

Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria

Víctor Huggo Córdova Pluma,* Pablo Vargas Viveros,** César Vega,*** Medardo Quintero,***
Rafael Hurtado Monroy****

RESUMEN

La función plaquetaria y su homeostasis resultan claves en diferentes momentos de las enfermedades crónicas y ante urgencias médico-quirúrgicas. Los medios tecnológicos mediante los cuales podemos conocer su actuar se han modificado en los últimos años, sin ser complejos ni de un alto costo económico. Su principal obstáculo para convertirse en instrumentos de uso frecuente para los médicos es su correcta interpretación; todos ellos se basan en la fisiología elemental. En esta revisión se presentan argumentos didácticos que permiten comprender mejor la traducción directa de su fisiopatología para su aplicación directa.

Palabras clave: agregometría, plaquetas, disfunción plaquetaria, citometría de flujo, tiempo de sangrado.

ABSTRACT

The platelet function and its homeostasis are the key at different times of chronic illnesses and undisputably in the presence of medicosurgical emergencies. The technological media through which we can get to how these act has been modified in the last years without these being complex and of a high economic cost, their main obstacle to become frequently used instruments for doctors is their correct interpretation, all of them are based in the elemental physiology. In this review we present didactic arguments that allow us to better understand the direct translation of their physiopathology for their direct application.

Key words: aggregometry, platelets, platelets disfunction, cytometrics flow, bleeding time.

Las plaquetas son células sanguíneas que tienen un papel central en la hemostasia normal, en la trombosis, en varios trastornos hemorrágicos y en algunos eventos tromboticos hereditarios o adquiridos. Es, por lo tanto, indispensable la comprensión y el estudio

minucioso de la función plaquetaria para identificar los diferentes grados y tipos de disfunción o hiperfunción de las plaquetas y para la vigilancia de la efectividad de los tratamientos antiplaquetarios modernos.

La historia del estudio de la función plaquetaria se remonta a más de 100 años, cuando las plaquetas se identificaron como células circulantes de características únicas con participación clave en la hemostasia y la trombosis;¹ sin embargo, a pesar de esta descripción temprana, en la mayor parte del siglo XX solo se dispuso del conteo manual de plaquetas, observación de su morfología en el frotis de sangre periférica y el tiempo de sangrado. Uno de los principales problemas en el estudio de la función plaquetaria es la dificultad para simular la hemostasia *in vitro* ya que las plaquetas son sensibles a la manipulación y se activan de manera artificiosa en los tubos de vidrio. La mejor comprensión de la fisiología de la hemostasia y la coagulación facilitó el desarrollo de un método de medición objetiva y de mayor exactitud de la función de las plaquetas: la agregometría plaquetaria.²

* Jefe de posgrado de la Facultad Mexicana de Medicina.
** Departamento de Hematología del Hospital Ángeles del Pedregal Ciudad de México.
*** Departamento de Medicina Interna del Hospital Ángeles del Pedregal Ciudad de México.
**** Jefe de Hematología del Hospital Ángeles del Pedregal, Ciudad de México.

Recibido: 24 de septiembre, 2010. Aceptado: diciembre, 2010.

Este artículo debe citarse como: Córdova-Pluma VH, Vargas-Viveros P, Vega C, Quintero M, Hurtado-Monroy R. Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. Med Int Mex 2011;27(1):58-74.

www.nietoeditores.com.mx

Origen y estructura plaquetaria

Las plaquetas son las células sanguíneas de menor tamaño y tienen varias características que las distinguen de otras células: 1) Las plaquetas se derivan de los megacariocitos a través de un proceso endomitótico, más que por duplicación celular directa.³ 2) El desarrollo de las plaquetas se realiza de manera predominante bajo el control de la trombopoyetina que, a diferencia de la eritropoyetina, se sintetiza en órganos diferentes al riñón e hígado, como el músculo liso y la médula ósea. La trombopoyetina se elimina por las plaquetas, por lo que la disminución en el número de estas aumenta las concentraciones de trombopoyetina circulante.⁴ 3) Las plaquetas son células anucleadas con forma discoidea de aproximadamente $0.5 \times 3.0 \mu\text{m}$. Los principales organelos que contienen son mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, gránulos (cuerpos) alfa y gránulos densos. Los gránulos alfa contienen gran número de factores que intervienen en la coagulación, como selectina P, factor V, factor VIII, factor de von Willebrand, trombospondina, fibronectina, fibrinógeno, β -tromboglobulina, factor plaquetario 4 y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés). Los gránulos densos almacenan adenosin difosfato (ADP), calcio y serotonina. El citoplasma puede contener otras sustancias, como: serotonina, epinefrina, norepinefrina, óxido nítrico y citocinas.⁵ (Figura 1)

Las plaquetas participan en la hemostasia y la trombosis por adherencia al endotelio vascular dañado. Su interacción con el ambiente y con otras plaquetas representa procesos complejos que se inician en la superficie de la membrana plaquetaria, por lo que ésta proporciona una interfase reactiva entre las plaquetas y su medio externo mediante receptores en la superficie, decisivos en la transducción de señales y los estímulos externos al interior de la plaqueta.⁶

La activación plaquetaria se lleva a cabo mediante la interacción entre los diferentes receptores de membrana y un gran número de moléculas pequeñas, enzimas y complejos proteicos macromoleculares que inducen contracción del citoesqueleto de la plaqueta. El cambio en su forma discoide a la forma esférica con extensiones (pseudópodos) que facilitan la adhesión con el endotelio y entre otras células, la interacción con otras plaquetas y liberación del contenido de sus gránulos.⁶ Son varios los estímulos responsables de la secuencia de eventos que conducen a la activación plaquetaria e incluyen: trombina, tripsina, colágena, ADP, epinefrina, metabolitos del ácido araquidónico, factor activador de plaquetas y epinefrina. Algunos de los principales receptores plaquetarios de membrana son los siguientes:

Receptores de ADP: el adenosin difosfato juega un papel central en la hemostasia al actuar como cofactor esencial de la activación plaquetaria. El ADP está presente

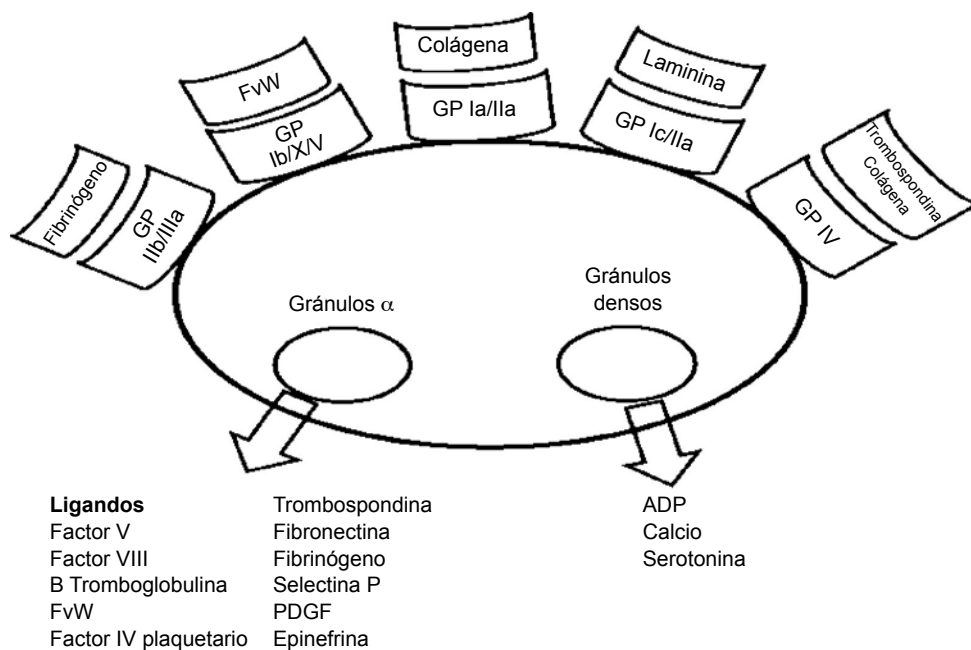


Figura 1. Principales receptores y ligandos de las plaquetas.

en altas concentraciones en los gránulos densos y se libera por activación plaquetaria y ejerce un reforzamiento para la agregación plaquetaria.⁷

Receptores de epinefrina: la estimulación plaquetaria por epinefrina ocurre sin cambios en la forma de la plaqueta y está mediada por receptores α_2 -adrenérgicos. Hay estudios farmacológicos que sugieren que se expresan aproximadamente 300 receptores de este tipo en cada plaqueta.⁶

Receptores de serotonina: la serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT) es otra molécula pequeña capaz de estimular y activar a las plaquetas. Las plaquetas activas liberan serotonina de los gránulos densos, lo que amplifica la respuesta plaquetaria a través de receptores específicos 5-HT_{2A}.⁸

Receptores de tromboxano A₂: diversos agonistas de la activación plaquetaria generan señales para la activación de fosfolipasa A₂, que separa al ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana, el cual se metaboliza en sustancias activas en las plaquetas e incluyen a los tromboxanos (TX) y su precursor PGH₂, que estimula el cambio de forma, la secreción y la agregación plaquetaria. De estos, el TX A₂ es el de mayor potencia y reconoce receptores específicos en las plaquetas.⁹

Receptores de vasopresina: la vasopresina interactúa con las plaquetas para inducir cambios de forma, secreción de los gránulos y agregación.

Receptor del factor activador de plaquetas (FAP): es único entre los agonistas plaquetarios porque es el único fosfolípido que estimula las plaquetas en concentraciones nanomolares. Este agonista se sintetiza por varias células inflamatorias y las propias plaquetas e induce cambios de forma, secreción y agregación.¹⁰

Receptores de trombina: la trombina es uno de los más potentes activadores de plaquetas.

