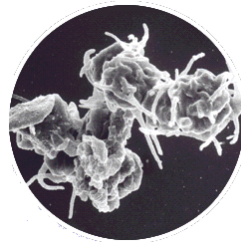


Rol de la agregometría en el estudio de la función plaquetaria



Dra. María Fabiana Alberto
Departamento de Hemostasia y Trombosis
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Buenos Aires



Agregometría (agregación plaquetaria por método óptico)

El método fue desarrollado por Born y O'Brien de manera independiente en 1962.

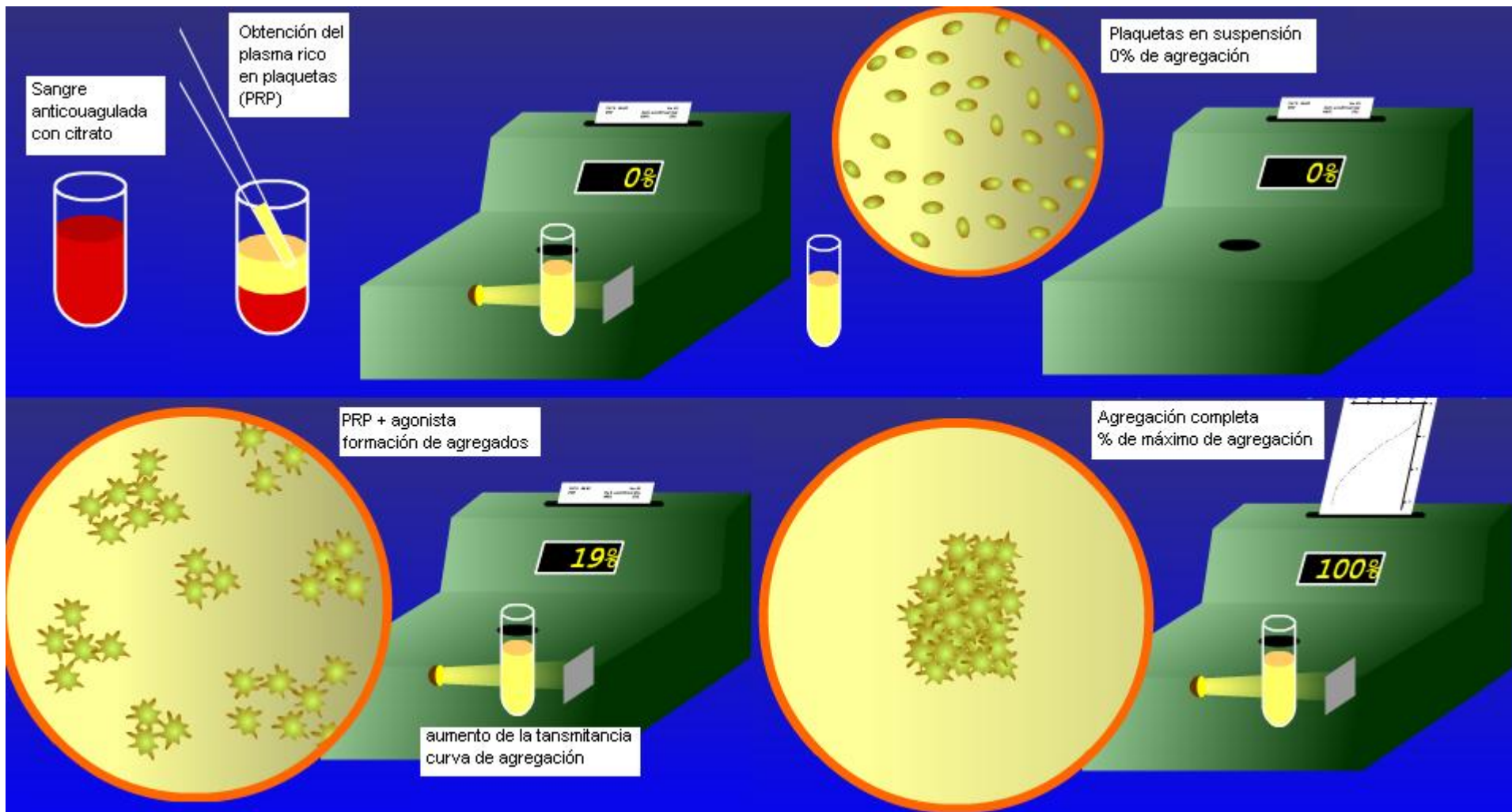
La metodología consiste en un instrumento diseñado específicamente: un espectrofotómetro conectado a un sistema de registro.

Es considerado el método de referencia para el estudio de los defectos de la función plaquetaria.

La metodología carece de estandarización (Moffat KA 2005, Jennings I 2006, Duncan EM 2008, Cattaneo M 2009).

En el año 2008 se publicó una guía de procedimiento elaborada por el Clinical and Laboratory Standart Instituted (H58-A, CLSI).

Las guías oficiales de la ISTH están siendo preparadas por el sub-comité de Fisiología Plaquetaria.



ADP (2.5-5.0 μM)

ADR (10.0 μM)

Colágeno (1.0 $\mu\text{g/ml}$)

Acido araquidónico (0.5 mM)

Ristocetina (0.5 y 1.2 $\mu\text{g/ml}$)

Agonistas especiales:

TRAP (10.0 μM)

Análogo del tromboxano, U46619 (1.0 μM)

Ionóforo de calcio (1.0 μM)

Condiciones pre-analíticas

Toma de muestra: agujas 20-19 G con mínimo de estasis venosa.

Anticoagulante: citrato de sodio 3.2%(109 mM) ó 3.8% (129 mM).

Obtención del plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 150 g durante 10 minutos.

Recuento de plaquetas: ajustar el PRP con plasma autólogo a un valor estándar (200.000-300.000 / μ l).

pH: tapar los tubos para evitar pérdida de CO₂ o emplear anticoagulante en medio tamponado.

Temperatura: ambiente hasta evaluación. El PRP debe estar a 37° para la agregación, dejar 3- 4 minutos en el contenedor del agregómetro antes de ser enfrentado al agonista.

Velocidad de agitación: 1000 rpm.

