

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

87
2ej'

PLAQUETAS
ANALISIS COMPARATIVO DE TRES METODOS DE CUANTIFICACION

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:

ESPERANZA GABRIELA GUTIERREZ REYES

MEXICO, D. F. 1991





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE:

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
- Hemostasia	3
- Fisiología del tapón hemostático	7
- Morfología Plaquetaria	8
- Metabolismo Plaquetario	10
- Función Plaquetaria	11
- Producción Plaquetaria	16
- Clasificación de las Enfermedades Plaquetarias	19
HIPOTESIS	27
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y METODOS	29
RESULTADOS	37
DISCUSION	49
CONCLUSION	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	56

INTRODUCCION

La sangre forma parte del tejido conectivo. Es un tejido líquido compuesto por elementos celulares y una sustancia intracelular líquida, el plasma sanguíneo.

El plasma es una solución acuosa que contiene componentes de pequeño tamaño y gran peso molecular, que corresponden al 10% de su volumen, las proteínas plasmáticas corresponden al 7%, las sales inorgánicas al 0.9% y el resto lo forman los compuestos orgánicos diversos como aminoácidos, vitaminas, hormonas y lípidos.

Los elementos celulares de la sangre son los eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Las plaquetas intervienen en forma importante en el mantenimiento de una hemostasis normal debido a dos funciones que desempeñan: la hemostática y la tromboplástica. La función hemostática se realiza mediante el taponamiento de los vasos sanguíneos lesionados por una masa de plaquetas, mientras que la función tromboplástica es inducida mediante la participación de los constituyentes químicos de las plaquetas en la coagulación.

Las enfermedades plaquetarias se dividen en tres grupos:

- 1.- Número insuficiente de plaquetas.
- 2.- Función anormal de plaquetas.
- 3.- Número excesivo de plaquetas.

El presente trabajo abarca el primer grupo de enfermedades plaquetarias que se caracterizan por número insuficiente de plaquetas, además en enfermedades en las cuales se altera la hematopoyesis (anemia aplásica, leucemias agudas). El propósito del mismo es presentar los resultados de una evaluación hecha para la cuantificación de plaquetas realizadas por Brecher, Rees- Ecker y Coulter Thrombocounter-C y corroboración por el frotis sanguíneo.

Los métodos para la cuantificación de plaquetas se dividen en 4 grupos:

1. Directos.
2. Indirectos.
3. Semiautomatizados y
4. Electrónico
(totalmente automatizados).

La cuenta de plaquetas debe de llevarse a cabo en todo paciente que presente a cualquier problema hematológico, ya que el resultado puede ser de valor diagnóstico y pronóstico.

Para realizar la cuenta de plaquetas es importante la toma de muestra, siendo un factor importante en la precisión del conteo. También es importante la experiencia en el manejo del material requerido.

La cuantificación de plaquetas se realizó en 397 muestras de sangre que se agruparon de la siguiente forma: A:153 adultos sanos, B: 103 niños hematológicamente sanos que acuden a la consulta externa y C:142 niños con problemas hematológicos.

En el grupo A, las cuentas obtenidas por los métodos directos fueron ligeramente más bajas que los valores de referencia. El semiautomatizado estuvo fuera de los límites de confianza y sucedió lo mismo en el grupo B. En este grupo, los métodos directos fueron similares a los valores de referencia. El método indirecto permitió en los 3 grupos la cuantificación hecha por los otros tres métodos estudiados.

Las cuantificaciones hechas en adultos y niños fueron significativamente diferentes, posiblemente por la inexperiencia al iniciar el estudio, ya que el primer grupo que se cuantificó fue el de adultos.

No se dispone de ningún método totalmente satisfactorio, ya que existen parámetros difíciles de controlar, tales como: distribución irregular, rápida adhesión y agregación a superficies extrañas, visualización en el microscopio y en el caso del método semiautomatizado, el manejo del microcapilar y la obtención del plasma rico en plaquetas.

Teóricamente los métodos electrónicos, proporcionan mayores ventajas, pues la muestra se manipula menos, con lo que se obtiene un menor coeficiente de variación.

GENERALIDADES

Hemostasis es el conjunto de mecanismos y procesos que mantienen la integridad vascular, evitan las extravasaciones sanguíneas espontáneas, cohiben las hemorragias, mantienen la sangre en circulación líquida y circunscriben el proceso de coagulación estrictamente al área donde se produjo la lesión del endotelio vascular. (1,2,4,5).

La hemostasis es un fenómeno complejo en el que participan los siguientes mecanismos:

1. Componente vascular
 2. Sistema de coagulación
 3. Sistema fibrinolítico
- (1, fig. 2)

1.-El componente vascular :

Depende de que los vasos sanguíneos sean estructural y funcionalmente normales, el endotelio normal es una superficie no activante de la coagulación y tampoco, de la adhesividad y agregación plaquetaria, lo que contribuye al mantenimiento de la sangre en estado líquido. Las propiedades funcionales relacionadas con la hemostasia son la contractibilidad, la fragilidad y la permeabilidad. (1,2,14) Es también importante la calidad de los elementos constituyentes del subendotelio y de la pared vascular. Si el vaso es lesionado se ha observado que es inmediata la adhesión plaquetaria al vaso sanguíneo. Esto dispara el inicio de las subsecuentes reacciones para iniciar los procesos tanto patológicos como fisiológicos de la hemostasis. La formación de un tapón hemostático representa una respuesta muy temprana a la lesión de la pared vascular. Las plaquetas reaccionan a cualquier discontinuidad en el endotelio vascular a través del contacto inicial, difusión y formación de un trombo. (5)

2.- Sistema de la coagulación sanguínea:

La cascada de la coagulación sanguínea es una secuencia lineal y es una reacción progresivamente amplificada en la conversión de zimógenos a proteasas, que termina en el cambio de fibrinógeno soluble a fibrina insoluble catalizada por complejos enzimáticos compuestos de una serin proteasa y de un cofactor proteico donde se realiza el ensamblaje en presencia de iones calcio. El cofactor proteico se concibe como formador de un "receptor" sobre la superficie de la membrana para la serin proteasas. La estabilización del complejo enzimático se lleva a cabo por diferentes interacciones entre proteína-proteína; proteína-lípido y proteína- iones calcio.

La teoría clásica de la coagulación propuesta por Morawitz (1905) asume la interacción de cuatro componentes del plasma:

1. Protrombina
2. Tromboplastina
3. Trombina
4. Fibrinógeno

Los iones calcio se requieren para la reacción básica.

La teoría moderna inicia con el descubrimiento de la conversión de protrombina hasta trombina e incluye además factores V y VIII del mecanismo de coagulación.

Existe una secuencia de eventos que termina con la polimerización de fibrinógeno. La secuencia se presenta en 4 fases cada una con sus respectivos inhibidores fisiológicos:

FASE I:

Fase de "contacto" o "iniciación", claramente se para el papel de las plaquetas en la hemostasis y sus anormalidades. Se ha demostrado que son el tapón hemostático más importante. Los factores de contacto (XI y XII) provocan uno de los estímulos para el inicio de las reacciones de adhesividad y agregación plaquetaria. (Fig. 1)

FASE II:

"Tromboplastinogenesis" representa una porción del sistema intrínseco que conducen a la generación de tromboplastina plasmática.

FASE III:

"Trombinogenesis" es la conversión de protrombina a trombina.

FASE IV:

La trombina lleva consigo la polimerización de fibrinógeno a fibrina, las anormalidades en esta fase incluyen alteraciones cuantitativas y cualitativas del fibrinógeno, deficiencias del factor XIII, incremento de la actividad fibrinolítica o alguna interferencia con la polimerización de fibrinógeno. (1)

Estas fases se realizan a través de dos vías: El sistema extrínseco utiliza la tromboplastina derivada de los tejidos dañados. Esta vía se estimula, cuando la sangre se pone en contacto con el endotelio lesionado o el tejido extravascular por la presencia de material tromboplastínico en la circulación. En la vía intrínseca se activan los factores plasmáticos de contacto, que inicia con la activación del factor XII, este a su vez activa al factor XI, formando lo que se llama el "complejo de contacto". Esta fase es independiente del calcio. "El complejo de contacto", en presencia de fosfolípido plaquetario, calcio, factores VIII y IX, es capaz de activar al factor X. Esta reacción es acelerada por la presencia de trombina. Tanto la vía intrínseca como la extrínseca llevan a un punto en común. La trombina es el factor clave en la interacción de los dos vías, y también de la hemostasis en general, porque además de formarse rápidamente por la activación del sistema extrínseco, produce fibrina y además acelera la coagulación por mecanismos de retroacción, al catalizar la acción de los factores V y VIII. En la vía extrínseca es probable que la cantidad de trombina, y por tanto de fibrina, sea insuficiente para la estabilización del coágulo

hemostático, solo sucede cuando se han formado grandes cantidades de trombina y de fibrina por la vía intrínseca. La trombina también estimula la liberación de adenosin difosfato (ADP) del interior de las plaquetas y por tanto la agregación.

3.- Fibrinolisis.

La principal función del sistema fibrinolítico es la de disolución de la fibrina en contrabalance al sistema de coagulación. Su acción es simultánea para permitir la existencia de coágulos "útiles" y prevenir una coagulación generalizada. Cabe aclarar que el sistema de coagulación genera en si mismo la producción de fibrina limitada y localizada. La fibrinolisis se activa normalmente durante la coagulación por vía factores de contacto -el factor XII acelera la conversión de plasminógeno en plasmina y por la trombina que tiene un efecto débil sobre el plasminógeno-. La plasmina es la enzima activa del plasminógeno, actúa sobre la fibrina degradandola, ataca los factores de la coagulación, como fibrinógeno, V, VIII. La plasmina circulante es rápidamente inactivada por las antiplasminas, cuya concentración en sangre es alrededor de 10 veces más elevada que la concentración de plasminógeno. Estos niveles evitan que los factores de coagulación sean degradados por pequeñas cantidades de plasmina producida durante la fibrinolisis. (1,2,4,5)

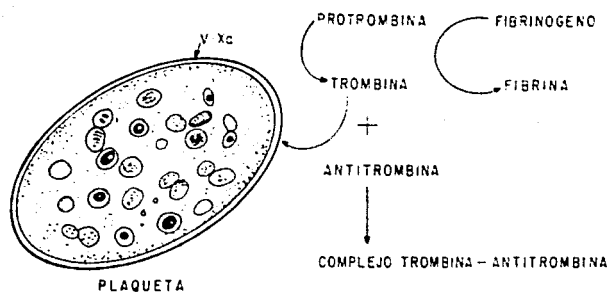


Fig 1 Papel de las plaquetas en coagulación

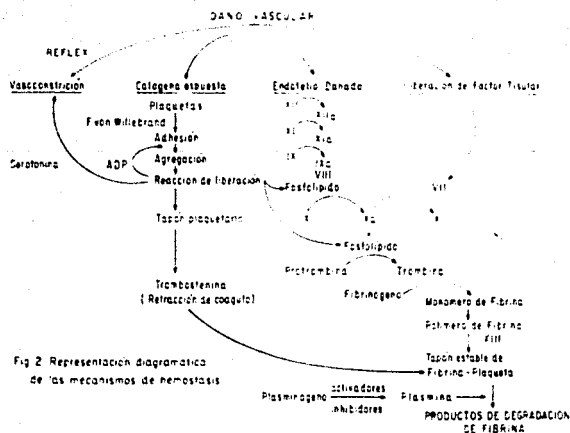


Fig 2 Representación diagramática de los mecanismos de hemostasis

FISIOLOGIA DEL TAPON HEMOSTATICO.

El desarrollo de un tapón hemostático requiere de receptores en la membrana plaquetaria, a través de los cuales, se adhieren macromoléculas, factor von Willebrand (FvW), fibrinógeno y plaquetas a lo ancho de la pared vascular. El tapón hemostático secundario esta compuesto de plaquetas enredadas en fibrina, resulta de la acción de la trombina, la cual no solamente es esencial para formación de fibrina, sino también para la exposición de los receptores de plaquetas para que se lleve a cabo la adhesividad de moléculas y para la "activación" de los factores V y VIII.

