

Pruebas de laboratorio para la evaluación de la hemostasia: fundamentos básicos

Laboratory tests for haemostasis evaluation: basics

Martinuzzo ME

Laboratorio Central Del Hospital Italiano.
Instituto Universitario del Hospital Italiano. Universidad Favaloro.

memartinuzzo@gmail.com
marta.martinuzzo@hospitalitaliano.org.ar



ARTÍCULO
DE REVISIÓN

HEMATOLOGÍA
Volumen 21 N° Extraordinario: 56-68
Fisiología de la hemostasia normal
Agosto 2017

Palabras claves: hemostasia,
pruebas de laboratorio.

Keywords: haemostasis,
laboratory tests.

Para la evaluación del sistema de coagulación se utilizan de manera rutinaria pruebas globales que son el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) y el tiempo de trombina (TT). A estas tres pruebas se suma el dosaje de fibrinógeno como pruebas mínimas en determinadas situaciones clínicas asociadas con hemorragias.

Tiempo de protrombina (tiempo de Quick)

El tiempo de protrombina (TP) evalúa la vías extrínseca y común del sistema de coagulación.

La prueba consiste en medir el tiempo de coagulación de un plasma citratado en presencia de tromboplastina (mezcla de factor tisular con fosfolípidos) e iones calcio. El TP refleja cambios en los niveles de tres factores vitamina K-dependientes (FII, FVII,

FX) y del FV (**Figura 1**). Los niveles de fibrinógeno que son capaces de alterar el TP son aquéllos por debajo de 80 mg/dl, y por debajo de 50 mg/dl de fibrinógeno la alteración del TP es considerable.

Los resultados del TP pueden expresarse en tiempo (segundos), % o en razones (TP paciente / TP normal). Si bien en ciertos países es utilizado, se sabe que el informe en segundos y la razón dependen significativamente del tipo de reactivo y del instrumento utilizado en la detección del coágulo (coagulómetro). Este problema es mejorado si se expresa en % actividad. Para informar en % de actividad se debe realizar una curva de calibración con un *pool* de plasmas normales o un calibrador comercial, el valor de referencia está entre 70-120% o una razón < 1.2. Los valores normales en niños son menores que en adultos.

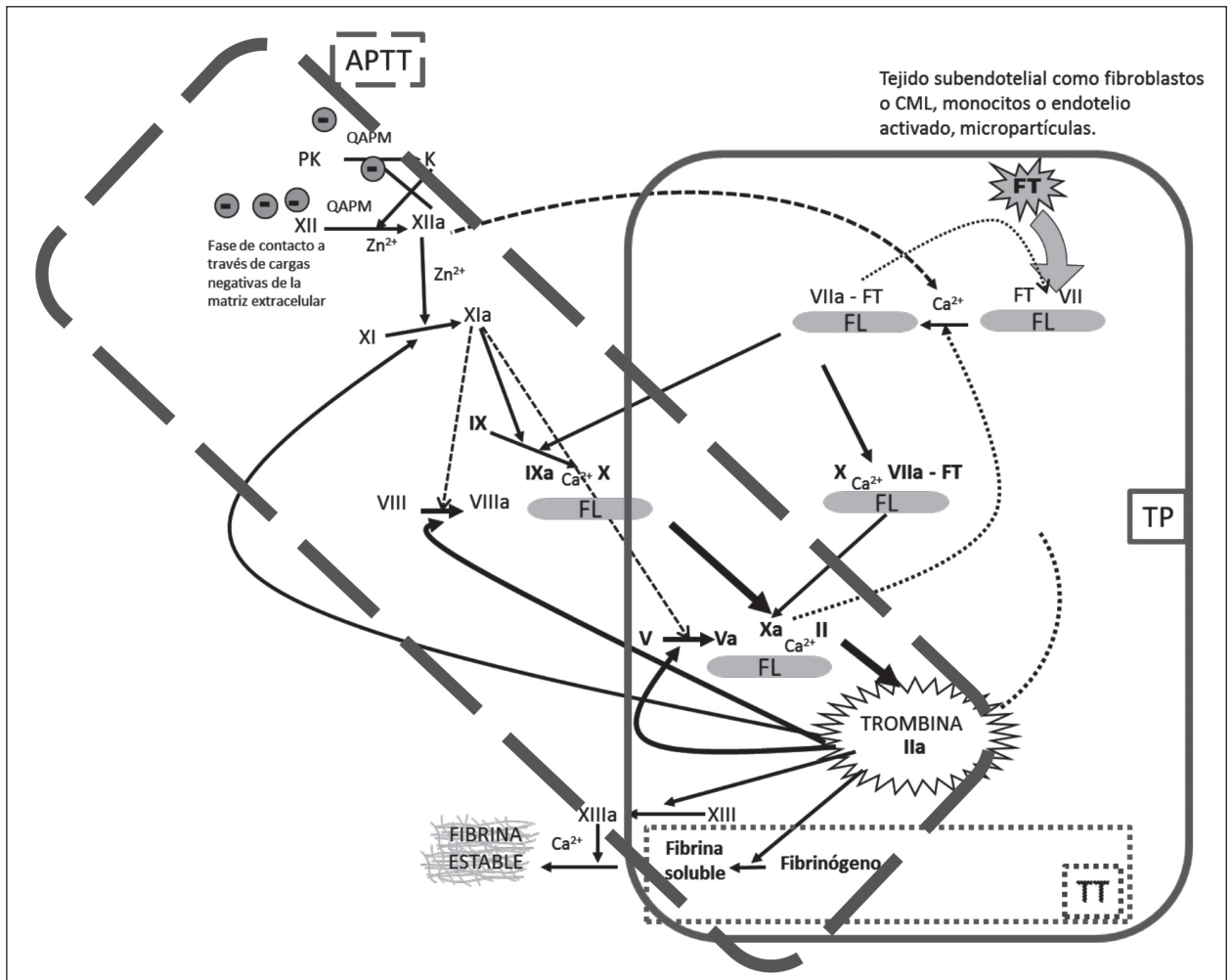
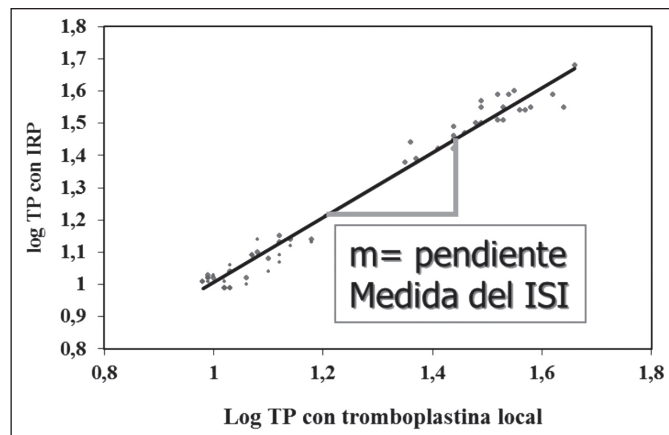


Figura 1. Visión esquemática de los factores involucrados en las tres pruebas básicas: TP, APTT y TT.



