

Función plaquetaria y diagnóstico de enfermedad de von Willebrand

Platelet function tests and von Willebrand disease diagnosis

Rol de la agregometría por método óptico en el estudio de función plaquetaria

Role of light transmission platelet aggregation in the study of platelet function

Alberto MF

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

fabiana@hematologia.anm.edu.ar



**TOPICOS
DE LABORATORIO**

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 • Número Extraordinario
XII Congreso del Grupo CAHT: 140-145
Septiembre 2016

Palabras clave: Plaquetas
Agregometría
Utilidad diagnóstica.

Keywords: Platelets,
Aggregometry,
Clinical usefulness.

Algunas consideraciones sobre la fisiología plaquetaria

Se define como hemostasia al conjunto de mecanismos fisiológicos que aseguran el mantenimiento de la integridad del sistema vascular frente a la injuria. Se trata de un proceso dinámico, que tiene que resolver la hemorragia en vasos sanguíneos muy diferentes (tanto anatómico como fluido dinámicos), limitándose al sitio de la lesión. Resulta de la cooperación de tres sistemas que actúan de manera coordinada balanceando entre mecanismos de activación e inactivación: las proteínas de la coagulación (proteínas plasmáticas solubles), las plaquetas (elementos formes en suspensión) y el endotelio vascular (superficie que limita la pared vascular).

Las plaquetas vigilan la pared vascular durante aproximadamente diez días para luego ser removidas de la circulación por los macrófagos del sistema retículo-endotelial. Constituyen la primera línea de defensa en los vasos de pequeño calibre⁽¹⁾. Vistas en perspectiva, las plaquetas deberán ser capaces de tomar contacto con la pared vascular normal sin activarse, de reconocer las características del daño de la pared vascular, de detener su marcha, de adherirse a la zona lesionada (en un sistema de alta presión y alta velocidad de flujo) y de pegarse unas con otras para ir construyendo un coágulo hemostático que pueda permanecer en el lugar sólo mientras sea necesario⁽²⁾. En este contexto se definirá como respuesta óptima a aquélla que previene la pérdida

de sangre sin producir oclusión de la luz vascular. Los mecanismos moleculares que median esta respuesta son aquéllos que han sido perpetuados por la selección natural para resolver injurias vasculares en un sistema de alta presión y alta velocidad de flujo. Los peces y las aves tienen como componente celular plaquetas nucleadas. En los mamíferos las plaquetas han evolucionado a elementos anucleados que disponen de herramientas sustancialmente más complejas⁽²⁾.

El endotelio intacto (desde un punto de vista físico y bioquímico) libera óxido nítrico y prostaciclina. En las plaquetas, estas sustancias activan vías de señalización inhibitorias, que aseguran el estado de inactivación no-adherente. En sitios de injuria vascular, las plaquetas emplean receptores (glicoproteínas de membrana GPVI y GPIb-IX-V) acoplados a motivos de activación basados en inmuno-receptor de tirosina (ITAM) y receptores acoplados a proteína G (GPCRs), para censar y responder a cambios en su microambiente, como lo serán la exposición de proteínas de la matriz extracelular y la activación del sistema de coagulación⁽³⁾. La estimulación de estos receptores dispara cascadas de señalización intracelulares, incluyendo las dependientes de la elevación del calcio citosólico, que promueve modificaciones dramáticas del citoesqueleto, secreción de gránulos intraplaquetarios y, de manera fundamental, el cambio en la conformación de las integrinas desde un estado de baja afinidad a otro de alta afinidad por sus ligandos (activación desde adentro hacia afuera)⁽⁴⁾. Las integrinas son los principales receptores plaquetarios que sostienen las interacciones plaquetas-matriz extracelular (adhesión plaquetaria) y plaqueta-plaqueta (agregación plaquetaria). La integrina α IIb β 3 es la más abundante de las expresadas en la superficie de las plaquetas. α IIb β 3 media la unión a varias proteínas plasmáticas, incluyendo el fibrinógeno y el factor de von Willebrand (VWF), lo que constituye la base molecular de los mecanismos de agregación y adhesión plaquetarias. No obstante, para la formación de un tapón hemostático estable se necesita que la activación de α IIb β 3 sea sostenida en el tiempo. Esto se logra gracias a la co-estimulación de las vías de señalización autócrina/parácrina de los agonistas plaquetarios tromboxano A2 (TXA2) y ADP⁽⁵⁾. El ADP es liberado a partir de los gránulos densos plaquetarios y genera la activación sostenida de la integrina, mediante su unión al re-

ceptor plaquetario P2Y12 acoplado a una proteína G inhibitoria⁽⁶⁾.