La formación de trombina se incrementa a través de la actividad de la protombinasa, formada en la superficie de las plaquetas, células endoteliales dañadas y leucocitos. La formación de un trombo de plaquetas y fibrina esta controlado por mecanismos reguladores: prostaciclina, heparina-Antitrombina III, el complejo endogeno trombo-modulina- Proteína C-Proteína S y el sistema fibrinolítico. El balance de todos los componentes y mecanismos reguladores determinan la efectividad de la coagulación para mantener la integridad funcional y estructural del sistema circulatorio. (5.Fig.7)

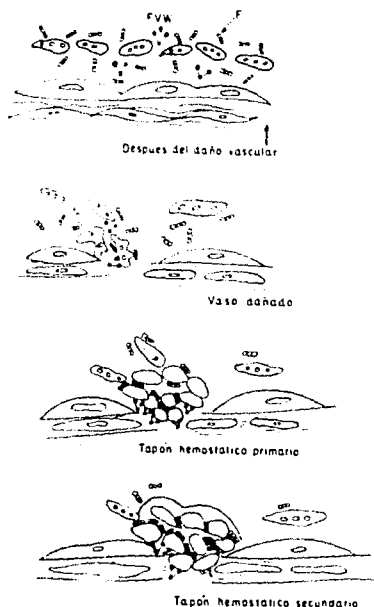


Fig. 7
FLUJO SANGUINEO

MORFOLOGIA PLAQUETARIA

Las plaquetas en su mayoría se forman en la región del sistema de Golgi de megacariocitos producidos en la médula ósea y pasan a la sangre por fragmentación del citoplasma, algunas pocas pueden derivarse de megacariocitos pulmonares. (3) Las plaquetas cuando no son activadas circulan bajo la forma de discos biconvexos con un diámetro de 2 a 4 μ m. Se divide en tres zonas estructurales: periférica, sol-gel y organelas. (2,3,4,5,6,7,11)

La zona periférica se compone de 3 zonas morfológicas: la cubierta exterior o "glucocaliz", la unidad de membrana y la región submembranosa, presentando invaginaciones que se extienden hacia el interior de la célula, para formar el sistema canicular abierto. El cual agranda el área de la superficie plaquetaria, lo que hace que las sustancias plasmáticas sean accesibles a las partes internas de las plaquetas. También sirven como conductos que transportan las sustancias que son liberadas por las plaquetas. El papel que desempeña la zona periférica en la función plaquetaria es mantener la integridad de las plaquetas, proporciona receptores para diversos agentes estimulantes o inhibidores, es determinante en la especificidad inmunológica plaquetaria, facilita las interacciones plaqueta-plaqueta, plaqueta-superficie endotelial y proporciona la superficie fosfolipídica que acelera la coagulación sanguínea. (2,3,4,5,6,11)

Zona sol-gel. Comprende la matriz viscosa intraplaquetaria, la cual esta compuesta principalmente por proteínas que se reúnen en tres sistemas de fibras: los filamentos submembranosos, los microtúbulos y los microfilamentos. Intervienen en los movimientos centripetos, la fusión de los gránulos y en la función contráctil (contracción de los pseudópodos y retracción del coágulo). (2,3,4,6,11)

Zona de organelas. En el interior de la plaqueta, en la zona sol-gel se encuentran diferentes tipos de organelos. Como son: Los cuerpos densos, los gránulos α , lisosomas, peroxisomas y mitocondrias. Contiene enzimas hidrolíticas como la fosfatasa ácida, β -glucoronidasa y catepsina. Además fibrinógeno plaquetario, trombostenina, ATPasa, adenosin trifosfato (ATP), adenosin difosfato (ADP), Factor plaquetario 4 (FP4) y catecolaminas. Las mitocondrias son pocas en número, contribuyen significativamente al depósito metabólico de ATP, además puede funcionar como depósito de calcio y glucógeno. (1,2,3,4,5,6,11 Fig.3)

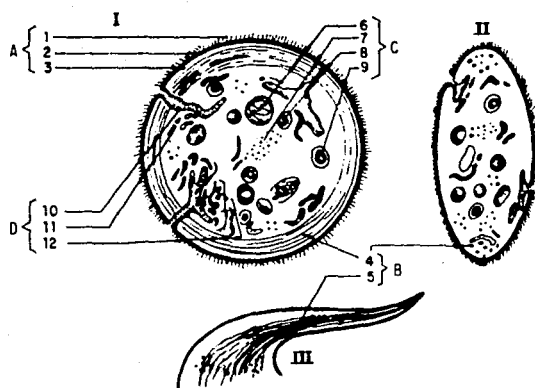


Fig 3.- Estructura plaquetaria

I y II. Cortes en plaquetas inactivadas, en plano ecuatorial y en sección cruzada reactivamente.

III. Seudópodo de una plaqueta activada.

A. Zona periférica formada por: 1. glucocáliz, 2. unidad de membrana y 3. área submembranosa.

B. Zona sol-gel consta de: 4. microtúbulos y 5. microfilamentos.

C. Zona de organelas contiene: 6. mitocondrias, 7. glucógeno, 8. gránulos α y gránulos densos.

D. Sistemas de membrana formados por 10. sistema canicular abierto, 11 sistema tubular denso y 12. membranas complejas.

METABOLISMO PLAQUETARIO

Las plaquetas tienen energía metabólica necesaria para el mantenimiento de la integridad estructural normal y de las reacciones de agregación y liberación. La energía es suministrada por el ATP generado por el metabolismo de la glucosa, tanto por la glucólisis anaerobia como por el proceso mucho más eficaz; la fosforilación oxidativa mitocondrial (7). El contenido de nucleótidos (ATP/ADP) no depende del plasma y es probable que las plaquetas reciban el complemento de nucleótidos en el citoplasma de los megacariocitos. Los adenin nucleótidos son distribuidos en dos pozas; la poza metabólica en mitocondrias que esta involucrada en reacciones que suministran energía y la poza de almacenamiento que esta en cuerpos densos que es necesaria para las reacciones de liberación. (1,2,3,7,11,16)

La generación de ATP es necesaria para la retracción del coágulo, agregación plaquetaria inducida por ADP, colágena, transporte activo de Na/K y para lograr la polimerización/despolimerización basal continua de la actina plaquetaria.(2)

El Adenosin 3'-5' monofosfato cíclico (AMPc) es un regulador importante del metabolismo de los nucleótidos y junto con los iones calcio regulan la mayoría de las reacciones plaquetarias, cambio de forma, agregación y liberación se deben al aumento del contenido de calcio en el citoplasma. Por otra parte casi todas las reacciones se suprimen al incrementarse las concentraciones de AMPc en las plaqueta. Los cambios de las concentraciones intracelulares de estos mensajeros y su interrelación determinan sobre todo la actividad plaquetaria. El AMPc se deriva del ATP por la acción de la adenilciclasa. El calcio esta implicado en la despolimerización de lo microtúbulos probablemente constituya un paso inicial para el cambio de forma, además estimula a la fosfolipasa C, la diglicerido lipasa, y en presencia de calmodulina, a la fosfolipasa A₂. A continuación el AMPc vuelve a inhibir a la fosfolipasa C, la fosfolipasa A₂ y la ciclooxygenasa. (3,7,11)

Las plaquetas cuentan con diversos receptores; para trombina, fibrinógeno, colágena, prostaglandinas, serotonina, para los componentes del complemento y para la insulina. Además existen dos factores plaquetarios. un factor de crecimiento que estimula la proliferación de las fibras musculares lisas o fibroblastos, y un factor de permeabilidad que es liberado por el complejo antígeno-anticuerpo.

FUNCION PLAQUETARIA

La función hemostática de las plaquetas pueden responder a una variedad de estímulos y someterse a la siguiente secuencia de reacciones:

1. Cambio de forma
 2. Adhesividad
 3. Agregación
 4. Reacción de liberación
- (1, 2,3,4,6,7,11,14)

La secuencia hemostática es completa si involucra la activación de la coagulación sanguínea y además los estímulos deben de ser lo suficientemente fuertes y no inhibir la reacción.

1. Cambio de forma

Todos los inductores de la adhesión y agregación plaquetaria, causan el cambio de forma plaquetaria de un disco liso a una esfera con pseudópodos, que ocurre por la degranulación y secreción del contenido de los gránulos densos (poza de almacenamiento de serotonina y ADP) y de los gránulos α (factor de crecimiento derivado de las plaquetas, FCDP), fibrinógeno, FvW, trombospodina y factor V. La secreción plaquetaria del factor V esta asociada con la formación del complejo protombinasa sobre las superficies de las plaquetas e involucra la unión del factor V y Xa a sitios específicos sobre la membrana plaquetaria, el resultado es acelerar 300,000 veces la formación de trombina a partir de protrombina que causa la conversión de fibrinógeno a fibrina, esta última se enredada al agregado plaquetario. (5)

El cambio de forma es de gran importancia para la agregación, ya que aumenta la frecuencia de colisión, disminuye la repulsión electrostática y facilita el estrecho contacto de las plaquetas adyacentes, además los pseudópodos son móviles y retráctiles. El cambio de forma es un proceso reversible, pues tan pronto como desaparece la estimulación plaquetaria, la plaqueta puede volver a su forma original y perder el contacto con las células adyacentes, el cual es acompañado por una transformación en el interior de los microtúbulos circunferenciales y de los organelos. (3)

2.- Adhesividad.

La adhesión es el proceso por el cual las plaquetas se adhieren a algunas superficies extrañas, es esencial en la reacción hemostática. El FvW es necesario para la adherencia

plaquetaria al subendotelio. (Fig.4) Existen dos mecanismos receptores para unión de FvW a las plaquetas: un clásico inducido por ristocetina y un alterno inducido por trombina. La vía alterna esta mediada en su mayor parte por ADP, el cual es secretado por los gránulos densos en respuesta a la trombina y como receptores de membrana tiene al complejo GP IIb/IIIa. Además esta acompañado por otros constituyentes que potencialmente pueden unir a las plaquetas, las cuales son: colágena, fibronectina y trombospodina. La adherencia involucra el aparato citoesquelético, el cual es activado cuando las plaquetas cambian de forma. La formación del trombo plaquetario depende del fibrinógeno, derivado del plasma o de los gránulos α de las plaquetas, interactuando con el complejo glicoproteína IIb/IIIa, siendo el receptor para la trombina. (1,2,3,5,11 Fig.5

3.- Agregación

Después del contacto de las plaquetas con la lesión vascular y localizadas sobre esta, comienzan a interactuar unas con otras para formar un agregado o trombo plaquetario. Los inductores para que las plaquetas formen un agregado son: ADP, epinefrina o trombina que inducen la exposición de aproximadamente 40 - 50,000 sitios de unión para fibrinógeno sobre la membrana plaquetaria. Además el ADP promueve la unión de calcio a la membrana plaquetaria sobre el complejo IIb/IIIa y la unión de fibrinógeno y FvW a los receptores plaquetarios. (1,2,5) El resultado es la unión de moléculas dimericas de fibrinógeno a cadenas de plaquetas, las cuales se unen a más plaquetas para producir un agregado plaquetario. (Fig.4,5a)

El ácido araquidónico es liberado de los fosfolípidos de la membrana endotelial mediante las fosfolipasas. Este desarrolla una estructura cíclica por vía de la ciclooxigenasa (CO); los productos resultantes son los endoperoxidos cíclicos, o PGI₂ y PGH₂. La PGH₂ interviene en una reacción de retrorregulación como cofactor para la estimulación, inducida por la colágena, de la activación plaquetaria.

También sirve como precursor de:

- 1.- Un producto menor de desdoblamiento no enzimático, PGD₂, prostaglandina que puede inhibir la activación plaquetaria.
- 2.- Un producto enzimático mayor, tromboxano A₂ (TXA₂), que actúa como potente inductor de la vasoconstricción y de la agregación plaquetaria. Al igual que la trombina y la colágena, se cree que el TXA₂ se une a un receptor de la membrana plaquetaria, con la consiguiente activación de la fosfolipasa C y producción de diacilglicerol.

La PGH₂ producida dentro de las plaquetas activadas puede ser liberado de éstas y captado por las células endoteliales, en donde actúa como sustrato adicional para las PGI₂, que se transforma en prostaciclina por medio de la enzima prostaciclina sintetasa. La prostaciclina activa la adenilatociclase plaquetaria, disminuyendo así la concentración citoplásmica de calcio e induciendo a que las plaquetas mantengan o recuperen la forma discoide, que no es favorable para el contacto intercelular extenso. Además contrarresta la acción del TXA₂ formado dentro de las plaquetas. (3,7)

Existen ciertos mecanismos retroactivos positivos que promueven el crecimiento del trombo plaquetario: formación de trombina, TXA_2 , secreción de los constituyentes granulares plaquetarios. Cabe suponer que también haya mecanismos retroactivos negativos para evitar la extensión del trombo a los vasos sanos; la prostaciclina desempeña un papel importante en estos mecanismos. (3)

4.-Reaccion de liberación

Se llama así a la liberación de sustancias de las plaquetas dentro del medio circundante. Existe una secuencia primaria de adhesión $\rightarrow$ agregación $\rightarrow$ metamorfosis viscosa, que se acompaña de la liberación de ADP que produce una secuencia secundaria de adhesión $\rightarrow$ agregación $\rightarrow$ metamorfosis viscosa que como resultado tiene una segunda liberación de material plaquetario. (1,2) En la reacción de liberación la estructura plaquetaria se altera marcadamente, los pseudópodos están aumentados y contienen microtúbulos que rodean a la célula, los gránulos y organelos son compactados en el centro y son rodeados por túbulos y filamentos. Los gránulos son indistintos y desaparecen los cuerpos densos liberando a través del sistema canicular abierto, sustancias tales como la serotonina, ATP, ADP, calcio, Factor plaquetario 3 y 4, hidrolasas ácidas y beta-tromboglobulina. La serotonina es un poderoso vasoconstrictor, el ADP se libera de las plaquetas para inducir agregación, siendo un mecanismo de retroalimentación positiva que promueve el crecimiento del trombo plaquetario. (1,2)

El factor plaquetario 4 (FP 4) es una glicoproteína que se desprende de las plaquetas cuando estas son agregadas por el efecto del ADP. Acorta el tiempo de trombina en presencia de heparina, potencia la agregación inducida por ADP in vitro, precipita el fibrinógeno, coagula no enzimáticamente los complejos de monómeros de fibrina solubles y neutraliza algunos productos de la degradación del fibrinógeno (Antitrombina VI). Las plaquetas jóvenes liberan 10 veces más FP4 que las plaquetas viejas. El FP4 es un potente agente específico desencadenante de la agregación plaquetaria y de la coagulación. (2)

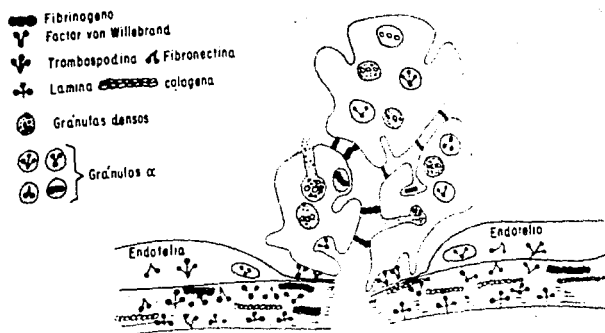


Fig.- 4 ADHESION PLAQUETARIA

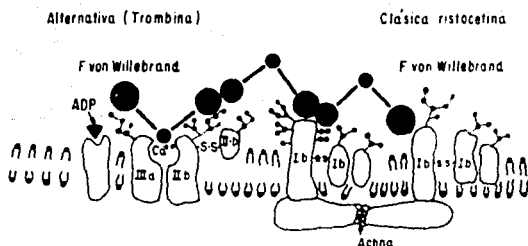


Fig. 5.- MECANISMOS RECEPTORES CLASICO Y ALTERNO DE LA UNION DE F.von Willebrand a la membrana plaquetaria.

