

# Técnica para evaluar hiperreactividad plaquetaria a través de técnica de agregación plaquetaria por transmisión de luz

Platelet hyperreactivity evaluation through light transmission aggregometry

Picciano L, Crudo C, Sueldo E, Arias M

*Laboratorio de Hematología y Hemostasia, U.A. Dr. César Milstein, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.*

lucaspicciano86@hotmail.com

Fecha de recepción: 25/04/2017

Fecha de aprobación: 30/06/2017



LABORATORIO  
EN HEMATOLOGÍA

HEMATOLOGÍA  
Volumen 21 n° 2: 222-226  
Mayo - Agosto 2017

**Palabras claves:** Síndrome metabólico  
Hiperreactividad plaquetaria  
Agregometría por transmisión de luz

**Keywords:** Metabolic syndrome  
Platelet hyperreactivity  
Light transmission aggregometry

## Resumen

En ciertas patologías como la enfermedad coronaria, diabetes, síndrome metabólico y síndrome de la plaqueta pegajosa congénita, las plaquetas tenderían a desarrollar hiperactividad, pudiendo aumentar así el riesgo, asociado a otros factores, de desarrollar un proceso trombótico. El aumento de reactividad puede ser evaluado mediante agregometría, utilizando agonistas (ADP y epinefrina) en concentraciones sub-umbrales (sub-agregantes).

## Abstract.

In certain pathologies such as coronary disease, diabetes, metabolic syndrome, congenital sticky platelet syndrome, platelets would develop hyperactivity, that could increase the risk, associated with other factors, for thrombotic complications. Increased reactivity could be assessed by light transmission aggregometry, using ADP and epinephrine agonists at sub-aggregating or submaximal concentrations.

## Introducción

Habitualmente se denomina concentración umbral de un agonista de actividad plaquetaria a la mínima concentración del mismo que provoca una agregación irreversible con agregación secundaria visible en el caso de los agonistas débiles, ADP y epinefrina (EPI) y son los que habitualmente se usan en la práctica clínica<sup>(1)</sup>. El estudio de agregación con concentraciones sub-umbrales o sub-agregantes de agonistas tomaría relevancia en patologías (congénitas y adquiridas) donde se sospecha una sobre-activación plaquetaria que provoca hiperreactividad plaquetaria. En el síndrome metabólico (SM), enfermedad coronaria y diabetes tipo 2 (DM2), por ejemplo, las plaquetas pueden adquirir hiperreactividad debido a: un cambio en la composición lipídica de la membrana plaquetaria como consecuencia de un desbalance del metabolismo lipídico y glucémico, aumentando la producción de ácido araquidónico (AA) y de tromboxano A (TxA2), que son sustancias pro-agregantes endógenas; puede haber también un aumento en la expresión de la glicoproteína IIb/IIIa, posibilitando más sitios para la interacción fibrinógeno-plaqueta. La insulino-resistencia es otra de las causas de hiperreactividad en el SM y DM2, ya que la reactividad plaquetaria también está regulada por la insulina actuando como antagonista de la activación mediante el aumento de expresión de receptores de prostaglandinas. Al adquirir la plaqueta resistencia a la insulina disminuye el número de receptores y la posibilidad de unión a prostaglandinas (PG); según la bibliografía, en estas patologías las plaquetas también pueden adquirir resistencia a PG y óxido nítrico (ON), que son sustancias antia-

gregantes secretadas por el endotelio<sup>(2-4)</sup>.

