

Análisis de las pruebas de Laboratorio que miden trastornos de la Coagulación

II. FUNCION PLAQUETARIA

DR. ALBERTO BARRANTES B.*

DR. CARLOS MONTERO U.**

DR. ROBERTO CORDERO M.**

El interés por los trastornos de la hemostasia dependientes de disfunciones cualitativas de las plaquetas ha aumentado gracias a las descripciones de los métodos utilizados para su estudio (7, 70, 12, 18, 21, 24).

Las plaquetas son fragmentos del citoplasma de los megacariocitos —miden alrededor de 7 micras cúbicas—, por lo tanto son anucleadas y no contienen DNA. Asimismo, contienen una variedad de organelas entre las que sobresalen los gránulos alfa —que son los más numerosos y semejan lisosomas—, los gránulos densos y las mitocondrias (30).

Las plaquetas son metabólicamente activas y su función depende de la síntesis continua de ATP por medio de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa. El 80% de la glucosa incorporada por las plaquetas es metabolizada anaeróbicamente y el restante 20% a través del metabolismo oxidativo (22). Las funciones plaquetarias que dependen de la generación de ATP incluyen la retracción del coágulo, la agregación plaquetaria inducida por ADP, la reacción de liberación, la incorporación de serotonina y epinefrina, y el transporte activo de potasio, glicina, ácido glutámico y ácido alfa aminoisobutírico en la plaqueta (6).

La plaqueta posee dos compartimientos o "pooles" de nucleótidos, uno es el pool

metabólico que puede ser marcado con material radioactivo y no es expulsado de la plaqueta durante la fase de liberación. El otro es el pool no metabólico o de depósito, que no puede ser marcado con ningún material radioactivo y que es expulsado durante la fase de liberación. Aproximadamente dos tercios del total del ATP y ADP de la plaqueta pertenecen al pool de depósito (22). Luego de una lesión del endotelio de la pared basal, las plaquetas se adhieren a la estructura subendotelial, principalmente a las fibras colágenas. Esta adhesividad plaquetaria al colágeno conlleva una serie de interacciones durante las cuales las plaquetas liberan algunos de sus constituyentes. Enseguida se sucede la formación de agregados de plaquetas que producen un tapón hemostático temporal, y por último una activación del mecanismo de la coagulación de la sangre mediante la cual produce agregación ulterior de las plaquetas (24).

Por lo tanto la plaqueta lleva a cabo funciones como adhesividad, agregación, liberación, formación de trombina y retracción del coágulo.

La adhesividad "in vivo", se lleva a cabo en la membrana basal, las microfibrillas y el colágeno, dependiente en este último de los grupos epsilon-amino libres de la molécula de colágeno (29). Evidencias recientes también indican que un factor plasmático —factor von Willebrand—, media la adhesión de las plaquetas al colágeno subendotelial y la membrana basal, expuestas cuando se rompe un vaso (23).

* Laboratorio de Investigación Clínica.
Hospital México.

** Servicio de Hematología - Hospital México.

La agregación se refiere a la adhesión de las plaquetas entre ellas con la formación del tapón plaquetario en el sitio de la lesión vascular (22). La habilidad de las plaquetas a agregarse parece controlada por niveles de AMP cíclico en la plaqueta. Muchos inhibidores de la agregación plaquetaria trabajan en la vía del sistema adenil-ciclasa-fosfodiesterasa (20).

La reacción de liberación es la expulsión al medio celular del material depositado en los gránulos de las plaquetas, y se divide en tres fases: inducción, transmisión intracelular y expulsión (22).

La liberación es un proceso rápido activo, en el cual el ADP se acompaña por el ATP, la serotonina, el factor plaquetario 4 y el calcio. Este material proviene de los gránulos densos y recibe este proceso el nombre de liberación I. La trombina o una alta concentración de partículas de tejido conectivo, pueden inducir liberación de enzimas como la beta-glucuronidasa de los gránulos alfa. Este proceso, llamado liberación II, ocurre más lentamente (30).

Durante la fase de liberación hay una alteración de la membrana plaquetaria y se hace disponible una lipoproteína de superficie —el factor 3 plaquetario—, que cataliza las interacciones del sistema intrínseco de la coagulación (13). Aparecen hilos de fibrina en la superficie del tapón plaquetario, se produce una consolidación del mismo y luego de esta las plaquetas se contraen haciendo al coágulo impermeable. Esta retracción es llevada a cabo por una proteína contractil de la plaqueta, la trombostenina (11).