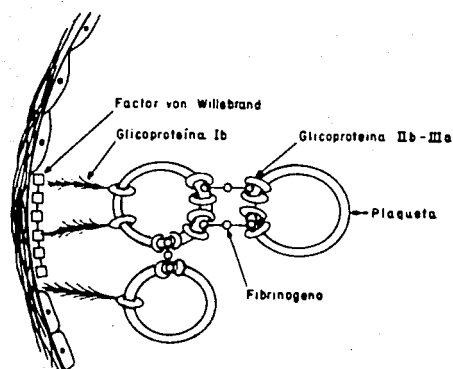


Fig 5. Receptores plaquetarios y proteínas adhesivas en adhesión y agregación

PRODUCCION PLAQUETARIA

Las plaquetas se producen principalmente en la médula ósea a partir del citoplasma de los megacariocitos.

Los megacariocitos proceden de una célula multipotencial (unidad formadora de colonias. UFC-Mix.), existe una restricción progresiva en el potencial de diferenciación a medida que la células se diferencian de células pluripotenciales progenitoras a células precursoras multipotenciales y luego en células precursoras de un solo linaje como la unidad formadora de colonias-megacariocítica (UFC-Mega). Esta célula prolifera en precursores megacariocíticos diploides que en algún punto, pierden la capacidad de división celular y adquieren la capacidad exclusiva de endoreduplicación de DNA. Entonces las células poliploides aumentan de volumen hasta ser reconocidas como megacariocitos. Estas sufren posterior maduración citoplasmática hacia el estadio de células formadoras de plaquetas.

Entre las células germinales y los megacarioblastos puede haber un depósito de células "comprometidas" intermediarias. El megacarioblasto (estadio I) es de 20 a 30 μ m de diámetro. Se compone de un citoplasma basófilo y un núcleo irregular con cromatina dispersa, ligeramente reticular y varios nucleolos, muestra el sistema membranoso de demarcación y algunos gránulos densos característicos de los megacariocitos así como protusiones citoplásmicas inespecíficas. La síntesis proteínica es muy activa y son notorios los ribosomas y el retículo endoplasmático rugoso. A menudo se observan grandes mitocondrias. El promegacariocito o megacariocito basófilo (estadio II) tiene hasta 32 equivalentes nucleares, pero su citoplasma permanece escaso y basófilo. Se caracteriza por una síntesis proteínica cada vez más pronunciada, con formación de polirribosomas. El tamaño celular esta aumentado y se encuentran todas las estructuras de la célula madura. Se observan numerosas mitocondrias. El sistema membranoso de demarcación se vuelve más extenso y aumenta la granulación citoplasmática. Al final de este estadio cesa la síntesis de DNA y así se consigue la ploidía máxima. El núcleo es multilobulado y picnótico, y se inicia la maduración citoplásmica, elaborandose en la región de Golgi elementos granulares destinados a ser organelos plaquetarios. Los gránulos de las plaquetas son sintetizados en esta región. Los canales tubulares destinados a formar las membranas de demarcación plaquetaria proliferan en todo el citoplasma, se sugiere que son invaginaciones de la membrana citoplásmica. (34) El estadio III es la forma final, es ácido-filo, granular y productor de plaquetas. En este estadio, los organelos citoplásmáticos, estan bien distribuidos y organizados. El extenso sistema membranoso de demarcación divide el citoplasma en zonas de plaquetas preformadas. Prosigue la síntesis proteica y aumenta el volumen celular, se pueden observar zonas plaquetarias independientes debidas a la dilatación del sistema membranoso de demarcación. La etapa final de desarrollo es la plaqueta madura.

Como la megacariopoyesis tiene lugar en el espacio medular extravascular las plaquetas deben de atravesar el endotelio y los sinusoides medulares. Las células desarrollan pseudópodos citoplásmáticos que manifiestan protusiones a través de las células de revestimiento endotelial, estas protusiones sufren fragmentación, hasta producir la plaqueta independiente. (1,2,3,7,11 Fig. 6)

En el hombre el tiempo requerido para la maduración del megacariocito, es de 4 a 5 días. (2) Además de que dos terceras partes de las plaquetas estan en circulación general, mientras que el otro tercio se halla en el depósito esplénico y la vida media de las plaquetas es de 9.5 ± 0.6 días. (1,2,11)

La médula ósea humana normal contiene alrededor de 6×10^6 megacariocitos/kilogramo peso corporal. Cada megacariocito libera probablemente varios miles de plaquetas. El número de plaquetas depende de la cifra de ploidia. (2,34)

Varios autores han hecho estimaciones de que se producen de 35 a 40.000 plaquetas por milímetro cúbico de sangre por día. (1,2,3,4)

Existe una reserva limitada de plaquetas que es capaz de proporcionar una compensación inmediata, que cuando hay pérdida, esta reserva podría proceder de las plaquetas depositadas en el bazo. La médula ósea tiene la capacidad de aumentar bruscamente la producción de plaquetas. (1,2)

La cuenta de plaquetas por el método indirecto muestra un rango normal de 200,000 a 400,000/mm³. (1) 437 - 586,000/mm³ (10), 150 - 500,000/mm³ (14), 500 - 900,000/mm³ (10,11). Para los métodos directos por la técnica de Brecher el rango es de: 140 - 400,000/mm³ (1,8,9,10,13), 200 - 500,000/mm³ (14). Por la técnica de Rees-Ecker el rango es de: 140 - 340,000/mm³ (10,11), 200 - 500,000/mm³ (14). Para los métodos semi-automatizados y electrónicos el rango es: 140 - 440,000/mm³ (10), 150 - 450,000/mm³ (12,13).

La cuenta de plaquetas debe de llevarse a cabo en todo paciente que presente cualquier problema hematológico, ya que el resultado del mismo es de valor diagnóstico. (14)

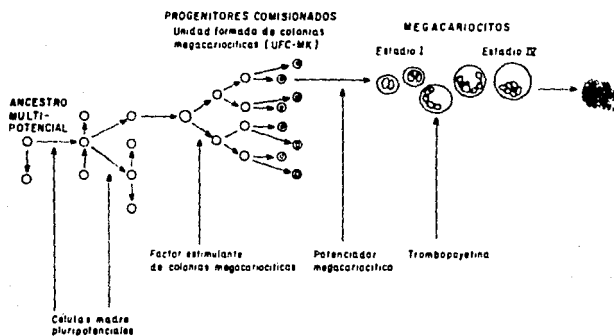


Fig 6- Megacariopoiesis

CLASIFICACION DE LAS ENFERMEDADES PLAQUETARIAS

Las enfermedades plaquetarias se pueden encontrar en una de las tres categorías siguientes:

I. Número insuficiente de plaquetas:

El descenso de las plaquetas es determinado por dos mecanismos:

- 1.- Producción insuficiente de plaquetas.
- 2.- Disminución de la supervivencia de plaquetas.

Púrpura Trombocitopénica

Las púrpuras trombocitopénicas se caracterizan por el sangrado capilar o la capacidad potencial de sangrar. El sangrado puede afectar las vísceras, piel y mucosas.

La púrpura trombocitopénica aguda corresponde a una situación patológica que no se vuelve a integrar en el paciente. Se expresa de forma permanente.(4)

La púrpura trombocitopénica crónica corresponde a una alteración genética o a una condición anormal del sistema inmunitario. Se observa por largos periodos.

Después que ocurre un estado trombocitopénico, los niveles de plaquetas aumentan muy lentamente y a veces no se observa variación.

Posteriormente las plaquetas aumentan por encima de los valores, lo cual indica que la producción de plaquetas ha aumentado para compensar la trombocitopenia. Esta respuesta está mediada por dos mecanismos:

- 1.- Un aumento en el tamaño de los megacariocitos posiblemente es resultado de un incremento en el promedio del número de núcleos por célula y de una producción mayor de plaquetas por cada megacariocito.
- 2.- El número de megacariocitos aumenta por el influjo de las células de depósito.

La trombocitopenia puede ser severa de $10,000$ a $20,000/\text{mm}^3$, media de $60,000$ a $100,000/\text{mm}^3$. Cuando la cifra de plaquetas es alrededor de $60,000/\text{mm}^3$, un individuo puede no tener manifestaciones de sangrado.

Trombocitopenía producida por una destrucción excesiva o secuestro de plaquetas.

1.- Debida a mecanismos inmunológicos.

- a) Púrpura trombocitopénica idiopática. Por el desarrollo de anticuerpos (IgG, IgM e IgA) o por la formación de complejos antígeno-anticuerpo.
- b) Púrpura trombocitopénica sintomática. Secundaria a hipersensibilidad a drogas u otros agentes.

2.- Debida a esplenomegalia y secuestro en el bazo.

El bazo es un sitio importante en la destrucción de plaquetas. Cuando hay una esplenomegalia masiva muchas células normales son atrapadas. La destrucción es acelerada por la exposición de la células secuestradas a los mecanismos líticos normales durante un período largo. Entre los ejemplos estan:

Trombocitopenia en enfermedad de Gaucher.
Mielofibrosis con metaplasia mieloide extramedular.
Síndrome de Felty's.
Esplenomegalia congestiva y
Septicemia con esplenomegalia.

3.- Debido a secuestro fuera del bazo.

Hemangiomas múltiples grandes. Secuestro de plaquetas en tumores, que desaparecen cuando el tumor es extirpado.

Hemangiomas cavernosos.
Coagulación intravascular diseminada. Las plaquetas quedan atrapadas en la red fibrina la cual es depositada en todo el sistema vascular.

4.- Debida destrucción mecanica.

Circulación extracorporeal de sangre, produce una destrucción moderada de plaquetas. Prótesis de válvulas cardiacas. La adhesión de válvulas artificiales produce trombocitopenia.

Hemorragias masivas. Puede ser por una transfusión pobre en plaquetas. Principalmente en hemorragias gastrointestinales.

Alcoholismo crónico. Se observa secuestro y efecto en las plaquetas circulantes.

Trombocitopenias por una producción deficiente de plaquetas.

A. Con cifra reducida de megacariocitos en médula ósea.

Trastornos infiltrativos de la médula ósea (tumores, tuberculosis miliaris, linfomas o tejidos fibrosos). Por reemplazo de la médula ósea normal, existiendo después otras complicaciones (esplenomegalia, hematopoyesis extramedular).

Aplasias o hipoplasias medulares que pueden ser ocasionadas por drogas potencialmente mielotóxicas y otros agentes químicos. Los megacariocitos son reducidos en número junto con las otras líneas celulares. Se pueden observar dos formas:

- 1.- Aguda que involucra un mecanismo inmunológico, cuadro de comienzo súbito, los megacariocitos son normales o elevados. Desaparición de la hemorragia al suspender el medicamento.
- 2.- Crónica causada por medicamentos o agentes químicos que pueden ocasionar anemia aplásica. En las formas agudas se ha podido postular la acción de alguno de los siguientes mecanismos inmunológicos: acción de un anticuerpo contra complejo formado por el medicamento y un componente de la membrana plaquetaria, depósito en la membrana plaquetaria de un complejo medicamento-anticuerpo o inducción a la formación de autoanticuerpos. En la forma crónica la acción tóxica es directa sobre los megacariocitos o un mecanismo inmunológico contra los mismos. Algunos medicamentos son la heparina, metildopa, nitroglicerina, aspirina, tolbutamida, fenilbutazona, estrógenos, estreptomina, penicilina, eritromicina, carbamazepina, entre otros. Como quimioterapéuticos: L-asparaginasa y los agentes alquilantes.

