueta por medio de receptores específicos. Estas señales causan rápidos cambios morfológicos tales como la extensión de pseudópodos, agregación plaqueta-plaqueta y la secreción granular. Además de su papel normal, las plaquetas desempeñan un papel central causando infarto al miocardio, ataque y otros desordenes trombóticos, los cuales junto con otras enfermedades cardiovasculares son responsables por prácticamente 1 millón de muertes por año en E. U., más que por cualquier otra causa (3).

VIII.1 ADHESION PLAQUETARIA

El daño vascular rompe la capa de células endoteliales de las líneas de paredes de los vasos sanguíneos que normalmente resisten la formación de la agregación plaquetaria, exponiendo una matriz rica en proteínas subendoteliales. En este proceso se distingue principalmente la unión de las plaquetas y posteriormente extensión, con el fin de aumentar la superficie recubierta. Algunas de las proteínas que componen al subendotelio incluyen al colágeno, el factor Von Willebrand y la fibronectina.

VIII.1.1 COLÁGENO

El colágeno no sólo es la clase más abundante de proteínas en el cuerpo, también es el mayor componente de la pared de los vasos sanguíneos, y son importantes colaboradores a la trombogenicidad del subendotelio expuesto en los sitios de daño. Varios tipos de colágeno han sido encontrados en la pared de los vasos, incluidos los tipos I, III, IV, V, VI, VII y XIII (4). De esos, el colágeno I y III representan más del 95% del colágeno presente.

VIII.1.2 FACTOR VON WILLEBRAND

El factor Von Willebrand (FvW) es una proteína adhesiva larga que se encuentra en varios sitios en el vaso sanguíneo: el subendotelio, los gránulos secretores en células endoteliales llamados cuerpos Weibel-Palade, el plasma y en los gránulos α plaquetarios. El FvW es una proteína de alto peso molecular; existe como multimeros unidos por puentes de

disulfuro en tamaño aproximado de 1×10^6 a 20×10^6 KD (20) y esta compuesto de monómeros con un peso molecular de 275 K (4). Sobre el vaso sanguíneo dañado, el FvW es expuesto e interviene en la adhesión plaquetaria vía la glicoproteína (GP) 1b receptor de adhesión, especialmente bajo condiciones de una lesión. Un corte insuficiente, o después de la activación de plaquetas vía señalización a través de GP1b, el FvW también se une a la mayor integrina plaquetaria la α I**II** β 3 (25,36) o glicoproteína IIb-IIIa vía la secuencia ácido aspartico-glicina-arginina (RGD) en FvW (37). La secuencia RGD es una secuencia de reconocimiento para muchas integrinas, y esta secuencia se encuentra en muchas proteínas adhesivas que se unen a integrinas.

VIII.1.3 FIBRONECTINA

La fibronectina es una proteína que consta de dos subunidades y se encuentra en la matriz extracelular subendotelial con un multidominio de aproximadamente 240 KDa, que también se encuentra en los gránulos α plaquetarios y en el plasma. Las plaquetas se adhieren a la fibronectina vía múltiples mecanismos. Estos mecanismos involucran a la adhesión plaquetaria vía cualquier integrina α I**II** β 3 o la integrina α 5 β , a la secuencia RGD localizada en la unión celular del dominio de la fibronectina (38). Los sitios de unión específicos no-RGD adicionales para α I**II** β 3 han sido también identificados en varios ligandos incluyendo a la fibronectina (38,41).

VIII.1.4 FIBRINÓGENO

El fibrinógeno se encuentra principalmente en la sangre circulante, pero está también presente en depósitos inmovilizados en placas ateroscleróticas y es convertido a una red de fibrina como parte de la coagulación y el proceso herida-cicatrización. La molécula del fibrinógeno tiene una masa molecular de 340 KDa y esta compuesto de 2 juegos de 3 cadenas distintas: Las cadenas A α , B β y γ (fig. 3). La porción amino-terminal de esas cadenas está unida a disulfuro, formando el dominio E central. Las porciones C-terminal de algunas de esas cadenas están presentes en los dominios D (43). El mayor sitio de unión plaquetaria, un sitio no RGD, esta localizado en el extremo-carboxil de la cadena γ del fibrinógeno (45). Dos secuencias RGD están presentes en la cadena α del fibrinógeno, aunque estos sitios pueden ser expuestos y funcionales solo bajo circunstancias específicas.

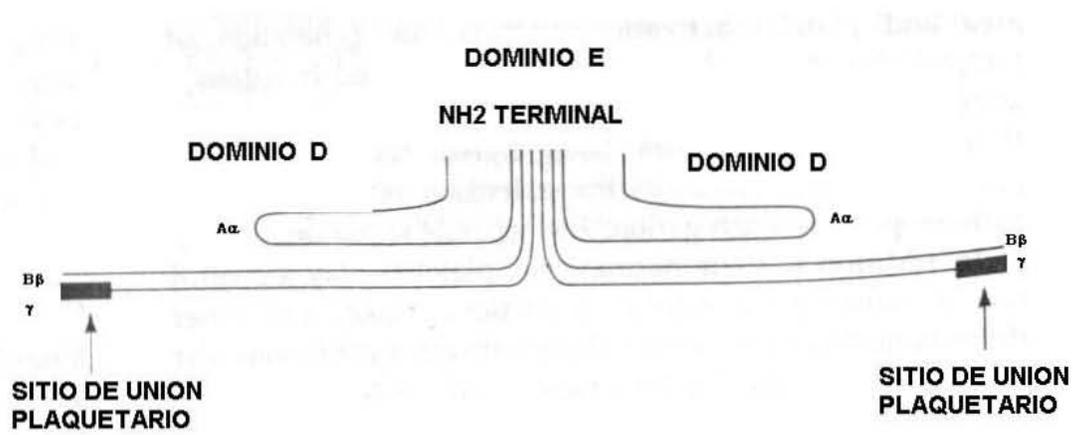


FIG.3 Estructura del fibrinógeno

VIII.1.5 RECEPTORES DE ADHESIÓN EN PLAQUETAS

- ♦ El complejo glicoproteína **Ib-V-IX**

Función. El complejo glicoproteína (GP) Ib-V-IX interviene en la adhesión plaquetaria a el factor Von Willebrand (FvW). El FvW se extiende debajo de las células endoteliales y llega a ser expuesto sobre la lesión vascular. La activación plaquetaria no es requerida por el sistema GPIb-V-IX para mediar la adhesión. Aunque el FvW está también presente en el plasma, la GPIb plaquetaria no se une a esta forma, excepto bajo condiciones de heridas profundas, lo que sugiere que una conformación específica del FvW es requerida para la adhesión plaquetaria. De hecho, la conformación del FvW en solución puede llegar a ser alterada experimentalmente por agentes como ristocetina o botrocetina (46), la cual une al FvW y aparentemente lo convierte a una forma activa que es reconocida por el GPIb. Estos compuestos tienden a ser por lo tanto útiles experimentalmente. La conformación del FvW también cambia dramáticamente desde una forma globular a una extendida bajo condiciones de heridas profundas, explicando potencialmente sus propiedades biológicas alteradas bajo estas condiciones (47). El FvW en el subendotelio está también probablemente en una conformación activa (46). Estudios in vitro del flujo de la adhesión sugieren que el GPIb plaquetario funciona más efectivamente como un receptor adhesivo para la matriz del FvW extracelular o inmovilizado bajo índice de una lesión profunda (48), y bajo estas circunstancias es probable que sea uno de los principales mecanismos de unión plaquetario inicial a la pared de los vasos lesionados.

Además de su presencia sobre las plaquetas, varios componentes del complejo han sido reportados sobre otras células también, principalmente células endoteliales. La presencia de algunas de esas glicoproteínas en las células endoteliales puede estar realizada por exposición a citocinas como el TNF- α e INF- γ (49). La GPIb sobre esas células es funcional en la adhesión para inmovilizar al FvW y puede contribuir al enlace endotelial del FvW en la matriz subendotelial (50).

Estructura y características. El complejo GPIb-V-IX sobre las plaquetas esta compuesto actualmente de 4 productos de genes separados: las GPIb α y GPIb β , unidas por puentes disulfuro, a cuales están asociados no covalentemente con el GPIX y el GPV (fig. 4). La subunidad GPIb α tiene una masa molecular de 150 KDa, GPIb β de 27 KDa, GPIX de 20 KDa, y el GPV de 83 KDa (53).

Aproximadamente 25 000 copias de este complejo están presentes en la superficie plaquetaria. Todas las subunidades del complejo GPIb pertenecen a la familia de proteínas

ricas en leucina, las cuales contienen más de 40 miembros, aunque la función de estos 24-aa esta indefinida. La porción amino-terminal de la GPIb α contiene sitios de unión adyacente y parcialmente traslapados para FvW y trombina (36,54). Varios residuos de tirosina en estas regiones están sulfatados, una modificación que parece critica para la unión del FvW y trombina (54). La GPIb β esta unida por puentes disulfuro a la GPIb α cercana a la región transmembranal de la GPIb α . El complejo GPIb-V-IX también contribuye a la respuesta de las plaquetas a la trombina. El dominio citoplasmático de la GPIb contiene 96 aminoácidos, una secuencia lineal de 32 aminoácidos de este dominio citoplasmático contiene un sitio de unión para la proteína de unión a actina, una proteína del citoesqueleto membranal (60). La proteína de unión actina se cree que une al complejo del citoesqueleto membranal, el cual es por turno unido al citoesqueleto de las plaquetas (fig. 4) Más recientemente fue reportado que la proteína 14-3-3 ξ une al aminoácido carboxiterminal 15 del GPIb α (61) y potencialmente juega un papel en la señalización GPIb-mediado.

Aunque el papel exacto del GPV dentro del complejo GPIb es desconocido, varios estudios demostraron que la GPV es requerida para una eficiente expresión en la superficie del GPIb α y GPIX (62). La secuencia del GPV también contiene un sitio hendido de trombina (24) y esta de hecho, hendido por trombina (65). Aunque si su hidrólisis contribuye completamente a la respuesta a trombina en plaquetas es desconocido y ha sido una fuente de controversia (83).

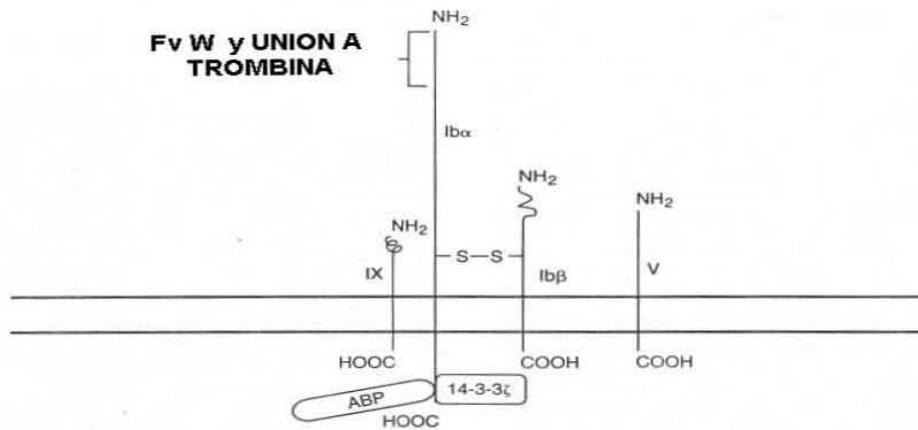


FIG. 4 Estructura de la GPIIb-V-IX.

♦ **Integrinas**

Las integrinas son la clase mejor estudiada de receptores mediante la adhesión de componentes de la matriz extracelular, y son esenciales para la función plaquetaria. Todas las integrinas son heterodímeros compuestos de subunidades transmembranales α y β . Actualmente hay más de 14 subunidades α y 8 subunidades β , la combinación de las cuales determina la especificidad del ligando. Entre las integrinas hay diferentes integrinas que pueden unir al mismo ligando, y algunas integrinas unen a varios ligandos. Las integrinas que se encuentran sobre las plaquetas son la α IIB β ₃, α _V β ₃, α ₂ β ₁, α ₅ β ₁ y α ₆ β ₁.

Cada una de las subunidades de las integrinas se extiende una vez sobre la membrana (fig. 5). El dominio extracelular α tiene 3 o 4 EF semejante a sitios de unión a catión divalente que unen Ca^{2+} , Mg^{2+} , o Mn^{2+} . El catión divalente de unión es esencial para la función de la integrina porque la adhesión celular mediada por integrinas es perturbada en presencia del EDTA. Algunas subunidades α de integrinas, incluyendo a la α IIB, y la α _V, están compuestas de una cadena ligera y pesada que están unidas por un enlace disulfuro (89). Además, algunas subunidades α de las integrinas, incluyendo a la α ₂, contiene un dominio extra, llamado I insertado o dominio I, el cual se piensa es importante para la unión de ligandos. Ambas subunidades la α y la β son esenciales para la unión de

ligandos. Las subunidades α o β que se encuentran naturalmente separadas en la superficie de la célula no han sido reportadas, y el dogma actual es que las integrinas se encuentran siempre como heterodímeros. Los dominios citoplasmáticos de las subunidades α y β determinan la localización subcelular, la asociación de integrinas con el citoesqueleto, y la localización de integrinas en estructuras especializadas llamadas adhesiones focales. Los dominios citoplasmáticos de las integrinas son también necesarios para su papel en la activación por integrinas (92) y en la transducción de señales extracelulares hacia la célula (93).

Las plaquetas pueden interactuar directamente con el colágeno expuesto vía GPIa / IIa ($\alpha 2\beta 1$) o quizás con otros receptores implicados en la interacción plaqueta-colágeno (GPVI, p65) (M189). Además, el fibrinógeno, fibronectina y FvW, si son liberados de plaquetas o están circulando en plasma, pueden unirse a colágeno. Por turno, estas proteínas pueden entonces interactuar con GPIIb/IIIa, GPIc*/IIa ($\alpha 5\beta 1$) y/o GPIb/IX plaquetarios, completando un mecanismo iniciado por la exposición de colágeno (M193).. Dependiendo de la capa vascular, las glicoproteínas adhesivas disponibles y las condiciones, es probable que varias combinaciones de receptores en plaquetas, incluyendo GPIb α , GPIa / IIa ($\alpha 2\beta 1$), GPVI, p65 y GPIIb / IIIa actúan en concierto para transformar la formación y lenta translocación de plaquetas iniciada por GPIb α interactuando con el FvW hacia la adhesión plaquetaria estable.

♦ **Integrina α IIb β ₃ (GPIIb – IIIa).**

La integrina α IIb β ₃ es la proteína de membrana plaquetaria más abundante, constituye de 1 a 3% del total de proteínas plaquetarias (102). En plaquetas en reposo estaba originalmente estimado que contienen de 40 000 a 60 000 moléculas de α IIb β ₃ en la superficie, aunque medidas recientes con fragmentos de Fab de un anticuerpo específico sugieren que una estimación más exacta es de 80 000 (115). Otros 20 000 a 40 000 receptores están presentes dentro de la plaqueta, principalmente en membranas de gránulos- α pero también en cuerpos densos y en las capas de las membranas del sistema canalicular abierto; estos receptores son capaces de juntar las membranas plasmáticas cuando las plaquetas son activadas y experimentan la reacción de liberación. En promedio los receptores GPIIb / IIIa son menores de 20 nm en la superficie plaquetaria y de ese modo están entre los receptores más densamente expresados para la adhesión / agregación presentes en cualquier tipo de célula.

La integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ media la agregación plaquetaria por unión del fibrinógeno soluble en plasma, el cual causa un eslabón de plaquetas múltiples vía un puente de fibrinógeno (143). Además, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ puede unirse a fibronectina, al factor Von Willebrand, vitronectina, y a la trombospondina (144). La unión a esos ligandos ocurre por medio de la adhesión a la secuencia de péptidos RGD que se encuentra en cada una de esas proteínas. En el fibrinógeno y el factor Von Willebrand, el sitio RGD está probablemente disponible sólo cuando el ligando está en una conformación específica o inmovilizado. Así, la unión plaquetaria a fibrinógeno soluble ocurre por la unión de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ a otro sitio relacionado en el fibrinógeno, una secuencia de 10 a 12 aminoácidos que contienen la secuencia crítica ala-gly-asp-val (AGDV) en el extremo carboxil de la cadena γ del fibrinógeno (45, 145, 146).

La integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ existe en la superficie plaquetaria en una conformación de baja-afinidad que es incapaz de unirse al fibrinógeno soluble (fig. 5) El estado de baja afinidad de la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ es importante porque esta provee una agregación espontánea de plaquetas circulantes en respuesta al fibrinógeno abundante en plasma (144). Sin embargo, la forma de baja-afinidad de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ puede unir al fibrinógeno que está inmovilizado sobre una pared de vasos sanguíneos o sobre la superficie de otra célula o plaqueta (25, 147,155). Sobre la activación plaquetaria, los eventos de señalización intracelular provocan un cambio conformacional en la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, haciéndolo capaz de unirse al fibrinógeno soluble (160).

♦ **Otras integrinas plaquetarias.**

Las plaquetas se adhieren al colágeno subendotelial principalmente en los sitios de lesión a través de la integrina

GPIa / IIa (receptor colágeno; VLA-2; $\alpha_2\beta_1$, CD49b / CD29)

La integrina $\alpha_2\beta_1$ es un receptor para los colágenos fibrilares I, II, III y V, así como los colágenos no fibrilares IV, VI, VII y VIII (162,163). La adhesión plaquetaria a colágeno mediado por GPIa / IIa aumenta en presencia de magnesio o manganeso y es inhibida por calcio. La GPIa / IIa puede, sin embargo, mediar la adhesión plaquetaria a colágeno en sangre heparinizada.

La GPIa / IIa probablemente se une a la membrana del citoesqueleto y es competente para mediar la adhesión en plaquetas en reposo. Su ligando específicamente parece estar determinado por la célula en la cual es expresado, entonces en plaquetas este parece funcionar únicamente como receptor de colágeno, mientras que en células endoteliales este funciona como un receptor para laminina, también como un receptor de colágeno. La GPIa / IIa es capaz de iniciar la síntesis de proteínas plaquetarias.

La integrina $\alpha_2\beta_1$ es también un receptor para laminina en diferentes tipos celulares, pero en plaquetas su función esta restringida a la unión a colágeno (164). Las plaquetas tienen de 1 000 a 2 000 moléculas $\alpha_2\beta_1$ en su superficie.

Las plaquetas tienen en su superficie otras 3 integrinas, las cuales están presentes en menos de 100 a 500 moléculas por plaqueta. Estas integrinas son:

GPIc* / IIa (receptor de fibronectina; $\alpha_5\beta_1$, VLA-5; Cd49e / CD29).

Es un receptor β_1 -integrina que es expresado en una gran variedad de células y media la adhesión a fibronectina. Es importante en interacciones con la matriz extracelular. La secuencia RGD en fibronectina es crucial para células de adhesión, pero otras regiones en fibronectina probablemente también contribuyen. Los péptidos contenidos en RGD pueden inhibir la adhesión celular mediada por GPIc* / IIa ($\alpha_5\beta_1$). Como con otras integrinas, la adhesión depende en la presencia de cationes divalentes. La GPIc* / IIa es componente para mediar adhesión de plaquetas en reposo a fibronectina. El papel biológico de este receptor en plaquetas no es claro. Aunque puede estar involucrado en homeostasis y / o trombosis, es también posible que su función sea restringida a megacariocitos unidos a la matriz de la médula, entonces parece servir esta función en otros precursores hematopoyéticos. La GPIc* / IIa no es el único receptor de fibronectina en plaquetas, con apropiada activación, la GPIIb / IIIa puede unirse a fibronectina.

GPIc / IIa (receptor laminina; $\alpha_6\beta_1$; VLA-6, CD49f / CD29)

La adhesión plaquetaria a laminina puede ser mediada por la integrina GPIc / IIa ($\alpha_6\beta_1$). La adhesión es demostrada con magnesio y manganeso; el calcio no soporta adhesión. Este receptor es competente en plaquetas en reposo, pero su papel en plaquetas no es claro.

Un receptor para laminina Mr 67 000 ha sido identificado en plaquetas; este receptor esta presente en otras células también.

α V β 3 (receptor de vitronectina; CD51 / CD61)

El receptor α V β 3 puede mediar la adhesión a vitronectina pero únicamente en la presencia de magnesio y manganeso, no en calcio, también puede mediar la interacción con fibrinógeno, FvW y trombospondina. Su papel fisiológico no está definido pero puede contribuir en el desarrollo de la actividad coagulante de las plaquetas. El receptor α V β 3 está presente en células endoteliales, osteoclastos y otras células. También une a fibronectina, osteoponina y colágeno desnaturalizado(169).

Esta integrina probablemente contribuye en la adhesión de plaquetas a los muchos componentes de la matriz subendotelial que son expuestos en sitios de lesión de vasos sanguíneos (182).

♦ **Otras glicoproteínas plaquetarias**

Glicoproteína VI. La glicoproteína VI (GPVI) es una proteína de membrana plaquetaria no caracterizada de casi 62 KDa. La GPVI se piensa es un receptor de colágeno porque pacientes con deficiencia de GPVI muestran defectos en la agregación plaquetaria en la respuesta al colágeno, pero no a otros agonistas. Esos pacientes presentan una prolongación del tiempo de sangrado leve, pero con perfiles de coagulación normal (185).

Glicoproteína IV. La glicoproteína IV (GPIV) o CD36, es una proteína membranal plaquetaria que tiene un número de funciones potenciales, y esta presente en cerca de 30 000 copias por plaqueta (299). La GPIV ha sido propuesta para ser un receptor de colágeno (300), trombospondina (301) y eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum* (malaria). Este papel es confuso por el hecho de que las plaquetas que carecen de GPIV, no tiene algún defecto observable en la respuesta plaquetaria a colágeno tipo I, III o IV (5, 302). Sin embargo, las plaquetas deficientes en GPIV muestran defectos en la respuesta a colágeno tipo V (5, 303). Ha sido propuesto que la habilidad de la GPIV para unirse al colágeno versus trombospondina es regulada por la fosforilación en el dominio extracelular de la GPIV por una ectoproteína cinasa (304). Aunque el papel de la GPIV en la función plaquetaria es incierto, probablemente juega algún papel en los eventos de señalización plaquetaria (305).

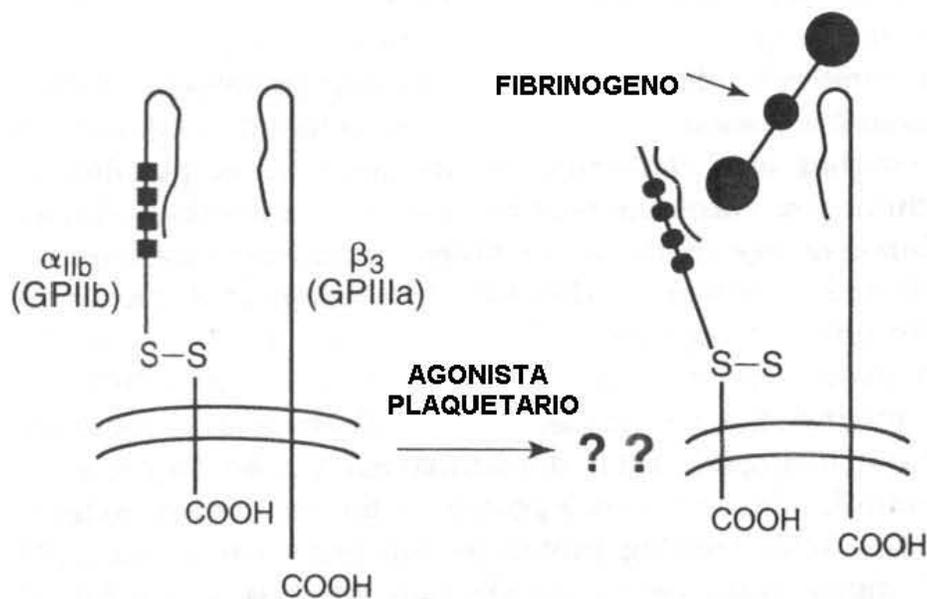


FIG. 5 Estructura y activación

VIII.2 AGREGACION PLAQUETARIA

El FvW subendotelial aparece para asociarse con el colágeno tipo VI, pero puede unirse a múltiples tipos de colágenos. Las plaquetas circulan como células en forma de disco pero cuando entran en contacto con el subendotelio, hay agonistas que activan a que las plaquetas expongan sus receptores. Estos agonistas incluyen al colágeno, el cual esta presente en el subendotelio; la trombina, la cual es generada en la superficie de las plaquetas; el ADP el cual es liberado de las células sanguíneas rojas dañadas y secretado de gránulos densos plaquetarios, la epinefrina circulante y ácido araquidónico, el cual es liberado de almacenes de lípidos en plaquetas y metabolizado a el potente agonista

tromboxano A₂. Estos agonistas generalmente causan en la plaqueta un cambio de forma de tal manera que forman seudópodos largos, seguido por la agregación plaquetaria. El cambio de forma y la agregación plaquetaria pueden ser monitoreados con un agregómetro, el cual registra el cambio de forma plaquetario como una disminución en la transmisión de luz a través de una suspensión de plaquetas y la agregación plaquetaria como un incremento en la transmisión de la luz (fig. 6). La agregación requiere de la activación del receptor de adhesión plaquetaria el α IIb β ₃ para que pueda unirse al fibrinógeno o al FvW y unirse a las plaquetas adyacentes juntos en un agregado. Los agonistas plaquetarios inducen eventos de transducción de señal en plaquetas que causan los eventos anteriores, aunque los caminos de transducción de la señal no son completamente entendidos.

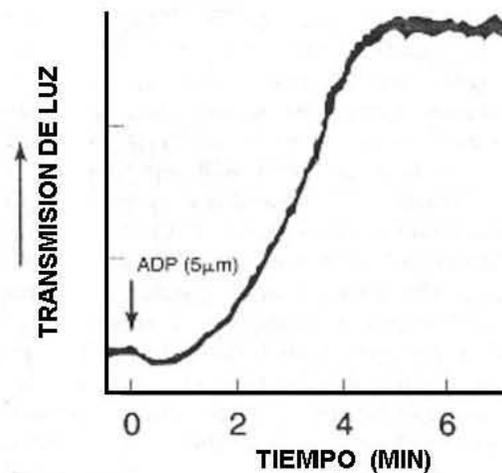


FIG. 6 Medición de la agregación plaquetaria.

VIII.2.1 UNIÓN DE FIBRINÓGENO SOLUBLE A PLAQUETAS EN SUSPENSIÓN

El receptor del fibrinógeno en plaquetas es la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (144). El número de moléculas $\alpha\text{IIb}\beta_3$ por plaqueta es aproximadamente de 80 000 (115) puede estar basado en la estimulación plaquetaria por agonistas extracelulares, la molécula $\alpha\text{IIb}\beta_3$ expuesta en la superficie original de un pool de almacenaje interno esto es, el sistema canalicular abierto y los gránulos α (306). Aunque el fibrinógeno es una proteína abundante en plasma (3mg/ml), las plaquetas circulan libremente en la sangre en un estado de reposo y no se unen a fibrinógeno, previniendo de esta manera la agregación espontánea. Para que se unan a fibrinógeno, las plaquetas deben ser activadas por agonistas expuestos o generados localmente tal como la trombina, el ADP, la epinefrina o el colágeno. Estos agonistas llegan a estar disponibles en el sitio de lesión del vaso sanguíneo, y se unen a sus receptores en la superficie plaquetaria, generando una cascada de eventos, que conducen a la activación del receptor del fibrinógeno $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Esta cascada de eventos de señalización inducen un cambio conformacional propagado a lo largo del heterodímero $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (307,308), resultando en la activación del receptor (fig.5), in vitro, el cambio conformacional del $\alpha\text{IIb}\beta_3$ puede también ser inducido por anticuerpos activadores específicos que se unen al $\alpha\text{IIb}\beta_3$. El uso de tales herramientas ha ayudado a delinear los eventos de transducción de señales bidireccional mediante $\alpha\text{IIb}\beta_3$. La unión de fibrinógeno radio-marcado en solución a plaquetas activadas por agonistas revela que la unión es saturable, específica y parcialmente reversible. Un amplio rango de constantes de disociación (Kd) (de 300 a 500 nm) ha sido reportado para la unión de fibrinógeno a plaquetas (309), mientras que el fibrinógeno se une a la $\alpha\text{IIb}\beta_3$ purificada con una Kd de 15 nm (310).

VII.2.2 REQUERIMIENTO DE CATION.

La unión del fibrinógeno a plaquetas activadas requiere una concentración óptima de cationes: 1 mM calcio, magnesio o manganeso. Estos cationes probablemente se unen al dominio de unión a catión de la αIIb , el cual contiene al menos cuatro sitios de unión a calcio de afinidad moderada (30 a 100 μM) (311-313). Uno de los sitios de unión a calcio también está presentes en la subunidad β_3 . Una mutación en la secuencia de unión a calcio de β_3 afecta la funcionalidad de la $\alpha\text{IIb}\beta_3$, sugiriendo que el calcio es importante en el mantenimiento de una conformación funcional. Además, la unión del ligando a $\alpha\text{IIb}\beta_3$

parece involucrar un desplazamiento del calcio por el ligando de la subunidad β_3 . También, el dominio citoplasmático $\alpha_{IIb}\beta_3$ (aminoácidos del 985 al 1008) contiene un sitio de unión a catión funcional que está constitutivamente ocupado en el ambiente intracelular y es capaz de formar un complejo ternario con el dominio citoplasmático β_3 .

VII.2.3 SITIOS DE UNIÓN A INTEGRINA EN FIBRINÓGENO.