El TP es el método elegido para monitorear pacientes bajo tratamiento con anticoagulación oral con dicumarínicos, pero en este caso se debe expresar en Razón Internacional Normalizada (RIN) que es la razón entre el tiempo del paciente y la media geométrica de la población normal en el laboratorio elevado a una potencia que es el ISI (índice de sensi-

bilidad indicado en el inserto del reactivo). Para calcular el INR se utiliza el ISI o índice de sensibilidad internacional que se calcula a partir de la comparación de los tiempos obtenidos de muestras de pacientes con la tromboplastina a calibrar comparado con una tromboplastina patrón internacional (IRP).

Cuanto más sensible es la tromboplastina más bajo es el ISI.

Se recomienda trabajar con tromboplastinas que posean ISI < 1.4.

La expresión en RIN es indispensable para la dosificación de los dicumarínicos, pues es la única forma de expresión que asegura un valor muy comparable entre laboratorios en este tipo de pacientes.

EL TP está prolongado en:

- deficiencia congénita o adquirida de uno o varios de los factores FVII, FX, FV, FII e hipofibrinogenemia o hipodisfibrinogenemias severas.
- enfermedad hepática
- deficiencia de vitamina K
- tratamiento con anticoagulantes orales anti vitamina K
- tratamiento con anticoagulantes orales directos, antitrombóticos (dabigatrán) y anti Xa (rivaroxabán > edoxabán > apixabán)
- presencia de inhibidores específicos dirigidos contra factor VII, X, V ó II.

Cabe recordar que el TP es una prueba global y, por lo tanto, refleja el equilibrio entre los distintos factores que intervienen en la activación *in vitro* de la vía extrínseca. Por lo que la deficiencia de un factor aislado tendrá menor repercusión que la deficiencia de varios factores (**Figura 2**).

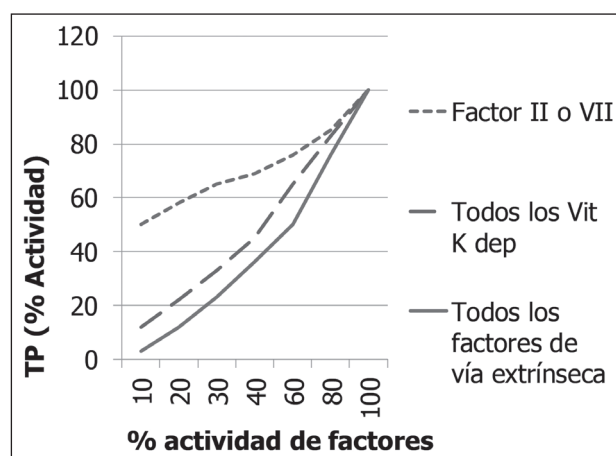


Figura 2. Variación del TP de acuerdo a la cantidad de factores de vía extrínseca y final común deficientes y el nivel de los mismos.

Tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT)

El tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) es una prueba de chequeo de la vía intrínseca del sistema de coagulación, detectando niveles disminu-

dos de los factores implicados en esta vía: XII, XI, IX y VIII. Es menos sensible a los factores de la vía final común (X, V y II) (**Figura 1**).

La prueba consiste en medir el tiempo de coagulación del plasma citratado en presencia de tromboplastina parcial (la fracción fosfolipídica de la tromboplastina, denominada cefalina), un activador de carga negativa (que puede ser de distinto tipo, por ej. sílica) e iones calcio. Los rangos normales son fuertemente dependientes del reactivo y del sistema de detección del coágulo, por lo que cada laboratorio lo debe establecer e informar. Los diferentes reactivos muestran distinta sensibilidad al déficit ligero de factores de la vía intrínseca, a la presencia de inhibidores adquiridos o de heparina no fraccionada.

Se observan valores prolongados de APTT en:

- déficit congénito y/o adquirido de los factores XII, XI, IX, VIII, X, II y V. Siempre hay que recordar que es una prueba global y que la deficiencia ligera aislada de un solo factor puede no modificar demasiado la prueba.
- anticoagulación oral con anti vitamina K dependiendo del nivel de anticoagulación
- tratamiento con heparina de bajo peso molecular, especialmente a dosis terapéuticas
- tratamientos con hirudina y otros inhibidores directos de trombina, como el inhibidor directo de trombina oral, dabigatrán
- anticoagulación con anti Xa directos, aunque lo afectan poco (rivaroxabán > edoxabán > apixabán)
- es poco sensible a los niveles de fibrinógeno, sólo se altera cuando éste es muy bajo (menor a 80 mg/dl).
- inhibidores adquiridos de interferencia (anticoagulante lúpico) o específicos de factores (ej. inhibidor anti factor VIII).
- la repercusión que provoca la deficiencia de un solo factor es menor que cuando hay deficiencia de varios factores (**Figura 3**).
- anticoagulación con heparina no fraccionada (prueba que se utiliza para dosificarla)

En cuanto a la utilización del APTT para dosificar la heparina no fraccionada, los valores de APTT que corresponden a niveles de heparina terapéutica (0.2-0.4 UI/mL ó 0.3-0.7 U anti Xa/mL) varían de

acuerdo al reactivo y al sistema de detección (coagulómetro). Es por ello que cada laboratorio debería establecerlo a través de medir la heparinemia de muestras de pacientes y el APTT, y obtener el rango a través de una curva de regresión lineal entre ellos.

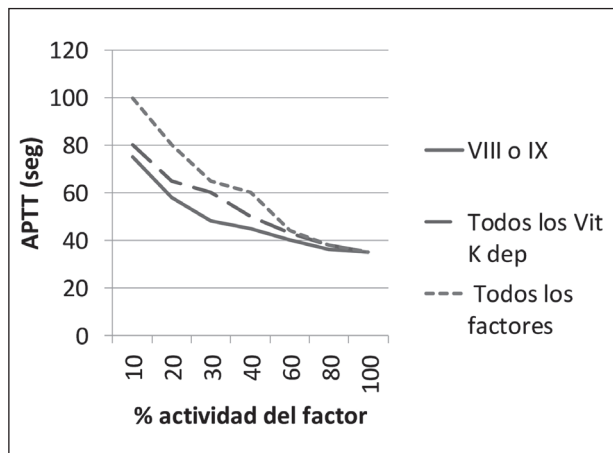


Figura 3. Variación del APTT de acuerdo a la cantidad de factores de vía intrínseca y final común deficientes y el nivel de los mismos.

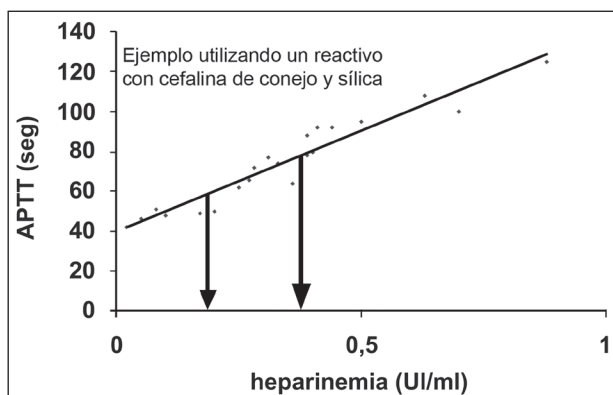


Figura 4. Método recomendado para determinar el rango de APTT que refleja las concentraciones terapéuticas de la heparina no fraccionada.