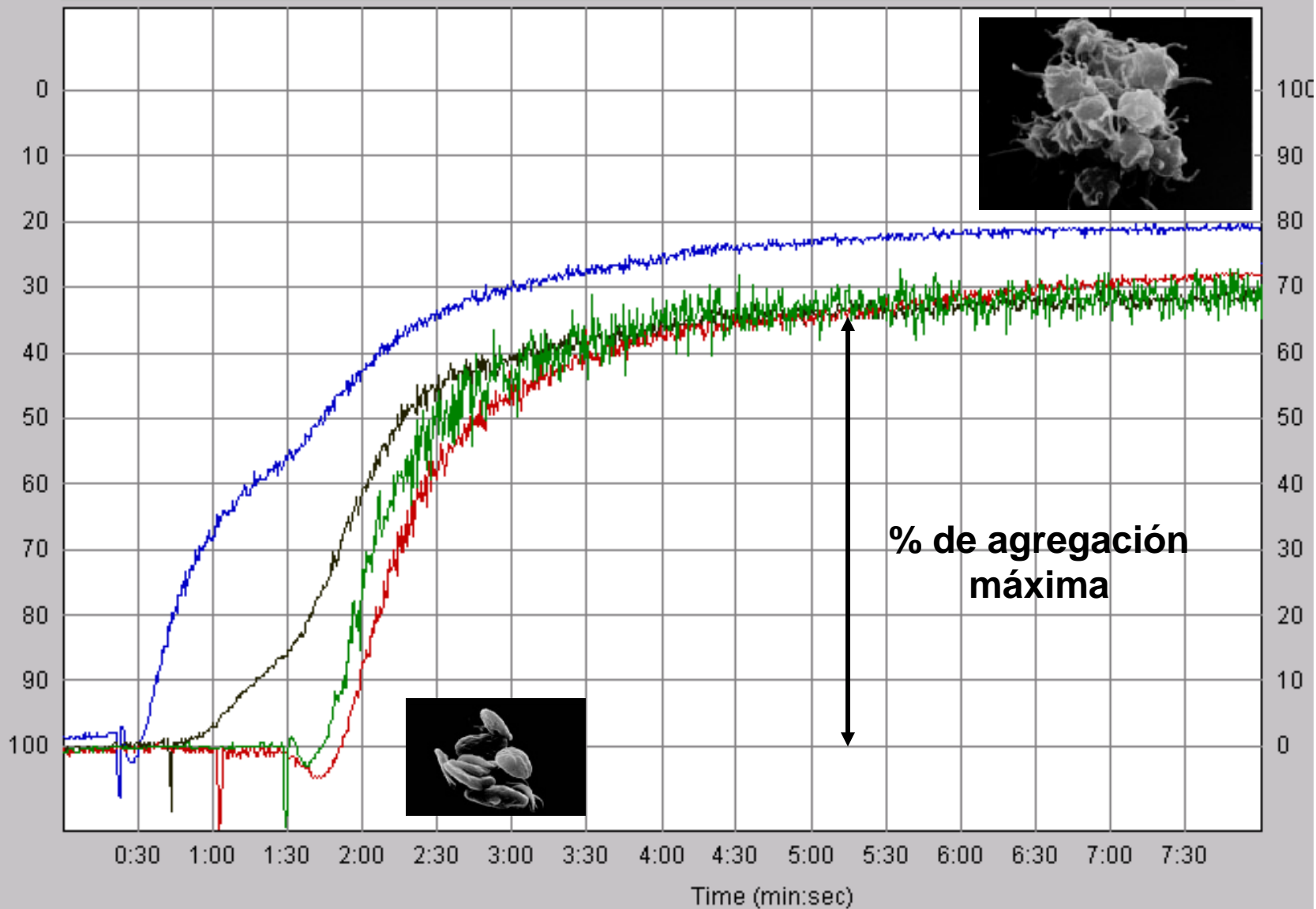
Tiempo: 30 minutos mínimo luego de la toma de muestra hasta cuatro horas máximo.

