



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA.

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
“DR. ANTONIO FRAGA MOURET”

TESIS

DIFERENCIA EN LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA
DE LAS GLICOPROTEINAS PLAQUETARIAS EN LOS
PACIENTES CON Y SIN HEMORRAGIA ANORMAL CON
PRUEBAS COAGULOMÉTRICAS NORMALES

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA

PRESENTA
Dra. Andrea Mirelly López Flores

ASESORES
Dr. Jaime García Chávez
Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes.

CIUDAD DE MÉXICO, 2019.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

DR. JESUS ARENAS OSUNA

Jefe de División de Educación en Salud del HECMN La Raza.

DR. JORGE VELA OJEDA

Profesor Titular del Curso Universitario de Hematología (UNAM)

DRA. ANDREA MIRELLY LOPEZ FLORES

Residente de Cuarto Año de la Especialidad de Hematología

Núm. de Registro

R-2019-3501-075

Índice

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Material y métodos	11
Resultados.....	13
Discusión	17
Conclusión	20
Referencia bibliográfica	21

Resumen

Título: Diferencia en la intensidad media de fluorescencia de las glicoproteínas plaquetarias en los pacientes con y sin hemorragia anormal con pruebas coagulométricas normales.

Material y métodos: Estudio observacional, prospectivo, analítico, transversal, abierto, buscando determinar la diferencia en las glicoproteínas plaquetarias en sangre periférica, por medio de citometría de flujo, expresado como intensidad media de fluorescencia en pacientes con sangrado anormal inespecífico con pruebas coagulométricas y cuenta plaquetaria normales, comparado con donadores de banco de sangre, pareados por edad y por sexo. Se evaluaron glicoproteínas plaquetarias de mayor relevancia, como CD41, CD42, CD61, CD62P activo y no activo. Considerándose normal la expresión del 100% y anormal la disminución mayor al 20% comparado con el control. El análisis estadístico: estadística descriptiva, diferencia de proporciones, X^2 . Siendo estadísticamente significativo una $p=0.05$.

Resultados: Se reclutaron 17 pacientes, 14 mujeres y 3 hombres, con edad media de 32 años. La manifestación principal fue epistaxis. Cuenta plaquetaria promedio de 251,7/uL, fibrinógeno de 362, hemoglobina 14g/dL, Con una $p=0.3$ para CD41, $p=0.9$ para CD42, $p=0.3$ para CD61, $p=0,3$ para CD62 activado, $p<0.05$ para CD62 no activado.

Conclusiones: Hasta el momento no se ha reclutado la n calculada y no es posible emitir un resultado definitivo. Aunque, la diferencia no ha sido estadísticamente significativa, la tendencia es hacia una disminución de las glicoproteínas plaquetarias en los pacientes con sangrado anormal.

Palabras clave: Plaquetas, glicoproteínas, sangrado anormal, citometría de flujo, intensidad media de fluorescencia.

Abstract

Title: Difference in the median fluorescence intensity of platelets glycoproteins between patients with and without abnormal bleeding with normal clotting test.

Material and methods: Observational, prospective, analitic, transversal and open study, to determinate the difference of platelets glycoproteins detected in peripheral blood, by flow cytometer, expressed as median fluorescence cytometry in patients with nonspecific abnormal bleeding with normal basic clotting test and platelets count, compared with donors of blood bank, paired by age and sex. There were evaluated the glycoprotein of mayor relevance, as CD41, CD42 CD61, CD62 activated and non-activated. It was considered as normal the expression of 100%of platelets receptors and as abnormal the diminishment of more than 20% compared with the control. The statistical analysis was made by proportion difference, with central tendency measure and dispersion. The hypothesis was contrasted by X^2 . Being statistical significance a $p= 0,05$.

Results: There were recruited 17 patients, 14 women and 3 men; with median age of 32 years old. The meaningful sing was epistaxis. Median platelet count of 251.7/uL, fibrinogen 362 and hemoglobin 14 g/dL. With a $p=0.3$ in CD41, $p=0.9$ in CD42, $p=0.3$ pin CD61, $p=0,3$ in CD62 activated, $p=<0.05$ in CD62 non activated.

Conclusions: Till this moment the calculated n hasn't recruited, thus is not possible to emit a definitive outcome. Even to this moment hasn't been statistically meaningful; the tendency is to a diminishment of the platelets glycoprotein in patients with abnormal bleeding.

Key words: Platelets, glycoproteins, abnormal bleeding, flow cytometer, median fluorescence intensity

Introducción

Plaquetas

Las plaquetas se descubrieron por Giulio Bizzozero en 1882, y por muchas décadas la naturaleza dinámica y multifactorial de las plaquetas permaneció en un campo de interés solo para biólogos. ^(1,2,3)

Se forman en los megacariocitos en la médula ósea y el diámetro de una plaqueta madura es de 2 a 3 μm , usualmente viven de 5 a 9 días. Aproximadamente 2/3 circulan en la sangre y 1/3 se encuentra almacenado en el bazo. La cuenta normal de plaquetas de 150-450 $\times 10^3$ por microlitro de sangre. Cada megacariocito puede producir 5000-10000 plaquetas. Un adulto saludable promedio puede producir 10^{11} plaquetas por día; las plaquetas viejas se destruyen por fagocitosis en el bazo e hígado (células de Kupffer). ⁽⁴⁾

El papel de las plaquetas en la hemostasia.