La interacción inicial entre fibrinógeno soluble y la $\alpha_{IIb}\beta_3$ involucra al extremo carboxi-terminal de la cadena γ del fibrinógeno, llamado el γ -dodecapéptido (fig. 3), el cual interactúa preferentemente con la subunidad α de $\alpha_{IIb}\beta_3$ en el segundo sitio de unión al catión (314). El péptido cadena- γ sintético también afecta a la subunidad β_3 porque desplaza al péptido RGD, el cual puede preferentemente unirse a la subunidad β_3 (315). Así, los sitios de unión en cada subunidad se creía forman una área de unión en que los péptidos que contienen RGD y los péptidos que contienen γ -dodecapéptidos son ligandos exclusivos mutuamente. Aunque el fibrinógeno contiene dos diferentes secuencias RGD localizadas en la cadena $A\alpha$ de la molécula del fibrinógeno, estos sitios no son requeridos para el enlace inicial del fibrinógeno (147). Sin embargo, pueden llegar a estar expuestos en el fibrinógeno de unión o fibrina a tal vez eventos específicos tales como la retracción del coágulo y unirse a otra integrina, la $\alpha_V\beta_3$ (316). El fibrinógeno de unión a $\alpha_V\beta_3$ en células endoteliales y $\alpha_{IIb}\beta_3$ en plaquetas ha sido propuesto como un mecanismo para unir un tapón de plaquetas a las células del endotelio circundante como parte del proceso de herida-curación (316).

VIII.2.4 INHIBICIÓN DEL FIBRINÓGENO DE UNIÓN POR PÉPTIDOS DERIVADOS DE FIBRINÓGENO Y OTRAS MOLÉCULAS.

Los péptidos sintéticos que contienen el dominio de unión a integrina RGDF o RGDS o el γ -dodecapéptido (fig. 3) puede inhibir la unión del fibrinógeno a plaquetas estimuladas por agonistas. La concentración necesaria para inhibir el 50% del fibrinógeno de unión está en el rango de 10 μ M para los péptidos RGD y 200 μ M para el dodecapéptido (317). En una búsqueda de más inhibidores terapéuticos eficaces del fibrinógeno de unión a plaquetas, nuevas moléculas han sido diseñadas o aisladas de fuentes naturales. Moléculas basadas en el RGD de la espina dorsal han sido químicamente modificadas para incrementar su efecto inhibitorio por ciclización de los péptidos RGD o por sustitución del cuarto residuo por otro

aminoácido (tales como el triptofano). Los esfuerzos farmacéuticos han resultado en la producción de análogos no péptidos químicos de la secuencia RGD (que es peptidomimético) que muestra las cargas (+) y (-) como la arginina y el ácido aspártico, respectivamente, que son separados por 10 a 20 Å (318, 319). Los péptidos-miméticos tienen las ventajas de ser más potentes y específicos para la $\alpha\text{IIb}\beta_3$, y es más estable biológicamente comparado con los péptidos RGD degradados rápidamente (320). Existen algunos antagonistas naturales del receptor del fibrinógeno plaquetario y han sido aislados del veneno de víbora (321), serpientes de cascabel (322), sanguijuelas y las glándulas salivales de la garrapata. Estas proteínas de bajo peso molecular (LMW) (5 a 9 Kda) contienen un sitio RGD y muestran un conservado patrón de cisteínas responsables del mantenimiento de la actividad de esas moléculas. La excepción es la barbourina, la cual en cambio tiene un sitio lys-gly-asp (KGD) que lo hace altamente específico para $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Por sus secuencias homólogas y porque interfieren directamente con la función de unión a integrinas, las moléculas derivadas del veneno de víbora han sido agrupadas en una familia llamada desintegrinas (322). Las desintegrinas derivan de una larga familia de precursores de metaloproteinasas e inhibidores de la agregación plaquetaria no enzimático. Las desintegrinas son aproximadamente 1000 a 3000 veces más potentes que los péptidos que contienen RGD, pero su antigenicidad limita su uso como droga (318,319). Sin embargo, proveen útil información que puede ser aplicada para el desarrollo de nuevos péptidos-mimético. La integrilina es un péptido que contiene KGD ciclizado derivado del barbourina a desintegrina .

Entre los primeros antagonistas $\alpha\text{IIb}\beta_3$ desarrollados, estaban los anticuerpos contra el complejo $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Uno de ellos, el anticuerpo monoclonal murina (323) que fue “humanizado” por ingeniería, es un fragmento Fab quimérico recombinante que está comúnmente disponible para la prevención de complicaciones isquémicas después de angioplastia arterial coronaria (320). Otro de los muchos antagonistas de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ comúnmente probado por ensayo clínico es tirofiban .

VIII.2.5 MECANISMOS GENERALES DE SEÑALIZACIÓN DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

Algunos de los caminos de señalización involucrados en eventos de activación plaquetaria son razonablemente bien comprendidos, mientras que otros no. Muchos, pero no todos los agonistas plaquetarios activan plaquetas ocupando siete receptores transmembranales conectados a proteína G (fig. 7). La activación de esos receptores generalmente resulta en la hidrólisis de fosfoinositidos y la activación de la fosfolipasa C β (PLC) (fig.7). La PLC hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ y el DAG parecen interpretar importantes papeles en caminos que conducen a varios aspectos de la activación plaquetaria. El IP₃ se cree interactúa con receptores específicos para inducir la liberación de Ca²⁺ intracelular desde el sistema tubular denso (fig. 7), un organelo de almacenaje de Ca²⁺ intracelular análogo al retículo sarcoplásmico en músculo esquelético. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual esta respuesta contribuye a la agregación plaquetaria no está completamente claro porque la agregación plaquetaria inducida por IP₃ es también dependiente de la producción de tromboxano A₂ (TXA₂) y la liberación de ADP . El DAG interactúa directamente con la proteína C cinasa (PKC), y conduce a la activación de la PKC (fig.7). La PKC activada parece tener un papel crucial en el camino de algunos agonistas, que conduce a, por ejemplo, la activación de α IIB β ₃ y la unión a fibrinógeno; inhibidores específicos de PKC bloquean la unión del fibrinógeno y agregación plaquetaria inducida por algunos agonistas.

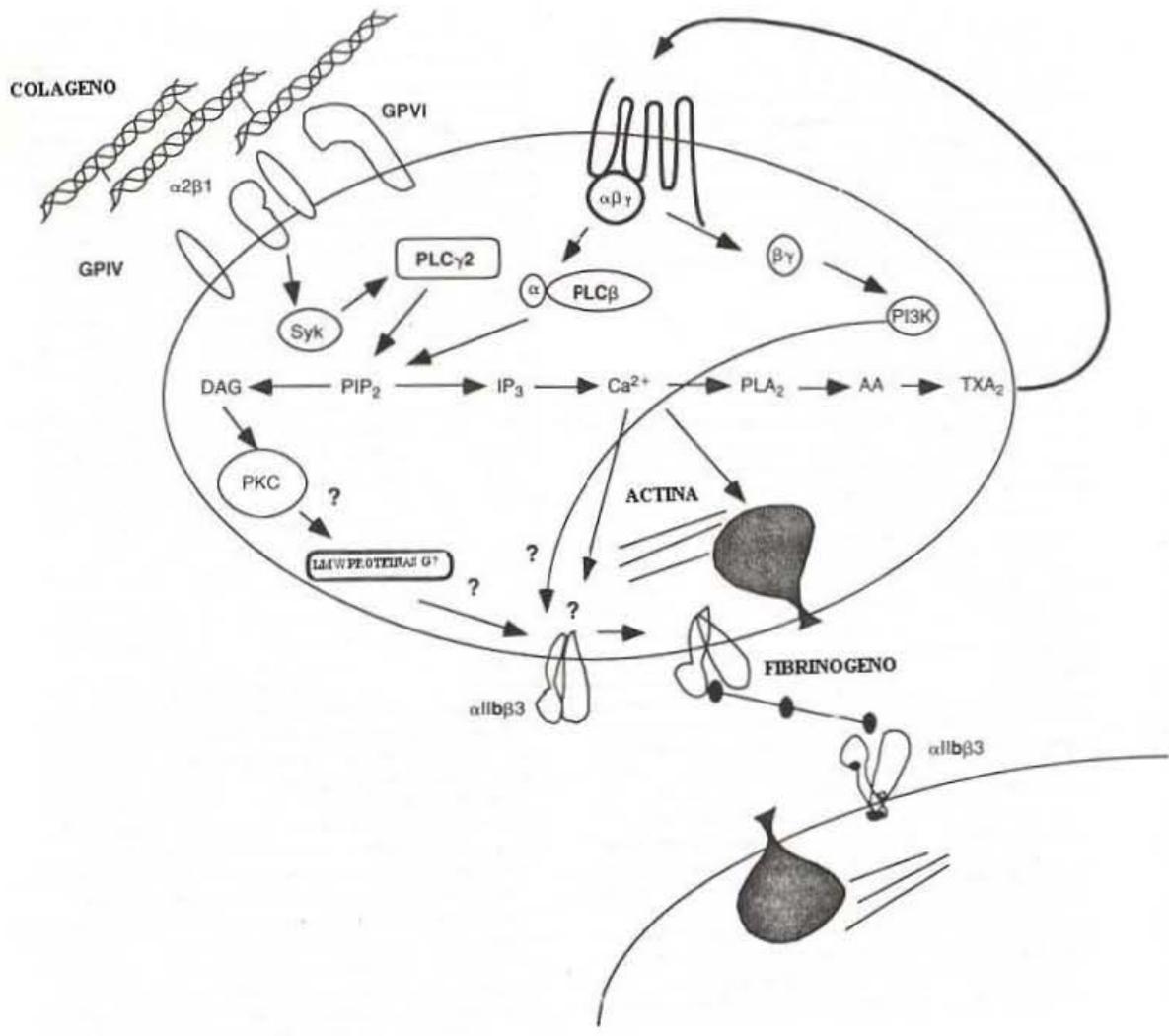


FIG. 7 Señales de transducción.

VIII.2.6 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR AGONISTAS SOLUBLES

La agregación plaquetaria puede facilitar la generación de trombina por uno o diferentes mecanismos, incluyendo la formación de microvesículas, exposición de factor V activado, exposición de fosfolípidos cargados negativamente y quizás la activación de sistemas de contacto. La trombina promueve la activación plaquetaria y conduce a una extensiva desgranulación, la trombina también promueve la activación de la coagulación e inicia la deposición de hebras de fibrina que refuerza el tapón plaquetario además sirve como sitio de depósito de FvW. La trombina puede también ayudar a consolidar el tapón mediante la retracción del coágulo. Finalmente la trombina afecta los receptores en la superficie de membrana, regulando a la GPIb / IX y tal vez facilitando la transición de la adhesión plaquetaria a la agregación plaquetaria (32,33).

VIII.2.7 TROMBINA Y RECEPTORES DE TROMBINA.

La protrombina, el precursor de la trombina, es sintetizada en el hígado, y se convierte en trombina enzimática activa durante la activación por el camino de la coagulación común en sitios de lesión vascular. La trombina activa es una serina proteasa que se adhiere al fibrinógeno para formar fibrina. Además de su actividad enzimática, la trombina ejerce un rango completo de efectos sobre diferentes células (324). La trombina ha sido cristalizada, lo cual ha proporcionado mucha información acerca de varias de sus funciones (325). En plaquetas, es el más potente activador de la unión a fibrinógeno, agregación plaquetaria y retracción del coágulo. Los estudios de unión de diferentes grupos (326) indican que las plaquetas tienen cerca de 50 a 100 sitios de unión de alta afinidad y de 1500 a 2000 sitios de unión de moderada afinidad para trombina. La GPIb es un candidato a receptor de trombina y contiene un sitio de unión cargado altamente negativo para trombina. Las plaquetas deficientes de GPIb son menos sensibles a la trombina, indicando que las moléculas de GPIb toman parte en la amplificación de la respuesta a trombina plaquetaria. Sin embargo, hay una desigualdad inexplicable entre el número de sitios de unión a trombina y el extenso número de moléculas GPIb (25 000 por plaqueta). Por muchos años la información sobre la estructura del receptor de la trombina y los mecanismos no estaba disponible; es solo recientemente que al menos uno de los receptores de trombina ha sido exitosamente clonado y secuenciado de dos tipos de células diferentes.

VIII.2.8 ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE TROMBINA.

Desde que la secuencia de nucleótidos fue deducida (56) ha sido determinado que el receptor de trombina es una proteína de cadena sencilla con un dominio amino-terminal extracelular extendido que contiene características críticas para su activación. La secuencia posterior del aminoácido 42 es llamada el ligando atado y es una extensión cargada muy negativamente, simulando el sitio de unión a trombina de hirudina, un inhibidor de la trombina. El receptor de trombina también contiene siete dominios hidrofóbicos, haciendo al receptor de trombina un miembro de los siete receptores transmembranales conectados a proteína G (fig.8). La parte posterior citoplasmática del receptor contiene un sitio que puede asegurar la parte posterior a la hoja interna de la membrana. El dominio que consta de muchas partes intracelulares también contiene sitios blancos para la fosforilación de la proteincinasa A.

VIII.2.9 MECANISMOS DEL RECEPTOR DE LA TROMBINA.

Activación. El receptor de trombina clonado tiene un nuevo mecanismo de activación: El receptor sirve como un sustrato para trombina. La trombina se une al receptor de trombina en el dominio extracelular amino-terminal (entre arginina 41/ serina 42) resultando en la liberación de los 40 primeros aminoácidos del receptor de trombina (fig.8). La remoción de estos péptidos amino-terminales desenmascara un nuevo extremo amino que funciona como un ligando atado, esto es, este segmento de receptor unido a otra región de este receptor y activarse el mismo (56). Un péptido sintético correspondiente a los 5 nuevos aminoácidos N-terminal (SFFLRN) del receptor de trombina (que es el ligando atado) imita muchos de los efectos de la trombina con respecto a la activación plaquetaria. Sin embargo, el péptido sintético debe ser agregado en un exceso molar grande en orden a plaquetas activas, lo cual puede indicar que el ligando atado por el mismo no es muy eficiente en la interacción con el sitio de unión. Además, la trombina esta presente en una proporción 1:1 con su receptor aunque es catalítico. Esto sugiere que la trombina es necesaria para facilitar la interacción del ligando atado con su sitio de unión. Esta hipótesis también explicaría la presencia del dominio semejante a hirudina cargado negativamente en el receptor adyacente para el ligando atado el cual probablemente promueve la interacción del receptor con el sitio de unión al anión exógeno de la trombina.

Desactivación. La activación del receptor de trombina es pasajera porque varios minutos después el receptor es desensibilizado. La desensibilización involucra la internalización del receptor seguido por degradación (75%) o reciclado (25%) de los receptores en la superficie (327,328). El porcentaje de receptores internalizados varía con el tipo de células (329). Cuanta desensibilización es regulada no ha sido delineado pero podría involucrar la fosforilación de las ondas citoplasmáticas del receptor, como en el caso para otros miembros de la familia de estos receptores (tal como los receptores β -adrenergico y rodopsina).

VIII.2.10 SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN GENERADOS POR EL RECEPTOR DE TROMBINA.

La porción citosólica del receptor de trombina interactúa con una proteína de unión a nucleótido guanina intracelular (una proteína G heterotrimerica compuesta de una subunidad α , β y γ), la cual es típica de la familia de receptores transmembranales heptahelical. Sobre la activación de la proteína G, la cual involucra intercambios de unión de GDP por GTP, la subunidad $G\alpha$ es liberada y activa a la fosfolipasa $C\beta$ ($PLC\beta$). Las $PLC\beta$ hidrolizan al PIP_2 , liberando DAG e IP_3 . Estos caminos conducen a la activación de la integrina $\alpha IIb\beta_3$ y secreción granular (fig.7). El metabolismo del ácido araquidónico y el ADP secretado también contribuyen a la respuesta total, también como por otros, caminos menos definidos.

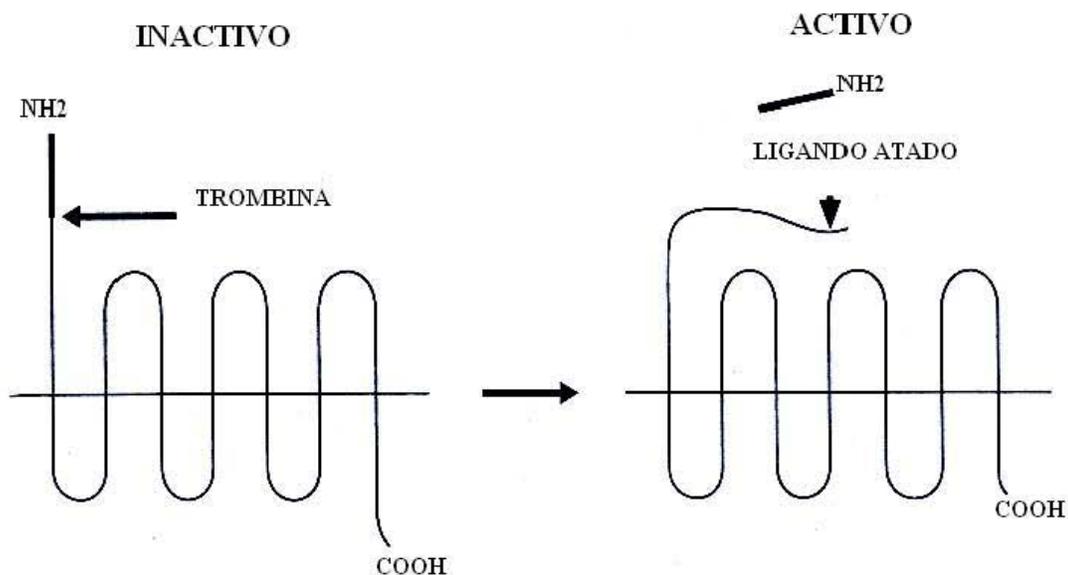


FIG. 8 Activación del receptor de trombina.

VIII.2.11 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.

El ácido araquidónico que es fabricado por el metabolismo en la plaqueta, es liberado principalmente de las reservas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina en la membrana plasmática (330). En la activación de plaquetas por una variedad de agonistas tales como la trombina, el ácido araquidónico es liberado de sus reservas membranales por la fosfolipasa (PL) A_2 , o por una combinación de PLC y DAG lipasa, y es metabolizado por ciclooxigenasa a prostaglandina (PG) G_2 (330). La ciclooxigenasa es inhibida por la aspirina y otros agentes anti-inflamatorios no esteroideos, los cuales disminuyen la agregación plaquetaria en respuesta a muchos agonistas. La PGG es metabolizada a PGH_2 , la cual es metabolizada a tromboxano (TX) A_2 , un potente agonista plaquetario de vida corta. El TXA_2 es rápidamente convertido al metabolito inactivo TXB_2 . Varios análogos PGH_2 / TXA_2 estables son disponibles para uso experimental en el estudio del receptor TXA_2 .

El TXA_2 y el PGH_2 interactúan con los receptores TXA_2 clonados y secuenciados recientemente, miembros de los siete receptores transmembranales conectados a proteína G. El receptor TXA_2 ha sido localizado en la membrana plasmática plaquetaria y aparece conectado a $G\alpha_q$, tal vez a $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, y G_i2 . Hay al menos dos isoformas de este

receptor, el cual difiere solo en el extremo carboxil, el receptor clonado de placenta es llamado TXR α y el receptor de endotelio es TXRB. Aunque ambos receptores activan PLC β , el TXR α activa adenilato ciclase, resultando en la formación de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), la cual inhibe la función plaquetaria, mientras que el TXR β inhibe la activación de la adenilato ciclase. Porque ambos receptores están sobre las plaquetas y el TXA $_2$ es un potente agonista plaquetario, los efectos de la activación de PLC deben estar lejos para compensar los efectos de la activación de la adenilato ciclase. La PLC hidroliza al PIP $_2$ resultando en la formación de DAG, el cual activa al PKC, y al IP $_3$, el cual moviliza Ca $^{2+}$ (fig. 7). Que el TXA $_2$ induce la agregación plaquetaria en una manera PKC-dependiente es apoyada por la observación de que el pre-tratamiento de las plaquetas con inhibidores de PKC tales como el RO 31-8220 inhibe la agregación inducida por el U46619 análogo del PGH $_2$ / THA $_2$ estable. Otros eventos de señalización que resultan de la estimulación del TXR incluye la activación de la cinasa, proteína activada por el mitogeno p38 (MAP) y la fosforilación de la pequeña proteína de choque térmico la hsp 27. Estos eventos parecen ser críticos para la agregación TRX-inducida porque un inhibidor específico de la cinasa MAP, SB203580, inhibe la agregación U46619-inducida.

El ADP secretado también contribuye substancialmente a la respuesta total inducida por el camino ácido araquidónico / TXA $_2$. Los sistemas de desecho de ADP ha sido reportado que bloquean la agregación plaquetaria inducida por U46619 parcialmente (30%) o completamente.

VIII.2.12 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR FACTOR PLAQUETARIO ACTIVANTE.

Como el nombre sugiere, el factor activante plaquetario (PAF) es un potente agonista plaquetario. Químicamente, el PAF es un fosfolípido éter. Además de la activación plaquetaria, el PAF media un número de respuestas inflamatorias en varios tejidos (331). Estas acciones son mediadas a través de receptores de membrana específicos.

La clonación molecular del receptor del PAF indica que es un miembro de la familia de los 7 receptores transmembranales conectados a proteína G (332). La activación del receptor PAF induce la producción de fosfoinositidos a través de las proteínas G seguido por un aumento en Ca $^{2+}$ intracelular y la activación del PKC (124). En plaquetas, el receptor del PAF regula a la adenilato ciclase y al PLC a través de una G α_{41} sensible a la toxina

pertusis. Las plaquetas, así como varias células diferentes y tejidos liberan ácido araquidónico en respuesta a la estimulación del PAF a través de PLA₂. El PAF también estimula la fosforilación tirosina de varias proteínas, incluyendo la pp60^{c-src} (333).

VIII.2.13 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR ADENOSINA 5'-DIFOSFATO (ADP).

La adenosina 5'-difosfato (ADP) es liberada de los gránulos densos plaquetarios durante la activación plaquetaria por agonistas. El ADP secretado potencia los efectos activantes de otros agonistas (334). El ADP causa cambio de forma, secreción granular y agregación. Sin embargo, diferentes agonistas fuertes tales como la trombina y el colágeno, inducen la secreción de ADP usualmente sólo en conjunción con la agregación plaquetaria. Fuertes agonistas generalmente estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos, el incremento de Ca²⁺ libre citosólico y la formación de TXA₂, y PKC activo. En contraste, el ADP sólo estimula mínimamente la hidrólisis de fosfoinosítidos o la activación de PKC, pero induce la formación de TXA₂, sugiriendo que el receptor de ADP se une a PLA₂ pero no a PLC. Aunque esos efectos del ADP han sido largamente conocidos, poco se conoce acerca de la naturaleza del receptor ADP plaquetario. Además de provocar la activación plaquetaria, se ha encontrado que el ADP también inhibe a la adenilato ciclasa estimulada. Existe controversia en cuanto a si esos dos efectos opuestos están mediados por uno o dos tipos de receptores ADP. El receptor ADP plaquetario es adoptado para pertenecer a la familia purinoreceptor y el llamado receptor P_{2T} (335). El ATP, un agonista para otro receptor P₂, es un antagonista para el receptor ADP plaquetario, una de las características que lo distinguen de otros. Estudios farmacocinéticos extensivos con varios análogos de ADP sugieren que más de un tipo de receptores ADP puede existir en las plaquetas (335). También es posible que un receptor individual puede acoplarse con diferentes efectores, induciendo diferentes respuestas fisiológicas. Se ha intentado identificar mediante varios estudios a las proteínas del receptor de plaquetas. Usando un análogo en foto-afinidad del ADP llamado AZPET-ADP, una proteína de 43-kDa ha sido identificado como un receptor ADP que inhibe adenilato ciclasa e induce la agregación plaquetaria. Además, una proteína de 100-kDa llamada agregina ha sido sugerida como receptor P_{2T} usando marcaje por afinidad.

VIII.2.14 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR EPINEFRINA.

La epinefrina aumenta la respuesta de muchos otros agentes agregantes, pero no es considerado por algunos investigadores que es un agente agregante por sí mismo. Los efectos agregantes de la epinefrina que se han visto in vivo pueden actualmente ser causados por la combinación de epinefrina y trombina, lo cual puede ser generado durante la recolección de sangre por causa del inhibidor de trombina específico hirudina que bloquea la agregación inducida por epinefrina de plaquetas lavadas (336). El receptor de epinefrina en plaquetas es un adrenoreceptor α_2 proteína G – enlazado que ha sido purificado, clonado y secuenciado. Es una proteína de 64-KDa que esta conectada a la inhibición de la adenilato ciclasa. Sin embargo, la inhibición de la adenilato ciclasa no es en si misma suficiente para causar agregación plaquetaria, pero puede ser suficiente para amplificar la activación inducida por otros agonistas (337). Tales efectos sinérgicos son comunes entre agonistas y probablemente ocurren in vivo.

VIII.2.15 SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN

La integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ha mostrado que traduce mensajes en las plaquetas sobre la unión a fibrinógeno (fig.7), un evento llamado señal de transducción. La señalización es importante para la activación de plaquetas por agonistas tales como el colágeno, el cual une a la integrina $\alpha_2\beta_1$, y otros receptores de adhesión plaquetaria, también como para eventos tardíos en la activación plaquetaria tales como la retracción del coagulo a través de $\alpha_{IIb}\beta_3$ (fig.6). En estudios de laboratorio el fibrinógeno de unión debe ser primero inducido por agonistas interactuando con sus receptores en la superficie de las plaquetas, o por adición y unión de anticuerpos activantes específicos a $\alpha_{IIb}\beta_3$. La ventaja de usar anticuerpos $\alpha_{IIb}\beta_3$ – activantes experimentalmente es que ellos no inducen la señalización de dentro hacia afuera, lo cual de otro modo complicaría el estudio de señalización en plaquetas.

El fenómeno de señalización probablemente ocurre con todas las integrinas en todas las células, aunque solo hablamos de señalización a través de $\alpha_2\beta_1$ y otros receptores de colágeno y $\alpha_{IIb}\beta_3$ en plaquetas. Aunque, a pesar de que el termino *señalización* fue originalmente introducido para la señalización de integrinas.

VIII.2.16 EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES EN LA UNIÓN DE FIBRINÓGENO A α IIB β ₃.

El empleo de α IIB β ₃ induce con certeza a la proteína intracelular tirosina en eventos de fosforilación. Cuando la integrina α IIB β ₃ es unida a través de anticuerpos primarios seguido por anticuerpos secundarios, o por una molécula dimérica tales como el fibrinógeno (la unión del cual es inducida por anticuerpos activantes de α IIB β ₃), los receptores α IIB β ₃ agrupados inducen fosforilación tirosina de proteínas en el rango de 50 a 68 KDa y 140 KDa también como de la tirosina cinasa . La agrupación de integrinas parece ser el evento que induce la transducción de señal del exterior al interior. La agrupación de integrinas también ocurre cuando las plaquetas son asignadas para adherirse a fibrinógeno inmovilizado.

VIII.2.17 EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTES EN FIBRINÓGENO DE UNIÓN A α IIB β ₃ Y LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA.

Eventos adicionales son observados cuando, además de la agrupación de α IIB β ₃, las plaquetas son agitadas y agregadas durante la estimulación de trombina. Estos eventos incluyen la fosforilación de proteínas de 95 a 97 KDa también como la fosforilación de cinasas tales como pp125fak, src y otras cinasas src-asociadas .

Poco se conoce del papel de las fosfatasa en la función plaquetaria. Dos fosfatasa conocidas, la PTP1B y la SH-PTP1, llegan a activarse en un estado tardío en el seguimiento de la agregación plaquetaria. Además, la inhibición de la actividad de la fosfatasa induce la liberación de gránulos plaquetarios y agregación, sugiriendo que algunas fosfatasa pueden interpretar un papel en el mantenimiento o regreso plaquetario a un estado de reposo.

VIII.2.18 ADHESIÓN DE PLAQUETAS A FIBRINÓGENO INMOVILIZADO.

La unión de plaquetas a fibrinógeno inmovilizado en la superficie es diferente de la unión plaquetaria a fibrinógeno soluble. La conformación del fibrinógeno es modificada cuando se une a superficies o a otra molécula receptor (338,339). Esta conformación alterada puede volver a la molécula del fibrinógeno accesible a una población de moléculas α IIB β ₃ en reposo sobre las plaquetas. Las plaquetas estimuladas por no agonistas pueden sujetar y extenderse sobre fibrinógeno inmovilizado, la vía más probable es por el A α RGDS y

secuencias γ -dodecapéptidos (147). Además, el α IIb β ₃ que esta ligado a fibrinógeno inmovilizado genera un conjunto distinguible de eventos de señalización del exterior al interior.

VIII.2.19 ACTIVACIÓN DE PLAQUETAS POR COLÁGENO A TRAVÉS DE RECEPTORES DE ADHESIÓN A COLÁGENO.

El colágeno es la proteína más abundante de la matriz subendotelial expuesta en sitios de lesión. Además, el colágeno es uno de los mayores componentes de la placa aterosclerótica. Así, la adhesión plaquetaria a colágeno y la activación subsiguiente es importante en la hemóstasis normal y condiciones patológicas.

VIII.2.20 CAMINOS DE SEÑALIZACIÓN.