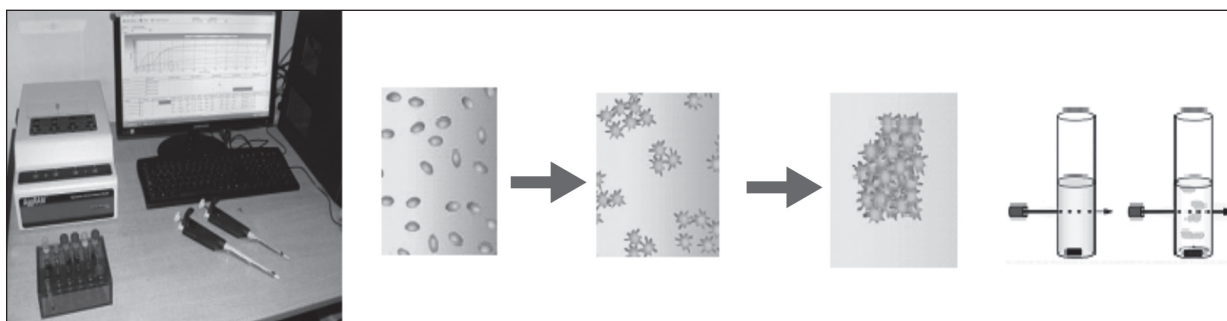
La hiperagregación se considera como tal si el porcentaje de agregación máxima, obtenido mediante agregometría, supera el límite superior del valor de referencia para una determinada concentración del agonista<sup>(4,5)</sup>.

## Fundamento de la técnica de agregación plaquetaria

La densidad óptica de un plasma rico en plaquetas (PRP) disminuye a medida que las plaquetas forman agregados, el PRP se agita en una cubeta a 37 °C y ésta se sitúa entre un campo de luz y una fotocélula. Cuando un agonista se añade, las plaquetas se agregan y el aumento de la transmisión de luz es detectada por la célula fotoeléctrica.

La cantidad de luz que se transmite depende de la reactividad plaquetaria, siempre que se controlen todas las demás variables (por ejemplo, el recuento de plaquetas, la velocidad de mezcla y la temperatura). El PRP equivale a 0% de transmisión de luz y el plasma pobre en plaquetas (PPP) equivale a 100% (blanco de reacción). Se obtienen los porcentajes de agregación máxima para cada agonista a una determinada concentración.

La densidad óptica o transmisión de luz se registra conectando una interfase al agregómetro y utilizando un *software* que muestra los resultados en forma de gráfico de % de transmitancia en función del tiempo. El porcentaje de agregación máxima se calcula como la relación entre el porcentaje de transmitancia máxima (diferencia entre transmitancia máxima y la línea de base) del PRP/PPP x 100.



## Materiales y método

### Etapa pre-analítica:

- Previo ayuno de al menos 4 h de comidas grasas, lácteos, café.
- Tener en cuenta si el paciente es fumador, ya que esto podría ser causa de aumento de reactividad plaquetaria.

- No haber consumido aspirina u otros AINES durante los últimos 10 días, antiagregantes plaquetarios (también hay otras drogas como antibióticos o beta bloqueantes que pueden interferir con la función plaquetaria).
- Obtener la sangre por punción venosa y recolectar en tubo de citrato al 3,2 % (proporción 1 parte de citrato y 9 de sangre).
- Las muestras de sangre deben ser procesadas dentro de las 4 h de la extracción y almacenadas a temperatura ambiente (el frío puede activar las plaquetas).
- Preparación del PRP: centrifugar los tubos a 150-180 g durante 10 minutos, en un tubo plástico preparar un *pool* con los PRP de los 4 tubos y mantener tapado el mismo para evitar contaminaciones o cambios de pH (la agregación debe desarrollarse a pH fisiológico), ajustar el PRP entre 200-400 mil plaquetas/mL, contando las mismas en contador hematológico.

Nota: evitar centrifugaciones adicionales para ajustar el PRP y diluciones con PPP, ya que pueden activar las plaquetas.

- Verificar la concentración de fibrinógeno antes de realizar la prueba de agregación (las plaquetas sólo agregan si la concentración de fibrinógeno es adecuada).
- Preparación del PPP: luego de separar el PRP, volver a centrifugar el plasma restante en los tubos a 1500 g durante 15 minutos y verificar el conteo de plaquetas en contador hematológico (menor a 10.000/mL).

Las concentraciones de los agonistas a utilizar recomendadas para estudiar pacientes con síndrome metabólico son<sup>(2)</sup>:

Concentración de agonistas		
Tubo	ADP (uM)	Epinefrina (uM)
A	2.34	11.1
B	1.17	1.11
C	0.58	0.55

Las concentraciones representan la concentración final del agonista en la cubeta de reacción.