Anteriormente se pensaba que el papel de las plaquetas en la hemostasia era mínimo, sin embargo, hoy en día sabemos que de hecho forman parte fundamental en los procesos trombóticos e inflamatorios (Jurk y Kehrel, 2005)^(5,6)

La importancia de las plaquetas para la homeostasis se hace más evidente en situaciones clínicas como trombocitopenia inmune primaria en la que se presenta una disminución de plaquetas importante, presentando en algunos casos hemorragia espontánea que puede poner en riesgo la vida de los pacientes. Sin embargo, pacientes con trombocitopenia grave, pueden no mostrar datos de hemorragia, lo que nos sugiere que existen factores adicionales para determinar la ocurrencia de una hemorragia. ^(7,8,9)

Estructura plaquetaria

Receptores de adhesión plaquetaria

Las plaquetas poseen una capa amorfa extendida unos 150 a 200 Å de la superficie, llamada glicocálix. Dichas glicoproteínas cumplen la función de receptores transmembrana de agonistas fisiológicos tales como adenosin difosfato (ADP), trombina y Tromboxano A₂ (TxA₂); proteínas de adhesión como fibrinógeno (Fg), fibronectina, Factor de von Willebrand (vWF), trombospondina, vitronectina; y para ligandos fibrosos como colágena.^(10,11,12)

Las proteínas adhesivas cumplen la función de ligandos para receptores específicos, la mayoría de ellos de tipo transmembranal.⁽¹³⁾ Finalmente, algunos receptores han sido nombrados según su función (por ejemplo, los receptores de vitronectina, fibrinógeno y fibronectina). Cabe destacar la capacidad de la plaqueta para realizar una amplia variedad de complejos eventos de señalización intracelular ya que un solo ligando puede iniciar varias respuestas funcionales distintas mediante la participación de diferentes receptores.^(14,15,16)

Activación y función plaquetaria

Cuando las plaquetas se activan, exteriorizan en su membrana estos receptores (entre 50.000 y 80.000 por plaqueta).^(17,18,19,20,21)

Durante los procesos de hemostasia secundaria se suscitan los eventos necesarios para la amplificación de la estimulación plaquetaria, que conduce a un estado procoagulante, generación de trombina y la formación de un coagulo de fibrina estable.⁽²²⁾

Integrinas plaquetarias

La glicoproteína IIb-IIIa es una integrina plaquetaria predominante, restringida a megacariocitos y plaquetas que media la agregación plaquetaria por la unión de proteínas como el fibrinógeno y el factor de von Willebrand. La ausencia hereditaria del complejo GPIIb-IIIa resulta en la incapacidad para la agregación por agonistas fisiológicos.⁽²³⁾

El complejo CD42 (a, b, c y d) se restringe a la línea megacariocítica y plaquetas. Estos complejos facilitan la adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial. La ausencia de CD42 lleva al síndrome de Bernard- Soulier.^(24,25)

CD41 (glicoproteína IIb) y CD61 (glicoproteína IIIa) forman un complejo heterodimero calcio dependiente. El complejo GPIIb-IIIa une proteínas plasmáticas, como fibrinógeno, fibronectina, factor de von Willebrand y vitronectina, y juega un papel crítico en la agregación plaquetaria. Defectos hereditarios del receptor de GPIIb-IIIa provocan la trombostenia de Glanzmann.^(26,27)

La GPIb -V-IX es un ejemplo notable de una molécula de superficie celular involucrada en la adhesión de las plaquetas que no es miembro de la familia de integrinas. La glucoproteína GPIb -V-IX cumple la función como receptor para el vWF. El vWF media directamente la adhesión plaquetaria rápida y reversible, asociándose con proteínas

de la matriz, lo que promueve el rodamiento plaquetario hacia el sitio de lesión del endotelio y subendotelio vascular. ^(28,29) Las integrinas son probablemente las encargadas de estabilizar estas uniones plaqueta- subendotelio. ⁽³⁰⁾

El papel de GPIb en la hemostasia no se limita a la unión de vWF, pues este es reconocido como un sitio de unión para la trombina, cuya importancia recae en la generación de macropartículas plaquetarias y la actividad procoagulante. Las plaquetas pueden utilizar el complejo GP Ib-V-IX y PSGL-1 para rodar en el endotelio activado a través de la P- selectina endotelial expresada en la superficie. Una consecuencia importante de la unión de GPIb-V-IX por vWF es la inducción de eventos de señalización intracelular que finalmente conducen a la activación de $\alpha_{IIb}\beta_3$, lo cual da pie a la agregación plaquetaria. ^(31,32)

La reactividad de las plaquetas involucra a algunos marcadores biológicamente activos, como CD36, CD41, CD42a, CD42b, y CD61. Estos incluyen algunos receptores de superficie activos y productos de secreción de plaquetas. Las plaquetas tienden a alterar la expresión y señalización de estos marcadores en diferentes enfermedades y de distinto pronóstico. Proveyendo un gran campo para explorar. ^(33, 34, 35)

Citometría de flujo en plaquetas

La función plaquetas normal depende de la presencia de receptores plaquetarios específicos en su superficie.

La mayoría de los estudios de la función de los receptores de la superficie plaquetaria son realizados por técnicas de unión por radioligando. Estos métodos son particularmente útiles para la determinación del número de receptores y afinidad y dependen de la medición de un gran número de células.