Tiempo de trombina

Esta prueba permite evaluar la etapa de fibrinoformación (**Figura 1**), ya que mide el tiempo de coagulación del plasma citratado cuando se le agrega como reactivo trombina. Es independiente de posibles alteraciones que afecten las vías extrínseca e intrínseca. El valor de referencia se encuentra en general entre 13-20 segundos, dependiendo de la concentración de trombina utilizada.

El tiempo de trombina se prolonga en presencia de:

- niveles bajos de fibrinógeno (menores de 100 mg/dl) o en presencia de disfibrinogenemias

- tratamiento con heparina no fraccionada, ya que es una prueba muy sensible a su presencia
- tratamiento con inhibidores directos de trombina endovenosos (bivaldurina, hirudina) y orales (dabigatrán) a los cuales es una prueba muy sensible
- inhibidores adquiridos del tipo de antitrombina, niveles elevados de productos de degradación de la fibrina y/o fibrinógeno, presencia de paraproteínas
- el tiempo de trombina del recién nacido es más largo que el del adulto por la presencia del fibrinógeno fetal que tiene distinta glicosilación que el del adulto.

Corrección con plasma normal

En caso de que la muestra sea de un paciente que viene a hacer una evaluación global de coagulación, ante un TP o un APTT prolongado se realiza la prueba de corrección con plasma normal. Para ello se prepara una mezcla de partes iguales de plasma del paciente y plasma normal (*pool*). Se realizan en la misma tanda de procesamiento el TP o APTT del normal, de la mezcla y del paciente.

Cálculos e interpretación

Índice de corrección de APTT (ICA).

$ICA = ((APTT \text{ mezcla} - APTT \text{ normal}) / APTT \text{ paciente}) \times 100$ El punto de corte debe establecerse para cada sistema de reactivo-sistema de detección o instrumento.

En general este índice presenta un valor de corte entre 10 y 15 %:

- < 10% Corrige
- > 10% No corrige

Para la corrección del TP se realizan en la misma tanda de procesamiento el TP del normal, de la mezcla y del paciente.

Se registra el % de actividad de cada tubo.

TP corregido esperable se calcula como $(TP \text{ paciente} + TP \text{ normal})/2$.

Si el resultado del TP de la mezcla medido es menor a TP corregido esperable en más de un 10 % se dice que el paciente presenta un efecto inhibitorio sobre el TP.

Dosaje de fibrinógeno

El método de dosaje de fibrinógeno recomendado es el de Clauss, que se basa en la medición del tiempo

de coagulación de un plasma diluido en presencia de exceso de trombina, de manera que el tiempo sea inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno. Algunos coagulómetros con sistema de detección foto-óptica permiten determinar la concentración de fibrinógeno midiendo la turbidez producida por la coagulación del plasma al realizar el tiempo de protrombina, denominado fibrinógeno derivado del TP. Esta técnica muestra buena correlación con el método de Clauss para valores de fibrinógeno dentro del rango normal, entre 2,0 y 4 g/l. Pero fuera de ese rango es necesario realizar la determinación por el método de Clauss, así como para pacientes recibiendo anticoagulantes orales anti vitamina K o anticoagulantes directos. Para situaciones de sangrado por trauma o coagulación intravascular diseminada (CID) está claramente no recomendado.

Los valores normales de fibrinógeno oscilan entre 1,8 y 4 g/l. Se observan valores aumentados en procesos infecciosos e inflamatorios, cirugía, sepsis, cáncer o aterosclerosis, ya que es un reactante de fase aguda. Los niveles de fibrinógeno aumentan además con la edad, masa corporal, embarazo, tabaquismo, estrés y el uso de anticonceptivos orales. Los niveles de fibrinógeno plasmático disminuyen en hepatopatías severas, trauma con sangrado crítico, CID, por efecto de estreptoquinasa (drogas fibrinolíticas) y L-asparaginasa.

Dosaje de factores

La determinación de la actividad de los factores de coagulación debe realizarse siempre que el paciente tenga clínica de sangrado, aunque las pruebas globales sean normales, ya que deficiencias de factores leves (alrededor de 40 %) pueden no modificar el TP o el APTT de acuerdo a la sensibilidad de los distintos sistemas de reactivos / instrumento de detección.

Dosaje de factor II, V, VII o X

Mide el tiempo de coagulación del plasma citratado del paciente diluido en presencia de un plasma deficiente en el factor a evaluar (aporta todos los otros factores y el fibrinógeno necesario) a través de un ensayo de tiempo de Quick. De esta manera el grado de prolongación sólo dependerá de la concentración de ese factor en particular en el plasma del paciente. El valor de referencia es de 70-120%. Recordar que

las deficiencias de factores pueden ser congénitas o adquiridas asociadas a determinadas situaciones clínicas, siendo las más importantes hepatopatías, coagulación intravascular diseminada y deficiencia de vitamina K.

Dosaje de factor VIII, IX, XI, XII, PK o KAPM

Mide el tiempo de coagulación del plasma citratado diluido en presencia de un plasma deficiente en el factor a evaluar (aporta todos los otros factores y el fibrinógeno necesario) a través de un ensayo de APTT. De esta manera el grado de prolongación sólo dependerá de la concentración de ese factor en particular en el plasma del paciente. El valor de referencia es de 50-150%.

Tromboelastograma

La realización de las cuatro pruebas TP, APTT, TT y fibrinógeno junto con el recuento plaquetario nos dan una idea del estado de coagulación de un paciente que tiene una hemorragia, por ejemplo, en trauma. No obstante, no tiene en cuenta las características físicas de la fibrina formada ni la cinética de formación “*in vivo*”.

Es por ello que se han desarrollado pruebas globales en sangre entera que permiten una evaluación considerada más fisiológica del proceso de coagulación. Una de estas técnicas que ha sido ampliamente reconsiderada en los últimos años especialmente en situaciones de sangrado crítico por trauma o cirugía es la tromboelastografía /tromboelastometría.

En la formación del coágulo *in vivo* intervienen distintos procesos dinámicos que interaccionan entre sí. Tanto la localización del trombo como las propiedades mecánicas del mismo son esenciales para una hemostasia apropiada. El coágulo consiste en una malla tridimensional de fibras de fibrina entrecruzadas que atrapa plaquetas y otras células. La malla de fibrina es rígida, pero con la elasticidad necesaria para resistir a las fuerzas del flujo. La resistencia a la deformación por fuerzas de flujo indica la fuerza del coágulo, que es dependiente de la fibrina y de las plaquetas que interactúan con ella a través de la glicoproteína $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GP IIb/IIIa). Algunos autores le adjudican hasta un 80% de la fuerza de la red de fibrina a la cantidad de plaquetas con correcta expresión funcional de la glicoproteína IIb/IIIa.

El tromboelastograma /temograma es una prueba de hemostasia viscoelástica. Mide la dinámica de for-

mación y las características mecánicas del trombo. Los parámetros principales y rápidos que mide reciben distintos nombres según el tipo de equipo que se utilice. Estos parámetros son (**Figura 5**):

- *Tiempo R o CT*, tiempo de latencia en comenzar a formar fibrina, dependiente de la concentración de factores y de la velocidad con que se forma trombina.
- *Tiempo K o CFT*, tiempo en alcanzar 20 mm de amplitud, que indica un coágulo de determinada fuerza.
- *Ángulo α (velocidad)*, rapidez en la formación entrecruzamiento de la fibrina (factores y fibrinógeno, en menor medida plaquetas).
- *MA (amplitud máxima) o MCF (máxima firmeza del coágulo)*, depende de las plaquetas a través

de la unión de la fibrina a GP IIbIIIa y de los niveles de fibrinógeno (con los que correlaciona muy bien, representa la firmeza del coágulo).