El tratamiento con colágeno de las plaquetas resulta en varios eventos de señalización intracelular que conduce a la activación y agregación plaquetaria (fig.7). El tratamiento conduce a la rápida activación, en menos de un minuto, de dos cinasas tirosina sin receptor, *syk* y *src* (340,341). La activación que esta asociada con cambios en la fosforilación de residuos de tirosina.

La *src* es el miembro prototipo de la familia *src* de proteíncinasas. Contiene un dominio de unión-fosfotirosina especializado llamado SH2, y uno de unión a prolina especializado llamado el dominio SH3 y uno dominio cinasa catalítico. Los dominios SH2 y SH3 median la unión de *src* a otras proteínas y son importantes por su activación y funciones cinasa. El *src* es extremadamente abundante en plaquetas, aunque su función exacta no esta clara porque el ratón *src*-transgénico no tiene defectos de la sangre.

La ***syk*** contiene 2 dominios dobles SH2 que median la unión a proteínas tirosina-fosforiladas, también como uno dominio cinasa catalítico. Su función ha sido estudiada en receptores de células B y T, donde es activado por la unión a sitios en alguna de las subunidades del receptor (342,343). Estos llamados sitios de activación basados en tirosina (TAMs), contienen residuos de tirosina específicamente espaciados para interactuar con los dos dominios de ***syk*** fosfotirosina unión - SH2. En los receptores de activación de células B y T, la familia *src* de cinasas parece ser necesaria para la activación de ***Syk***. La ***Syk*** parece interpretar un papel en la activación inducida por colágeno de las plaquetas. En el

ratón **Syk**-transgénico también están disponibles. Aunque estos ratones no tienen desordenes sanguíneos, estudios detallados de su función plaquetaria aún no han sido reportados.

Siguiendo la activación de **Syk** y Src, la estimulación por colágeno de plaquetas resulta en la fosforilación de tirosina y activación de PLC γ 2. La activación de PLC γ 2 se piensa es hacia abajo de **Syk** porque la inhibición de la actividad del **Syk** por el piceatannol inhibidor **Syk**-selectivo también inhibe la fosforilación del PLC γ 2 (344). Si la **Syk** fosforila directamente a la PLC γ 2 o si la función de las cinasas entre restos de **Syk** y PLC γ 2 para ser determinados. La activación de PLC γ 2, cataliza la división del PIP $_2$ a IP $_3$, lo que causa la liberación de Ca $^{2+}$ en la plaqueta (345) y DAG, lo cual activa PKC (fig. 7). Los eventos de señalización siguientes a la activación del PKC y la movilización de Ca $^{2+}$ son comunes a otros caminos de estimulación plaquetaria. Además, es posible que el colágeno active otros caminos de activación que no han sido aún descubiertos.

La estimulación por colágeno de plaquetas difiere de la estimulación por otros agonistas plaquetarios en algunos caminos clave. Primero, el cAMP elevado no inhibe la activación plaquetaria inducida por colágeno (345), pero es un potente inhibidor de la activación inducida por trombina o el análogo PGH $_2$ / TXA $_2$ U46619 (345). Esta diferencia puede reflejar la diferencia en isótopos PLC estimulados por cada uno; considerando que el colágeno estimula al PLC γ 2, el cual no es inhibido por cAMP, la trombina y U46619 estimulan al PLC β , el cual es inhibido por cAMP elevado. Segundo, oxido de fenilarsina, inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno, pero no por trombina o ADP. Este resultado señala un importante papel para una fosfatasa no identificada en la estimulación de plaquetas.

VIII.2.21 RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR COLÁGENO.

La activación plaquetaria por colágeno involucra al menos dos, y posiblemente más, receptores de colágeno en la superficie de la célula. La integrina $\alpha_2\beta_1$ y GPVI son requeridos porque las plaquetas carecen de cualquiera de esas moléculas suspendiendo la agregación en respuesta al colágeno.

Las plaquetas se unen a colágeno por adherencia a fibrillas de colágeno. La estable adhesión a colágeno requiere de la integrina $\alpha_2\beta_1$ por el bloqueo de su receptor con

anticuerpos que inhiben la adhesión plaquetaria al inmovilizar al colágeno. Además, las plaquetas que carecen de la integrina $\alpha_2\beta_1$ no se adhieren a fibrillas de colágeno en solución (165). Varios eventos de estimulación inducidos por colágeno en plaquetas, que incluyen la activación de la cinasa **Syk**, son bloqueados por anticuerpos contra la integrina $\alpha_2\beta_1$ (344).

Aunque la GPVI parece interpretar menos de un papel al mediar la adhesión inicial de plaquetas a colágeno, es requerido para la agregación plaquetaria subsiguiente. En realidad, el GPVI unido con los anticuerpos anti-GPVI es suficiente para inducir la activación de la cinasa **Syk** y la agregación plaquetaria. Esto es en contraste a la integrina $\alpha_2\beta_1$, lo cual puede por sí mismo inducir la agregación plaquetaria (344). De esta manera, la acción coordinada de la integrina $\alpha_2\beta_1$, GPVI y tal vez otros receptores plaquetarios para colágeno conducen a la agregación plaquetaria inducida por colágeno. La exacta relación de esos receptores no ha sido aún elucidada.

La liberación de vasoactivos y agentes mitogénicos desde las plaquetas no hay duda de que contribuyen a la respuesta inflamatoria, como hace la aparición de la P-selectina en la superficie de plaquetas y células endoteliales, la cual es probablemente para localizar neutrófilos en la región del daño. Las plaquetas expresan también ligando CD40 en su superficie después de la activación, el cual puede interactuar con CD40 en linfocitos, monocitos, células endoteliales conduciendo a la activación celular y aumentar la respuesta inflamatoria.

VIII.2.22 SEÑALIZACIÓN INDUCIDA POR GLICOPROTEÍNA Ib.

Numerosos estudios demostraron que el FvW unido a GPIb conduce a la activación del $\alpha_{IIb}\beta_3$ y la agregación plaquetaria. De esta manera, la unión del FvW inducida por ristocetina a plaquetas causa la hidrólisis de PIP_2 , con subsecuente activación de PKC e incremento en Ca^{2+} intracelular. Además, el TXA_2 es sintetizado. Estos eventos inducen o potencian la agregación plaquetaria. Estos eventos de estimulación son inhibidos por anticuerpos monoclonales contra GPIb, pero no anticuerpos monoclonales contra $\alpha_{IIb}\beta_3$ (346). Otra actividad observada después de la asociación del FvW con la GPIb en plaquetas incluye la fosforilación en tirosina de una proteína de 64-KDa no identificada (347) y un aumento en el Ca^{2+} intracelular, cuando la unión del FvW a plaquetas es inducida por una herida profunda (348). Es por lo tanto de interés que una PLA_2 de 29-KDa (también

clasificado como una proteína 14-3-3 isoforma humana) se encontró esta asociada con el complejo GPIb-IX en plaquetas (fig. 4) . El FvW unido a GPIb puede activar esta PLA₂, un evento que probablemente conduce a la activación de α IIB β ₃ y la subsecuente agregación plaquetaria. De esta manera un orden en los eventos puede ser que las plaquetas son expuestas a una lesión profunda in vivo, se unen a FvW vía GPIb, aumentan los niveles de Ca²⁺ intracelular, y la PLA₂ llega a ser activada. La PLA₂ libera ácido araquidónico, el cual es metabolizado al TXA₂ activo y al TXB₂ inactivo. Estos eventos contribuyen a la activación del α IIB β ₃. El ADP también es liberado de esas plaquetas activadas, se une a su receptor en las plaquetas, y fomenta la activación de las plaquetas, resultando en una activación potenciada de α IIB β ₃ (348).

La GPIb también recibe avisos de señalización intracelular en plaquetas que fomentan la función plaquetaria. Después de la exposición de las plaquetas a agentes tales como la PGE₁, la cual eleva el cAMP plaquetario, la GPIb β es fosforilada en Ser 166. Ha sido sabido por muchos años que los incrementos en cAMP activa cinasas dependientes de cAMP y disminuye el estado activado de las plaquetas. Un papel potencial para la fosforilación de GPIb β en la función plaquetaria ha sido determinado a partir de estudios de plaquetas Bernard-Soulier, las cuales carecen de GPIb funcional. Estas plaquetas responden normalmente al tratamiento con PGE₂ en muchas vías excepto que PGE₁ inhibe la polimerización de actina como en plaquetas normales. Estos resultados sugieren que la fosforilación de la GPIb inducida por PGE₁ es requerida para la inhibición de la polimerización de actina inducida por cAMP (349).

VIII.2.23 INHIBICIÓN NATURAL QUE OCURRE EN LOS MECANISMOS DE ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA.

La formación de un tapón plaquetario en el sitio de lesión vascular esta altamente localizado. El tapón plaquetario normalmente no crece incontrolablemente y bloquea el flujo sanguíneo. Además, las plaquetas no se adhieren a una pared vascular no dañada. Existen mecanismos para prevenir la adhesión plaquetaria al endotelio no dañado y limitar la formación del tapón plaquetario. Estos mecanismos incluyen la producción de prostaglandinas inhibitorias, oxido nítrico, un sistema de cinasas plaquetario y α IIB β ₃ reciclado.

VIII.2.24 PROSTAGLANDINAS INHIBITORIAS

La PGE₁, PGE₂ y PGI₂ (también llamadas prostaciclina) inhiben la agregación plaquetaria inducida por la mayoría de los agonistas en una manera dependiente de cAMP. Las prostaciclina y la PGE₂ son producidas por el endotelio y otros tejidos, estas interactúan con los receptores acoplados a proteína-G específicos en la superficie plaquetaria, resultando en la activación de adenilato ciclasa, la cual induce la formación de cAMP. La magnitud de la producción del cAMP es balanceada por la actividad fosfodiesterasa, lo cual descompone al cAMP. La actividad fosfodiesterasa es inhibida por varias drogas, incluyendo teofilina, lo cual puede resultar en una elevación de los niveles de cAMP intracelular. El cAMP activa cinasas dependientes de cAMP (también llamadas cinasas A o proteincinasa A), las cuales fosforilan proteínas específicas, inhibiendo la reactividad plaquetaria. El blanco exacto de las cinasas dependientes de cAMP que resulta en una inhibición de la reactividad plaquetaria, aunque existen varias posibilidades y la inhibición puede ocurrir en más de un punto en más de un camino. Por ejemplo, ha sido demostrado recientemente que cAMP elevado inhibe al receptor IP₃ en plaquetas, probablemente por la fosforilación de este receptor, resultando en una disminución en los niveles de Ca²⁺ intracelular (350). El cAMP elevado también inhibe las actividades del PLC y PLA₂, aunque el mecanismo no está claro. Adicionalmente, la fosforilación del GPIIb β inducida por PGE₁ parece inhibir la polimerización de actina que ocurre en plaquetas estimuladas por colágeno. El cAMP elevado también inhibe la activación de la cinasa Raf, aunque el papel del Raf en plaquetas es actualmente desconocido. Finalmente, la proteína G Rap Ib de peso molecular bajo (LMW) es un sustrato para PKA, aunque el papel potencial del Rap Ib en la inhibición de la función plaquetaria ha sido cuestionado (351).

Las plaquetas activadas pueden también facilitar la síntesis de prostaciclina vía producción y liberación de endoperóxido intermedio, compuesto que puede activar la producción de prostaciclina endotelial.

VIII.2.25 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es formado por células endoteliales, plaquetas y otras células desde L-arginina, por la NO sintetasa. El NO es producido en estos sitios en respuesta a un corte

acentuado y agonistas plaquetarios tales como la trombina y el ADP, y fácilmente difunde desde el endotelio, a través de las membranas plasmáticas plaquetarias (352). El NO inhibe la activación plaquetaria y disgrega a los agregados plaquetarios, pero diferente de PGI₂ o PGE₁, esto ocurre de una manera dependiente de cGMP (353). Porque la actividad de la NO sintasa es mejorada durante la activación plaquetaria, ha sido sugerido que la producción de NO por las plaquetas proporciona una manera para limitar la respuesta de agregación. Varios grupos han demostrado un efecto inhibitorio sinérgico del NO y la prostaciclina en la activación plaquetaria (354,355).

VIII.2.26 INTERNALIZACIÓN DE LA INTEGRINA α IIb β ₃

El receptor GPIIb / IIIa ocupa un papel central en determinar la magnitud de la agregación plaquetaria, es notable que este receptor este presente en extraordinaria alta cantidad en la superficie de la plaqueta. Esto permite al receptor rápidamente iniciar la agregación. Por otro lado, el receptor no esta en su estado de ligando de alta afinidad sobre plaquetas en reposo necesita ser activado por agonistas como ADP, serotonina, trombina, colágeno y TXA₂ que están localizados en sitios de daño vascular. Como resultado, las plaquetas pueden circular en el plasma conteniendo una alta concentración de GP IIb / IIIa ligado a fibrinógeno y FvW sin la formación de un trombo plaquetario.

Por ello, la adhesión plaquetaria es controlada por la exposición del subendotelio con el receptor plaquetario GPIb / IX para FvW inmovilizado y la GPIIb / IIIa para fibrinógeno inmovilizado siempre compitiendo para interactuar con esta ligandos adhesivos. En contraste, la habilidad de la GPIIb / IIIa para mediar la agregación por unión de FvW o fibrinógeno está bajo el control de un elaborado mecanismo de activación que limitan la respuesta a sitios de daño vascular.

La integrina α IIb β ₃ parece sufrir internalización en plaquetas activadas y en reposo. Sin embargo, en plaquetas activadas, la α IIb β ₃ puede también unir al fibrinógeno y rápidamente introducirlo (356). Esta acción puede proporcionar un mecanismo circulante de plaquetas activadas que no forman un agregado, quitar al fibrinógeno de su superficie y regresar a un estado no-adhesivo (356). El destino exacto del fibrinógeno internalizado no está totalmente claro, pero varias evidencias sugieren que al menos una parte de este es transportado a los gránulos α en megacariocitos (357-358) y plaquetas (359). Así, el fibrinógeno captado por plaquetas activadas puede proporcionar un mecanismo para

transportar fibrinógeno a los gránulos α y un mecanismo antitrombotico involucrando el espacio de unión a fibrinógeno de la superficie plaquetaria.

Dado que la trombina es un potente activador de plaquetas, los mecanismos de control que limitan la producción de trombina también pueden ser considerados como mecanismos de control para la agregación plaquetaria. Las plaquetas también pueden desensibilizar la estimulación para algunos agonistas si han sido previamente expuestas a bajas concentraciones de esos agonistas (desensibilización homóloga). Es posible que la liberación de agonistas plaquetarios algunas plaquetas lleguen a ser inhibidas por este mecanismo.

VIII.2.27 ECTOPROTEÍNA-CINASA

Una proteína activa un sistema de fosfatasa protein /cinasa ya ha sido parcialmente caracterizada en la superficie de plaquetas en reposo intactas (361), y parece regular negativamente la activación plaquetaria. El ATP que es secretado desde los gránulos densos plaquetarios o liberado desde otras células circulatorias sirve como el cosustrato de esta enzima. El sistema ectoproteína cinasa (EPK) en plaquetas fosforila dos proteínas de 39 KDa y 42 KDa. La EPK es una cinasa serina / treonina y muestra notables semejanzas funcionales a PKC. Su actividad es dependiente de Ca^{2+} y la enzima fácilmente fosforila a un sustrato péptido sintético derivado del pseudosustrato PKC. Las Km. de fosforilación son de 0.9 mM, el cual esta dentro del rango reportado para PKC (0.2 mM). Esta actividad enzimática es sumamente disminuida por la activación plaquetaria para diferentes agonistas. La especificidad del ligando de GPIV (CD36), un sitio de unión plaquetario para trombospondina (TSP) y colágeno, es controlado por la fosforilación de un ectodominio GPIV (304). Aunque la enzima que puede fosforilar al GPIV en la superficie de las plaquetas es desconocida, la EPK es un candidato. Recientemente ha sido demostrado que el CD 36 es también fosforilado por un EPK plaquetario dependiente de cAMP. De esta manera, la fosforilación extracelular tiene el potencial para regular la respuesta plaquetaria a varios agonistas.

Las células endoteliales también tienen CD39 una ecto-ADP-difosfohidrolasa (ecto-ADPasa) que puede asimilar ATP y ADP a AMP, y por eso se limita los efectos de liberación de ADP.

VIII.3 REACCION DE LIBERACION PLAQUETARIA

Las plaquetas almacenan ATP, ADP, Ca^{2+} y serotonina en los gránulos densos y proteínas adhesivas tales como el factor 4 plaquetario, la β -tromboglobulina, el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), el fibrinógeno, la fibronectina, la trombospondina y el FvW en gránulos α (362). Los mecanismos contráctiles involucran actina y miosina se piensa que media la secreción de gránulos y retracción del coágulo, pero los detalles permanecen oscuros. Después de iniciado el cambio de forma, la actina llega a ser organizada centralmente hacia masas de filamentos gruesos, donde es probable la asociación con filamentos de miosina. La respuesta contráctil se piensa es iniciada por un incremento de calcio citosólico, el cual resulta en la formación de un complejo calcio-calmodulina que después activa miosina cinasa de cadena ligera; fosfatasas y cinasa dependiente de AMP. La centralización de organelos en un círculo contráctil correlaciona bien con la secreción. Hay controversia, sin embargo, en cuanto a si las plaquetas secretan el contenido de sus gránulos por fusión con el sistema canalicular abierto en el centro de la plaqueta o por fusión directa con la membrana plasmática (8, 31).

El modelo de dos pasos para la secreción de gránulos ha sido propuesto en el cual el primer paso es el acoplamiento de gránulos al interior de la membrana plasmática y el segundo paso es la fusión de la bicapa de lípidos. El proceso de acoplamiento se piensa involucra pocas GTP-asas, notablemente rab 3, la cual es fosforilado cuando las plaquetas son activadas. La rab 3 se piensa forma complejos con proteínas SNARE presentes en los gránulos y membrana plasmática, incluyendo sintaxinas 2 y 4, conduciendo a el desarrollo de un complejo de acoplamiento 7S. La reacción de acoplamiento no requiere ATP, pero la subsecuente reacción iniciadora, la cual prepara los complejos para la fusión de membrana, es dependiente de energía. El complejo de acoplamiento 7S interactúa con otras proteínas incluyendo el factor N-etilmaleimida-sensible (NSF) y proteínas α formando un largo complejo de fusión 20S.

Fosfoinositoides y proteínas del citoesqueleto incluyendo la miosina cinasa de cadena ligera, también participan en la reacción iniciadora. En el paso de la fusión ha sido propuesto que la SNAP interacciona con el NSF activando la actividad ATPasa del NSF, resultando en la liberación de SNAREs desde el complejo 20S. El calcio juega un papel importante, probablemente actúa en concierne con un homólogo de sinaptotagmina en

creación de fusión de poros entre las membranas, y los procesos son ayudados por sinaptofisina y sinaptogirina (u otros homólogos).

Sobre la activación de plaquetas por agonistas, las plaquetas sufren una reacción de liberación, de tal modo que libera el contenido granular, liberación que esta asociada con la producción de TXA₂. La secreción de los gránulos α y el contenido de los gránulos densos ocurren por centralización de gránulos secretores seguido por exocitosis. La extensión de la secreción depende de la fuerza del agonista. Agonistas débiles (tales como el ADP y la epinefrina) requieren de la actividad de la ciclooxigenasa y la agregación primaria para inducir la secreción que es observada en concentraciones bajas de Ca²⁺. Agonistas de fuerza intermedia (tales como el PAF) pueden inducir la secreción en la ausencia de la formación del metabolismo del ácido araquidónico y sin agregación primaria (363, 364). Sin embargo, la inhibición de la ciclooxigenasa y el ADP reducen la secreción y agregación. Agonistas fuertes (tales como la trombina y el colágeno) en altas concentraciones inducen la agregación y secreción plaquetaria que es independiente de la actividad de la ciclooxigenasa (363, 365), considerando que a bajas concentraciones inducen la agregación y secreción que es completa o dependiente en la actividad de la ciclooxigenasa y el ADP liberado. La mayoría de estos activadores son liberados o sintetizados en el sitio del daño vascular resultando en una respuesta local. Interesantemente, cuando el colágeno es adicionado en bajas concentraciones a suspensiones plaquetarias, la secreción de ATP ocurre antes del comienzo del cambio de forma. Esta secreción no es inhibida por bloqueadores de la ciclooxigenasa, pero es sensible a la concentración de Ca²⁺ extracelular y es una consecuencia directa de la unión plaquetaria a colágeno (366). El ADP secretado potencia la actividad de activación plaquetaria de una variedad de agonistas.

VIII.4 CAMBIO DE FORMA PLAQUETARIA

El cambio de forma plaquetaria ocurre en respuesta a muchos agonistas diferentes. Esto involucra la pérdida de la forma discoide normal de la plaqueta y la transformación a una espinosa esfera con filopodios delgados, largos, extendiéndose varios μm fuera de la plaqueta y terminando en puntos que son más pequeños de 0.1 μm en diámetro. Aunque la razón por la cual las plaquetas cambian de forma es poco claro, una posibilidad es que esto reduce la repulsión electrostática aún sin reducir la densidad de la carga de la superficie, de esta manera, el extremo de una plaqueta puede aproximarse y hacer contacto con una

superficie o una célula, con la mayor parte de la carga en la superficie repulsiva ahora en una distancia. La formación de fibras de actina, el cual es un importante componente en el cambio de forma es un proceso complejo que requiere energía que depende en nucleación, polimerización, enrollamiento de hélice y filamento empaquetado.

En plaquetas en reposo, predominan los finos filamentos de actina (60%), pero con activación, ocurre la polimerización de la actina y los monómeros de actina disminuyen de un 20 a 40 % del total. Los filamentos de actina en plaquetas en reposo son relativamente estables por que sus extremos (los extremos desde los cuales pueden aumentar adicionando monómeros de actina) y son coronados con la proteína Cap Z.

El paso inicial en el cambio de forma es la activación de gelsolina, cual entonces ambos existen cortando filamentos de actina y cubre el recién creado extremo barbado. Esto aumenta el número de filamentos de actina unas 10 veces y substituye gelsolina por Cap Z como la proteína coronada (16).

Varios filamentos de actina que interactúa con la enrejada planar de proteínas de unión-actina (filamina-1), GPIb y espectrina en la membrana del citoesqueleto, liberan la restricción en la red de espectrina. Esto permite la membrana del esqueleto para hincharse (pero no produce filopodia) por incorporación hacia la membrana plasmática las membranas del sistema canalicular abierto, y después las membranas de los gránulos que liberan su contenido.

Los filamentos no coronados de actina parece estar acompañado por la activación de gelsolina por fosfoinositoides (ppIs) que son producidos durante la activación plaquetaria, incluyendo fosfatidilinositol 3,4 bifosfato (PI3,4P2), PI4,5P2 y PI3,4,5P3 (16). Los filamentos no coronados de actina actúan como núcleo sobre el cual los monómeros de actina (los cuales son sostenidos en una disponibilidad pool por asociación con timosina- β 4) pueden ensamblarse. La profilina acelera la polimerización de actina para facilitar la transferencia de actina desde el complejo actinatimosina- β 4 a los extremos de los filamentos de actina. Otras proteínas que han sido implicadas en la organización de pasos de la filopodia, donde la actina es empaquetada a la membrana plasmática son la GTPasa Cdc 42, la proteína de intercambio WASP (la cual es anormal en el síndrome de Wiskott-Aldrich), vinculina, VASP, zixina y profilina. Cuando se forma filopodia, los gránulos plaquetarios y organelos se mueven para el centro, rodeado por microtúbulos enrollados,

resultando un incremento de densidad electrónica. La activación de miosina vía fosforilación de miosina cinasa cadena de ligera contribuye en la fuerza contráctil interior por su interacción con fibras de actina.

VIII.5 EL CITOESQUELETO EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

Las plaquetas en reposo tienen una forma discoide y una superficie que se asemeja algo a los pliegues del cerebro, con numerosas invaginaciones hacia el sistema canalicular membranal. El citoesqueleto de plaquetas en reposo consiste en la membrana del esqueleto, el cual está situado justo debajo de la membrana, y una red de filamentos de actina citoplasmática, la cual también contiene, α -actina, tropomiosina, vinculina y caldesmon. Durante la activación plaquetaria, el citoesqueleto se reorganiza y el sistema canalicular llega a ser parte de la superficie plaquetaria en expansión. Esta activación induce cambios en la forma de la célula resultando en una plaqueta que está cubierta con protuberancias espinosas o pseudopodia. El cambio de forma plaquetario precede a la agregación, y es descrito como un incremento inicial en turbiedad antes de la agregación.

Mucho del cambio de forma plaquetario puede ser atribuido a cambios en la polimerización de la actina en el citoesqueleto. Con la activación plaquetaria, la miosina fosforilada unida al citoesqueleto, se convierten en una masa electrón-densa de filamentos empaquetados. No es completamente claro como la activación plaquetaria resulta en cambios en la organización citoesquelética. Los agonistas plaquetarios causan incrementos en la concentración de calcio intracelular, lo cual afecta al citoesqueleto. Varias proteínas de unión a actina son reguladas por cambios en la concentración de calcio, por ejemplo, la gelsolina es una proteína de unión a actina que, sobre la unión a calcio, separa filamentos de actina, lo cual se piensa es importante para la reorganización membranal (367), y podría contribuir a los cambios dramáticos en la membrana que son observados cuando la plaqueta cambia de forma. Las plaquetas contienen calpainas, las cuales son dependientes de calcio, proteasas neutrales compuestas de 2 subunidades que preferentemente adhieren proteínas citoesqueléticas, en particular proteínas de unión a actina (filamina-1) y talina, y al dominio citoplasmático de GPIIIa y a un número de moléculas involucradas en señalización, incluyendo cinasas y fosfatasa. Ha sido propuesto que las calpainas están involucradas en la reorganización del citoesqueleto en activación plaquetaria y quizás unirse al ligando GPIIb / IIIa. Las calpainas también han sido implicadas en la propagación de plaquetas,

formación de micropartículas y en la generación de actividad coagulante plaquetaria. Además, el calcio activa calpaina, lo cual puede afectar la polimerización de actina por la adhesión de la proteína de unión a actina (ABP), talina y espectrina. Así, calpaina y tal vez gelsolina, podrían actuar para despolimerizar el esqueleto membranal plaquetario subcortical así que pueda ser reorganizado en filamentos de actina citoplasmático, o fibras en tensión, a través de lo largo de la plaqueta. Estos filamentos están sujetos por adhesiones focales, los cuales son reunidos alrededor de integrinas sobre ligandos de unión.

Además de cambios estructurales dramáticos, la polimerización de la actina en el citoesqueleto juega un importante papel en la señalización y activación plaquetaria para proveer un andamio que localiza moléculas de señalización. Varias proteínas que llegan a ser activadas seguido del tratamiento con agonistas de plaquetas reubican la fracción citoesqueletal. Estas proteínas no incluyen al receptor tirosina cinasas Src (368,369), **Yes** (370) y **Syk** (371), moléculas de señalización importantes tales como la fosfatidilinositol 3-cinasa; el ras-semejante a proteína de unión-GTP la CDC42Hs ; proteínas citoesqueletales tales como la espectrina, talina y vinculina; y otras distintas no identificadas proteínas fosforiladas de tirosina (370). Para muchas de estas proteínas la activación o fosforilación en tirosina es necesaria para su reubicación a la fracción citoesqueletal (369). Esta reubicación también requiere la polimerización de actina y de la agregación plaquetaria (368, 372) y no ocurre en plaquetas de pacientes con trombostenia de Glanzmann, la cual implica que la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ es necesaria para el ensamblaje de estos complejos de señalización / citoesqueletico (369).

Esta claro que al menos una porción de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ es funcional y está estructuralmente unida al citoesqueleto. La $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activada se vuelve parte de la fracción del citoesqueleto después de la activación plaquetaria. La asociación al citoesqueleto de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ no requiere agregación de plaquetas, sólo la activación de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. No sólo la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ afecta al ensamblaje citoesqueletal, pero la activación del $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ parece no requerir al citoesqueleto porque la preincubación de plaquetas con citochalasin, lo cual depolimeriza filamentos de actina citoplasmáticos, parcialmente inhibe la activación inducida por agonistas de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. De esta manera, es difícil separar y ordenar los eventos que conducen a la polimerización de actina, porque todos los eventos ocurren rápidamente y parecen estar interrelacionados y contribuyen el uno al otro. El citoesqueleto afecta la habilidad de la integrina para unirse a su ligando, y es en cambio organizado por

la señalización dependiente de integrina. El citoesqueleto también juega un papel en la retracción del coagulo.

La formación de adhesión focal y la organización de filamentos de actina hacia fibras en tensión ocurren no solo durante la agregación plaquetaria y la activación de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Las adhesiones focales están también organizadas por las otras integrinas $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, $\alpha\text{6}\beta\text{1}$ y $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, cuando las plaquetas se adhieren a las proteínas de la matriz extracelular apropiadas que son ligandos para esas integrinas.

VIII.6 FORMACIÓN DEL COAGULO

La formación del coagulo es la consecuencia fisiológicamente normal más importante de la hemóstasis primaria. Las plaquetas son necesarias para la formación del coagulo; se adhieren al sitio de lesión, secretan factores que promueven la actividad local plaquetaria, y para formar un tapón plaquetario. Además, las plaquetas contribuyen a la formación del coagulo para aumentar la formación de fibrina e inmovilizarlo en su superficie.

La fibrina es formada de fibrinógeno soluble por trombina para liberar fibrinopéptidos A y B. Estos péptidos están unidos desde el extremo amino-terminal de la cadena $\text{A}\alpha$ y la cadena $\text{B}\beta$, respectivamente. El fibrinopéptido B es liberado en una velocidad más lenta que el fibrinopéptido A (373). La fibrina polimeriza espontáneamente para formar un gel insoluble o coagulo de fibrina. Las plaquetas se unen a fibrinógeno soluble y fibrina insoluble a través de su receptor integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, y en este camino ayudan a centrar e inmovilizar el coagulo de fibrina.