A través de citometría de flujo se puede medir un gran número de células de manera rápida y por más de una propiedad de cada célula cuantificada, facilitando la identificación de subpoblaciones. La interacción receptor plaquetario-ligando ha sido descrito para una variedad de glicoproteínas incluyendo trombospondina, fibronectina, y agonistas como ADP, epinefrina, y colágeno.

Algunas interacciones son vitales para que se lleve a cabo el proceso de coagulación de manera adecuada. La interacción de Gp-Ib-vWF es necesaria durante la hemostasia primaria y se evidencia su importancia en enfermedades como von

Willebrand o en síndrome de Bernard Spulier. La disfunción plaquetaria también puede ocurrir durante el estado terapéutico o patológico o fibrinólisis debido a degradación inducido por plasmina de Gplb.

Los desórdenes plaquetarios hereditarios son un grupo heterogéneo de desordenes que causan una propensión a la hemorragia. El rango de severidad va hemorragias graves como en la trombostenia de Glanzman y el síndrome de Bernard Soulier a defectos con solamente síntomas leves. Los defectos se pueden encontrar en las glicoproteínas plaquetarias, en los receptores, en el contenido o liberación de los gránulos, factores de transcripción y en vías de señalización. (35, 36, 37)

Debido a la complejidad del diagnóstico de estos desordenes, las herramientas diagnósticas involucran una variedad de métodos y procedimientos, que son más o menos accesibles aún para laboratorios especializados.

Un método diagnóstico clave en los desórdenes de función plaquetaria es la agregometría de transmisión de luz (LTA). (38)

La transmisión de luz se mida en plaquetas ricas en plasma (PRP) durante la estimulación agonista. Los cambios en la luz de transmisión se correlacionan con el grado de agregación plaquetaria. A través del uso de diferentes agonistas, un gran rango de desórdenes plaquetarios se pueden investigar. También, la liberación de ATP desde los gránulos densos se puede medir por LTA por el uso de quimioluminiscencia. LTA tiene la ventaja de que es un método establecido y muchos de los defectos conocidos se han caracterizado usando LTA.

Por lo que es considerado como el gold estándar para el diagnóstico de muchas disfunciones plaquetarias.

La desventaja principal es que el método requiere una muestra grande de sangre para realizarse, lo que hace el método menos óptimo para el diagnóstico en población pediátrica. LTA no es factible en pacientes con trombocitopenia, y no es aplicable para muestras con cuenta plaquetaria por debajo de $150 \times 10^9 /L$, siendo la trombocitopenia frecuente en pacientes con desordenes plaquetarios funcionales.

La citometría de flujo ha emergido como un método alternativo para el estudio de la activación plaquetaria. Se ha establecido un rol en el diagnóstico del síndrome de Bernard Soulier y trombostenia de Glanzman, donde la carencia de receptores puede ser detectada fácilmente en la superficie de plaquetas en reposo. (37,38)

Sin embargo, también se puede utilizar para el estudio de activación de plaquetas por diferentes agonistas. La exposición de antígenos específicos, como la activación de GPIIb-IIIa (PAC-1), P-selectina (CD62P) y LAMP-3 (CD63), en la superficie plaquetaria, se miden posterior la activación con un set de agonistas.

La principal ventaja de la citometría de flujo es el pequeño volumen de muestra de sangre que se requiere. Además, es menos sensible a la cuenta plaquetaria y por lo tanto pacientes con trombocitopenia pueden estudiarse por éste método.

La citometría de flujo en plaquetas es una tecnología emergente en la clínica e investigación en hematología. ⁽³⁸⁾

Algunas de las ventajas de la citometría de flujo sobre otros procedimientos de laboratorio que la hacen ideal son que se realiza el análisis en estado fisiológico de las plaquetas, la activación in vitro es insignificante debido a la mínima manipulación de la muestra, se requiere muy poca cantidad de sangre. Determinación simultánea del estado de reposo y activado de las plaquetas, procedimiento altamente sensible y específico para la detección de plaquetas en reposo y activadas y micropartículas derivadas de plaquetas. Análisis preciso de las plaquetas de pacientes aún con trombocitopenia grave La técnica de fluorescencia elimina el riesgo de exposición al material radioactivo. ⁽³⁷⁾

Por lo que se concluye que la citometria de flujo se puede utilizar para el diagnóstico de diversos trastornos plaquetarios, la evaluación del estado funcional de las plaquetas, el seguimiento de la terapia antiplaquetaria y los fines de investigación.

Material y método

Objetivo general

Conocer la diferencia en la cantidad de glicoproteínas plaquetarias entre los pacientes con sangrado anormal inespecífico que hayan presentado pruebas coagulométricas básicas y cuenta plaquetaria normales comparada con donadores de banco de sangre clínicamente sanos, pareados por edad y sexo.

Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional, prospectivo, analítico, transversal, abierto. Se invitó a participar a los pacientes en la consulta de hemostasia , a donde acuden normalmente para su atención y tratamiento, Se recibieron las muestras en tubo con citrato de sodio al 3.2% y se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto por 10 minutos para obtener plasma rico en plaquetas, posteriormente se realizó la dilución pertinente para obtener una concentración de plaquetas de 20,000 por microlitro, colocar 100 microlitros de esta dilución más 20 microlitros de anticuerpo monoclonal de interés acoplado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), se incubaron durante 20 minutos en oscuridad, temperatura ambiente y después de transcurrido ese tiempo, se adicionaron 3 ml de solución salina isotónica, se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm durante 5 minutos, se decantaron, y se adicionaron 2 ml de solución fisiológica y adquirieron al citómetro, para obtener los resultados. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Hematología Especial del hospital de especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, con el uso del Citómetro de flujo modelo "FACSCanto II" de Becton Dickinson utilizando el programa de "FACSDiva", versión 8.0.1, se determinaron CD41, CD42, CD61, Y CD62 P activo y no activo, expresándose como intensidad media de fluorescencia.