ADP 2.5 μ M

ADR 10 μ M

Colágeno 1 μ g/ml

Araquidónico 0.5 mM



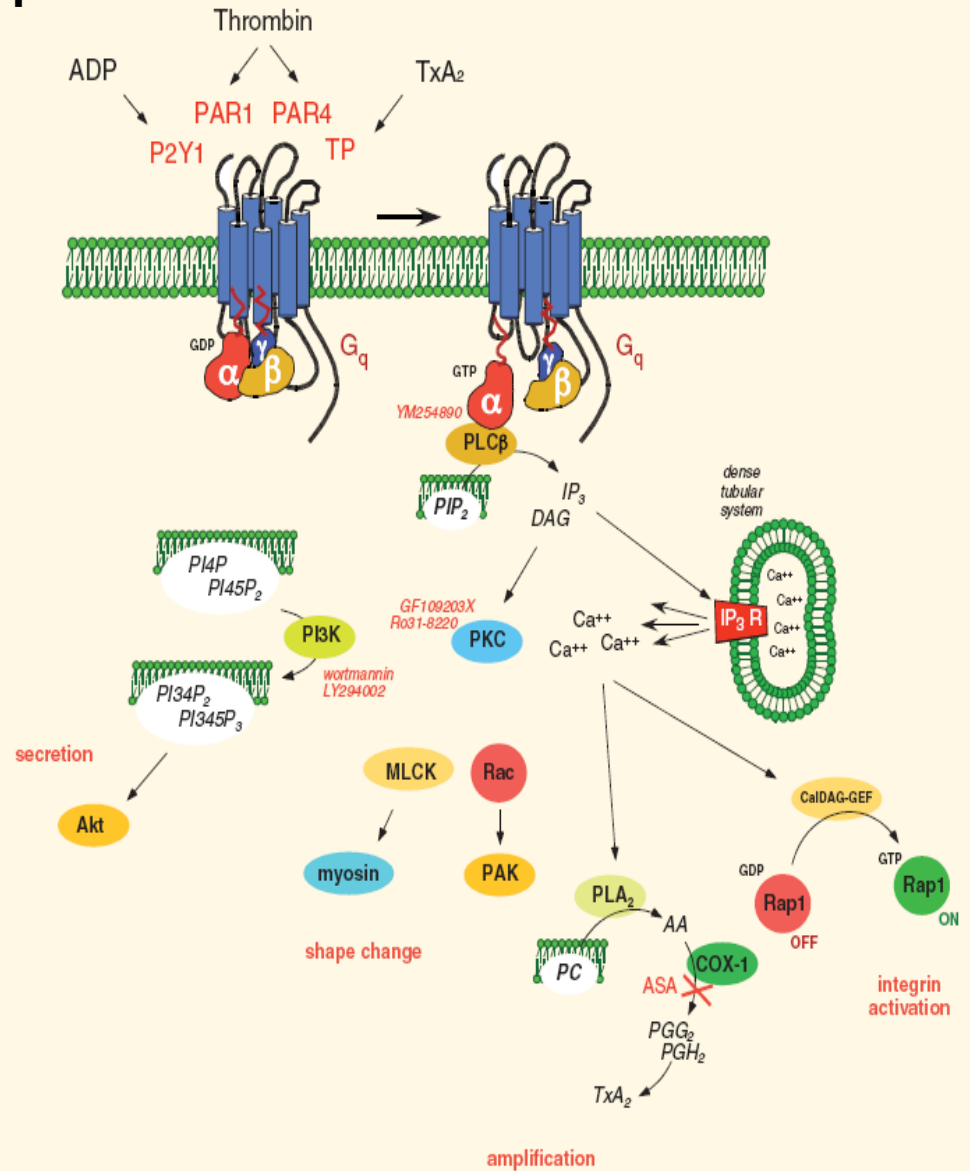
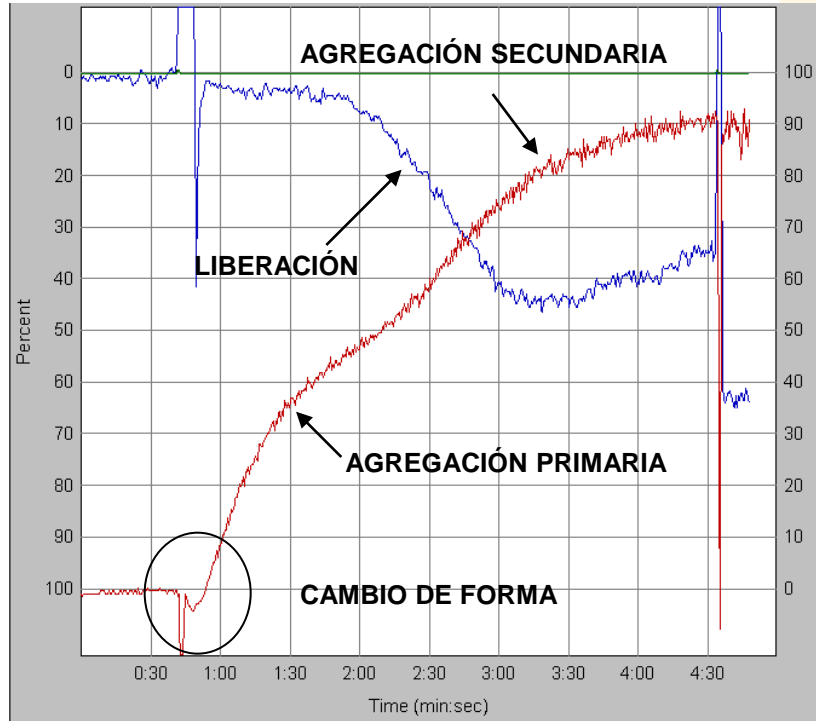
Lumiagregometría

Es una modificación del método tradicional que permite medir en paralelo la secreción plaquetaria y la agregación.

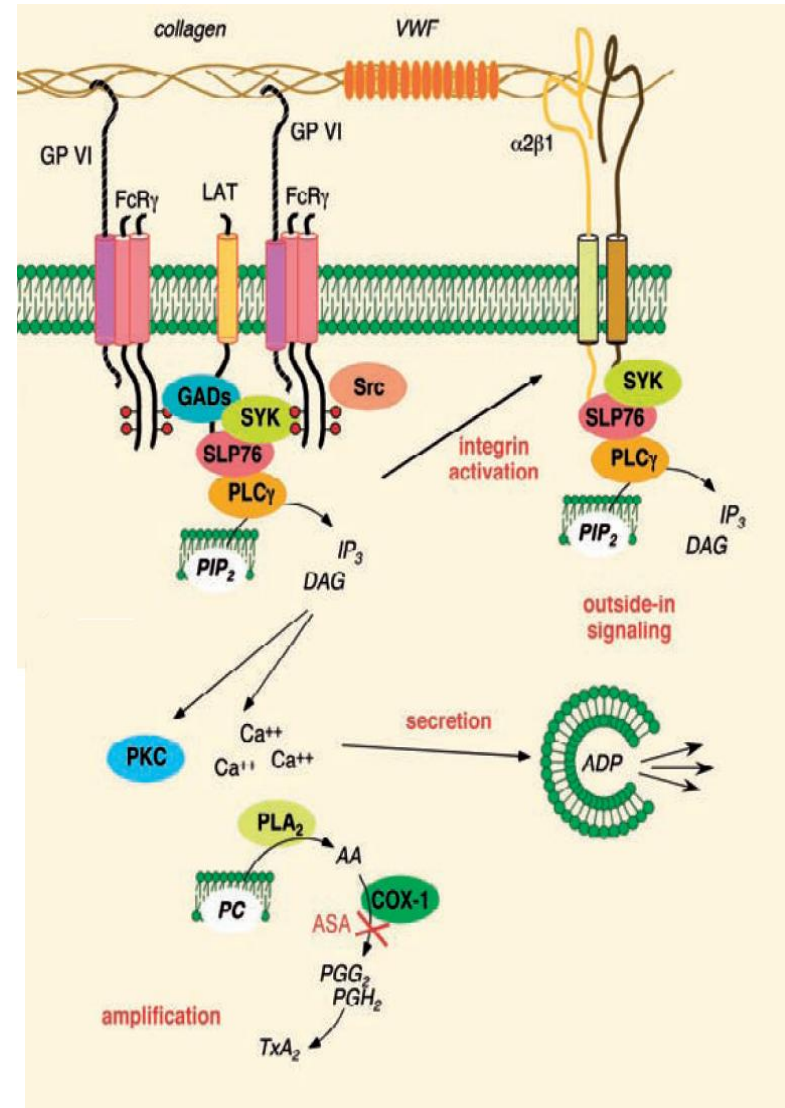
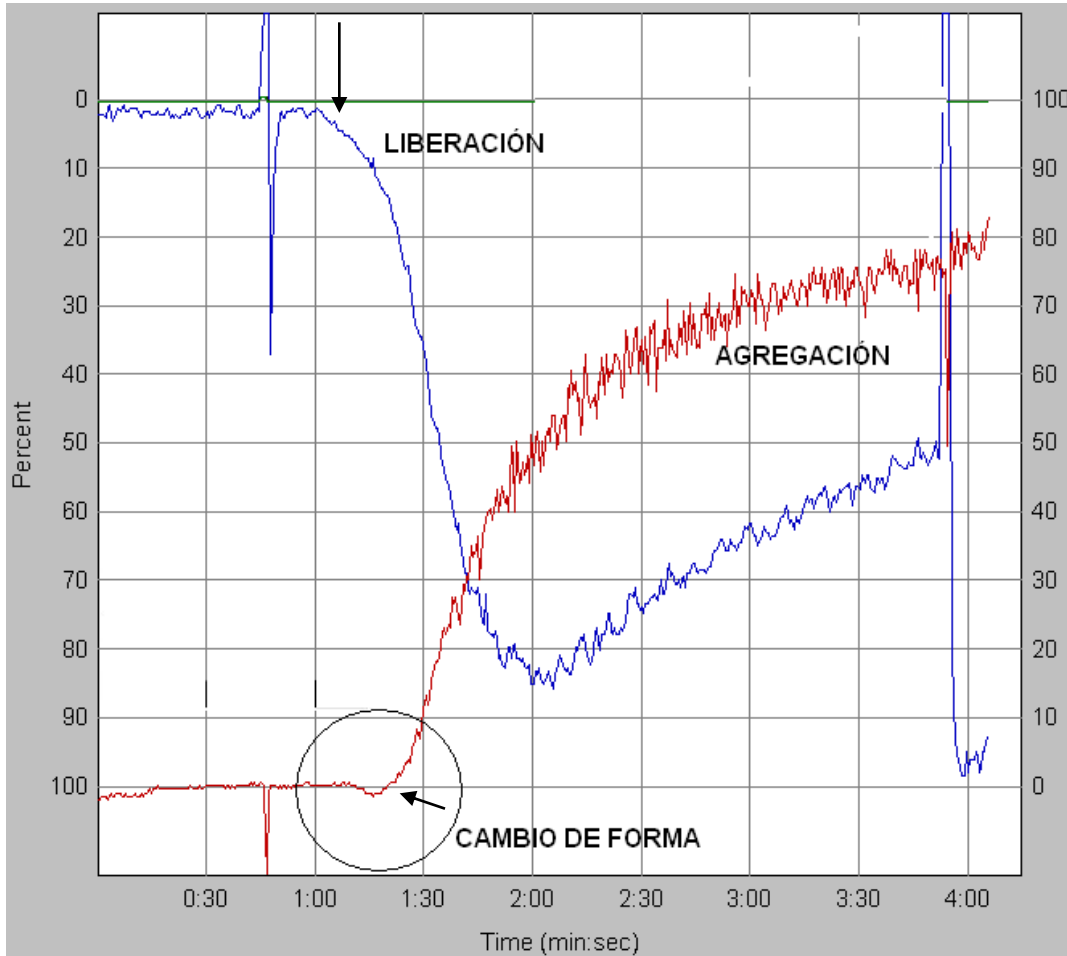
Se basa en la determinación de una señal de bioluminiscencia que se produce cuando el ATP es liberado desde los gránulos densos de la plaqueta y reacciona con un extracto de luciferina-luciferaza produciendo oxidación de la luciferina lo que resulta en la emisión de luz.

