



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---



FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS PLAQUETARIAS  
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

OFELIA CAMACHO DEL MONTE

MÉXICO, D.F.

2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---



FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS PLAQUETARIAS  
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

OFELIA CAMACHO DEL MONTE

MÉXICO, D.F.

2007.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE.        PROFR.    FERNANDO GARCIA TAMAYO**

**VOCAL:                PROFR.    ARACELI MENDIETA RERGIS.**

**SECRETARIO:        PROFR.    EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS**

**1er. SUPLENTE        PROFR.    PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ**

**2do SUPLENTE        PROFR.    PERLA DEYANIRA MALDONADO  
JIMENEZ**

**SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA.**  
**Instituto Nacional de Pediatría**  
**Laboratorio de Hemato-Oncología**

**ASESOR PROFR. EBC. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS.**

**SUPERVISOR TECNICO: PROFR. EBC. LINA T. ROMERO GUZMAN.**

**SUSTENTANTE .    OFELIA CAMACHO DEL MONTE.**

## **DEDICATORIAS**

Doy gracias:

A Dios Todopoderoso por ser mi guía, mi luz en todo mi camino.

A ese gran hombre que me ha guiado con amor, por el camino de la rectitud, por su apoyo incondicional y a quien debo todo.

Mi Padre: Guillermo Camacho Soriano

A esa gran mujer que me dio la vida, su amor y sus desvelos

Mi madre: Simona del Monte Olivares.

A mis hermanos:

Guillermo, Esteban Oscar, Martha, por su inmenso cariño y por todo el apoyo brindado.

A mi esposo por el amor, dedicación y apoyo que me ha brindado en los momentos más difíciles, ya que ha estado allí para darme animo y para seguir adelante.

Pedro Fco. Ramírez Mendoza

A mis hijas:

Diana y Pamela, por el amor, la dedicación y la paciencia y sobre todo por darme ánimos para seguir adelante.

A la Q.F.B. E.B.C. Lina T. Romero, por su apoyo a la realización de este trabajo y por haberme introducido al maravilloso campo de la Citometria de Flujo.

A la Dra. Norma López Santiago por su valioso apoyo y estimulo constante.

Al Dr. Rogelio Paredes Aguilera por su valioso apoyo

A mis sinodales, con respeto y admiración por sus valiosas aportaciones y recomendaciones en la revisión del manuscrito.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ETAPAS DEL DESARROLLO DEL MEGACARIOCITO.....	4
3. MORFOLOGÍA DE LAS PLAQUETAS.....	5
4. MEMBRANA PLAQUETARIA.....	7
5. CITOESQUELETO.....	8
6. ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEINA IIb/IIIa Y DESCRIPCIÓN .....	11
7. ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEINA Ib/IX/V Y DESCRIPCIÓN.....	12
8. FUNCIONES DE LAS PLAQUETA.....	14
9. ENFERMEDADES CONGÉNITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA .....	19
10. SÍNDROME DE BERNARD SOULIER CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DATOS DEL LABORATORIO.....	19
11. TROMBASTENIA DE GLAZMANN CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DATOS DEL LABORATORIO.....	22
12. OBJETIVOS .....	25
13. ANTECEDENTES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO.....	26
14. FUNDAMENTO Y OPERACIÓN DEL CITOMETRO DE FLUJO.....	27
15. MATERIAL Y MÉTODOS .....	30
16. RESULTADOS.....	37
17. CONCLUSIONES.....	39
18. VENTAJAS Y LIMITACIONES.....	41
19. BIBLIOGRAFÍA.....	42

## INTRODUCCION

Las plaquetas desempeñan un papel muy importante en el fenómeno de la hemostasia y en la trombosis. Ya que su capacidad de adhesión y agregación dan inicio a la formación del coágulo una vez que son estimuladas por agonistas o por sustancias liberadas por las propias células y a su vez liberan productos que afectan a las principales funciones antitromboticas del endotelio vascular.

Las plaquetas forman un trombo hemostático en las zonas vasculares que han sufrido una lesión, las plaquetas también intervienen en los procesos fisiológicos o patológicos como inflamación, cicatrización de las heridas fibrosis tisular, arteriosclerosis o diseminación neoplásica y arteriosclerosis.

Las plaquetas están rodeadas por membranas plasmáticas, las membranas plaquetarias contienen una cubierta rica en hidratos de carbono o glucocalix cuya composición pone de manifiesto la presencia de glicoproteínas enclavadas en la bicapa lipídica.

Esta integrada por tres capas:

La cubierta exterior o glucocalix que contiene los receptores glicoproteicos entre ellos el complejo Ib/V/IX que interacciona con el Factor von Willebrand en el proceso de la adhesión y el complejo IIb/IIIa que lo hace básicamente con el fibrinógeno en la agregación.

La segunda capa es la unidad de membrana o bicapa asimétrica fosfolipídica especialmente rica en ácido araquidónico.

La capa más interna que es el área submembranosa que está unida a las porciones transmembranosas de algunas glicoproteínas y contienen filamentos submembranosos que forman el citoesqueleto.

La citometría de flujo aplicada al estudio de las plaquetas permite evaluar defectos en su estructura y alteración de su funcionalidad, con el uso de los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos permite

estudiar la presencia de las diferentes glicoproteínas presentes en la membrana de las plaquetas.

La adhesión de las plaquetas a la pared vascular dañada es el primer paso en la formación del tapón hemostático. Esta adhesión inicial de las plaquetas da a seguir un crecimiento de microtrombo formado. La formación del tapón hemostático requiere de la interacción entre los receptores de la membrana plaquetaria y las proteínas adhesivas presentes en el subendotelio y el plasma. El proceso de adhesión tiene una fase de contacto seguida de una fase de extensión de las plaquetas sobre el endotelio.

La unión del Factor von Willebrand circulante con el subendotelio y un cambio conformacional en su estructura es el paso previo a la adhesión plaquetaria mediada por Gplb.

La interacción del Factor von Willebrand con la Gplb es suficiente para inducir la activación plaquetaria, así tras el contacto de las plaquetas con el subendotelio vascular a través de la Gplb se produce la estimulación plaquetaria y como resultado de la activación plaquetaria se expresara, en la GpIIb/IIIa este cambio conformacional en la GpIIb/IIIa permite que las plaquetas interactúen con el Factor von Willebrand, esta interacción facilita la extensión de las plaquetas sobre el subendotelio y la interacción de la GPIIb/IIIa con el fibrinogeno facilitara la agregación de las plaquetas.

Existen enfermedades relacionadas con las plaquetas que en situaciones fisiológicamente anormales un exceso de adhesividad y reactividad plaquetaria favorecen la trombosis. La capacidad funcional de las plaquetas para adherirse a elementos del subendotelio, activarse en respuesta a distintos agonistas y agregarse con otras plaquetas vecinas. Las deficiencias congénitas cuantitativas o cualitativas de las proteínas puede afectar en diferente grado la función de la plaqueta normal y con ello facilitar el desarrollo de procesos hemorrágicos o tromboticos.

La importancia de estos trastornos se refleja claramente en dos tipos hemorrágicos asociados a deficiencias congénitas que son el Síndrome de Bernard Soulier y la Trombastenia de Glanzmann son defectos raros pero bien definidos los cuales se pueden estudiar y evaluar los receptores que modulan la adhesión y la agregación plaquetaria .

## **MEGACARIOPOYESIS**

Estudios *in vitro* han permitido la caracterización de las células progenitoras hematopoyéticas de las plaquetas. Estas se producen en la médula ósea a partir de la misma célula progenitora que las series linfocítica y mieloide, la unidad formadora de colonias granulocito-eritrocito-macrófago-megacariocito (UFC-GEMM). Bajo influencia hormonal, esta célula progenitora se diferencia en células progenitoras megacariocíticas. Se han identificado cuando menos dos etapas de maduración de la célula progenitora: célula progenitora inmadura megacariocito llamada unidad formadora de brotes megacariocíticos (BFU-Mega), la cual da lugar a grupos de megacariocitos, ésta aparece a los 21 días del cultivo, expresa el marcador CD34 y HLADR negativo. Un progenitor más tardío es la unidad formadora de colonias-mega (CFU-Mega) que da lugar a colonias con un número pequeño de megacariocitos y aparece a los 12 días del cultivo, expresando los antígenos CD34 y HLADR. Las células comisionadas tardías, denominadas unidad formadora de colonias granulocito-eritrocito-macrófago-megacariocito (CFU-GEMM), tienen la capacidad de producir células de diferentes estirpes. La transición entre el progenitor multipotente y progenitor megacariocito-restringido involucra al oncogen *mpl*, el cual es altamente expresado en líneas celulares megacariocíticas y progenitores celulares. Los progenitores más

inmaduros tienen una mayor capacidad de proliferación, la cual declina cuando el progenitor entra a diferenciación.

Se han descrito dos tipos de factores reguladores de la megacariopoyesis. Algunos actúan sobre las células progenitoras y troncales mientras que otros influyen sobre las células reconocibles más maduras de la serie megacariocítica. La interleucina 3 (IL-3) y el FEC-GM son factores de crecimiento que actúan tempranamente los cuales de manera sinérgica hacen que las células progenitoras se diferencien en células progenitoras de megacariocito y también las inducen a proliferar. Por tanto influyen en el número de megacariocitos en proceso de formación.

El segundo tipo de factor regulador se llama trombopoyetina e influye principalmente en las etapas de maduración de los megacariocitos. Esto incluye el tamaño final de las células y el número de plaquetas producidas. También puede afectar la velocidad de liberación de las plaquetas a la sangre periférica. <sup>(1)</sup>

### **Etapas del desarrollo del megacariocito.**

La estimulación de los receptores de las células progenitoras por los factores de la acción temprana IL -3 y FEC -GM da lugar a la formación de un megacarioblasto. La célula blástica sufre una secuencia de maduración diferente a la de las otras células de la médula ósea ya que la maduración nuclear se realiza primero y está considerablemente completa antes de que se inicie la maduración citoplásmica. El proceso singular de la maduración nuclear consiste en una serie de endomitosis. Con cada endomitosis el contenido de DNA de la célula se duplica pero no se produce división celular. El contenido de DNA o nivel de ploidia de las células puede convertirse de 4 N a 32 N o mayor. La etapa de 8 N es la primera reconocible en un frotis de médula ósea y es la clase de ploidia que se encuentra más comúnmente.