Población:

Pacientes mayores de 16 años con diagnóstico de sangrado anormal inespecífico cuyas pruebas de coagulación básicas (TP y TTPa) y cuenta plaquetaria son normales, que son atendidos en la clínica de coagulación a cargo del investigador

principal, Dr. García Chávez, del Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza.

Donadores clínicamente sanos de banco de sangre del mismo centro, pareados por edad y sexo con los casos.

Características sujetos de estudio:

Pacientes con sangrado anormal inespecífico con pruebas previas de coagulación normales, y con cuenta plaquetaria normal en su historial.

Características del grupo de comparación:

Serán donadores clínicamente sanos obtenidos del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza, pareados por edad y sexo con los pacientes en estudio.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes mayores de 16 años
2. Con afiliación vigente en el IMSS
3. Firma de consentimiento bajo información
4. Tiempo de protrombina y tromboplastina parcial activado normales.
5. Cuenta plaquetaria normal.

Criterios de no inclusión:

1. Pacientes con ingesta de antiagregantes plaquetarios
2. Pacientes con alteraciones en pruebas de funcionamiento renal
3. Pacientes con alteraciones en pruebas de funcionamiento hepático

Criterios de eliminación:

1. Paciente que retire el consentimiento bajo información
2. Muestras insuficientes para las determinaciones necesarias

Análisis estadístico

Se calculó una n de 38. El análisis estadístico se realizó mediante diferencia de proporciones, con medidas de tendencia central y dispersión. Se contrastó la hipótesis mediante X^2 . Tomando como estadísticamente significativo un valor de $p = 0.05$

Resultados

Se reclutaron 17 pacientes, 14 mujeres y 3 hombres, la edad media fue de 32 años, con un mínimo de 17 y un máximo de 64 años de edad. La mayoría presentando como signo principal epistaxis y otras hemorragias en mucosa. Sin presentar en la mayor parte antecedentes familiares de hemorragia. Con un promedio de cuenta plaquetaria de 251,705/ uL, y fibrinógeno de 362, hemoglobina de 14 g/dL, con un mínimo de 10 y un máximo de 17 g/dL. En la tabla 1 se muestran las características basales del grupo estudiado.

Tabla 1. Características basales del grupo de estudio

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Edad	15	17	64	32	16.7
Peso	15	45	95	67.9	10.48
Talla	15	1.59	1.73	1.54	38.8
Plaquetas	17	106	402	251.7	83.8
Fibrinógeno	15	223	502	362	83.24
Hemoglobina	17	10	17	14	2.31

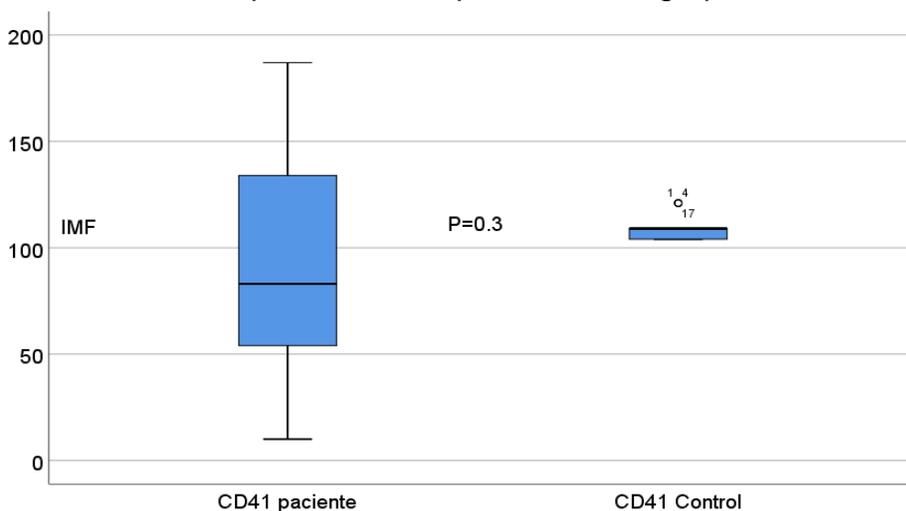
Se ha tomado como normal una cuenta plaquetaria por encima de 100,000/uL, ya que por encima de ésta cantidad no se presentarían hemorragias secundarias a la cantidad plaquetaria.

No se encuentran algunos datos basales en dos pacientes, por lo que, la edad, el peso, la talla y el fibrinógeno, se han podido analizar solamente en 15 pacientes de los 17.

CD41.

CD41 fue analizado en 17 pacientes, sin embargo, solo en 15 se compararon con un individuo de características similares, considerado normal por ser donador de banco de sangre, siendo anormal la disminución del 20% o más del valor del control, por lo que solo es posible analizar esos 15 pacientes en ésta variable.

Tabla 2. CD41 en pacientes comparado con el grupo de los donadores.