Considerando la complejidad de la hemostasia primaria, no es sorprendente que el proceso pueda ser afectado en varias vías (2), pudiéndose dividir los desórdenes plaquetarios cualitativos en dos grupos: congénitos y adquiridos.

Dentro de los congénitos tenemos aquellos aislados como la trombostenia de Glanzman, la trombocitopatía A (deficiencia del pool de depósito), la trombocitopatía B (síndrome tipo aspirina) y el síndrome de Bernard-Soulier. Además se encuentran aquellas asociadas a otras afecciones congénitas como el síndrome de Wiskott-Aldrich, anomalía de May-Hegglin, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan y osteogénesis imperfecta.

Las adquiridas generalmente son asociadas a otro tipo de afección como uremia,

cirrosis hepática, macroglobulinemia, leucemia mielocítica crónica, mielofibrosis, policitemia vera y trombocitemia hemorrágica; asimismo tenemos aquellas asociadas a fármacos y productos tóxicos.

Luego de esta breve introducción sobre los mecanismos de acción de la plaqueta y de sus defectos cualitativos, podemos hacer un análisis de las pruebas que miden la función plaquetaria.

Tiempo de sangrado

Esta prueba mide todos los procesos específicos de la función plaquetaria (4), siendo hasta la fecha la prueba de mas valor en este sentido, pues mide "in vivo" la adhesión, la agregación y la liberación como una respuesta del organismo a la lesión vascular (22).

Desdichadamente, esta es una de las pruebas del laboratorio de coagulación que tiene más factores de error, muchos de los cuales se ha logrado evadir usando el método para el tiempo de sangrado de Ivy (12), que usa una presión constante en el brazo —40 mmHG—, con una herida de 1 mm de profundidad por 1 cm de largo.

El error más común consiste en no practicar una herida suficientemente profunda, lo que da un sangrado leve aun en sujetos con anomalías del número o de la función de las plaquetas.

Debe tenerse la precaución de hacer la incisión en una zona del antebrazo donde no haya mucha vascularización, pues si se corta una vénula no se produce la ausencia de sangrado transitorio después del corte —por la contracción capilar—, sino que la sangre aparece inmediatamente en mayores cantidades, pero con la salvedad de que el sangrado se detiene antes.

Existe un aparato para llevar a cabo la prueba que nos da una herida con las dimensiones apuntadas, lo que ayuda a eliminar en gran parte los errores inherentes de la prueba (19).

Un alargamiento del tiempo de sangrado, con normalidad del TTP y TP, nos indica una disminución del número de plaquetas o una alteración funcional de las mismas. Pero, una normalidad del tiempo de sangrado no excluye una anormalidad funcional de las plaquetas, pues hay algunas anomalías plaquetarias que no dan aumento del tiempo de sangrado (26).

Adhesividad plaquetaria

Una de las funciones de las plaquetas es su adhesión a los bordes de las heridas y además una plaqueta con otra.

En algunos casos no se ha podido establecer correlación entre parámetros que caracterizan la coagulación sanguínea y la adhesividad plaquetaria. Esto es evidente en dos síndromes hereditarios; la enfermedad de von Willebrand (4) y la trombostenia de Glanzman, en las que se encuentran factores de la coagulación más o menos normales con adhesividad alterada.

La adhesividad plaquetaria se mide "*in vitro*" por una técnica que consiste en pasar sangre —en condiciones estrictamente controladas—, a través de un filtro formado por una columna de perlas de vidrio, manteniendo un flujo constante de sangre por medio de una bomba de infusión.

Se hace un conteo de plaquetas antes y después del pasaje de la sangre a través de la columna, expresándose la adhesividad plaquetaria como el porcentaje de plaquetas que se adhieren a la superficie de vidrio.

El método más recomendable es el basado en el de Hellem (10), que tiene la ventaja de no requerir sangre tratada previamente con anticoagulantes. Los valores normales reportados son de $84.8 \pm 11.3\%$.

Existe además un método "*in vivo*" (3) para medir la adhesividad plaquetaria, pero que presenta los mismos inconvenientes que el tiempo de sangrado, con la ventaja de que es más fisiológico que el método "*in vitro*".

Agregación plaquetaria

El principio de la agregación plaquetaria se basa en el cambio de densidad óptica que se sucede en un plasma rico en plaquetas cuando se produce la agregación de las mismas.