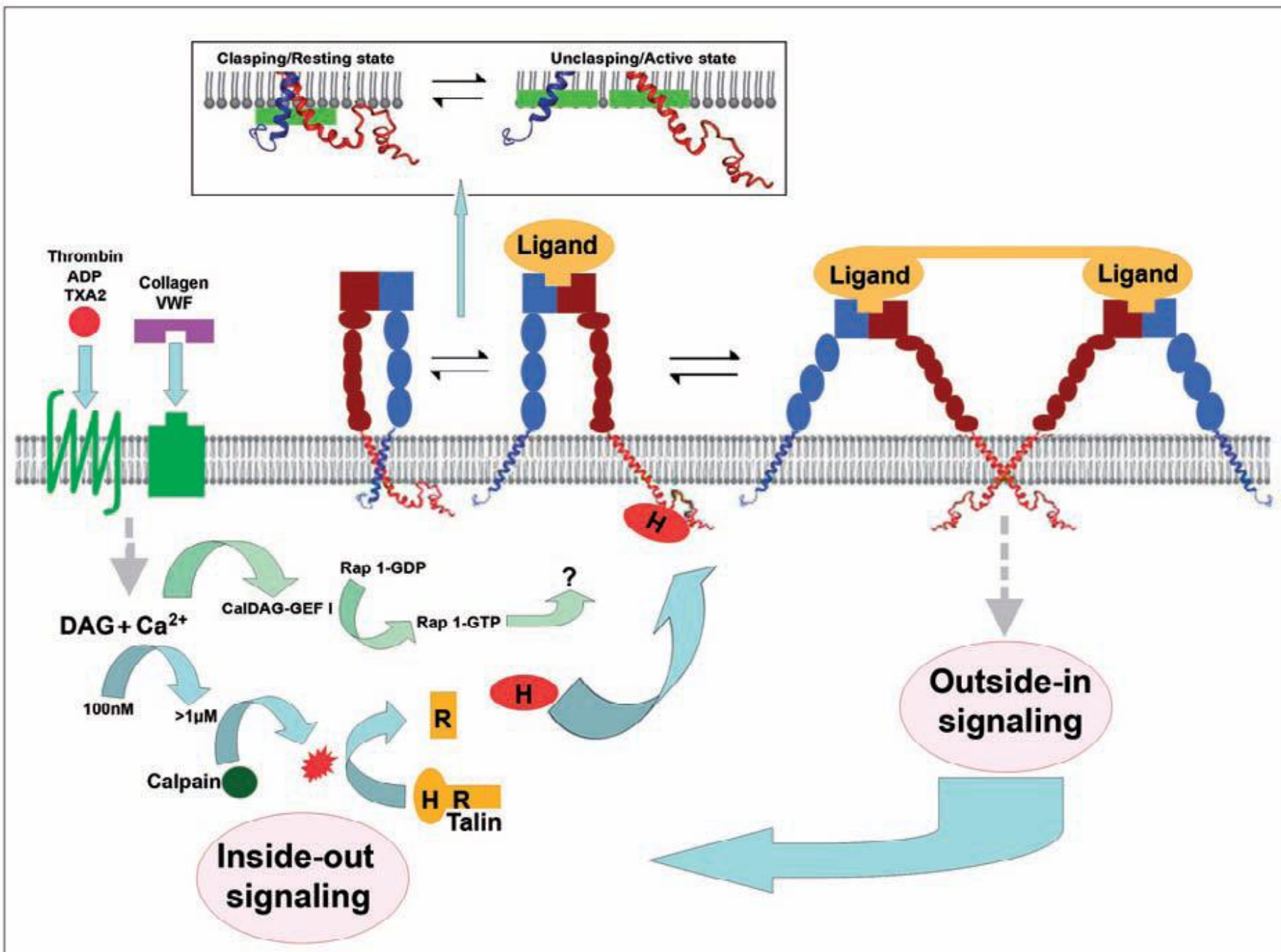
Esta técnica es preferible a la agregación plaquetaria tradicional porque puede llegar ser mas sensible para la caracterización de los desórdenes plaquetarios mas comunes que se caracterizan por anomalías en los mecanismos de secreción (Hayward CPM 2009, Mezzano D 2009).

