

11214

UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

3
2ej.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.
CENTRO MEDICO NACIONAL

ACTIVIDAD PROCOAGULANTE
NORMAL DE LAS PLAQUETAS
EN EL SÍNDROME DE
BERNARD SOULIER

TESIS CON
DIPLOMA DE OMBEN

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el Título de:
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

Presenta el Doctor:

**CECILIA GUILLÉN
MARISCAL**

1492



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

En el Síndrome de Bernard Soulier (SBS) han sido demostradas alteraciones específicas que dan lugar a un trastorno en la adhesividad plaquetaria. También se le han intentado atribuir otros defectos que condicionan una alteración en la actividad procoagulante de sus mismas plaquetas, los cuales no han logrado definirse satisfactoriamente. Los mismos consisten en una interacción deficiente de la membrana plaquetaria con los factores V, VIII, y especialmente el XI, hipótesis basada en resultados obtenidos de estudios como fijación defectuosa de los factores mencionados a la membrana plaquetaria posterior al lavado con la técnica de Walsh, consumo de protombina anormal, etc.

En el presente trabajo se estudió el efecto procoagulante de las plaquetas en 4 pacientes con el SBS comparándolo con los resultados en controles sanos y enfermos trombocitopénicos con anemia aplásica y púrpura trombocitopénica, para tal fin se efectuaron modificaciones en el consumo de protombina (CP) y tiempo de recalcificación del plasma, para evaluar el efecto de la trombocitopenia y el de plasmas con deficiencias intensas y específicas de factores de coagulación V, VIII y XI sobre el mecanismo procoagulante de las plaquetas con SBS.

Los resultados observados difieren de los informados por otros investigadores pues no se detectó por medio de las pruebas empleadas ningún defecto en la actividad procoagulante en las plaquetas de pacientes con el SBS, resultados que sugieren la existencia de variantes ?

Actividad procoagulante en Síndrome de Bernard Soulier.

ABSTRACT

BERNARD SOULIER SYNDROME WITH NORMAL PROCOAGULANT ACTIVITY

Several specific alterations of the platelets have been found in the Bernard Soulier Syndrome (BSS), such as defects in adhesiveness, as well as agglutination with Ristocetin in the presence of factor VIII; also, - defects in the fixation to its membrane of factors V, VIII, and XI, as - well as defficient prothrombin consumption and a poor response to its - incubation with collagen. This data have suggested that the platelets in the BSS have an abnormal procoagulant mechanism. This is why we - - undertook the study of the procoagulant effects of the platelets from - four patients with BSS, as well as healthy subjects, and patients with thrombocytopenia due to aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. With this object in mind the following tests were performed: - prothrombin consumption and the recalcification time of modified plasma, with the hope of evaluating the platelet's procoagulant mechanism in BSS, thrombocytopenia and upon severe plasma deficiencies of specific factors of coagulation, such as V, VIII, and XI. Our results differed from - - those previously reported since we found platelets to be normal in their procoagulant activity in BSS.

Bernard Soulier Syndrome Procoagulant Activity.

INTRODUCCION

El SBS es una enfermedad hemorrágica familiar poco común, cuyos defectos hemostáticos no han sido definidos satisfactoriamente.

Las manifestaciones clínicas del síndrome consisten en una diátesis hemorrágica que puede ser desde leve hasta mortal (1). En el mismo se han detectado diferentes alteraciones de la hemostasia, como agregación plaquetaria anormal con ausencia de aglutinación para Ristocetina en presencia de factor VIII Von Willebrand y fibrinógeno bovino y disminución de la agregación con trombina (2-6). Esto se puede explicar satisfactoriamente por ausencia de glucoproteína de membrana I b alfa y I b beta (7), lo que contribuye a favorecer el gran tamaño de las plaquetas en el SBS, por una supuesta alteración en la fijación del citoesqueleto de la plaqueta a estas glucoproteínas de la membrana en el SBS (8). Recientemente se ha detectado también ausencia de glucoproteína V de la membrana, sitio receptor para trombina, así como ausencia de glucoproteína IX cuya función aún se desconoce (7).