Las plaquetas mejoran la formación de fibrina por desarrollo de una superficie catalítica por el ensamblaje de enzimas procoagulantes que convierten la protrombina a trombina activa. Las plaquetas se vuelven catalíticas para estas enzimas procoagulantes por exposición de fosfolípidos aniónicos, más importantemente la fosfatidilserina (PS), en la superficie plaquetaria después de la activación plaquetaria. Uno de los más potentes y fisiológicamente importantes agonistas plaquetarios por exposición a PS sobre la superficie plaquetaria es el colágeno. Como es que la exposición lipídica aniónica actualmente ocurre es poco clara, pero puede involucrar la inhibición de un aminofosfolípido translocasa que normalmente sirve para mantener fosfolípidos distribuidos asimétricamente en la membrana plaquetaria. Después de la exposición de PS, se cree que la translocasa

gradualmente regresa la PS a su sitio original sobre la cara interior de la membrana plasmática en un proceso dependiente de ATP.

Sobre exposición de PS sobre la superficie plaquetaria, aumenta la activación del factor X por factores IXa y VIIIa. El complejo protrombinasa de Xa y Va en plaquetas entonces convierte la protrombina a trombina así que la trombina puede convertir al fibrinógeno a fibrina para estabilizar el tapón hemostático. Los factores IXa, X y la protrombina se unen a plaquetas vía formación de puentes de Ca^{2+} entre residuos de ácido γ -carboxiglutámico dentro de estos factores y los fosfolípidos cargados negativamente.

La reunión de enzimas procoagulantes ha sido también propuesta que existe en la superficie de micropartículas, las cuales se originan de la membrana plasmática después de la activación plaquetaria. Estas partículas contienen glicoproteínas transmembranales plaquetarias tales como la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, GPIb y proteínas del esqueleto membranal plaquetario, así como PS expuesto. La PS parece que permanece expuesta, posiblemente por causa de una carencia de ATP y por lo tanto carece de la función translocase en estas micropartículas. Sin embargo, la contribución de esas micropartículas plaquetarias a la activación de la trombina es controversial debido a que la mayoría de la actividad procoagulante es actualmente causada por la presencia de algunas plaquetas intactas.

VIII.7 RETRACCION DEL COAGULO

Cuando inicia la coagulación en el tubo de ensayo, la malla de fibrina se extiende a lo largo, atrapando virtualmente todo el suero en un estado como de gel. Si las plaquetas están presentes, dentro de minutos a horas, la retracción del coagulo, expulsa una buena fracción del suero. Este proceso se piensa imita el fenómeno in vivo que resulta en la consolidación del trombo y quizás aumentar la curación de la herida.

Las plaquetas son responsables por la generación de la fuerza necesaria para la retracción del coagulo de fibrina, el cual contribuye a la curación de la herida. La retracción del coagulo requiere un citoesqueleto plaquetario intacto, el cual provee el aparato contráctil físico. Los mecanismos propuestos incluyen el movimiento de plaquetas por filopodia a lo largo de las fibras de fibrina, arrastra fibras de fibrina por filopodia e internalización del esqueleto membranal. La contracción probablemente involucra un aparato citoesquelal celular similar al que se encuentra en células de músculo liso, incluyendo a los filamentos de actina y miosina para generar fuerza. La GPIIb / IIIa plaquetaria es requerida para la

retracción del coágulo, como es demostrado por estudios en pacientes con Glanzmann y en estudios de plaquetas normales en presencia de agentes que bloquean al receptor GPIIb / IIIa. La integrina α Iib β 3 es también necesaria como la molécula que sujeta la plaqueta a la fibrina. Si la α Iib β 3 es bloqueada por anticuerpos o péptidos solubles que compiten por la unión de la α Iib β 3 a fibrina, entonces la retracción del coagulo es inhibido (375). Interesantemente, la interacción de la α Iib β 3 con fibrina durante la retracción del coagulo difiere de la interacción con fibrinógeno durante la agregación. Esta diferencia no es causada por pérdida de fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno pues la fibrina retiene a las dos integrinas conocidas unidas a sitios localizados en fibrinógeno. Cuando uno de los sitios, el péptido AGDV localizado en la cadena- γ del fibrinógeno, es eliminado, la agregación plaquetaria es perturbada, mientras que la retracción del coagulo ocurre normalmente. Esto sugiere que la agregación plaquetaria es mediada por la unión de la α Iib β 3 a la cadena- γ , mientras que la retracción del coagulo es mediado por la unión de la α Iib β 3 a la secuencia peptídica RGD localizada en la cadena- γ del fibrinógeno.

La fibrinólisis del coagulo ocurre por la acción de plasmina, la cual es iniciada por el activador plasminógeno de tejido (TPA). Los coágulos que son ricos en plaquetas son más resistentes a la fibrinólisis, posiblemente debido a la liberación del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Además, la red densa de fibrina que se une a la superficie plaquetaria es más resistente a la fibrinólisis de lo que es la fibrina no unida a una superficie plaquetaria. Esta es mediada por el receptor de la integrina α Iib β 3 debido a que la fibrina desacoplada de α Iib β 3 hace a la fibrina más susceptible a lisis. De esta manera, los coágulos formados recientemente, los cuales son ricos en plaquetas, son menos susceptibles a fibrinólisis de lo que son los coágulos más viejos.

IX. TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN PLAQUETARIA

Se han desarrollado numerosos métodos para valorar la función *in vivo* de las plaquetas así como las reacciones específicas de las mismas *in vitro*.

La disponibilidad de estas pruebas no ha tenido solamente un valor excepcional en la investigación de la fisiología y bioquímica de las plaquetas, si no que también ha permitido la demostración y caracterización de las anomalías de la función plaquetaria en pacientes con trastornos hemorrágicos.

Algunas pruebas de función plaquetaria hoy muy usadas en la evaluación de pacientes con dichas anomalías se describen más adelante, pero debemos señalar que debido a la gran tendencia de las plaquetas a reaccionar con superficies extrañas, la interpretación de los resultados de pruebas *in vitro* de la función plaquetaria está sujeta a errores potenciales a menos que:

Se cuente con la razonable seguridad de que el paciente en estudio no ha tomado drogas que influyen probablemente en las mediciones *in vitro* y/o *in vivo* de la función plaquetaria.

Entre esas drogas la más importante es el ácido acetilsalicílico (ASA), cuyo efecto en el tiempo de sangría y sobre la agregación *in vitro* de las plaquetas puede ser detectable hasta 7 días después de ingerir una sola tableta de 0.3g.

Lamentablemente se cuenta con muy pocos o ningún dato sobre la alteración de las mediciones *in vitro* de la función plaquetaria después de la administración *in vivo* de gran número de drogas que interfieren en estas mediciones cuando se agregan a las plaquetas *in vitro* por ello es necesario obtener buenos antecedentes de drogas en todos los pacientes a estudiar y tratar por todos los medios de que el paciente suspenda cualquier medicación no esencial 48 horas antes del estudio.(159,78,384)

IX.1 RECuento DE PLAQUETAS

FUNDAMENTO:

Se destruyen los eritrocitos con una solución de oxalato de amonio al 1.0 % y se hace cuenta directa de plaquetas con el microscopio de contraste de fases en una cámara de Neubauer de fondo plano.

MATERIALES:

Líquido de dilución:

Se utiliza oxalato de amonio al 1% (1 g de oxalato de amonio en 100ml de agua destilada). Se filtra y se conserva en el refrigerador a 4°C. Se vuelve a filtrar con frecuencia, y se desecha en cuanto aparece turbidez.

MÉTODO:

1. - Con una pipeta de glóbulos blancos, se aspira líquido de dilución hasta la señal de 0,5 luego, bien sea con sangre capilar que procede de una punción del flujo libre o bien sea con sangre venosa recogida sobre Sequestrene (EDTA), se aspira sangre hasta la señal de 1. Finalmente se aspira líquido de dilución hasta la señal 11.

La sangre venosa recogida por punción venosa limpia sobre EDTA resulta preferible a la capilar, pues en el último caso es inevitable que se pierdan algunas plaquetas que se adhieren a los labios de la herida, y pueden obtenerse cifras bajas. No se recomienda la técnica del tubo, pues la superficie de vidrio en contacto con la sangre, relativamente grande, también puede producir valores bajos falsos.

2. - Se mezcla inmediatamente durante 20 a 30 seg. a mano y se pone sobre el agitador mecánico durante 2 ó 3 minutos. Luego se llenan los dos lados de la cámara de Neubauer y se deja sedimentar durante 20 minutos en una caja de Petri cuyo fondo está ocupado por un disco húmedo de papel filtro. La preparación no debe dejarse mucho tiempo en la pipeta antes de llevarse a la cámara de recuento.

3. - Se cuentan las mismas superficies que para glóbulos rojos, y se toma el promedio de ambas cuadrículas. Las plaquetas se presentan como pequeños cuerpos de gran índice de refracción. También se pueden contarse los glóbulos blancos, pues el líquido de dilución no los afecta.

CÁLCULO:

Es igual que para la cuenta de glóbulos rojos, pero el factor de dilución es de 20 (no de 200). Por lo tanto, el número de plaquetas contado se multiplica por 1000 para dar la cifra por mm^3 de sangre.

VALORES NORMALES:

Valores normales de 150 000 a 500 000 plaquetas/ mm^3 .

IX 1.1 MÉTODO DE CONTRASTE DE FASE

El líquido de dilución es oxalato de amonio.

1. - Con el menor traumatismo posible, se aspiran 2 ml de sangre en una jeringa tratada con silicón, empleando una aguja de calibre 20.
2. - La sangre se puede pasar a un tubo tratado con silicón, o se puede aspirar directamente a una pipeta de glóbulos rojos hasta la señal de 1.
3. -Se mezcla como antes.
4. - Se llena la cámara de recuento que se deja en una caja de Petri en una atmósfera húmeda.
- 5.- Se observa con condensador de contraste de fase y el objetivo correspondiente. Las plaquetas se presentan como objetos redondos u ovalados, de color rosado, púrpura o incluso también negro.
6. - El recuento se apega a las técnicas mencionadas para glóbulos rojos, pero el factor de dilución es 100, y el número de plaquetas observadas se multiplican por 5 000.

IX.1.2 RECUENTO INDIRECTO DE PLAQUETAS:

- 1.- Se prepara un buen frotis con sangre venosa recién obtenida, recogida sobre Sequestrene o a partir de una punción cutánea con sangrado abundante. Se seca al aire y se tiñe con colorante Wright o de Leishman.
- 2.- Con objetivo de inmersión en aceite, se cuenta el número de plaquetas por cada 1 000 glóbulos rojos.
- 3.- Se lleva a cabo un recuento de eritrocitos tan exacto como sea posible.
- 4.- Cálculo: si el número de plaquetas por cada 1 000 glóbulos rojos es P, se tiene

CALCULO:

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = \frac{\text{P X glóbulos rojos /mm}^3}{1\ 000}$$

P = No. De plaquetas.

NOTA:

Un recuento de plaquetas bajo o dudoso por el método indirecto se debe verificar cuidadosamente por recuento directo. Cualquier trombocitopenia. Obtenida por cualquier método, debe confirmarse antes de reportarse. Como método de elección, no se recomienda la técnica indirecta.

IX.2 TIEMPO DE SANGRADO DE IVY CON EL SIMPLATE

FUNDAMENTO:

El tiempo de sangrado es el necesario para que deje de sangrar una herida estandarizada en la piel. Es una medida de la función plaquetaria e independiente del mecanismo de la coagulación, aunque en el caso de alteración grave de la coagulación el tiempo de sangrado puede estar prolongado.

MATERIALES:

- 1.-Simplate.
- 2.-Esfingomanómetro.
- 3.-Cronómetro
- 4.-Discos de papel filtro (Whatman n°.1)
- 5.-Torunda de alcohol.
- 6.-Adhesivo de mariposa.

MÉTODO:

- 1.- Se limpia la superficie anterior del antebrazo con la torunda de alcohol y se deja secar. Se elige una zona donde no existan venas ni vasos sanguíneos evidentes.
- 2.- Se coloca el esfingomanómetro en el brazo y se insufla hasta 40 mm HG, manteniendo esta presión durante todo el procedimiento.
- 3.- Se hace girar el botón blanco en la en la parte lateral del Simplate.
- 4.-Se sitúa el Simplate en el punto elegido y se le sujeta firmemente; se deprime el gatillo rojo y, simultáneamente se pone en marcha el cronómetro.
- 5.-A intervalos de 30 seg., se enjuaga el flujo de sangre con el borde del papel filtro, sin tocar los bordes de la incisión.
- 6.-Se anota el momento en que el papel de filtro ya no se tiñe de sangre. Se retira el esfingomanómetro.
- 7.-Se limpia el brazo con una torunda, se seca y se aplica un adhesivo de mariposa.

INTERPRETACIÓN:

Dado que la aspirina puede prolongar el tiempo de sangrado, conviene instruir a los pacientes para no tomarla desde una semana antes de la prueba. Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de valores. Los normales oscilan entre 2-7 min.

IX.3 RETRACCIÓN DE COÁGULO

FUNDAMENTO:

Cuando se deja coagular en forma espontánea la sangre total se obtiene una masa sólida con todos los componentes sanguíneos, con el tiempo esta masa se contrae y exuda suero, por la función contractil de las plaquetas sobre la red de fibrina.

METODO:

- a) Se coloca en un tubo de centrifuga graduado 2 ml de sangre a temperatura de 37 °C. Introducir inmediatamente un espiral de alambre de cobre.
- b) A la hora se retira el coagulo y se mide el volumen de suero remanente. Referir este volumen a porcentaje y hacer el promedio de los tubos.

Valores normales: 40 % o más.

IX.4 ADHESIVIDAD PLAQUETARIA: MÉTODO <<IN VIVO>>.

FUNDAMENTO:

Cuando se corta un vaso, se produce casi de inmediato una adhesión de plaquetas en la sede lesionada. El método in vivo se basa en la determinación de la diferencia entre el recuento de plaquetas en la sangre venosa y el mismo en una incisión cutánea normalizada.

MATERIALES:

- 1.- Lanceta
- 2.- Cámara de Neubauer
- 3.- Microscopio de contraste de fases
- 4.- Pipeta de dilución para plaquetas

MÉTODO:

- 1.- Se efectúa una incisión cutánea normalizada igual que para la determinación del tiempo de sangrado.
- 2.- No se impide el flujo de sangre, sino que, al contrario, se deja que se acumule hasta que la gota sea lo bastante grande como para llenar una pipeta de dilución para el recuento de plaquetas. Esto requiere de 40 a 50 seg. a partir del momento de la incisión.
- 3.- Transcurrido 1 min. se llena otra pipeta para recuento de plaquetas, y se repite esto cada minuto, hasta el cese del sangrado. Se ha de poner atención en no alterar la incisión, y secar la sangre excedente con papel filtro en caso necesario.
- 4.- Se determina el recuento de plaquetas de una muestra de sangre venosa extraída en anticoagulante EDTA.
- 5.- Se calcula el porcentaje de adhesividad

$$\frac{\text{recuento de plaquetas en sangre venosa} - \text{recuento de plaquetas en la última pipeta capilar}}{\text{recuento de plaquetas en sangre venosa}} \times 100$$

- 6.- Resulta útil llevar un gráfico aritmético simple los recuentos plaquetarios seriados frente a los tiempos.

IX.5 TÉCNICA DE ADHESIVIDAD DE SALZMAN.

FUNDAMENTO:

Tiene su base en la valoración del número de plaquetas que se adhieren a una columna de bolitas de vidrio cuando a través de la misma se hace pasar sangre de del paciente expulsada por una succión negativa.

Tanto esta técnica como la de Hellem, deberían denominarse técnicas de retención de plaquetas, que de adhesividad trombocitaria, pues en ellas se valora de cierta manera tanto la adhesividad de las plaquetas al vidrio como la subsiguiente agregación de los trombocitos entre sí.

MÉTODO:

- 1.-En un tubo de polivinilo de 3mm de diámetro interior y de 13,5 cm. de longitud se rellena con 1,5 g de bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. En cada extremo del tubo se coloca un filtro de nailon. El tubo de polivinilo se conecta por un lado con una aguja siliconada, con la que se realiza la punción venosa del paciente, y por el otro lado con un tubo de plástico o vidrio siliconado en el que se ha hecho un vacío (presión negativa de 550 mm de Hg) y que contiene como anticoagulante EDTA disódico 7mg.
- 2.- Por la fuerza de succión que el vacío hace se consigue que la sangre del paciente pase a través del tubo y se vierta en el frasco que contiene el anticoagulante. El volumen de sangre obtenido debe ser de 7 ml., y el tiempo empleado es de 40 a 50 seg.
- 3.- Durante el tiempo que dura la recolección de la muestra conviene agitar el tubo receptor continua pero suavemente.
- 4.- Paralelamente a las anteriores se obtiene una muestra de sangre del mismo paciente, pero sin que haya estado en contacto con las bolitas de vidrio.
- 5.- Seguidamente se recuentan las plaquetas en ambas muestras y se calcula el porcentaje de trombocitos adheridos a la bolita de vidrio.
- 6.-Valores normales, se adhieren entre un 30 y 50 % de plaquetas que pasan a través del tubo de polivinilo.

NOTA:

La prueba parece muy útil para el diagnóstico de la hipoadhesividad trombocitaria que se observa en la enfermedad de Von Willebrand.

Como desventaja con respecto a las otras pruebas presenta la dificultad de estandarizar el flujo de la sangre a través de la columna de vidrio, debido a ello fundamentalmente a que no es fácil conseguir idénticas condiciones de vacío en todos los frascos empleados.

IX.6 ADHESIVIDAD AL VIDRIO. TÉCNICA DE BREDDIN.**FUNDAMENTO:**

Las plaquetas cuando se dejan en contacto con una superficie de vidrio siliconada se adhieren a la misma. El número de plaquetas retenidas es proporcional a su capacidad de adhesión.

MÉTODO:

- 1.- Se obtienen 9 ml de sangre venosa y se vierten rápidamente en un tubo de plástico que contiene 1 ml de citrato sódico al 3,8%.
- 2.- Se deja sedimentar espontáneamente la muestra durante una hora a temperatura ambiente.
- 3.- El sobrenadante se transfiere a un tubo de plástico.
- 4.- Se recuentan las plaquetas, utilizando como cifra definitiva la media de al menos tres recuentos.
- 5.- Seguidamente, con este plasma problema se llena una cámara de recuentos de Bürker, que previamente ha sido cuidadosamente siliconada.
- 6.- Se deja diez minutos a temperatura ambiente.
- 7.- A continuación se quita el cubreobjetos y la cámara se lava diez veces con una solución formada por nueve partes de solución salina isotónica y una parte de citrato de sodio al 3,8%.
- 8.- La cámara se coloca a continuación en una cubeta de tinción y se fija durante 5 minutos con formaldehído al 40%.

9.-Finalmente, se lava con agua destilada.

10.- Terminadas todas estas operaciones se cuenta el número de plaquetas que han permanecido adheridas en 1 mm².de la cámara.

11.- Cálculo del índice de adhesividad:

$$I.A= \frac{\text{número de trombocitos adheridos por mm}^2 \times 100}{\text{número de trombocitos por mm}^3 \text{ en el plasma}}$$

12.- Valores normales. Los índices de adhesividad se encuentran comprendidos entre 0,7 y 1,4.

IX.7 TÉCNICA DE ADHESIVIDAD DE Hellem (Hellem II)

FUNDAMENTO:

El método que aquí se describe, en lugar de hacer pasar la muestra de sangre a través de la columna de vidrio impulsada por una presión negativa, se lleva a cabo impulsándola con un motor que ejerce presión positiva.

MÉTODO:

- 1.- Se extrae la muestra de sangre utilizando una jeringuilla de plástico. Se extraen 5,5 ml.
- 2.- La muestra se impulsa a través de un tubo de plástico de 3 mm de diámetro que contiene 1,3 g de bolitas de vidrio de 0,3-0,4 mm.
- 3.- Se hace pasar 3.6 ml de la muestra de sangre por la columna de vidrio, a una velocidad de 9,2 seg/ml. La muestra se recoge en un tubo de vidrio que contiene aproximadamente 0,4 ml de EDTA 0,077 M.
- 4.- Seguidamente se desconecta la jeringa del filtro de vidrio y se vierten 0,9 ml de la sangre problema en un tubo de vidrio que contiene 19 ml de una solución de citrato sódico 0,11M.

5.- 1ml de la muestra de sangre obtenida en el aparato después de parar por la columna de vidrio, se pipetea en un tubo que 19ml de la solución de citrato sódico.

6.- Se hace el recuento de plaquetas en ambas diluciones de la sangre problema, antes y después de pasar por la columna de vidrio y se calcula el tanto por ciento de plaquetas adheridas.

7.- La proporción de plaquetas adheridas con este método es de 74,8% (SD=12,8).

El método parece muy adecuado para valorar estados de adhesividad trombocitaria disminuida, también puede ser utilizada para valorar estados de hiperfunción trombocitaria, en cuyo caso conviene reducir la cantidad de sangre que hay que hacer pasar a través de la columna de vidrio. En efecto, el porcentaje de plaquetas adheridas, cuando en idénticas condiciones experimentales a las anteriores referidas se hace pasar solamente 1 ml de sangre problema, es aproximadamente de 40-50 %, lo cual se deja un margen mayor para valorar estados de hiperadhesividad trombocitaria.

♦ **TÉCNICA DE ADHESIVIDAD DE PROST.**

FUNDAMENTO:

Al igual que las técnicas anteriores, en esta modalidad técnica se valora la adhesividad de las plaquetas a las bolas de vidrio, pero en lugar de utilizar sangre nativa, como en los métodos de Salzman y Hellem, se utiliza plasma anticoagulado con citrato sódico.

Para la valoración de la adhesividad se utiliza un aparato de vidrio en el que se introduce una cantidad fija de bolitas de vidrio de 2mm de diámetro.

MÉTODO:

1.- Antes de comenzar la prueba, el aparato se introduce en una estufa para calentarlo a 37°C. Seguidamente se llena con agua que así mismo debe estar a 37°C para de esta forma realizar las operaciones a la antedicha temperatura.

2.- La muestra de sangre del paciente se recoge sobre material siliconado, utilizando como anticoagulante un volumen de citrato sódico al 3,8%. Una vez extraída la muestra se deja reposar de 2 a 4 horas a temperatura ambiente y el sobrenadante es el que se utiliza para la realización de la prueba.

- 3.- En el sobrenadante se realiza un recuento de plaquetas, cifra que se utiliza como número de plaquetas inicial.
- 4.-Seguidamente, 2,5 ml de este plasma se hacen pasar varias veces por la columna de vidrio, primero dejando que el plasma descienda por la gravedad, y en última instancia realizando un pequeño impulso con una pera de goma.
- 5.- Las plaquetas se recuentan de nuevo después del 4° y 9° pase.
- 6.-Cada pase a través de la columna de bolitas de vidrio debe durar aproximadamente 30 seg. y la realización total de la prueba alrededor de 7 min.
- 7.- Valores normales. Después del 4° pase quedan aproximadamente retenidas el 40 o 50% de las plaquetas. Después del 9° pase la proporción de plaquetas adheridas es del 70% aprox.

NOTA:

En caso de enfermedad de Von Willebrand, la proporción de plaquetas adheridas después del 9° pase suele ser inferior al 10%.

Al valorar la adhesividad de las plaquetas con plasma, parece que se introducen mayores posibilidades de error técnico que cuando se utiliza la sangre total recién extraída, pero en cambio se tiene la ventaja de su más fácil manejabilidad en el laboratorio, y el no requerir la presencia del paciente en el momento de realizar la prueba. Igualmente parece que esta técnica es útil para la valoración de los estados de hiperadhesividad trombocitaria, teniendo en cuenta únicamente que en esta circunstancia los recuentos de plaquetas deben realizarse del 4° pase, a fin de dar mayor margen de sensibilidad a la prueba para la valoración de la hiperfunción trombocitaria.

IX.9 TÉCNICA DE ADHESIVIDAD AL COLÁGENO DE SPAET.

FUNDAMENTO:

Para que se lleve a cabo con normalidad el proceso de agregación de las plaquetas se requiere la presencia de iones calcio. En cambio, éstos no son necesarios para la normal adhesividad trombocitaria al tejido colágeno.

Por ello, se sigue la técnica sistemática llevada a cabo en la valoración de la agregación trombocitaria, pero utilizando un plasma desprovisto de iones calcio, únicamente tendrá

lugar la adhesión de plaquetas a las fibras de colágeno, sin que posteriormente sobre las plaquetas adheridas se agreguen otras nuevas.

Por ello la caída de la densidad óptica observada cuando se sigue la técnica anteriormente descrita es debida a la adhesión plaquetaria a las fibras de colágeno, y en cierta manera dicha variación de la densidad es proporcional al número de plaquetas adheridas.

MÉTODO:

1.- Se prepara una solución de colágeno diluyendo el liofilizado del mismo con ácido acético 0.1 N. Dicha solución madre diluida al 1/40 debe dar en el espectrofotómetro una densidad óptica de 0,15 medida a 625m μ . Como blanco se utiliza agua destilada.

2.- La muestra de sangre se extrae con EDTA al 10%, en la proporción de 1ml de anticoagulante y 9 ml de sangre. Seguidamente se centrifuga a 900r.p.m. durante 15 min. quedando el sobrenadante en disposición de uso.

3.- En el momento de realizar la prueba se calibra el agregómetro introduciendo una cubeta del mismo 1 ml de plasma del paciente rico en plaquetas. La aguja del galvanómetro se lleva a 65 unidades de densidad óptica, añadiéndose en este momento 0,05 ml de la suspensión concentrada de colágeno. Seguidamente se observa una caída de la densidad óptica hasta que se produce una meseta estable. Con este plasma rico en plaquetas más el colágeno ya estabilizado se lleva la aguja del galvanómetro a 0, y con el plasma rico en plaquetas a 65 unidades.

4.- En el momento de realizar la prueba se añaden 0,05 ml de la suspensión de colágeno diluida a 1 ml de plasma del paciente rico en plaquetas y se valora la caída de la densidad óptica, tras agitación continua de la muestra en el agregómetro.

Si las plaquetas se adhieren a las fibras de colágeno se produce una disminución en la densidad óptica que en cierta manera es proporcional al número de trombocitos adheridos.

Los cambios pueden seguirse bien si el aparato está provisto de un sistema de registro automático.

Aunque la prueba es difícil de estandarizar para la valoración cuantitativa de la adhesividad plaquetaria, si que parece útil para la determinación cualitativa de la capacidad de adhesión in vitro de las plaquetas al tejido colágeno.

IX.10 AGREGACION PLAQUETARIA

FUNDAMENTO:

La agregación puede inducirse añadiendo agentes agregantes al plasma rico en plaquetas, que se mantiene agitado continuamente. A medida que las plaquetas se agregan, el plasma se va aclarando progresivamente. Se utiliza un sistema óptico para detectar el cambio de transmisión luminosa, en tanto que un registrador representa gráficamente las variaciones que experimenta dicha transmisión desde la basal.

MATERIALES:

- 1.- Agregómetro y registrador, cubetas y barras de agitación magnética.
- 2.- Tubos de centrifuga de plástico graduados.
- 3.-Pipetas.

REACTIVOS:

- 1.- Citrato de sodio 3.2% (0.109M).
- 2.-Adenosin 5´difosfato sódico.
 - a. Solución stock: 10.2mg en 100ml de salino (2×10^{-4} M). Se congela en alícuotas de 1 ml
 - b. Solución de trabajo. Diluir la solución al 1:10 en salino. Cuando se añaden 20 μ l a 0.5 ml de PRP, la concentración final es de 0,4 μ g/ml o 0.8 μ M. Para obtener una respuesta bifásica, puede ser necesario utilizar otras concentraciones.
- 3.- Colágeno: reactivo soluble de colágeno. Se reconstituye con 1 ml. De agua destilada. Cuando se utilizan 50 μ l., la concentración final es de 0.8 μ l/ml.
- 4.- Hidrocloruro de adrenalina al 1:1000 (inyección de epinefrina USP.)
 - a. Solución de trabajo: se diluye al 1:10 con salino. Cuando se añaden 20 μ a 0,5ml de PRP, la concentración final es de 4 μ g/ml. Puede ser necesario practicar otras diluciones o emplear concentraciones mayores.
- 5.-Trombina (humana).
 - a. Solución stock: 50 unidades de trombina. Se reconstituye el vial con 1ml de salino.
 - b. Solución de trabajo: Se diluye 0,1ml de stock con 0,56ml de salino. Puede utilizarse otra dilución al 1:2. Cuando se utilizan 20 ml en la prueba, las concentraciones finales son de 0,3 unidades y 0,15 unidades/ml, respectivamente.

6.-Ristocetina. Diluir hasta 10mg/ml en salino. Cuando se añaden 50ml en la prueba, la concentración es de 1 mg/ml.

MÉTODO:

1.-Se extraen 20 ml de sangre con jeringa de plástico y aguja de calibre 20 en 1 ml de citrato de sodio. Se centrifuga 30min a 150g a temperatura ambiente para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP). Se retira con suavidad el plasma mediante una pipeta de plástico. Se mantiene un tubo de plástico bien tapado a temperatura ambiente. Se realiza la prueba en un plazo de 2 horas. Se obtiene el plasma pobre en plaquetas (PPP) centrifugando de nuevo a 3 000g durante 20 min. Se diluye el PPP y el PRP con partes iguales de solución salina para normalizar el sistema agregómetro. Si el plasma no presenta lipemia, se puede sustituir él por un volumen de agua normal.