Otros parámetros adicionales evalúan la activación del sistema fibrinolítico:

- *A 60*, amplitud a los 60 min de haber alcanzado la MA
- *Ly 30*, diferencia de amplitud entre la MA y la amplitud a los 30 min post MA
- *ML*, o máxima lisis.

En los últimos años se ha utilizado mucho en la evaluación de la hemostasia en situaciones de hemorragia crítica en pacientes post trauma, o cirugía o parto, e incluso se han desarrollado nomogramas de tratamiento con hemoderivados de acuerdo a los resultados de esta prueba.

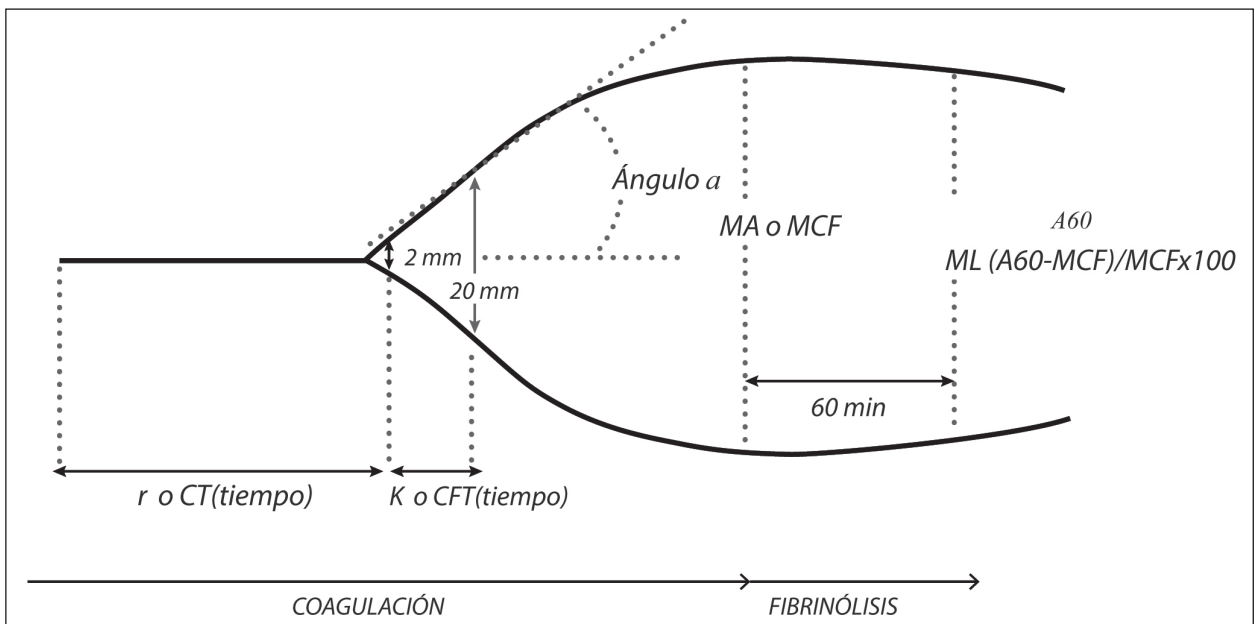


Figura 5. Trazado de tromboelastografía/tromboelastometría con sus parámetros

Métodos de estudio de plaquetas

Recuento plaquetario

Fundamento

El recuento plaquetario en sangre entera refleja, en pacientes normales, el equilibrio que existe entre la producción en médula ósea y las plaquetas en circulación periférica.

Se debe trabajar con material plástico o vidrio siliconado, ya que las plaquetas tienden a adherirse y agregarse sobre cualquier superficie que no tenga propiedades antiadherentes similares a las del endotelio normal.

Es conveniente observar al microscopio un frotis de sangre periférica, independientemente del método de recuento utilizado, donde se evaluará número, distribución, forma y tamaño plaquetario.

Los métodos de recuento pueden ser: manuales, semiautomáticos y automáticos.

Metodología automática

Fundamento

Se emplean contadores multiparámetros, donde el recuento plaquetario es parte del perfil celular san-

guíneo. Se trabaja con sangre anticoagulada con EDTA. Existen contadores que utilizan la metodología apertura-impedancia con el siguiente fundamento: la célula, al pasar a través de un orificio en el que hay una diferencia de potencial conocida, induce un pulso eléctrico que es directamente proporcional al volumen celular. Para esto la muestra es diluida, automáticamente, con una solución de conductividad fija, es conducida, unidireccionalmente, a través de una apertura u orificio de tamaño determinado. Una corriente eléctrica constante pasa entre electrodos ubicados a cada lado de la apertura determinando una zona de censado a lo largo de toda la apertura. Durante el ciclo de medición, cada célula que atraviesa la zona de censado, interrumpe el flujo de corriente constante generando un pulso eléctrico cuya amplitud es directamente proporcional al tamaño de la célula. El número de pulsos generados durante cada medición corresponde al número de células censadas. Los pulsos eléctricos generados son primero amplificados y luego comparados con voltajes en canales de referencia que han sido previamente calibrados para aceptar sólo señales con una amplitud predeterminada. Luego se clasifican las células contadas por el tamaño y la mayoría de los equipos cuentan entre 2-20 fl de volumen plaquetario, haciendo una extrapolación por cuadrados mínimos del histograma de 0-70 fl.

Existen contadores con metodologías de conteo por dispersión de luz producida por luz laser denominada "monocromática" debido a que se emite con una longitud de onda individual. A medida que las células circulan en un sistema capilar y pasan por la zona de censado, la luz impacta sobre ellas y se interrumpe el flujo lumínico unidireccional, la luz se dispersa en todas direcciones con ángulos de desvío relativos a las características (densidad y tamaño) de la célula. Se generan a su vez procesos de absorción, difracción y de dispersión lumínica, que se convierten en señales eléctricas por fotoelectrodos en ángulos específicos. La luz dispersa se colecta y se detecta a través de un complejo sistema de lentes, filtros, espejos y fotodetectores que registran la cantidad de señales electrónicas que se generan con esta luz dispersada en distintos ángulos que permiten correlacionar con el volumen celular (dispersión frontal) y con la complejidad de estructuras celulares (dispersión ortogonal o lateral).

Estos contadores permiten además calcular el vo-

lumen plaquetario medio (MPV), la variedad de tamaños plaquetarios dada por el PDW (*platelet distribution wide*) y permiten ver el histograma de distribución.

Es muy importante confirmar por frotis cualquier trombocitopenia obtenida, ya que la presencia de acúmulos plaquetarios presentes en una muestra mal tomada o activada, pueden provocar disminución del recuento final, ya que esos acúmulos, al cambiar el tamaño plaquetario, no son contados como tales y disminuye el número total de plaquetas. Además, el frotis nos permitirá detectar la presencia de un artefacto que es la pseudotrombocitopenia por EDTA.

Valores de referencia: 150.000-400.000/mm³. No obstante la definición de trombocitopenia es cuando el recuento es inferior a 100.000/mm³.