No obstante, estas habilidades adquiridas por las plaquetas de los mamíferos tienen sus costos. La patología arterial vaso-oclusiva (coronaria, cerebral y periférica) constituye la principal causa de morbi-mortalidad del mundo desarrollado. En estas enfermedades subyacen dos procesos patológicos generales que involucran a las plaquetas: la aterosclerosis que se desarrolla a lo largo de varios años y la trombosis aguda en lesiones ateroscleróticas dañadas⁽⁷⁾. La comprensión de las bases moleculares que sostienen la respuesta hemostática ha permitido el desarrollo terapéutico aplicado a la prevención y tratamiento de estas patologías, siendo su principal objetivo la disminución de la activación patológica de las plaquetas.

La disminución severa del número de plaquetas o su hipofunción, sea congénita o adquirida, se asocian a diátesis hemorrágica de intensidad variable. Las alteraciones congénitas de la función plaquetaria (ACFP) constituyen probablemente la causa más frecuente de sangrado⁽⁸⁾. Se trata de un grupo heterogéneo de alteraciones asociadas a defectos en los receptores de las proteínas adhesivas, receptores de agonistas solubles, gránulos plaquetarios, vías de activación, y fosfolípidos de membrana⁽⁹⁾. El diagnóstico correcto de estas alteraciones es de suma importancia para individualizar el manejo clínico apropiado del paciente, para estimar de manera real la prevalencia de estos desórdenes y profundizar el conocimiento de los mecanismos hemostáticos de las plaquetas.

Aspectos metodológicos de la APMO

La agregación plaquetaria por método óptico (APMO) es el método de referencia y el más utilizado en la identificación y diagnóstico de las alteraciones de la función plaquetaria⁽⁸⁾.

El ensayo clásico, desarrollado en forma independiente por Born y O'Brien a principios de los años sesenta, se basa en medir el aumento de la transmisión de luz de una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP), plaquetas lavadas o filtradas, mantenida en agitación, e inducir la agregación de manera individual con sustancias capaces de activar las plaquetas, llamadas agonistas plaquetarios (equivalente al estímulo liberado en el sitio de la injuria)⁽¹⁰⁾. El fibrinógeno necesario para establecer el puente

de unión entre plaquetas es aportado por el plasma. El agregómetro está conectado a un sistema que irá registrando el aumento de transmitancia en función del tiempo. Se considera que las respuestas obtenidas *in vitro* correlacionan con lo que ocurre *in vivo* y que, por lo tanto, son de significación clínica.

Los agonistas que se emplean en primera línea son: ADP, adrenalina, colágeno, ácido araquidónico y ristocetina. La respuesta inicial al estímulo con ADP y colágeno es el cambio de forma, que refleja la movilización de calcio intracelular. Se evidencia como una disminución efímera de la transmitancia y es independiente de la activación de α IIb β 3. En el caso particular del colágeno, antecede al cambio de forma una etapa de latencia. Cuando la integrina comienza a activarse (de adentro hacia afuera), la transmitancia aumenta y la curva comienza a dibujarse hasta alcanzar un valor máximo, estable, que expresado en % constituye el valor de agregación o amplitud máxima para el agonista empleado. Para el colágeno y el ácido araquidónico se observa una curva con pendiente única. Para agonistas débiles como el ADP y la adrenalina se obtienen curvas bifásicas, donde la primera ola resulta de la interacción del agonista con su receptor (GPCRs) y la segunda ola del funcionamiento de los mecanismos de amplificación del estímulo inicial (secreción de gránulos plaquetarios y síntesis de TXA₂). Evaluar la respuesta bifásica es clave, por su mayor sensibilidad para detectar alteraciones leves de la función que pueden quedar enmascaradas con los otros agonistas. En el caso de la ristocetina a alta concentración (1.2 mg/mL) la respuesta también es bifásica, con una primera ola que resulta de la activación y agregación a partir de la interacción VWF-GPIb-IX-V y una segunda ola dependiente de la interacción α IIb β 3-fibrinógeno.