Receptores de colágena: varias proteínas de la membrana plaquetaria participan en la activación y adhesión que induce la colágena: GP Ia-IIa, GP IV, GP VI y GP V.¹¹

Receptores para la adhesión plaquetaria: la participación de las glucoproteínas (GP) de la superficie de la membrana es crítica para la adhesión de las plaquetas al subendotelio expuesto (colágena, fibronectina y factor de von Willebrand) y para la interacción con otras plaquetas y componentes de la sangre (fibrinógeno y factor de von Willebrand). Se enumeran de la I (de mayor tamaño) a la IX (más pequeña).¹² Pertenecen a la familia de las integri-

nas, que son complejos proteicos heterodiméricos α/β .¹³ La glucoproteína más abundante es la IIb/IIIa (α IIb/ β_3), que es la responsable de la unión al fibrinógeno, colágena, protrombina, factor de von Willebrand, trombospondina y vitronectina, y principal promotor de la agregación plaquetaria.¹⁴ El complejo GP Ib-IX-V es el segundo receptor plaquetario más abundante y participa principalmente en la adhesión plaquetaria al subendotelio mediante la unión al factor de von Willebrand (FvW).¹⁵ También promueve la unión a la trombina y facilita la activación de otras plaquetas.

Función plaquetaria

La hemostasia primaria es el proceso inicial de la coagulación y tiene el objeto de crear un tapón plaquetario en respuesta a daño al endotelio vascular y consiste en tres fases: adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria. En condiciones normales, las plaquetas no tienen contacto con la matriz de tejido conectivo del subendotelio vascular. Cuando se rompe la integridad endotelial, se exponen fibras de colágena, FvW y otras proteínas de la matriz subendotelial,¹⁶ y es la interacción de las plaquetas con estas sustancias la que proporciona la superficie para la adhesión plaquetaria y sirve como un fuerte estímulo para la activación de las plaquetas. En condiciones de gran fricción por flujo sanguíneo (arterias y capilares), esta interacción consiste de manera primordial en la unión de la GP Ib al FvW, que se adhiere a la colágena subendotelial.^{17,18} En condiciones de baja fricción, la GP Ia/IIa puede unirse de manera directa a la colágena.

La unión de los receptores de la superficie de las plaquetas a sus ligandos activa varias reacciones bioquímicas en cascadas de señalización intracelular a través de segundos mensajeros, como las tirosina cinasas, el calcio, la fosfolipasa C, el fosfoinositol 3 cinasa y el AMP cíclico, entre otros.¹⁹ Esta señalización produce cuatro cambios mayores en las plaquetas:

1. El rearreglo del citoesqueleto de actina causa aplanamiento de las plaquetas y extensión de pseudópodos (filópodos y lamelópodos) para sellar el defecto endotelial.²⁰
2. La activación de la fosfolipasa A₂ libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y se convierte en prostaglandinas y tromboxano A₂ (TXA),⁹ que, además, aumenta la vasoconstricción e inducen un taponamiento local

3. Los gránulos intracelulares se unen con el sistema canalicular abierto de la membrana y liberan su contenido en el plasma circundante. Los gránulos densos liberan ADP y serotonina, entre otras sustancias, que interactúan con los receptores celulares de superficie de otras plaquetas, amplificando la activación y estimulando la agregación.^{16, 21}
4. La activación plaquetaria conduce a un incremento en la concentración de GP IIb/IIIa en la membrana e induce cambios en su conformación, lo que permite su unión a fibrinógeno soluble y agregación de las plaquetas¹⁴ También se efectúa la activación plaquetaria por la trombina y la epinefrina circulantes, cuyos efectos se realizan a través de receptores específicos. La agregación plaquetaria se regula de manera primaria por la unión de GP IIb/IIIa a fibrinógeno y en menor medida a FvW y fibronectina²² y puesto que estas moléculas son polivalentes, pueden fungir como unión entre varias plaquetas a la vez. Esta unión plaqueta-fibrinógeno-plaqueta inicia el proceso de agregación del coágulo de plaquetas. Una vez que se forma el coágulo de plaquetas se estabiliza mediante el desarrollo de una red circundante de fibrina a través de la cascada de la coagulación, proceso que se inicia de manera simultánea con la activación de las plaquetas. Además, las plaquetas juegan una función decisiva en la activación y regulación del proceso de la coagulación. Las membranas de las plaquetas activadas contienen el fosfolípido fosfatidilserina en concentración abundante, que funciona como cofactor para la unión y activación de los factores de la coagulación. También, las plaquetas son fuente de factores de coagulación que se secretan de los gránulos alfa y de calcio de los gránulos densos. Por último, el factor Va unido a plaquetas se mantiene en relativa "protección" para no ser desactivado por el complejo proteína C/S.^{16, 23}

Agregometría plaquetaria

La medición de la agregación de las plaquetas o agregometría plaquetaria fue descrita en 1962 por Born²⁴ como una técnica para estimar la cinética de la agregación de las plaquetas por medio de turbidometría (medición de la turbidez o densidad óptica). El método se convirtió de manera rápida en el patrón de referencia para el estudio de la función plaquetaria.

En la actualidad existen dos métodos diferentes para el estudio de la agregación plaquetaria: el método óptico original con plasma rico en plaquetas (PRP) y el método de impedancia con sangre completa.

Agregación de plasma rico en plaquetas por método óptico

Este estudio mide en tiempo real la agregación de las plaquetas en una muestra de PRP mediante aclaramiento óptico. Esta prueba requiere un agregómetro (espectrofotómetro) en el que se deposita la muestra de PRP en un recipiente o cubeta de incubación a 37°C, que se encuentra entre una fuente de luz y una fotocelda de medición que calcula la densidad óptica o turbidez del PRP. La preparación del PRP requiere la separación de los eritrocitos y leucocitos del plasma y las plaquetas en una muestra de sangre completa, mediante centrifugación lenta (1000 rpm) durante 15 minutos. También se requiere la preparación de una muestra de plasma pobre en plaquetas (PPP), que se obtiene por centrifugación rápida (3000 rpm). La calibración de la transmisión de la luz a través del PPP (plasma claro) se ajusta al 100%; la transmisión de luz a través del PRP (plasma turbio u opaco) entonces se ajusta a 0%.²⁵ (Figura 2)

Después, se agrega una de varias sustancias conocidas por su efecto agonista sobre las plaquetas, con la finalidad de inducir agregación de las plaquetas y simular *in vitro* lo que sucede *in vivo*. En un estudio de rutina se incluyen: epinefrina, ADP, colágena, ácido araquidónico, trombina y ristocetina (un antibiótico que estimula la agregación por aumento de la unión de FvW a la GP Ib). Mientras se

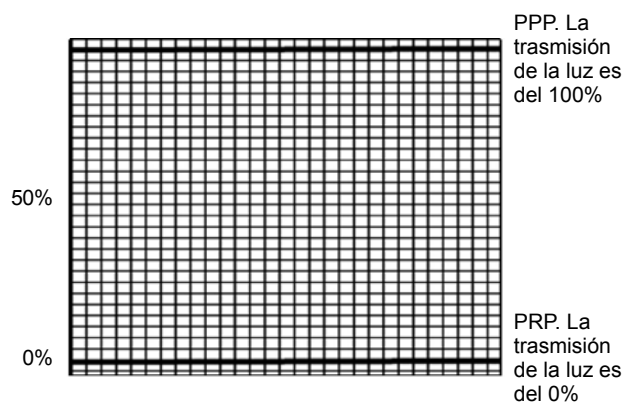


Figura 2. Calibración y gráfica de la transmisión de la luz con PRP y PPP.

realiza este proceso, la luz pasa a través de la cubeta con el PRP y se captura por el detector o fotocelda en el lado opuesto. Conforme las plaquetas se agregan en respuesta al agonista, el PRP se aclara y se transmite mayor cantidad de luz. La transmisión de la luz se mide en tiempo real y se grafica el porcentaje del aclaramiento de la muestra; a mayor agregación plaquetaria, mayor transmisión de la luz y viceversa.²⁵ (Figura 3)

Su graficación genera una curva de la agregación plaquetaria en porcentaje y tiempo. Se debe estudiar un agente agregante (agonista) a la vez. Los agonistas que comúnmente se utilizan son ADP, epinefrina, colágena y ristocetina; es común que en algunos centros se utilice al ácido araquidónico y serotonina como agentes agregantes; sin embargo, el último ha caído en desuso. La curva típica de la agregación plaquetaria tiene cinco fases distintas con dos curvas. (Figura 4)^{25, 26}

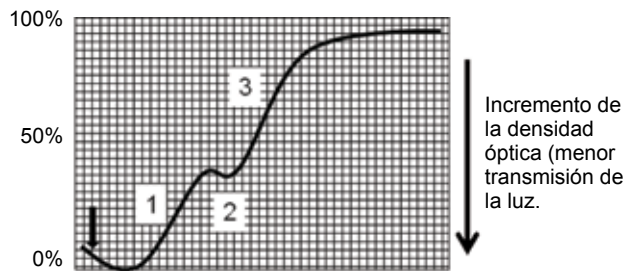


Figura 4. Curva típica de la agregación plaquetaria en PRP con epinefrina o ADP. La flecha indica la dilución del PRP al agregar el agobiata. El número 1 agregación primaria, el número 2 meseta y número 3 agregación secundaria.

1. Incremento inicial de la transmisión de la luz atribuible a dilución del PRP por el agonista que añade.
2. Discreta disminución de la transmisión conforme las plaquetas cambian de forma.