Se coloca plasma rico en plaquetas en un recipiente a través del cual se dirige una fuente de luz constante. Con la temperatura de 37°C y con una agitación regulada de las plaquetas, la agregación permitirá un aumento de la transmisión de la luz a través del plasma, el cual puede demostrarse gráficamente.

La agregación plaquetaria puede ser provocada por varios agentes, existiendo cuatro que son los de más utilidad clínica: colágeno, adrenalina, ADP y ristocetina.

La agregación "*in vitro*" requiere de calcio extracelular y fibrinógeno, es dependiente fuertemente de la temperatura y necesita agitación mecánica de las plaquetas (1).

El colágeno, es uno de los componentes subendoteliales que reacciona "*in vivo*" causando adhesión de las plaquetas y finalmente su agregación. En el agregómetro una dilución de una suspensión de colágeno se añade a una alícuota de plasma rico en plaquetas y se observan los cambios de agregación que tienen lugar después de un período de espera. La liberación de ADP es la que provoca la agregación, por lo tanto, la agregación causada por el colágeno es una medida indirecta de la liberación de ADP por las plaquetas, y de la capacidad de estas para agregarse en respuesta al ADP.

El colágeno induce la agregación a través de un proceso de fagocitosis plaquetaria (22).

La adrenalina ejerce una acción directa sobre las plaquetas y provoca una respuesta de agregación primaria. Aun cuando la adrenalina misma puede provocar agregación, se observa una segunda fase originada por la liberación de ADP de las plaquetas (16). Medirá por lo tanto, anomalías en la respuesta primaria, la liberación y la capacidad de las plaquetas para responder al ADP.

La adrenalina induce la liberación a través de receptores específicos de membrana (22).

El ADP provoca una agregación directa sin período de espera y, según la concentración de ADP utilizado, puede delimitarse una segunda fase de agregación causada por la liberación de ADP por las plaquetas, la cual es inducida a través de receptores específicos de membrana (22).

La ristocetina es un antibiótico con un gran poder agregante. Su modo de acción es diferente al de los otros agentes agregantes, pues requiere de la presencia de factor von Willebrand para que tenga lugar su efecto sobre la agregación de las plaquetas (27, 25). Por lo tanto, es de gran utilidad para el estudio de pacientes con enfermedad de von Willebrand pues es posible cuantificar factor von Willebrand del cual son deficientes estos pacientes (27).

Las plaquetas en la trombostenia de Glanzman no se agregan en respuesta a ninguno de los agentes agregantes —excepto la ristocetina (22, 28)—, o sea se carac-

terizan en el agregómetro por la imposibilidad de agregación en respuesta a ADP, colágeno y adrenalina.

En las anomalías de liberación (trombocitopatía B), la deficiencia de este grupo depende de la incapacidad de las plaquetas en liberar nucleótidos endógenos en respuesta a ADP, adrenalina y colágeno. Por lo tanto, en el agregómetro observamos únicamente una respuesta primaria al ADP y a la adrenalina y no hay respuesta de agregación al colágeno.

El agregómetro por si solo no puede distinguir el grupo de anomalías de liberación y el grupo de almacenamiento del fondo común (trombocitopatía A), pues el comportamiento es idéntico. Para su diferenciación se requiere establecer cuantitativamente los nucleótidos del fondo común de almacenamiento o estudios de liberación de serotonina (18).

Factor 3 plaquetario

La actividad procoagulante de las plaquetas (F_3P) aumenta e interviene cuando las plaquetas se agregan con el colágeno y el ADP. El F_3P cataliza la generación de protrombina y del coágulo de fibrina, con lo cual se consolida el tapón plaquetario (26).

El F_3P puede hacerse disponible en la plaqueta intacta por modificación de la membrana, lo cual se produce en circunstancias como la agregación plaquetaria secundaria y el contacto con caolín o celite (21).

El F_3P actúa en dos lugares en el desarrollo del activador intrínseco de la protrombina, para lo cual suple una superficie catalítica para la interacción de los factores de la coagulación. En realidad el término factor-3-plaquetario es erróneo, pues este no es un factor bioquímico y su naturaleza química es desconocida (13).

Una prueba "*in vitro*" que mida verdaderamente el F_3P —lo cual no es posible actualmente—, revelaría la eficiencia de las plaquetas en su contribución a la formación del activador intrínseco de la protrombina.

Los sistemas que se usan "*in vitro*" para medirlo se basan en el principio de que la actividad del F_3P , o sus derivados se manifiesta por un acortamiento del tiempo de coagulación, comparado con un blanco de bófer, pero estos sistemas no son completamente adecuados.