Además del porcentaje de agregación máxima, otros parámetros como el cambio de forma, el tiempo de inicio, la pendiente o velocidad de agregación, la presencia de agregación reversible, deben ser tenidos en cuenta al momento de realizar la valoración del comportamiento funcional de la muestra.

Si se obtienen patrones anormales de agregación, se puede recurrir al uso de "agonistas especiales", que permitirán una mejor caracterización de la alteración. Dentro de este grupo se encuentran: factor activador plaquetario (PAF), forbolmiristato acetato (PMA), ionóforo de calcio, análogos estables del

TXA₂ (U46619) y péptidos activadores de los receptores de trombina (SFLLRN para PAR1 y GYP-GKF para PAR4).

La APMO es un ensayo laborioso, afectado por variables pre-analíticas y analíticas que deben ser cuidadosamente controladas por personal experimentado. Se han desarrollado métodos alternativos para medir la agregación en PRP o sangre entera (agregometría de impedancia, agregometría en placa de 96 pocillos, citometría de flujo) alguno de los cuales son más rápidos y amigables. Sin embargo, a pesar de estas ventajas no han sido ampliamente adoptados y, a diferencia de la APMO, no aportan información diagnóstica adicional, como el cambio de forma, la agregación secundaria y la presencia de agregación reversible, que ayudan en la identificación de los defectos en la función plaquetaria⁽¹¹⁾. Existen aparatos llamados lumiagregómetros, que pueden medir al mismo tiempo la transmisión de luz y la liberación de gránulos densos a partir del registro de la luminiscencia generada por la secreción de ATP y el reactivo luciferina-luciferasa que se agrega al PRP de la muestra en estudio⁽¹²⁾. Es una metodología de mayor sensibilidad para la detección de los desórdenes plaquetarios más comunes, que se caracterizan por anomalías en los mecanismos de secreción.

Las pautas de estandarización para la APMO son de publicación muy reciente, pese a ser el método de referencia y el más utilizado desde hace más de 40 años. En 2008 el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) aprobó su guía para la implementación de los estudios de APMO⁽¹³⁾. En 2010 se publicó la guía de consenso de América del Norte, que incluye recomendaciones para determinar rangos de referencias para la APMO y para el enfoque en la interpretación de los resultados obtenidos⁽¹⁴⁾. En julio de 2006 el Subcomité de Fisiología Plaquetaria de la ISTH formó un grupo de trabajo, constituido por 11 expertos, con el objetivo de elaborar una serie de recomendaciones de consenso a fin de estandarizar la APMO. Como paso inicial, el grupo de expertos organizó la mayor y más detallada encuesta mundial sobre APMO⁽¹⁵⁾. Esta encuesta confirmó la gran variabilidad en la práctica de esta metodología, aseverando la necesidad de estandarización. La información reunida en la encuesta contribuyó al desarrollo de las pautas metodológicas para la APMO que fueron publicadas en 2013⁽¹¹⁾.

En general las guías clínicas y de laboratorio se elaboran en base a la revisión de la evidencia registrada en la literatura médica y científica. Debido a la cantidad insuficiente de estudios relevantes que compararan diferentes metodologías empleadas en la APMO (lo que hubiera permitido el desarrollo de guías basadas en la evidencia), el grupo de expertos decidió utilizar el método RAND⁽¹⁶⁾. El método RAND se emplea para obtener el consenso formal de grupos de expertos, sobre la validez de las intervenciones en el cuidado de la salud, cuando la evidencia científica es escasa y/o heterogénea. La guía de recomendaciones del grupo de trabajo sobre la estandarización de APMO incluye 70 recomendaciones agrupadas en 8 secciones: utilidad clínica, variables pre-analíticas, toma de muestra, preparación del PRP y del plasma pobre en plaquetas, evaluación de la calidad del PRP, metodología, elección de agonistas y evaluación e informe de resultados. Cada recomendación tiene una calificación de consenso que define la clasificación de la recomendación como inapropiada, incierta y apropiada.