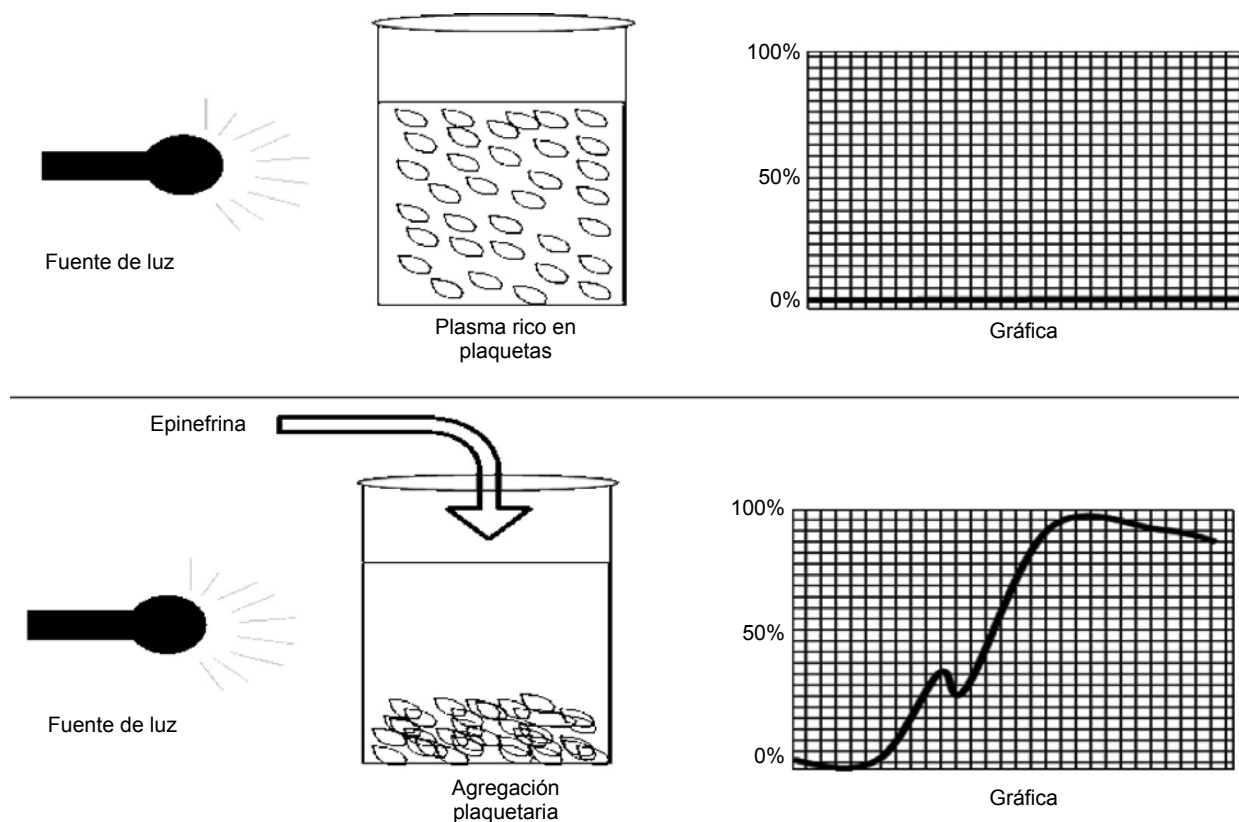


Figura 3. Esquema de la agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas. En la figura superior se ejemplifica la falta de trasmisión de la luz a través del plasma turbio. En la figura inferior se induce agregación plaquetaria con la adición de un agonista (epinefrina); por eso se agregan las plaquetas y permiten el paso de la luz y se grafica en porcentaje.

3. Incremento agudo inicial de la transmisión conforme las plaquetas se agregan (agregación primaria).
4. Meseta breve o disminución de la agregación.
5. Agregación secundaria que se estimula por la secreción de los gránulos plaquetarios.
6. En la mayoría de los individuos esta respuesta bifásica se observa con concentraciones bajas de ADP y epinefrina. Las curvas que se generan con otros agonistas (colágena, ristocetina) son típicamente unimodales con una sola curva. (Figura 5)

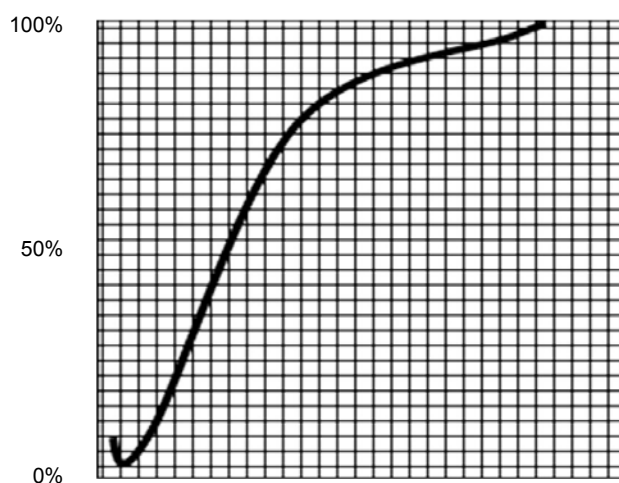


Figura 5. Curva monofásica en agregometría con colágena o ristocetina.

Este método tiene varias limitaciones inherentes; consume tiempo, es laborioso y complejo, por lo que se requiere un equipo humano bien adiestrado y con experiencia en la realización de la técnica. La interpretación de los resultados también requiere experiencia y conocimiento de la técnica y fisiología y fisiopatología de la hemostasia y la coagulación. La muestra debe obtenerse por punción venosa directa y se colecta en tubos con anticoagulante a base de citrato (tubos para tiempos de coagulación con tapón de color lila). La prueba se debe realizar en las tres horas después de obtener la muestra. La centrifugación puede dañar o activar las plaquetas y no se debe realizar en muestras hemolizadas, lipémicas o con contaminación por eritrocitos.^{27, 28}

La agregometría en PRP es sensible a la cifra de plaquetas. Como en otros estudios de la función plaquetaria, la trombocitopenia menor de $100 \times 10^9/L$ o la trombocitosis mayor de $400 \times 10^9/L$ pueden alterar los resultados y se debe tener en cuenta para su interpretación. En el caso de la cifra de plaquetas $> 400 \times 10^9/L$ se recomienda diluir la muestra con PPP (aproximadamente a $200 \times 10^9/L$).²⁷ Este ajuste, sin embargo, agrega una variable adicional, ya que el PPP contiene nucleótidos de adenina que pueden inhibir la agregación plaquetaria por ADP o colágena.²⁹

Las dosis de los agentes agregantes pueden variar en los diferentes centros. Las dosis estandarizadas son las siguientes: la epinefrina, por lo regular, se utiliza en dos dosis, la dosis alta en concentración de 2.5×10^{-5} y la dosis baja en concentración de 2.5×10^{-6} . De manera similar, el ADP también se utiliza en dos concentraciones, la dosis alta en concentración de 2.0×10^{-5} y la dosis baja de 2.5×10^{-6} ; la colágena se utiliza en concentración final de 0.19 mg/mL; ristocetina en concentración de 1.25 mg/mL y ácido araquidónico en concentración de 0.5 mg/mL.³⁰ Los valores normales de la agregación plaquetaria con los diferentes agonistas se describen en el Cuadro 1 y los patrones normales de las curvas con cada agonista de manera individual se muestran en la Figura 6.

Agregometría en sangre completa por método de impedancia

En 1980, Cardinal y Flower³¹ desarrollaron un método por el que la agregación plaquetaria se puede medir en sangre completa mediante impedancia eléctrica, en donde se coloca una muestra de sangre en una cubeta o recipiente a 37°C, se colocan dos electrodos de platino a distancia fija y entre los electrodos se aplica una corriente eléctrica.³² La adición de un agonista (ADP, epinefrina, colágena o ristocetina) estimula la agregación de las plaquetas en la superficie de los electrodos, lo que impide el flujo

Cuadro 1. Valores normales de agregación plaquetaria según cada agonista

Agonista	Concentración	Agregación (%)
ADP	5 μM	68-88
	10 μM	71-88
Acido araquidónico	0.5 mM	74-99
Colágena	2 $\mu g/mL$	70-94
Epinefrina	5 μM	78-88
Ristocetina	1.25 mg/mL	87-102

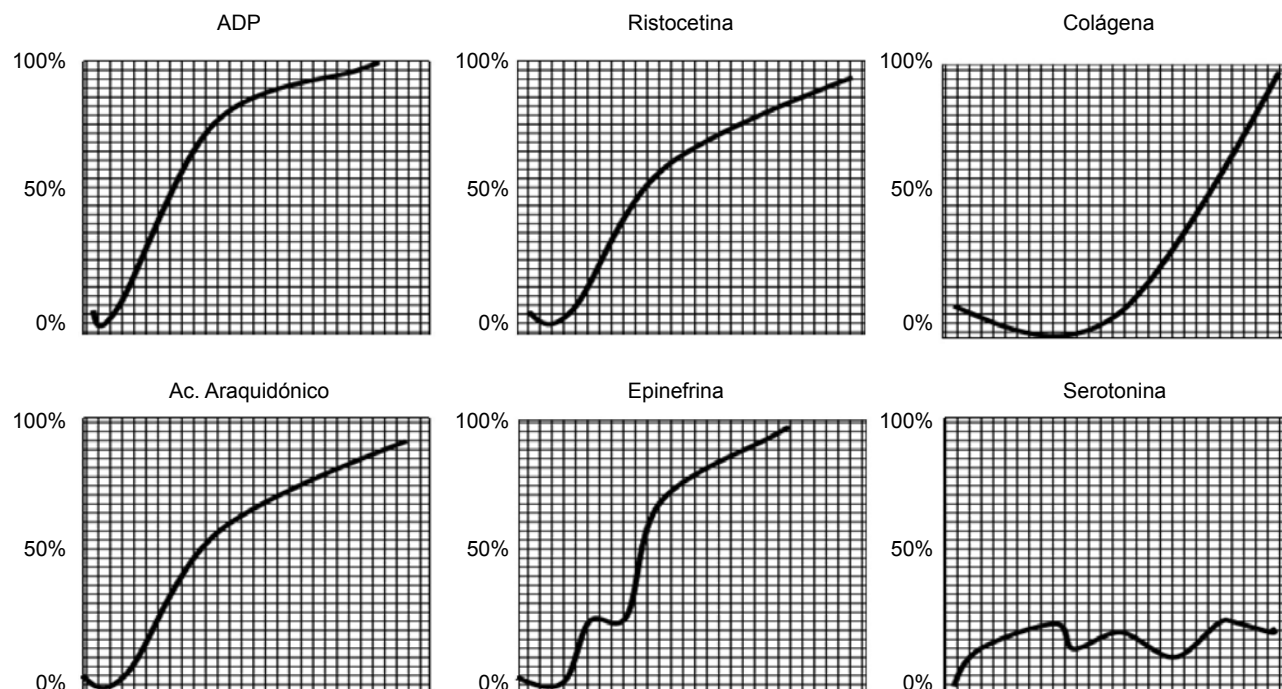


Figura 6. Curvas normales de agregometría plaquetaria en PRP con espectrofotometría.

de la corriente eléctrica. El aumento en la resistencia al flujo de electricidad es proporcional a la agregación de las plaquetas en torno a los electrodos y se genera una curva de agregación.³³ Este método elimina varias de las variables confusas en la preparación de PRP, ya que no se requiere, además de ser más simple y fácil de realizar. En estudios comparativos se reporta que esta técnica proporciona resultados similares a los que se obtienen con el método clásico (turbidimétrico) y que es superior para vigilar tratamientos antiplaquetarios y en el diagnóstico y seguimiento de estados de hiperactividad plaquetaria (por ejemplo: síndrome de la plaqueta pegajosa).³⁴⁻³⁷

Al igual que la agregometría convencional, la agregación por impedancia en sangre completa es relativamente insensible a la presencia de agregados de plaquetas. Este examen también requiere de técnicos expertos y es significativamente más costoso.