Otra alteración reconocida en las plaquetas del SBS y que se encuentra menos caracterizadas es el mecanismo procoagulante de las mismas que consiste en una disminución de la fijación a la membrana de los factores V, VIII y ausencia de fijación del factor XI por una probable escasez de receptores de membrana en la plaqueta (9). Lo anterior incrementa la tendencia hemorrágica en esta enfermedad sumándose a la trombocitopenia y alteración de la adhesividad plaquetaria características del síndrome (1).

Estas hipótesis se basan en el efecto procoagulante defectuoso de las plaquetas con SBS detectados en diferentes estudios in vitro, siendo los de mayor trascendencia los siguientes: a) Al lavar las plaquetas con SBS con la técnica de Walsh (10) se encuentra una escasa cantidad de factores V y VIII unidos a la membrana y ausencia del XI a diferencia de --

las plaquetas normales, las cuales conservan fijos a la membrana tales factores posterior al lavado (10). b) Al incubar las plaquetas del SBS con colágena y plasma provisto sólo con los factores VIII, IX y X, se encuentra una deficiencia en la activación del factor X y como consecuencia, un tiempo de coagulación prolongado. Lo anterior contrasta con lo observado cuando se incuban en la misma forma plaquetas normales, obteniéndose incluso un tiempo de coagulación acortado al incrementar la activación del factor X. Lo anterior es sugestivo para Walsh (9) de una respuesta deficiente de las plaquetas del SBS la colagena por unión defectuosa del factor XI a la membrana plaquetaria. c) En estos enfermos se encuentra un consumo de protrombina anormal (acortado) (5,9,11,12) lo que según Walsh apoya los hallazgos previos, es decir una deficiente interacción de la membrana plaquetaria con los factores XI, V, VIII.

OBJETIVO

En el servicio se presentó la oportunidad de estudiar 4 pacientes - con el SBS. Uno de ellos, motivo de publicación previa (Ref. 1) presentó en una ocasión consumo de protrombina normal en coincidencia con una cuenta de plaquetas también cercana a lo normal, lo que resultó en contra de lo informado en la literatura (5,9,11,12,13). Por lo anterior se propuso investigar la actividad procoagulante de las plaquetas en otros enfermos con el mismo trastorno.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron cuatro pacientes con diagnóstico clínico y por laboratorio de SBS, tres de ellos relacionados entre sí (hermanos), con edades de 27, 21, 19 y 4 años respectivamente. La mitad del sexo femenino y la otra mitad del sexo masculino.

Todos los pacientes tenían o habían tenido el cuadro clínico que corresponde al padecimiento, pero no existía ningún antecedente al respecto en los padres. Los estudios de escrutinio de la coagulación incluyeron tiempo de sangrado de Ivy (14), recuento de plaquetas con Microscopio de contraste de fase; determinación del factor de Von Willebrand con prueba específica (Behring); agregación con ristocetín; prueba de plaquetas activadas con formaldehído; tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), tiempo de trombina (TT) y con sumo de protrombina (CP) efectuados de acuerdo a técnicas previamente descritas (14).

En la agregación plaquetaria (agregómetro marca Bristol), se usaron como agentes proagregantes Risticetina, trombina, ADP, adrenalina, colágeno y fibrinógeno bovino.

Tanto en las pruebas de agregometría como en las que se mencionarán enseguida, se ajustó el número de plaquetas inmediatamente antes del estudio de modo que la cifra fuera semejante entre testigo y pacientes con SBS, para lo cual se utilizaron plasmas autólogos pobres en plaquetas. Como plasma testigo en todos los casos se utilizó el obtenido mediante la mezcla de seis plasmas frescos de personas sanas y sin haber ingerido medicamentos en los 8 días previos.

Además también se utilizaron como testigos, plasmas de pacientes con anemia aplásica (AA), púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) y -

sujetos con deficiencias selectivas e intensas de factores II,V,VIII,IX, X,XI y XII.