B. Con un número normal o aumentado de megacariocitos en médula ósea pero con trombopoyesis inefectiva.

Existe una correlación de megacariocitos y cuenta plaquetaria. Es posible que en algunos casos, los megacariocitos no producen plaquetas. Anormalidad funcional de plaquetas en enfermedades mieloproliferativas.

Trombocitopoyesis deficiente debida a mecanismos desconocidos. Se ha observado en varias enfermedades metabólicas tales como la anemia perniciosa, hemoglobinuria paroxismal nocturna, prematuridad, en trastornos hereditarios raros: Síndrome de Wiscott Aldrich, anomalía de May-Hegglin. Existe una interferencia metabólica en la trombopoyesis.

II.- Anormalidades en función plaquetaria.

Trombastenia.

Es una enfermedad hemorrágica autosómica recesiva, causada por una anomalía en la glicoproteína IIa-IIIb, de la membrana plaquetaria. Se presenta en grupos con alta

frecuencia de consanguinidad. El defecto funcional de las plaquetas es una agregación deficiente. Esta enfermedad además involucra la disminución del fibrinógeno, de ADP, de trombostenina, agregación nula o escasa, el tiempo de sangrado es prolongado, la cuenta de plaquetas es normal y la retracción del coágulo es deficiente o nula.

Trombocitopatías.

Congénitas:

TIPO I. Reacción de liberación deficiente.

La liberación de ADP es un prerequisite para las reacciones de agregación. Existen dos variantes: la primera es una fuerte liberación intrínseca de ADP no metabólico y la segunda es la "enfermedad de la poza de almacenamiento".

Debido a una deficiencia de gránulos densos asociados a ADP. La cuenta de plaquetas es normal, tiempo de sangrado prolongado, retracción del coágulo disminuida y agregación plaquetaria disminuida.

TIPO II. Síndrome de Bernard-Soulier.

Es una enfermedad hemorrágica autosómica recesiva con alto porcentaje de consanguinidad. Se caracteriza por tiempo de sangrado y de protrombina prolongados, cuenta de plaquetas de 140,000 a 180,000 / mm³, de las cuales la gran mayoría son gigantes. Presenta períodos variables de trombocitopenia relacionados con la disminución de ácido siálico en la membrana plaquetaria. Existe una anomalía en la glicoproteína la que es el receptor necesario para la fijación del FvW a la membrana plaquetaria. Se ha observado que las glicoproteínas V y IX, también se encuentran disminuidas en esta enfermedad.

TIPO III. Trombocitopenia trombopática.

Es una enfermedad autosómica dominante. Presenta una agregación inducida con la colágena disminuida y factor plaquetario 3 disminuido.

TIPO IV. Enfermedad de von Willebrand.

La enfermedad de von Willebrand puede ser causada por uno o varios defectos en las proteínas del FvW. En personas normales, el FvW en plasma, esta compuesto de multímeros de alto peso molecular que promueven la adhesión plaquetaria al subendotelio. El 75% del FvW se encuentra en plasma y el otro 25% en plaquetas, se muestra un sangrado moderadamente severo, epistaxis, en mujeres sangrado menstrual profuso, cuenta plaquetaria normal y tiempo de sangrado prolongado, agregación plaquetaria normal inducida con colágena, ADP, epinefrina y trombina pero anormal con ristocetina, niveles de factor VIII, fracción procoagulante y antigénica. Esta enfermedad tiene algunas variantes.

El tipo I esta caracterizado por una disminución cuantitativa del FvW, es un rasgo autosómico dominante. El tipo II también es una forma autosómica dominante y se caracteriza por una deficiencia selectiva de múltimeros de alto peso molecular del FvW, probablemente debido a una unión anormal de las subunidades múltimericas.

TIPO V. Afibrinógenemia congénita.

Es una enfermedad que presenta dos efectos hemostáticos: uno es la deficiente formación de fibrina y otro la función plaquetaria anormal. El fibrinógeno es necesario para la agregación inducida por ADP.

TIPO VI. Adhesividad plaquetaria disminuida.

Enfermedad que presenta sangrados anormales, tiempo de sangrado anormal y retención en columna de vidrio disminuida.

TIPO VII. Asociada con enfermedades o síndromes congénitos.

La disfunción plaquetaria se ha observado, en algunas enfermedades del tejido conectivo (Anomalía de May-Hegglin, Wiskott-Aldrich) y en albinismo.

TIPO VIII. Agregación ausente inducida por colágena.

Adquiridas:

Ocasionada por drogas. La más común es la aspirina que inhibe significativamente la agregación plaquetaria. Causada por una liberación defectuosa de ADP plaquetario de almacenamiento y de serotonina así como de factor plaquetario 3 y 4. Probablemente una interferencia en el metabolismo de las prostaglandinas.

Secundaria a otras enfermedades.

En la Uremia esta acompañada por defectos hemostáticos múltiples, dos de los cuales son de importancia primordial: trombocitopenia y trombocitopatía. La trombocitopatía es reportada en varias enfermedades mieloproliferativas (Leucemia Granulocítica Crónica, Mielofibrosis, Policitemia Vera y Trombocitemia). Función plaquetaria defectuosa en Cirrosis Hepática, Lupus Eritomatoso Sistemico, Anemia Perniciosa e Inmunoglobulinopatías.

III.- Número excesivo de plaquetas.

Los términos Trombocitosis y Trombocitemia se aplican cuando la cuenta de plaquetas es elevada mayor de $500,000/\text{mm}^3$ hasta millones/ mm^3 .

La cuenta de plaquetas puede producir sangrado anormal o trombosis. El sangrado

anormal resulta de una combinación de trombocitopatía e interferencia con generación de tromboplastina. La cuenta plaquetaria alta en trombosis todavía se discute. La liberación de grandes cantidades de fosfatasa ácida y de potasio de la gran masa plaquetaria ocasiona niveles séricos elevados de estas sustancias. El término Trombocitosis se usa cuando la cuenta plaquetaria es secundaria a otra enfermedad, probablemente sea transitoria y puede ser hasta reversible cuando la causa sea eliminada. Mientras que Trombocitemia se utiliza cuando la cuenta plaquetaria refleja una proliferación megacariocítica primaria, siendo un síndrome mieloproliferativo.

1. Trombocitosis.

- a) Secundaria a reacciones inflamatorias. Fiebre Reumática Aguda, Artritis Reumatoide. Infecciones Intestinales Inflamatorias Crónicas y Cirrosis Hepática.
- b) Secundaria a otras enfermedades hematológicas. Se ha observado después de hemorragias severas, Anemia Ferropriva, Anemia Hemolítica y en el estado de recuperación después de trombocitopenia.
- c) Secundaria a procesos malignos. Se ha observado en Neoplasmas ocultos.
- d) Postoperatoria. Se ha observado moderada en cirugías mayores.
- e) Postesplenectomía.
- f) Respuesta a la administración de Vincristina. La Vincristina acelera la producción plaquetaria.

2. Trombocitemia.

- a) Trombocitemia esencial. Es cuando la mayor proliferación implica la trombopoyesis. La proliferación no solo se limita a megacariocitos, usualmente involucra leucocitos.
- b) Policitemia Vera.
- c) Leucemia Granulocítica Crónica.
- d) Mielofibrosis.

Es parte de la proliferación en los síndromes mieloproliferativos.

Las plaquetas son considerablemente más difíciles de contar que los eritrocitos y los leucocitos, tal vez por el tamaño pequeño la adhesión a superficies extrañas y la rápida agregación después de un pequeño trauma.

En general los métodos para las cuentas de plaquetas se pueden dividir en 4 grupos:

- 1.- Directos o con hemocitometro en el que la sangre total es diluida y las plaquetas son contadas, como los leucocitos o eritrocitos.
- 2.- Indirectos en los cuales los glóbulos rojos son directamente ennumerados y la proporción de plaquetas es determinada en un frotis sanguíneo.
- 3.- Semiautomatizados en los que el número de plaquetas determinado en un contador de partículas electrónico.
- 4.- Electrónico totalmente automatizado.

Bull (1965) introdujo el método automatizado en el cual se utiliza plasma rico en plaquetas (PRP), siendo las plaquetas ennumeradas por medio de un contador de partículas electrónico. Estos métodos permiten una mayor precisión en el conteo, pues el coeficiente de variación de duplicados de las muestras es de 1.2-4%. Los errores significativos pueden resultar de variaciones impredecibles en el porcentaje de plaquetas registrado en el PRP. Este método requiere gran cantidad de equipo, pero utiliza menos tiempo comparado con los métodos manuales, además se pueden realizar más de 30 cuentas plaquetarias en un día. Los métodos totalmente automatizados, utilizan muestras de sangre total colectadas en etilidiaminotetracético (EDTA) , diluidas y hemolizadas en Urea 2 M, las plaquetas son ennumeradas por medio de un contador de partículas óptico que emplea el principio de microscopía de campo oscuro invertida. La precisión del conteo de plaquetas en este instrumento es igual o mayor que el obtenido por el método semiautomatizado. Las desventajas de estos instrumentos son: el gran costo, el tamaño y el considerable tiempo de mantenimiento. El costo puede ser justificado únicamente por un gran volumen de trabajo.

Con el surgimiento de los métodos directos se originaron las técnicas indirectas las cuales son inseguras, totalmente imprecisas y por consiguiente no son recomendables. Los métodos indirectos son el de Fonio, Olef y Dameshek, una variante es el frotis sanguíneo, realizado de sangre obtenida por punción venosa. La cuenta de plaquetas por este método tienden a ser más altas que las obtenidas por métodos directos. Se atribuye en parte a la tendencia de los eritrocitos a concentrarse en las orillas de los frotis, esto da una proporción falsamente alta de plaquetas-eritrocitos en el area central que es donde se realiza la cuenta.(1,10,12,14)

HIPOTESIS.

- 1.- Al cuantificar las plaquetas en una muestra por los 4 métodos no debe haber diferencias significativas en los resultados obtenidos.
- 2.- Los valores que se obtengan de las cuentas plaquetarias por cada uno de los métodos deben ser similares a los valores de referencia.
- 3.- El método óptimo para la cuantificación de plaquetas es el Coulter ThromboCounter-C, por su mayor reproducibilidad y menor variabilidad en la manipulación de la muestra.

OBJETIVOS:

- 1.- Estandarización de métodos directos: Brecher y Rees-Ecker, un método semi-automatizado: Coulter Thrombo Counter C y comprobación por un método indirecto: Frotis sanguíneo para la cuantificación de plaquetas.
- 2.- Obtención de valores de referencia para número de plaquetas en la población infantil que ingresa al Instituto Nacional de Pediatría de México,D,F.,
- 3.- Determinación del método óptimo para cuantificar plaquetas en la población infantil.
- 4.- Cuantificación de plaquetas por cuatro métodos;Rees-Ecker, Brecher, Coulter Thrombo Counter-C y Frotis Sanguíneo en la población infantil con problemas hematológicos.

MATERIAL Y METODOS

Se coleccionaron por venipuntura 397 muestras de sangre total que se distribuyeron en 3 grupos:

Grupo A, constituido por 153 adultos sanos.

Grupo B, integrado por 103 niños que asistieron a la Consulta Externa del Instituto Nacional de Pediatría, elegidos por no presentar alteraciones hematológicas.

Grupo C, formado por 142 niños con enfermedades hematológicas. Este grupo se dividió en las siguientes categorías:

1. Púrpuras trombocitopénicas: 92 pacientes, 64.8 %.
2. Leucemias agudas: 20 pacientes, 14.1 %.
3. Anemias aplásicas: 15 pacientes, 10.6 %.
4. Otras enfermedades: 15 pacientes, 10.6 %.

A cada una de las muestras se les cuantificarán las plaquetas por los tres métodos y además comprobándose por el método indirecto (frotis sanguíneo).

Toma de muestra

Para la exacta enumeración de las plaquetas es de gran importancia la toma apropiada de la muestra de sangre. Una toma deficiente de la muestra frecuentemente produce aglutinación de plaquetas y cuando esto ocurre se reduce mucha la precisión del conteo. La punción debe hacerse sin dificultad y el tiempo entre la toma y la anticoagulación o la dilución de la sangre (si es capilar), debe reducirse al mínimo. Para obtener resultados óptimos se deben emplear agujas del calibre 20, jeringas de plástico y tubos de plástico o vidrio conteniendo EDTA disódico al 15% como anticoagulante.

La cuenta de plaquetas debe realizarse durante de 1- 4 primeras horas después de haber tomado la muestra y es preferente realizarlas en sangre venosa, debido a que es una muestra más representativa de la condición existente en la circulación, además el conteo se puede repetir con la misma muestra, si es necesario.

Conteo semiautomatizado en el Coulter Trhombocounter-C

Determina el número de plaquetas suspendidas en un líquido conductor, pasando la suspensión a través de un flujo de corriente eléctrica por una abertura. El paso de las plaquetas a través de la abertura es por el cambio de resistencia de los electrodos que se encuentran a ambos lados de la abertura. Esto produce un cambio de voltaje de corta duración, la magnitud del cambio de voltaje es dependiente del tamaño de partícula, objetos mayores o menores que las plaquetas pueden ser reconocidos y excluidos de la cuenta.

Material

Tubos de plástico para sedimentación.

Viales con capacidad de 20 ml.

Capilares de 3.33 ml o 6.66 ml.

Solución diluyente (Isoton II):

Cloruro de sodio ---- 7.93 g.