Agregometría plaquetaria en la práctica clínica

La utilidad de estos estudios es muy amplia; sin embargo, hay que destacar que los resultados no son específicos de algún trastorno en particular y que, por el contrario, puede haber sobreposición de entidades

con un mismo patrón de agregación plaquetaria. Por lo anterior, se requiere el conocimiento amplio de todas las variables que intervienen en el desarrollo de la prueba y los resultados posibles.

La agregometría plaquetaria no se debe utilizar como estudio general sin una indicación o sospecha específica. Ante una trombocitopenia menor a $100 \times 10^9/L$, la agregometría plaquetaria no dará resultados válidos o confiables y se deberá esperar hasta tener una cifra de plaquetas mayor para realizar la prueba.³⁸

El estudio de los trastornos funcionales de las plaquetas se puede dividir de manera general en trastornos hereditarios o primarios y adquiridos o secundarios. Los defectos primarios de la función plaquetaria son muy raros; por el contrario, los trastornos adquiridos son muy comunes y se asocian con enfermedades frecuentes en la práctica clínica.³⁸ A continuación se describen los padecimientos más frecuentes y las gráficas de la agregometría plaquetaria correspondientes.

Disfunción plaquetaria primaria (hereditaria)

Síndrome de Bernard Soulier: es un trastorno hereditario autosómico de la adhesión plaquetaria, en el que las

plaquetas carecen de las glicoproteínas de membrana GP Ib, V y IX. Funcionalmente las plaquetas están impedidas para la unión con el FvW y, por tanto, no se lleva a cabo la adhesión plaquetaria. Las manifestaciones clínicas principales son sangrado fácil (al mínimo trauma), epistaxis, petequias, púrpura e hiperpolimenorrea.^{39,40,41} Los hallazgos de laboratorio muestran un patrón de adhesión alterado y agregación anormal con ristocetina (Figura 7); el frotis de sangre periférica contiene plaquetas gigantes y trombocitopenia leve en la mayoría, pero no en todos los pacientes.^{41,42} Si solo se estudia la adhesión plaquetaria y la agregación con ristocetina, se puede diagnosticar de manera equivocada como síndrome de Bernard Soulier a un paciente con enfermedad de von Willebrand. La diferencia solo se puede establecer al estudiar la actividad de coagulación del factor VIII (VIII:c), el factor VIII antigénico y la actividad del cofactor VIII: FvW.⁴³

Enfermedad de von Willebrand (EvW): es un trastorno variable del FvW, que puede ser cuantitativo o cualitativo y que fue descrito por primera vez en 1926 por Erik von Willebrand en Suecia.⁴⁴ La enfermedad de von Willebrand es la coagulopatía hereditaria más común en todo el mundo, con incidencia de 1 a 4%,⁴⁵ sin aparente predominio étnico o racial.⁴⁶ Esta enfermedad es el trastorno hemorrágico primario de mayor frecuencia e importancia clínica. Su

diagnóstico no siempre es sencillo y requiere tres criterios: antecedentes de hemorragia, disminución en la cantidad o alteración funcional del factor de von Willebrand y demostrar su patrón hereditario.⁴⁷ La presentación clínica es muy variable entre individuos pero por lo general es consistente entre familias y es característica la hemorragia “plaquetaria” (sangrado al mínimo traumatismo, hemorragia mucocutánea, menorragia). Los casos de enfermedad leve pueden estar asintomáticos, excepto en situaciones de reto hemostático (traumatismo o cirugía, incluso con procedimientos menores). Los casos severos pueden parecer clínicamente idénticos a la hemofilia.

El factor de von Willebrand se produce en las células endoteliales y en los megacariocitos; actúa mediante la unión a la colágena subendotelial a través de la adhesión con la GP Ib y GP IIb/IIIa de las plaquetas. También participa de manera crucial en la coagulación, al proteger al factor VIII:c de la degradación proteolítica de la proteína C, por lo que aumenta la vida media de factor VIII circulante.⁴⁸

La enfermedad de von Willebrand se puede dividir en tres tipos principales. El tipo 1 es una deficiencia cuantitativa de los multímeros de todos los tamaños del factor de von Willebrand; el tipo 2 consiste en déficit cualitativo y cuantitativo de los multímeros de alto peso

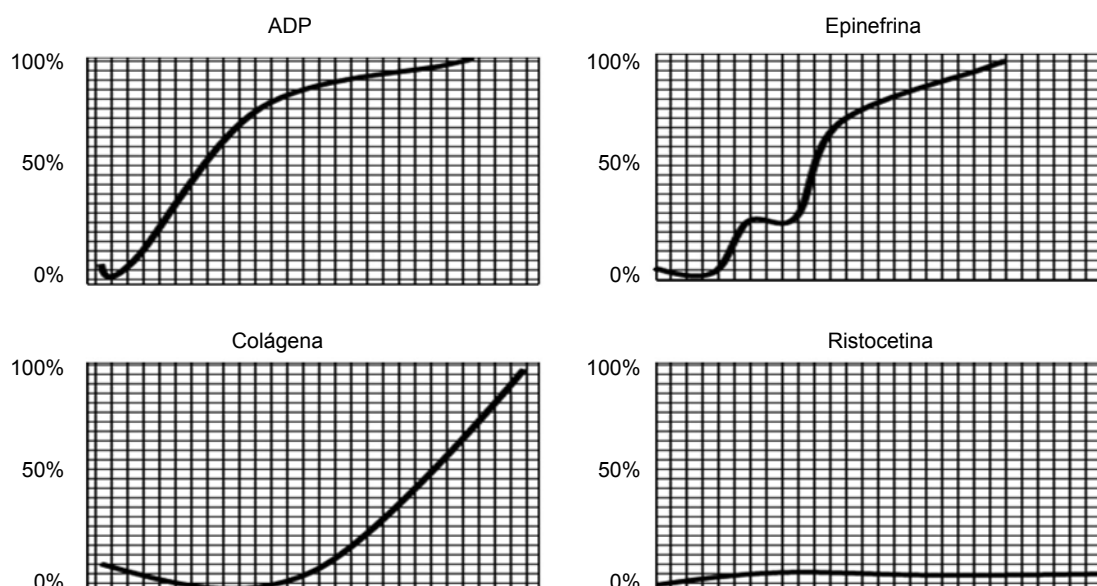


Figura 7. Agregometría de un paciente con síndrome de Bernard Soulier. La curva de la agregación con ristocetina también es característica de la enfermedad de von Willebrand.

molecular del factor de von Willebrand (en la mayoría de los subtipos) y el tipo 3 se caracteriza por la ausencia casi completa del factor de von Willebrand. Cada tipo consiste en varios subtipos.⁴⁹ El estudio de un paciente en quien se sospecha enfermedad de von Willebrand requiere realizar pruebas *in vivo* e *in vitro*. El tiempo de sangrado se utiliza para valorar la hemostasia primaria, pero este estudio *in vivo* carece de sensibilidad en casos leves y tiene pobre reproducibilidad. La determinación de la actividad del cofactor del factor de von Willebrand ristocetina mide la actividad funcional del factor de von Willebrand. Este estudio utiliza ristocetina para inducir un cambio conformacional en el factor de von Willebrand presente en el plasma del paciente que agrega las plaquetas mediante la unión a su receptor, la GP Ib (Figura 7). También se requiere la cuantificación del factor de von Willebrand antigénico mediante métodos inmunológicos y el análisis de los multímeros de factor de von Willebrand por inmunolectroforesis en gel de agarosa.

Trombastenia de Glanzmann y atrombia esencial. Los trastornos primarios de la agregación plaquetaria son: la trombastenia de Glanzmann y un síndrome aún más raro llamado atrombia esencial.⁵⁰ En estos trastornos las plaquetas carecen de la GP IIb/IIIa y son incapaces de efectuar la unión entre GP IIb/IIIa y fibrinógeno y, por tanto, la agregación plaquetaria. Las características clínicas

son las comunes a todos los pacientes con disfunción plaquetaria y la tendencia hemorrágica disminuye en severidad con la edad, como sucede con la mayoría de los defectos primarios de la hemostasia. Las características de laboratorio incluyen un tiempo de sangrado prolongado, ausencia total de la agregación primaria inducida por ADP, trombina, colágena y epinefrina (Figura 8), deficiencia de factor 3 plaquetario y retracción del coágulo anormal.^{38,51,52} La única diferencia con la atrombia esencial es que en esta entidad la retracción del coágulo es normal.⁵³

Enfermedad de la poza de almacenamiento: los trastornos de la agregación secundaria son más comunes que los de la agregación primaria, y el más común en esta categoría es la enfermedad de la poza de almacenamiento y puede formar parte de otros síndromes congénitos, como el síndrome de Wiskott-Aldrich, el síndrome de Chediak-Higashi, el síndrome de Hermansky-Pudlak y el síndrome de trombocitopenia y ausencia de radio (síndrome TAR). En esta entidad hay deficiencia de los gránulos densos, que se puede detectar por microscopia electrónica y en la agregometría hay ausencia de la curva de agregación secundaria con ADP y epinefrina, aunque la curva primaria está presente. La agregación con colágena es marcadamente aplanada o está ausente (Figura 9). La hemorragia es variable pero puede ser muy severa.^{54,55}