Tiempo de sangría

Fundamento

Cuando se produce injuria tisular quedan expuestos los componentes del subendotelio (fundamentalmente colágeno tipo IV y V) donde las plaquetas se adhieren y luego se agregan. El tiempo de sangría se basa en esta propiedad y mide el tiempo que tarda en cohibirse la salida de sangre provocada por una incisión estandarizada realizada en los vasos superficiales pequeños.

Es una prueba global de la hemostasia primaria. Está influenciada por factores técnicos que se deben estandarizar cuidadosamente: profundidad, ubicación y dirección de la incisión; también depende del tipo de piel del paciente y la habilidad del operador.

El TS depende fundamentalmente de la calidad y cantidad plaquetaria. Por lo tanto, en presencia de trombocitopenia (menor de 80.000 mm³) el TS debe interpretarse con cuidado.

El TS se puede medir por varias técnicas.

- 1) TÉCNICA DE DUKE: se realiza una incisión con lanceta original de Frank en el lóbulo de la oreja. NO es una técnica recomendable ya que es difícil la estandarización y tiene poca sensibilidad. Además, el resultado final dependerá de la lanceta usada y de la habilidad y fuerza con que el operador realiza la incisión.
- 2) TÉCNICA DE IVY : la incisión se realiza en el antebrazo donde se ha colocado un esfigmomanómetro a una presión constante (40 mm de Hg) para llenar los capilares en forma homogénea y elimi-

nar la variabilidad del tono capilar dependiendo de la tensión arterial del paciente. Se elige una zona donde no haya vasos capilares visibles y libre de vello.

Se puede realizar de 2 formas:

- a) se efectúan en el antebrazo 3 incisiones con lanceta descartable (profundidad 1 mm). Se pone en marcha el cronómetro y cada 30 segundos con papel de filtro, se absorben las gotas de sangre formadas sin tocar los bordes de las heridas para no remover el coágulo en formación, hasta que cese de fluir la sangre. VALOR NORMAL: hasta 5 minutos.
- b) modificación de Mielke: se efectúa en el antebrazo una incisión de 5 mm de longitud y 1 mm de profundidad, originalmente descrito para realizar con un bisturí de hoja descartable. La forma de tomar el tiempo es la misma que la descrita para la técnica de Ivy.

En el comercio existen aparatos descartables que en forma de guillotina permiten un corte estándar de 5 mm de longitud y 1 mm de profundidad. Son estériles y se elimina la posibilidad de transmisión de infecciones y contaminación de la herida. Además, presentan el tope para que la incisión sea realmente estandarizada. Se presentan de 1 y 2 incisiones a la vez (Figura 6).

Los valores normales con los aparatos comerciales se deben estandarizar en cada laboratorio. Generalmente el valor normal va de 2 a 8 ó 9 minutos. Se recomienda que cada laboratorio en sus condiciones establezca su rango de referencia.

Comentarios: el TS es una prueba global de la hemostasia primaria. No sólo se puede encontrar alterada en defectos plaquetarios *per se*, sino también en deficiencias o anomalías funcionales de proteínas plasmáticas (ej.: factor von Willebrand).

Es importante conocer la ingesta de drogas que pueden influir en esta técnica (ácido acetil salicílico, antiinflamatorios no esteroideos, otras drogas antiagregantes como las tienopiridinas, las drogas inhibidoras de fosfodiesterasa, entre otras).

Se encuentra alterado en trombocitopatías congénitas: Bernard Soulier, trombostenia de Glanzman, enfermedad de *pool* de depósito; en trombocitopatías adquiridas: uremia, presencia de paraproteína, post *by-pass* cardiopulmonar, afibrinogenemias. También se puede encontrar alterado en trastornos

de médula ósea: leucemias, síndromes mielodisplásicos, trombocitemia esencial. En enfermedad de von Willebrand puede estar prolongado, pero si es normal no descarta su diagnóstico. En general, el TS en niños es significativamente más corto que en adultos, por lo que es importante establecer un rango especial para ellos.

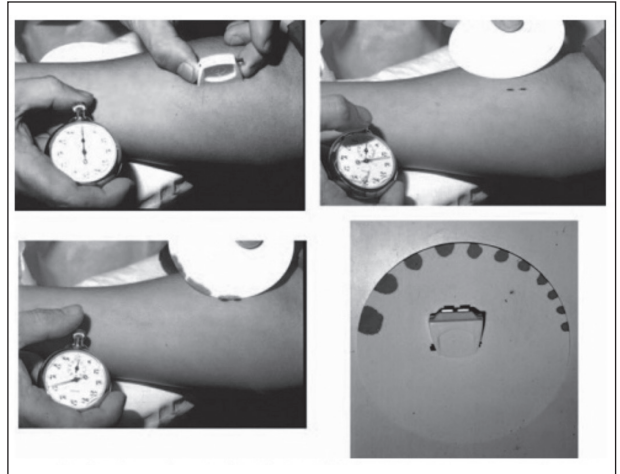


Figura 6. Fotografía que ejemplifica de la realización de un tiempo de sangría por el método de Template.

Adhesividad plaquetaria

Fundamento

La adhesividad plaquetaria es una de las primeras etapas de la hemostasia que relaciona una superficie no plaquetaria (subendotelio, matrices de colágeno, vidrio, etc.) con la plaqueta.

Al producirse injuria tisular quedan expuestos los componentes del subendotelio. La plaqueta se adhiere activándose, emitiendo pseudópodos y formando una monocapa que cubre la disrupción endotelial producida por la herida. En la siguiente fase de propagación se une más fuertemente al endotelio con una mayor proporción de membrana plaquetaria involucrada. En estos procesos intervienen proteínas específicas: fundamentalmente colágeno, factor von Willebrand y receptores a nivel de membrana plaquetaria (GPIIb-V-IX, integrina $\alpha 2\beta 1$, GP VI).

La adhesividad plaquetaria se puede medir por técnicas *in vivo* (Borchgrevik) e *in vitro*.

a) Método de Borchgrevik (técnica “*in vivo*”)

Se realiza el tiempo de sangría (TS), según técnica de Mielke con un dispositivo descartable. Se deja fluir la sangre y a los 2 minutos, con una micropipeta, se toma una muestra de la sangre que fluye de la incisión practicada para el TS. Se realiza el recuento

de esta muestra (RT_2). Al mismo tiempo se toma una muestra de sangre venosa y se realiza el recuento plaquetario basal (RT_0).

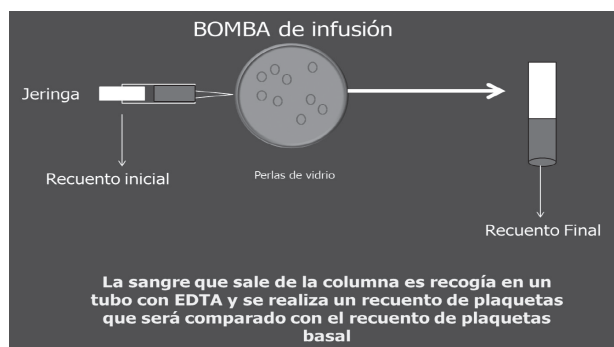
El porcentaje de adhesividad plaquetaria se calcula:

$$\text{Adhesividad\%} = \frac{\{(RT_0) - (RT_2)\}}{(RT_0)} \times 100$$

Valores normales: 30 - 70%

b) Método de Hellem II

Figura 7. Esquematiza la determinación de la adhesividad plaquetaria a las perlas de vidrio por el método de Hellem II



Comentarios

Se encuentran valores disminuidos de adhesividad plaquetaria en enfermedad de Bernard Soulier, ya que en esta patología está alterado cuanti o cualitativamente el complejo GP Ib-V-IX, a nivel de la membrana plaquetaria. En la enfermedad de von Willebrand se pueden presentar también valores disminuidos. De todas maneras, una adhesividad plaquetaria normal en esta patología no descarta el diagnóstico. Generalmente se correlaciona con el valor del TS.