EDTA disódico ----- 0.38 g.

Cloruro de potasio -- 0.40 g.

Fosfato monosódico -- 0.19 g.

Fosfato disódico ---- 1.95 g.

Solución limpiadora (ISOTERGE II):

Cloruro de sodio ---- 7.51 g.

Cloruro de potasio -- 0.38 g.

Fosfato monosódico -- 0.18 g.

Fosfato disódico ---- 1.85 g.

EDTA disódico ----- 0.36 g.

Alquifenol polioxietileno --- 14.9 g.

Coulter ThromboCounter-C

Sangre Venosa.

Método

- 1.- Encender el aparato
- 2.- Verificar que los accesorios se encuentren en condiciones óptimas de trabajo (bomba de vacío, reservorio auxiliar y trampa de vacío).
- 3.- Colocar en la plataforma un vial con diluyente.
- 4.- Verificar que la abertura del tubo sea visible a través del microscopio.
- 5.- Observar que MONITOR presente la línea horizontal.
- 6.- Abrir la llave de vacío. El mercurio debe caer correctamente justo abajo del tubo de coalescencia. La lectura numérica debe de dar cero.
- 7.- Cerrar la llave de vacío. El mercurio debe de subir a través de la sección de conteo del manómetro alrededor de 8 segundos.
- 8.- Los seis dígitos de registro no deben de mostrar un número mayor de 150.
- 9.- Llenar un tubo de sedimentación con la sangre bien mezclada y colocarlo en posición vertical.
- 10.- Manejar el tubo de sedimentación cuidadosamente de manera que no se mezclen las células rojas sedimentadas, dejando un plasma rico en plaquetas (PRP). Después cortar la porción de las células rojas.
- 11.- Llenar una pipeta de 3.33 μ l o 6.66 μ l con el PRP, y adicionar 10 ml o 20 ml de diluyente en un vial respectivamente.
- 12.- Mezclar la dilución inmediatamente después de la adición del plasma y realizar la cuenta de plaquetas.
- 13.- Determinar el hematocrito de la muestra.
- 14.- Realizar la cuenta de plaquetas como sigue:

- a.- Colocar en la plataforma el vial con el plasma diluido y sumergir hasta el fondo la abertura del tubo y el electrodo externo.
- b.- Colocar el valor del hematocrito girando el selector .
- c.- Abrir la llave de vacio. Cerrar la llave cuando la lectura numérica sea cero, los pulsos celulares sean visibles en el Monitor.
- d.- Seleccionar correctamente el hematocrito y después presionar COMPUTE. Registrar la cuenta de plaquetas en sangre total.
- e.- Repetir la operación.
- f.- Quitar la muestra y colocar un vial con solución limpiadora hasta sumergir el electrodo externo y el tubo de abertura. Abrir la llave de vacio hasta que la solución limpiadora este dentro de la cristalería. Lavar el exterior del tubo de abertura.
- g.- Apagar el aparato.

El instrumento cuenta las plaquetas aproximadamente en 8 segundos y después se detiene. El valor mostrado es la cuenta de plaquetas en plasma y puede ser entre 1,000 hasta 40,000. Si la lámpara de alarma flashea intermitente en la lectura numérica la amplitud celular contada puede ser mayor de 1,000 (la muestra, además contiene muchas células rojas o plaquetas grandes anormales), o la cuenta de plaquetas puede ser fuera del rango del instrumento.

Brecher

Es un método directo en el cual las plaquetas son contadas en un hemocitometro (cámara de Neubauer) por medio de un microscopio de contraste de fases. El diluyente, Oxalato de Amonio al 1% tiene la capacidad de hemolizar a los glóbulos rojos, proporcionando un fondo claro.

Material.

Oxalato de Amonio al 1%.

Microscopio óptico.

Pipetas de Thoma para glóbulos rojos y/o blancos.

Hemocitómetro.

Caja de Petri con pepel húmedo.

Agitador mecánico.

Sangre venosa anticoagulada con EDTA al 15%.

Método

- 1.- Mezclar perfectamente la muestra.
- 2.- Aspirar sangre en una pipeta de Thoma de glóbulos rojos hasta la marca de 1.
- 3.- Llenar con Oxalato de Amonio al 1% hasta la amrca de 101. Para obtener una dilución 1:100.
- 4.-Agitese la pipeta durante 3-5 minutos aproximadamente.
- 5.- Descartar las cuatro primeras gotas.
- 6.- Llenar los dos lados del hemocitometro.
- 7.- Dejar sedimentar la preparación en una cámara húmeda durante 10 a 20 minutos.
- 8.- Contar las plaquetas de los 4 cuadrados de las esquinas y el cuadro central de cada uno de los dos lados del hemocitómetro. Si el número de plaquetas es muy pequeño se deben de examinar los 25 cuadrados del cuadro central, para cada lado del hemocitómetro.

Para esta técnica es recomendable el uso de microscopía de con traste de fases, ya que supera la dificultad de distinguir las plaquetas de partículas extrañas.

El Oxalato de Amonio al 1% se debe mantener en refrigeración y filtrarse cada vez que se va a utilizar y descartarlo al ponerse turbio.

Rees-Ecker

Es un método directo que tiñe las plaquetas, permitiendo posteriormente contarlas en un microscopio óptico.

Material.

Pipetas de Thoma para eritrocitos.

Microscopio óptico.

Hemocitómetro.

Cámara húmeda.

Agitador mecánico.

Líquido de dilución:

Citrato de sodio ----3.8 g.

Formaldehído al 40% --- 0.2 ml.

Azul de cresil brillante --- 0.1 g.

Agua destilada ----- 100 ml.

Se debe filtrar y mantener en refrigeración.

Método.

- 1.- Mezclar perfectamente la muestra.
- 2.- Aspirar sangre con una pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca de 1.
- 3.- Aspirar rápidamente el diluyente hasta la señal de 101.
- 4.- Mezclar de 3-5 minutos aproximadamente en un agitador mecánico.
- 5.- Desechar las 4 primeras gotas.

- 6.- Llenar los dos lados del hemocitometro.
- 7.- Dejar sedimentar de 10 a 20 minutos en una cámara húmeda.
- 8.- Después de transcurrido el tiempo contar las plaquetas al igual que en el método de Brecher. El conteo se realiza haciendo un ajuste fino del la luz del microscopio, que revela las características refráctiles y la apariencia plateada de las plaquetas.

Por este método las plaquetas se tiñen de lila.

CALCULO PARA LOS METODOS DIRECTOS.

$$\frac{\text{Número de células contadas} \times \text{dilución}}{0.004 \times \text{No. de cuadrados contados}} = \frac{\text{No. de plaquetas contadas}}{\text{x mm}^3 \text{ de sangre.}}$$

Método Indirecto (frotis sanguíneo).

El recuento diferencial es el estudio cualitativo y cuantitativo de las plaquetas y el porcentaje de los diferentes tipos de leucocitos, además de la edad y anomalías de los eritrocitos. Para realizar un recuento diferencial es necesario la elaboración de un frotis el cual se puede hacer en un portaobjetos o cubreobjetos.

Es útil para comprobar el grado de precisión del recuento y permite tener una idea sobre la morfología y los aumentos y disminuciones de estos elementos sanguíneos.

Material:

Sangre venosa con anticoagulante.

Portaobjetos.

Colorante de Wright y

Microscopio óptico.

Método

- 1.- En las primeras tres horas después de haber tomado la muestra, se coloca una gota de sangre en un portaobjetos.
- 2.- Se realiza un frotis.

3.- La preparación se tiñe con colorante de Wright.

4.- En el microscopio se inspeccionan algunos campos a inmersión, calculando el número de plaquetas. Se debe observar que las plaquetas estén distribuidas homogéneamente (no aglutinadas en algún área del frotis), además de la morfología y tamaño de las mismas.

5.-Fórmula para los cálculos:

a. Se revisan 4 campos diferentes del extendido.

b. En cada campo se cuentan 100 eritrocitos y se registra el número de plaquetas que se observan en esa cuenta.

c. Después se aplica la fórmula siguiente,

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = \text{Plaquetas}/100 \text{ eritrocitos} \times \text{hematocrito} \times 1000.$$

El frotis se debe hacer en un portaobjetos muy bien lavados, con agua y jabón, después se enjuagan con agua destilada o desionizada y por último se colocan en un recipiente con alcohol durante unas horas y se secan con un trapo limpio y seco.

La comparación estadística se realizó por el análisis de varianza de 1 criterio de Fisher y por correlación de Pearsón.

RESULTADOS

En las tablas 1 y 2 se señalan los promedios y los valores de dos desviaciones estandar obtenidas por los cuatro métodos en los grupos A y B.

En la tabla 3 se muestran los rangos de plaquetas obtenidos en el grupo C. El mayor porcentaje de las cuentas se encontró en el rango de 1,000 - 75,000 / mm³, pues en los métodos directos fue de 37.3%, en el semiautomatizado de 34.5% y en el frotis sanguíneo 24.6%.

En los grupos A y B, las cuantificaciones hechas por el Coulter ThromboCounter-C, se encontrarán fuera de los valores de referencia, pues tuvieron límites inferiores menores. En el grupo B en todos los métodos los límites superiores fueron ligeramente más altos.

La correlación de los datos al comparar cada uno de los métodos con el de Brecher (método de referencia), en los 3 grupos, se muestran en las gráficas 1-9.

Hubo una variación en el método de Brecher, el cual consistió en el cambio de microscopía de contraste de fases por microscopía óptica, ya que no se contaba con el equipo especial requerido para contraste de fases, la ventaja de esta, es minimizar la dificultad para distinguir las plaquetas de otras partículas.

Los histogramas (Figuras 10 - 17) muestran la distribución de los datos en los grupos A y B.

El analisis de varianza mostró que hubo diferencias altamente significativas entre los grupos A y B. Lo mismo sucedió al analizar en el grupo A el Coulter ThromboCounter-C ($p < 0.001$). En el grupo B también hubo diferencias significativas ($p < 0.01$), al comparar el método semiautomatizado.

TABLA 1

PARAMETROS ESTADISTICOS DE LA CUANTIFICACION DE PLAQUETAS
REALIZADAS POR LOS CUATRO METODOS EN EL GRUPO A.

METODO	PROMEDIO 10 /mm	DESVIACION ESTANDAR	+ 2 D.S.	
			L. Inf	L. Sup.
BRECHER	248.7	65.9	116.9	380.5
REES-ECKER	257.2	63.6	130.0	384.4
COULTER THROMBOC-C	231.7	67.3	79.0	348.4
FROTIS SANGUINEO	279.2	58.6	162.0	396.4

TABLA 2

PARAMETROS ESTADISTICOS DE LA CUANTIFICACION DE PLAQUETAS
REALIZADAS POR LOS CUATRO METODOS EN EL GRUPO B.

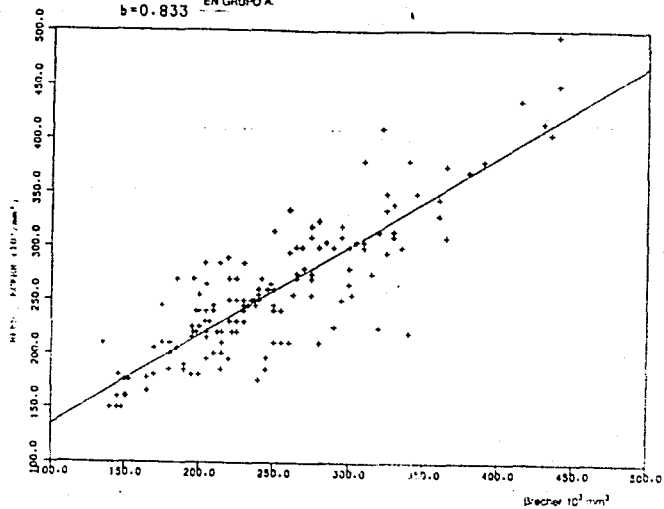
METODO	PROMEDIO 10 /mm	DESVIACION ESTANDAR	+ 2 D.S.	
			L. Inf	L. Sup.
BRECHER	306.5	81.5	143.5	469.5
REES-ECKER	311.3	80.4	150.4	472.2
COULTER THROMBOC-C	296.7	94.3	108.1	485.3
FROTIS SANGUINEO	328.3	75.5	177.2	479.2

TABLA 3

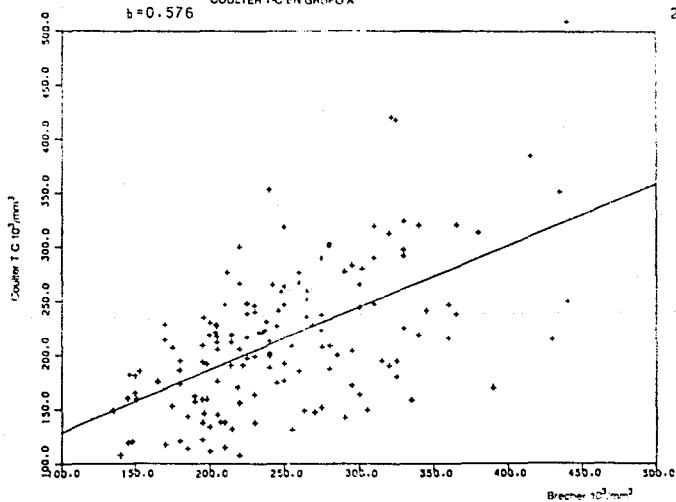
INTERVALOS OBTENIDOS EN LA CUENTA DE PLAQUETAS POR LOS
CUATRO METODOS EN EL GRUPO C.