2.-Realizar la prueba con los reactivos agregantes (2, 3, 4, 5 y 6 del apartado anterior).

a. Se diluyen en una cubeta 0,25 ml de PRP con 0,25 ml de solución salina. Se incorpora una varilla agitadora y se pone en el agregómetro 2 min. hasta alcanzar los 37°C. Se registra un valor básico durante 1min, aproximadamente.

b. Se añaden 20µl de reactivo que agrega con una pipeta automática. Hay que depositarlos con cuidado en el centro del tubo.

c. Se registran los resultados durante 3-5 min., aproximadamente, o hasta que no se observen más cambios.

d. Se repite el proceso con los 5 reactivos que agregan.

COMENTARIOS:

La temperatura, ph y concentración de citrato son valores muy importantes en la agregación, y deben controlarse cuidadosamente. Para manejar las plaquetas se recomienda material de vidrio recubierto con silicona o plástico.

Todos los plasmas estarán a temperatura ambiente durante cerca de 30 min. antes de proceder a su estudio, de modo que una centrifugación más corta o más rápida no supone ninguna ventaja. Por ningún concepto se calentarán o refrigerarán las plaquetas.

RESULTADOS:

La epinefrina y el ADP deben producir curvas difásicas. La curva del colágeno presenta una fase retardada y luego una curva monofásica. También la trombina tiene una curva

monofásica; forma con frecuencia un coágulo a la dilución más fuerte y suele exhibir desagregación a la dilución más débil. Las curvas normales de ristocetina son monofásicas, y a veces bifásicas. La aspirina y los preparados a base a aspirina, los antihistamínicos, etc., son capaces de reducir la agregación, en especial en la onda secundaria de las curvas bifásicas.

IX.11 METODO DE AGREGADOS CIRCULANTES DE PLAQUETAS

FUNDAMENTO:

La presencia de grupos microscópicos de plaquetas en pequeños vasos sanguíneos en biopsias o autopsia se ha asociado a isquemia. Wu y Hoak han postulado que los pacientes con lesiones vasculares oclusivas tienen mayor porcentaje de agregados circulantes de plaquetas. Sus resultados en estudios experimentales y clínicos limitados sugieren que la prueba propuesta puede ser útil para identificar pacientes con lesiones isquémicas activas o en formación. La técnica es sencilla pero no se ha estudiado lo suficiente para justificar una valoración de su eventual utilidad.

EQUIPOS:

- 1.- Centrífuga.
- 2.- Equipo contador de plaquetas, automático o microscopio de contraste de fase.
- 3.-Tubos de ensayo impermeables.

REACTIVOS:

- 1.- Anticoagulante A: EDTA 0,0115M, formalina 1%, NaH_2PO_4 0,007M, NaCl 0,15M, pH 7,4.
- 2.- Anticoagulante B: EDTA 0,0115M, NaH_2PO_4 0,007M, NaCl 0,15M, pH 7,4.

MÉTODO:

- 1.- Se toma sangre venosa en 2 jeringas impermeables que contienen anticoagulante A y B respectivamente. SE usa una proporción de 1 parte de sangre por 4 partes de anticoagulante.
- 2.- Las muestras se mezclan bien, se colocan en tubos de ensayo y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 15 min.

3.-Se prepara PRP en ambos tubos.

4.- Se hacen recuentos de plaquetas en ambas muestras.

INTERPRETACIÓN:

La base lógica de esta prueba es que cualquier grupo circulante de plaquetas es fijado por formalina en anticoagulante A. A la inversa Wu y Hoak sostienen que los agregados se disgregan en un tubo B. Los agregados del tubo A se centrifugan en la capa de glóbulos rojos y así el recuento de plaquetas PRP del tubo A es menor que el del tubo B. La proporción de recuento de plaquetas A y B se llama proporción de agregados de plaquetas (PAR). Cada laboratorio debe determinar sus propios límites normales. Si se usan instrumentos contadores de partículas, la ventana debe recalibrarse cuidadosamente para las plaquetas formalizadas del tubo A. Una PAR menor de los límites normales indicaría un evento trombovascular agudo.

IX.12 VALORACIÓN DE LA AGREGACIÓN POR LA TÉCNICA FOTOCOLORIMETRICA DE BORN.

FUNDAMENTO:

Si un plasma rico en plaquetas se introduce en fotocolorímetro absorbe una cierta cantidad de luz. Cuando las plaquetas inician la agregación constituyendo cúmulos mayores dejan pasar mayor cantidad de luz.

En determinadas condiciones de experimentación parece que existe una cierta correlación entre la intensidad de agregación y la densidad óptica de la suspensión plasmática de plaquetas, por lo que este último dato puede utilizarse como expresión bastante directa de la agregación trombocitaria.

MÉTODO:

Existen diversos aparatos en el mercado para la valoración de la agregación plaquetaria. Todos tienen un parecido fundamento de actuación, es decir, la valoración de los cambios de densidad óptica del plasma rico en plaquetas cuando el mismo se somete a una agitación

constante. Estas variaciones de densidad óptica pueden recogerse en un registro gráfico y constituyen la denominada curva de agregación.

Para estimular la agregación se utilizan diversos inductores, de los cuales los más frecuentes son el colágeno, la adrenalina y el ADP. La concentración de cada uno de estos inductores varía según la finalidad de la valoración realizada, pero en la práctica del laboratorio se suelen utilizar 50 microgramos por mililitro de colágeno, 0,5 a.m. /ml de ADP y 1,25 moles de adrenalina. Todas las concentraciones se entienden que son concentraciones del inductor en el plasma en el momento de realizar la prueba.

En el momento de iniciar la prueba la aguja del galvanómetro se lleva a 100 de densidad óptica con un plasma del paciente rico en plaquetas (aproximadamente de 250 a 300.000/mm³), y a 0 con el plasma pobre en plaquetas.

Seguidamente se introduce en el agregómetro la cubeta con 0,6 ml del plasma del paciente que se va a valorar. Se añaden 0,2 ml del inductor y se inicia la agitación continua registrando las variaciones de densidad óptica.

Con esta prueba se puede seguir continuamente el proceso de agregación de las plaquetas, pudiéndose observar en el mismo la primera y segunda onda de agregación y la desagregación en caso de que esta se produzca. También parece especialmente útil para la experimentación farmacológica, ya que permite una gran versatilidad en el tipo de experiencias que con el mismo se puede desarrollar.

Los aspectos concretos de las técnicas varían con el modelo de aparato utilizado, por lo conviene seguir las indicaciones del fabricante.

IX.13 DISPONIBILIDAD DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO (MÉT. DE LA CELITA)

FUNDAMENTO:

Las plaquetas liberan un fosfolípido (factor 3 plaquetario, PF₃) con actividad tromboplastínica parcial. Para estudiar la actividad PF₃ del paciente, se pueden usar las plaquetas de éste como reactivo PF₃ en la prueba de tromboplastina parcial, Se comparan el PRP (la fuente de actividad de PF₃) y el PPP (escaso en PF₃) con el reactivo tromboplastínico parcial activado, para probar la actividad de cada uno.

REACTIVOS:

- 1.- Celita 505 suspensión al 1% en NaCl, 0,85%.
- 2.- CaCl₂, 0,025M.
- 3.- Platelin más activador.

MÉTODO:

- 1.- Se obtiene plasma PRP y PPP como para la agregación plaquetaria y se mantienen a temperatura ambiente en tubos de plástico.
- 2.- Se determinan 3 tiempos de coagulación.
 - a. Control. Se añaden 0,1ml de Platelin más activador a 0.1 ml de PPP. SE incuba a 37 °C. durante 5 min., y luego se adiciona 0,1 ml de CaCl₂ 0,025M.
Se determina el tiempo de coagulación.
 - b. Se agregan 0,1 ml de suspensión de celita al 1% a 0,1 ml de PRP. Se incuba a 37°C. durante 5 min. , y luego de añade 0,1ml de CaCl₂ y se determina el tiempo de coagulación.
 - c. Se añade 0,1 ml de celita al 1% a 0,1 ml de PPP. Se incuba a 37°C. durante 5 min. y luego se le adiciona 0,1 ml de Ca Cl₂ y se determina el tiempo de coagulación.

RESULTADOS:

El PRP y la celita deben dar un tiempo próximo al de control con Platelin más activador. El PPP proporcionará un tiempo prolongado con la suspensión de celita. Si el tiempo de coagulación del PRP es prolongado, más próximo al del PPP que al control, se ha presentado la imposibilidad de las plaquetas para liberar PF₃.

**IX.14 PRUEBA DE DISPONIBILIDAD DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO.
TIEMPO DE COAGULACIÓN CON CAOLIN.****FUNDAMENTO:**

El fosfolípido plaquetario (PF₃) es necesario en el mecanismo común de la coagulación para la formación de protombinasa, y en el mecanismo intrínseco para la formación del complejo de factor VIII. Se libera de plaquetas estimuladas durante la agregación plaquetaria inducida por varios agentes o después de traumatización de las plaquetas

mediante sonicación o por congelamiento y descongelamiento. La disponibilidad del factor 3 plaquetario puede elevarse no solo con el tiempo de coagulación con caolín, sino también mediante el tiempo de recalcificación de plasma rico en plaquetas, el Tiempo de Stypven, el tiempo de consumo de protrombina y el tiempo de trombina.

El tiempo de recalcificación normal de PRP está basado en un limitado liberamiento del PF3. El tiempo de coagulación puede ser significativamente acortado por la liberación de PF3 procedente de las plaquetas agregadas con caolín. El PRP se incubaba con caolín antes de la adición de calcio.

REACTIVOS Y EQUIPO:

- 1.-Bio/Data Coagulation Prolifer (optativo).
- 2.- PPP, control y del paciente.
- 3.- PRP, control y del paciente.
- 4.-CaCl₂ 0,035M
- 5.- Suspensión de caolín.

MÉTODO:

TUBOS DE ENSAYO	1	2	3	4
PPP paciente (ml)	0.1	0.1		
PPP control (ml)		0.1		0.1
PRP paciente (ml)		0.1	0.1	
PRP control (ml)	0.1			0.1
CALENTAR A 37°C				
CAOLIN(ml) a 37°C	0.2	0.2	0.2	0.2
INCUBAR A 37°C CON AGITACION OCASIONAL				
Cl ₂ Ca (ml) a 37°C	0.2	0.2	0.2	0.2

Añadiendo a cada tubo a intervalos de 1 min.

Poner en marca el cronómetro al añadir el calcio y registrar el tiempo de coagulación.

IX.15 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS PLAQUETARIOS POR ENSAYO DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO.

Hirschman y Gralnick modificaron la determinación original de factor 3 plaquetario de Horowitz y col. , e introdujeron una prueba rápida que es sensible y reproducible y puede ser efectuada en la mayoría de los laboratorios, ya que no requiere un equipo especializado. El factor 3 plaquetario es liberado por las plaquetas tras un daño inmunológico y su actividad se determina mediante una técnica de tiempo de coagulación. Una actividad anticuerpo aumentada da lugar a una mayor concentración de factor 3 que es responsable de un acortamiento de tiempo de coagulación.

REACTIVOS:

- 1.-Plasma rico en plaquetas.
- 2.-Plasma pobre en plaquetas.
- 3.- Suero del paciente y suero control.
- 4.- CaCl_2 0,025 M, 2,75 g/l.

MÉTODO:

La reacción se efectúa en un fibrómetro.

- 1.- Añadir 0,1 ml de suero problema a 0,1 ml de PRP.
- 2.- Incubar la muestra a 37°C durante 10 min.
- 3.-Añadir 0,1 ml de mezcla a 0,1 ml de PPP e incubar 30 segundos a 37°C.
- 4.- Añadir 0,2 ml de CaCl_2 y registrar el tiempo de coagulación.
- 5.- Repetir la prueba con 5 sueros control y efectuar todas las pruebas por duplicado.

RESULTADOS:

Los resultados que se desvían más de 2 SD de los resultados de los 5 sueros control con cada suspensión de plaquetas se consideran positivos.

IX.16 ENSAYO DE FACTOR 3 PLAQUETARIO PARA ANTICUERPOS ANTIDROGAS.

MATERIAL :

- 1.- Preparación de PPP, PRP, sueros control y problema.
- 2.- Soluciones salinas de las drogas, tales como:
Sulfato de quinidina 0,005M (1,85g/l).
Clorhidrato de tiazida 1,2 mg/ml.
Digoxina 0,02 mg/ml.
- 3.- En los controles sustituir el suero problema por solución salina.

MÉTODO:

- 1.- Inactivar los sueros a 56°C durante 30 minutos a guardar a -40°C si no se emplean inmediatamente.
- 2.- Mezclar 0,1 ml de suero problema, 0,1 ml de solución de droga y 0,1 ml de PRP.
- 3.- incubar a 37°C durante 10 min.
- 4.- Añadir 0,1 ml de la mezcla a 0,1 ml de PPP e incubar 30 segundos a 37°C.
- 5.- Añadir CaCl₂ y registrar el tiempo de coagulación.

RESULTADOS

Los resultados se consideran positivos cuando los tiempos de coagulación se desvían más de 2 SD de los resultados de 5 especímenes de control.

Los resultados obtenidos por Okuno y Crockatt son los siguientes:

Suero problema + quinidina = 48,8 seg.

Suero problema + salino = 70,2 seg.

Suero control + quinidina = 62,4 ±4,8 seg.

Suero control + salino = 60,5 ±5,4 seg.

IX.17 FACTOR 4 PLAQUETARIO (ACTIVIDAD HEPARINICA)

FUNDAMENTO:

El factor 4 plaquetario es una proteína plaquetaria de bajo peso molecular que puede neutralizar el efecto anticoagulante de la heparina. Dicho factor se libera de las plaquetas durante la reacción de liberación. La cantidad de factor 4 en el plasma es un índice del grado de destrucción intravascular de plaquetas. La significación de un solo resultado no se ha establecido claramente, porque el índice de depuración metabólica de la sangre de factor 4 liberado no se conoce. Esta prueba puede tener valor en la estimación del consumo de plaquetas versus el consumo de proteínas de coagulación en lugar de estudios de recambio.

EQUIPOS:

- 1.- Baños de agua a 60°C. y 37°C.
- 2.- Centrífuga d alta velocidad.
- 3.- Baño de hielo.
- 4.- Tubos de ensayo.

REACTIVOS:

- 1.-Trombina 40U/ml en imidazol 0,05M, NaCl 0,15M
- 2.-Heparina sódica 1.000 U/ml.
Diluir en NaCl 0,15M hasta una concentración final de 1,4 U/ml.
- 3.- Tris-Cl 0,02M pH 7,4
- 4.-Plasma citratado de control.
- 5.- Plasma citratado de muestra.

MÉTODO:

- 1.-Preparar PPP de control y de muestra centrifugando a 9.000 x g durante 5 min.
- 2.- Incubar el plasma a 60°C. durante 5 min. y centrifugando a 8.000 x g 5 min.
- 3.- Almacenar el plasma sobrenadante.
- 4.-Precalentar 0,1 ml de trombina a 37°C.
- 5.- Poner 0,15 ml de plasma y 0,02 ml de Tris-Cl en un tubo de ensayo. Mezclar y agregar 0.05 ml de heparina. Agregar 0,05 ml de trombina y poner en marcha el cronómetro.

El tiempo de coagulación de control es 25-30 seg.

INTERPRETACIÓN:

Los tiempos de coagulación menores de los límites normales indican aumento de factor 4 plaquetario y de consumo de estas últimas.

IX.18 INDICE DE MEGATROMBOCITOS

En el índice de megatrombocitos se mide el porcentaje de plaquetas circulantes que está por encima de un volumen determinado. El porcentaje y/o el número de estas plaquetas se han correlacionado con el número de megatrombocitos en la médula ósea. La base de la prueba es la observación de que las plaquetas jóvenes son más grandes y de mayor actividad metabólica. Además, se comprobó que un aumento de megatrombocitos junto con menor supervivencia de plaquetas en trastornos como ITP, lupus eritomatoso sistémico y coagulación intravascular diseminada con trombocitopenia o sin ella. Actualmente se usa como auxiliar cuando se sospecha de una enfermedad con aumento de producción de plaquetas o menor supervivencia de las mismas.

MATERIAL:

- 1.- Contador de plaquetas con capacidad de clasificar por tamaño, por ejemplo Coulter Model B.
- 2.- Sangre anticoagulada con EDTA.

MÉTODO:

- 1.- Diluir sangre anticoagulada con EDTA en solución de Eagle hasta un recuento de plaquetas de $50/\text{mm}^3$.
- 2.- En el método original la apertura se ajusta para contar partículas desde $1,5-13 \mu\text{m}^3$ (A); un segundo recuento también se hace para valores de $1,5-27 \mu\text{m}^3$ (B).

$$\frac{B-A}{B} \times 100 = 5 \text{ grandes plaquetas}$$

En algunos instrumentos de recuento de $13\text{-}27\ \mu\text{m}^3$ puede ser técnicamente factible.

3.-Cada laboratorio debe determinar sus límites normales. La descripción original fue de $2,7\% \pm 2,8\%$ (SD).Las aperturas deben ajustarse para que la media normal no exceda de 10%.

INTERPRETACIÓN:

Un porcentaje aumentado de megatrombocitos sugiere recambio acelerado de plaquetas en las enfermedades mencionadas. En estados megaloblásticos la prueba ni es válida pues todavía no se puede sustituir a la supervivencia de plaquetas, pero puede tener valor como auxiliar particularmente cuando la supervivencia de plaquetas no es factible.

IX.19 PRUEBA DE LA ANTIGLOBULINA DE COOMBS PARA DETECTAR IgG Y C3 EN PLAQUETAS.

La prueba de antiglobulina de Coombs marcada radiactivamente establece que la mayoría de los pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática tienen niveles aumentados de IgG en sus plaquetas. El C₃ asociado a plaquetas está elevado en algunos pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática incluso estando la IgG dentro de los límites de normalidad sugiriendo que el C₃ desempeña un papel en la patogénesis de la púrpura trombocitopénica idiopática.

MÉTODO:

- 1.- El PRP se obtiene centrifugando sangre anticoagulada con EDTA a 170G durante 10 min. Se lavan las plaquetas 3 veces (2 500 g /10 min.) con tampón de Tyrode modificado y se resuspenden en 1 ml.
- 2.- Se incuban a 37 °C durante 30 min., con una alícuota de I¹²⁵ anti-IgG o I¹²⁵-anti-C₃.
- 3.- Las plaquetas se lavan 4 veces con tampón de Tyrode conteniendo EDTA sé resuspenden en 1 ml y se determina la cantidad de radiactividad asociada a plaquetas con un contador gamma.
- 4.- Los resultados pueden informarse como radiactividad asociada a plaquetas.(159,78,384)

XI. CLASIFICACION DE LOS TRASTORNOS PLAQUETARIOS

A. ALTERACIONES CUANTITATIVAS EN LAS PLAQUETAS.

X.1 TROMBOCITOPENIA.

X.1.1 TROMBOCITOPENIA DEBIDA A PRODUCCION DE PLAQUETAS DISMINUIDA O DEFECTUOSA.

X.1.1.1. TROMBOCITOPENIA CONGENITA.

PANCITOPENIA CONSTITUCIONAL (SINDROME DE FANCONI). La pancitopenia, debida a aplasia congénita de la medula, puede presentarse con otras anomalías o sin ellas. La Púrpura trombocitopénica puede predominar en el período neonatal y progresar a pancitopenia varios años después. Los niveles de hemoglobina y leucocitos pueden subir después de un tratamiento de corticosteroides y testosterona, pero las plaquetas responden raramente.

TROMBOCITOPENIA AMEGACARIOCITICA CON MALFORMACIONES CONGENITAS. La deficiencia congénita que se presenta con malformaciones esqueléticas, renales o cardíacas es una causa rara de púrpura trombocitopénica en el recién nacido. La anomalía más comúnmente asociada es la aplasia bilateral de los radios. La trombocitopenia es casi siempre grave y sólo se encuentran megacariocitos ocasionales en la medula, generalmente existe una reacción granulocítica leucemoide.

TROMBOCITOPENIA HEREDITARIA. Estas alteraciones quedan clasificadas por su forma de herencia: La trombocitopenia ligada al sexo como lo es el Síndrome de Wiscott-Aldrich se caracteriza por eccema, trombocitopenia y susceptibilidad a las infecciones que conducen a un fatal desenlace a edad variable. Las plaquetas son más pequeñas que las normales y, tanto plaquetas como megacariocitos muestran una ultraestructura muy alterada al microscopio electrónico.

El número absoluto de megacariocitos es normal o aumentado. La supervivencia de plaquetas homologa es normal, pero las autólogas tienen una vida muy corta. Es muy probable que la trombocitopenia sea causada por anomalía del desarrollo megacariocítico que dé como resultado la formación de plaquetas defectuosas. La trombocitopenia autosómica dominante como la anomalía de May-Hegglin es una alteración rara, caracterizada por plaquetas gigantes, extrañas e inclusiones basofílicas (cuerpos **de Döhle**) dentro de los granulocitos. Los megacariocitos están presentes en cantidades normales y la ultraestructura plaquetaria es normal. La trombocitopenia en el déficit congénito de tromboxetina se debe a una producción defectuosa.

En la trombocitopenia autosómica recesiva sólo se tienen informes de algunos casos en donde el número de megacariocitos era muy reducido y en otros incrementado, existían plaquetas gigantes con una vida aparentemente muy corta; también se han detectado plaquetas anormales en la sangre periférica de individuos.

ENFERMEDAD INFILTRADA DE LA MEDULA. Es extremadamente rara, y se limita esencialmente, a casos de reticuloendoteliosis diseminada y leucemia congénita.

RUBEOLA DEL RECIEN NACIDO. En los recién nacidos, infectados con rubéola, se observa con frecuencia trombocitopenia, a veces muy grave, en donde se presenta niveles plaquetarios bajos y un número reducido de megacariocitos.

INGESTION MATERNA DE DIURETICOS TIACIDICOS. Se ha encontrado niños con presencia de Púrpura trombocitopénica neonatal, de madres que fueron tratadas con diuréticos tiacídicos durante el embarazo. Los megacariocitos se encontraban en un número reducido, no fue posible detectar anticuerpos plaquetarios en el suero materno, y se postuló un efecto tóxico del fármaco sobre la producción fetal de plaquetas como causa de la trombocitopenia.

X.1.2 TROMBOCITOPENIA ADQUIRIDA.

ANEMIA APLASICA. En la anemia aplásica adquirida tanto adulta como juvenil, la trombocitopenia persiste a pesar de la restauración a la normalidad de los niveles de hematocrito y leucocitos.

INFILTRACION DE LA MEDULA. La trombocitopenia puede ser la resultante de la sustitución de medula por carcinoma, leucemia aguda y crónica, linfoma y otros estados. Cuando se presentan múltiples focos de carcinoma están ampliamente diseminados por la medula, todavía la trombocitopenia puede ser la anomalía más prominente. La mielofibrosis es a menudo causa de la trombocitopenia, aunque los niveles de plaquetas puedan ser también elevados, en la tuberculosis miliar puede presentarse como púrpura trombocitopénica, pero muy a menudo se observan también la anemia y la leucopenia.

RADIACION IONIZANTE Y FARMACOS MIELOSUPRESORES. Los precursores de las plaquetas son un poco menos sensibles a los efectos de la irradiación de todo el cuerpo que los precursores de los linfocitos eritrocitos y granulocitos. Las plaquetas en circulación no son afectadas, después de la irradiación las plaquetas no disminuyen en número durante varios días, lo que indica que los megacariocitos afectados continúan con capacidad de madurar y liberar plaquetas. La diátesis hemorrágica que sigue a la irradiación es principalmente el resultado de la trombocitopenia.

Todos los fármacos mielosupresores son capaces de causar trombocitopenia si se administra en dosis suficientes. La citosina arabinósido es particularmente tóxica para los megacariocitos, y su uso puede ser seguido por una trombocitopenia súbita y grave. La ciclofosfamida, el busulfán, el metotrexato y la 6-mercaptopurina son de potencia intermedia. Los alcaloides de la vinca tienen un efecto depresivo relativamente pequeño sobre la producción de plaquetas, aunque son efectivos contra eritrocitos. Su empleo puede ocasionar la elevación de los niveles plaquetarios. La suspensión de la terapia mielosupresora es a menudo seguida por trombosis.

SUSTANCIAS QUE ACTUAN ESPECIFICAMENTE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS. **DIURETICOS TIACIDICOS:** Se tienen informes de trombocitopenia asociada con el uso de clorotiacida y otros derivados; los megacariocitos aparecen

generalmente disminuidos o no los hay, se requiere de un período largo de administración del fármaco (1-4 semanas) para poder reinducir la trombocitopenia en los pacientes sensibles, por lo tanto parece probable que los diuréticos tiazídicos causan la trombocitopenia a través de un efecto tóxico sobre los megacariocitos y no por destrucción periférica de las plaquetas. ALCOHOL en pacientes con alcoholismo crónico los megacariocitos son normales o disminuidos en número, tras la supresión de alcohol los niveles de plaquetas vuelven a la normalidad. En estudios recientes se ha demostrado que se requiere la ingestión de alcohol durante 5 a 10 días para producir una trombocitopenia, presentando una disminución de megacariocitos, indicando que el alcohol actúa suprimiendo la producción de plaquetas en ciertos individuos sensibles, por medio de un mecanismo aún no determinado.

TROMBOCITOPENIA CICLICA. En la mujer los niveles plaquetarios disminuyen aproximadamente un 20% durante las 2 semanas que preceden a la menstruación. Ocasionalmente, la disminución de plaquetas es tan acentuada que se presenta una púrpura trombocitopénica. Hoy en día, la causa de esta alteración es desconocida existen mecanismos de retroacción que son capaces de regular la producción de plaquetas. El defecto funcional primario, en la trombocitopenia cíclica, puede ser una reaccionabilidad anormal por parte de la medula a los estímulos retroacción. Tanto positivos como negativos, lo que origina una alternación regular entre producción excesiva e inadecuada de plaquetas, es decir, un estado de oscilación estable.

DESNUTRICION. Los pacientes con anemia perniciosa y deficiencia de ácido fólico, tienen, a menudo, el número de plaquetas reducido. Ocasionalmente, la trombocitopenia es tan grave que el paciente requiere de consulta médica. Existen, probablemente 3 mecanismos responsables de la reducción del nivel de plaquetas: la vida de las plaquetas se ve acortada de un tercio a la mitad, se presenta una megacariopoyesis y, en los casos graves, los megacariocitos están disminuidos en número o completamente ausentes, en algunas veces se observan megacariocitos hiperlobulados. En niños con anemia grave por deficiencia de hierro se observa una trombocitopenia moderada. El incremento de los niveles plaquetarios que se produce con el tratamiento ha sido interpretado como una respuesta específica al hierro. Es más, probable, sin embargo, que la trombocitopenia sea el resultado de una deficiencia coexistente de ácido fólico, posiblemente como consecuencia

de mala absorción, que se corrige por la combinación de una dieta y un suplemento de hierro.

INFECCIONES VIRICAS. Estudios experimentales en animales han demostrado que los megacariocitos presentan un sitio ideal para la autorreproducción vírica, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los que sugiere que los virus pueden interferir en la maduración de los megacariocitos. La trombocitopenia se puede presentar en el curso de muchas enfermedades víricas. No esta bien claro en que medida se debe esto de la hematosupresión, por que no se ha efectuado un estudio sistemático de supervivencia plaquetaria. En la rubéola congénita los megacariocitos están disminuidos en número, lo que sugiere que la producción de plaquetas es defectuosa. En la gripe, sarampión, rubéola y mononucleosis infecciosa que se presentan en niños mayores y en adultos, se confirma comúnmente una reducción significativa de los niveles plaquetarios durante el periodo de incubación y el estadio agudo. En la fiebre hemorrágica Thai y en la íntimamente relacionada, el dengue, la púrpura trombocitopénica puede ser muy grave. Se presentan cambios degenerativos en los megacariocitos (desarrollando vacuolación y degeneración nuclear).

HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA. Las plaquetas presentan anomalías de la membrana, característica de los eritrocitos en esta alteración, la vida de las plaquetas es normal, lo que indica que los reducidos niveles plaquetarios son originados en primer lugar por insuficiente producción.

XI.1.2 TROMBOCITOPENIA DEBIDA A UNA DESTRUCCION DE PLAQUETAS AUMENTADA.

XI.1.2.1. TROMBOCITOPENIA CONGENITA: NO INMUNOLOGICA.

ERITROBLASTOSIS FETAL. Los niños con eritroblastosis fetal, presentan frecuentemente trombocitopenia moderada, aunque la destrucción de eritrocitos, característica de esta alteración, es inducida por anticuerpos, el antígeno Rh contra los anticuerpos que van dirigidos no se encuentra, probablemente, en las plaquetas. Estas pueden, ser destruidas como resultado de su interacción con productos de degradación de los eritrocitos, más bien que por su participación directa en una reacción inmunológica.

TROMBOCITOPENIA DE LOS PREMATUROS.

Se observó trombocitopenia en un alto porcentaje en prematuros, se sugirió que podría ser normal en este tipo de niños, a veces se encuentra asociada, con hemorragia gastrointestinal, que puede presentarse en salas para prematuros; posiblemente, estas epidemias tengan causa en algún tóxico desconocido o agente infecciosos.