**Etapa analítica:**

Volúmenes a utilizar en el agregómetro Agg Ram (Helena Laboratories):

Blanco de reacción	
PPP (sin imán)	250 uL

Paciente	
PRP (con imán)	225 uL
AGONISTA	25 uL
Velocidad de mezcla	600 rpm

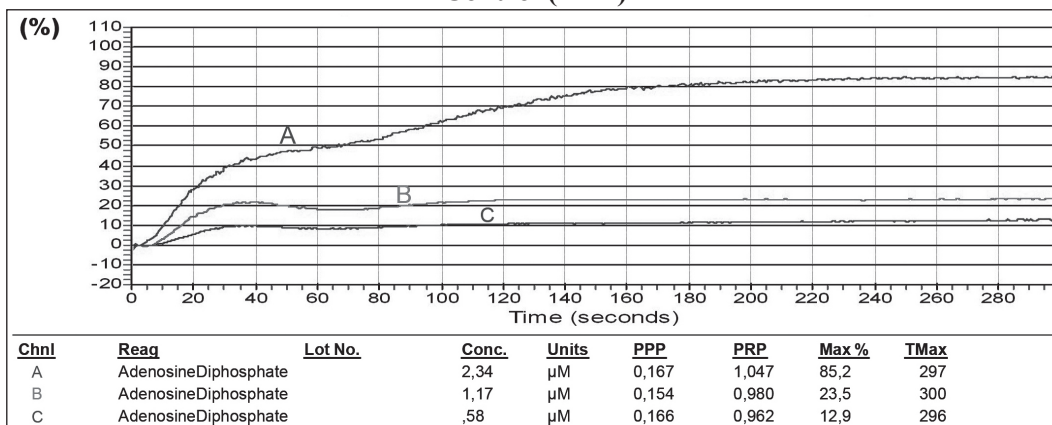
Realizar autoagregación: PRP 250 uL (con imán, tiempo de corrida 20 minutos).

(Mediante esta prueba se evalúa la reactividad plaquetaria en ausencia de agonistas)

- Control de la técnica: procesar en paralelo un PRP de un individuo control.
- Se obtienen los porcentajes de agregación máxima para cada concentración de agonista.

En la **figura 1** (2 gráficos) se observa un ejemplo de la corrida a 3 concentraciones de ADP para un control y un paciente con SM e hiperreactividad plaquetaria; en la **figura 2** (2 gráficos) se observa la corrida a 3 concentraciones de epinefrina para los mismos sujetos.

**Control (ADP)**



**SM (ADP)**

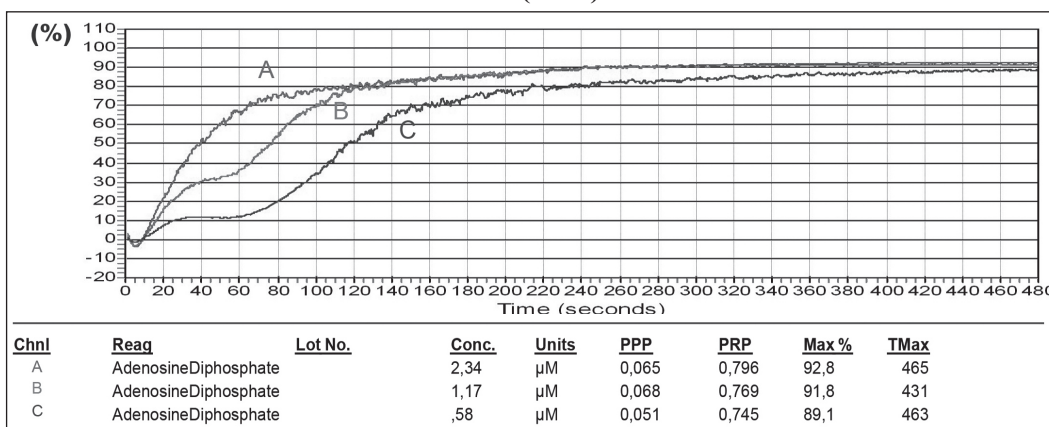
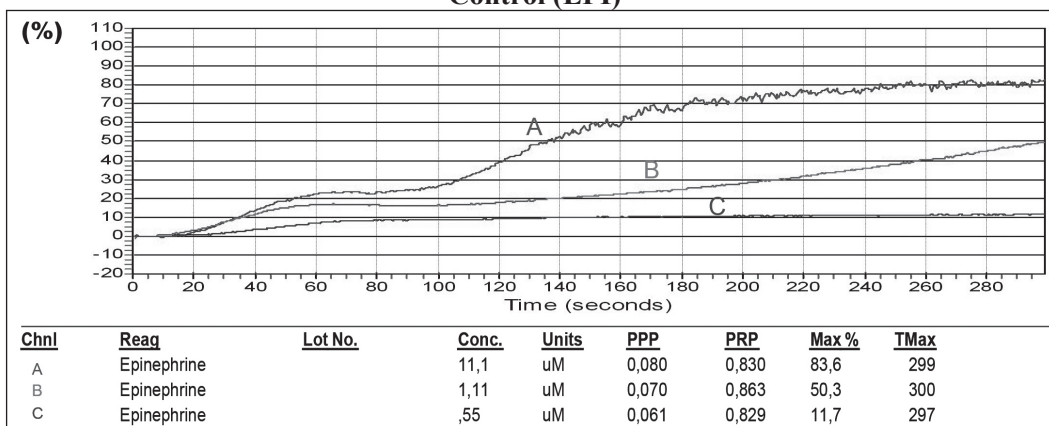