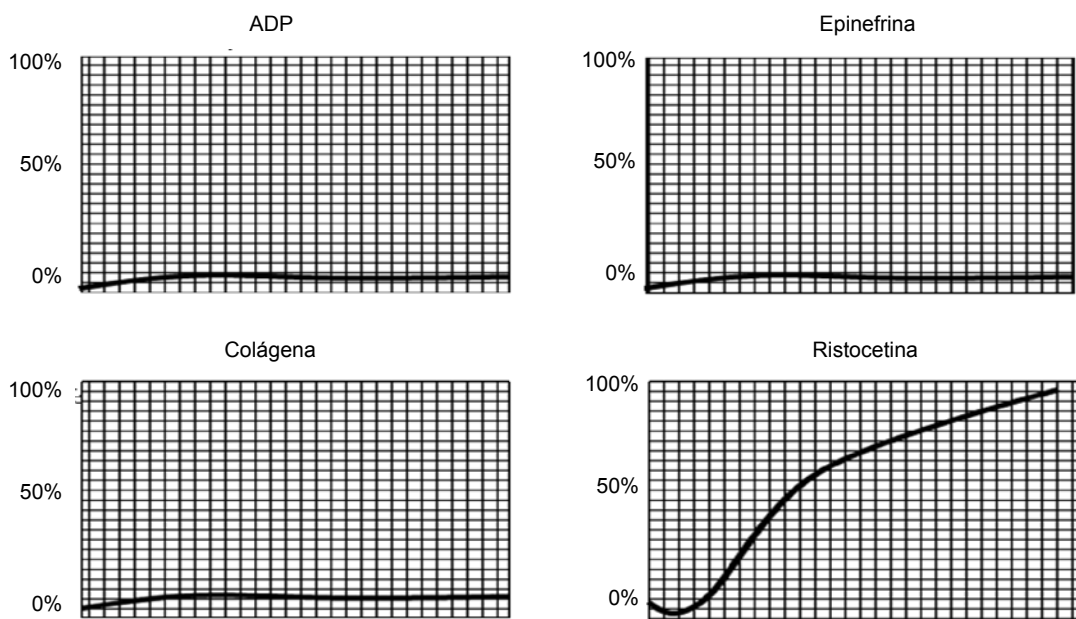


Figura 8. Agregometría plaquetaria de un paciente con trombastenia de Glanzmann.

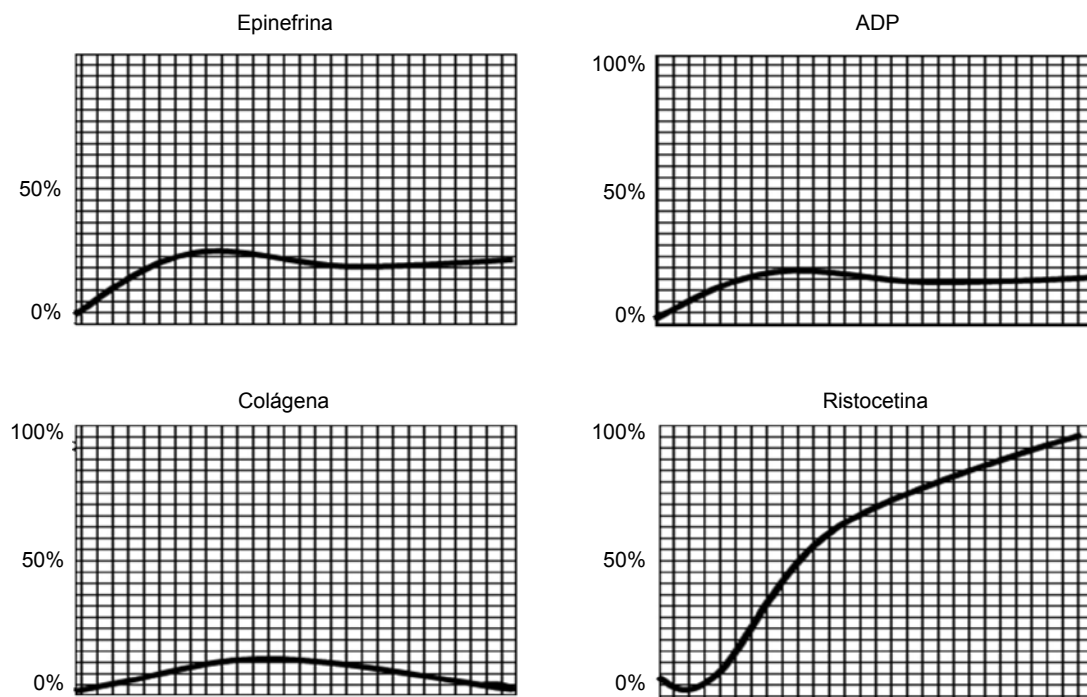


Figura 9. Agregometría plaquetaria de un paciente con enfermedad de la poza de almacenamiento.

Disfunción plaquetaria adquirida

La disfunción plaquetaria adquirida es la causa más frecuente de hemorragia, ya que muchos de los pacientes con alguno de estos trastornos, en ocasiones sin diagnosticar, son operados o sufren trauma y sangrados profusos. En el Cuadro 2 se refieren las principales causas de disfunción plaquetaria adquirida.

Disfunción plaquetaria en uremia: la disfunción plaquetaria se presenta en casi todos los pacientes con uremia⁵⁶ y se atribuye al aumento en la circulación de los ácidos guanidinosuccínico o hidroxifenólico que interfieren con la actividad del factor plaquetario 3.^{57,58} Ambas sustancias son dializables y la diálisis puede corregir o mejorar la función plaquetaria en estos pacientes. También se puede encontrar anomalía en la interacción entre el factor de von Willebrand y los receptores de membrana, principalmente con la GP IIb/IIIa, lo que sugiere un defecto funcional en la interacción adhesiva.^{59,60} Sin embargo, los patrones de las gráficas de la agregometría plaquetaria no son uniformes o característicos y se puede encontrar cualquier combinación de defectos (Figura 10).

Disfunción plaquetaria en insuficiencia hepática: es muy frecuente la disfunción plaquetaria en pacientes

con insuficiencia hepática aguda y crónica y sus causas pueden ser multifactoriales. La mayoría de los casos con enfermedad hepática crónica tienen activación primaria del sistema fibrinolítico (fibrinólisis primaria), que resulta en aumento de los productos de degradación de la fibrina (PDF's), que afectan gravemente la función de las plaquetas, por bloqueo de sus receptores de superficie y por disminución de la unión de fibrinógeno con la GP IIb/IIIa.^{61,62} Otra causa de disfunción plaquetaria en enfermedad hepática es el aumento en el número de plaquetas viejas circulantes, como lo señala la disminución del volumen plaquetario medio (VPM) en estos pacientes; presumiblemente son plaquetas con menor actividad hemostática.⁶³ En los pacientes con insuficiencia hepática aguda o crónica hay defectos de la agregación secundaria o alteraciones tipo enfermedad de la poza de almacenamiento (Figura 9) que se manifiestan por curvas de agregación aplanadas para colágena, trombina y ristocetina, y ausencia de las curvas de agregación secundaria con ADP y epinefrina.⁶¹

Si el paciente con enfermedad hepática ingiere alcohol con abuso, la función plaquetaria se afecta en mayor proporción. La ingestión de dosis altas de

Cuadro 2. Principales causas de disfunción plaquetaria adquirida

Medicamentos:

Aspirina y AINE's

Anticuerpos monoclonales (anti GP IIb/IIIa)

Alcohol

Uremia

Enfermedad hepática

Paraproteinemias:

Mieloma múltiple

Macroglobulinemia de Waldenström

Gamopatía monoclonal

Enfermedades autoinmunes:

Enfermedades de la colágena vascular

Anticuerpos anti-plaquetarios

Trombocitopenias autoinmunes.

Productos de degradación de la fibrina (y fibrinógeno):

Hepatopatía

Coagulación Intravascular diseminada

Fibrinolisis.

Síndromes mieloproliferativos

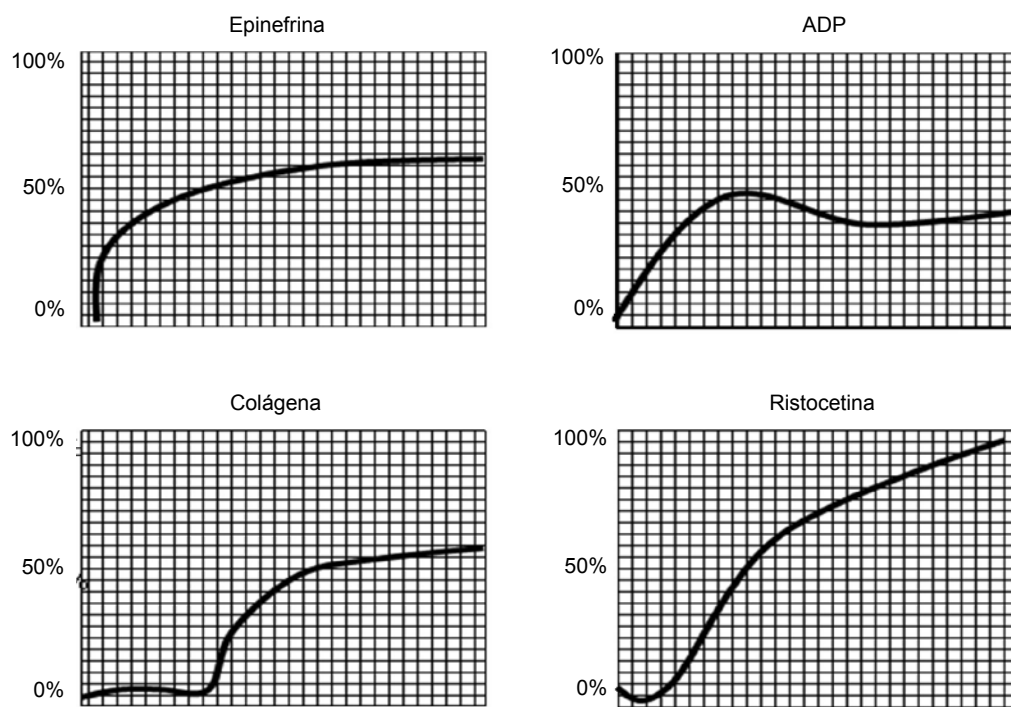
Síndromes mielodisplásicos

Cirugía cardíaca con circulación extracorpórea

AINE's: antiinflamatorios no esteroides

alcohol, aún sin enfermedad hepática, puede inducir un defecto tipo enfermedad de la poza de almacenamiento, con disminución de ATP y ADP por efecto directo del alcohol y de AMP por inhibición de la adenil ciclasa. También se altera la síntesis de prostaglandinas, TXA_2 y la disponibilidad del factor 3 plaquetario.⁶⁴