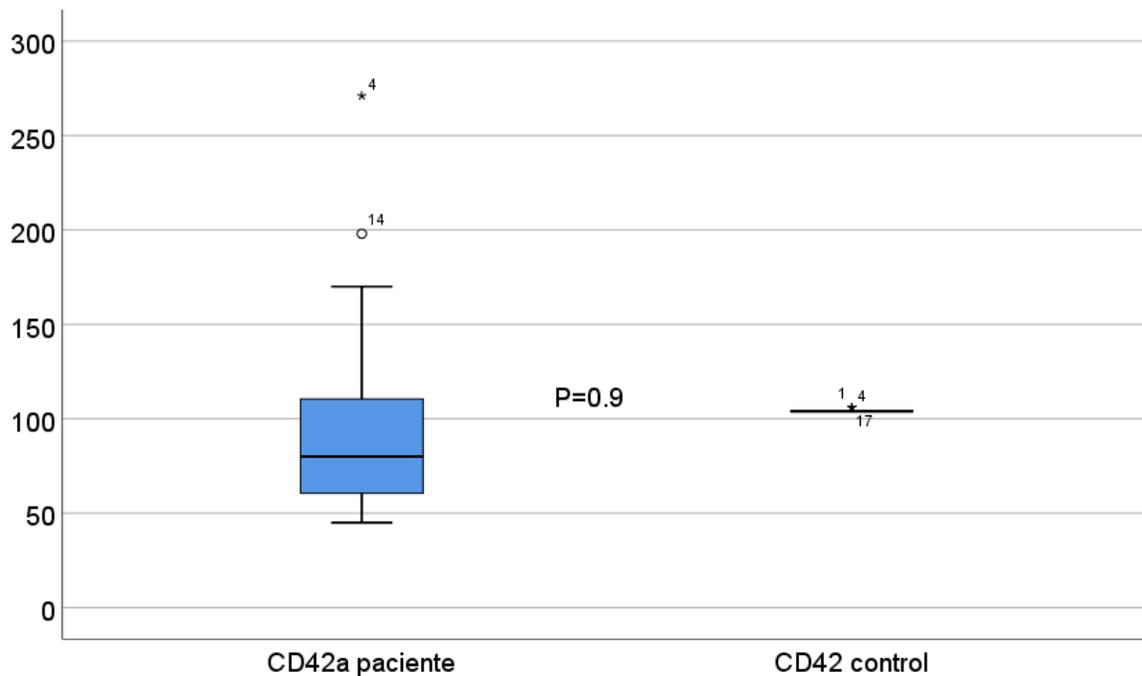


Se encuentra un promedio de intensidad media de fluorescencia de 89, con un mínimo de 10 y un máximo de 187 en el grupo de estudio, comparado con una media de 109, con un mínimo de 104 y un máximo de 121, en el grupo de comparación. Sin embargo, no se encuentra una P estadísticamente significativa al contrastar la hipótesis nula con χ^2 .

CD42

Con un promedio de intensidad media de fluorescencia de 101 en el grupo de estudio, un valor mínimo de 45 y un máximo de 271, comparado con un promedio de 104, con un mínimo de 104 y máximo de 106 en el grupo de comparación. Con una P no significativa muy cercana al 1.

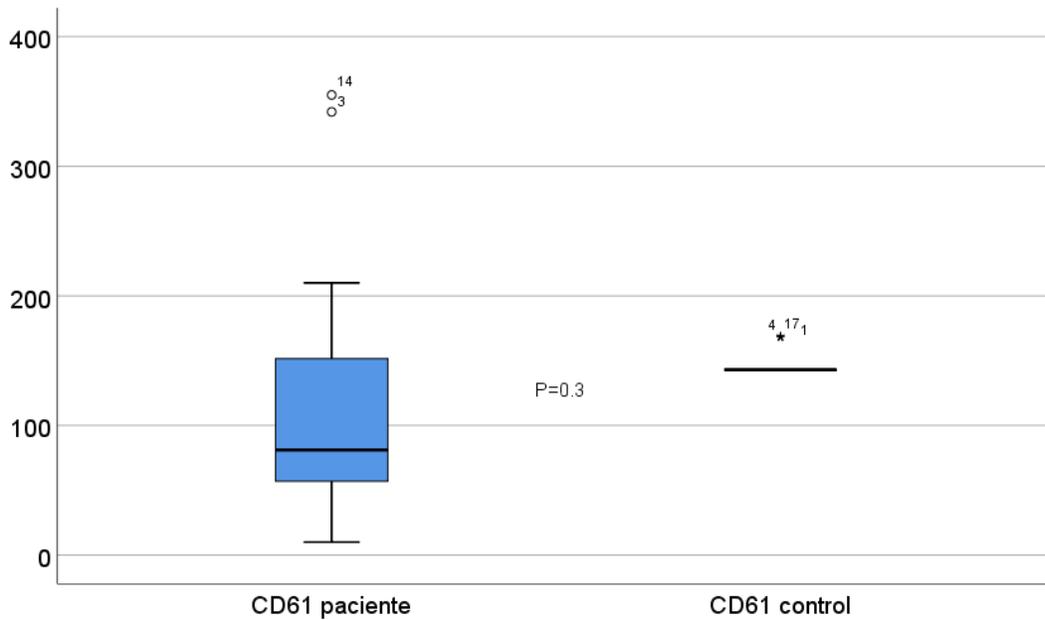
Tabla 3. CD42 en pacientes comparado con el grupo de los donadores.