Figura 1. Agregación a concentraciones sub-umbrales de ADP

**Control (EPI)**



**SM (EPI)**

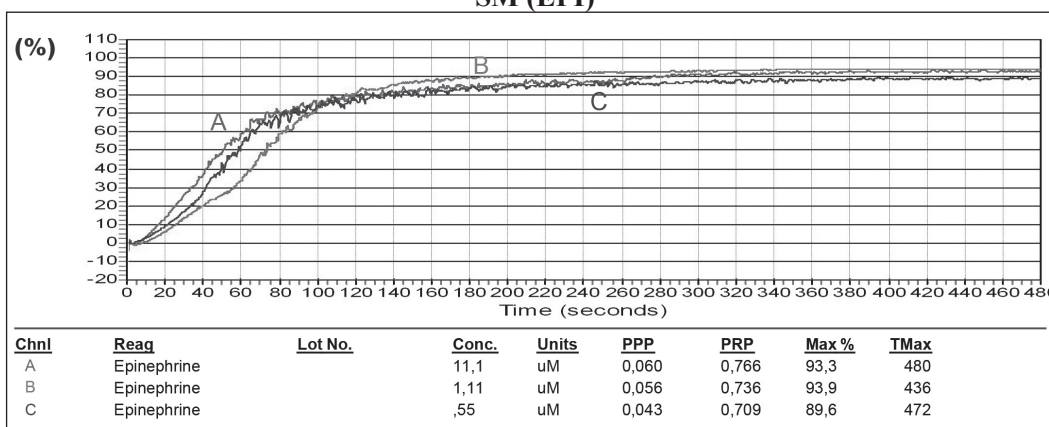


Figura 2. Agregación a concentraciones sub umbrales de epinefrina (EPI)

**Rangos de referencia<sup>(2-4)</sup>:**

**Epinefrina:** 11.1 uM (39-80 %), 1.11 uM (15-27 %), 0.55 uM (9-20 %)

**ADP:** 2.34 uM (7.5-55 %), 1.17 uM (2-36 %), 0.58 uM (0-12 %)

**Autoagregación: 0-20%**

NOTA 1: de encontrarse hiperagregabilidad frente a uno o ambos agonistas, ésta debe ser confirmada luego de un tiempo en por lo menos 2 ocasiones (en algunos trabajos consideran repetir el estudio luego de 30 días).

Habitualmente, en un control normal se observa reversibilidad en la segunda ola de ADP con concentraciones menores a 1 uM.