El anticoagulante utilizado en la preparación de las muestras fue el citrato trisódico al 3.8% con ph de 6.3 en proporción de 1:10.

El estudio de morfología plaquetaria con microscopio de luz se efectuó con el frotis de sangre periférica obtenido por punción capilar.

Se llevaron a cabo estudios del CP modificado en sujetos normales, pacientes con trombocitopenia por AA o PTI que se usaron como controles y en los pacientes con SBS. En cada caso a 1.8 ml de sangre sin anticoagulante se agregó solución salina y fosfolípidos plaquetarios preparados de concentrados de plaquetas de sujetos normales y de pacientes con SBS y además diferentes concentraciones de plaquetas frescas de los mismos sujetos. Posteriormente se efectuó el CP de la manera habitual (14) en los sueros resultantes.

También se efectuaron modificaciones al tiempo de recalcificación del plasma (TRP) realizándolo en los mismos grupos anteriores y además en los sujetos con deficiencias graves de los factores plasmáticos mencionados. Las modificaciones consistieron en agregar 0.1 ml de plasma de estos sujetos a solución salina (0.1 ml) y a concentración variable de plaquetas frescas, lavadas, suspendidas en solución salina de sujetos normales y de pacientes con SBS (14).

Los TRP se efectuaron de la manera habitual en plasmas de sujetos normales y de pacientes con SBS, pero modificando el número de plaquetas para lo cual se utilizaron sus propios plasmas como diluyentes, agregando 0.1 ml de estos plasma al amortiguador veronal y a colágena 10 uM/ml.

Se aplicó la prueba de Pearson para determinar el nivel de significancia al 95%.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se observan los resultados del estudio clínico, de las pruebas generales de coagulación así como de la agregación plaquetaria, las cuales fueron características del SBS. Se descartó enfermedad de Von Willebrand, ya que la cuantificación de este factor fue normal en los cuatro pacientes y la agregación plaquetaria con ristocetina ausente, además de la presencia de plaquetas gigantes en el frotis de sangre periférica.

En el cuadro 2 se encuentran los resultados que se obtienen en la prueba del CP con las modificaciones efectuadas. Inicialmente con solución salina los controles normales dan resultados con tiempos mayores de 60 segundos, mientras que los controles con plaquetopenia por AA o PTI y los pacientes con SBS muestran acortamientos menores a 30 segundos. Enseguida, se observa que estos resultados se normalizan con la adición de fosfolípidos plaquetarios tanto de plaquetas normales como de pacientes con SBS. En la segunda parte de esta prueba se adicionaron plaquetas -- frescas tanto normales como de pacientes con SBS a diferentes concentraciones para evitar que los resultados pudieran ser modificados por efecto de masa y nuevamente, se observó que el consumo de protrombina se normalizó en forma semejante tanto para las plaquetas normales como para -- las plaquetas del SBS, aún con cantidades pequeñas de plaquetas, pues en todos los casos el resultado fué mayor de 60 segundos.

Las modificaciones sobre el TRP se muestran en el cuadro 3. Cuando sólo se agregó solución salina a los reactivos (normales) los resultados en los controles normales (AA y PTI) y en los pacientes con SBS fueron -- semejantes, encontrándose bastante más prolongados en las pruebas efectuadas en los plasmas con deficiencias selectivas de factores. Al efectuar el TRP agregando plaquetas frescas normales fue notable el acortamiento de los tiempos en todos los grupos, con excepción de aquellos con deficiencia del factor II. Si en lugar de agregar plaquetas normales se utilizan plaquetas del SBS en proporciones comparables, también se produce

acortamiento en los tiempos de coagulación siendo aparente la semejanza en los resultados de ambas modificaciones; incluso en el caso de deficiencia de factor XI, factor que se considera imprescindible para facilitar la actividad procoagulante de las plaquetas (9).