La maduración citoplásmica puede empezar con los niveles de ploidia de 8N o mayores, pero la etapa en la cual se produce la maduración varía de célula a célula. Se desconoce la razón de esta variabilidad en la

maduración citoplásmica a distintos niveles de ploidía. Los trastornos clínicos vinculados con la presencia de las plaquetas grandes se caracterizan por tener megacariocitos con ploidía izquierda trasladada (ploidía menor); estos también parecen producir plaquetas más densas y más activas funcionalmente. El aumento de la ploidía del núcleo puede dar lugar a más citoplasma y, por lo tanto, a más plaquetas a partir de un megacariocito individual.

Se han descrito cuatro etapas en el desarrollo del megacariocito de acuerdo a su aspecto morfológico en frotis teñido con Romanowsky. Las características de diferenciación son la morfología nuclear, el aspecto citoplásmico y el tamaño relativo de las células determinado por la clase de ploidía. Es necesario hacer la distinción de las etapas de maduración de los megacariocitos, sin embargo sí es importante reconocer a una célula como perteneciente a la línea celular de éstos.

Los megacariocitos de la etapa I (megacarioblastos) tienen citoplasma basófilo escaso, no presentan gránulos visibles en el microscopio de luz. El núcleo suele ser redondo y los nucléolos pueden ser visibles, los megacarioblastos tienen de 6 a 24µm de diámetro.

Los megacariocitos de la etapa II (promegacariocitos) contienen gránulos azurófilos visibles. Los gránulos aparecen primero en la región perinuclear o de Golgi, el núcleo es lobulado y puede aparecer con muescas o en forma de herradura. Los nucléolos han desaparecido. Los promegacariocitos miden de 14 a 30µm. En esta etapa comienza a desarrollarse el sistema de membrana citoplásmica denominada (SMD) pero solo puede verse con microscopía electrónica. Su origen es controvertido, algunos estiman que se forma por invaginación de la membrana del megacariocito y otros que se produce por el aparato de Golgi. Al formarse se separan porciones pequeñas del citoplasma del megacariocito que finalmente se convertirán en plaquetas.

Los megacariocitos de la etapa III (megacariocitos granulares) se caracterizan por su tamaño más grande (16 a 56µm) y números crecientes de gránulos y membranas de demarcación. El núcleo tiene múltiples lóbulos y aumenta considerablemente la cantidad de citoplasma.

En los megacariocitos de la etapa IV el núcleo está compactado, pero lobulado y el citoplasma es abundante. Las células en la etapa IV tienen de 20 a 60 μm de diámetro y se denominan megacariocitos maduros<sup>(2)</sup>.

#### LIBERACION DE PLAQUETAS.

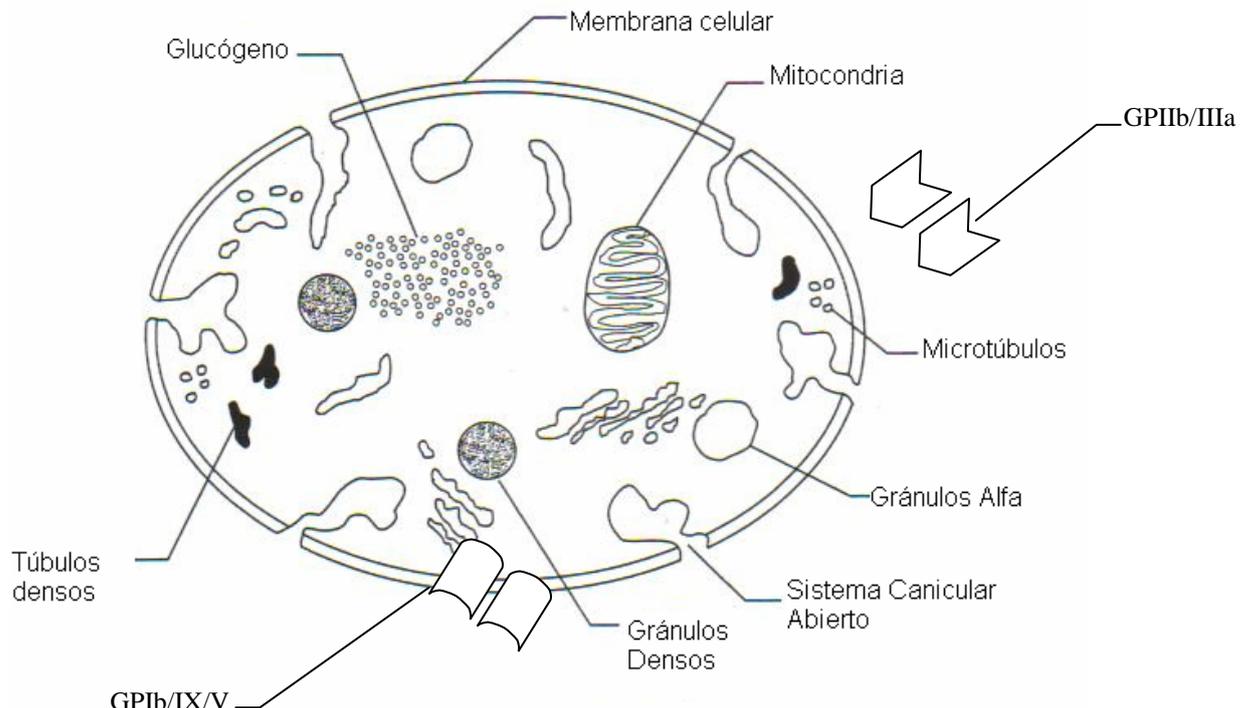
Los megacariocitos maduros situados a menos de 1 μm de los senos venosos de la médula ósea esparcen plaquetas directamente hacia ellos. El mecanismo aún no se comprende completamente. Los megacariocitos parecen liberar las plaquetas en grupos llamados proplaquetas. Cada megacariocito produce de 7 a 8 proplaquetas las cuales se expulsan a través del citoplasma de las células endoteliales hasta el interior de los senos venosos de la médula ósea. Se piensa que las proplaquetas se fragmentan después en plaqueta aunque el proceso aún no se ha observado. De manera alterna, el citoplasma del megacariocito puede desdoblarse aleatoriamente en plaquetas dentro del espacio medular.

#### MORFOLOGIA DE LAS PLAQUETAS

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares anucleados, con un diámetro variable de 1.5 a 2.5 μm. En frotis hechos de sangre anticoagulada con ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA) y teñido con colorante de Wright, las plaquetas aparecen como pequeños cuerpos de forma redonda u oval de color azul-grisáceo con abundantes gránulos rojo púrpura. La microscopía electrónica revela el glicocalix con una extensión de 14 a 20 nm de la superficie de la plaqueta, el cual además de contener glicoproteínas (GP) en la membrana, está compuesto de glicolípidos, mucopolisacáridos y proteínas plasmáticas adsorbidas. Las plaquetas se mueven en un campo eléctrico ya que tienen una carga neta negativa sobre la superficie. La repulsión electrostática creada por la carga negativa ayuda a las plaquetas en reposo a evitar la agregación de una con otra, así mismo la unión con las células endoteliales. La superficie de las plaquetas tiene un número de indentaciones que se comunican al sistema canalicular, el cual es un sistema de canales que presenta invaginaciones de la membrana plasmática y se extiende a través de la plaqueta. El contenido de los gránulos tiene acceso hacia el exterior cuando

éstos se fusionan con la membrana o alguna región del sistema canalicular abierto. Similarmente, las glicoproteínas contenidas entre los gránulos de la membrana la pueden romper después de la fusión de los gránulos con la membrana o al sistema canalicular abierto.

Las plaquetas contienen todas las enzimas necesarias para los ciclos glucolíticos y del ácido tricarboxílico y para la síntesis y degradación del glucógeno. <sup>(2)</sup>



Cuadro 1. Diagrama esquemático de una plaqueta en corte transversal ilustrando las características morfológicas más importantes.

<b>ESTRUCTURA</b>	<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA</b>	<b>FUNCIONES</b>
<b>ZONA PERIFÉRICA</b>	GLUCOPROTEÍNAS Y MUCOPOLISACÁRIDOS	ADHESIÓN Y AGREGACIÓN
<b>BICAPA DE FOSFOLÍPIDOS</b>	FOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDO ARÁQUIDÓNICO	ARREGLO ASIMÉTRICO
<b>GLICOPROTEÍNA Ib</b>	PROTEÍNAS INTEGRALES	ADHESIÓN
<b>GLICOPROTEÍNA IIb/IIIa</b>	PROTEÍNAS INTEGRALES	AGREGACIÓN
<b>MICROTUBULO, RED CITOESQUELÉTICA</b>	TUBULINA, PROTEÍNA FIGADORA DE ACTINA, MIOSINA	ESTRUCTURA Y SOPORTE
<b>ZONA DE ORGANELOS</b>	CONTIENEN NUCLEÓTIDOS DE ADENINA NO METABÓLICAS CALCIO, FOSFATOS, SEROTONINA	SECRECIÓN Y ALMACENAMIENTO
<b>GRANULOS ALFA</b>	FIBRINOGENO TROMBOSPONDINA FIBRONECTINA ALBUMINA COLAGENASA ELASTASA	MEDIADORES FUNCIONALES NO PROTEÍNICOS
<b>SISTEMA CALICULAR ABIERTO</b>	REMANENTE DEL SISTEMA DE MEMBRANA DE DEMARCACIÓN DEL MEGACARIÓCITO	COMO DEPÓSITO INTRACELULAR DE IONES CALCIO

Cuadro 1: Composición y funciones de las diferentes estructuras de la plaqueta

## MEMBRANA PLAQUETARIA

La membrana es una unidad trilaminar compuesta por una doble capa de fosfolípidos, colesterol, glicolípidos y glicoproteínas. La membrana contiene ATPasas de sodio y de calcio que controlan el microambiente iónico plaquetario. Aproximadamente el 57% de los fosfolípidos plaquetarios están contenidos en la membrana, los fosfolípidos se encuentran asimétricamente organizados y su carga negativa, especialmente fosfatidil serina aceleran algunas etapas en la secuencia de la coagulación. Durante la activación plaquetaria producida por agonistas los aminofosfolípidos son expuestos sobre la superficie de la plaqueta o sobre la superficie de micropartículas. La composición lipídica de la membrana plaquetaria esta limitada al ácido araquidónico, el cual es convertido a tromboxano  $A_2$ .