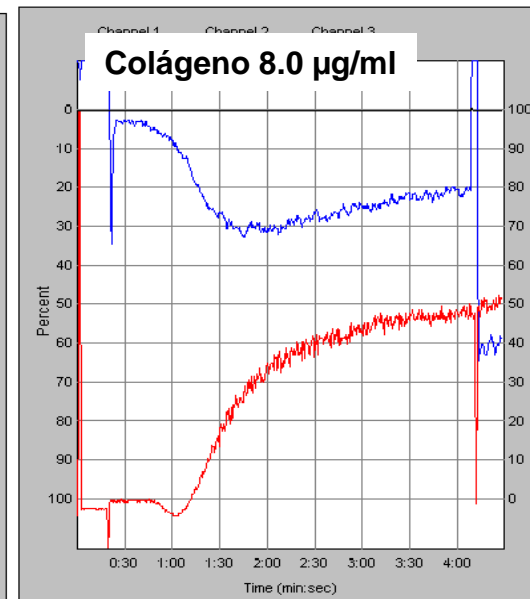
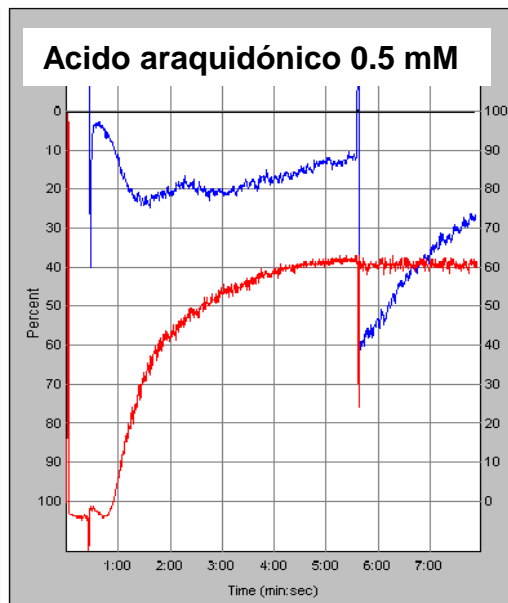
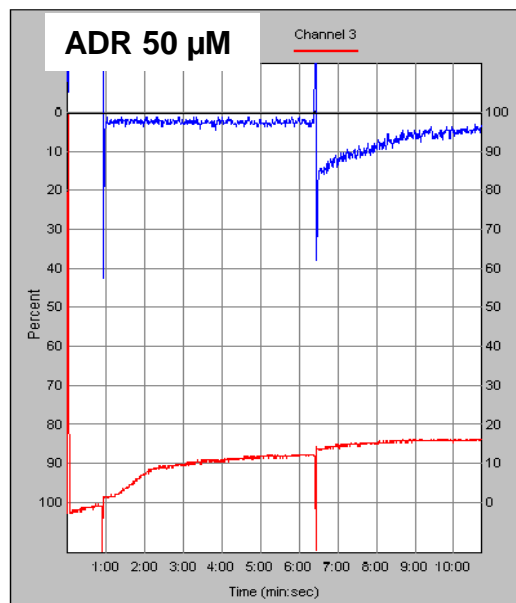
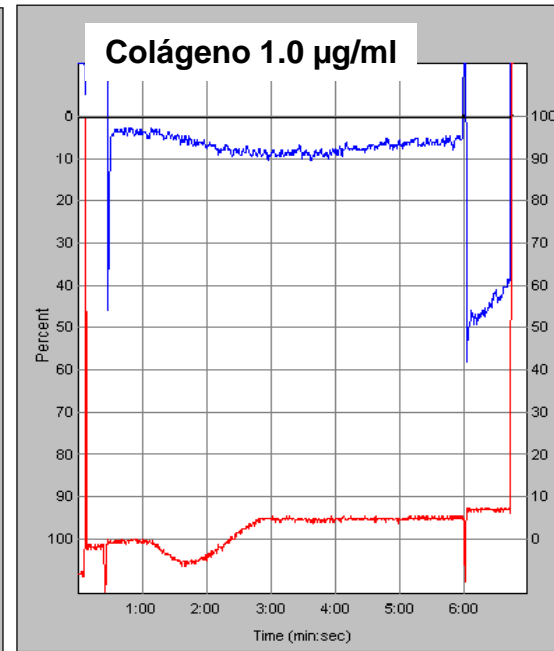
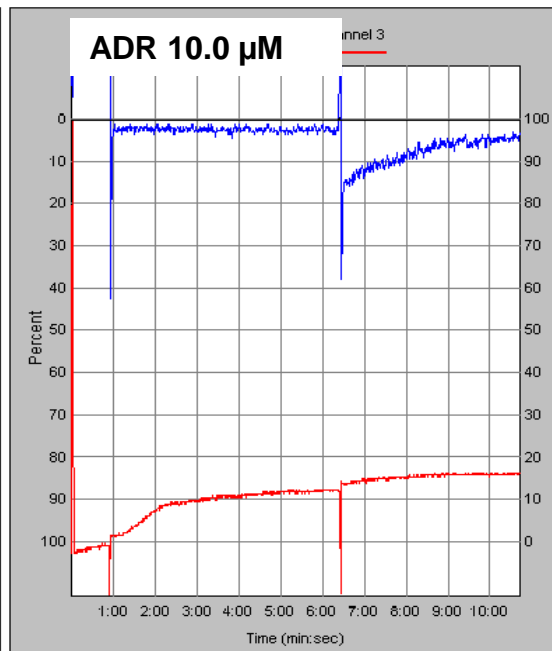
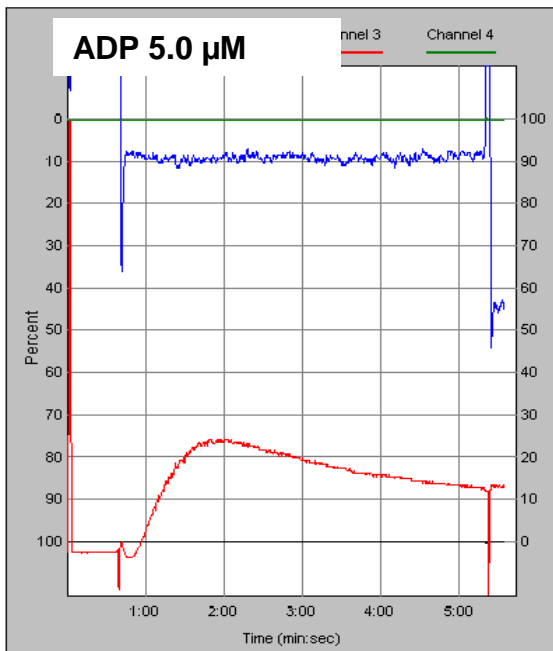
Agregación plaquetaria con ADP 2.5 μM