Esta prueba puede encontrarse alterada en enfermedad de *pool* de depósito, y en diversas trombocitopatías adquiridas: síndromes mieloproliferativos, enfermedad renal crónica, síndrome de plaquetas activadas (por ej.: enfermedad valvular cardíaca). También se ve influenciada por la ingesta de drogas que interfieren con la funcionalidad plaquetaria como el ácido acetil salicílico, antiinflamatorios no esteroides, otras drogas antiagregantes como las tienopiridinas, las drogas inhibitoras de fosfodiesterasa, entre otras. Este tipo de técnicas son poco usadas según la bibliografía mundial más reciente. Adaptaciones de pruebas de adhesividad, pero en sistemas de flujo de superficies recubiertas de fibras de colágeno, son utilizadas a nivel de investigación, pero no para la práctica clínica.

Agregación plaquetaria

Fundamento

La agregación plaquetaria “in vitro” se puede definir como la interacción plaqueta-plaqueta medida sobre plasma rico en plaquetas (PRP) por método óptico (método descrito por Born) y sobre **sangre entera** por impedancia.

Preparación del paciente

Es importante que el paciente no ingiera medicación que altere la función plaquetaria. En el caso de las drogas que inhiben las plaquetas de manera irreversible como el ácido acetil salicílico y las tienopiridinas, se sugiere suspender su ingesta entre 7-10 días previos al estudio (vida media plaquetaria). En caso de drogas que producen inhibiciones reversibles, como los antiinflamatorios no esteroides, se deben suspender 72-96 horas previas al estudio. Hay situaciones en que hay que estudiar al paciente con toda la medicación dada por el médico para poner de manifiesto la acción de esas drogas sobre la función plaquetaria del paciente, en caso de duda se sugiere consultar al médico que indica el estudio.

Siempre se deben registrar todos los medicamentos que ingiera el paciente.

No se necesita ayuno previo de 8 horas estrictamente, pero sí 8 horas libre de ingestas ricas en grasas, para evitar la opalescencia del plasma que pueda interferir en el estudio, especialmente cuando se utiliza el método óptico. Se recomienda que el paciente se abstenga de fumar 30 min y de consumir cafeína 2 horas antes de la toma de muestra.

Método de transmisión de luz: agregación en PRP

Procedimiento

Se ajusta el agregómetro con: PRP el 100% de DO (límite inferior de la transmitancia), PPP el 0% DO (o máxima transmitancia), correspondiendo al 10 y 90% del registro milimetrado. Cada agonista presenta una curva de morfología característica. Es importante procesar un plasma rico normal en cada jornada de trabajo.

ANÁLISIS DE LA CURVA DE AGREGACIÓN DE ADP: la figura 8 es un gráfico de cambios de la DO de una suspensión plaquetaria a la que se agregó ADP $3 \cdot 10^{-6}M$. Por acción del agonista comienza el cambio de forma, que es la primera respuesta al estímulo, la plaqueta se transforma de una célula lenticular en una

esfera con pseudópodos y eso genera una disminución transitoria de la transmitancia. Este mecanismo es independiente de cationes divalentes y se produce en ausencia de fibrinógeno. Comienza luego la fase inicial de agregación, que sí es dependiente de calcio y presencia de fibrinógeno. Las plaquetas se adhieren unas a otras llegando a formar agregados plaquetarios. La primera parte de la curva luego se continúa con la segunda ola o agregación secundaria que es dependiente de la acción del ADP sobre el receptor P_2Y_{12} . Para que la agregación secundaria se lleve a cabo se debe formar tromboxano a partir del meta-

bolismo del ácido araquidónico y se deben liberar correctamente los gránulos. Esta dependencia hace que el ADP tanto como la adrenalina sean llamados agonistas débiles. El proceso puede ser reversible luego de la primera ola, debido a que los agregados se dispersan y la DO aumenta (la transmitancia disminuye). Esto puede suceder por: a) la concentración del agonista es baja y no se puede producir la respuesta completa; b) existe una falla en la reacción de liberación (inhibición por drogas o presencia de trombocitopatía).

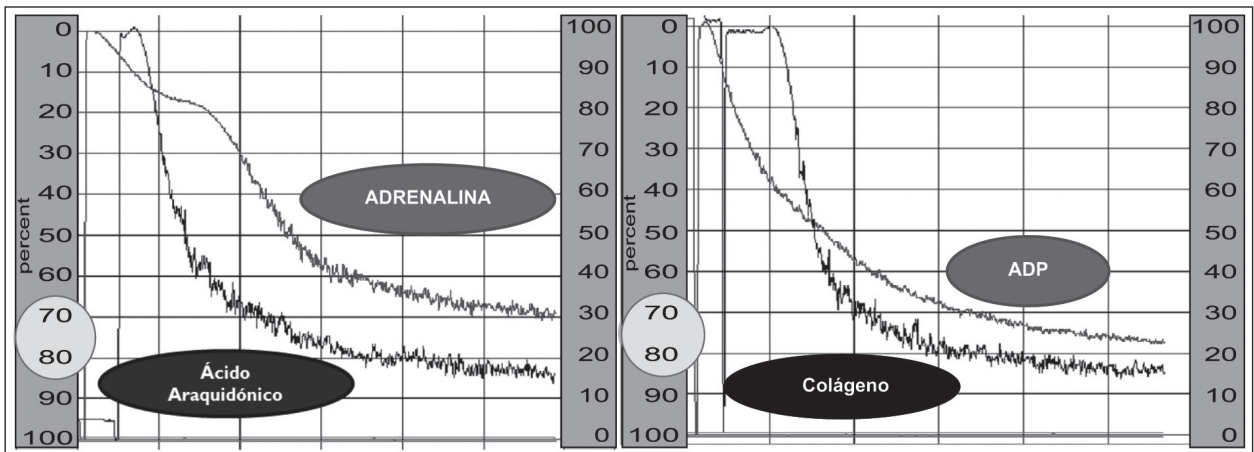


Figura 8. Curvas normales de agregación plaquetaria con los diferentes agonistas

En la figura 9 se muestran fotos de distintos modelos de agregómetros



Figura 9. Modelos de agregómetros por transmisión de luz

Hipofunción plaquetaria: la agregación plaquetaria está alterada tanto en trombocitopatías congénitas como adquiridas. Las anomalías bioquímicas y/o metabólicas que se presentan en algunas trombocitopatías congénitas como trombostenia de Glanzman (alteración cuanti y/o cuali de GPIIb-IIIa), el síndrome de Bernard Soulier (alteración cuanti y/o cuali de GPIb-V-IX), el síndrome de *pool* de depósito o alteraciones de la reacción de liberación de los gránulos, están bien definidas. Las trombocitopatías adquiridas son mucho más frecuentes, pero las alteraciones se pueden presentar a distintos niveles: receptores de membrana, reacción de liberación, síntesis de prostaglandinas, enzimas. Por lo tanto, los perfiles de agregación plaquetaria no siguen un patrón establecido.