Los métodos más usados (9, 21) usan veneno de la víbora de Russel. El veneno coagula el plasma en presencia de la lipoproteína plaquetaria disponible; pero cuando las plaquetas se incuban en presencia de caolín, que produce modificación de la membrana, el tiempo de coagulación se acorta y esto es tomado como una medida del F_3P , pero permanece desconocido si este acortamiento indica específicamente la habilidad de las plaquetas en catalizar la formación del activador intrínseco de la protrombina (13).

Si en lugar de poner a las plaquetas en presencia de caolín, para medir la disponibilidad de F_3P , se destruyen las plaquetas por procedimientos mecánicos o bien por congelamiento y descongelamiento rápidos, se pone en evidencia la máxima actividad que poseen las plaquetas (15).

Una comparación entre disponibilidad y F_3P total ayudaría al diagnóstico diferencial de trombocitopatías por mala liberación, de aquellas con defecto de depósito.

Pero, una deficiencia de producción o liberación puede verse aun cuando haya una liberación normal de ADP (8).

Factor plaquetario 4

Entre los elementos expulsados durante la fase de liberación, se encuentra una proteína de bajo peso molecular que es el FP_4 , una proteína estable al calor y liberada durante los estadios iniciales de la coagulación.

Este compuesto antagoniza la acción de la heparina y su investigación constituye un eficaz examen de la reacción de liberación. Así mismo, el aumento es índice de consumo plaquetario, como en la coagulación intravascular crónica o aguda y en el tromboembolismo. (17).

Incorporación de serotonina

Se basa este método en añadir 5-hidroxitriptamina marcada con Carbono-14 a un plasma rico en plaquetas. A diferentes intervalos de tiempo se toman alícuotas de la mezcla, se centrifugan a alta velocidad y se mide la ^{14}C -5HT en el sobrenadante. Este procedimiento va a dar una curva de porcentaje de incorporación de serotonina de plaquetas, teniendo su utilidad en la diferenciación de plaquetopatías con defecto de liberación de aquellas con defecto de depó-

sito, pues la característica común de ambos tipos de trombocitopatía es la ausencia de agregación secundaria y una disminución de la reacción de liberación (18).

Se comprobado que las plaquetas de pacientes con defecto de depósito incorporan 5HT en una proporción menor que las plaquetas normales, mientras las plaquetas de pacientes con defecto de liberación llegan a niveles normales de saturación. (18).

Estudios plaquetarios en pacientes con defecto de almacenamiento han llevado a la conclusión de que estos pacientes tienen una deficiencia de las organelas específicas en las cuales se cree que los nucleótidos y la 5HT se almacenan juntos.