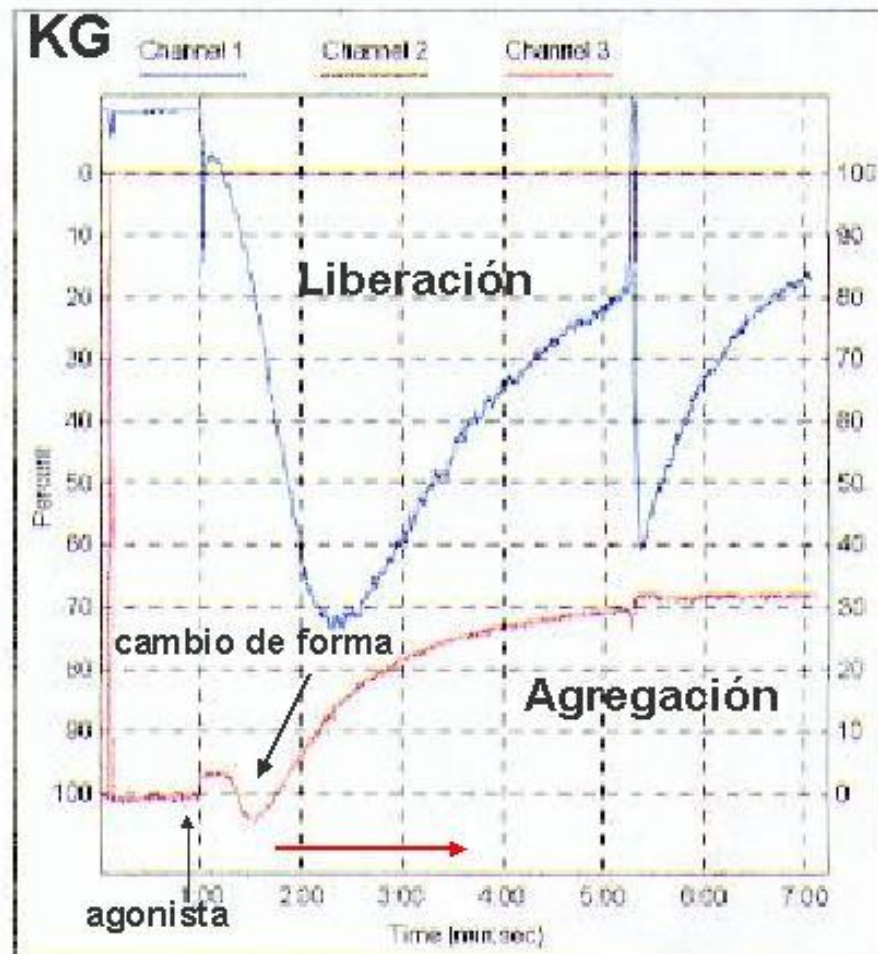
Agregación plaquetaria con colágeno 1 μM





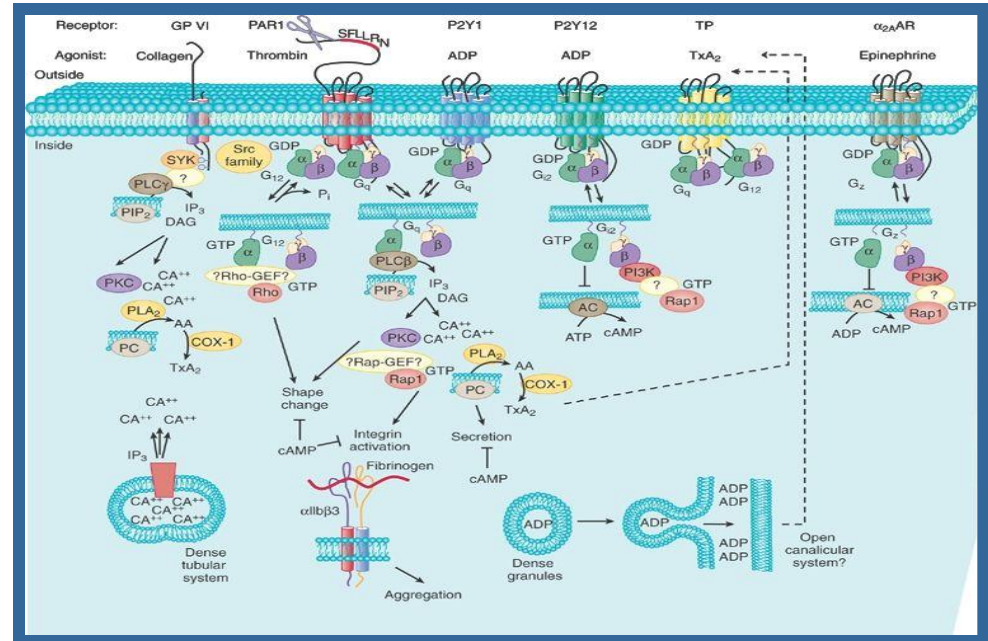
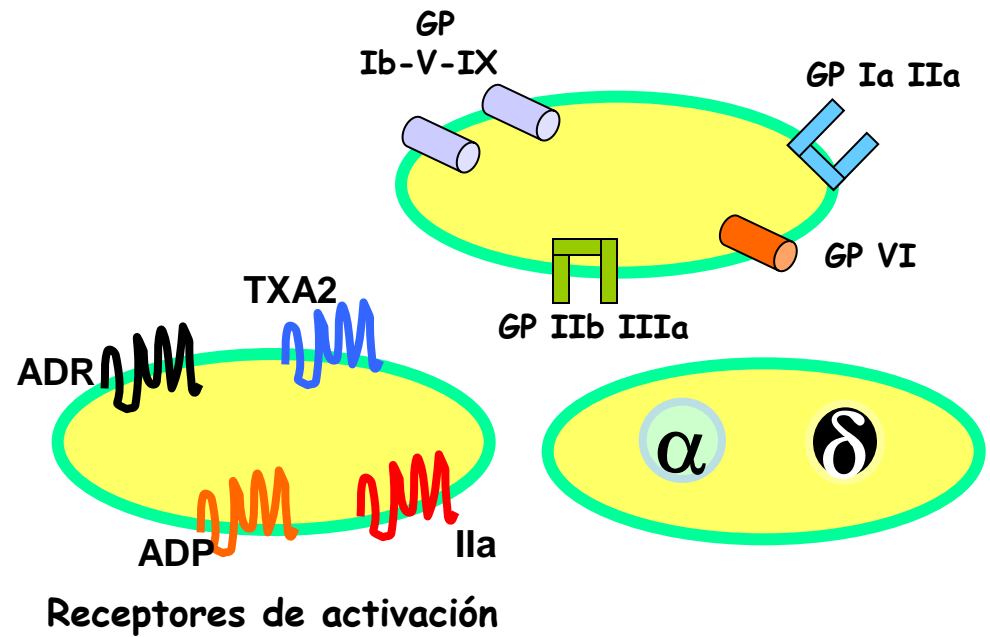