METODO	INTERVALO ($10^3/\text{mm}^3$)	
	L. INF.	L. SUP.
BRECHER	4	700
REES-ECKER	2	740
COULTER THROMBOC-C	9	656
FROTIS SANGUINEO	10	500

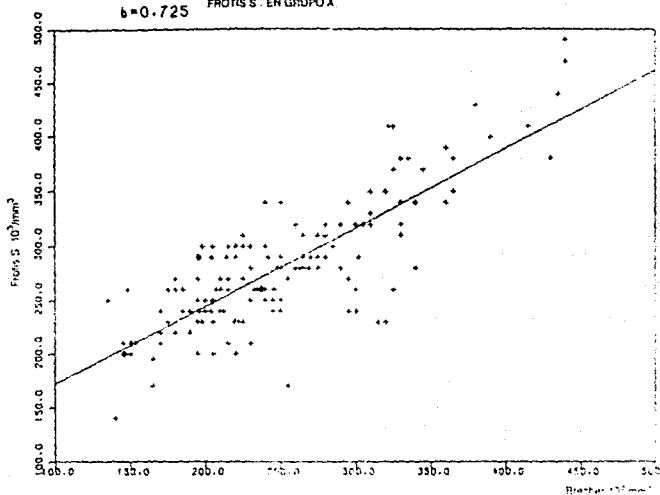
$a = 50.559$ CORRELACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR BRECHER Y REES ECKER
 $b = 0.833$ EN GRUPO A



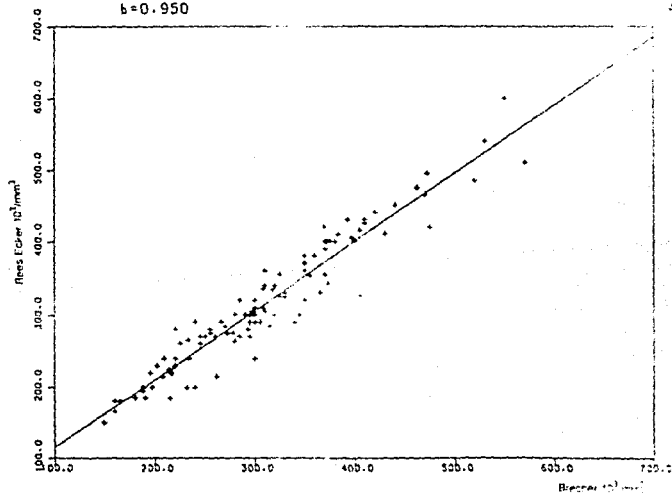
$a = 71.410$ COMPARACION DE LAS CUENTAS PLAQUETARIAS REALIZADAS POR BRECHER +
 $b = 0.576$ COULTER T-C EN GRUPO A



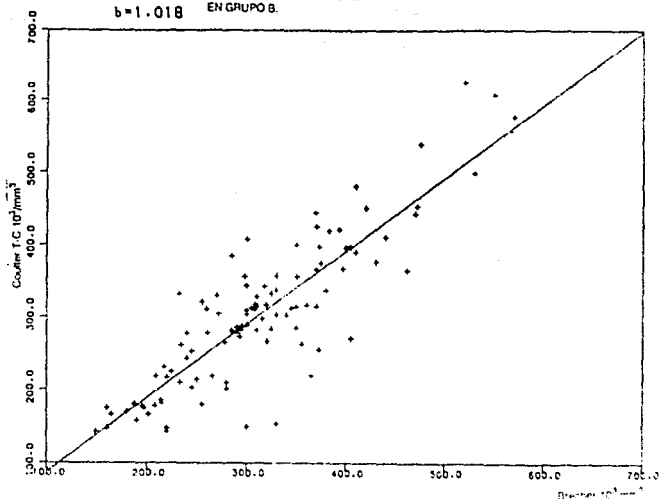
$a = 99.354$ COMPARACION DE LAS CUENTAS PLAQUETARIAS OBTENIDAS POR BRECHER Y
 $b = 0.725$ FROTIS S. EN GRUPO A



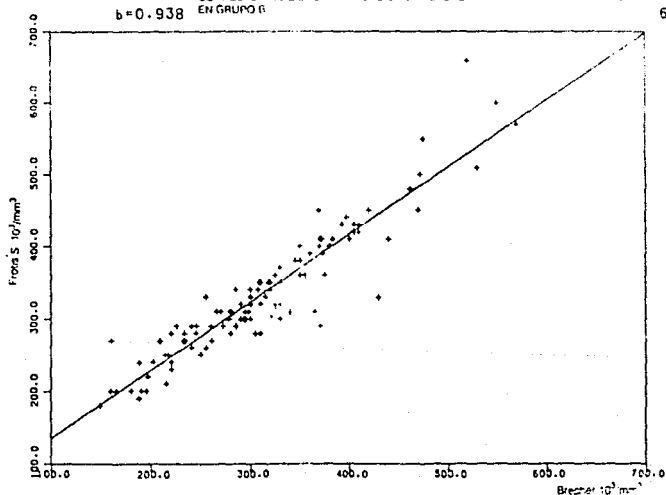
$a = 20.087$ COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR BRECHER Y REES-EDER
 $b = 0.950$ EN GRUPO B



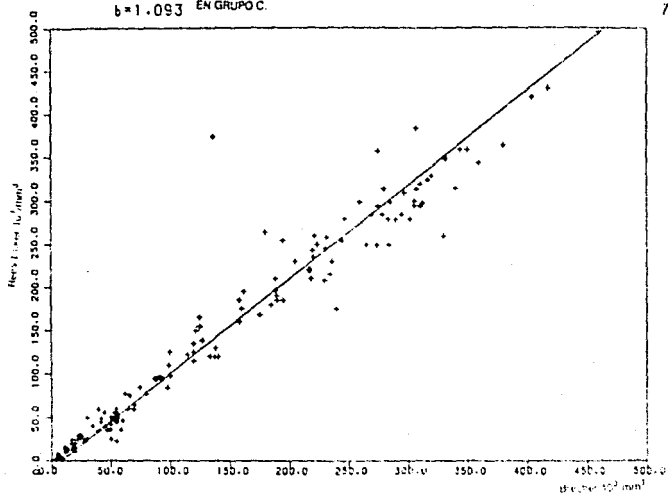
$a = -14.373$ COMPARACION DE LAS CUENTAS PLAQUETARIAS POR BRECHER Y COULTER T-C
 $b = 1.018$ EN GRUPO B.



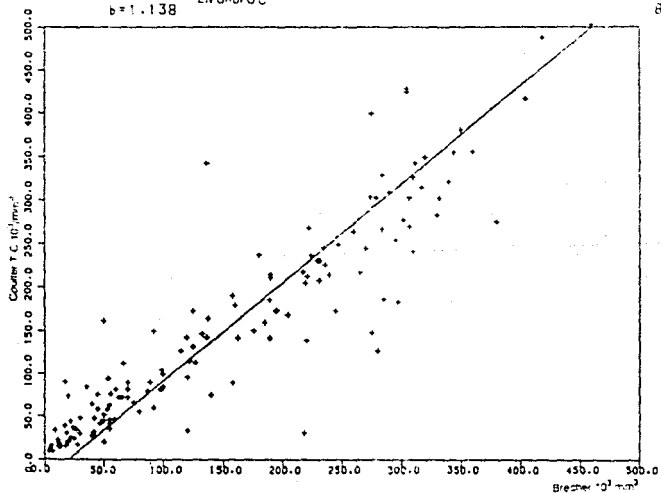
$a = 41.729$ CORRELACION DE LA CUANTIFICACION DE PLAQUETAS POR BRECHER Y FROTIS S
 $b = 0.938$ EN GRUPO B.



$r = -0.955$ COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR BRECHER Y REES-ECKER
 $b = 1.093$ EN GRUPO C.



$r = -0.529$ CORRELACION DE LAS CUENTAS PLACUETARIAS POR BRECHER Y COUTLER T.C.
 $b = 1.138$ EN GRUPO C.



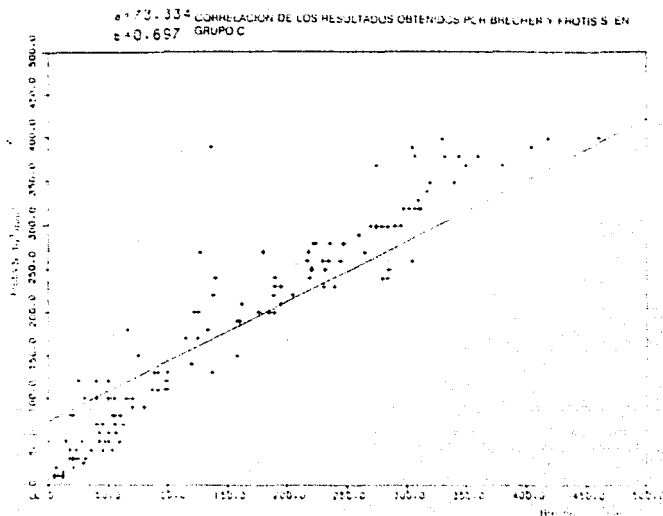


Fig.10 CUENTA DE PLAQUETAS EN GRUPO A.

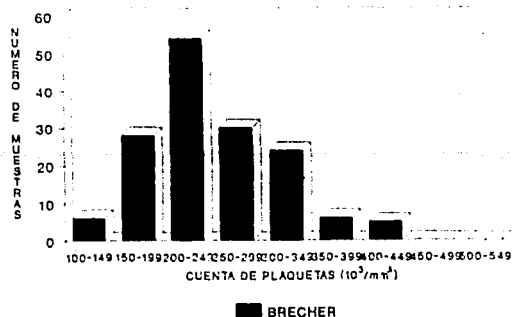


Fig.11 CUENTA DE PLAQUETAS EN GRUPO A.

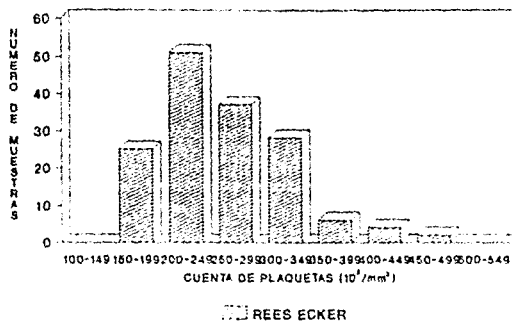


Fig.12 CUENTA DE PLAQUETAS EN GRUPO A.

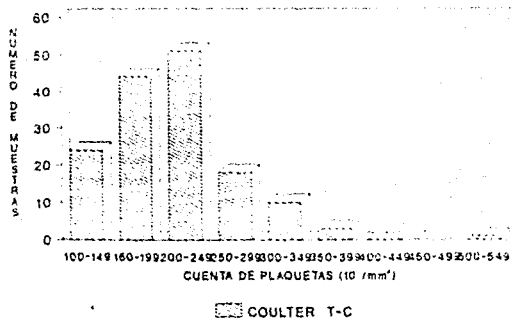


Fig.13 CUENTA DE PLAQUETAS EN
GRUPO A.

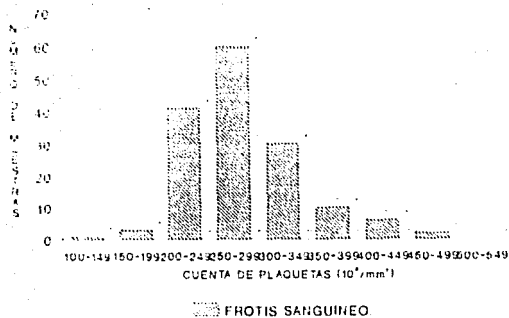


Fig. 14 CUENTA DE PLAQUETAS EN
GRUPO B.

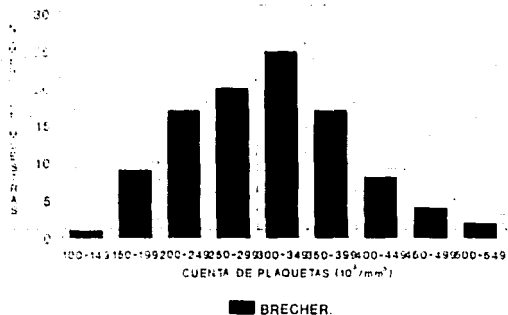


Fig.15 CUENTA DE PLAQUETAS EN GRUPO B.

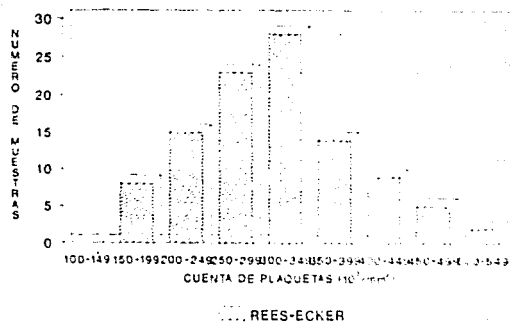


Fig.16 CUENTA DE PLAQUETAS EN GRUPO B.