El receptor de la glicoproteína esta anclada en el plasma ambos están en la superficie plaquetaria y dentro del sistema canicular. La GP IIb/IIIa es un miembro de la familia de integrina de receptores de la membrana, en la integrina de la nomenclatura GPIIb es la subunidad  $\beta_3$ . La síntesis de la GPIIIa está restringida a megacariocitos y plaquetas. La síntesis GPIIIa también ocurre en las células endoteliales y muchas otras células como la subunidad  $\beta_3$  del receptor de vitronectina GPIIb/GPIIIa es la más abundante de la glicoproteína en la superficie de la membrana, también es la más abundante en los gránulos  $\alpha$  de la membrana. El complejo glicoproteína IIb/IIIa es un receptor para el fibrinogeno, un principal mediador de la agregación plaquetaria pero la GP IIb/IIIa también puede unir fibrina, von Willibran (FvW), fibronectina vitromectina y trombospodina. <sup>(2,3)</sup>

Estas proteínas también pueden unir otros receptores de plaquetas, existen aproximadamente 12,000 copias del complejo GPIb/X/V en la superficie plaquetaria cada una con dos copias de GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V se encuentran principalmente en la superficie de la plaqueta en superficies insignificantes sobre el interior y sobre la membrana de los gránulos  $\alpha$ . La GPIIb es la más grande de las dos partes proteicas, es una proteína de dos cadenas.

## CITOESQUELETO.

La membrana del citoesqueleto es una malla de filamentos cortos de actina espectrina y proteínas asociadas que se localizan en la membrana plasmática estabilizando la forma discoide por interacción con los microtúbulos circundantes. La proteína vimentina es un importante componente de filamentos intermediarios para la formación del citoesqueleto. La membrana del citoesqueleto contiene dos dominios transmembrana de glicoproteínas, la GPIb/IX y la GPIIb/IIIa, el citoesqueleto da movimiento a ciertos receptores de la superficie al interior de las plaquetas y viceversa vía el sistema canalicular abierto. Otras proteínas del citoesqueleto incluyen talina, vinculina, proteína relacionada a la distrofina, moléculas implicadas en la señal de transducción (pp60, pp62, p21 proteína activadora de la GTPasa) y muchas isoenzimas de la proteína cinasa C. Una banda diferencial de microtúbulos se presenta por debajo de la membrana citoplásmica, éstos está compuestos de polímeros de subunidades de PM: 110,000 y cada uno compuesto por dos proteínas de PM: 55,000 ( $\alpha$  y  $\beta$  tubulina) que se asocian con abundantes proteínas de alto peso molecular<sup>(5)</sup> (FIGURA 2)

## CITOESQUELETO.

FIGURA 2

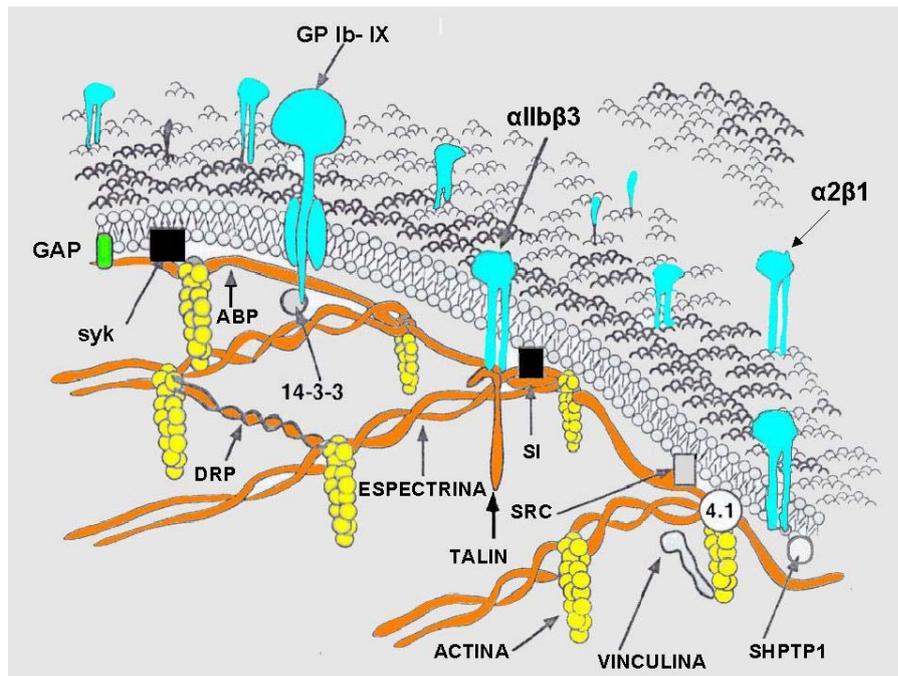


Figura tomada del libro "Hemostasis y Thrombosis: Basic Principles and Clinical third edition. W Colman, Jack Hirds, Victor Marder an Edwin W. Salzaman.

Los peroxisomas son organelos muy pequeños y se identifican por su contenido de catalasa, contribuyen al metabolismo de los lípidos especialmente la síntesis de plasminógeno. La zona estructural esta constituida por microtubulos y una red de proteínas. Los microtúbulos están formados por la proteína tubulina son un fascículo de 8 a 24 túbulos situados debajo de la región submembranosa de filamentos y rodea completamente la circunferencia de la plaqueta, la red de proteínas consiste en actina y varias otras proteínas estructurales. <sup>(2,7)</sup>

Las plaquetas contienen aproximadamente siete mitocondrias de tamaño pequeño, en las cuales se lleva a cabo el metabolismo oxidativo energético.

La participación de las plaquetas en la hemostasis es un componente fundamental, las reacciones incluyen adhesión al vaso sanguíneo, extensión de plaquetas adherentes sobre la superficie expuesta del subendotelio, secreción de constituyentes almacenados de las plaquetas (incluyendo moléculas involucradas en la hemostasis y curación de las heridas) y formación de grandes agregados plaquetarios.

Todos los inductores de la adhesión y la agregación plaquetaria, provocan el cambio de forma en la plaqueta, cambio que consiste en el paso

de la forma de disco a la de una esfera con espículas, dicha transformación no depende del calcio, pues no se inhibe con EDTA, potente inhibidor de la adhesión y la agregación.

La aparición de las espículas favorecen la adhesión a las superficies extrañas así como a la de célula a célula (agregación).

La adhesión de la plaqueta es el proceso por el que las plaquetas se pegan a algo que no sea otra plaqueta, por ejemplo una membrana basal, microfibrillas, colágena, vidrio u otras superficies extrañas.

Las plaquetas tienen la superficie pegajosa pero las condiciones para la adhesión varían con las diferentes sustancias. Para la adhesión plaquetaria al vidrio se necesita la presencia de iones calcio mientras que para la adhesión sobre membrana basal o colágeno depende de la formación de un complejo enzima-receptor entre la colágena glucosil-transferasa de la membrana plaquetaria y los residuos galactosil del colágeno.

La adhesión plaquetaria es un paso fundamental de la reacción hemostática. En las anomalías funcionales de la plaqueta se descubre disminución de la adhesividad.

La agregación plaquetaria consiste en la adhesión de unas plaquetas a otras a varios estímulos inducen la agregación in vivo. Puede estudiarse la reacción in vitro añadiendo diferentes inductores de la agregación al plasma rico en plaquetas y determinando el cambio de la transmisión luminosa en un instrumento.

La agregación plaquetaria va acompañada de transformación viscosa y de la reacción de liberación. La reacción de agregación efectuadas in vitro dependen de pH, temperatura, agitación mecánica, concentración de calcio iónico, número de plaquetas en el plasma enriquecido, tiempo que transcurre entre la preparación del plasma enriquecido y la ejecución de la prueba de agregación y del tiempo de concentración del agente inductor de la agregación. El pH óptimo que se necesita para que se lleve a cabo la agregación es entre 6.8 y 8.5. Es importante la agitación mecánica con una barra magnética a velocidad constante.

## ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEINA IIb/IIIa (CD 41)

Es un complejo receptor de la familia de las  $\beta$  Integrinas, es el de mayor número en las plaquetas en reposo con alrededor de 40,000 a 80,000 en la superficie. Otros 20,000 a 40,000 se encuentran en el interior de las plaquetas principalmente en los gránulos  $\alpha$ .

El complejo glucoproteína IIb/IIIa es un receptor para fibrinógeno, también enlaza otras proteínas adhesivas circulantes como el Factor de von Willebrand, la trombospondina, la vitronectina.

La glicoproteína IIb (GpIIb) es la más grande de las dos partes de una proteína de dos cadenas. Esta compuesta por la subunidad alfa que esta inmersa en la capa doble de fosfolípidos y la subunidad beta que sale a la superficie de la plaqueta, parte de la cadena beta es el antígeno Bak<sup>a</sup>, la porción superficial pequeña de la GpIIIa contiene el antígeno PI<sup>a</sup> glicoproteína IIIa (GpIIIa) es una cadena simple y se vincula con la porción GpIIb que esta situada dentro de la capa doble de fosfolípidos. El complejo GpIIb/IIIa esta oculto en las plaquetas en reposo y aparece cuando estas se activan la GpIIb tiene dos cadenas que se componen de moléculas con enlaces disulfuro, contiene también calcio que une los dominios homólogos con regiones calmodulina trombina C .

La GpIIIa contiene un gran número de cisteínas incluyendo cuatro cisteínas ricas en elementos repetidos. La expresión de las intracadenas de uniones disulfuro entre cisteínas estabiliza la molécula. La expresión de la GPIIb y por la tanto del complejo GPIIb/IIIa está restringido a los megacariocitos y plaquetas.