En la gráfica 1 se ilustran los cambios que ocurren en el TRP cuando esta prueba se efectúa en testigos normales y en pacientes con SBS y el acortamiento semejante en ambos casos ($p < 0.05$). Al agregar colágeno ocurre un acortamiento, el que es independiente de la cantidad de plaquetas ya que aún con una cifra de $25 \times 10^9/L$ los TRP son idénticos, a diferencia de lo informado por otros investigadores que encontraron una menor respuesta en el SBS que en las plaquetas normales (9). En esta misma prueba se determinó la cantidad de factor II (gráfica 2) remanente después del consumo necesario para la formación del coágulo. La cantidad de factor II aumenta cuando sólo se agrega amortiguador, pero disminuye en forma importante ($p < 0.05$) cuando se agrega el colágeno, tanto en las determinaciones del testigo como en las muestras de las plaquetas con SBS.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION

El estudio de las trombocitopatías congénitas es muy difícil por su baja frecuencia en la población general y los problemas técnicos que origina su estudio in vitro. En el caso del SBS se encuentran bien documentados el defecto en la adhesividad de las plaquetas así como su nula respuesta a la aglutinación con ristocetín en presencia de factor VIII. En esta enfermedad se han descrito otros defectos en base a diferentes estudios de laboratorio, pero sus resultados son difíciles de interpretar y aplicar in vivo como son el CP anormal, la ausencia de fijación de los factores XI, V, VIII a la membrana plaquetaria posterior al lavado con técnica de Walsh (9,10) y la pobre respuesta a la incubación con colágena (9), todo lo cual ha dado lugar a la hipótesis de que existe un defecto en el mecanismo procoagulante de las plaquetas del SBS. En este trabajo los estudios efectuados acerca de tal actividad modificando el CP al utilizar diferentes concentraciones de plaquetas tanto de controles sanos como de enfermos y el tiempo de recalcificación con plasma utilizando deficiencias selectivas de diferentes factores de la coagulación, la respuesta a la incubación con colágena llevó a las siguientes conclusiones:

A) Los resultados anormales del consumo de protrombina, en los casos estudiados con SBS, deben atribuirse más bien a trombocitopenia que a una supuesta disfunción plaquetaria descrita con anterioridad (9).

B) En consecuencia, la actividad procoagulante de las plaquetas en 4 casos con SBS estudiados, debe considerarse igual a la de las plaquetas normales.

C) La carencia de algunos factores plasmáticos de la coagulación (V, VIII, y XI) no influyó en el desarrollo de la actividad procoagulante, de las plaquetas del SBS lo que descarta la alteración en la fijación de tales factores de la membrana plaquetaria, informada por otros autores (9), como causa de . . . la actividad procoagulante anormal.

D) Los resultados obtenidos en este trabajo en comparación con los

de otros autores, sugieren la existencia de distintas variedades o grados de intensidad del SBS; o bien, puede ser que estos hallazgos no hayan sido tomados en cuenta con anterioridad por otros investigadores. Para confirmar lo anterior es necesario contar con más experiencia en un mayor número de pacientes.

CUADRO I

ESTUDIO CLINICO Y DE LABORATORIO DE LOS
PACIENTES CON SBS

ESTUDIO CLINICO	NUMERO DE CASOS ESTUDIADOS			
	1	2	3	4
EDAD (años)	19	21	27	4
SEXO	M	F	F	M
HISTORIA SANGRADO ANORMAL:				
PERSONAL	SI	SI	SI	SI
PADRES	NO	NO	NO	NO
ESTUDIO LABORATORIO				
TIEMPO SANGRADO	ANORMAL	ANORMAL	ANORMAL	ANORMAL
TROMBOCITOPENIA VARIABLE	SI	SI	SI	SI
PLAQUETAS GIGANTES	SI	SI	SI	SI
TP, TTPA, TT FIBRINOGENO	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
CONSUMO DE PROTROMBINA (en varias ocasiones)	ANORMAL	ANORMAL*	ANORMAL	ANORMAL
* Sólo una vez resultó normal y coincidió con una cuenta de plaquetas - cercana a la normal.				
AGREGOMETRIA PLAQUETARIA				
ADP. ADRENALINA COLAGENA Y TROMBINA	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
FIBRINOGENO BOVINO	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
RISTOCETIN	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE

CUADRO 2

ESTUDIOS CON EL CONSUMO DE PROTROMBINA

MODIFICACIONES AL CONSUMO DE PROTROMBINA	SUJETOS NORMALES	CONTROL AA ó PTI	PACIENTES CON SBS			
			1	2	3	4
NINGUNA	> 60	30	26	20	18	17
AGREGANDO SOLUCION SALINA	> 60	30	25	23	19	20
AGREGANDO FOSFOLIPIDOS PLAQUETARIOS: a) DE -- NORMALES	> 60	> 60	> 60	> 60	> 60	> 60
b) DE SBS	> 60	> 60	> 60*	> 60*	> 60*	> 60**

* SE USARON SUS PROPIAS PLAQUETAS
(Promedio en segundos de 2 determinaciones)

CONSUMO DE PROTROMBINA MODIFICADO (CP)*

MODIFICACIONES DEL NUMERO DE PLAQUETAS	NORMALES	CONTROLES	
		AA ó PTI	
PLAQUETAS NORMALES/mm3			
a) 120,000	> 60		> 60
b) 60,000	> 60		> 60
c) 30,000	> 60		> 60
PLAQUETAS CON SBS/mm3			
a) 120,000	> 60		> 60
b) 60,000	> 60		> 60
c) 30,000	> 60		> 60

* Promedio en segundos de dos determinaciones.

CUADRO 3

TIEMPO DE RECALCIFICACION DEL PLASMA (TRP)*

MODIFICACIONES AL TRP	CONTROLES		
	NORMALES	AA 6 PTI	PACIENTES SBS
SOLUCION SALINA	274	204	148
PLAQUETAS NORMALES x 10 ⁹ /L			
a) CONCENTRADO	79	69	82
b) 220 x 10 ⁹ /L	106	61	88
c) 110 x 10 ⁹ /L	95	54	80
d) 55 x 10 ⁹ /L	103	63	94
PROMEDIO	96	62	86
PLAQUETAS SBS x 10 ⁹ /L			
a) CONCENTRADO	39		50
b) 120 x 10 ⁹ /L	108	66	94
c) 60 x 10 ⁹ /L	115	72	107
d) 30 x 10 ⁹ /L	115	70	111
	94	69	91

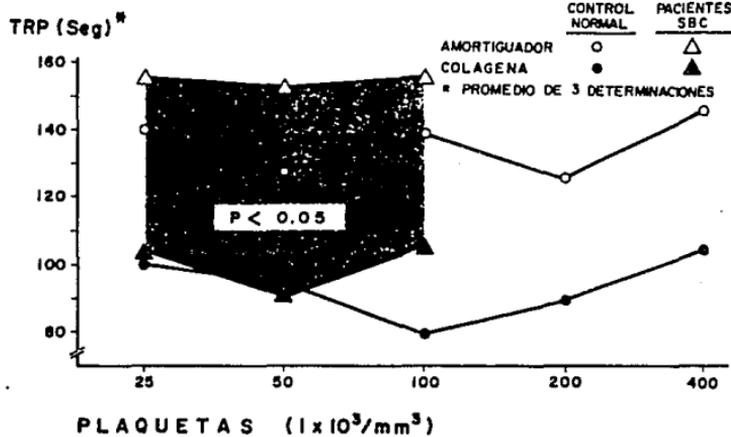
* Promedio en segundos de tres determinaciones

TIEMPO DE RECALCIFICACION DEL PLASMA (TRP)*

MODIFICACIONES AL TRP	PLASMAS CON DEFICIENCIAS INTENSAS						
	II	V	VIII	IX	X	XI	XII
SOLUCION SALINA	600	468	545	600	395	410	545
CONCENTRADO DE PLAQUETAS NORMALES	427	87	114	228	172	78	167
CONCENTRADO DE PLAQUETAS CON SBS	566	69	60	130	195	38	133