TROMBOSIS DE LA VENA RENAL. Se ha descrito la trombosis de la vena renal en el recién nacido complicada por trombocitopenia, como causa posible, se ha sugerido el consumo de las plaquetas circulantes en el riñón afectado.

INFECCIONES. La trombocitopenia usualmente benigna, pero a veces grave se presenta frecuentemente en recién nacidos enfermos de inclusión citomegálica y sífilis, algunas veces, en los que tienen herpes sistémico y toxoplasmosis. Los megacariocitos se encuentran normales, la trombocitopenia se debe probablemente a la destrucción de plaquetas circulantes.

TROMBOCITOPENIA CON HEMANGIOMA CAVERNOSO GIGANTE (SINDROME DE KASABACH-MERRIT). Las plaquetas transfundidas a los pacientes de este trastorno son rápidamente eliminadas de la circulación; se han encontrado trombos, formados principalmente por plaquetas, en algunas muestras tomadas de biopsias de las lesiones. Algunos han observado que la trombocitopenia es el resultado de la destrucción plaquetaria desencadenada por la propia neoplasia.

XI.1.2.2.TROMBOCITOPENIA CONGENITA: INMUNOLOGICA.

SENSIBILIDAD A LOS FARMACOS. Tras la ingestión de quinina, quinidina y otras sustancias, se pueden formar anticuerpos que, en presencia del fármaco, reaccionan con las plaquetas y originan trombocitopenia.

TROMBOCITOPENIA NEONATAL ISOIMNUNE. La trombocitopenia neonatal, debida a inmunización de la madre contra las plaquetas fetales. La destrucción de estas plaquetas

es acarreada por su interacción con los anticuerpos maternos, adquiridos transplacentalmente y dirigidos contra los antígenos plaquetarios específicos heredados del padre. La alteración es semejante a la eritroblastosis fetal, excepto que son plaquetas fetales, y ni los eritrocitos, los que suministran el estímulo antigénico.

TROMBOCITOPENIA IDIOPATICA MATERNA. Aproximadamente el 50% de los niños nacidos de mujeres con púrpura trombocitopénica idiopática crónica (ITP) son también trombocitopenicos al nacer porque aparentemente el factor antiplaquetario que causa la enfermedad en la madre atraviesa la placenta y ataca las plaquetas fetales.

XI.1.2.3. TROMBOCITOPENIA ADQUIRIDA: NO INMUNOLOGICA.

TROMBOCITOPENIA ASOCIADA CON INFECCION. La producción de plaquetas puede ser suprimida en ciertas infecciones víricas y posiblemente, en algunas bacterianas.

COAGULACION INTRAVASCULAR DISEMINADA (DIC). La DIC se presenta en una variedad de estados clínicos y quirúrgicos y debería ser tomada en cuenta siempre en el diagnóstico diferencial de la trombocitopenia.

PURPURA TROMBOTICA TROMBOCITOPENICA (TTP). La TTP se caracteriza por la anemia hemolítica con cambios microangiopáticos en los eritrocitos, trombocitopenia y anomalías neurológicas fluctuantes, a menudo extrañas. Los microtrombos responsables de la mayoría de las manifestaciones clínicas de la TTP, podrían ser el resultado de una agregación de plaquetas desencadenada por el contacto de éstas con el endotelio lesionado de los pequeños vasos.

SINDROME HEMOLITICO-UREMICO (SINDROME DE GASSER). El síndrome hemolítico-urémico (HUS), es una enfermedad de la infancia caracterizada por fiebre, fallo renal, agudo, anemia hemolítica con cambios microangiopáticos en los eritrocitos y trombocitopenia.

Los niveles de plaquetas son subnormales en más del 90% de los casos y se ha notado un acortamiento en la supervivencia plaquetaria.

FARMACOS DIRECTAMENTE TOXICO PARA LAS PLAQUETAS CIRCULANTES.

La risrocetina es un antibiótico que ya no está en uso normal. Es el único que ha demostrado capaz de provocar trombocitopenia por una acción directa sobre las plaquetas humanas circulantes. Dicho efecto puede ser reproducido en los conejos y relacionarse con la propiedad de la ristocetina de desencadenar la agregación de plaquetas. La heparina es una sustancia que puede causar d un 17 a un 60 % de disminución en los niveles plaquetarios cuando se inyecta por vía intravenosa. En estudios más recientes se sugiere que la trombocitopenia heparínica es un artefacto, causado por la aglutinación de las plaquetas después de recoger las muestras de sangre.

XI.1.2.4 TROMBOCITOPENIA ADQUIRIDA: INMUNOLOGICA.

PURPURA TROMBOCITOPENICA INMUNOLOGICA INDUCIDA POR FARMACOS.

La púrpura trombocitopénica después de la ingestión de quinina, se mostró que podía ser reinducida en tales pacientes administrándoles de nuevo el medicamento después de su recuperación inicial. Se halló que las plaquetas podían ser aglutinadas o lisadas *in vivo* cuando se mezclaban con quinina y suero procedente de un paciente trombocitopénico, y que la sensibilidad a la quinina podía ser transferida de forma pasiva a un sujeto normal inyectándole plasma procedente de un paciente sensible a la quinina. Estas observaciones demostraron que la trombocitopenia inducida por la quinina es causada por la interacción *in vivo* del fármaco, un factor plasmático y las plaquetas. Desde entonces se ha observado que otros fármacos causan trombocitopenia aguda en individuos sensibles, entre ellos se encuentran la quinina, la quinidina y la aliloisopropilacetilurea (Sedormid). En una serie de artículos se mostró que el factor plasmático presente en los pacientes con sensibilidad al Sedormid tiene propiedades de un anticuerpo, que reacciona con las plaquetas sólo en presencia del fármaco y causa aglutinación, lisis, fijación del complemento, e inhibición del coágulo.

PURPURA POSTTRANSFUSION. Una púrpura trombocitopénica aguda, comparable en gravedad con la de los pacientes con sensibilidad a la quinidina, pero se presenta aproximadamente 1 semana después de una transfusión de sangre, aunque rara, esta

alteración es de gran interés como posible modelo de la patogénesis de la enfermedad <<autoinmune>>.

PURPURA TROMBOCITOPENICA IDIOPATICA (PTI). Se manifiesta por dos síndromes clínicamente diferentes: el tipo agudo y el crónico. La PTI aguda es más frecuente en niños, que tienen historial de infección respiratoria, rubéola y otros exantemas, la instauración es súbita con dos tipos de síntomas y signos primero se observa púrpura, equimosis de la piel y membranas mucosas; y después hemorragia a través del tracto gastrointestinal, urinario, intracraneal o vaginal. El curso suele ser benigno; en general los pacientes responden al tratamiento con esteroides en las primeras semanas o meses, sin embargo algunos casos evolucionan hacia una forma crónica. La PTI crónica se caracteriza por su instauración insidiosa, por lo común una larga historia de contusiones por causas triviales y hemorragias anormales. El hallazgo en el laboratorio que más llama la atención es la trombocitopenia. El recuento plaquetario en la forma aguda puede ser muy bajo, se observa escasez o total ausencia de plaquetas en las extensiones sanguíneas. Son frecuentes plaquetas gigantes y pequeñas, también se advierte en la forma crónica. Prácticamente se encuentra alargado el tiempo de hemorragia y la prueba del torniquete es positiva, todas las pruebas de coagulación son normales, excepto la del consumo de protrombina y la retracción del coágulo; la anormal de estas dos es proporcional al número de plaquetas. El estudio de la medula ósea no es diagnóstico. Los megacariocitos son abundantes (al contrario de lo que sucede en las trombocitopenias debidas a depresión de la medula ósea) y se observa aumentado el número de megacariocitos jóvenes y de formas con pocas granulaciones citoplasmáticas. La trombocitopenia, se debe a la acción del mismo anticuerpo (probablemente es una inmunoglobulina IgG) que ataca a las plaquetas circulantes, o son el reflejo de la trombopoyesis acelerada.

XI.1.2.5 TROMBOCITOPENIA DEBIDA AL SECUESTRO DE PLAQUETAS.

ESPLANOMEGALIA Y SECUESTRO ESPLENICO. Ya se ha indicado que las plaquetas dañadas por complejos antígeno-anticuerpo son secuestradas y destruidas por el bazo normal. La situación que ahora se considera, consiste en una trombocitopenia por secuestro de plaquetas normales y no dañadas. En este caso se acepta que no es necesario ningún mecanismo inmunológico. Tal como se señaló anteriormente, el bazo aumentado de tamaño

sirve de reservorio para derivar a las células sanguíneas fuera de la circulación. Se destruyen grandes cantidades de células alteradas, como los hematíes y las plaquetas inmunológicamente dañadas después de quedar atrapadas en el bazo. Del mismo modo cuando existe esplenomegalia masiva, están atrapadas muchas células normales. También puede acelerarse la destrucción, pero esto se debe por mecanismos lisígenos normales del bazo que actúan durante prolongados períodos de tiempo sobre las células secuestradas. Consideremos este mecanismo básico de las trombocitopenias que aparecen en *la enfermedad de Gaucher, síndrome de Felty, esplenomegalia congestiva, linfosarcoma con afección esplénica predominante, tuberculosis miliar del bazo, Sarcoidosis, trastornos mieloproliferativos con esplenomegalias y septicemia con esplenomegalia.*

HIPOTERMIA. Se presenta una trombocitopenia generalmente transitoria, está ha sido tomada como causa de la diátesis hemorrágica que sigue en ocasiones a la restauración de la temperatura normal del cuerpo después de una operación quirúrgica, llevada a cabo en condiciones hipotérmicas. Se requieren de temperaturas corporales por debajo de los 25°C para bajar los niveles plaquetarios, esta reducción se debe por un incremento de adherencia y tendencia a la aglutinación.

XI.1.2.6. TROMBOCITOPENIA DEBIDA A PÉRDIDA DE PLAQUETAS.

TROMBOCITOPENIA ASOCIADA CON HEMORRAGIA Y TRANSFUSIONES MULTIPLES DE SANGRE. Aunque la hemorragia no causa por sí misma trombocitopenia, puede originarse una grave reducción de los niveles plaquetarios cuando la pérdida de sangre es compensada con grandes cantidades de sangre conservada. La gravedad de la trombocitopenia está directamente relacionada con el número de transfusiones necesarias y se presenta en todos los pacientes que reciben de 14 ó más unidades de sangre almacenada. Los estudios experimentales han demostrado que la trombocitopenia, en estas circunstancias, viene causada por la sustitución de plaquetas viables, perdidas durante la hemorragia, por plaquetas no viables contenidas en la sangre almacenada, añadida a la capacidad muy limitada de la medula ósea para incrementar bruscamente la producción de plaquetas. La persistencia de la trombocitopenia durante varios días es, posiblemente, el resultado del <<agotamiento>>de los megacariocitos o del remansamiento de plaquetas del bazo recién producidas. El desarrollo de la

trombocitopenia en los pacientes que están en tratamiento de transfusiones masivas, se evita empleando una unidad de sangre fresca en cada 5 ó 10 unidades de sangre conservada, o también administrando concentrados de plaquetas.

TROMBOCITOPENIA CON PERFUSION EXTRACORPOREA. Una reducción progresiva de los niveles plaquetarios de aproximadamente el 50% del valor preoperatorio se presenta en casi todos los pacientes que sufren una operación ayudada por perfusión extracorpórea. Ocasionalmente, la trombocitopenia es muy grave y contribuye a la diátesis hemorrágica que se presenta algunas veces después de la perfusión, en dichos pacientes, los niveles plaquetarios permanecen casi siempre bajos durante 3 a 5 días; se necesita un promedio de 7 días para la restauración de los niveles normales.

En la tabla 3. Se representa una clasificación de las trombocitopenias.

TABLA 3 . CLASIFICACION DE LAS TROMBOCITOPENIAS

- I. Debida a excesiva destrucción o secuestro
 - A. Por mecanismos inmunológicos
 - a) Púrpura trombocitopénica (PTI)
 - b) Púrpura trombocitopénica sintomática.
 - ♦ Púrpura por apronalida (Sedormid)
 - ♦ Púrpura por quinidina
 - ♦ Púrpura por quinina
 - ♦ Digitoxina
 - ♦ Derivados de la clorotiazida
 - ♦ Clorpropamida
 - ♦ Meprobamato
 - ♦ Fenilbutazona
 - ♦ Sulfonamidas
 - ♦ Antihistamínicos
 - ♦ Otras drogas
 - ♦ Púrpura trombocitopénica neonatal inmunológica
 - ♦ Púrpura trombocitopénica neonatal isoimmune
 - ♦ Lupus eritomatoso sistémico
 - ♦ Síndrome de Evans
 - ♦ Mononucleosis infecciosa
 - ♦ Otras enfermedades víricas (viruela, varicela, rubéola, sarampión, vacunación contra el sarampión, fiebre hemorrágica Thai).
 - ♦ Después de transfusión sanguínea
 - ♦ Durante tratamiento con heparina
 - B. Por esplenomegalia y secuestro esplénico
 - ♦ Enfermedad de Gaucher
 - ♦ Síndrome de Felty
 - ♦ Esplenomegalia congestiva
 - ♦ Linfomas con afectación esplénica predominante
 - ♦ Tuberculosis miliar del bazo
 - ♦ Sarcoidosis
 - ♦ Trastornos mieloproliferativos con esplenomegalia
 - ♦ Septicemia con esplenomegalia
 - C. Por secuestro no esplénico
 - ♦ Hemangiomas cavernosos(Síndrome de Kasabach-Merritt)
 - ♦ Hemangiomas múltiples
 - ♦ Coagulación intravascular diseminada, púrpura trombótica trombocitopénica, anemia hemolítica microangiopénica, etc.
 - D. por destrucción mecánica
 - ♦ Circulación extracorpórea
 - ♦ Prótesis valvulares cardíacas.
 - E. Por otros Factores
 - ♦ hemorragia masiva
 - ♦ Transfusión masiva con sangre pobre en plaquetas (almacenada)
 - ♦ Alcoholismo crónico
- II. Debidas a una falta de producción
 - A. Supresión medular de la trombocitopoyesis
 - a) Drogas potencialmente mieolotoxicas (lista parcial)
 - ♦ Antifolatos
 - ♦ Mostazas nitrogenadas
 - ♦ Cloramfenicol
 - ♦ Sales de oro
 - ♦ Dinitrofenol
 - ♦ Estreptomicina
 - ♦ Penicilina
 - ♦ DDT
 - ♦ Benzol
 - ♦ Compuestos orgánicos
 - b) Agentes físicos y animales
 - ♦ Radiaciones
 - ♦ Fiebre artificial
 - ♦ Acaloramiento
 - ♦ Quemaduras
 - ♦ Picaduras de insectos
 - c) Invasión de la médula ósea (tumores metastáticos tuberculosis miliar, linfomas, mielofibrosis, etc.)
 - d) Trombocitopoyesis defectuosa, mecanismo desconocido.
 - ♦ Anemia perniciosa
 - ♦ Hemoglobinuria paroxística nocturna
 - ♦ Prematuriedad
 - ♦ Uremia
 - ♦ Enfermedad cardíaca cianótica congénita
 - ♦ Disgenesia plaquetaria cíclica
 - e) Síndromes trombocitopenicos congénitos, neonatales o familiares
 - ♦ Síndrome de Wiskott-Aldrich
 - ♦ Anomalia de May-Hegglin
 - ♦ Síndrome de Chediak-Higashi
 - ♦ Aplasia bilateral del radio
 - ♦ Hiperglicinemia
 - ♦ Tirosinosis
 - ♦ Deficiencia congénita de trombopoyetina
 - ♦ Trombocitopenia hereditaria ligada al sexo
 - ♦ Trombocitopenia hereditaria no ligada al sexo

XI.2 TROMBOCITOSIS Y TROMBOCITEMIA.

Los términos trombocitosis y trombocitemia se aplican a los recuentos plaquetarios anormalmente elevados. Por definición se usa trombocitosis cuando la elevación del número de plaquetas es secundaria a otra enfermedad, y trombocitemia cuando ésta refleja la proliferación megacariocítica primaria. En la tabla 4 se representa una clasificación.

**TABLA 4. CLASIFICACION DE LA TROMBOCITOSIS
Y LA TROMBOCITEMIA.**

I.Trombocitosis.
A. Secundaria a reacciones inflamatorias.
♦ Fiebre reumática aguda.
♦ Artritis reumatoide.
♦ Colitis ulcerosa.
♦ Enteritis regional.
♦ Tuberculosis.
♦ Cirrosis hepática.
♦ Osteomielitis.
B. Secundaria a trastornos sanguíneos.
♦ Policitemia vera.
♦ Leucemia mieloide crónica.
♦ Mielofibrosis.
♦ Hemorragia aguda.
♦ Anemia ferropénica.
♦ Anemias hemolíticas.
♦ Trombosis de rebote.
C. Secundaria a enfermedades malignas.
♦ Carcinoma.
♦ Enfermedad de Hodgking
♦ Linfomas no hodgkinianos.
D. Postoperatoria.
E. Postesplenectomía.
F. Respuesta a la administración de Vincristina.
G. Disgenesia plaquetaria cíclica.
II.Trombocitemia

El recuento de plaquetas supera los 500 000/mm³ y puede incluso llegar a millones/mm³. Esta situación puede dar lugar a hemorragias anormales o a trombosis. Las hemorragias anormales se deben a la combinación de trombocitopatías y bloqueo de

la generación de tromboplastina. Se desconoce por qué este cuadro es predisponente de la hemorragia para ciertas personas y resulta condicionante de trombosis para otras. La liberación de grandes cantidades de fosfatasa ácida y potasio a partir de la inmensa masa plaquetaria, provoca la elevación de las concentraciones séricas de estos productos. La elevación del recuento plaquetario no suele ser tan grande en las trombocitosis reactivas como en la trombocitemia. Dado que, además, acostumbra ser transitoria, las complicaciones hemorrágicas y trombóticas son más raros. Se han descrito trombocitosis en la fiebre reumática aguda y en la artritis reumatoide, en la colitis inflamatoria crónica y en la cirrosis hepática. Se han observado trombosis secundarias a trastornos hematológicos, tales como hemorragias graves, anemia ferropénica, anemia hemolítica, y en la fase de recuperación de estados trombocitopenicos. Después de la cirugía mayor se observa a veces moderada trombocitosis, tras la esplenectomía, la aparición de trombocitosis es la regla. La administración de vincristina provoca trombocitosis por aceleración de la producción plaquetaria. En la disgenesia plaquetaria cíclica el recuento plaquetario oscila regularmente entre la trombocitopenia y la trombocitosis.

El término trombocitemia se refiere a los síndromes mieloproliferativos que presentan, como uno de sus componentes, la proliferación megacariocítica y la elevación del recuento plaquetario. Cuando el principal compartimento proliferativo es el trombocítico, se utiliza la denominación << trombocitemia esencial >>. Sin embargo, la proliferación nunca se limita exclusivamente a los megacariocitos, de manera que también quedan afectados los leucocitos. Así pues, no existe una línea divisoria clara entre la trombocitemia esencial y la trombocitemia que forma parte de un síndrome mieloproliferativo. Se han comunicado algunos casos de trombocitemia esencial en niños; algunos autores han publicado casos de respuestas de agregación defectuosa.

XI.3 TROMBASTENIA Y TROMBOCITOPATÍAS.

La clasificación de los diferentes mecanismos por los que fracasan funcionalmente, es seguramente el mayor avance que se ha conseguido en el campo de la hemostasia y patología. La clasificación se encuentra en la tabla 5.

TABLA 5. CLASIFICACION DE LOS TRASTORNOS PLAQUETARIOS FUNCIONALES

I. Trombastenia
II. Trombocitopatias
A) Enfermedad de pool de almacenamiento
♦ Disminución de la liberación de los nucleótidos
♦ Disminución del contenido de nucleótidos
♦ Disminución de la liberación de FP3.
B) Síndrome de Bernard-Soulier
C) Trombocitopenia trombopática
D) Síntesis de prostaglandinas anormal
♦ Deficiencia congénita de ciclooxigenasa
♦ Deficiencia congénita de tromboxanosintetasa
♦ Deficiencia congénita de fosfolipasa
E) Defecto de los cofactores plasmáticos
♦ Afibrinogenemia congénita
♦ Enfermedad de von Willebrand
♦ Ausencia congénita de otros factores plasmáticos
♦ Ausencia de calcio ionizado
F) Defecto del metabolismo de los nucleótidos
G) Inducidas por fármacos
♦ Inhibidores del metabolismo de las prostaglandinas
♦ Estimuladores del sistema cAMP.
H) Patogénesis no definidas

TROMBASTENIA. Glanzmann describió un trastorno hemorrágico caracterizado por insuficiente retracción del coágulo. Propuso que el trastorno se debía a algún defecto de la función plaquetaria, y lo denominó << trombastenia >>. La clasificación de la trombastenia se basa en las siguientes características:

1. Recuento plaquetario normal.
2. Tiempo de hemorragia prolongado
3. Escasa o nula retracción del coágulo.

4. Retención plaquetaria anormal.

5. Agregación pobre o nula con colágeno, ADP, adrenalina, trombina, y ristocetina.

Es una anomalía plaquetaria desconcertante, pues las plaquetas expuestas al ADP desarrollan los cambios morfológicos habituales y también es normal la liberación de factores a pesar de la falta de agregación. La retracción del coágulo es nula o escasa únicamente en la trombostenia. La anomalía más importante es la ausencia de glicoproteína II de la superficie plaquetaria. Algunas investigaciones señalan que las plaquetas experimentan en este trastorno la disminución de la cantidad de trombostenina. Quizás este trastorno sea el responsable de la falta de respuesta plaquetaria ante los productos normales liberados.

ENFERMEDAD DE POOL DE ALMACENAMIENTO. Se trata de la primera de numerosas anomalías funcionales plaquetarias congénitas o adquiridas que se denominó trombopatía para distinguirla de la trombostenia, teniendo en cuenta que ésta cursa con disminución o ausencia de la retracción del coágulo y falta de agregación por cualquiera de los agentes habituales, incluida la ristocetina.

Datos recientes indican que las trombopatías caracterizadas por una reacción de liberación anómala constituyen un grupo heterogéneo y se reserva el término de << enfermedad del pool de almacenamiento >> para el caso que presenta una deficiencia del ADP asociada con los gránulos densos. Los cuerpos densos contienen normalmente una porción de ADP/ATP en la enfermedad del pool de almacenamiento, la reducción de ADP hace que esta fracción disminuya.

En la enfermedad del pool de almacenamiento, el recuento plaquetario es normal, el tiempo de hemorragia presenta una prolongación variable y existe un defecto de agregación plaquetaria con colágeno, epinefrina y trombina. La adición de ADP produce sólo una pequeña onda primaria. A veces se observa una disminución del PF3 disponible. Si el contenido de ADP es normal pero falla la reacción de liberación, se observa una disminución de la agregación plaquetaria con colágeno, epinefrina y trombina, y una respuesta bastante normal al ADP añadido. En ambos casos la adhesividad plaquetaria suele estar disminuida.

SINDROME DE BERNARD-SOULIER. Bernard y Soulier describieron un síndrome constituido por un prolongado tiempo de hemorragia, anormal consumo de protrombina y plaquetas gigantes. Las características que presenta son trombocitopenia moderada, prolongación del tiempo de hemorragia, y retracción del coágulo. La disponibilidad del

PF3 es pobre cuando se mide por la prueba de consumo de protrombina pero normal por el método de caolín. La adhesividad plaquetaria está disminuida. Algunas plaquetas son muy grandes, pues alcanzan un tamaño similar al de los linfocitos. Además la granulación central densa puede conferirles un aspecto seudonucleado. Las plaquetas no se agregan mediante fibrinógeno bovino, ni con ristocetina. La anomalía de agregación con ristocetina no se corrige añadiendo plasma normal, lo cual sugiere que las plaquetas en este síndrome carecen de receptor para el factor de Von Willebrand. La lesión plaquetaria consiste en la ausencia de una glicoproteína de membrana distinta de la que falta en la trombostenia.

TROMBOCITOPENIA TROMBOPATICA. Se parece el síndrome de Bernard-Soulier en que también hay trombocitopenia y plaquetas gigantes. Es una enfermedad rara en donde se señala una deficiente agregación con colágeno y escasa disponibilidad del PF3. Los estudios de las ultraestructuras, han demostrado deficiencia de gránulos plaquetarios.

ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND Y VARIANTES. El caso clásico de enfermedad de Von Willebrand debe reunir las siguientes características:

1. Un tiempo de hemorragia prolongado.
2. Una adhesividad plaquetaria defectuosa.
3. Una agregación normal de las plaquetas por el colágeno, el ADP, la epinefrina y la trombina, pero anormal por la ristocetina.
4. Niveles muy bajos de factor VIII: C actividad antihemofílica o actividad procoagulante, VIII: Ag actividad antigénica, VIII: vW actividad ausente en la enfermedad de Von Willebrand. (john miale)

AFIBRINOGENEMIA CONGENITA. La afibrinogenemia congénita provoca dos trastornos hemostáticos: uno debido a la falta de formación de fibrina; u otro, por la disfunción plaquetaria. Tal como se ha señalado, es indispensable el fibrinógeno para que se produzca la agregación normal con ADP y la adhesión plaquetaria. Se demuestra defecto de la agregación *in vitro* si el índice de fibrinógeno es inferior a 15mg/dl y cuando se utilizan concentraciones bajas de ADP.

TROMBOCITOPATIAS ASOCIADAS CON ENFERMEDADES O SINDROMES ESTABLECIDOS. Se han descrito disfunciones plaquetarias leves, moderadas y graves, en la anomalía de May-Hegglin, en el síndrome de Wiskott-Aldrich, en el síndrome de Ehlers-Danlos y otros trastornos del tejido conjuntivo, en el albinismo y en la trombocitopenia con agenesia de radio y en la enfermedad por almacenamiento de glicógeno I.

FALTA DE AGREGACION INDUCIDA POR EL COLAGENO. Se han descrito algunos casos de falta de agregación por el colágeno en donde el colágeno del paciente reaccionaba anormalmente con las plaquetas normales.

TROMBOCITOPATIA ADQUIRIDA DEBIDA A DROGAS. Se sabe que muchas drogas afectan a la función plaquetaria. En la tabla 6. Se indican algunas de las que se utilizan más a menudo.

TABLA 6. Lista parcial de fármacos que inhiben la función plaquetaria.

1. Aspirina
2. Fenilbutazona (Butazolidina)
3. Ibuprofeno
4. Indometacina
5. Dipyridamol
6. Propranolol
7. Antihistamínicos
8. Teofilina
9. Clofibrato
10. Fenotiazinas
11. Antidepresivos cíclicos

12. Colchicina
13. Furosemida
14. Nitrofurantoina
15. Penicilinas
16. Gentamicina
17. Corticosteroides
18. Hidracinofalazina
19. Litio

La aspirina, que es la droga más frecuentemente usada, se inhibe considerablemente la agregación plaquetaria después de una dosis oral de 60 a 300 mg. Se debilita la agregación con colágeno y trombina, mientras que con ADP y adrenalina desaparece la onda secundaria. Se ha señalado que el efecto de la aspirina se debe al descenso de la liberación de ADP plaquetario no metabólico y serotonina, así como factores 3 y 4 plaquetarios. La ingestión de aspirina provoca la prolongación del tiempo de hemorragia, pero no afecta la retención sobre las bolas de cristal. Es probable que el efecto sea mediado por el cAMP, de manera que se interfiere el metabolismo de las prostaglandinas. El efecto inhibitorio de la aspirina se prolonga paralelamente a la vida media plaquetaria, de tal forma que es detectable varios días después de haberla ingerido.

DEFICIENCIAS ENZIMATICAS CONGENITAS. Junto con las deficiencias enzimáticas adquiridas producidas por fármacos, se han comunicado algunos casos de deficiencias congénitas de enzimas activos en el metabolismo de las prostaglandinas. Se ha identificado una deficiencia de la ciclooxigenasa plaquetaria como causa de una reacción de liberación anormal.

TROMBOCITOPATIA ADQUIRIDA SECUNDARIA A OTRAS ENFERMEDADES.

La uremia va acompañada de muchos trastornos hemostáticos, dos de los cuales, la trombocitopenia y la trombocitopatía son de gran importancia. Se han descrito trombocitopatías asociadas a varios trastornos mieloproliferativos (leucemia mieloide crónica, mielofibrosis, policitemia vera y trombocitemia). Se ha detallado trastornos de la función plaquetaria en la cirrosis hepática, en el lupus eritomatoso diseminado, en la anemia perniciosa, en el escorbuto y en las inmunoglobulinopatías.

XI.-JUSTIFICACIÓN

Esta tesis fue elaborada pensando en todo aquel estudiante o profesor interesado en el tema de las plaquetas tratando de proporcionarles la información suficiente para cumplir el objetivo planteado, que es dar a conocer los conceptos más actuales sobre su morfología, bioquímica, función, patologías, y pruebas para el diagnóstico.

Ya que está, se encuentra de forma limitada, repetitiva, y muy dispersa en la literatura, tratamos de conjuntar toda esa información para darle una estructura, que proporcione un fácil acceso a lo que es tema de las plaquetas.