Hiperfunción plaquetaria: se presenta en estados de activación tanto plasmática como plaquetaria: estados pretrombóticos, pacientes con aterosclerosis, IAM, accidentes cerebrovasculares, diabetes, etc. Para poder detectarlos, se debe trabajar con agonistas en baja concentración de tal manera que los normales

no respondan. Por ej: $ADP \leq 1 \times 10^{-6}$ M. No obstante, las recomendaciones de la ISTH son no utilizar esta metodología para detectar pacientes en riesgo trombótico, sino para evaluar disfunción plaquetaria asociadas a manifestaciones de sangrado

Método por amperometría o impedancia: agregación en sangre entera

Fundamento

Al ponerse en contacto el electrodo con la muestra de sangre entera, se forma una monocapa plaquetaria inicial. Cuando se agrega un agonista en la sangre entera bajo agitación se forman agregados plaquetarios que se depositan sobre la monocapa ya existente sobre el electrodo. Se crea así una diferencia de potencial por el aumento de resistencia al pasaje de corriente que es directamente proporcional a la masa plaquetaria depositada.

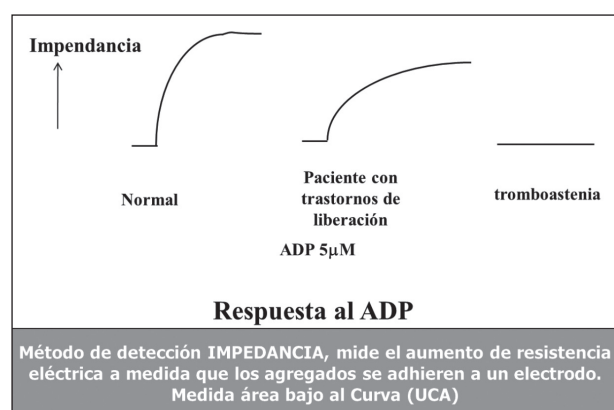


Figura 10. Curvas de agregación plaquetaria obtenidas a través de una agregómetro por el método de impedancia

Comentarios

La incorporación del agregómetro de sangre entera al estudio de la función plaquetaria se pensó como de gran ayuda para evaluar a la plaqueta en su medio original. La información que se ha obtenido hasta ahora es la misma que por el método óptico. Sin embargo, hay dos situaciones en donde la agregación en sangre entera da más información: a) detectar estados de hiper-reactividad plaquetaria, ya que la presencia de leucocitos y eritrocitos aumenta la sensibilidad, e incluso influirían en este método la formación de agregados leucocito-plaqueta b) control de drogas antiplaquetarias.

Reacción de liberación

Liberación de ATP

Para esta técnica se trabaja con plasma rico en plaquetas y se utiliza como reactivo la luciferin-luciferasa, que tiene la particularidad de producir luminiscencia cuando reacciona con ATP. Dado que uno de los componentes importantes del gránulo denso es el ATP, la liberación del mismo cuando la plaqueta es activada por un agonista se mide como un aumento de luminiscencia. Para ello se utiliza un agregómetro especial llamado Lumi agregómetro. Este agregómetro es una variante del agregómetro óptico de transmisión de luz que tiene la capacidad de detectar luminiscencia además de transmitancia y puede registrar simultáneamente las curvas de agregación y liberación.

La luminiscencia que emite cada plasma rico es diferente debido a las características físicas de cada plasma. Es por ello que para poder cuantificar el ATP liberado hay que colocar en cada corrida un estándar interno de ATP.

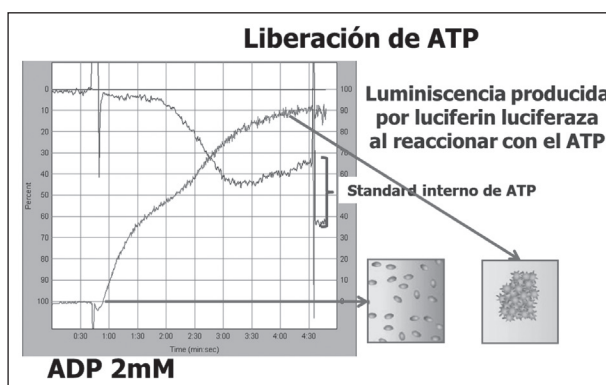


Figura 11. Ejemplo de curvas de agregación y liberación de ATP por el método de luminiscencia

Métodos rápidos y globales de evaluación de la hemostasia primaria

PFA100-200®

El analizador de función plaquetaria (PFA-100/Dade-Behring) valora automáticamente la adhesión y agregación plaquetaria inducida simultáneamente por una alta velocidad de flujo en presencia de una mezcla de colágeno con ADP o con epinefrina. Esencialmente, una muestra de sangre entera (0,8 mL) anticoagulada con citrato de sodio (0.11 M) se dispensa en el reservorio de un cartucho desechable que contiene un capilar dirigido hacia una membrana con un orificio de 150 µm de diámetro. La membrana está recubierta de colágeno y ADP (col/ADP)

o con colágeno y epinefrina (col/Epi). Al iniciar el ensayo, un vacío constante (40 mbar) hace que la sangre circule a alto flujo (4000-6000 s⁻¹) por el capilar hasta atravesar el orificio de la membrana del cartucho. El alto flujo, que *per se* induce activación, la presencia de colágeno, que promueve la adhesión de las plaquetas vía GP Ib/IX/V y factor von Wi-

llebrand en esas condiciones de flujo, seguido de la activación inducida por el ADP/epinefrina embebidos en la membrana que actúan sobre los receptores P2Y1/P2Y12 y α_2 adrenérgico respectivamente, provocan la formación de un trombo plaquetario que termina por impedir el flujo de sangre a través del orificio.