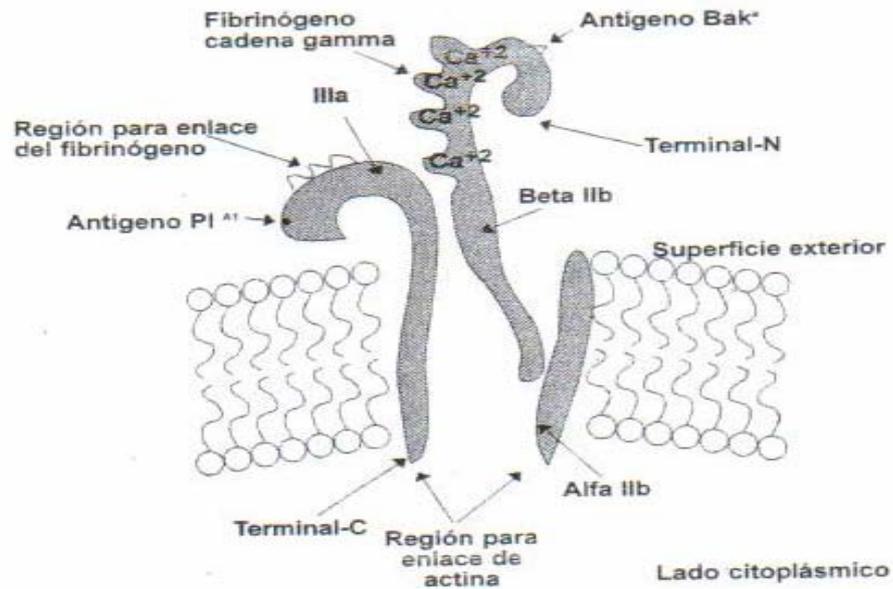


FIGURA 3

ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEINA IIb/IIIa DE LA MEMBRANA DE LA PLAQUETA.

Glicoproteínas IIb/IIIa vinculadas en un complejo después de la activación de la plaqueta en ellas están presentes los sitios de enlace para el fibrinógeno así como antígenos específicos de la plaqueta. Esta figura se tomo del libro de "Hematología Clínica" de Shirlyn B. McKenzie. <sup>(2)</sup>

### ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEINA Ib/IX/V (CD 42)

La GP Ib/IX es un heterodímero formado por la asociación gp Ib y IX, consta de dos cadenas consistiendo en dos subunidades una cadena pesada de GpIb $\alpha$  de peso molecular de 140,000 y una cadena ligera GpIb de peso molecular de 22,000; unidas por puentes disulfuro ambas unidades están glucosiladas en su porción externa, todas las subunidades del complejo pertenecen a la familia de proteínas ricas en leucinas con una secuencia de 24 aminoácidos que se encuentra en el gen 3q21 distribución en megacariocitos y plaquetas <sup>(5)</sup>

(FIGURA 4).

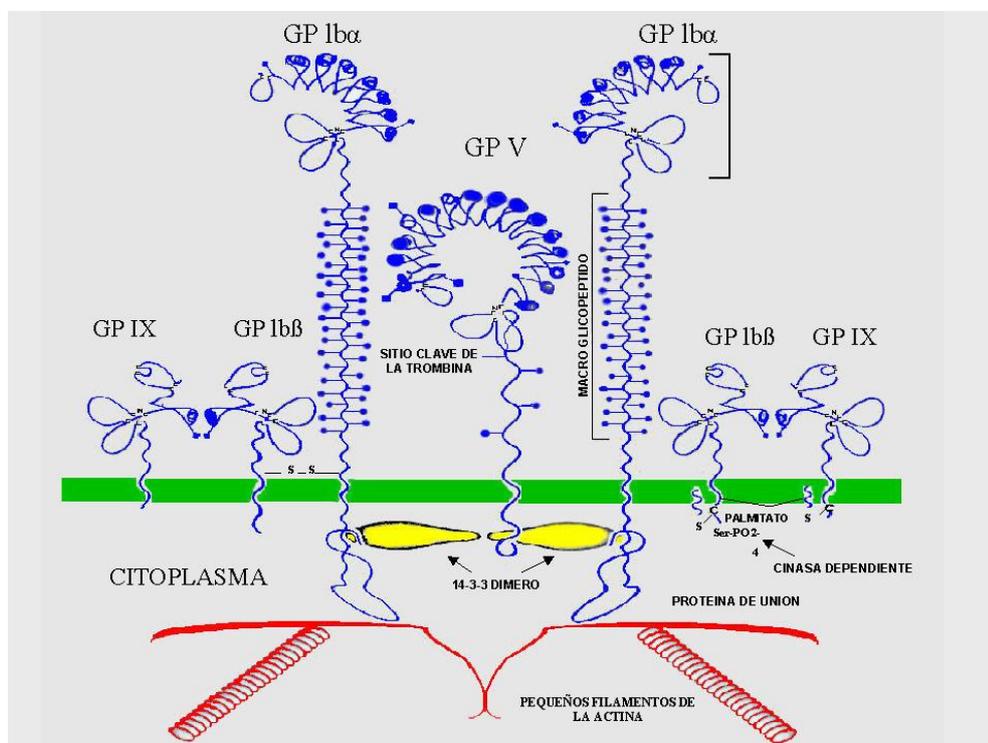


FIGURA 4 ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO Ib-IX-V .

Una posible adaptación del complejo Gp Ib-IX-V es mostrando con dos complejos de la Gp Ib-IX-V asociados con una molécula de Gp V. El rombo en los tallos describe el enlace "N" de la cadena de carbohidrato, los círculos en los tallos describen el enlace de la cadena c AMP, adenosin monofosfato cíclico, C cisterna, N asparagina, S sulfidrido <sup>(5)</sup>

Figura tomada del libro de Hemostasis y Thrombosis: Basic Principles an clinical third edition. W. Colman, Jack Hirsh, Victor Marder y Edwin W. Salzman.

## **FUNCION DE LAS PLAQUETAS**

Funciones de las plaquetas en la hemostasia:

Las plaquetas están implicadas en varios aspectos de la hemostasia. Una de las de las funciones que desempeñan parece ser la vigilancia pasiva del recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos con respecto a posibles brechas y fracturas, las plaquetas mantienen la continuidad o integridad de los vasos al llenar las brechas pequeñas causadas por la separación de las células endoteliales. Se adhieren a las fibras de colagena subyacentes del endotelio expuesto y evitan el escape de la sangre.

La disminución en el número de plaquetas en la sangre periférica resulta en escapes de sangre a través de estas brechas hacia el interior de los tejidos. Cuando se producen lesiones y hay una rotura real en la continuidad del recubrimiento de los vasos, las plaquetas reaccionan para formar el agregado conocido como tapón de plaquetas hemostático primario. Después de esta formación de tapón los fosfolípidos de la membrana de la plaqueta agregadas proporcionan una superficie de reacción para la formación de fibrina. Esta estabiliza el tapón de plaquetas inicial y la masa total de fibrina y plaquetas en el tapón hemostático secundario.

### **FORMACION DEL TAPON HEMOSTATICO PRIMARIO.**

Las plaquetas tienen forma de disco y son inertes en el ambiente del endotelio normal, la lesión de los vasos sanguíneos producen un cambio en el ambiente normal. Las plaquetas responden al cambio activándose. El tapón hemostático primario resulta de la transformación de las plaquetas inactivas a activas. El tapón se forma por una serie de pasos que se llama adhesión, activación y agregación <sup>(2)</sup>

Adhesión de las plaquetas.

La adhesión de las plaquetas en la formación del tapón hemostático primario, es la adhesión de las plaquetas a algo además de las plaquetas. Cuando el endotelio se lesiona se produce hemorragia y las plaquetas se escapan de los vasos sanguíneos y fluyen al interior de los tejidos

subendoteliales. Inmediatamente se pegan a componentes del subendotelio, de los cuales el elemento más importante son las fibras de colágena.

La adhesión de las plaquetas a la colágena sólo se produce con la ayuda del factor de von Willebrand (FvW) y de la Gplb de la membrana de la plaqueta.

Cuando se produce la adhesión de las plaquetas, el FvW se enlaza tanto a la colágena como a la Gplb en la superficie de la plaqueta y se convierte en un “puente” que conecta a la plaqueta a la fibra de colágena. Al continuar el enlazamiento la plaqueta se une mediante la adhesión de sus receptores, a varias proteínas adhesivas de la matriz del tejido conjuntivo y finalmente “se expande” sobre la superficie de la colágena.

Gran parte de lo conocido sobre esta fase de la función de las plaquetas se ha visto en el estudio de los pacientes con enfermedades en las cuales las plaquetas no se adhieren de manera apropiada: la enfermedad de Bernard-Soulier y la enfermedad von Willebrand. La enfermedad de Bernard-Soulier se caracteriza por la falta de Gplb en la membrana de la plaqueta.

#### Activación.

La adhesión de las plaquetas a las fibras de colágena a través del FvW desencadena una serie de cambios morfológicos y funcionales conocidos como activación. La activación es un proceso complicado que no se comprende totalmente. Los cambios mejor estudiados incluyen cambios en 1) bioquímica metabólica, 2) forma, 3) receptores de superficie y 4) orientación de los fosfolípidos de la membrana. Solo las plaquetas activadas tienen la capacidad de proceder con los pasos subsecuentes en la formación del tapón hemostático primario. Una vez activada, la respuesta de la plaqueta se vuelve permanente.

Los cambios en la bioquímica metabólica están presentes normalmente dentro de las células, pero se generan cuando las células se lesionan.

Un agente que induce activación de plaquetas se conoce como agonista. Cada agonista se enlaza a un receptor de plaquetas específico y causa una serie de reacciones en el interior de la plaqueta.

Los cambios bioquímicos se inician cuando el FvW y la colágena entran en contacto con el receptor de la Gplb en la superficie de la plaqueta. Las enzimas en la membrana se activan y fragmentan fosfolípidos específicos de la

membrana. Los productos resultantes son “segundos mensajeros” que penetran en el citoplasma de la plaqueta y transfieren la señal a las partes interiores de las células. <sup>(2)</sup>

Se describen las vías y los productos de segundos mensajeros de tres enzimas de membrana: la fosfolipasa C, la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la adenil ciclasa. Los productos de las tres causan un movimiento rápido de los iones de calcio intracelular a partir de los sitios de almacenamiento en el sistema tubular denso.

Las plaquetas en reposo tienen concentraciones muy escasas de calcio iónico en el citoplasma.

El sustrato de la fosfolipasa C es un derivado del fosfatidilinositol (PI). El PI es uno de los fosfolípidos que se encuentran en cantidad en la hoja interior de la capa doble.

Uno o dos grupos de fosfatos pueden agregarse enzimáticamente al PI a través del ATP en las posiciones 4 y 5 del inositol para formar fosfoinositol-4-monofosfato o fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>).

La fosfolipasa escinde al PIP<sub>2</sub> y se forman dos compuestos, cada uno de los cuales causa un conjunto separado de vías internas. El primero, el inositol-1, 4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>).