Disfunción plaquetaria en paraproteinemias: muchos pacientes con mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström o gamopatías monoclonales presentan de manera asociada un trastorno de la función plaquetaria. Esto se debe a que las paraproteínas envuelven o cubren a las plaquetas e impiden el contacto de los receptores de membrana con sus ligandos. Esta disfunción plaquetaria también puede suceder con hiperproteinemias de origen benigno.^{65,66} La mayoría de los pacientes con paraproteinemias malignas manifiestan disfunción plaquetaria significativa con sangrado y alteración difusa de la agregometría plaquetaria (Figura 11). Estas alteraciones son reversibles de manera parcial con plasmaféresis o posterior al control de la actividad de las células plasmáticas con tratamiento específico.^{67, 68}

**Figura 10.** Agregometría plaquetaria de un paciente con uremia

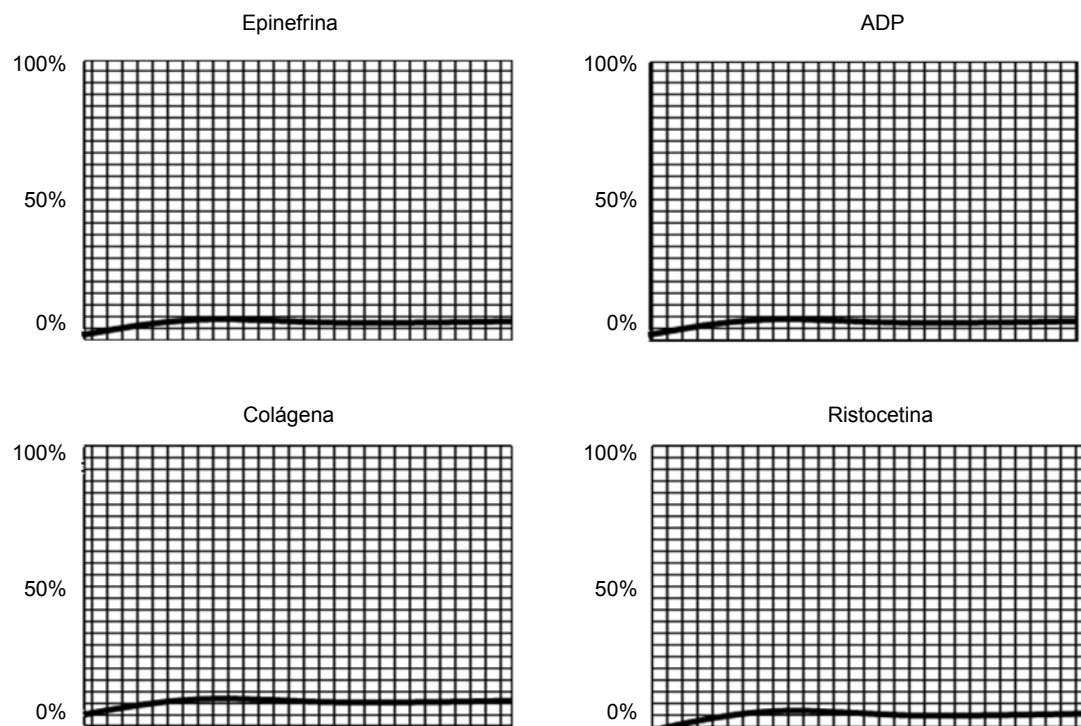


Figura 11. Agregometría plaquetaria de un paciente con mieloma múltiple.

Disfunción plaquetaria en mielodisplasia y síndromes mieloproliferativos: la alteración de la función plaquetaria es frecuente en los síndromes mieloproliferativos: trombocitemia esencial, metaplasia mieloide agnógena, policitemia vera, leucemia mieloide crónica y en los mielodisplásicos: anemia resistente, anemia resistente con exceso de blastos y anemia sideroblástica.^{69, 70} Los patrones de agregación plaquetaria que se asocian con estos síndromes por lo general no son característicos y se puede presentar casi cualquier combinación de curvas en la agregometría plaquetaria. Los más frecuentes son los defectos de la agregación con epinefrina, seguida de la hipoagregabilidad para ADP.^{69, 70, 71}

Disfunción plaquetaria en cirugía cardíaca: los pacientes que se someten a circulación extracorpórea presentan la disfunción plaquetaria más severa de todos los trastornos adquiridos y es la principal causa de hemorragia trans y postoperatoria en cirugía cardíaca.^{72, 73} Son muchos los factores que se asocian con estas alteraciones plaquetarias: a) pH, b) cifra de plaquetas, c) hematócrito, d) fármacos, e) PDF's, f) manejo de la bomba de circulación extracorpórea (velocidad, tiempo, anticoagulación, calcio), g) oxigenación,

h) hipotermia.^{72,73,74} Se ha demostrado desgranulación selectiva de plaquetas en este tipo de cirugía; sin embargo, no se han establecido con precisión todos los mecanismos que pueden estar involucrados. Sea cual sea el o los mecanismos responsables, el grado de disfunción plaquetaria en circulación extracorpórea es severa y se presenta en todos los pacientes.^{74, 75} Además, con mucha frecuencia, los pacientes ingieren fármacos antiagregantes plaquetarios (por ejemplo: aspirina, clopidogrel, dipiridamol, AINES) que interfieren con la función plaquetaria y presentan mayor hemorragia trans y postoperatoria que los pacientes que no ingieren estos fármacos, por lo menos durante los 10 días previos a la intervención quirúrgica.

Disfunción plaquetaria inducida por fármacos: son numerosos los fármacos de uso común que causan disfunción plaquetaria significativa y hemorragia, pero es mucho mayor el número de medicamentos que interfieren con la función de las plaquetas y que se demuestra por estudio de la agregometría plaquetaria. Esta revisión se limita a los fármacos de uso más común en la práctica clínica y que se relacionan con aumento del riesgo de hemorragia anormal.

Los tres mecanismos más importantes por medio de los cuales los fármacos alteran el funcionamiento de las plaquetas, en orden de frecuencia son: a) interferencia del fármaco con la membrana o receptores de las plaquetas, b) inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas, y c) interferencia con la actividad de la fosfodiesterasa.^{76, 77}

Los antiinflamatorios no esteroides (AINES) son los fármacos con actividad antiplaquetaria de uso más frecuente, y entre ellos destacan por su mayor consumo: aspirina, ibuprofeno, indometacina, sulfinpirazona, colchicina, dipirona y metamizol. Cualquier AINE puede inducir disfunción plaquetaria clínicamente importante, y todos actúan mediante la inhibición de las vías de la síntesis de prostaglandinas.⁷⁸ La aspirina se utiliza para la supresión farmacológica de la función plaquetaria mediante la inhibición de la ciclooxigenasa, y como consecuencia se inhibe la síntesis de TXA₂. Este fármaco también inhibe la síntesis endotelial de prostaciclina; sin embargo, la selectividad inhibitoria es de aproximadamente 70% para la ciclooxigenasa de plaquetas y 30% para la ciclooxigenasa del endotelio, y así predomina el efecto antitrombótico sobre el efecto procoagulante.⁷⁹⁻⁸² También algunos fármacos que se utilizan en psiquiatría inducen disfunción plaquetaria como las fenotiazinas (clorpromazina, trifluoperazina, antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la recaptura de serotonina).

Varios fármacos que se utilizan en la medicina cardiovascular interfieren con la función de las plaquetas y son causa muy frecuente de hemorragia anormal, entre las que se incluyen: clofibrato, dipiridamol, ácido nicotínico, papaverina, propranolol, antagonistas de los canales del calcio (nifedipina, verapamil, diltiazem, amlodipino), bloqueadores β-adrenérgicos, nitroprusiato de sodio y trimetorfan.⁸³⁻⁸⁵ Esta clase de fármacos es de suma importancia, ya que muchos de los pacientes que se someten a cirugía cardíaca aumentan su riesgo de sangrado trans y postoperatorio por el consumo de alguno de estos fármacos, solos o en combinación, en la mayoría de los casos.⁸⁶⁻⁸⁸

Los antibióticos también inducen disfunción plaquetaria, y entre los que más destacan son las penicilinas, principalmente nafcilina, ampicilina, carbenicilina (el más frecuente) y ticarcilina. La gentamicina y otros aminoglucósidos también son capaces de interferir con la función plaquetaria.³⁰

Entre otras drogas de uso frecuente que también representan riesgo de disfunción plaquetaria y hemorragia se encuentran los anestésicos locales (incluida la cocaína) y los gases anestésicos, antihistamínicos, dextranes, furosemida, guayacolato de glicerol (base para la mayoría de jarabes antitusivos), nitroprusiato, vincristina y vinblastina.³⁰

Los medicamentos que se utilizan para el tratamiento de los síndromes coronarios agudos y en el manejo trans y postangioplastia coronaria merecen mención aparte por su mecanismo de acción, frecuencia de uso y riesgo de hemorragia severa.