Agregación y liberación con colágeno 8 ug/ml Trombastenia de Glanzmann



Anormalidades plaquetarias:

- de los receptores para proteínas adhesivas
- de los receptores para agonistas solubles
- de los gránulos
- de los mecanismos de transducción de señal
- de los fosfolípidos pro-coagulantes
- misceláneas, desórdenes no caracterizados





Resultados de la encuesta mundial sobre la evaluación de la función plaquetaria mediante agregación plaquetaria por método óptico **(Subcomité de Fisiología Plaquetaria del Comité de Estandarización de la ISTH)**

Participantes: 359 laboratorios de 48 países (244 clínicos, 115 de investigación), miembros de la ISTH o de programas de control de calidad externos.

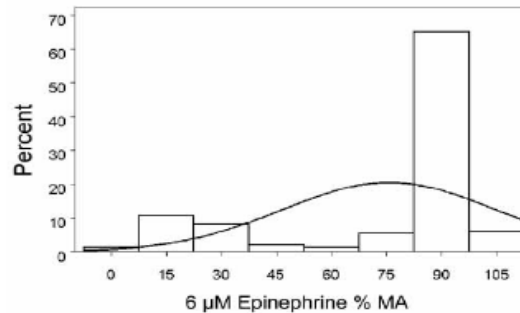
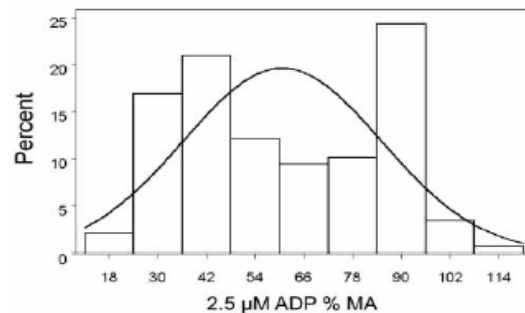
- 54% realiza la evaluación siempre que lo solicita el médico sin criterios clínicos definidos.**
- Solo 30% solicita a los pacientes no ingerir drogas que inhiben la función plaquetaria.**
- La mayoría emplea agujas 21 G (rango de 16-23), torniquete, tubos de vacío, citrato de sodio 3.2% en relación 1:9.**
- Para muestras con trombocitopenia y macroplaquetas la mayoría no tiene un procedimiento especial.**
- Entre los sitios que evalúan la secreción plaquetaria la mayoría mide liberación de ATP por el método de luciferina-luciferaza.**
- Los agonistas mas frecuentes son ADP, ADR, colágeno, ristocetina y ácido araquidónico en mas de una concentración.**
- La mayoría evalúa la respuesta en % de agregación máxima en adición a la presencia de agregación secundaria, desagregación, cambio de forma y fase de latencia.**
- Solo 39% tiene intervalos de referencia y la mayoría de estos usan la media + 2SD.**

Evaluación de métodos para determinar intervalos de referencia para agregación plaquetaria por método óptico en muestras con recuento normal o reducido

171 controles sin historia de sangrado y pacientes con trombocitopenia evaluados en paralelo con un PRP control ajustado. Se determinó el % de agregación máxima con ADP, ADR, colágeno, ácido araquidónico y ristocetina.

¿Análisis paramétrico ó no paramétrico?