La fosforilación es un proceso regulador en todas las células y da lugar a la activación de algunas proteínas y a la inactivación de otras. La fosfolipasa A<sub>2</sub> se estimula por el incremento del calcio citoplásmico descrito antes. La fosfolipasa A<sub>2</sub> hidroliza al ácido araquidónico es un ácido graso insaturado. En la plaqueta el tromboxano A<sub>2</sub> se sintetiza del AA por las enzimas ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa. Dentro de la plaqueta, el tromboxano A<sub>2</sub> estimula la secreción de los gránulos de esta. La secreción normal no se produce si se bloquea la síntesis del tromboxano A<sub>2</sub>. La ingestión de aspirina inhibe a la ciclooxigenasa y evita que las plaquetas afectadas sintetizen tromboxano A<sub>2</sub>. El tromboxano A<sub>2</sub> es un compuesto lábil y se convierte espontáneamente en una variante inerte, el tromboxano B<sub>2</sub>, poco tiempo después de su síntesis.

La enzima adenilciclase, se estimula por los agentes inhibidores de la agregación de plaquetas y se bloquea por muchos agonistas promotores de dicha agregación.

La activación se continúa con un cambio en la forma de la plaqueta cuando el nivel interno de calcio alcanza un umbral. El cambio de forma es la transformación de las células de forma de disco en esferas con proyecciones espinosas llamadas pseudópodos. Implica a las proteínas de la zona estructural, incluso a las del citoesqueleto de la membrana actina y miosina en la celosía citoplásmica, y los microtúbulos. Durante el cambio de forma de los pseudópodos, los microtúbulos se disuelven. Cuando se forman los pseudópodos, los microtúbulos reaparecen con ellos. Al mismo tiempo la actina G se polimeriza de manera tal que de 70 a 80% se convierten en filamentos de actina F. <sup>(2)</sup>

A través de la proteína fijadora de actina, esta red se adhiere al complejo Gp Ib/IX en la membrana citoplasmática. Adicionalmente, otros filamentos de actina F se vinculan con miosina y forman una red de actomiosina. La miosina se activa mediante fosforilación por la proteína cinasa C, la miosina cinasa de cadena ligera por otras enzimas y se vincula con la actina F. la actomiosina proporciona un sistema de unidades contráctiles comparable con el del músculo liso.

El resultado de cada cambio de forma es que cada plaqueta tiene un área de membrana superficial más grande para las reacciones bioquímicas y una mayor probabilidad de establecer contacto con otras plaquetas.

El tercer elemento de la activación da lugar a la aparición del receptor de GpIIb/IIIa al cual se enlaza el fibrinógeno. Este receptor está oculto en las plaquetas en reposo, pero aparece muy pronto después de la activación. Las plaquetas son capaces de enlazar fibrinógeno solo después de que aparece un receptor de GpIIb/IIIa. Para este enlace del fibrinógeno se requiere calcio.

En la plaqueta en reposo, la GpIIb y la GpIIIa son entidades separadas. Algunos autores describen la naturaleza de la aparición del receptor de la GpIIb/IIIa como una unión de ambas después de la estimulación por un agonista.

El cuarto aspecto de la activación es un cambio en la superficie de la membrana el cual permite que las proteínas formadoras de fibrina se enlacen a ella. Esta función se conoce como actividad procoagulante de la plaqueta.

Las proteínas se enlazan en complejos que permiten la orientación correcta de las enzimas y se forman moléculas sustrato, como la fibrina.

#### Agregación.

Después que las plaquetas adherentes se activan, el tapón hemostático primario continúa en una fase conocida como agregación. La agregación de las plaquetas es la adhesión de las plaquetas entre sí. Las plaquetas nuevas que fluyen al interior del tejido hemorrágico se activan por contacto con agonistas como ADP los cuales se liberan por el tejido y las células endoteliales. Con la activación las plaquetas nuevas sufren cambio de forma, y se expone su sitio de glucoproteína IIb/IIIa. Las plaquetas nuevas se pegan luego a las que están adheridas a la colágena. <sup>(2)</sup>

La agregación se produce en dos fases llamadas: la agregación primaria las plaquetas se adhieren laxamente entre si; si el estímulo por los agonistas es débil la agregación es reversible. La agregación secundaria tarda más tiempo y empieza cuando las plaquetas comienzan a liberar su propio ADP y otros contenidos de los gránulos y a sintetizar tromboxano  $A_2$ .

Si las plaquetas son incapaces de liberar ADP o de sintetizar tromboxano  $A_2$ , o de ambas cosas, no se produce la agregación secundaria y se desagregan. El resultado puede ser que la hemorragia de una herida tarde más tiempo en detenerse. Se necesita fibrinógeno y calcio extracelular para que se produzca la agregación. Ambos son elementos constitutivos del plasma. También, ambos son liberados por las plaquetas de los gránulos internos de almacenamiento para proporcionar altas concentraciones en el área lesionada. No se conoce exactamente la función del calcio en la agregación de las plaquetas, el calcio es un segundo mensajero que afecta la actividad de muchas enzimas a la interacción entre proteínas y a la adhesión. Las plaquetas en reposo mantienen una concentración de calcio citosólico libre baja que se mantiene bombeando hacia fuera a través de la membrana plasmática por un mecanismo desconocido y que secuestra al calcio; la del fibrinógeno es formar un "puente" que une a dos plaquetas adyacentes. El fibrinógeno tiene la

capacidad de unir las dos plaquetas debido a su estructura molecular, el fibrinógeno es un compuesto de dos pares de tres cadenas de polipéptidos, alfa, beta y gamma. Un juego de las tres cadenas péptidas forma un dominio D en cada extremo de la molécula. Las seis cadenas se unen en el centro de la molécula en el dominio E, una molécula de fibrinógeno se puede adherir a los receptores de GpIIb/IIIa en dos plaquetas diferentes a través de los sitios de enlace en las cadenas alfa, beta y gamma de su dominio D. El extremo carboxilo terminal de la cadena gamma y dos sitios de la cadena alfa del fibrinógeno se enlaza a secuencias de aminoácido cortas específicas y complementarias en el receptor.

La necesidad de receptores de GpIIb/IIIa en la agregación de las plaquetas se encontró al estudiar a los pacientes con un trastorno raro llamado trombastenia de Glanzmann. Las personas con esta enfermedad carecen de receptores GpIIb/IIIa y las plaquetas no se agregan como respuesta a varios agonistas en las pruebas de agregación de las plaquetas. Los pacientes con valores disminuidos de fibrinógeno también tienen agregación anormal de las plaquetas. Otras proteínas adhesivas como la FvW, la trombospondina y al fibronectina también se enlazan al receptor GpIIb/IIIa, pero sus funciones en esto no son claras.

Secreción (liberación).

Después de la adhesión cambio de forma y agregación primaria, las plaquetas comienzan a descargar en el área circundante los contenidos de los gránulos. El proceso se conoce como secreción o liberación. La secreción depende de energía y se requiere de ATP. <sup>(2)</sup>

## **ENFERMEDADES CONGENITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA.**

Los defectos de adhesión y agregación son los que asocian con los síntomas clínicos más graves. La función defectuosa de las plaquetas es clínicamente importante y ésta es hereditaria o adquirida. Los trastornos

hereditarios suelen ser autósomícos recesivos en los cuales las plaquetas no se adhieren a la colágena y son la enfermedad de Bernard Soulier y la trombostenia de Glanzmann en la cual las plaquetas son deficientes en el complejo glicoproteínico IIb/IIIa estas forman el sitio de adhesión de fibrinógeno a la superficie de la plaqueta.

En los trastornos adquiridos la disfunción de la plaqueta es inducida por diversas situaciones y con la ingestión de ciertos fármacos como la aspirina que afecta la función de las plaquetas al acelerar de manera irreversible a la enzima ciclooxigenasa y por lo tanto evita la formación y liberación de Troboxano A<sub>2</sub>. La trombostenia de Glanzmann y el Síndrome de Bernard Soulier se debe a una expresión reducida del receptor Gp IIb / IIIa que impide total o parcialmente la agregación plaquetaria y de la Gp I b / IX / V que disminuye o incluso anula a la adhesión de las plaquetas <sup>(3)</sup>

El estudio de estos pacientes ha contribuido mucho para entender dichas enfermedades.

### **SINDROME DE BERNARD SOULIER (DEFECTO DE LA ADHESION PLAQUETARIA).**

Se hereda como un carácter autosómico recesivo, caracterizado por trombocitopenia, plaquetaria. El complejo GP Ib -IX- V es único en el plasma, el complejo de la membrana glicoproteico esta relacionado con la estructura de otros receptores de membrana que disminuye o incluso anula la adhesión de las plaquetas respectivamente aunque existen variantes raras, en las que las glicoproteínas están expresadas en densidad normal pero son disfuncionales como la disminución o ausencia del enlace del ligando receptor.

La adhesión de las plaquetas es el primer paso para la formación del tapón hemostático primario. Cuando el endotelio se lesiona se produce hemorragia y las plaquetas se escapan de los vasos sanguíneos y fluyen al interior de los tejidos subendoteliales, inmediatamente se pegan a los componentes del subendotelio de los cuales el elemento más importante son las fibras de colágeno. Las superficies subendoteliales son componentes a

los cuales las plaquetas no se exponen normalmente. La adhesión de las plaquetas a la colágena solo se produce con la ayuda del Factor de von Willebrand (FvW) y de la glicoproteína Ib en la membrana de la plaqueta.

La enfermedad de Bernard Soulier se caracteriza por la falta de la glicoproteína Ib en la membrana de la plaqueta. El Factor de von Willebrand actúa como un puente para unir a las plaquetas a la colágena a través de la Gp Ib.

En 1948 Bernard Soulier descubrió un infante de 5 meses quien sufría episodios recurrentes de pérdida de sangre. Este desorden es de carácter autosómico recesivo y todas las manifestaciones se encuentran en los homocigotos. La población heterocigota carece de síntomas clínicos y puede o no presentar alteraciones morfológicas y de laboratorio.

El defecto en la enfermedad de Bernard Soulier es una disminución en la cantidad o una función anormal de las fracciones de glicoproteínas de la membrana de la plaqueta incluso de la glicoproteína Ib/IX. Esto resulta de una mutación en los genes que codifica las glicoproteínas Ib alfa, Ib beta, o IX.

La falta de la glicoproteína Ib/IX funcional impide la interacción de las plaquetas como el Factor de von Willebrand así como la adhesión subsecuente con el colágeno. <sup>(4,5)</sup>

## CARACTERISTICAS CLINICAS

Los síntomas hemorrágicos afectan con mayor frecuencia a las membranas mucosas, epistaxis, hemorragia gastrointestinal, menstruaciones excesivas, diátesis hemorrágica, equimosis y petequias así como hemorragia excesiva después de traumatismos.