Del estudio de las diferentes pruebas que se usan para el estudio de las plaquetas, podemos deducir que para el diagnóstico preciso de la disfunción plaquetaria es necesario efectuar el máximo de exámenes pues su clasificación depende de ello, debido a la heterogeneidad que presentan las anomalías cualitativas plaquetarias. No es posible hacer una clasificación basados únicamente en la agregación, pues los otros parámetros son complementarios y el conjunto es el que nos llevará a un diagnóstico verdadero.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ARKEL, Y.S.:
Valoración de la agregación de plaquetas en trastornos de la hemostasia.
Clin. Med. N.A. 60: 881, 1976.
- 2.—ASTER, R.H.:
Platelet disorders: Advances in understanding and management.
Postgr. Med. 55:50, 1974.
- 3.—BORCHGREVINK, C.F.:
A method for measuring platelet adhesiveness in vivo. *Acta Med. Scand.* 168: 157, 1960.
- 4.—BOWIE, E.J.W., OWEN, C.A., THOMPSON, J.H., DIDISHEIM, P.:
Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. *Am. J. Clin. Path.* 52:69, 1969.
- 5.—DIOGUARDI, N.:
Difetti qualitativi piastrinici.
Min. Med. 65:4351, 1974.
- 6.—DOERY, J.C.G., HIRSH, J., DeGRUCHY, G.C.:
Platelet metabolism and function.
Haematology. (Suppl) 4:405, 1970.
- 7.—FUSTER, V., KAZMIER, F.J., CASH, J.O., BOWIE, E.J.W., OWREN, Jr. C.A.:
Mayo Clin Proc. 48:103, 1973.
- 8.—GIROLAMI, A., BRUNETTI, A., FIORETTI, D., GRAVINA, E.:
Congenital thrombocytopathy (platelet factor 3 defect) with prolonged bleeding time but normal platelet adhesiveness and aggregation. *Acta Haemat.* 50: 116, 1973.
- 9.—HARDISTY, R.M., HUTTON, R.A.:
The kaolin clotting time of platelet-rich plasma. A test of platelet factor 3 availability. *Brit. J. Haemat.* 11:258, 1965.
- 10.—HELEM, A.J.:
Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. A study with a new modification of the glass bead filter method. *Scand. J. Haemat.* 7:374, 1970.
- 11.—HOLMSEN, H.:
The platelet: Its membrane, physiology and biochemistry. *Clinics Haematol.* 1:235, 1972.
- 12.—IVY, A.C., NELSON, D., BUCHER, G.:
The standardization of certain factors in the cutaneous "venostasis" bleeding time technique. *J. Lab. Clin. Med.* 26: 1812, 1940.
- 13.—MARCUS, A.J.:
Platelet Function. *New. Engl. J. Med.* Parte 1, 280:1213, Parte 2, 280:1278, Parte 3, 280:1330, 1969.
- 14.—MIELKE, C.H. Jr., KANESHIRO, M.M., MAHER, I.A., WEINER, J.M., RAPAPORT, S.I.:
The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin.
Blood. 34:204, 1969.
- 15.—MOLINA, F.:
Determinación de factor plaquetario 3. *In* Técnicas de Hemostasia y Trombosis. (Ed. M. Pavlosky), Ibáñez Ed. Buenos Aires, 1975.
- 16.—MUSTARD, F.J., PACHAM, M.A.:
Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation.
Pharm. Rev. 22:97, 1970.
- 17.—OKUNO, T., CROKATT, D.:
Platelet factor 4 activity and thromboembolic episodes. *Am. J. Clin. Path.* 67:351, 1977.
- 18.—PARETI, F.I., DAY, H.J., MILLS, C.B.:
Nucleotide and serotonin metabolism in platelets with defective secondary aggregation. *Blood.* 44:789, 1974.
- 19.—PRAGA, C., VALENTINE, L., MAIORANO, M., CORTELLARO, M.:
A new automatic device for the standardized Ivy bleeding time. *In* Platelet Function and Thrombosis: a Review of Methods (Ed. P.M. Mannucci), p. 271, Plenum Press, New York, 1974.

- 20.—SALZMAN, E.W.:
Cyclic AMP and platelet function.
N. England J. Med. 286:358, 1972.
- 21.—SPAET, T.H., CINTRON, J.:
Studies on platelet factor 3 availability.
Brit. J. Haemat. 11:269, 1965.
- 22.—STUART, MARIE J.:
Inherited defects of platelet function.
Sem. Hemato. 12:233, 1975.
- 23.—TSCHOPP, T.B., WEISS, H.J., BAUM-
GARTNER, H.R.:
Decreased adhesion of platelet to subendo-
telium in von Willebrand's disease.
J. Clin. Lab. Med. 83:296, 1974.
- 24.—WEISS, H.J.:
Trastornos hemorrágicos debidos a función
anormal de las plaquetas.
Clin. Med. N.A. 57: 517, 1973.
- 25.—WEISS, H.J.:
Abnormalities of factor VIII and platelet
aggregation —use of ristocetin in diagnosis
the von Willebrand's syndrome.
Blood. 45:403, 1975.
- 26.—WEISS, H.J.:
Platelet physiology and abnormalities of
platelet function. N. Eng. J. Med. Parte 1,
293:531, Parte 2, 293:580, 1975.
- 27.—WEISS, H.J., HOYER, L.W., DICKLES,
F.R.:
Qualitative assay of a plasma factor in von
Willebrand's disease that is necessary for
platelet aggregation: relationship to factor
VIII procoagulant activity and antigen con-
tent. J. Clin. Invest. 52:2708, 1973.
- 28.—WEISS, H.J. ROGER, J.:
Thrombocytopathia due to abnormalities in
platelet release reaction — studies on six
unrelated patients. Blood. 39:187, 1972.
- 29.—WILNER, G.D., NOSSEL, H.L., PROCU-
PEC, T.C.:
Aggregation of platelets by collagen: polar
active sites of insoluble human collagen.
Am. J. Physiol. 220:1074, 1971.
- 30.—ZUCKER, MARJORIE B.:
The value of the blood platelet in hemos-
tasis and as a scientific tool.
Trans. N.Y. Acad. Sci. 36:561, 1974.