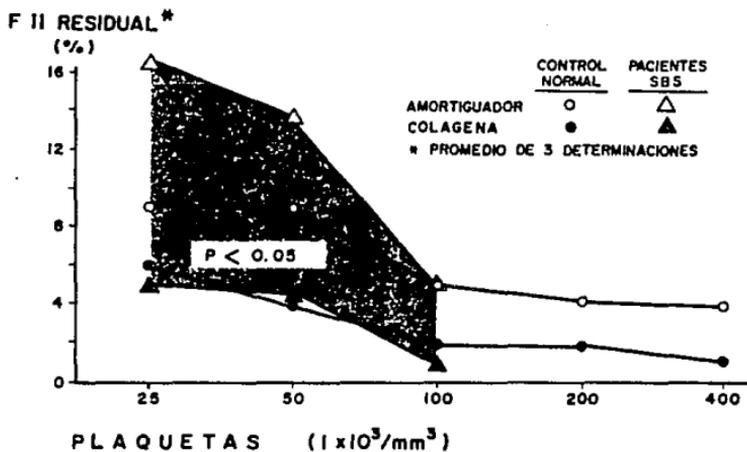
* Promedio en segundos de tres determinaciones

EFFECTO DE COLAGENA EN LA RECALCIFICACION DEL PLASMA (TRP)



GRAFICA I

EFFECTO DE COLAGENA EN EL FACTOR II (FII) RESIDUAL



GRAFICA II

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pizzuto J., Reyna M., Defectos de la hemostasia en el Síndrome de Bernard Soulier. Presentación de un caso y Revisión de la literatura. Arch. Invest. Méd. (México). 1981;12:193-212.
- 2.- Alagille D., Josso F., la Dystrophie thrombocytaire hemorrhagipare. - - Discusión nosológica. Nov. Rev. Fr. Hematol. Blood Cells 1964;4:755-762.
- 3.- Bithell T., Parell, Platelet function in the Bernard Soulier. Ann -- NY Acad Sci 1972;201:145-156.
- 4.- Caen, J. Levy Toledano, S. Sultan, Y. La dystrophie Thrombocytaire hemorrhagipare. Nouv. Rev. Fr. Hematol. Blood Cells 1973;13:593-595.
- 5.- Howard, M.A. Hutton, R.A. Hardisty R; Hereditary Giant Platelet - -- Syndrome; a disorder of a new aspect of platelet function. Br. Med. J. 1973;4:586-591.
- 6.- Kanska B., Niewiarowski S., Microthrombocytic thrombopathia: clinical coagulation and hereditary aspects. Thromb Diathes Haemorrh. 1963; - 10:88-98.
- 7.- Berndt M., Gregory C., Additional Glycoprotein Defects in Bernard - - Soulier's syndrome. Confirmation of Genetic Basis by Parental A - - Alysis. Blood 1983;62:800-807.
- 8.- Comfurius, P. Bevers, E.M., and Zwaal R.F., The involvement of - - cytoskeleton in the regulation of transbilayer movement of - - - phospholipids in human blood platelets. Biochimica et. Biophysica - Acta. 1985;815:143-148.
- 9.- Walsh P., Francesco M., Gwendolyn P. Hereditary Giant Platelet Syndro me British Journal of Haematology 1975;29:639-654.
- 10.- Walsh, P. N., Albumin density gradient separation and washing of - - platelets and the study of platelet coagulant activities. British Journal of Haematology, 1972;22:205-224.
- 11.- Evensen, S.A. Solum, N., Grotium, K.A., Hong, T.: Familial bleeding - disorder with a moderate thrombocytopenia and giant blood platelets - Scand J. Haematol 1974;13:203-214.

- 12.- Weiss, H. J. Congenital Disorders of platelet function. Semin - - Hematol 1980;17(4):228-242.
- 13.- Caen J. P, Tobelem., G., La dystrophie thrombocytaire hemorrhagipare congenitale. Syndrome de Bernard Soulier, de la description clinique. Nouv Rev Fr. Hematol. 1977;18:365-370.
- 14.- Reyna Ma. Paz, Pizzuto J, Manual de Técnicas de la Coagulación. Ed. Limusa, México, D. F. 1988.