La enfermedad de Bernard Soulier es un trastorno hereditario raro de las plaquetas que se caracteriza por una mutación en el gen que codifica para la glucoproteína Ib (CD42) de la plaqueta para adherirse al colágeno. Las plaquetas del Síndrome de Bernard Soulier agregan y secretan normalmente en respuesta al ADP, a la adrenalina y al colágeno pero son defectuosas en lo que se refiere a la aglutinación en respuesta al factor VIII bovino .

Estas plaquetas tienen bajo contenido de ácido siálico, reducida movilidad lo que indica una anomalía de la membrana .<sup>(4,5)</sup>

#### DATOS DEL LABORATORIO.

Plaquetas	20 micras de diámetro en sangre periférica
Trombocitopenia	Entre leve y moderado
Tiempo de sangrado:	Aumentado
Agregación con:	
Ristocetina:	Anormal
FvW:	Anormal por que carecen de este
Receptor ADP:	Normal
Acido araquidónico:	Normal
Citometría de flujo:	CD 42, CD42b: ausente

#### TROMBASTENIA DE GLANZMANN

Es una enfermedad muy rara descrita por primera vez en 1918. Su herencia es autosómica recesiva caracterizada por una severa reducción o ausencia de agregación plaquetaria con respuesta agonistas fisiológicos como ADP, trombina, colágena y epinefrina y la enfermedad sólo es aparente en homocigotos.

Las plaquetas de los pacientes con la enfermedad de Glanzmann son deficientes o tienen el defecto en el complejo glicoproteínico IIb/IIIa.

Las glicoproteínas IIb y IIIa forman el sitio para la adhesión del fibrinógeno a la superficie de la plaqueta. El sitio receptor está oculto en las plaquetas en reposo y se hace "disponible" para el enlace solo después de la estimulación por ciertos agentes como ADP y trombina.

Los genes de ambas glicoproteínas están estrechamente conectados en el brazo largo del cromosoma 17. Cuando cualquiera de las glicoproteínas IIb o IIIa es defectuosa se produce una deficiencia del complejo total porque la producción de una depende de la producción de la otra.

El defecto molecular en el gen se ha estudiado en unos cuantos pacientes y varía de familia a familia. En los pacientes con trombostenia se producen anomalías adicionales de las plaquetas. Se presentan deficiencias de los antígenos como PI<sup>a1</sup> y Bak<sup>a</sup> normalmente presentes en el complejo IIb y IIIa.

Los pacientes con la enfermedad tienen de 5 a 20% del complejo en la superficie de las plaquetas. Los portadores obligados tienen de 50 a 60% y son fenotípicamente normales.

Como las plaquetas carecen de sitio para la adhesión del fibrinógeno no se produce agregación. Los aspectos de la función de las plaquetas que no dependen de la agregación como la adhesión son normales.

En contraste directo con el Síndrome de Bernard Soulier, las plaquetas trombosténicas se adhieren en forma normal al subendotelio, pero no pueden agruparse para la formación del tapón hemostático. La razón por la cual las plaquetas trombosténicas no se agregan está relacionado con la alteración en la unión del fibrinógeno a la membrana de la plaqueta debido a defecto en los receptores específicos de la membrana que se manifiestan

como disminución en las glicoproteínas II b y IIIa de la membrana plaquetaria.

La agregación de las plaquetas requiere la presencia de fibrinógeno y de la glucoproteína receptora IIb/ IIIa en la membrana plaquetaria. En ausencia de uno o más componentes, las plaquetas no interactúan con uno o con otro para producir agregación ya sea primaria o secundaria. <sup>(6, 7,8)</sup>

## CARACTERISTICAS CLINICAS

Los síntomas hemorrágicos pueden iniciarse en la lactancia y afectar regiones superficiales del cuerpo característico de las anomalías de las plaquetas.

Aunque suelen describirse de intensidad moderada, se han producido muertes debido a que los síntomas hemorrágicos no se distinguen de los correspondientes a otros trastornos plaquetarios hereditarios, no hay signos clínicos asociados y el diagnóstico se basa por completo en el resultado del laboratorio.

## ETIOLOGIA Y PATOLOGIA.

Las personas con la enfermedad de trombocitopenia de Glanzmann carecen de receptores para el complejo Gp IIb / Gp IIIa, caracterizada por trombocitopenia, plaquetas normales, ausencia de adhesión y agregación .

## DATOS DEL LABORATORIO.

Las plaquetas aparecen discretas y redondas en extensiones teñidas.

La cuenta plaquetaria y su morfología son normales pero el tiempo de hemorragia está prolongado y la retracción del coágulo es defectuosa .

Las plaquetas no logran la agregación en respuesta a ADP, Adrenalina, colágena o trombina.

Como las plaquetas carecen del sitio de adhesión del fibrinógeno no puede producirse agregación.

La trombostenia representa una insuficiencia pura de agregación plaquetaria primaria de tal modo que todas las respuestas plaquetarias son normales excepto las que dependen de la agregación

Plaquetas	Normales
Tiempo de sangrado	Aumentado
Retracción del coagulo	Ausente con Colágena, Trombina, ADP
Agregación con ristocetina	Normal o ausente
Agregación plaquetaria con ADP	Deficiente
Citometria de flujo: CD41,CD61	Anormal

Las anomalías de la función plaquetaria se determinaban por agregometría

-- Hay posibilidades de obtener resultados confusos tanto si este intervalo es muy corto como si es demasiado largo en la preparación del plasma rico en plaquetas y el estudio de agregación.

-- En la centrifugación, las plaquetas se vuelven parcialmente arreactivas lo que suele denominarse "Choque plaquetario" .

-- Dificultades cuando el recuento plaquetario en el plasma enriquecido es demasiado bajo.

-- Sensibilidad del instrumento utilizado para detectar y registrar la agregación. <sup>(9, 10)</sup>



## OBJETIVOS

- I. Identificar por medio de anticuerpos monoclonales las glicoproteínas presentes en las superficie plaquetaria , de pacientes con sospecha de trombopatias .
  
- II. Analizar las ventajas de identificar las glicoproteínas plaquetarias por citometria de flujo para el diagnostico exacto de trombopatias.

## CITOMETRIA DE FLUJO.

### ANTECEDENTES

La citometría de flujo aparece en los años 70 utilizando Helio, Neón, Argón, como fuente de luz se utiliza como instrumento que puede analizar diferente clase de células o señales que surgen de esas partículas.

En particular la tecnología de flujo encuentra sus antecedentes intelectuales en la microscopía y en los instrumentos que cuentan células de la sangre.

La citometría de flujo es de particular utilidad en el análisis de células que en condiciones naturales se encuentran en forma de suspensión, por ello el estudio de las células sanguíneas y sus precursores ha sido una de las áreas en las que mayor y mas rápido desarrollo ha tenido esta técnica. También necesita de fluorocromos diferentes que se seleccionan cuidadosamente de tal manera que la fluorescencia de uno pueda discriminar la de otro.

Los equipos los agrupan en canales de fluorescencia FL 1, FL 2, FL 3,

El rayo láser como fuente de energía es originado en Argón, por tanto, se pueden elegir fluorocromos que son excitados a 488 nm como el Isotiocianato de fluoresceína FITC y la ficoeritrina PE. <sup>(12,13)</sup>

La presencia de estos fluorocromos en la célula ya sea de forma natural (autofluorescencia) o unidos a ella artificialmente, el numero de emisiones fluorescentes detectables de forma simultanea es variable.

En la actualidad la mayoría de los citometros de flujo disponen de detectores (fotomultiplicadores) para emisiones fluorescentes de tres a cuatro longitudes de onda (colores).

## MATERIAL Y METODOS

### METODO DE DETECCIÓN DE GLICOPROTEINAS PLAQUETARIAS

#### METODO

- 1.- Cuenta de plaquetas en una Biometría Hemática.
- 2.- Separación de plaquetas por centrifugación a bajas revoluciones por minuto (1900rpm)
- 3.- Separar el plasma rico en plaquetas, de pacientes y sujetos normales
- 4.- Lavar el paquete de plaquetas con PBS al 0.009 % de EDTA disódico.
5. Colocar los anticuerpos monoclonales (AbMo) en los tubos de plástico de 13x100 mm en el siguiente

Orden:

Control

CD 41( GP II b / III a),

CD 42 b (GP I b  $\alpha$ )

CD 61 (GP III a con 41 subunidad de la Integrina  $\beta$ 3 ).

Para la reacción con los anticuerpos monoclonales conjugados con FITC

6. Después de lavar con un buffer de fosfatos 2 veces se decanta y se resuspende en 1 ml del buffer de fosfatos con EDTA.
7. Agregar de esta solución que contiene las plaquetas 100  $\mu$ l al tubo con los anticuerpos monoclonales incubar 30 min. en cámara húmeda.

8.- Lavar una vez con un buffer de fosfatos resuspender en 1 ml de buffer de fosfatos con EDTA.

9.- Análisis de fluorescencia en un citómetro de flujo EPICX XL (Coulter)

## CUANTIFICACION DE GLUCOPROTEINAS DE LA MEMBRANA DE PLAQUETAS.

### CYTOQUANT PLATELET (STAGO)

#### Fundamento

La sangre total de pacientes en ayunas es mezclada con un péptido agonista receptor de la trombina (induce agregación plaquetaria)

Se cuantifica la variación de la expresión de las GPs de la membrana GP II b/ IIIa, GP Ib, GP III a, GMP 140 por citometria de flujo.

Se prepara una “curva estándar” en base a una solución que contiene un número de

partículas conocido como fluorescencia. La fluorescencia obtenida en plaquetas de pacientes

se extrapola en la curva, lo cual se correlaciona con el número de partículas.  
<sup>(17,18)</sup> (Figura 5).