La hiperreactividad frente a epinefrina también ha sido definida como > 60% de la máxima amplitud frente a epinefrina 0.4 uM. La probabilidad de presentar hiperreactividad frente a ADP 1 uM cuando existe frente a EPI 0.4 uM alcanza un OR de 36 (14-95)<sup>(5)</sup>. En otras circunstancias, como en el caso de artritis autoinmune, la hiperreactividad sólo se evidencia con concentraciones subumbrales de ADP<sup>(6)</sup>. Por lo tanto el análisis de ambos agonistas es lo recomendado.

NOTA 2: previamente al estudio de hiperfunción se debe realizar el estudio de agregación plaquetaria con agonistas en concentraciones umbrales habituales (agregantes); por ejemplo: ADP 5 uM, colágeno 2 ug/mL, epinefrina 50 uM, ácido araquidónico 500 ug/mL; con esto se descartan interferencias por aspirina u otros antiagregantes plaquetarios, o un eventual trastorno de hipofunción, en cualquiera de estos casos queda invalidado el estudio de hiperfunción.

### Utilidad clínica

Está cuestionada, ya que lo que se observó en distintos trabajos es que hay un aumento de reactividad a epinefrina (uno de los agonistas más utilizados) relacionado a un polimorfismo (C825T) en una cantidad considerable de sujetos sanos que muestran hiperagregabilidad con esta técnica, sin que ello sugiera un riesgo de trombosis. No obstante, en el consenso realizado por la International Society of Thrombosis and Haemostasis, a través de la revisión de la literatura y opinión de expertos, se ha concluido que la agregación plaquetaria por transmisión de luz no debería ser utilizada para este propósito en la clínica, salvo a nivel de investigación<sup>(7)</sup>.

En conclusión, este estudio podría tomar relevancia en pacientes de riesgo como obesos, con patología cardiovascular, diabéticos, en pacientes jóvenes con eventos tromboticos sin factores de riesgo clásicos o trombofilicos, con sospecha de alteración congénita como síndrome de plaquetas pegajosas, en pacientes con fracaso en la terapia con anticoagulantes/antiagregantes (recordar que el estudio no es válido si el paciente se encuentra antiagregado) o para evaluar un cambio en la terapéutica o prevención, por ejemplo, en pacientes con síndrome metabólico<sup>(2,3,8)</sup>.

### Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

### Bibliografía

1. Scazzioti A, Bermejo E, Vizcarguenaga MI. Agregación plaquetaria. Blanco A, Kordich L Editoras. Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia. Grupo CATH. 2da Edición, 2012: 199-204.
2. Perez-Campos-Mayoral L, Pérez-Campos E, Zenteno E, Majluf-Cruz A, Perez-Ortega E, Matias-Pérez D, Rodal-Canales FJ, Martínez-Cruz R, Pina-Canseco S, Reyes Franco MA, Mayoral Andrade G, Hernández P, Gallegos B. Better detection of platelet aggregation in patients with metabolic syndrome using epinephrine and ADP. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2014, 6:93-99.
3. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Cruz-Cruz D, Reyes-Aulis MB. Primary thrombophilia in México III. A prospective study of the sticky platelet syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2002; 8(3):273-277.
4. Yee DL, Sun CW, Bergeron AL, Dong JF, Bray PF. Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals. *Blood*. 2005; 106: 2723-9.
5. Yee DL, Bergeron AL, Sun CW, Dong J-F, Bray PF. Platelet hyperreactivity generalizes to multiple forms of stimulation. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 2043-50.
6. Mac Mullan PA, Peace AJ, Madigan AM, Tedesco AF, Kenny D, McCarthy GM. Platelet hyperreactivity in active inflammatory arthritis is unique to the adenosine diphosphate pathway: a novel finding and potential therapeutic target. *Rheumatology*. 2010;49:240-245.
7. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, Nurden P, Rao AK, Schmaier AH, Watson SP, Lussana F, Pugliano MT, Michelson AD. 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: 1183-9.
8. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Camacho-Alarcón C, Reyes-Nuñez V, Moncada-González B, Valdés-Tapia P, León-Montes N, Ruiz-Delgado G. Primary thrombophilia in Mexico IX: The Glycoprotein IIIa PLA1/A2 Polymorphism is not Associated with the Sticky Platelet Syndrome Phenotype. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2012; 19 689-692.