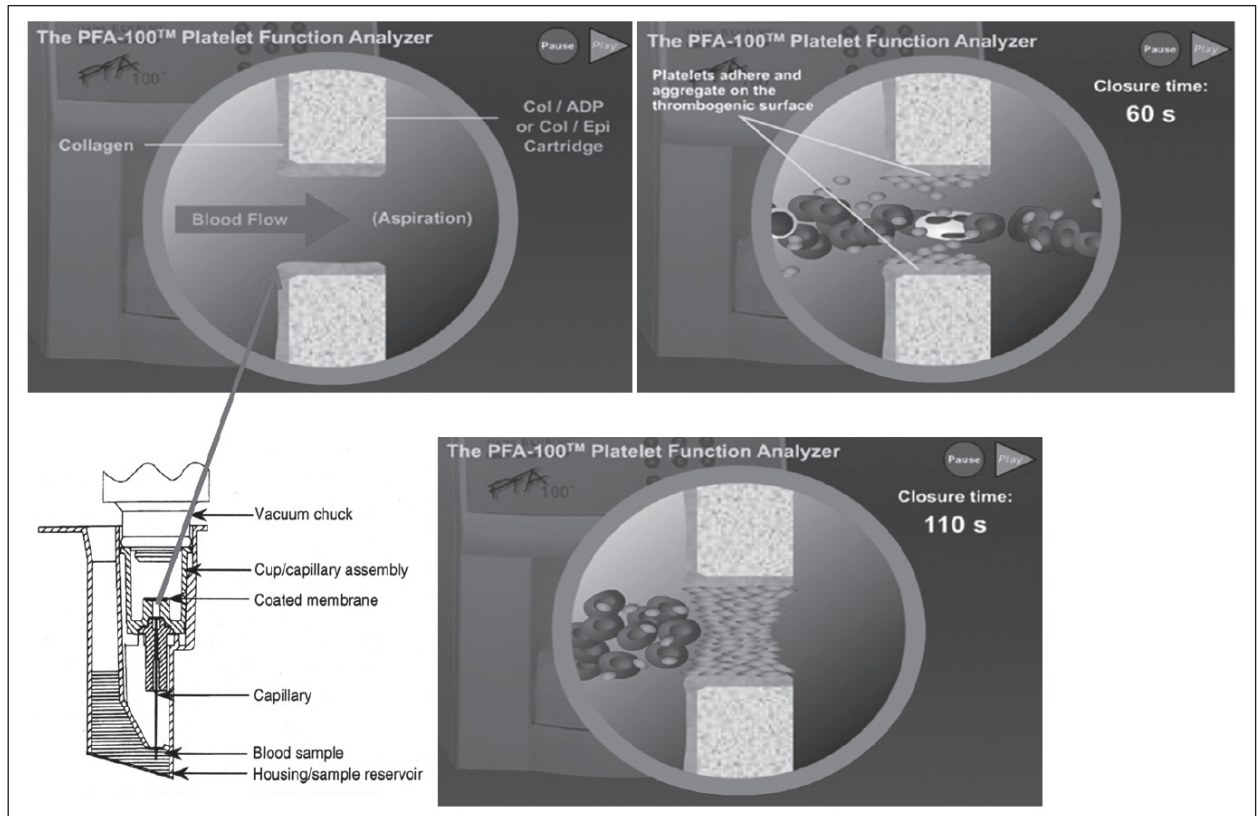


Figura 12. Esquema del funcionamiento del sistema PFA (tomado de los gráficos del fabricante)

La medida que realiza el equipo es el tiempo necesario para obstruir el flujo a través del orificio y es llamado CT (*closure time*) o TO en español.

Conceptualmente, TO muy largos estarían asociados a hipofunción plaquetaria y tiempos muy cortos a hiperreactividad. El equipo está diseñado para cuantificar sólo TO inferiores a 300 s; superado este tiempo el ensayo se corta automáticamente y el resultado se expresa como TO > 300 s. Otros parámetros adicionales del ensayo en el modo investigación el equipo son la velocidad y volumen máximo de sangre que atraviesa la membrana. Esta técnica es simple y rápida con un volumen de sangre requerido bajo y valora la respuesta hemostática bajo condiciones de alto flujo. El equipo es poco flexible porque tiene sólo 3 tipos de *cartridge*, COL/ADP, COL/EPI, y un *cartridge* nuevo P2Y que contiene

colágeno/ADP, pero con el agregado de PGE1 para eliminar la activación del receptor P2Y1 que permite evaluar la respuesta a los inhibidores del receptor de ADP P2Y12 como el clopidogrel. Tiene sensibilidad moderada frente a trastornos de la agregación plaquetaria leves, como son trastornos leves de la respuesta secundaria o reacción de liberación. Sí detecta la mayor parte de los pacientes con defectos plaquetarios congénitos importantes. Es sensible a la cantidad y funcionalidad (dependiente de la estructura multimérica del factor von Willebrand), por lo que tiene buena sensibilidad para detectar la presencia de enfermedad de von Willebrand. Por lo tanto, un TO normal con ambos *cartridge* permite descartar una trombocitopatía severa, o una enfermedad de von Willebrand importante, pero no descarta un trastorno de la hemostasia primario leve.

También tiene importancia el hematocrito y el recuento plaquetario en este método. Se puede concluir que es una herramienta adicional interesante que colabora al diagnóstico de los trastornos de la hemostasia primaria o que evalúa el efecto de los antiagregantes, pero su uso rutinario como prequirúrgico no es costo/beneficio aceptable.

Verify Now®

El sistema VerifyNow®, denominado hasta hace poco Ultegra-RPFA® (Accumetrics Inc.), se basa en un principio similar al de la agregación plaquetaria, es decir, la medida del cambio de turbidez o de transmisión de luz a través de una muestra de sangre como consecuencia de la formación de agregados de plaquetas con unas esferas recubiertas con fibrinógeno inducida por un agonista (Figura 13). Esta técnica es simple y rápida, con un volumen de sangre requerido muy bajo. Básicamente, el sistema es un fotómetro compacto automático en el que se insertan unos cartuchos de plástico en los que se aplica la muestra de sangre. Estos cartuchos incluyen bolas recubiertas de fibrinógeno y un agonista plaquetario que varía según el tipo de prueba. Iniciado el ensayo, el detector mide automáticamente (16 veces) la transmisión de luz a través de la muestra, y calcula la velocidad de aglutinación en función de la pendiente de cambio de la absorbancia. El resultado se imprime automáticamente expresado en unidades arbitrarias de respuesta al agonista. El diseño de este sistema se ha enfocado particularmente a la monitorización de la terapia antiagregante, y ha sido aprobado por la FDA para esta aplicación. No se utiliza para el diagnóstico de alteraciones congénitas de la hemostasia primaria como trombocitopatías congénitas ni de la enfermedad de von Willebrand, ya que no se ve afectado por los niveles de factor von Willebrand.

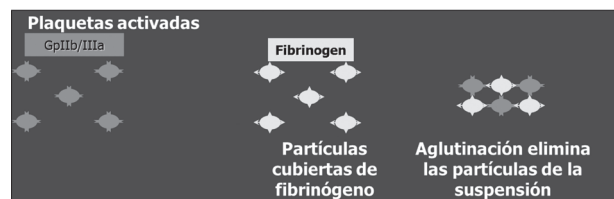


Figura 13. Fundamento del funcionamiento de la agregación plaquetaria medida por el Verify One. (Adaptado del fabricante)

Platelets Work®

Es un ensayo rápido de funcionamiento plaquetario que sirve en situaciones de emergencia para verificar si la agregación plaquetaria está alterada o si se detecta efecto de antiagregantes plaquetarios que estén presentes en la sangre del paciente. Se basa en la realización de dos recuentos plaquetarios en contadores hematológicos en un tubo con agonista y otro sin agonista.

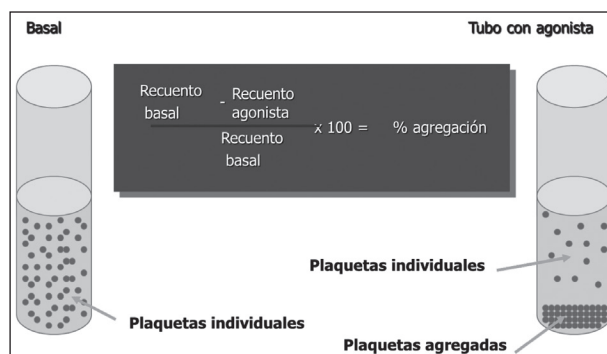


Figura 14. Fundamento del método Platelets Work®