Se sugiere enfáticamente la lectura de las guías de la ISTH. A continuación se mencionarán solo algunas de las recomendaciones que conforman las diferentes secciones. A nivel de utilidad clínica se considera que la APMO sólo debería emplearse en pacientes con clínica de sangrado en quienes se sospecha un desorden de la función plaquetaria (no en pacientes con tratamiento antiagregante ni en la identificación de sujetos con riesgo de trombosis). En la toma de muestra se debería utilizar como anticoagulante tanto citrato 109 como 129 mM, siempre que éste fuere de uso sistemático. El PRP se debería preparar por centrifugación a 200 g durante 10 min, a temperatura ambiente, sin utilizar freno. Si la muestra contiene macropaquetas, el PRP se debería preparar mediante sedimentación. El PPP se debería preparar por centrifugación de sangre entera o de los tubos a partir de los cuales fue removido el PRP, a 1500 g durante 15 min a temperatura ambiente. Es necesario realizar el recuento de plaquetas del PRP. Los resultados de la APMO podrían ser imprecisos cuando el recuento de plaquetas del PRP es menor de $150 \times 10^9/L$. El PRP con bajo recuento de plaquetas puede ser analizado para excluir desórdenes severos de la función plaquetaria (trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier, enfermedad de VW tipo 2B y tipo plaquetario). Los PRP no

deberían ser ajustados a un valor estándar con PPP (se aclara que la mejor práctica es incierta, cuando el valor de plaquetas excede las $600 \times 10^9/L$ y que una publicación reciente demuestra que la tanto la muestra nativa como la ajustada son válidas⁽¹⁷⁾, pero que las anomalías en la función plaquetaria son más frecuentes usando un valor estándar ajustado de plaquetas tanto en controles como pacientes). Las concentraciones mínimas de agonistas que deberían emplearse son: ADP 2 μM , ADR 5 μM , colágeno 2 $\mu g/mL$, péptido de activación de PAR1 10 μM , análogo del TXA2 1 μM , ácido araquidónico 1 mM, ristocetina 1.2 mg/mL y si ésta es normal se debería analizar nuevamente empleando ristocetina entre 0.5-0.7 mg/mL , pero, si la agregación con ristocetina 1.2 es anormal, debería repetirse a una concentración de 2 mg/mL .

Utilidad clínica de la APMO

En 2009 se publicó un estudio prospectivo para evaluar la utilidad diagnóstica de APMO en pacientes derivados para evaluación por sangrado⁽¹⁸⁾. Se incluyeron 229 pacientes (en quienes se había descartado trombocitopenia y enfermedad de VW) y 105 controles sanos. Mediante el empleo de intervalos de referencia (con validación previa), se determinó que las alteraciones de la función plaquetaria evaluadas por APMO fueron más frecuentes en el grupo con desorden de sangrado clínicamente evidente. Además, la relación de probabilidad de tener un desorden de sangrado se incrementó (OR 32) cuando la agregación estuvo disminuida con dos o más agonistas. El análisis de las curvas ROC señaló que la APMO tiene alta especificidad y moderada sensibilidad para detectar defectos primarios de la función plaquetaria. En este sentido, el 50% de pacientes con desorden de sangrado y alteración de la función plaquetaria tenían agregación normal (el diagnóstico se realizó por lumiagregometría o microscopía electrónica). La disfunción plaquetaria más común fueron los defectos primarios de la secreción (74%). Ese mismo año también se publicaron los resultados de otro estudio que evaluó la utilidad diagnóstica de la APMO y el ensayo de liberación de serotonina en pacientes con desórdenes leves de la función plaquetaria⁽¹⁹⁾. Como intervalo de referencia se utilizó el percentil > a 2.5% elaborado a partir de las respuestas para los diferentes agonistas de un grupo control de 299 individuos sanos. Se determinó

que el 13.7 % del grupo control, tenía agregación plaquetaria anormal de manera conjunta con ADR 10 $\mu\text{g/mL}$ y ADP 4 μM . Esta combinación no fue considerada, *per se*, como criterio de alteración de la función plaquetaria. Sin embargo, un hallazgo muy interesante fueron los altos valores predictivos negativos tanto para el ADP (95%, si ADP=4 μM produce agregación irreversible) como para la ADR (93% si agregación con ADR=10 μM es > a 42%), lo que significa que la probabilidad de que un paciente tenga una alteración de la función plaquetaria, si sus agregaciones con ADP y/o ADR son normales, es muy baja. Sobre un total de 213 pacientes con sangrado cutáneo mucoso congénito, 85 fueron diagnosticados con defectos de la función plaquetaria. Las alteraciones en la agregación se asociaron de manera constante con alteraciones en la secreción plaquetaria. Sin embargo un 14 % de pacientes tuvieron de manera aislada defectos en la secreción sin alteraciones en el patrón de agregación.