CD61.

Se encuentra un IMF promedio de 111, mínimo de 10 y máximo de 355 en el grupo de estudio, comparado con un promedio de 148, mínimo de 143 y máximo de 169 en el grupo de comparación. Con una P no significativa de 0.3.

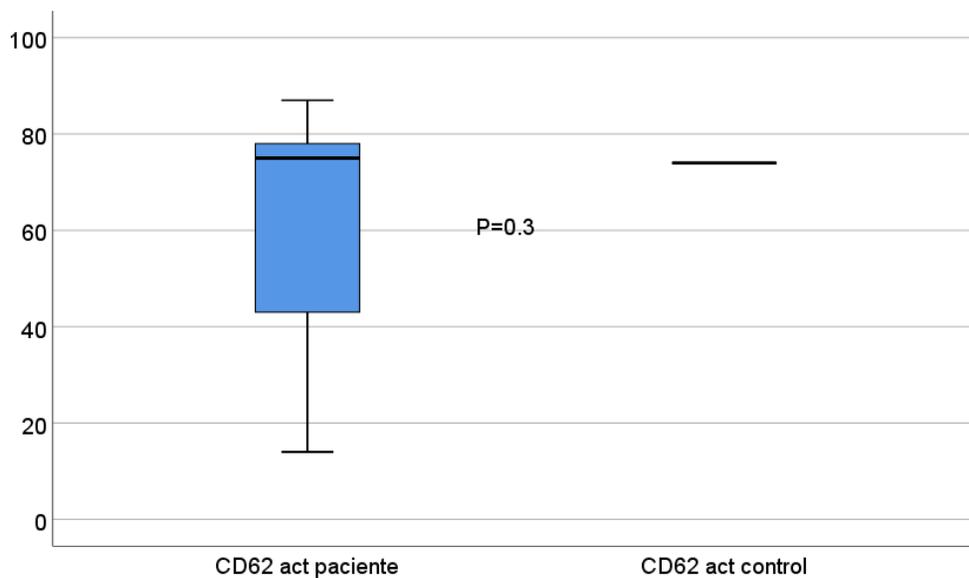
Tabla 4. CD61 en pacientes comparado con el grupo de los donadores



CD62P activado

Con ésta variable solo se analizaron 11 pacientes, encontrándose uniformidad en la IMF del grupo control en 11. Con una P no significativa de 0.3.

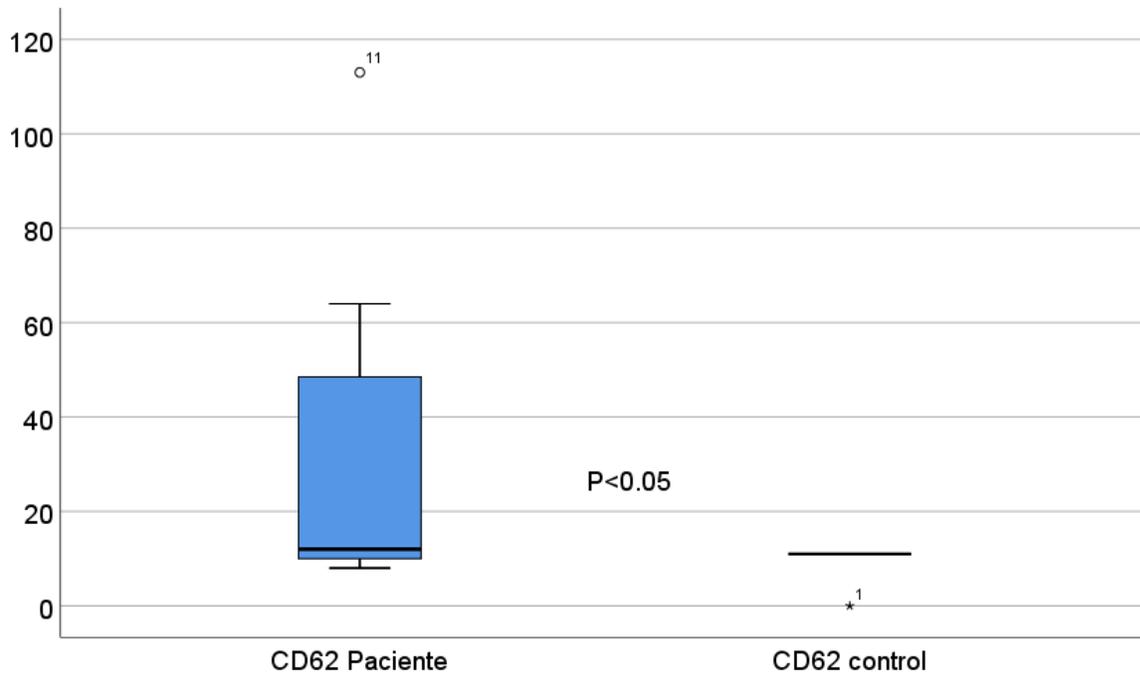
Tabla 5. CD62 activado en pacientes comparado con el grupo de los donadores.



CD62P no activado

Se encontró una IMF promedio de 54 en el grupo de estudio, con un valor mínimo registrado de 14 y un máximo de 87, comparado con un promedio de 74, siendo el único valor presentado en el grupo control. Solo de analizaron 5 sujetos con ésta variable, ya que se contaban con 8 pacientes, pero solo 5 comparados con control. Con una $P < 0.05$.