Inhibidores del receptor GP IIb/IIIa: son tres los fármacos de esta categoría que están disponibles para aplicación intravenosa: abciximab, tirofiban y eptifibatide. Abciximab es un anticuerpo monoclonal anti receptor IIb/IIIa, tirofiban es un inhibidor no peptídico y eptifibatide es un heptapéptido cíclico no inmunogénico que se deriva de veneno de serpiente.⁸⁹⁻⁹² El riesgo de hemorragia es inherente al mecanismo de acción; sin embargo, este riesgo es mayor (2 a 3 veces) cuando se combinan con aspirina, clopidogrel, heparina y anticoagulantes orales (por lo general se combinan 2, 3 y hasta 4 de estos fármacos en un mismo paciente).⁹³⁻⁹⁵ La mayoría de los episodios de sangrado se presentan en las angioplastias coronarias en el sitio del acceso vascular, aunque son frecuentes las hemorragias de tubo digestivo y en el sistema nervioso central. El bloqueo del receptor IIb/IIIa induce un estado trombasténico con afección principalmente de la agregación plaquetaria mediada por fibrinógeno. También se presenta trombocitopenia, en ocasiones grave, con el uso de estos fármacos, lo que aumenta la morbilidad de manera significativa y el riesgo de hemorragias fatales.^{96, 97}

Tienopiridinas: las tienopiridinas clopidogrel y ticlopidina son fármacos con amplia prescripción en enfermedad cardiovascular que antagonizan de manera selectiva, y diferente a la aspirina y AINES, el efecto de ADP. Ambos fármacos inhiben la agregación plaquetaria *ex vivo* y prolongan el tiempo de sangrado *in vivo*. El grado de prolongación del tiempo de sangrado es equivalente o mayor al que produce la aspirina y el efecto de la combinación de tienopiridina y aspirina es aditivo. Las curvas de agregometría muestran una clara inhibición para ADP y epinefrina, mientras que las respectivas para trombina y colágena son normales.^{98, 99}

Hiperfunción plaquetaria: los estados de hiperactividad plaquetaria hereditarios o adquiridos son responsables de un número importante de eventos trombóticos arteriales y algunos venosos. Uno de estos estados es el defecto Wein-Penzing, una deficiencia en la vía de la lipoxigenasa con incremento compensador de los productos de la cicloxigenasa (TX_{A_2} , PGE_2 y PGD_2) que se asocia con infartos de miocardio en gente joven, apenas descrito en 1991 y con solo algunos pocos reportes.¹⁰⁰

Otro defecto con hiperfunción plaquetaria, muy común y de fácil diagnóstico y tratamiento es el síndrome de la plaqueta pegajosa (SPP), responsable de gran número de episodios de trombosis arterial y venosa (hasta 14% de los casos de trombofilia primaria) con morbilidad y mortalidad significativas.^{101, 102} Se hereda con carácter autosómico dominante¹⁰³ y las principales manifestaciones clínicas son trombosis coronaria y vascular cerebral en personas jóvenes sin otros factores de riesgo cardiovascular, aunque puede haber episodios trombóticos arteriales y venosos en cualquier sitio.^{104, 105} Los criterios de diagnóstico descritos por Mammen¹⁰³ se señalan en el Cuadro 3. El método de estudio consiste en realizar agregometría plaquetaria en PRP con la adición de ADP y epinefrina a diferentes concentraciones (Cuadro 4). Se considera diagnóstico de hiperactividad plaquetaria y SPP con:

Cuadro 3. Síndrome de la plaqueta pegajosa: criterios de diagnóstico

Tipo I:
Hiperagregabilidad a epinefrina y ADP.
Tipo II:
Hiperagregabilidad a epinefrina únicamente.
Tipo III:
Hiperagregabilidad a ADP únicamente.

Diagnóstico sospechoso:
Hiperagregabilidad a solo un agonista a una concentración e historia de trombosis.

Cuadro 4. Concentraciones de los agonistas y valores normales de la agregometría

Agonista	Variación normal (porcentaje de agregación)
EPI: 11×10^{-6} M	39 – 80%
EPI: 1.1×10^{-6} M	15 – 27%
EPI: 0.55×10^{-6} M	9 – 20%
ADP: 2.34×10^{-6} M	7.5 – 55%
ADP: 1.17×10^{-6} M	2 – 36%
ADP: 0.58×10^{-6} M	0 – 12%

EPI: epinefrina

1. Historia de trombosis e hiperagregabilidad plaquetaria a dos concentraciones de un agonista, o
2. Historia de trombosis e hiperagregabilidad plaquetaria a una concentración de dos agonistas, o
3. Historia de trombosis e hiperagregabilidad plaquetaria a una concentración de un agonista, y al repetir la prueba se obtienen los mismos resultados.

Su tratamiento consiste en la administración de antiagregantes plaquetarios, principalmente aspirina, y es de suma importancia verificar el efecto farmacológico (antiagregante) en la agregometría plaquetaria.

Otras pruebas de la función plaquetaria

Conteo de plaquetas: el primer examen que se debe realizar en un paciente en quien se sospecha algún trastorno plaquetario es la biometría hemática completa con conteo específico de plaquetas. La mayoría de los analizadores sanguíneos modernos realizan este conteo de manera muy precisa y rápida mediante impedancia eléctrica. Sin embargo, el patrón de referencia internacional continúa siendo el conteo manual con microscopía por contraste de fase, aunque este método es impreciso con coeficientes de variación de 15 a 25%.

Tiempo de sangrado: esta técnica que describió Duke¹⁰⁶ en 1912 y luego refinada por Ivy¹⁰⁷ fue el primer estudio *in vivo* de la función plaquetaria. Su principal ventaja es que estudia la hemostasia de manera natural y no requiere equipo especializado. Sin embargo, es poco reproducible, es invasivo, de baja sensibilidad y es impráctico para realizarlo durante un procedimiento quirúrgico, además que requiere personal técnico con experiencia. Es una buena primera opción como estudio de escrutinio para identificar pacientes con defectos plaquetarios severos.¹⁰⁸

Citometría de flujo: la citometría de flujo en sangre completa es una herramienta de laboratorio poderosa y relativamente nueva para valorar el número de plaquetas, la proporción de plaquetas activadas y en función, hipo o hiperreactividad plaquetaria, agregados de plaquetas-leucocitos, micropartículas plaquetarias y recambio plaquetario.¹⁰⁹ Hay ensayos de diseño específico para vigilar el tratamiento con antagonistas de GP IIb/IIIa, así como para el diagnóstico de deficiencias de glucoproteínas de la superficie de las plaquetas, enfermedad de la poza de almacenamiento y trombocitopenia inducida por heparina.¹¹⁰

Otros estudios: existen otros estudios y analizadores con indicaciones específicas (PFA-100) o que valoran la coagulación y la hemostasia en conjunto como el tromboelastógrafo, hemostatómetro y el TSA (Thrombotic Status Analyzer), pero cuya discusión va más allá del objetivo de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Bizzozzero J. On a new blood particle and its role in thrombosis and blood coagulation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1882;90:261.
2. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine and its reversal. *Nature* 1962; 194:927.
3. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355: 1531-1539
4. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998; 339: 746-754
5. Weiss JG. Anatomy and structural organization of the platelet. En: Colman RW, Hirsh JU, Marder VJ, et al. Eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* 3th ed. Philadelphia: Lippincott, 1994;p:397-413.
6. Ware JA, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry and function. En: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, et al. eds. *Williams hematology*, 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1995;p: 1161-1201.
7. Mills DC. ADP receptors on platelets. *Thromb Haemost* 1996;76:835-856.
8. Glennon R, Dukat M. Novel serotonergic agents: 5-HT₂. *Serotonin ID Research Alert* 1997;2:107-113.
9. Johnson GJ. Platelet thromboxane receptors: biology and function. En: Rao G, Ed. *Handbook of platelets physiology and pharmacology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999;p: 38-79.
10. Shukla SD. Platelet activating factor and platelets. En: Rao G, Ed. *Handbook of platelets physiology and pharmacology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999;p:120-141.
11. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001;86:189-197.
12. Bennet JSW. The molecular biology of platelets membrane proteins. *Semin Hematol* 1990; 27:186-204.
13. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239.
14. Nierodski ML, Klepfish A, Karparkin S. Role of platelet integrin GPIIb-GPIIIa, fibronectina, von Willebrand factor and thrombin in platelet-tumor interaction in vitro and metastasis in vivo. *Semin Hematol* 1994;31:278-288.
15. López JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:97-119.
16. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 2005;31:381-392.
17. Andrews RK, López JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:91-105.
18. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, et al. Platelets and Shear stress. *Blood* 1996;88:1525-1541.
19. Gibbins JM. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 2004;117:3415-3425.
20. Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol* 2006;42: s94-100.
21. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001;86: 222-232.
22. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelets aggregation. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 270-276.
23. Jackson, SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109:5087.
24. Born GRV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194: 927-029.
25. Adam Seegmiller, Ravindra Sarode. Laboratory Evaluation of platelet function. *Hematol Oncol Clin N Am* 2007; 21: 731-742.
26. Rodgers G. Qualitative platelet disorders and von Willebrand disease. En: Kjeldsberg CR, Ed. *Practical diagnosis of hematologic disorders*. 4th edition. Chicago: ASCP Press; 2006. p. 327-344.
27. Newhouse P, Clark C. The variability of platelet aggregation. En: Tripplet DA Ed. *Platelet function: laboratory evaluation and clinical application*. Chicago: ASCP; 1978. p. 63-107.
28. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Scio* 2003; 28: 307-127.
29. Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F, et al. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (Suppl 1): p0965.
30. Rodger L. Bick. Platelet Function Defects. En: Rodger L. Bick Ed: *Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and Laboratory Practice*. Lippincott Williams & Wilkins. 2002 p. 59-90.
31. Cardinal DC, Flower RJ. The electric aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3: 135-158.
32. Mackie IJ, Jones R, Machin SJ. Platelet impedance aggregation in whole blood assay and its inhibition by antiplatelet drugs. *J Clin Pathol* 1984; 37: 874.
33. Ingerman-Wojenski CM, Silver MJ. A quick method for screening platelet dysfunction using the whole blood lumi-aggregometer. *Thromb Haemost* 1984; 51: 154-156.
34. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF, et al. Assessment of platelet function assays. *Am Heart J* 1998; 135: S170.
35. Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, et al. Rapid assessment of platelet function with a modified whole-blood aggregometer in percutaneous transluminal coronary angioplasty patients receiving anti-IIb/IIIa therapy. *Circulation* 1997; 96: 3860.
36. Storey RF, May Ja, Wilcox RG, Heptinstall S. A whole blood assay of inhibition of platelet aggregation by glycoprotein IIb/IIIa antagonists: comparison with other aggregation methodologies. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1307.
37. Dyszkiewicz-Korpany AM, Frenkel EP, Sarode R. Approach to the assessment of platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11: 25-35.
38. Bick RL. Platelet function defects. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18: 167-185.
39. Bernard J, Soulier JP. Sur une nouvelle variété dystrophique thrombocytaire hémorragique congénitale. *Semin Hopitaux Paris* 1948 ; 24 : 2317.
40. White JG. Inherited abnormalities of platelet membrane and secretory granules. *Hum Pathol* 1987; 18: 123-132.