En 2014 se publicaron los resultados de una encuesta mundial dirigida a evaluar el manejo diagnóstico en pacientes con sospecha de ACFP⁽¹¹⁾. Participaron 202 laboratorios (de 37 países) miembros de la ISTH y otras sociedades nacionales de hemostasia y trombosis. El primer punto destacado por la encuesta es que existe en todo el mundo un gran interés en el diagnóstico de las ACFP. Otra observación interesante es que las habilidades metodológicas para el estudio de la función plaquetaria se han expandido. Aunque la APMO sigue siendo el pilar diagnóstico, una amplia gama de técnicas que incluye la citometría de flujo, la lumiagregometría y otras más sofisticadas como la microscopía electrónica y el análisis molecular, ahora se utilizan en laboratorios especializados en todo el mundo. Para la mayoría de los encuestados las primeras pruebas de detección, después del recuento de plaquetas en sangre, son la evaluación morfológica de un frotis de sangre, la APMO, y la prueba PFA-100. Las utilizadas en una segunda etapa son citometría de flujo (64,7%) y el análisis genético molecular (36,4%). Una última consideración es el número relativamente grande de pacientes que se someten a estudios por sospecha de ACFP cada año (> 14000 en todo el mundo) y el número relativamente elevado en los que se confirma este diagnóstico (> 5700 cada año). De acuerdo a lo reportado por esta encuesta, los diagnósticos más frecuentes son las alteraciones en la respuesta

a la activación por ADP y ADR, que, en conjunto, reciben la denominación de “señalización defectuosa de Gi” (defectos en la vía α_2 adrenérgica 13,4%, defectos en la vía de ADP 17,9%), seguidos por los defectos en la secreción o defectos en la respuesta al colágeno.

Declaración de conflictos de interés:

La autora declara que no posee conflictos de interés.

Referencias

1. Ruggeri ZM. Platelet adhesion under flow. *Microcirculation*. 2009;16:58–83.
2. Brass LF, Wannemacher KM, Ma P, Stalker TJ. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J Thromb Haemost*. 2011;9 (Suppl 1):66-75.
3. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med*. 2010;89:109–121.
4. Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:321–345.
5. Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK, Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol*. 2009;147:415–430.
6. Cattaneo M. P2Y12 receptors: structure and function. *J Thromb Haemost*. 2015; 13(Suppl 1):S10–S16.
7. Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17:1423–1436.
8. Gresele P, Harrison P, Bury L y col. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost*. 2014 Sep;12(9):1562-1569.
9. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br J Haematol*. 2014;165:165–178.
10. Scazzioti A, Bermejo E, Vizcarguénaga MI. Agregación plaquetaria. Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia. Blanco A, Kordich L, Bermejo E, Forastiero R, Lauricella AM, Pierono G, Quintana I, Scazzioti A 2012, 2ª edición p 199-200. Grupo CAHT, Buenos Aires.

11. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P y col. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013;11:1183–1189.
12. White MM, Foust JT, Mauer AM, Robertson JT, Jennings LK. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories. *Thromb Haemost.* 1992;67:572–577.
13. Christie DJ, Avari T, Carrington LR, Cohen E y col. Platelet function testing by aggregometry: approved guideline. WaynePA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008;28:1–45.
14. Hayward CP, Moffat KA, Raby A y col. Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J ClinPathol.* 2010;134:955–963.
15. Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1029.
16. Brook RH, Chassin MR, Fink A, Solomon DH, Koscoff J, Park RE. A method for the detailed assessment of the appropriateness of medical technologies. *Int J Technol Assess Health Care.* 1986;2:53–63.
17. Castilloux JF, Moffat KA, Liu Y, Seecharan J, Pai M, Hayward CP. A prospective cohort study of light transmission platelet aggregometry for bleeding disorders: is testing native platelet-rich plasma non-inferior to testing platelet count adjusted samples? *Thromb Haemost.* 2011;106:675–682.
18. Hayward CPM, Pai M, Liu Y. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost.* 2009;7:676–684.
19. Quiroga T, Goycoolea M, Matus V y col. Diagnosis of mild platelet function disorders. Reliability and usefulness of light transmission platelet aggregation and serotonin secretion assays. *Br J Haematol.* 2009;147:729–736.