Tabla 6. CD62P no activado en pacientes comparado con el grupo de los donadores



Discusión

La hemostasia es un proceso dinámico conducido por eventos regulados que culminan en la detención del sangrado.

Las plaquetas tienen un papel importante en el proceso hemostático. En orden de reparar los vasos sanguíneos, las plaquetas se adherirán al subendotelio lesionado. La adhesión es un proceso que involucra muchos receptores de superficie. Los receptores de superficie especializados están a la vanguardia de este proceso y contribuyen a la adhesión, activación y agregación de las plaquetas. En condiciones de alto cizallamiento, las plaquetas se unirán al factor de von Willebrand, inmovilizadas en el colágeno expuesto en la pared del vaso a través de la GPIb/IX/V, seguido de la activación plaquetaria cuando GPVI se une al colágeno. La firme adhesión y dispersión es mediada por la GPIIb/IIIa unido a vWF, fibrinógeno y fibronectina y GPIa/IIa unido al colágeno. Todo esto, resultará, como se había mencionado, en la activación, cambio conformacional, secreción de los gránulos y exposición de la fosfatidilserina. ⁽³⁹⁾

Se ha sugerido que las diferencias en los niveles de expresión de estos receptores de superficie, antes y después de la activación de las plaquetas, contribuyen a la heterogeneidad de la respuesta en la formación de trombos.

Por ejemplo, la trombostenia de Glanzmann (GT), un trastorno hereditario autosómico recesivo caracterizado por un defecto cuantitativo y / o cualitativo en el receptor de fibrinógeno plaquetario, la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (CD41 / CD61) que causa un aumento del sangrado en los pacientes.

Diferencias intrínsecas en la densidad del receptor de la superficie de las plaquetas presentes en el momento en que se forman las plaquetas a partir de megacariocitos, que a su vez pueden ser heterogéneos y se ha sugerido que los cambios debidos al envejecimiento de las plaquetas y / o al historial de activación contribuyen a la naturaleza heterogénea de las plaquetas circulantes. ⁽⁴⁰⁾

El análisis citométrico de flujo de plaquetas teñidas con anticuerpos monoclonales específicos del receptor conjugadas con sondas fluorescentes (citometría de flujo de fluorescencia o FFC) se usa tradicionalmente en entornos clínicos y de investigación

para estudiar la función plaquetaria y diagnosticar pacientes con trastornos plaquetarios hereditarios

La citometría de flujo plaquetario es una herramienta emergente en la hematología diagnóstica y terapéutica. Está especialmente indicado para estudiar la expresión de los receptores de la superficie de las plaquetas tanto cualitativamente como cuantitativamente.

Desde su introducción hace 30 años, la citometría de flujo, ha sido la herramienta analítica estándar de oro para medir los antígenos de la superficie de las plaquetas.⁽⁴¹⁾

En éste estudio se han analizado un total de 17 pacientes, no obstante con una variabilidad en el número de pacientes analizados en cada variable, por no contar en todos los casos con un valor de comparación de acuerdo al grupo que se ha elegido para realizarse dicha comparación, al ser considerados personas normales por ser donadores del banco de sangre, sin enfermedades conocidas ni antecedentes de hemorragia o trombosis, de acuerdo a los cuestionarios realizados en el banco de sangre.

Al momento no contamos con el número de individuos considerados para el tamaño de muestra calculado, ya que aún se encuentra en marcha la realización del estudio.

Se analizó a una población en su mayoría joven y mujeres, con una frecuencia de hemorragias más alta en mucosas con manifestación como epistaxis, así también de manera frecuente, con presencia de menorragia

Todos con una cuenta plaquetaria mayor a 100,000/uL y con fibrinógeno normal.

Al analizar las variables, hasta el momento no se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa en los valores de intensidad media de fluorescencia de CD41, CD42, CD61 y CD62P, siendo estadísticamente significativo la diferencia de IMF de CD62P activado, del grupo de estudio contra el grupo de comparación. Siendo posible ésta diferencia a pesar del número pequeño de individuos estudiados en cuanto a ésta variable, debido probablemente, a la capacidad para discernir entre receptores funcionales y no funcionales por la activación de los mismos con cloruro de

calcio, de los pacientes considerados normales y los enfermos, encontrándose en éstos últimos menor activación.

Al aumentar el tamaño de la muestra hasta llegar a la N calculada, muy probablemente algunas variables pudieran alcanzar la significancia estadística.

Conclusión

Hasta el momento no hemos analizado el número de pacientes esperados para la n calculada, por lo que en éste momento no es posible emitir un resultado definitivo. Aunque la diferencia hasta el momento no ha sido estadísticamente significativa, la tendencia es hacia una disminución en la intensidad media de fluorescencia de las glicoproteínas plaquetarias estudiadas a través de citometría de flujo.