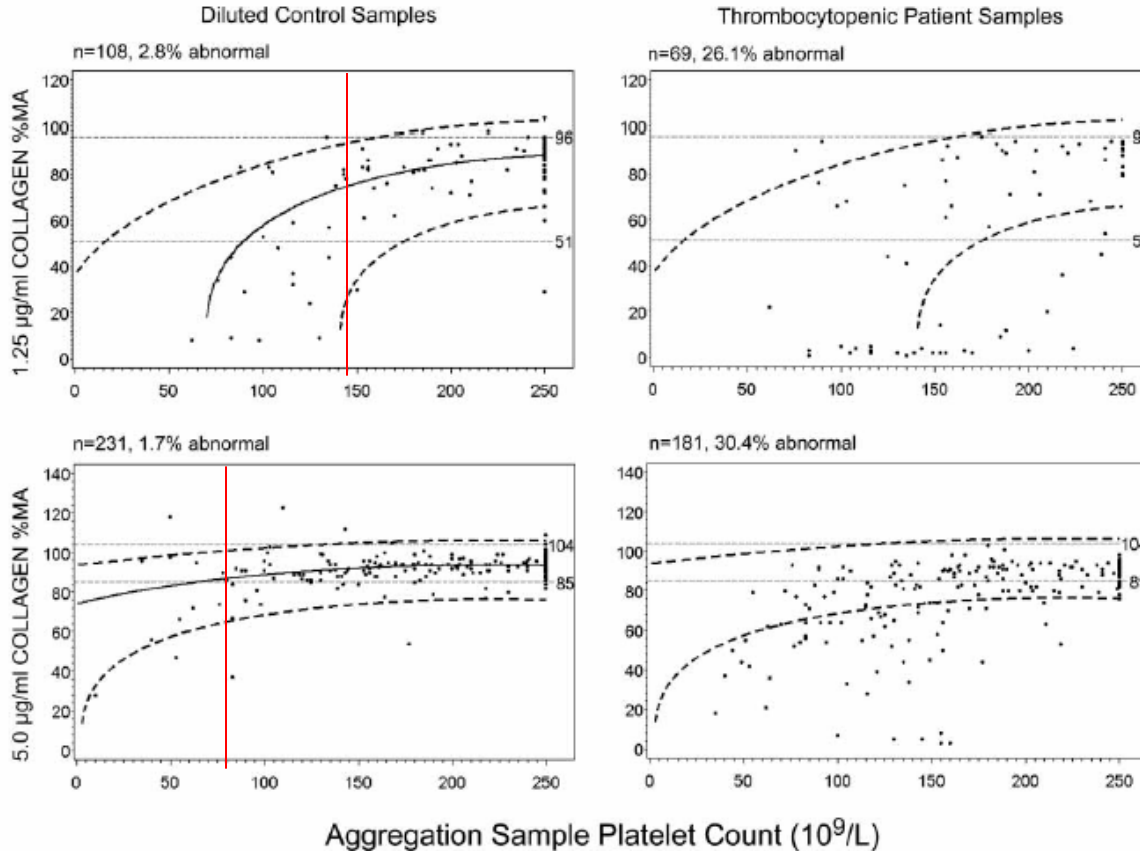
- % de agregación de controles (PRP a 250.000/ μ l) no tiene distribución normal con ningún agonista, esto es mas evidente para ADP y ADR que presentan distribuciones bimodales.



- Se propone calcular intervalos de confianza por el método no paramétrico de Taylor (Taylor JM 1996), que permite la inclusión de mediciones repetidas en un mismo control, con un mínimo de 39 controles.

Evaluación de métodos para determinar intervalos de referencia para agregación plaquetaria por método óptico en muestras con recuento normal o reducido

¿ Cómo evaluar el % de agregación en muestras trombocitopénicas?



PRP > 80.000 /µl:
- Colágeno 5 µg/ml
- ADP µM
- Ristocetina 0.5 y 1.2 µg/ml

PRP < 80.000 /µl:
- Ristocetina 0.5 y 1.2 µg/ml

En pacientes con macrotrofocitopenia (hereditaria o adquirida) el incremento en el tamaño plaquetario se asoció a una mayor extensión del % de agregación con todos los agonistas (menos ristocetina).

Utilidad diagnóstica de la agregación plaquetaria por método óptico: resultados de un estudio prospectivo de individuos derivados para evaluación por desórdenes de sangrado.

“La utilidad diagnóstica de la agregación plaquetaria es incierta”

Mediante el empleo de intervalos de referencia validados se evaluó:

- Con qué frecuencia las pruebas de agregación detectan anomalías de la función plaquetaria una vez que se descartó trombocitopenia y enfermedad de von Willebrand
- Qué agonistas detectan desórdenes plaquetarios comunes
- Probabilidad de sangrado basada en los hallazgos de las pruebas de agregación.

Se enrolaron:

- 229 pacientes que habían sido estudiados por desórdenes de sangrado en quienes se había estudiado la agregación plaquetaria y descartado trombocitopenia y enfermedad de von Willebrand.
- 105 controles sanos

Los pacientes fueron categorizados en grupos:

- Sin desorden de sangrado (39)
- Posible desorden de sangrado (17)
- Con desorden de sangrado: con diagnóstico (111) o indefinidos (63), de acuerdo a los resultados de las pruebas de laboratorio.

Hayward CPM, 2009

Utilidad diagnóstica de la agregación plaquetaria por método óptico: resultados de un estudio prospectivo de individuos derivados para evaluación por desórdenes de sangrado.

Resultados:

- La incidencia de una agregación anormal (falso positivo) en el grupo “sin desorden de sangrado” fue similar al grupo control.
- Agregación plaquetaria anormal fue mas común en el grupo “con desorden de sangrado”.
- La relación de probabilidad de tener un desorden de sangrado se incrementó (OR 32) cuando la agregación fue reducida con dos o mas agonistas.
- La mejor combinación de agonistas para detectar defectos en agregación fueron: colágeno 1.25 µg/ml, ADR 6 µM, ácido araquidónico 1.6 mM, análogo del tromboxano 1 µM.
- Análisis de las curvas ROC indicó que la agregación plaquetaria tiene alta especificidad y moderada sensibilidad para detectar defectos primarios de la función plaquetarias.
- 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%).

Utilidad diagnóstica de la agregometría por método óptico y el ensayo de liberación de serotonina en pacientes con desórdenes leves de la función plaquetaria.

-213 pacientes con sangrado cutáneo mucoso congénito.

- Intervalos de referencia: percentilo >2.5 % de un grupo control de 299 individuos.

-13.7 % del grupo control, tenía agregación plaquetaria anormal de manera conjunta, con ADR 10µg/ml y ADP 4 µM. Esta combinación no fue considerada *per se* como criterio de alteración de la función plaquetaria.

- 93 % fue el valor predictivo negativo de la agregación > 42 % con ADR 10µg/ml y 95% para agregación irreversible con ADP 4 µM.

- 85 pacientes fueron diagnosticados con defectos de la función plaquetaria.

- 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.

Hiperreactividad plaquetaria

Estudios prospectivos han relacionado incremento de la función plaquetaria con mal pronóstico en diferentes situaciones de enfermedad cardiovascular (Trip MD 1990, Kabbani SS 2001 y 2003, Tschoepe D 1993, Thaulow 1991, Frossard 2004)

No se dispone de métodos estandarizados para determinar esta condición.

En 2005 Yee DL , demostró que la agregación plaquetaria con bajas concentraciones de ADR (0.4 M) distingue una población de individuos sanos que presentan una respuesta aumentada, que se mantiene en el tiempo.

En un trabajo posterior con 386 individuos sanos (Yee DL 2006) se confirmó la presencia del grupo con hiperreactividad a bajas concentraciones de ADR y se demostró que esto correlacionó con, aumento de respuesta a otros agonistas, aumento de expresión de P-selectina, menor recuento plaquetario, mayor volumen plaquetario medio y niveles de fibrinógeno.