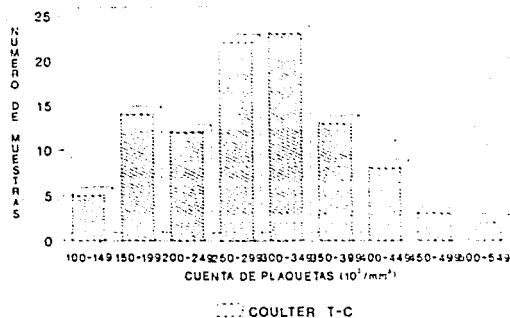
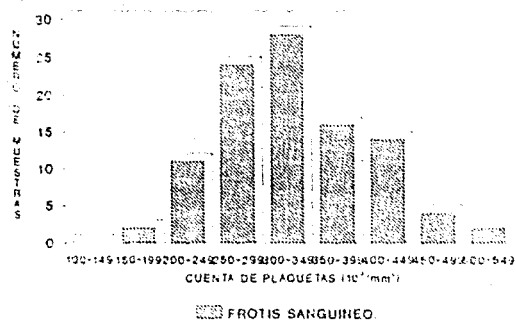


Fig.17 CUENTA DE PLAQUETAS EN GRUPO B.



DISCUSION.

Al comparar los resultados obtenidos por los cuatro métodos para la cuantificación de plaquetas en los grupos A y B, se encontró que existían diferencias altamente significativas entre ellos, ($p < 0.001$), ya que en el grupo A los valores promedio resultaron más bajos que en B, (por ejemplo en Coulter ThromboCounter-C; $A = 213.7 \times 10^3/\text{mm}^3$ mientras que en $B = 296.7 \times 10^3/\text{mm}^3$).

El método semiautomatizado en los grupos A y B, mostró resultados más bajos al compararse con el método de referencia, (Brecher) obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($A p < 0.001$ y $B p < 0.01$).

Mientras que al comparar los resultados obtenidos por los otros dos técnicas (Rees Ecker y Frotis sanguíneo), no hubo diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a los valores promedio en el grupo A los valores más altos se observaron en el frotis sanguíneo (método indirecto) $X = 279.2 \times 10^3/\text{mm}^3$, con un límite del 95% de $162-396.4 \times 10^3/\text{mm}^3$. Para Rees-Ecker la $X = 257.2$ con un límite de confianza de $130-384.4 \times 10^3/\text{mm}^3$. En Brecher fue $X = 248.7 \times 10^3/\text{mm}^3$ con 95% de confianza de $116.9-380.5 \times 10^3/\text{mm}^3$. Mientras que en el semiautomatizado la $X = 213.7 \times 10^3/\text{mm}^3$ con un intervalo de confianza de $79-348.4 \times 10^3/\text{mm}^3$.

En el grupo B al igual que en el grupo A los valores más altos se obtuvieron por el frotis sanguíneo, $X = 328.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ con un rango de $177.2-479.2 \times 10^3/\text{mm}^3$. En los métodos directos los valores promedio y límites de confianza (95%) fueron: Rees-Ecker $X = 311.3$; $150.4-472.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ y para Brecher, $X = 306.5$; $143.5-469.5 \times 10^3/\text{mm}^3$. Por último los valores para el Coulter Thrombo Counter-C fueron los más bajos $X = 296.7$ y un límite del 95% de $108.1-485.3 \times 10^3/\text{mm}^3$.

Sin embargo la literatura (1,7,8,10,11,12,13,14,) menciona como límite inferior desde $140-200 \times 10^3/\text{mm}^3$ y como límite superior de $340-500 \times 10^3/\text{mm}^3$. A excepción del método indirecto con rangos de valores más altos. Posiblemente esto se deba a la dificultad de tener un criterio con el cual se pueda establecer la variación del número de plaquetas de campo a campo, debido a que las células están distribuidas al azar, por tal motivo para la cuantificación de plaquetas solo se pueden utilizar frotis sanguíneos con una distribución uniforme.(9)

Por el método indirecto el error mínimo es de 14% cuando se cuentan las plaquetas en 1000 eritrocitos y adicionando el error de la cuenta de los glóbulos rojos que es alrededor de 8% el cual se requiere para obtener el nivel de plaquetas/ mm^3 . El error combinado es del 16%.(9) Sin embargo el recuento de plaquetas obtenido por métodos directos, semiautomatizados o electrónicos siempre debe corroborarse con el número de plaquetas observadas en el frotis sanguíneo. En los métodos directo el error mínimo del recuento depende del número de pipetas usadas, el número de cámaras examinadas y el número de células contadas, teniendo como error mínimo de 22% (8,9,12,13,16).

En el método semiautomatizado las cuentas de plaquetas son reproducibles de un 4-7.6%. (12,13,15,16)

Para el Coulter ThromboCounter-C sus límites inferiores estuvieron por abajo de los valores de referencia.

Los métodos directos también estuvieron ligeramente abajo. Mientras que en el límite superior todos los métodos, tanto en grupo A como en intervalo de referencia. Esto demuestra que las cuentas plaquetarias en el grupo A fueron más bajas que en el grupo B. En cuanto a la correlación de Brecher con los otros tres métodos en el grupo A se obtuvieron coeficientes de correlación de 0.59 - 0.96, en el grupo B de 0.87-0.95 y en el grupo C de 0.86-0.99. Esto indica que en los tres grupos la mayor correlación fue entre Brecher y Rees-Ecker, y la menor correlación fue con el ThromboCounter-C del grupo A. En el grupo C fue donde se obtuvo una mayor comparación de los métodos. (Gráficas 1-9).

Las dificultades que se tuvieron en el método semiautomatizado fueron las siguientes:

- 1.-En el aparato todos los pasos son manuales, excepto la cuenta de plaquetas (conteo electrónico de partículas), que permite una cuenta selectiva de plaquetas en una abertura que excluye pulsos grandes producidos por eritrocitos o leucocitos y pequeños pulsos producidos por fragmentos celulares. Unicamente cuenta los pulsos intermedios producidos por las plaquetas. Además que se requiere de habilidad en el uso del microcapilar de 3 μ l. (16) Además muestras hemolizadas pueden dar recuentos falsamente altos, pues los fragmentos que miden aproximadamente 1 μ se cuentan como plaquetas. Si el plasma rico en plaquetas llega a contaminarse con eritrocitos los recuentos pueden ser falsamente bajos, debido a que no se pueden detectar las plaquetas que atraviesan el orificio simultáneamente con los glóbulos rojos. Otro factor que influye en la cuenta plaquetaria son las plaquetas gigantes, ya que cuando estas son abundantes se excluyen del umbral superior, determinando cuentas falsamente bajas. (13,20)
- 2.-La solución estandar de referencia, permite saber si el aparato se encuentra en óptimas condiciones de trabajo, esto no fue posible pues no se contaba con el estandar. Ocasionando que el manejo del aparato se realizara de acuerdo a los umbrales que indica el fabricante.
- 3.- El exceso de plaquetas en plasma acarreo por los eritrocitos, durante su sedimentación, esto puede ser corregido por el hematocrito, permitiendo así una lectura de plaquetas en sangre total y una cuenta de plaquetas en plasma cuando no ha sido corregida. (16) Al analizar los datos obtenidos por el Coulter ThromboCounter-C se observó una relación inversamente proporcional entre la cuenta de plaquetas en plasma y el hematocrito, pues se encontró que algunas cuentas de plaquetas en plasma fueron similares en los grupos A y B pero al hacer la corrección con el hematocrito y obtener la cuenta en sangre total los valores diferían, pues a mayor hematocrito menor cuenta de plaquetas en sangre total. Estas observaciones pueden justificar las dis-

crepancias encontradas en los grupos, pues en el grupo A, los valores de hematocrito oscilaban entre 45 - 56, mientras que en B fueron de 30 - 44.

- 4.-El plasma rico en plaquetas se obtuvo por el método de sedimentación, los rangos de tiempo variaron en los tres grupos (A,B y C). En A el rango fue de 30'-45', en B de 15'-35' y en C desde 15'-25', por la influencia del valor del hematocrito. Otros factores limitantes para la obtención de PRP son los inherentes al método: las cantidades anormales de proteínas, temperatura, inclinación del tubo de sedimentación y presencia de crioaglutininas plaquetarias. (1,2,7,10,11,13,15,17,18,20,30)

En material y métodos se mencionó que el lavado de material tanto cristalería (portaobjetos, pipetas de glóbulos rojos hemocitómetros y frascos) como accesorios del Coulter ThromboCounter- C debe ser escrupuloso, de lo contrario, se facilita la adherencia de las plaquetas a partículas extrañas, tales como, cristales de algunas sales utilizadas para preparar los diluyentes, colorantes, bacterias, hongos, fragmentos de eritrocitos y leucocitos (8,10,11,12,13,14,15,23,24). Se observó que la punción venosa puede inducir agregación plaquetaria por trauma mecánico o contaminación tisular o bien la adherencia de plaquetas a superficies extrañas. (12,13)

Además la cantidad inadecuada de anticoagulantes (EDTA, Citrato y Heparina) producen agregación plaquetaria, aunque a diferente tiempo después de la colección de la muestra, (21) ocasionando pseudotrombocitopenia (11,19,21,30,31), que es una reacción de anticuerpos específicos de plaquetas con plaquetas en presencia de EDTA. Los anticuerpos en su mayoría son IgG y frecuentemente IgA e IgM.(30) Cuentas plaquetarias falsamente bajas se pueden deber a satelosis plaquetaria, aglutininas frías plaquetarias, plaquetas gigantes, coagulación parcial de la sangre por obtención inapropiada de la sangre. (11,30) Por el contrario se ha observado que cuentas falsamente altas son producidas por fragmentos de células leucémicas. (32,33)

El método de referencia para la cuenta de plaquetas fue Brecher (1950) por ser el método más ampliamente utilizado en la comparación con métodos semiautomatizados y electrónicos (17,18,19,22,23,24,26,27,29).

En los métodos directos se utiliza microscopía óptica, pues no se contaba con el equipo especial requerido para la microscopía de contraste de fases que es la adecuada para la técnica de Brecher. El inconveniente de la microscopía óptica es la dificultad para visualizar las plaquetas principalmente en el método de Rees-Ecker (1923). Cuando se cuantifican por esta técnica, el observador debe de hacer un ajuste fino en el microscopio, que revele las características refráctiles y la apariencia plateada de las plaquetas.(10) Además se observó que en este método el tiempo de reposo en la cámara húmeda (20'), fue crítico, pues entre mayor fué el tiempo de reposo, se facilitaba la visualización de las plaquetas, ya que evitaba la interferencia con los eritrocitos, que por sobreponerse unos a otras obstaculizaban la cuantificación de las mismas. Algunos factores que influyeron en la cuenta por métodos directos fueron:

1. El filtrado o centrifugación de los diluyentes después de haberlos preparado y refiltrar diariamente antes de usarlos. Esto evita la contaminación con partículas extrañas o restos de colorante o sales. Además estas soluciones se deben mantener a 4°C para evitar el crecimiento de hongos y bacterias. (8,9,12,13,14) Se observó que la solución de Oxalato de Amonio al 1% se contamina con mayor facilidad que la solución de Rees-Ecker.
- 2.- El llenado de pipetas y cámaras debe de ser uniforme evitando que se formen burbujas, de lo contrario, los resultados de la cuantificación son menores. Con el método de Brecher para el grupo C se utilizaron pipetas de blancos, teniendo una dilución diez veces menor que al utilizar pipetas de glóbulos rojos (grupos A y B), esto fue posible porque el Oxalato de Amonio al 1%, es un reactivo que hemoliza a los glóbulos rojos proporcionando un fondo claro, lo cual no sucede con el diluyente de Rees- Ecker. Esto se hizo porque el 90% de los pacientes de este grupo tienen disminuidas las plaquetas. Al comparar Brecher con Rees- Ecker, el coeficiente de correlación fue de 0.99 con un error de 3% en la reproducibilidad lo que indica que no hubo diferencias al utilizar diferentes diluciones. En los casos que el número de plaquetas era normal, el resultado por este método resultaba más bajo que el obtenido por Rees-Ecker, donde se utilizaban pipetas de glóbulos rojos. Cartwright, menciona que el recuento de plaquetas obtenido por cualquier método siempre debe comprobarse con el número de plaquetas observadas en frotis sanguíneo. El método indirecto generalmente da cifras más altas que los directos y electrónicos, esto es atribuible en parte a la tendencia de los glóbulos rojos a concentrarse en las orillas del frotis, esto da un rango falsamente alto de plaquetas con eritrocitos en el área central, que es donde la cuenta de plaquetas es confiable. (10) Este fenómeno se observó en los tres grupos estudiados. Si en el frotis sanguíneo, el tamaño, la morfología y la distribución homogénea (no agregadas) de las plaquetas son anormales, influyen, en la cuenta plaquetaria realizada por los métodos directos o semiautomatizado.

En cuanto al grupo C se encontró que el coeficiente de correlación entre Brecher y Coulter ThromboCounter-C fue de 0.98, lo que indica que existe una relación directamente proporcional entre los dos teniendo solo un 3% de error, mientras que en el grupo A fue de 75% y en B fue de 24.4%. Esta diferencia posiblemente se debió a la experiencia que se había adquirido para manejar el aparato, pues el último grupo estudiado fue C.