Referencia bibliográfica

- 1) Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*. 2014;2014:1-16.
- 2) Nieswandt B. How do platelets prevent bleeding?. *Blood*. 2008;111(10):4835-4835.
- 3) Nurden A. Platelet Membrane Glycoproteins: A Historical Review. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2014;40(05):577-584..
- 4) Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting Platelets in Acute Experimental Stroke. *Circulation*. 2007;115(17):2323-2330..
- 5) Trevor Bagli. (2012) *Drugs and haemostasis in Clinical Pharmacology Eleventh Edition*, 482-495.
- 6) Naeim, F. (2008). *Principles of Immunophenotyping. Hematopathology*, 27-55.
- 7) Juárez, U. (2001). Inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa en los síndromes coronarios agudos ¿cuál, cuándo, cómo? *Arch Cardiol Mex*. 71,85-90.
- 8) Martínez, C. (2003). Bases de la hemostasia y trombosis, Actualización en hemostasia y trombosis. *Gaceta Médica de México*. 139 (2), 28-68.
- 9) Cáceres, F. & Pérez, H. (2001). Los inhibidores de los receptores plaquetarios IIb/IIIa en los síndromes coronarios agudos. *Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovas*. 15(1), 40-51.
- 10) Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013;11(4):605-614.
- 11) Shen Y, Dopheide S, Gardiner E, Andrews R, Berndt M. The Vascular Biology of the Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;86(07):178-188.
- 12) Sandes A, Yamamoto M, Matarraz S, Chauffaille M, Quijano S, Lopez A et al. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2012;97(6):895-902.

- 13) Capoor M, Stonemetz J, Baird J, Ahmed F, Awan A, Birkenmaier C et al. Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time Testing: A Comparative Effectiveness Study in a Million-Patient Sample. PLOS ONE. 2015; 10(8):e0133317.
- 14) EACTS/EACTA Guidelines / European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 53. 2018. 79–111.
- 15) Hoffman R. et al. Hematology. Basic principles and practice. 6a Edición. Elsevier. 2013. 1730-1930.
- 16) Harrison. Medicina Interna. Trastornos de las plaquetas y la pared vascular. Mc-Graw Hill .19ª edición. 2016. Cap. 140.
- 17) De la Vega A. Determinación de subpoblaciones de linfocitos B, T, subtipos Th (1, 2, 17) y la activación de plaquetas en pacientes con PTA de novo, crónica y en remisión. [doctoral]. ENCB-CQB; 2015: 20-53.
- 18) Marder V. Hemostasis and thrombosis. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer health - Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- 19) Mendez N. Evaluación de la activación plaquetaria en la leucemia linfoblástica aguda. Ciencia UANL. 2007;X:149-159.
- 20) Chee Y, Greaves M. Role of coagulation testing in predicting bleeding risk. The Hematology Journal. 2003;4(6):373-378.
- 21) Adelman B, Michelson A, Handin R, Ault K. Evaluation of platelet glycoprotein Ib by fluorescence flow cytometry. Blood. 1985;66:423-427.
- 22) Marti G, Magruder L, Schuette W, Gralnick H. Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. Cytometry. 1988;9(5):448-455.
- 23) NURDEN A, NURDEN P. Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2011;9:76-91.
- 24) Gresele P, Harrison P, Bury L, Falcinelli E, Gachet C, Hayward C et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2014;12(9):1562-1569.

- 25) Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *Journal of Clinical Pathology*. 1988;41(12):1322-1330.
- 26) Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward C, Kenny D, Nugent D et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013;11(6):1183-1189.
- 27) Hayward C. How I investigate for bleeding disorders. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2018;40:6-14.
- 28) Lassila R. Platelet Function Tests in Bleeding Disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2016;42(03):185-190.
- 29) Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *Journal of Clinical Pathology*. 1988;41(12):1322-1330.
- 30) Skipper M, Rubak P, Stentoft J, Hvas A, Larsen O. Evaluation of platelet function in thrombocytopenia. *Platelets*. 2017;29(3):270-276.
- 31) Chandrashekar V. Does platelet count in platelet-rich plasma influence slope, maximal amplitude and lag phase in healthy individuals? Results of light transmission aggregometry. *Platelets*. 2015;26(7):699-701.
- 32) Rubak P, Nissen P, Kristensen S, Hvas A. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry. *Platelets*. 2015;27(1):66-74.
- 33) Boknäs N, Ramström S, Faxälv L, Lindahl T. Flow cytometry-based platelet function testing is predictive of symptom burden in a cohort of bleeders. *Platelets*. 2017;29(5):512-519.
- 34) Michelson A. Flow cytometric analysis of platelet surface glycoproteins: Phenotypically distinct subpopulations of platelets in children with chronic myeloid leukemia. *J Lab Clin Med*. 1987;110(3):346–354.
- 35) Michelson A. Evaluation Of Platelet Function By Flow Cytometry. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2006;35(1-2):67-82.

- 36) Podda G, Scavone M, Femia E, Cattaneo M. Aggregometry in the settings of thrombocytopenia, thrombocytosis and antiplatelet therapy. *Platelets*. 2018;29(7):644-649.
- 37) Orfao A, Ruiz-Arguellez A, Lacombe F. Flow cytometry: Its applications in hematology. *Haematologica*. 1995;80(1):69-81.
- 38) Harrison P. Assessment of platelet function in the laboratory. *Hämostaseologie*. 2009;29(01):25-31.
- 39) Tynngård N, Wallstedt M, Södergren A, Faxälv L, Ramström S. Platelet adhesion changes during storage studied with a novel method using flow cytometry and protein-coated beads. *Platelets*. 2014;26(2):177-185.
- 40) Blair T, Michelson A, Frelinger A. Mass Cytometry Reveals Distinct Platelet Subtypes in Healthy Subjects and Novel Alterations in Surface Glycoproteins in Glanzmann Thrombasthenia. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
- 41) Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. New Horizons in Platelets Flow Cytometry. *J Med Sci*. 2013;20(2):62-66.