BIBLIOGRAFIA

1. Alarcon PA, Graeve JLA. Analysis of megakaryocytes ploidy in fetal bone marrow biopsies using a new adaptation of the megakaryocyte ploidy from biopsy specimens. *Pediatr Res.* 1996;39:166-170.
2. Alarcon PA, Graeve JLA. Megakaryocytopoiesis in the human fetus. *Arch Dis in Childhood.* 1989;64:481-484.
3. Andrews RK, Fox JEB. Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J Biol Chem.* 1992;267:18605-18611.
4. Andrieux A, Hudry-Clergeon G, Ryckewaert J-J, et al. Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIb-IIIa. *J Biol Chem.* 1989;264:9258-9265.
5. Asch AS, Adelman B, Fujimoto M, Nachman RL. Identification and isolation of a platelet GPIb-like protein in human umbilical vein endothelial cells and bovine aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1988;81:1600-1607.
6. Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest.* 1987;79:1054.
7. Asch AS, Liu I, Briccetti FM, et al, Analysis of CD36 binding domains ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science.* 1993;262:1436-1440.
8. Bastida E, Ordinas A, Giardina SL, Jameison GA. Differentiation of platelet - aggregating effects of human tumor cell lines based on inhibition studies with apyrase, hirudin, and phospholipase. *Cancer Res.* 1982;42:4348-4352.
9. Beacham DA, Cruz MA, Handin RI: Glycoprotein Ib can mediate endothelial cell attachment to a von Willebrand factor substratum. *Thromb Haemost.* 1995;73:309-317.
10. Beacham et al. Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS) binding site in Von Willebrand factor by site-directed mutagenesis. *J BIOL Chem.* 1992;267:3409-3415.
11. Behnke O. Coated pits and vesicles transfer plasma components to platelet granules. *Thromb Haemostas.* 1989;62:718-722.

12. Behnke O. Degrading and non-degrading pathways in fluidphase (non-adsorptive) endocytosis in human blood platelets. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1992;24:169-178.
13. Bennett JS. The molecular biology of platelet membrane proteins *Sem Hematol.* 1990;27:186-204.
14. Bentfeld-Barker ME, Bainton DF. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelet. *Blood.* 59:472-481,1982.
15. Berger G, Masse J-M, Cramer EM. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX and V. *Blood* 87:1385-1395,1996.
16. Berioge MV; Ralph SJ, Tan AS. Cell-lineage antigens of the stem cell-megakaryocyte- platelet lineage are associated with the platelet IIb-IIIa glycoprotein complex. *Blood.* 1985,66:76-85.
17. Berndt MC, Phillips DR. Purification and preliminary physicochemical characterization of human platelet membrane glycoprotein V. *J Biol Chem.* 1981,256:59-65.
18. Berndt MC, Ward CM, De Luca M et al. The molecular mechanism of platelet adhesion. *Aust N Z J Med.* 1995;25:822-830.
19. Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR: The inverse relation of platelet size and count in normal subjects and an artifact of other particles. *Am J Clin Pathol* 76:289, 1981.
20. Beumer S, Ijsseldijk MJ, et al. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood.* 1994;84:3724-3733.
21. Bevers EM, Tilly RHJ, Senden JMG, et al: Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelet is reversed by restoration of aminophospholipid translocase activity. *Biochemistry* 282:382,1989.
22. Block KL, Poncz M. Platelet glycoprotein IIb gene expression as a model of megakaryocyte-specific expression. *Stem Cells* 1995;13:135-145.
23. Blomback B. Fibrinogen structure, activation, polymerization and fibrin gel structure. *Thromb Res.* 1994;75:327-328.
24. Bodwitch et al. Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. Differential utilization by beta-3-integrins. *J Biol Chem.* 1994;269:10856.

25. Boukerche H, Berthier- Vergnes O, Penin F, et al. Human melanoma cell lines differ their capacity to release ADP and to aggregate platelet. *Br j Haematol.* 1994;87:763-772.
26. Boyles J , Fox JEB, Phillips DR, Stenberg PE. Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelet: preservation of actin filaments by a modified fixation that prevent osmium damage. *J Cell Biol* 101:1463-1472, 1985.
27. Brass LF, Pizzarro S, Ahuja M, et al. Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during activation, internalization and recycling. *J Biol Chem.* 1994;269:2943-2952.
28. Bray PF, Rosa JP, Johnston GI, et al. Platelet glycoprotein IIb. Chromosomal localization and tissue expression. *J Clin Invest.* 1987;80:1812-1817.
29. Breton-Gorius J. On the alleged phagocytosis by megakaryocytes. *Br J Haematol* 1981;47:635-636.
30. Breton-GoriusJ, Clezardin P, Guichard J , et al. Localization of platelet osteoactin at the internal face of the alpha-granule membranes in platelet and megakaryocytes. *Blood* 79:936-941,1992.
31. Breton-GoriusJ, VainchenkerW, Nurden A, et al. Defective alpha-granule production in megakaryocytes from gray platelet syndrome. *Am J Pathol.* 1981;102:10-19.
32. Bricker LJ, Zucker,an KS, Serotonin uptake by progeny of murine megakaryocyte precursors (CFU-M) in vitro. *Exp Hematol.* 1984;12:672-675.
33. Briddell RA, Bradt JE, Straneva JE, et al, Characterization of the human burst-forming unit. Megakaryocyte. *Blood.* 1989,74.145-151.
34. Briddell RA, Hoffman R,. Cytokine regulation of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood.* 1990,76.516-522.
35. Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G: A family of small inducible proteins secreted by leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol* 142:679, 1989.
36. Burstein SA, Adamson JW, Erb SK, Harker LA: Megakaryocytopoiesis in the mouse: response to varying platelet demand. *J Cell Physiol* 109:333. 1981.
37. Burstein SA, Adamson JW, ErbSK, Harker LA. Megakaryocytopoiesis in the mouse response to varying platelet demand. *J Cell Physiol.* 1981;109:333-341.

38. Casella JF, Flanagan MD, Lin S. Cytochalasin D inhibits actinpolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* 293:302-305.
39. Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, et al. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood*. 1981;57:781-787.
40. Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre a. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-triphosphato receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem*. 1996;271:5545-5551.
41. Cavanaugh PG, Sloane BF. Role of the coagulation system in tumor cell.induced platelet aggregation and metastasis. *Haemostasis*. 1988;18:37-46.
42. Cierniewski CS, Haas TA, Smith JW, Plow EF, Characterization of cation-binding sequences in the platelet integrin GPIIb-IIIa by terbium liminescence. *Biochemistry*.1994;33:12238-1226.
43. Clark EA, Brugge Js. Redistribution of activated pp60src to integrin-dependet cytoskeletal complexes in thrombin-stimulated platelet. *Mol Cell Biol*. 1993;13:1863-1871.
44. Clezardin P, Malaval L. Morej MC, et al. Osteonectin is an alpha-granule component involved with thrombospondin in platelet aggregation. *J Bone Miner Res* 1991;6:1059-1070.
45. Coler BS. Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Ann NY Acad Sci* 416:693-708,1984.
46. Coller BS, Anderson K, Weisman HF. New antiplatelet agents: Platelet GPIIb/IIIa antagonists. *Thromb Haemost*. 1995,74:302-308.
47. Coller BS. A new murine monoclonal antibody reports an activation-dependent change in the conformation and/or microenviroment of the platelet Iib/IIIa complex. *J Clin nvest*. 1985;76:101-108.
48. Confurius P, Bevers EM, Zwaal RFA: The involvement of cytoeskeleton i the regulation of transbilayer movement of phospholipids in human blood platelet. *Biochim Biophys Acta* 815:143, 1985.
49. Cook NS, Kottirsch G, Zewes HG,. Platelet glycoprotein Iib/IIIa antagonist. *Drugs Future*. 1994,19:135-159.

50. Corash L, Levin j, Mok et al. Measurement of megakaryocyte frequency and ploidy distribution in unfractionated murine bone marrow. *Exp Hematol.* 1989;17:278-286.
51. Corash L. The relationship between megakaryocyte ploidy and platelet volumen. *Blood Cells.* 1989;15:81-107.
52. Coughlin SR. Molecular mechanisms of thrombin signaling. *Semin Heamatol.* 1994,31:270-277.
53. Cox D, Aoki T, Seki J , et al. The pharmacology of integrins. *Med res Rev.* 1994,14.195-228.
54. Cramer EM, Berger G, Berndt MC. Platelet alpha-granule and plasma membrane share two new components: CD9and PECAM-1. *Blood* 84:1722-1730,1994.
55. Cramer EM, Debili N, Martin Jf, et al. Uncoordinated expression of fibrinogen compared with thrombospondin and von Willebrand factor in maturing human megakaryocytes. *Blood* 73:1123-1129,1989.
56. Cramer EM, Lu H, Caen JP, et al. Differential redistribution of platelet glycoproteins Ib and IIb-IIIa after plamin stimulation .*Blood.* 1991,77:694-699.
57. Cramer EM, Masse J-M, Caen JP, et al. Effect of thrombin onmaturing human megakaryocytes. *Am j Path.* 1993,143:1498-1508.
58. Cramer EM, Meyer D, Menn RL, Breton-Gorius I. Eccentric localization of von Willebrand factor in a an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood* 66:710-713,1985.
59. Cramer EM,Savidge GF, Vainchenker W et al. Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelet and megakaryocytes. *Blood*75:1220-1227,1990.
60. Chen YQ, Ghao X, Timar J, et al. Identification of the alfa-IIb-beta 3 integrin in murine tumor cells. *J Biol Chem.* 1992;267.17314-17320.
61. Cheresch DA, Berliner SA, Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelet and endothelial cells.*Cell.* 1989;58:945-953.
62. Chernoff A, Levine RF, Goodman DS. Origin of platelet-derived growth factor in megakaryocytes in guinea pigs. *J Clin Invest.* 1980;65:926-930.
63. Chiang TM, Jin A, Kang AH. Platelet-collagen interaction. Inhibition by a monoclonal antibody raised against collagen receptor. *J Immunol.* 1987,139:887-892.

64. Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Res.* 1988;2:108-114.
65. Chow TW, Hellums JD, Moak HJ, Kroll MH. Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood.* 1992;80:113-120.
66. Da Prada M, Richards JG, Kettler R. Amine storage organelles in platelet. In: Gordon JL, ed Platelet biology and Pathology. Cambridge: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1981;107-145.
67. Daimon T, David H. An automatic image analysis of megakaryocytes in fetal liver and adult bone marrow. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1982;3:454-460.
68. Daimon T, David H. Precursors of monoamine-storage organelles in developing megakaryocytes of the rat. *Histochem.* 1983;77:353-363.
69. Debili N, Issaad C, Masse JM, et al. Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. *Blood.* 1992;80:3022-3035.
70. Debili N, Kieffer N, Nakazawa M, et al. Expression of platelet glycoprotein Ib by cultured human megakaryocytes: ultrastructural localization and biosynthesis. *Blood.* 1990;76:368-376.
71. Debus E, Weber K, Osborn M. The cytoskeleton of blood platelet viewed by immunofluorescence microscopy. *Eur J Cell Biol* 24:45-52, 1981.
72. Dhar A, Shukla SD. Involvement of pp60c-src in platelet-activating factor-stimulated platelets. Evidence for translocation from cytosol to membrane. *J Biol Chem.* 1991;266:18797-18801.
73. D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, et al. Localization of an arg-gly-asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science.* 1988;242:91-93.
74. D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Plow EF. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its α subunit. *J Biol Chem.* 1990;265:3440-3446.
75. Du X, Fox JE, Pei S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib- α . *J Biol Chem.* 1996;271:7362-7367.
76. Du X, Gu M, Weisel JW, et al. Long range propagation of conformational changes in integrin α -IIb- β 3. *J Biol Chem.* 1993;268:23087-23092.

77. Duperray A, Troesch A, Berthier R, et al. Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: Evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of complex on the cell surface. *Blood*. 1989;74:1603-1611.
78. Enrique Iovine. *El laboratorio en el diagnóstico en la enfermedad*. Ed. Medica Panamericana. 1985. Buenos Aires.
79. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Assoc Sci*. 1992;89:10729-10732.
80. Fava RA, Casey TT, Wilcox J, et al. Synthesis of transforming growth factor beta-1 by megakaryocytes and its localization to megakaryocyte and platelet alpha-granules. *Blood* 76:1946-1955, 1990.
81. Felding-Haberman B, Chesh DA. Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:864-868.
82. Fitzgerald LA, Poncz M, Steiner B, et al. Comparison of cDNA-derived protein sequences of the human fibronectin and vitronectin receptor alpha subunits and platelet glycoprotein IIb. *Biochemistry*. 1987;26:8158-8165.
83. Fox JE: The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 70:884, 1993
84. Fox JEB, Berndt MC. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of glycoprotein Ib inhibits collagen-induced polymerization of actin in platelet. *J Biol Chem*. 1989;264:9520-9526.
85. Fox JEB, Boyles JK, Berndt MC. Identification of a membrane skeleton in platelet, *J Cell Biol*. 1988;106:1525-1538.
86. Fox JEB, Boyles JK, Reynolds CC, Phillips DR. Actin filament content and organization in unstimulated platelet. *J Cell Biol* 98: 1985-1991, 1984.
87. Fox JEB, Lipfert L, Clark EA, et al. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. *J Biol Chem*. 1993;268:25973-25984.
88. Fox JEB, Phillips DR. Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelet. *J Biol Chem*. 257:4120-4126, 1982.
89. Fox JEB. Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelet. Identification of one of the glycoproteins as glycoprotein Ib. *J Clin Invest*. 76:1673-1683, 1985.

90. Fox JEB. Regulation of platelet function by the cytoskeleton. In: Authi KS et al; eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York:Plenum Press 175.185, 1993.
91. Fox JEB: Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelet. Identification of one the glycoproteins as glycoprotein Ib. *J Clin Invest* 76:1673, 1985
92. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Vagner DD. Platelet roll on stimulates endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc natl Acad Sci*. 1995;92:7450-7454.
93. Gartner TK, Gerrard JM, White JG, Williams DC. The endogenous lectin of human platelet is an alpha-granule component. *Blood* 58:153-157,1981.
94. Gartner TK, Ogilvie ML. Peptides and monoclonal antibodies which bind to platelet glycoprotein IIb and /or IIIa inhibit clot retraction. *Thromb Res*. 1988;49:43.
95. Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, et al . Ligand bringing mediates integrin alpha-IIb-beta3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest*. 1991;88:1128-1134.
96. Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, et al . Ligand bridging mediates integrin platelet GPIIb-IIIa dependent homotypic and heterotypic cell-interactions. *J Clin Invest*. 1991;88(4):1128-1134..
97. George JN, , Saucerman S, Levine SP, Kmeriem LK. Immunoglobulin G is a platelet alpha granule-se reted protein. *J Clin Invest*. 76:2020-2025,1985.
98. George JN, Pickett EB, Saucerman S et al : Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelet and platelet membrane microparticles in normal subjects, and onservations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac sugery. *J Clin Invest* 78:340, 1986.
99. George JN, Platelet immunoglobulin G: Its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood*. 1990,76:859-870.
100. George JN. Platelet immunoglobulin G: significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood*. 1990;76:859-870.

101. Gerrard JM, Lint D, Sims PJ, et al. Identification of a platelet dense granule membrane protein that is deficient in a patient with the Hermansky-Pudlak Syndrome. *Blood*. 1991;77:101-112.
102. Gewirtz AM, Keefer M, Doshi K, et al. Biology of human megakaryocyte Factor V. *Blood*. 1986;67:1639-1648.
103. Gewirtz AM, Schick B, Megakaryocytopoiesis. In : Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practise*. 3rd. Ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1994:353-396.
104. Giles C: The platelet count and mean platelet volume. *Br J Haemost*. 48:31,1981.
105. Ginsberg MH, Taylor L, Painter RG: The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. *Blood* 55:661, 1980.
106. Ginsburg D, Konkle BA, Gill JC, et al : Molecular basis of human von Willebrand disease: analysis of platelet von Willebrand factor mRNA. *Proc natl Acad Sci USA* 86:3723, 1989.
107. Girma JP, Meyer D, Verweij CL, et al. Structure.function relationship og human von Willebrand factor.*Blood*. 1987;70:605-611.
108. Gogstad GO. A method for the isolaton of a alpha-granules from human platelet. *Thromb Res* 1980;20:669-681.
109. Greco NJ, Tandon NN, Jones GD, et al. Contributions of glycoprotein Ib and the seven transmembrane domain receptor to increases in platelet cytoplasmic Ca²⁺ inducedby alpha-thrombin .*Biochemistry*.1996;35:906-914.
110. Gulino D, Boudignon C, Zhang L, et al. Calcium binding properties of the platelet GPIIb ligand interacting domain. *J Biol Chem*. 1992;267:1001-1007.
111. Handagama P, Rappolee DA, Werb Z, et al. Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J Clin Invest. K* 1990;86:1364-1368.
112. Handagama P, Scarborough RM, ShumanMA, Bainton DF. Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granule is mediated glycoprotein IIB-IIIa. *Blood*. 1993;82:135-138.

113. Handagama P, Bainton DF, Jacques Y, et al. Kistrin, an integrin antagonist, blocks endocytosis of fibrinogen into guinea pig megakaryocyte and platelet alpha-granules. *J Clin Invest.* 1993;91:193-200.
114. Handagama PJ, George JN, Shuman MA, et al. Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc Natl Acad Sci.* 84:861-865, 1987.
115. Handagama PJ, Feldman BF, Jain NC, et al. Circulating proplatelets. Isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss. *Am J Vet Res.* 1987;48:962-965.
116. Handagama PJ, Shuman MA, Bainton DF. Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G, and fibrinogen in guinea pig megakaryocyte granule. *J Clin Invest.* 84:73-82, 1989.
117. Harmon JT, Jameison GA. Activation of platelet by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. *J Biol Chem.* 1986;261:15928-15933.
118. Harrison P, Savidge GF, Cramer Em. The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br J Haematol.* 74:125-130, 1990.
119. Harrison P, Wilboyrn B, Debili N, et al. Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelet. *J Clin Invest.* 84:1320-1324, 1989.
120. Harrison P, Wilboyrn B, Cramer E. The influence of therapeutic blocking of GPIIb/IIIa on platelet alpha-granular fibrinogen. *Br J Haematol* 1992,82:721-728.
121. Harrosin P, Wilbourn B, Delhili N, et al. Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocyte and platelet. *J Clin Invest.* 1989;84:1320-1324.
122. Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J: The elegant platelet: signals controlling actin assembly. *Thromb Haemost* 82:392, 1999.
123. Hartwig JH, DeSisto M. The cytoskeleton on the resting human attachment to actin filaments. *J Cell Biol.* 1991;112:407-425.
124. Hartwig JH. Mechanism of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol.* 118:1421-1442.
125. Hartwig JH: Platelet morphology, in *Thrombosis and Hemorrhage*, 2nd ed, Loscalzo J, Schafer ai (edotors). P 207, Williams & Wilkins, Baltimore, 1999.

126. Hayward CPM, Faurmaniak-Kazmierczak E, Cieutat AM, et al. Factor V is complexed with multimerin in resting platelet alpha-granule. *Blood*. 270:19217-19224,1995
127. Hayward CPM, Bainton DF, Smith JW, et al. Multimerin is found in the alpha-granule of resting platelet and synthesized by a megakaryocytic cell line. *J Clin Invest* 91:2630-2639,1993.
128. Heart & Stroke A-Z Guide, *American Heart Association*, 1996.
129. Hegyi E, Nakeff A. Ultrastructural localization of platelet factor 4 in rat megakaryocytes and platelet by gold-labeled antibody detection. *Exp Hematol* 17:223-228,1989.
130. Hegyi eE, Nakazawa M, Debili N et al. Developmental changes in human megakaryocytes ploidy. *Exp hematol*. 1991,19:87-94.
131. Heilmann E, Houedille P, Pruvost A, et al. Thrombin-induced platelet aggregates have a dynamic structure: Time- dependent redistribution of GPIIb/IIIa complexes and secreted adhesive proteins. *Arterioscler Thromb* 11:704-718,1991.
132. Hettasch JM, Bolyard MG, Lord ST. The residues AGDV of recombinant gamma chain of human fibrinogen must be carboxy-terminal to support human platelet aggregation. *Thromb Haemost*. 1992;68:701-706.
133. Hickey MJ, Hagen FS, Yagi M, Roth GJ. Human platelet glycoprotein V: characterization of the polypeptide and the related Ib-V-IX receptor system of adhesive, leucine-rich glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:8327-8331.
134. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. N: Colman RW, J Hirsh, VJ Marder and EW Salzman, eds *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practise*. Philadelphia: J B Lippincott Company, 1994:524-545.
135. Holmsen h. Significance of testing platelet functions *in vitro*. *Eur J Clin Invest*. 1994;24:3-8.
136. Holmsen H: Platelet secretion and energy metabolism,*in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, edited by RW Colma, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman, 3rd ed, p 524, JB Lippincott, Philadelphia, 1993.

137. Holt JC, Rabellino EM, Gewirtz AM, et al. Occurrence of platelet basic protein a precursor ,of low affinity platelet factor 4 and b-thrombospondin, in human platelet and megakaryocytes. *Exp Hematol.* 1988;16:302-306.
138. Honn Kv, Grossi IM, Diglio CA, et al. Enhanced tumor cell adhesion to the subendothelial matrix resulting from 12(S)HETE-induced endothelial cell retraction. *FASEB J.* 1989;3:2285-2293.
139. Horsewood P, Hayward CPM, Warkentin TE, Kelton Jg. Investigation of the mechanisms of monoclonal antibody- induced platelet activation. *Blood.* 1991;78:1019-1026.
140. Hourani SMO, Cusack N. Pharmacological Receptors on Blood Platelet. *Pharmacol Rev.* 1991;43:243-298.
141. Hourani SMO, Hall DA. Receptor for ADP on human blood platelet. *TIPS.* 1994;15:103-108.
142. Hourdille P, Benabdallah S, Belloc F, Nurden AT. Distribution of glycoprotein IIb-IIIa complexes in the surface membranes of human platelet and megakaryocytes. *Br J Haematol.* 1985;59:171-182.
143. Hourdille P, Fialon P, Belloc F, et al. Megakaryocytes from the marrow of a patient with Glanzmann's thrombasthenia lacked GpIIb-IIIa complexes. *Throm Haemost.* 1986;56:66-70.
144. Hourdille P, Fialon P, Belloc F, et al. Mepacrine labelling test and uranaffin cytochemical reaction in human megakaryocytes. *Throm Haemost.* 1982;47:232-235.
145. Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, et al. Internalization and recycling of activated thrombin receptor. *J Biol Chem.* 1993;268:9780-9786.
146. Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, et al. Membrane glycoprotein IV is physically associated with the fyn, lyn, and yes protein tyrosine kinases in human platelet. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88:7844-7848.
147. Ishii K, Hein Kobilka B, Couhlin SR. Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells; Relation to signaling. *J Biol Chem.* 1993;268:9780-9786.
148. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140) *Blood* 80:143-152, 1992.

149. Ittyerah BR, Rawala R, Colman RW. Immunochemical studies of factor V of bovine platelet. *Eur J Biochem* 1981;120:235-241.
150. Jackson CW, Hutson NK, Steward SA, et al. The Wistar Furth rat: an animal model of hereditary macrothrombocytopenia. *Blood*.1988,71:1676-1686
151. Jackson CW, Hutson NK, Steward SA, Stenberg PE. A unique talin antigenic determinant and anomalous megakaryocyte talin distribution associated with abnormal platelet formation in the Wistar Furth rat. *Blood*. 1992,79:1729-1737.
152. Jaffe EA, Leung LLK, Nachman RL, et al. Thrombospondin is the endogenous lectin of human platelet. *Nature* 295:246-248,1982.
153. Jackson CW,. Megakaryocyte endomitosis: A review. *Int J Cell Cloning*.1990,8.224-226.
154. Jeanneau C, Avner P, Sultan Y. Use of monoclonal antibody and colloidal gold in E:M: localization of von Willebrand factor in megakaryocytes and platelet. *Cell Biol Int Rep*. 8:841-848,1989.
155. Jenkins RB, Nichol WL, Mann KG, Lawrence A, Solberg J. CFU-M-derived human megakaryocytes synthesize glycoproteins IIb and IIIa .*Blood*. 1986;67.682-688.
156. Jennings LK, Fox JEB, Edwards HH, Phillips DR. Changes in the cytoskeletal of human platelet following thrombin activation. *J Biol Chem* 256:6927-6932, 1981.
157. Jennings LK, Phillips DR.Purification the glycoprotein IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex.*J Biol Chem*.1982;257(17).10458-10466.
158. Jennings LK, Wilkinson Da, Crossno JT Jr. CD9 is a cell adhesion molecule on human platelet. *Blood*. 1995,86.282.
159. John B. Miale. M.D. *Hematologia, Medicina del Laboratorio*.Ed. Reverté, 1985.
160. Kannan K, Divers SG, Lurie AA, et al. Cell surface expression of lysosome-associated membrane protein-2(lamp2) and CD63 as markers of in vivo platelet activation in malignancy. *Eur j Haematol*.1995;55:145-151.
161. Kanz L, Mielke R, Fauser A A. Analysis of human hemopoitic progenitor cells for the expression of glycoprotein IIIa. *Exp Hematol*. 1988,16.741-747.

162. Karlsson R, Lassing I, Hoglund A-S, Lindberg U. The organization of microfilaments in spreading platelet: a comparison with fibroblasts and glial cells. *J Cell Physiol.* 121:96-113,1984.
163. Kawahara RS, Deuel TF: Platelet-derived growth factor-inducible gene JE is a member of a family of small inducible genes related to platelet factor 4. *J Biol Chem* 264:679, 1989.
164. Keely PJ, Parise LV. The alpha-2-beta-1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of PLC-gamma-2 in platelet. *J Biol Chem.* 1996;271:26668-26676.
165. Kehrel B, Kronenberg a, Rauterberg J, et al. Platelet deficient in glycoprotein IIIb aggregate normally to collagen type I and III but not to collagen type V. *Blood.* 1993;82:3364-3370.
166. Kenney DM, Lick RW: The cytoskeleton of unstimulated blood platelet: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J Cell Sci* 78:1, 1985
167. Kirchhofer D, Languino L, Ruoslahti E, Pierschbacher MD. Alpha2-beta1 integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem.*1990;265:615-618.
168. Klinger MHF, Kluter H. Immunocytochemical colocalization of adhesive proteins with clathrin in human blood platelets: further evidence for coated vesicle-mediated transport of Von Willebrand factor, fibronogen and fibronectin. *Cell Tissue Res* 1995;279:453-457.
169. Kloczewiak M. Timmons ST, Lukas TJ, Hawiger J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry.* 1984;23:1767-1774.
170. Knezevic I, Leiser TM, Lam SC-T. Direct-binding of the platelet integrin GPIIb-IIIa to talin. *J Biol Chem.* 1996;271:16416-16421.
171. Kolanus W, Romeo C, Seed B. T cell activation by clustered tyrosine kinase. *Cell.* 1993;74:171-183.
172. Konkle BA. Shapiro SS, Asch AS, Nachman RL. Cytokine-enhanced expression of glycoprotein Ib-alpha in human endothelium. *J Biol Chem.* 1990;265:19833-19838.

173. Kouns WC, Fox CF, Lamoreaux WJ, et al. The effect of glycoprotein IIb-IIIareceptor occupancy on the cytoskeleton of resting and activated platelet. *J Biol Chem* . 1991;266:13891-13900.
174. Krishnamurthi S, Westwick J, Kakkar VV.Regulaton of human platelet activation-analysis of ciclooxygenase and ciclin AMP-dependent pathways. *Biochem Pharmacol*. 1984;33:3025-3035.
175. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, et al. Von Willebrand factor binding to platelet GPIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest*. 1991;88:168-173.
176. Kudcki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins . *Blood*. 1992;80:1386-1404.
177. Lange W, Luig A, Dolken G et al. Fibrinogen gama-chain mRNA is not detected in human megakaryocytes. *Blood*. 1991;78:20-25.
178. Lanza F, Beretz a, Stierle A, et al. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol*. 1988,255:H1276-H1288.
179. Lanza F, Morales M, de la Salle C, et al. Cloning and characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. A member of the leucine-rich glycoprotein family cleaved during thrombin-induced platelet activation. *J Biol Chem*. 1993,268.20801-20807.
180. Lee KP, Emperipolexis of hematopoietic cells within megakaryocytes in bone marrow of the rat. *Vet Pathol*. 19879;26:473-478.
181. Leven RM, Mullikin WH, Nachmias VT. Role of sodium in ADP-andthrombin-induced megakaryocyte spreading. *J Cell Biol*. 1983,96:732-736.
182. Leven RM, Nachmias VT. A-actinin arcs in megakaryocyte spreading. *Exp Cell Res.k* 1984;152:476-485.
183. Leven RM, Nachmias VT. Cultured megakaryocytes: changes in the cytoskeleton after ADP-induced spreading.*J Cell Biol* 1982;92:313-323.
184. Leven Rm, Yee MK. Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and parcially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood*. 1987;69:1046-1052.
185. Leven RM. Megakaryocyte e motility and platelet formation. *Scan Microsc*.1987,1.1701-1709.

186. Levin J, Levin FC, Metcalf D: The effects of acute thrombocytopenia on megakaryocyte-CFC and granulocyte-macrophage-CFC in mice: studies of bone marrow and spleen. *Blood* 56:274, 1980.
187. Levine RF, Eldor A, Shoff PK, et al. Circulating megakaryocytes: Delivery of large number of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol.* 1993;51:233-246.
188. Levine RF, Hazzars KC, Lamberg JD. The significance of megakaryocyte size. *Blood.* 1982;60:1122-1131.
189. Levine RF, The origin, development and regulation of megakaryocytes. *Br J Haematol.* 1982,52.173-180.
190. Li QX, Berdt MC, Bush AI, et al. Membrane-associated forms of the beta-A4 amyloid precursor of Alzheimer's disease in human platelet and brain: Surface expression on the activated human platelet. *Blood.* 84:133-142,1994.
191. Lind SE, Yin HL, Stossel TP. Human platelet contain gelsolin: A regulator of actin filament length. *J Clin Invest* 69:1384-1387, 1982.
192. Long MW, Heffner CH; Gragowski LL. IN vitro differences in responsiveness of early (BFU-Mk) and late (CFU-Mk) murine megakaryocyte progenitor cells. *Prog Clin Biol Res.* 1986,215.179-186.
193. Long MW, Heffner CH; Gragowski LL. Phorbol diesters stimulate the development of an early murine progenitor cell. The burst-forming unit- megakaryocyte. *J Clin Invest.* 1985,76.431-438.
194. Long MW, Williams N, Ebbe S. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood.* 1982;59.569-575.
195. Long MW, Williams N, Immature megakaryocytes in the mouse: morphology and quantitation by acetylcholinesterase staining. *Blood.* 1981;58.1032-1039.
196. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995;38:87-104.
197. Louache F, Debili N, Cramer E, et al. Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood.* 1991;77:311-316.