## TECNICA

MUESTRA Sangre citratada

### 1.- MARCAR 13 TUBOS DEL T<sub>1</sub> AL T<sub>13</sub>

T <sub>1</sub>	Pipetear	50 µl del Reactivo 1 diluido
T <sub>2</sub>	Pipetear	20 µl del Reactivo 5 reconstituido
T <sub>3</sub> y T <sub>8</sub>	Pipetear	20 µl de Reactivo 2a
T <sub>4</sub> y T <sub>9</sub>	Pipetear	20 µl Reactivo 2b
T <sub>5</sub> y T <sub>10</sub>	Pipetear	20 µl Reactivo 2c
T <sub>6</sub> y T <sub>11</sub>	Pipetear	20 µl del Reactivo 2d
T <sub>7</sub> y T <sub>12</sub>	Pipetear	20 µl del Reactivo 2e
T <sub>13</sub>	Pipetear	40 µl del Reactivo 3 (mezclar en vortex antes de pipetear)

T= Tubo

Reactivo	1	diluyente
Reactivo	2a	control isotipo ( Ig G)
Reactivo	2b	anti Gp IIb/ IIIa ( CD41)
Reactivo	2c	anti Gp Ib ( CD42 )
Reactivo	2d	anti Gp IIIa (CD61)
Reactivo	2e	anti GMP 140 (CD62)
Reactivo	3	perlas de calibración
Reactivo	4	fragmentos F(ab') <sub>2</sub> -IgG -FITC
Reactivo	5	TRAP ( Trombina , Receptor , peptido Antagonista )
Reactivo	6	Fijador PFA 1%

## 2.- Activación de plaquetas

- Pipetar 50  $\mu$ l de la muestra problema homogenizada en la T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> en el vortex.
- Incubar a Temperatura ambiente por 5 minutos.
- Agregar 500  $\mu$ l del Reactivo 1 diluido en los tubos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>
- Homogenizar los tubos usando un vortex.

## 3.- Inmunomarcaje de las muestras

- Agregar 20  $\mu$ l del T<sub>1</sub> a los tubos T<sub>3</sub> al T<sub>7</sub> .
- Homogenizar los 5 tubos usando un vortex
- Agregar 20  $\mu$ l del T<sub>2</sub> a los tubos T<sub>8</sub> y T<sub>12</sub>
- Homogenizar los tubos usando un vortex
- Incubar por 10 min. a temperatura ambiente

## 4.- Fijación

- Pipetar 50  $\mu$ l del reactivo 6 (PFA 1 %) en cada uno de los tubos del T<sub>3</sub> al T<sub>13</sub>
- Mezclar todos los tubos en vortex.
- Incubar todos los tubos a temperatura ambiente por 10 minutos
- Pipetear 2 ml del reactivo 1 diluido ( buffer ) en cada tubo del T<sub>3</sub> al T<sub>13</sub> .

Los tubos de la muestras ya preparados pueden ser almacenados por 8 horas de 2 a

8°C antes del análisis

## 5.- Análisis citométrico.

Mezclar cada uno de los tubos antes del análisis

Se utiliza el protocolo previamente diseñado de FS log vs SS log

## 6.- Calibración

Se lleva a cabo con el tubo 13. (Figura A)

Usar un histograma A FS log Contra SS log. Poner un discriminador sobre un "Background".

Hacer un mapa alrededor de la población de las partículas.

Anotar la media de las intensidades de fluorescencia para cada uno de los 4 picos de

fluorescencia con los cursores A, B, C, D, en la figura B. Usando el mismo procedimiento de adquisición de FS log contra SS log aislar las plaquetas con una ventana. En el histograma FL1 Log en la figura C anotar la media de la intensidad de fluorescencia de cada una de las pruebas.

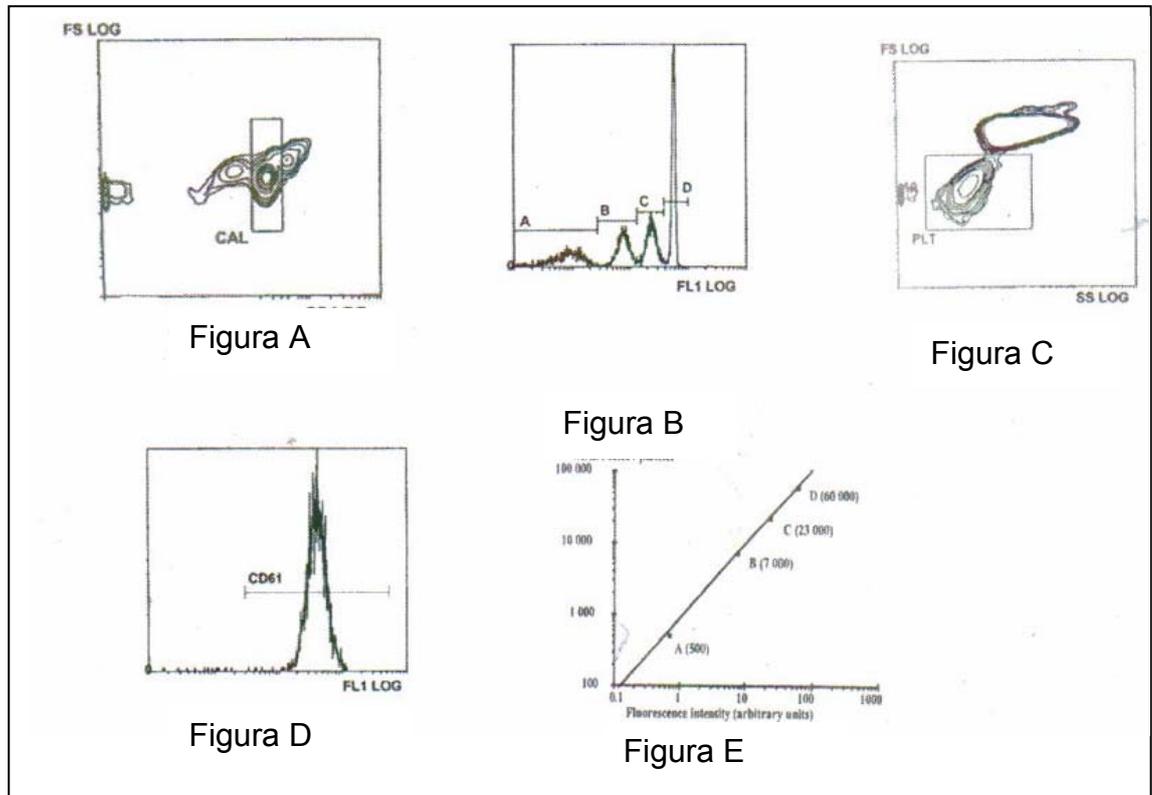


Figura 6. Histogramas obtenidas en el Citoquant: (A) El recuadro selecciona la población a estudiar; (B) señala la intensidad de fluorescencia de los cursores; (C) Se selecciona la ventana de las plaquetas; (D)

Marca la intensidad del marcador estudiado en base el número de plaquetas analizadas; (E) Gráfica de porcentaje de positividad en la población de plaquetas estudiada

Para la expresión débil de los marcadores (Control negativo GMP 140 =CD62) la intensidad media de fluorescencia correspondiendo al total de plaquetas analizadas (100%) debería ser anotada en la Figura D.

Para marcadores con mayor expresión ( Gp IIb / IIIa Gp I b , Gp IIIa ) anotar solamente la intensidad media de fluorescencia correspondiente al pico positivo de interés, Para esos marcadores un buen análisis permite la obtención de 90 % (Figura E) de células positivas en la ventana de plaquetas (17, 18,21).

## RESULTADOS

Se estudiaron 22 individuos sanos que fueron tomados como controles, la mitad fueron niños y la mitad adultos, doce pacientes con sospecha de trombastenia de Glanzman, cinco pacientes con sospecha clínica de síndrome de Bernard Soulier y cuatro papás de los pacientes del último grupo.

En el grupo control el valor mínimo obtenido para los tres marcadores estudiados fue de 75% y el máximo de 99%.

**TABLA CON LOS RESULTADOS DE LOS CONTROLES**

Paciente	Edad (años)	CD41	CD42	CD61
1	4	91	95	80
2	5	85	76	95
3	6	85	98	95
4	6	98	97	95
5	6	98	97	99
6	6	75	90	88
7	7	81	98	90
8	8	93	81	73
9	10	81	85	70
10	12	76	93	90
11	14	90	98	99
12	A	93	95	92
13	D	99	98	94
14	U	99	99	99
15	L	98	86	93
16	T	97	99	90
17	O	98	98	93
18	S	97	90	95
19		97	90	90
20		98	93	98
21		95	96	94
22		81	85	93

Desde 1997, en que se realizó en consenso Latino-Americano para la clasificación inmunológica de las leucemias, se estableció que en las células inmaduras la presencia de  $\geq 30\%$  de cada una de las glicoproteínas nos indica la diferenciación hacia la serie megacariocítica y el grado de maduración que tiene, sin embargo hasta el momento no se ha definido cual es el número de moléculas necesarias en la superficie de la plaqueta que representen el mínimo indispensable para llevar a cabo la adhesión y la agregación plaquetaria. Por esta razón y tomando en cuenta las concentraciones de factores de la coagulación necesarios para activar la cascada de coagulación y formar fibrina, se decidió en forma arbitraria considerar un valor de 60% como suficiente para que se realice en forma adecuada la adhesión y la agregación.

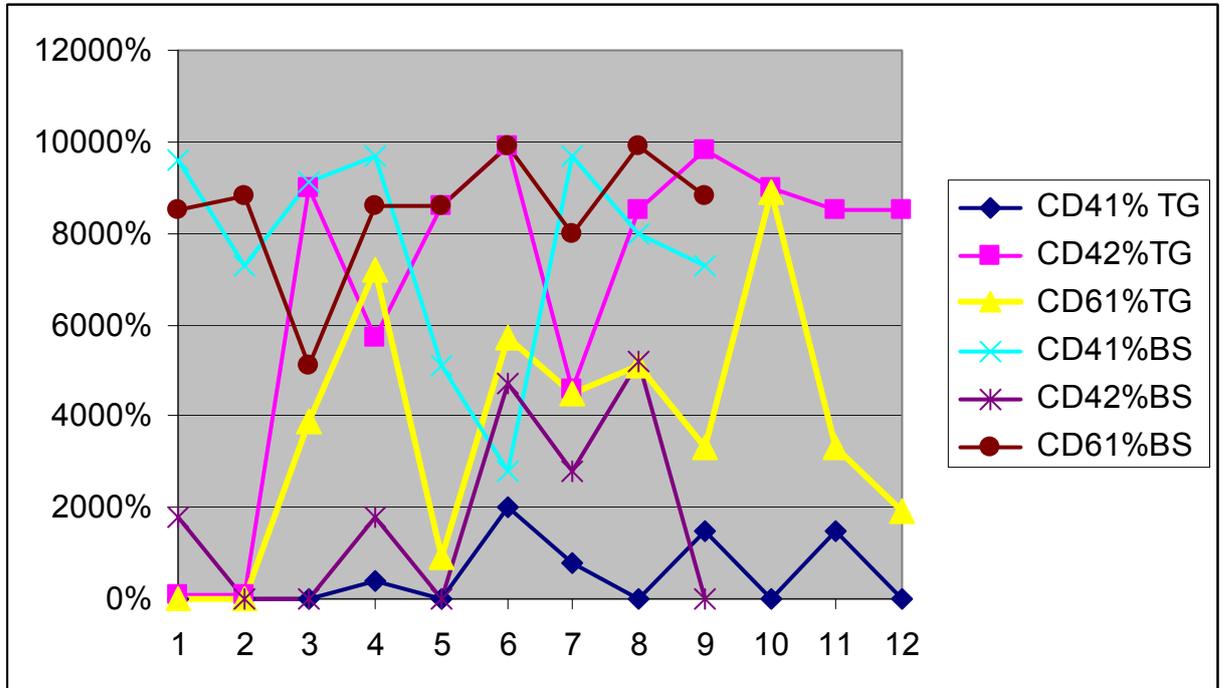
**TABLA CON LOS RESULTADOS DE LOS PACIENTES.**