De acuerdo a los parámetros normales que tiene el aparato; cuenta de plaquetas en plasma de 8,000 a 30,000/mm³, se encontró que la mayoría de las cuentas en el grupo C se encontraban por debajo de las 8,000 plaquetas en plasma, esto es porque el 90% de los pacientes padecen enfermedades que se caracterizan por recuentos plaquetarios bajos. Cuando la muestra sanguínea contenía plaquetas gigantes (más de 1,000 plaquetas/mm³) o si estaba contaminada con eritrocitos, se encendía la lámpara de alarma, siendo común en este grupo, por consiguiente se tenían que corroborar, la mayoría de las cuentas fueron reproducibles.

En los casos en los cuales se obtenían menos de 1,000 plaquetas en plasma, el resultado para sangre total era cero, lo mismo sucedía cuando se obtenían más de 30,000 plaquetas

en plasma. El aparato tiene como tamaño normal de 2.7 - 37 fl, en los casos en que el tamaño excedía los 37 fl el resultado se tenía que comparar con un frotis, pues se ha reportado que cuando existen plaquetas gigantes en alguna muestra las cuentas son falsamente bajas. (19,30)

Las cuentas altas de leucocitos, cuerpos de Howey-Jolly y parásitos de malaria, pueden ser contadas como partículas por el método semiautomatizado. La importancia de este método, es que a permitido que se realicen numerosas cuentas de plaquetas, que se requieren en pacientes que reciben quimioterapia. (29)

En la literatura (17,18,19,20,21,22,23,24,26,28,29) no existen diferencias significativas entre Brecher y métodos electrónicos (tanto semiautomatizados como totalmente automatizados), en el presente trabajo se obtuvieron diferencias en la comparación de los métodos en los grupos A y B, mientras que en el grupo C no hubo diferencias significativas. Tal vez esto fue por la inexperiencia que se tenía al inicio en el manejo de la metodología, pues el primer grupo que se trabajo fue el A, en el cual estadísticamente hubo diferencias altamente significativas.

No hubo inconveniente en el método de Brecher al utilizar microscopía óptica, pues al hacer el ajuste de luz en el microscopio y por la capacidad que tiene el diluyente de hemolizar los eritrocitos, las plaquetas se pudierón visualizar fácilmente.

CONCLUSION

En el presente trabajo se encontraron diferencias significativas entre el grupo A y B, este resultado no se esperaba, pues en la literatura consultada (1,7,8,9,10,11,12,13,14.), no mencionan que los valores de referencia sean diferentes de acuerdo a la edad. Posiblemente esto se debió a que el primer grupo que se le cuantificaron las plaquetas fue el A, teniendo inexperiencia en el manejo de las técnicas, instrumentos y visualización al microscopio de las plaquetas, o bien, en el método semiautomatizado por una calibración inadecuada del aparato esto no fue posible evitarlo porque no se contaba con una solución de referencia que nos permitiera conocer el funcionamiento adecuado del aparato, con el cual se observa reproducibilidad y precisión del aparato.

Es difícil aceptar valores de referencia por el amplio rango de valores normales reportados, pero actualmente el rango de mayor aceptación es el establecido por Brecher ($140,000-400,000/\text{mm}^3$). Esta amplitud se observó tanto en el grupo A como en el B, obteniéndose valores similares a los ya reportados ya que se observó buena correlación en Brecher, Rees-Ecker y frotis sanguíneo. En el único método que hubo diferencias fue en el Coulter Thrombo Counter-C, además que tuvo un rango de confianza muy amplio (límite inferior de $79,000$ y límite superior de $485,000/\text{mm}^3$). Esto indica que cuando se realizara una cuantificación, valores alrededor de $100,000/\text{mm}^3$ implicarían una cuenta normal, lo cual no es confiable, pues varios autores mencionan que los valores de referencia no difieren mucho entre los métodos existentes para el conteo de plaquetas. Un factor que influyó primordialmente, fue la obtención del plasma rico en plaquetas, que tal vez no fue la forma adecuada y por consiguiente los valores fueron más bajos. La desventaja del Coulter ThromboCounter-C es que la mayor parte de la metodología es manual a excepción de la cuenta, con lo cual existe una mayor variabilidad y menor reproducibilidad.

Por lo tanto la determinación de una cuenta de plaquetas por este método es dudosa hasta que las diferencias sean esclarecidas. Además que tiene como rangos de confianza de más de 30 a $1000 \times 10^3/\text{mm}^3$ plaquetas en sangre, siendo una desventaja cuando la cuenta de plaquetas este fuera del rango, pues se tienen que comprobar por otro método. En el caso de los pacientes con enfermedades hematológicas, fue frecuente, ya que la mayoría tenía valores menores de $50,000$.

La reproducibilidad del Coulter ThromboCounter-C fue menor de lo establecido, pues el grado de dispersión alrededor de la regresión lineal fue mayor. Esta dispersión pudo incluir errores al azar inherentes y sistemáticos. Además de que al comparar grandes cantidades de muestras sanguíneas anormales y normales hubo menor reproducibilidad. En este método, la exactitud depende de la preparación cuidadosa de la muestra.

Estos resultados muestran que el Coulter ThromboCounter-C no es el método óptimo para la cuenta plaquetaria.

Los métodos directos resultarán ser los más reproducibles, de menor costo y mayor precisión, por consiguiente los métodos óptimos. No obstante que la técnica de Brecher

tuvo una variación en el tipo de microscopía utilizada. Además se observó que a mayor tiempo de reposo del hemocitometro en la cámara húmeda, se visualizaban mejor las plaquetas (más de 30 minutos), especialmente en Rees-Ecker, ya que los eritrocitos se sedimentaban y permitían tener un fondo claro. Los inconvenientes de estos métodos es que son laboriosos para la persona que los realiza y el gran consumo de tiempo necesario para realizar numerosas cuentas plaquetarias.

Cabe mencionar la importancia que tiene el conteo de las plaquetas por frotis sanguíneo, pues permite confirmar el resultado obtenido por otro método, además que proporciona información sobre la morfología plaquetaria

En el grupo con problemas hematológicos (C), es primordial la cuenta plaquetaria pues sufren enfermedades en las que la médula ósea está directamente afectada (hipoplasia, megacariopoyesis defectuosa) o bien por la administración de quimioterapia que tiene efecto citotóxico, ocasionando trastornos en la producción de los elementos celulares sanguíneos y/o porque existe una destrucción excesiva de plaquetas en sangre periférica que la médula ósea no puede compensar.

En este grupo hubo buena correlación entre los 4 métodos, el Coulter ThromboCounter-C correlacionó con Brecher, lo que no se observó en los otros dos grupos, tal vez porque fue el último grupo que se trabajó y al hacer la corrección con el hematocrito (valores de 15-40), para obtener el número de plaquetas en sangre total, la cuenta era similar con la obtenida por Brecher. Esta corrección ocasionó grandes discrepancias en el grupo A al compararla con el método de referencia.

El inconveniente del método semiautomatizado en el grupo C fue que el 50% de los pacientes tenían cuentas plaquetarias menores de $30,000/\text{mm}^3$, como este resultado salía del rango de confianza que tiene el aparato, no fueron confiables, teniendo que comprobar por otro método.

Teóricamente el método óptimo es el totalmente electrónico, pues hay menor manipuleo de la muestra, con lo cual hay menor variabilidad.

De los métodos directos y semiautomatizado ninguno fue totalmente satisfactorio, ya que las plaquetas presentan inconvenientes tales como: una distribución irregular en la sangre, facilidad para aglutinarse y adherirse a superficies extrañas (residuos de diluyente, instrumentos de vidrio) y por la rapidez de su desintegración. Además que en los métodos directos a veces es difícil visualizarlas al microscopio, a causa de su tamaño pequeño.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.-Miale J.B.(1982) Laboratory Medicine Hematology.6a. Ed.Mosby; 1084 pág.
- 2.-Williams J.,Beutler E.,Erlev J.,Rundles W.(1986) Hematología TOMO II,2a Ed.,Salvat Editores; 1231-1298.
- 3.-Harker L.A.,Zimmerman T.S.(1985) Clínica Hematologica.Trastornos Plaquetarios Vol. 11,1a ed. Salvat Editores;368 pág.
- 4.- Dorantes S.,Pizuto J., (1981) Hemorragia y Trombosis. Grupo Latinoamericano de Hemostasis y Trombosis. IMSS;57-142 pág.
- 5.-Hawiger J:Formation and Regulation of Platelet and Fibrin Hemostatic Plus. Human Pathol 1987; 18(2): 111-122.
- 6.-White J.G:Inherited abnormalites of the Platelet Membrane and Secretory Granules. Human Pathol 1987; 18(2): 123-39.
- 7.-Rapaport S. Introducción a la Hematología 1989 2a Ed, Salvat Editores. 475-510.
- 8.-Brecher G and Cronkite E: Morphology and Enumeration of Human Blood Platelets. 1950; 365-377.
- 9.-Brecher G, Schneiderman M, and Cronkite E: The reproductibility and constancy og the platelet count 1953; 23:15-26.
- 10.-Wintrobe, M.M. Clinical Hematology 1961 7a ed. Lea & Febiger; 1050-1069.
- 11.-Nathan D; Oski F. Hematology of infancy and Childhood. Vol II 1987 3a Ed, W.B. Saunders Company; 1271-1295, 1343-1359.
- 12.-Todd-Sanford, Davidsohn I; Wells B.B. Diagnostico Clínico por el Laboratorio. 1966 4a. Ed. española, Marín; 105-108 pág.
- 13.-Cartwright G.E; El Laboratorio en el diagnostico hematológico 1973, 4a Ed. Editorial Científico Medica 52-64, 78-82.
- 14.-Saunz G, Atmetlla F; Jimenez R; Barrante A. Manual de Hemostasia y Coagulación Sanguínea. Teoría, Tecnicas e Interpretaciones. Universidad de Costa Rica.
- 15.-Manual de Coulter Thrombocounter-C 1979 Coulter Electronics Inc. U.S.A.
- 16.-Brown B.E. and Moor C.V. Progress in Hematology Vol VIII 1971 Ed, Grune & Statton Inc.

- 17.-Cousins S, Lewis SM. A rapid and accurate differential centrifugation method for platelet counts. J Clin Pathol 1981; - :114-6.
- 18.-Sassier P: Platelet Counts by Thrombocounter and Coulter S- Plus. Am J Clin Pathol 1982; 78:258.
- 19.-Gilmer Jr. P.R, Williams LJ, Bessman DJ: Spuriously Elevated Platelet Counts due to Microspherocytosis. Am J Clin Pathol 1982; 78(2):259.
- 20.-Dumoulin-Lagrange M: Errors in Platelet Counts. Am J Clin Pathol 1982; 77(4):511-12.
- 21.-Berning H, Stilbo I: Pseudothrombocytopenia and the Hematology Laboratory. Lancet 1982; C:1469-70.
- 22.-Lewis SM, Rawan RM, Kubota F: Evaluation of a Prototype for a Reference Platelet Counter. J Clin Pathol 1990; 43:932-36.
- 23.-Handin RI, Lawler KC and Valeri CR: Automated Platelet Counting. Amer. J. Clin. Pathol. 1971; 56:661-664.
- 24.-Glass UH, Mills RT and Priest CJ: Automated Platelet Counting. Brit J of Haematol 1971; 21: 529-540.
- 25.-Bizzaro N: Platelet Satellitosis to Polymorphonuclears: Cytochemical, Immunological, and Ultrastructural Characterization of Eight Cases. Am J Hematol 1991; 36: 235-242.
- 26.-Patrick CH and Lazarchick J: The affect of Bacteremia on Automated Platelet Measurements in Neonates. Am J Clin Path 1990; 93: 391-394.
- 27.-Savage RA: Analytic Inaccuracy Resulting from Hematology Specimen Characteristics. Am J Clin Path 1989; 92:295-299.
- 28.-Ravan RM, Allan W and Prescott RJ: Evaluation of an automatic platelet counting system utilizing whole blood. J Clin Path 1972; 25: 218-226.
- 29.-Brittin GM, Dew SA and Fewell EK: Automated Optical Counting of Blood Platelets. Blood 1971; 38(4): 422-430.
- 30.- Payne BA, Pierre RV: Pseudothrombocytopenia: A Laboratory Artifact With Potentially Serious Consequences. Mayo Clin Proc 1984;59: 123-125.
- 31.- Arnold JPF, Lombarts PhD and Kieviet W: Recognition and Prevention of Pseudothrombocytopenia and Concomitant Pseudoleuko cytosis. Am J Clin Pathol 1988;89:634-639.

- 32.- Chen JH, Distenfeld A: Leukemic Cell Fragments Mimicking Platelets. JAMA 1978;239(19): 11959-1960.
- 33.- Armitage JO, Goeken JA, Feagler JR: Spurious Elevation of the Platelet Count in Acute Leukemia. JAMA;239(5): 433-434.
- 34.- Penington DG, Streatfield K and Roxburg AE: Megacaryocytes and the Heterogeneity of Circulating Platelets. B J of Haematol 1976;34: 639-653.