198. Malmgren R. ATP-secretion occurs as an initial response in collagen induced platelet activation. *Thromb Res* .1986;43:445-453.
199. Marcus AJ. Platelet eicosanoid Metabolism. In: RW Colman, J Hirsch, VJ Marder, EW Salzman, eds. *Hemostasis and Thrombosis; Basic principles and clinical practice*. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott,1987;676-688.
200. Marchese P, Murata M, Mazzucato M, et al. Identification of three tyrosine residues of glycoprotein Ib-alpha with distinct roles in von Willebrand factor and alpha-thrombin binding. *J Biol Chem*. 1995;270:9571-9578.
201. Margueire GA, Edgington TS, Plow EF. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as part of a multistep reaction in ADP-reduced platelet aggregation. *J Biol Chem*. 1980;255:154-161.
202. Martin DIK, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*. 1990;344:444-447.
203. Martin JF, Slater DN, Trowbridge EA. Evidence that platelet are produced in the pulmonary circulation by a physical process. In: Levine RF, Williams N, Kevin J, Evatt BL, eds. *Megakaryocytes Development and Function*. New York: Alan R. Liss, 1986:405-416.
204. Matsudaira P, Janmey P. Pieces in the actin-severing protein puzzle. *Cell*. 1988;54:139-140.
205. Matsushita T, Sadler JE. Regions within vWF that bind to GPIb (Identification of amino acid residues essential for von Willebrand Factor binding to platelet glycoprotein Ib) Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the A domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem*.1995;270:13406-13414.
206. Mazur EM, Hoffman R, Bruno E. Regulation of human megakaryocytopoiesis. An in vitro analysis. *J Clin Invest*. 1981;68:733-741.
207. McGowan EB, Ding A, Detwiler TC. Correlation of thrombin-induced glycoprotein V hydrolysis and platelet activation. *J Biol Chem*. 1983;258:11243-11248.
208. Mckeown L, Vail M, Williams S, et al. Platelet adhesion to collagen in individuals lacking glycoproteinIV. *Blodd*. 1994;83:2866-2871.
209. McLaren KM. Immunohistochemical localization of thrombospondin in human megakaryocytes and platelet. *J Clin Pathol*. 1983;36:197-199.

210. McLaren KM; Pepper DS. Immunological localization of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in human megakaryocytes and platelets. *J Clin Pathol.* 1982;35:1227-1231.
211. Mellion BT, Ignarro LI, Ohlstein EH, et al. Evidence for the inhibitory role for guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood.* 1981;57:946-955.
212. Menashi S, Davis C, Crawford N: Calcium uptake associated with an intracellular membrane fraction prepared from human blood platelet by high-voltage, free-flow electrophoresis. *FEBS LETT* 140:298, 1982.
213. Metzelaar MH, Clevers HC. Lysosomal membrane glycoproteins in platelet. *Thromb Haemost.* 1992;68:378-382.
214. Metzelaar MJ, Heijnen HFG, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Identification of a 33-Kd protein associated with the alpha-granule membrane (GMP-33) that is expressed on the surface of activated platelet. *Blood.* 79:372-379,1992.
215. Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, et al. CD36 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 1991;266:3239-3245.
216. Meyer SC, Fox JE. Interaction of platelet glycoprotein V with glycoprotein Ib-IX regulates expression of the glycoproteins and binding of von Willebrand factor to glycoprotein Ib-IX in transfected cells. *J Biol Chem.* 1995;270:14693-14699.
217. Meyers K, Seachord C. Identification of dense granule specific membrane proteins in bovine platelet that are absent in the Chediak- Higashi syndrome. *Thromb Haemost.*1990;64:319-325.
218. Michalak M, Mariani P, Opas M: Calreticulin, a multifunctional Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem Cell Biol* 76:779, 1998.
219. Michelson AD, Barnard MR: Plasmin- induced redistribution of platelet glycoprotein Ib. *Blood* 76:2005, 1990.
220. Michelson AD: Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Semin Thromb Hemost* 18:18, 1992.
221. Miller JL, Characterization of the megakaryocyte secretory response: Studies of continuously monitored release of endogenous ATP. *Blood.*1983;61:967-972.

222. Mohri H et al. Identification of a novel binding site to the integrin alpha-IIb-beta-3 located in the C-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin. *J Biol Chem.* 1996;271:15724-15728.
223. Morgenstern E, Edelman L. Fibrinogen distribution on surfaces and in organelles of ADP stimulated human blood platelet. *Eur J Cell Biol.* 38:292-300,1985.
224. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H, Transport of antiglycoprotein IIb/IIIa - antibodies into alpha-granules of unstimulated human blood platelet. *Thromb Haemost.* 1992;67:121-125.
225. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Transport of antiglycoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alpha-granule of unstimulated human blood platelets. *Thromb Haemost* 1992;67:121-125.
226. Morgenstern E. Coated membranes in blood platelet. *Eur J Cell Biol.* 1982;26:315-318.
227. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelet deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest.* 1989;84:1440-1445.
228. Moroi M, Jung SM, Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. *Blood.* 1984;64:622-629.
229. Muzbek L, Adany R, Gluknova MA, Frid MG. The identification of vimentin in human blood platelet. *Eur J Cell Biol* 43:501-504, 1987.
230. Nachmias VT, Kavalier J, Jacobowitz S. Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton. *Nature.* 313:70-72,1985.
231. Nachmias VT. Cytoskeleton of human platelet at rest and after spreading. *J Cell Biol* 1980;86:795-802.
232. Nachmias VT. Platelet and megakaryocyte shape change: Triggered alterations in the cytoskeleton. *Semin Hematol* 20:261-281, 1983.
233. Naik UP, Kornecki E, Ehrlich YH. Phosphorylation and dephosphorylation of human platelet surface proteins by an ectoprotein kinase/phosphatase system. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1092:256-264.

234. Naik UP, Patel PM, Parise LV. Identification of a novel calcium binding protein that interact with the integrin alpha-IIb cytoplasmic domain. *K J Biol Chem*.k 1997, in press.
235. Nakahata T, OgawaM. Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982,79:3843-3847.
236. Nakamura M,Honda ZI, Izumi T, et al. Molecular Cloning and Expression of platelet-activating factor-receptor from human leukocytes. *J Biol Chem*. 1990;266:20400-20405.
237. Nakata T, Hirokawa N. Cytoskeletal reorganization of human platelet after stimulation revealed by the quick-freeze deepetch technique. *J Cell Biol* 1987;105:1771-1780.
238. Newman PJ; Derbes RS,Aster RH: The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 83:1778. 1989.
239. Nichol JL, Hokom MM A,et al. Megakaryocyte growth and development factor. Analyses of in vivo effects of human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J Clin Invest*. 1995,95:2973-2978.
240. Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Houdijk WPM, Sixma JJ. Human blood platelet showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature*.1985;318:470-472.
241. Nieuwenhuis HK, Ooste hout JJG, Rozemuller E, et al. Studies with a monoclonal antibody against activated platelet: evidence that a secreted 53,000-mw lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood*. 1987;70:838-845.
242. Niewiaroski S,McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ. Disintegrins nad other naturally occurring antagonist of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol*.1994;31:289-300.
243. Nochols WL, Gaastineau DA, Solberg LA, Mann KG. Identification of human megakaryocyte coagulation factor V. *Blood*. 1985;65:1396-1406.

244. Nurden P, Heilmann E, Pannocchia A, Nueden AT: Two-way trafficking of membrane glycoproteins on thrombin-activated human platelets. *Semin Hematol* 31:240, 1994.
245. Oda A, Druker BJ, Smith M, Salzman EW. Association of pp60src with Triton X-100-insoluble residue in human blood platelets requires platelet aggregation and actin polymerization. *J Biol Chem.* 1992;267_20075-20081.
246. Okumura N, Tsuji K, Nakahata T. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood.* 1992,80.642-650.
247. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K: Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Ann Rev Immunol* 9:617, 1991.
248. Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, et al. Protein tyrosine phosphorylation in human platelet induced by interaction between glycoprotein Ib and Von Willebrand factor. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1243.482-488.
249. Painter RG, Ginsberg MH. Centripetal myosin redistribution in thrombin-stimulated platelet: relationship to platelet Factor 4 secretion. *Exp Cell Res.* 155:198-212,1984.
250. Parise LV, Helgerson SL, Steiner B, et al. Synthetic peptides derived from fibrinogen and fibronectin change the conformation of purified platelet glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem.* 1987;262:12597-12602
251. Parise LV, Phillips DR. Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor. Fibrinogen-binding properties of the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem.* 1985;260.10698-10707.
252. Parmley RT, Kim TH, Austin RL, et al. Emperipolesis of neutrophils by dysmorphic megakaryocytes. *Am J Hematol.* 1982,13:303-311.
253. Pedersen NT. Megakaryocytes in the foetal circulation and in cubital venous blood in the mother before and after delivery. *Scand J Haematol.* 1980,25.5-11.
254. Pestina TI, Jackson CW, Stenberg PE. Abnormal subcellular distribution of myosin and talin in Wistar Furth rat platelet. *Blood.* 1995,85.2436-2446.
255. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood.* 1988,71:831-843.

256. Pleot D, Loll PJ, Garavito RM: The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 367:243, 1994.
257. Pollard Td. Actin. *Cur Opin Cell Biol* 2:33-40, 1990.
258. Pranddni MH, Uzan G, Martin F, et al. Characterization of a specific erythromegakaryocytic enhancer within the glycoprotein IIb promoter. *J Biol Chem.* 1992;267:10370-10374.
259. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. *J Biol Chem.* 1990,265:17381-17384.
260. Rabellino EM, Awidi A, Sitar G, Levene RB. Human marrow megakaryocytes synthesize platelet glycoproteins IIb/IIIa and Thrombospondin. *Blood.* 1984;64.(suppl 1):250a.
261. Rabellino EM, Levene RB, Leung LLK, Nachman RL. Human magakaryocytes. II. Expression od platelet ptoteins in early marrow megakaryocytes. *J Exp Med.* 1981,154.88-100.
262. Radley Jm, Haller CJ. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br J Haematol.* 1983,53.277-287.
263. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer. *Blood.* 1982;60:213-219.
264. Radley JM, Hartshorn MA, Green SL. The response of megakaryocytes with processes to thrombin. *Thromb Haemost.* 1987,58.732-736.
265. Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood.k* 1980;56:996-999.
266. Radley JM. Ultrastructural aspect of platelet production. In: Levinerf, N Williams, J Levin and BL Evatt, eds. *Megakaryocyte Development and Function.* New York: Alan R. Liss, Inc, 1986:387-398.
267. Radley JM; Green SL. Ultrastructure of endomitosis in megakaryocytes. *Nouvelle Revue Francaise D'Hematologie.* 1989;31:232a.
268. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to the vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2:1057-1058.
269. Rinder HM, Tracey JL, Rinder CS. Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost.* 1994;72:750-756.

270. Roberts JJ, Rodgers SE, Drury J, et al. Platelet activation induced by a murine monoclonal antibody directed against a novel tetra-span antigen. *Br J Haematol.* 1995;89:853-860.
271. Romeo P-H, Prandini M_h, Joulin V, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature.* 1990;344:447-450.
272. Rosa JP, Bray PF, Gayet O, et al. Cloning of glycoprotein IIIa cDNA from human erythroleukemia cells and localization of the gene to chromosome 17. *Blood.* 1988;72:593-600.
273. Rosales C, O'Brien V, Korberg L, Juliano R. Signaltransduction by cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Acta.* 1995;1242:77-98.
274. Ryo R, Nakeff A, Huang SS, et al. New synthesis of a platelet-specific protein: Platelet factor 4 synthesis in a megakaryocyte-enriched rabbit bone marrow culture system. *J Cell Biol.* 1983;96:515-520.
275. Ryo R, Proffitt RT, Poger ME, et al. Platelet factor 4 antigen in megakaryocytes. *Thromb res.* 1980;17:645-652.
276. Saelman EUM, Kehrel B, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen and endothelial cell matrix under flow conditions is not dependent on platelet glycoprotein IV. *Blood.* 1994;83:3240-3244.
277. Saelman EUM, Nieuwehuis HK, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa. *Blood.* 1994;83:1244-1250.
278. Safer D, Elzinga M, Nachmias VT. Thymosin beta-4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem* 266:4029-4032, 1991.
279. Sander HJ, Slot JW, Bouma BN, et al. Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelet. *J Clin Invest* 72:1277-1287, 1983.
280. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membraneprotein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelet to collagen. *Cell.* 1986;46:913-920.

281. Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive site in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelet. *J Biol Chem.* 1991;266:11227-11233.
282. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM, Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996;84:289-297.
283. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1992;267:11300-11306.
284. Scarborough RM, Rose JW, Naughton MA, et al. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American Pit Viper Venoms. *J Biol Chem.* 1993;268:1058-1065.
285. Scott JL, Dunn SM, Jin B, et al. Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. *J Biol Chem.* 1989;264:13475-13482.
286. Scurfield G, Radley JM. Aspects of platelet formation and release. *Am J Hematol.* 1981;10:285-296.
287. Schick BP, Jacoby JA. Serglycin and betaglycan proteoglycans are expressed in the megakaryocytic cell line CHRF288-11 and normal human megakaryocytes. *J Cell Physiol.* 1995;165:96-106.
288. Schick BP, Schick PK, Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1985;833:281-290.
289. Schick BP, Schick PK, Foster K, Block A. A rachidonate synthesis and uptake in isolated guinea pig megakaryocytes and platelet. *Biochim Biophys Acta.* 1984;795:341-347.
290. Schick BP, Schick PK. Megakaryocyte biochemistry. *Semin Hematol.* 1986;23:68-87.
291. Schick BP, Walsh CJ, Breslin DL. Megakaryocyte and platelet proteoglycans. In : Levine RF, Williams N, Levin J, Evatt BL, eds. *Megakaryocyte Development and Function.* New York: Alan R. Liss, 1986:287-292.
292. Schick BP, Schick PK; Chase PR: Lipid composition of guinea pig platelet and megakaryocytes. The megakaryocyte as a probable source of platelet lipids. *Biochim Biophys Acta.* 1981;663:239-248.

293. Schick BP, Schick PK; Cholesterol and phospholipid biosynthesis in guinea pig megakaryocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1981;663:249-254.
294. Schick PK, He X. Composition and synthesis of glycolipids in megakaryocytes and platelet: Differences in synthesis in megakaryocytes at different stages of maturation. *J Lipids Res*. 1990;31:1645-1654.
295. Schick PK, Konkle BA, He X, Thornton RD. P-selectin mRNA is expressed at a later phase of megakaryocyte maturation than mRNAs for Von Willebrand factor and glycoprotein Ib-a. *J Lab Clin Med*. 1993;121:714-721.
296. Schick PK, Megakaryocyte and platelet lipids. In : Colman RW, J Hirsh, VJ Marder and EW Salzman, eds Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Third ed. Philadelphia: J b lippincott company, 1994;574-589.
297. Schick PK, Schick BP, Williams-Gartner K. Characterization of guinea pig megakaryocyte subpopulations at different phases of maturation prepared with a Celsp separation system. *Blood*. 1989;73:1801-1808.
298. Schick PK, Weinstein M. A marker for megakaryocytes: serotonin accumulation in guinea pig megakaryocytes. *J Lab Clin Med*. 1981;98:607-615.
299. Schick PK, Williams-Gartner K, He X. Lipids composition and metabolism in megakaryocytes at different stages of maturation. *J Lipids Res*. 1990;31:27-35.
300. Schick PK: Megakaryocyte and platelet lipids, in *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, edited by RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman, 3rd ed, p 574, JB Lippincott, Philadelphia, 1993.
301. Schoenwaelder SM, Jackson SP, Yuan Y, et al. Tyrosine kinases regulated the cytoskeletal attachment of integrin platelet glycoprotein IIb/IIIa and the cellular retraction of fibrin polymers. *J Biol Chem*. 1994;269:32479-
302. Seitz R, Wesemann W, Studies on megakaryocytes: isolation from rat and guinea pig and incorporation of 5-hydroxytryptamine. *Eur J Cell Biol*. 1980;21:183-187.
303. Shattil SJ, Ginberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelet. *Curr Opin Cell Biol*. 1994;6:695-704.
304. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985;260:11107-11114

305. Shattil SJ, O'Toole T, Eigenthaler M, et al. Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interact specifically with the cytoplasmic tail of the integrin Beta-3 subunit. *J Cell Biol.* 1995;131:807-816.
306. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K, et al. Shear dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood.* 1996;88:2939-2950.
307. Siess W, Cuatrecasas P, Lapeyina EG. A role for cyclooxygenase products in the formation of phosphatidic acid in stimulated human platelet. Differential mechanism of action of thrombin and collagen. *J Biol Chem.* 1983;258:4683-4686.
308. Siess W, Grunberg B. Phosphorylation of rap 1B by protein kinase A is not involved in platelet inhibition by cyclic AMP. *Cell Signal.* 1993;5:209-214.
309. Siess W, Lapetina EG. Calcium mobilization primes protein kinase C in human platelet. Calcium and phorbol esters stimulate platelet aggregation and secretion synergistically through protein kinase C. *Biochem J.* 1988;255:309-318.
310. Siess W. Molecular Mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev.* 1989;69:58-177.
311. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ: Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 263:18205, 1988.
312. Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem.* 1991;266:7345-7352.
313. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, et al: Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation on the platelet plasma membrane, Studie in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 264:137,1989
314. Sixma JJ, Berg Avd, Hasilik A, et al. Immuno-electron microscopical demonstration of lysosomes in human blood platelet and megakaryocytes using anti-cathepsin D. *Blood.* 1985;65:1287-1291.

315. Slater DN, Trowbridge EA, Martin JF. The megakaryocyte in thrombocytopenia a microscopic study which supports the theory that platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb Res.* 1983;31:163-176.
316. Smith JB, Dangelmaier C, Selak MA, et al. Cyclic AMP does not inhibit collagen-induced platelet signal transduction. *Biochem J.* 1992;283:889-892.
317. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood.* 1993;98:2827-2843.
318. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of Von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1985;76:1102-1106.
319. Stamler J, Vaughan DE, Loscalzo J. Synergistic disaggregation of platelets by tissue plasminogen activator, prostaglandin E1 and nitroglycerin. *Circ Res.* 1989;65:796-804.
320. Stenberg PE, Levin J. Mechanisms of platelet production. *K Blood Cells.* 1989;15:23-47.
321. Stenberg PE, McEver RP, Schuman MA et al. A platelet alpha-granule membrane protein GMP-140 is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985;101:880-886.
322. Stenberg PE, Schuman MA, Levine SP, Bainton DF. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol* 98: 748-760, 1984.
323. Stubbs MT, Bode W. The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *TIBS.* 1995;20:23-28.
324. Suzuki H, Katagiri Y, Tsukita S, et al. Localization of adhesive proteins in two newly subdivided zones in electron-lucent matrix of human platelet alpha-granules. *Histochem* 94:337-344
325. Suzuki H, Kinlough-Rathbone RL, Packman MA, et al. Immunocytochemical localization of fibrinogen during adenosine diphosphate-induced responses and enhanced fibrinogen binding in a medium with low calcium levels. *Blood* 71:850-860, 1988.
326. Suzuki H, Nakamura S, Itoh Y, Yamazaki H, Tanoue: Immunocytochemical evidence for the translocation of alpha-granule membrane glycoprotein IIb/IIIa of human platelets to the surface membrane during the release reaction. *Histochemistry.* 1992;97:381.

327. Suzuki H, Nakamura S, Itoh Y, et al. Immunocytochemical evidence for the translocation of alpha-granule membrane glycoprotein IIb/IIIa of human platelet to the surface membrane during the release reaction. *Histochem* 97:381-388, 1992.
328. Swords NA, Tracy PB, Mann KG. Intact platelet membranes, not platelet-released microvesicles, support the procoagulant activity of adherent platelet. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1613-1622.
329. Tablin F, Taube D. Platelet intermediate filaments: Detection of a vimentin like protein in human and bovine platelet. *Cell Motil Cytoskel* 8:61-67, 1987.
330. Tabon F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci*. 1990;97:59-70.
331. Takafuta T, Fujimura K, Kawano H, et al. Expression of platelet membrane glycoprotein V in human megakaryocytes and megakaryocytic cell lines: Study using a novel monoclonal antibody against GPV. *Thromb Haemost*. 1994;72:762-769.
332. Tandon NN, Kralisz U, Jameison GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*. 1989;264:7576-7583.
333. Tavassoli M, Aoki M. Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells*. 1989;15:3-14.
334. Tavassoli M, Aoki M. Migration of entire megakaryocytes through the marrow-blood barrier. *Br J Haematol*. 1981;48:25-29.
335. Tavassoli M. Megakaryocyte-platelet axis and the process of platelet formation and release. *Blood*. 1980;55:537-545.
336. Tavassoli M. Modulation of megakaryocyte emperipoiesis by phlebotomy: Megakaryocytes as a component of marrow-blood barrier. *Blood Cells*. 1986;12:205-216.
337. Tertyshnikova S, Fein A: Inhibition of inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1613, 1998.
338. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelet and platelet-derived microparticles. *J Biol Chem*. 1991;266:24302-24307.

339. Thibert V, Duberman V, Edelman L, et al. Quantitation of platelet glycoprotein IV and study of its interaction with thrombospondin using an immunocapture assay. *Thromb Haemost.* 1991;65:1643.
340. Thiele J, Krech R, Choritz H, Georgii A. Emperipolesis—a myeloproliferative disease by morphometry and ultrastructure. *Virchows Arch Cell Pathol.* 1984;46:253-263.
341. Tohyama Y, Yanagi S, Sada K, Yamamura H. Translocation of p72syk to the cytoskeleton in Thrombin-stimulated platelet. *J Biol Chem* 1994;269:32796-32799.
342. Tong M, Seth P, Penington DG. Proplatelets and stress platelet. *Blood.* 1987;69:522-528.
343. Trowbridge EA, Harley PJ. A stochastic model of pulmonary platelet production. *IMA J of Math Appl Med Biol.* 1988;5:45-63.
344. Trowbridge EA, Martin JF, Slater DN. Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb Res.* 1982;28:461-475.
345. Trowbridge EA. Pulmonary platelet production: a Physical analogue of mitosis. *Blood.* 1988,13:451-458.
346. Tuszynski GP, Mauco GP, Koshy A, et al: The platelet cytoskeleton contains element of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 259:6947, 1984.
347. Uganova T, Agbanyo FR, Plow EF. Conformational changes in adhesive proteins modulated their adhesive function. *Thromb Haemost.* 1995,74:253-257.
348. Ugarova TP, Budzynski AZ, Shatil SJ, et al. Conformational changes in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa. *J Biol Chem.* 1993;268:21080-21087.
349. Vaichenker W, Deschamps JF, Bastin JM, et al. Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in vivo cells from normal and leukemic patients. *Blood.* 1982,59:514-521.
350. Van den BH, de Vet EC, Zomer AW: The role of peroxisomes in ether lipids synthesis. Back to the roots of PAF, *Adv Exp Med Biol* 416:33. 1996.
351. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991;5:2814-2823.

352. Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cunningham DD. Protease nexin II (amyloid beta-protein precursor):a platelet alpha-granule protein. *Science* . 248:745-748,1990.
353. van Pampus ECM, Denkers IAM, Geel BJM; et al. Expression of adhesion antigens of human bone marrow megakaryocytes and blood platelet. *Eur Haematol* . 1992;49:122-127.
354. Vicic WJ, Lages B, Weiss HJ. Release of human platelet factor V activity is induced by both collagen and ADP and is inhibited by aspirin. *Blood*. 1980;56:448-455.
355. Vigon I, Mornon JP, Cocaault L, et al. Molecular cloning and characterization of mpl, the human homolog of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992,89:5640-5644.
356. Villarreal XC, Grant BW, Long GL. Demonstration of osteonectin mRNA in megakaryocytes: The use of the polymerase chain reaction. *Blood*. 1991,78.1216-1222.
357. Vinci G, Tabilio A, Deschamps JF, et al. Immunological study of in vitro maturation of human megakaryocytes. *Br J Haematol*. 1984;56:589-605
358. Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64:1057-1068.
359. Wagner CL, Masceli MA, Neblock DS, et al. Analysis of GpIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelet. *Blood*. 1996;88:907-914.
360. Walsh PN, Schmaier AH: Platelet-coagulant protein interactions, in *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, edited by RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman, 3rd ed, p 629, JB Lippincott, Philadelphia, 1993.
361. Wang DL, Pan YT, Wang JJ, et al. Demonstration of a functionally active tPA-like plasminogen activator in human platelet. *Thromb Haemost*.71:493-498,1994.
362. Warhert DB, Barnhart MI. Circulating megakaryocytes and the microvasculature of the lung. *Sanning Electron Microsc*.1980;3:255-262.
363. Warhert DB, Barnhart MI.Ultrastructure of circulating and platelet-forming megakaryocytes: a combined correlative SEM_TEM and SEM histochemical study. *Ann NY Acad Sci*. 1981;370:30-41.

364. Weisel JW, Stauffacher CV, Bullit E, Cohen C. A model for fibrinogen: Domains and sequence. *Science*. 1985;230:1386-1392.
365. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 1994;76:263-274.
366. Wells S, Sissons M, Hasleton PS. Quantitation of pulmonary megakaryocytes and fibrin thrombi in patients dying from burns. *Histopathology*. 1984;8:517-527.
367. Wence-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, et al. Localization of internal pools of membrane glycoprotein involved in platelet adhesive responses. *Am Pathol*. 1986;124:324-334.
368. Wence-Drake JD, Boudignon-Proudhon C, Dieter MG, et al. Internalization of bound fibrinogen modulates platelet aggregation. *Blood*. 1996;87:602-612.
369. Wence-Drake JD, Dahlback B, White JG, Ginsberg MH. Ultrastructural localization of coagulation factor V in human platelet. *Blood* 68:244-249, 1986.
370. Wence-Drake JD, Frelinger LF, Dieter MG, Lam S-T. Arg-Gly-Asp-dependent occupancy of GPIIb/IIIa by applaggin: Evidence for internalization and cycling of a platelet integrin. *Blood* 1993;81:62-69.
371. Wence-Drake JD, Painter RG, Zimmerman TS, Ginsberg MH. Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin section. *Blood* .4:929-938, 1985.
372. Wence-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, et al: Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol*. 1986;124:324-334.
373. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, et al. C-mpl ligands is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature*. 1994;369:571-574.
374. Wesemann W, Raha S, McDonald T. Isolation of mouse different maturational stages. *Eur J Cell Biol*. 1985;37:117-121.
375. White JG, Clawson GC. Overview article: Biostructure of blood platelet. *Ultrastruc Pathol* 1:533-558, 1980.
376. White JG, Clawson GC. The surface-connected canalicular system of blood platelet- A fenestrated membrane system. *Am J Pathol*. 101:353-364, 1980.

377. White JG, Sauk JJ. The organization of microtubules and microtubule coils in giant platelet disorders. *Am J Pathol* 116:514-522,1984.
378. White JG. Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelet. *Am j Pathol* 117:207-217, 1984.
379. White JG. Platelet secretory granules and associated proteins. *Lab invest.*1993;68:497-498.
380. White JG. Ultrastructural modifications in platelet membranes and cytoskeleton following activation. *Blood Cells* 9:237-261, 1983.
381. White JG.The secretory pathway of bovine platelet. *Blood.* 1987;69.878-885.
382. White JG: Anatomy and structural organization of the platelet, in *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, edited by RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, EW Salzman, 3rd ed, p 397. JB Lippincott, Philadelphia, 1993.
383. Wiesneth W, Pflieger H, Kubanek B, Heimpel H. Mocomagakaryocytes in human bone marrow. *Acta Haemat.*1980;64:65-71.
384. Williams J. Williams. K Hematología. Tomo II. 2° ed. Editorial Salvat. 1985,1041-1193.
385. WilliamsMJ, Du X, Loftus JC, Ginsberg MH. Platelet adhesion receptors. *Semin Cell Biol.*1995,6:305-314.
386. Yin HL, Albrecht JH, Fattourn A. Identification of gelsolin, a Ca²⁺-dependent regulatory protein of actin-gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of ceils and tissues. *J Cell Biol* 91: 901-906, 1981.
387. Young KM, Weiss L, Megakaryocytopoiesis: incprporation of tritiated thymidine by small acetylcholinesterase-positive cells in murine bone marrow during antibody-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1987,69:290-295.
388. Zucker-Franklin D, Benson KA, Myers KM, Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelet. *Blood.*1985;65:241-244.
389. Zucker-Franklin D, Petorsson S. Thrombocytopoiesis-analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cukltured mouse megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1984;99:390-402.
- 390.Zucker-Franklin D. Endocytosis by human platelet: Metabolic and freeze-fracture studies. *J Cell Biol.* 91:706-715, 1981.