41. Bithel TC, Parokh SJ, Stronf RR. Platelet function in the Bernard-Soulier syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1972; 201: 145-154.
42. Howard MA, Hutton RA, Hardisty RM. Hereditary giant platelet syndrome: a new disorder of platelet function. *Br Med J* 1973; 2: 586-595.
43. Bick RL. Hereditary coagulation protein defects. En: *Disorders of thrombosis and Hemostasis*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2002. p. 117-1388.
44. von Willebrand E. Hereditary pseudohaemophilia. *Fin Lakarsallsk Handl* 1926; 68: 87.
45. Rodeghiero F, Castman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 454-460.
46. Werner E, Broxson E, Tucker E, et al. Prevalence of von Willebrand's disease in children: a multiethnic study. *J Pediatr* 1993; 123-132.
47. Battle J, Torea J, Rendal E, et al. The problem of diagnosing von Willebrand's disease. *J Intern Med* 1997; 242 (suppl 749): 121.
48. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, et al. Inactivation of human factor VIII by activated protein C: cofactor activity of protein S and protective of von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1988; 82: 1236-1254.
49. Sadler J. A revised classification of von Willebrand disease: for the subcommittee on von Willebrand factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1994; 71: 520-552.
50. Glanzmann E. Hereditäre hamorrhagische thrombastenie. *Beitr Pathol Blutplatt Jahrb Kinderheilkd* 1918; 88: 1-15.
51. Caen JP. Glanzmann thrombastenia. *Clin Haematol* 1972; 1: 383-390.
52. Bick R, Murano L. Physiology of Hemostasis. *Clin Lab Med* 1994; 14: 677-689.
53. Inceman S, Tangun V. Essential athrombia. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 33: 278-287.
54. Holmawn H, Weiss WH. Further evidence for a deficient storage pool of adenine nucleotides in platelets from some patients with thrombocytopathia: "storage pool disease". *Blood* 1972; 39: 197-207.
55. Pareti FI, Mannucci L, Capitanio L, et al. Heterogeneity of storage pool deficiency. *Thromb Haemost* 1977; 38: 3-15.
56. Schetz MRC. Coagulation disorders in acute renal failure. *Kidney Int* 1998; 53(suppl 66): 96.
57. Horowitz HI, Cohen DB, Martinez P, et al. Defective ADP-induced platelet factor 3 activation in uremia. *Blood* 1967; 30: 331-339.
58. Horowitz HI, Stein IM, Cohen BD, et al. Further studies on the platelet-inhibiting affect of guanidino-succinic acid and its role in uremic bleeding. *Am J Med* 1970; 49: 339-348.
59. Escolar G, Casa A, Bastidi E. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb-IIIa. *Blood* 1990; 76:1336.
60. Komarnicki M, Twardowski T. Platelet glycoprotein concentrations in patients with chronic uraemia. *Folia Haematol* 1987; 114:642.
61. Mammen EF. Coagulopathies of liver disease. *Clin Lab Med* 1994; 14: 669-786
62. Bick RL. The clinical significance of fibrinogen degradation products. *Semin Thromb Hemost* 1983; 8: 302-315.
63. Ashud MA. Platelet size and number in alcoholic thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1972; 286: 355-360.
64. Cowan DH. Effect of alcoholism on Hemostasis. *Semin Hematol* 1980; 17: 137-149.
65. Bick RL. Clinical aspects of acquired circulating anticoagulants. En: Bick RL, Bennett J, Brynes R, et al; Eds. *Hematology: clinical and laboratory practice*. St. Louis: Mosby, 1993: 1533.
66. Bick RL, Strauss JF, Rutherford CJ, et al. Thrombosis and hemorrhage in oncology patients. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996; 10: 875-890.
67. Frenkel UP, Bick RL. Issues of thrombosis and hemorrhagic events in patients with cancer. *Anticancer Res* 1998; 18: 1-4.
68. Lachner H. Hemostatic abnormalities associated with dysproteinemias. *Semin Hematol* 1973; 10: 125-141.
69. Schafer AI. Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood* 1984; 64:1-14.
70. Raman BK, Van-Slyck EJ, Riddle J. Platelet function and structure in myeloproliferative disease, myelodysplastic syndrome and secondary thrombocytosis. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 647-659.
71. Pflieger G, Boda Z, Udvardy M. Platelet function studies in myeloproliferative disorders. *Folia Haematol* 1986; 113:655-670.
72. Bick RL. Thrombotic and hemorrhagic problems during cardiovascular bypass surgery and cardiovascular procedures. En: Rodger L Bick. *Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and Laboratory Practice*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2002. p. 177-212.
73. Bick RL. Hemostasis defects in cardiac surgery and use of cardiac devices. En: Piffere R. Ed. *Cardiac surgery: principles and practice*. Philadelphia: Belfus Press, 1999.
74. Harker LA, Malpass TW, Bronson NE. Mechanisms of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha-granule release. *Blood* 1980; 56: 824-839.
75. Weerasinghe A, Taylor KM. The platelet in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 2145-2160.
76. Weiss HJ. Antiplatelet drugs: pharmacological aspects. En: *Platelets: Pathophysiology and antiplatelet drug therapy*. New York: Alan R. Liss, 1982:45.
77. Triplett DA. Appendix C: Miscellaneous lists and forms. En: Triplett DA, Ed. *Platelet function evaluation: laboratory evaluation and clinical application*. Chicago: ASCP Press, 1978:291.
78. Rao AK, Walsh PN. Acquired qualitative platelet disorders. *Clin Haematol* 1983; 12: 201-222.
79. Amezcua JL, Parsons A, Moncada S. Unstable metabolites of arachidonic acid, aspirin and the formation of the hemostatic plug. *Thromb Res* 1978; 13: 477-480.
80. Weksler BB, Pett SB, Alonso D, et al. Inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med* 1983; 308: 800-809.
81. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 1982; 69: 1366-1383.
82. Preston FE, Greaves M, Jackson CA. Cumulative inhibitory effect of daily 40 mg aspirin on prostacyclin synthesis. *Lancet* 1982; 1: 1211-1220.
83. Yamauchi K, Furui H, Taniguchi N. Effects of diltiazem hydrochloride on cardiovascular response, platelet aggregation and coagulation activity during exercise testing in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1986; 57: 609.

84. Hines R, Barash PG. Infusion of sodium nitroprusside induces platelet dysfunction in vitro. *Anesthesiology* 1989; 70: 611.
85. Hines R. Preservation of platelet function during trimethaphan infusion. *Anesthesiology* 1990; 72: 834.
86. Bick RL, Fekete LF. Cardiopulmonary bypass hemorrhage: aggravation by pre-op ingestion of antiplatelet agents. *Vasc Surg* 1979; 13: 227.
87. Leist ER, Banwell JG. Products containing aspirin. *N Engl J Med* 1974; 291: 710-722.
88. Selner JC. More aspirin-containing drugs. *N Engl J Med* 1975; 292: 372-378.
89. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. The EPIC Investigation. *N Engl J Med* 1994; 330:956.
90. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. The EPILOG Investigators. *N Engl J Med* 1997; 336:1689.
91. Kereiakes, DJ, Kleiman, NS, Ambrose, J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study of tirofiban (MK-383) platelet IIb/IIIa blockade in high risk patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:536.
92. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. The RESTORE Investigators. Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis. *Circulation* 1997; 96:1445.
93. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338:1498.
94. Sabatine, MS, Januzzi, JL, Snapinn, S, et al. A risk score system for predicting adverse outcomes and magnitude of benefit with glycoprotein IIb/IIIa inhibitor therapy in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2001; 88:488.
95. Cohen, M, Gensini, GF, Maritz, F, et al. The safety and efficacy of subcutaneous enoxaparin versus intravenous unfractionated heparin and tirofiban versus placebo in the treatment of acute ST-segment elevation myocardial infarction patients ineligible for reperfusion (TETAMI): a randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1348.
96. Dasgupta, H, Blankenship, JC, Wood, GC, et al. Thrombocytopenia complicating treatment with intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors: A pooled analysis. *Am Heart J* 2000; 140:206.
97. Blankenship, JC, Tasissa, G, O'Shea, JC, et al. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition on angiographic complications during percutaneous coronary intervention in the ESPRIT trial. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:653.
98. Hollopeter, G, Jantzen, HM, Vincent, D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409:202.
99. Angiolillo, DJ, Capranzano, P. Pharmacology of emerging novel platelet inhibitors. *Am Heart J* 2008; 156:S10.
100. Sinzinger H, Kaliman J, O'Grady J. Platelet lipooxygenase defect (Wein-Penzing defect) in two patients with myocardial infarction. *Am J Hematol* 1991; 36: 202.
101. Holliday PL, Mammen E, Gilroy J. Sticky platelet syndrome and cerebral infarction in young adults. En: 9th International Joint Conference on Stroke and Cerebral Circulation. Phoenix: 1983 (abst).
102. Rubenfire M, Blevins RD, Barnhart MI, et al. Platelet hyperaggregability in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Am J Cardiol* 1986; 57: 657.
103. Mammen EF, Barnhart MI, Selik NR, et al. « Sticky Platelet Syndrome »: A congenital platelet abnormality predisposing to thrombosis. *Folia Haematol* 1988; 115: 361.
104. Mammen EF. Ten year's experience with the "sticky platelet syndrome". *Clin Appl Thromb Hemost* 1995; 1: 66.
105. Bick RL. Sticky platelet syndrome: a common cause of arterial and venous thrombosis. *J Clin Appl Thromb Hemost*; 1998: 477-81.
106. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. *JAMA* 1910; 55: 1185.
107. Mielke CH, Kaneshiro MM, Maher IA, et al. The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. *Blood* 1969; 34:204.
108. Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1990; 16:1.
109. Michelson AD. Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87:4925-4934.
110. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 342-354.