	TROMBASTENIA DE GLANZMAN				Sx. BERNARD SOULIER			
	EDAD	CD41%	CD42%	CD61%	EDAD	CD41%	CD42%	CD61%
1	6 meses	0 %	89 %	0 %	4 años	96	18	85
2	8 meses	8.6 %	99 %	10 %	10 años	73	0	88
3	9 meses	0	90	39	10 años	91	0	51
4	10 meses	4	57	72	12 años	97	18	86
5	11 meses	0	86	9	ADULTO	51	0	86
6	1 año	20	99	57	ADULTO	28	47	99
7	1 año	8	46	45	ADULTO	97	28	80
8	3 años	0	85	51	ADULTO	80	52	99
9	4 años	15	98	33	ADULTO	73	0	88
10	ADULTO	0	90	89				
11	ADULTO	15	85	33				
12	ADULTO	0	85	19				

Una vez definido este valor se realizó mediante tablas de contingencia el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo para cada una de las glicoproteínas, obteniendo los siguientes resultados:

Para CD41 que identifica GpIIb/IIIa, se obtuvo una sensibilidad de 85%, especificidad de 100%, mientras que los valores predictivos positivo y negativo fueron de 60 y 77% respectivamente. Para CD61 (GpIIIa) se obtuvo una sensibilidad de 90%, especificidad de 80% y valores predictivos positivos y negativos fue de 83 y 88% respectivamente. En el caso de CD42 que evalúa al

complejo Ib/IX/V la sensibilidad fue de 81% y la especificidad de 100%, con valores predictivos de 100 y 83% para el positivo y el negativo respectivamente.



## **CONCLUSIONES:**

Con estos resultados podemos concluir que la especificidad y la sensibilidad de CD41 y CD61 son adecuadas, ya que con un valor por arriba de 60% en la sensibilidad tenemos una seguridad de 85% o más de estar diagnosticando adecuadamente la enfermedad, y por otra parte es tan específica que en más del 80% de los casos en que la prueba es negativa, tendremos la certeza de estar ante un paciente sin enfermedad.

A pesar de este resultado es importante remarcar que con CD61 tenemos un mayor número de pacientes con valores normales o cercano a lo normal, esto puede explicarse porque el defecto en trombostenina de Glanzman está dado por alteraciones del complejo GpIIb/IIIa, una vez que esta se ha formado, y por lo tanto es capaz de activarse, más que por una sola de las glicoproteínas medidas en forma aislada. Aunque lo más frecuente es que el complejo GpIIb/IIIa se encuentre disminuido, es importante recordar que el tipo 3 de la enfermedad está dado por un defecto funcional, que aun que no se ve necesariamente reflejado en la cuantificación del complejo, tal vez si está asociada a un nivel mayor de GpIIIa.

Datos muy similares podemos observar en el estudio del síndrome de Bernard Soulier, en el que la sensibilidad es de 90%, la especificidad de 80% y los valores predictivos positivo y negativo de 83 y 88% respectivamente, que nos confirman, al igual que en trombostenia, una alta certeza diagnóstica y un riesgo mínimo de subdiagnosticar la enfermedad. En este grupo con una enfermedad mucho más rara, vale la pena mencionar que los cuatro menores y uno de los adultos tenían el diagnóstico clínico fundamentado en las manifestaciones de sangrado en piel y mucosas, en la biometría hemática trombocitopenia de diferente intensidad y presencia de plaquetas gigantes, y se agregó la determinación de CD42 en <20% en todos ellos, mientras que los otros cuatro adultos son padres de dos de los pacientes estudiados y los cuatro se encuentran totalmente asintomáticos; si recordamos que se trata de una enfermedad autosómica recesiva y es de esperarse que los padres de los pacientes sean portadores de la enfermedad, se explica fácilmente la determinación de niveles intermedios de CD42, lo que muy probablemente esté traduciendo su condición de portadores, y solo llama la atención el último de los

padres, cuya determinación es de cero y al momento del estudio se encontró asintomático.

## **VENTAJAS Y LIMITACIONES**

- La aplicación de la citometria en el estudio de las plaquetas ofrece grandes ventajas sobre otros métodos de análisis porque es el único que hasta el momento también puede medir la activación de plaquetas individuales y detectar subpoblaciones de plaquetas.
- La utilización de anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes a permitido la detección y cuantificación de numerosos antígenos plaquetarios, lo que proporciona un análisis de alta especificad y sensibilidad
- La utilidad es determinar inequívocadamente que en el estudio son plaquetas con marcadores específicos para las glicoproteínas constitutivas de la membrana plaquetaria

- Es posible identificar sin lugar a dudas la glicoproteína plaquetaria afectada
- Se requieren mínimas cantidades de muestra.

#### Limitaciones

- Se necesita un operador especializado
- No es posible identificar defectos funcionales de las glicoproteínas
- Son equipos caros por lo que no se encuentran disponibles en la mayoría de los centros de trabajo
- El empleo de programas de computación
- Las muestras deben ser procesadas después de la extracción en no más de 45 minutos.

Sin embargo siempre que sea posible su utilización, tendremos la certeza de lograr la confirmación de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA .

- 1) MegaKaryocyte Biology and related disorders. The J.Clin.Invest. 2005;Dec 115 (12); Pàg.3332-3338
- 2) Shirlyn B., Mc Kenzie PHDCLS Hematologia Clínica. 1996, 2da Edición. Editorial Manual Moderno. Pág. 578-593.
- 3) Nurden AT and J.P. Caen An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombastenia Br. J. Haematol 1974; 28 253 – 260
- 4) Amy D. Shapiro M.D. Platelet function Disorders August 1999 No 19 World Federation of Hemophillia.
- 5) Nurden A.T., and J.N. George (2001). Inherited Abnormalities of the platelet membrane: Glanzmann thrombastenia – Bernard – Soulier Syndrome and oher disorders in hemastasis and trhombosis. Basic Principles an clinical practice R.W. Colman J. Hirsh V.J. Mader A.W. Clowes and J.N. George Eds (Philadelphia; Lippincott, Williams & Wilkins) Pag 921 – 946.
- 6) Phillips DR, IF, Charo, LV Parise and L.A. Fitz Gerald. The Plalelet membrane glycoprotein IIb – IIIa complex. Blood 1998; 71-831 – 843.
- 7) W. Colman, Jack Hirsh Victor Marder an Edwin W. Salzaman, 1994 Lippincott Company, Hemostasis Thrombosis: Basic Principles and clinical third edition. Cap 22,31. Pag 489 -497 y 765- 770.
- 8) Coller B.S Anderson K. Weisman H.F. New antiplatelet Gp IIb/IIIa antagonist Thromb – Haemost 1995, 74: 302-308.
- 9) G. Escolar M. Diaz – Ricart M. Garrido. A variant of Glazmann's thrombastenia wich fails to express a GpIIb – IIIa relative epitope that is recognized by a specific monoclonal antiboby (C17). British Journal of hematology 1992, 81: 545 – 551

- 10) DuX M. Gu, J.W Weisel C. Nagaswami J. S Bennett. Platelet Integrins. Throm – Haemost 1995; 74 (1): 352 – 359
- 11) Wintrobe's Clinical Hematology Platelets and Megakaryocytes I.N. 9<sup>th</sup> edited by G.R. Lee Pag. 47-50
- 12) Orfao A, Ruiz Arguellez A, Citometria de flujo y su aplicación en Hematología. Cap 12, 1992, Pàg.161 – 174-. Ediciones Universidad de Salamanca.
- 13) Darren H.M. Hickerson <sup>a</sup>, Arthur P Bode Ph. D. Flow Cytometry of platelets for clinical análisis. Hematol- Oncol Clin. N. Am 2002; 16: 421- 454.
- 14) J.P. Mc Coy Basic Principles of flow cytometry. Hematol - Oncol N. Am 2002; 16: 229 – 243.
- 15) Rev. Cubana Hematol / Inmunol / Hemoter 204: 20 ( 1)   
 [http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20\\_1\\_04/hih04104.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol20_1_04/hih04104.htm)
- 16) Stewart C.C. Clinical applications of cytometry. Immunology swing cell membrana and cytoplasmic antigens Cancer 1992,69: 15 – 18
- 17) Ginsberg M. H. Frelinger AL., Lam S.C.T., Forsyth J., Mcmillan R., Plow E.F., Shattil S.J.: Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies .Blood1990; 76: 2017-2023.
- 18) Michelson A. D., Ellis PA., Barnard M.R., Matic G.B., Viles A.F., Kestin A.S.: Downregulation of the platelet surface glycoprotein IIb-IIIa complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate or aspirin in vitro . Blood 1991; 77:770-779.

- 19) Bonescu A., Lindahl T., Solum N.O., Schulman S., Larsson A., Lundahl J., Egberg N.: Partial expression of Gplb measured by flow cytometry in two patients with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb.Res.* 1994; 76: 441-450.
- 20) Lages B., Shattil S.J. Bainton D.F., Weiss H.J.: "Decreased contents and surface expression of a granule membrane protein GMP 140 in one of two types of platelets  $\alpha\delta$  storage pool deficiency". *J Clin. Invest.* 1991; 87:919-929.
- 21) Michelson A.D. "Flow cytometry: A Clinical test of platelet function". *Blood* 1996; 87; 12: 4925-4936.