PARTE 10 Plaqueta

Tulasi Geevar

TEMAS TRATADOS

- ✓ Recuento de plaquetas
- ✓ Pruebas de función plaquetaria
- ✓ Pruebas de función plaquetaria por citometría de flujo

Recuento de plaquetas: La sangre se mezcla con un diluyente que causa hemólisis de los glóbulos rojos. Se llena un hemocitómetro con el líquido diluyente y las plaquetas se cuentan bajo el microscopio, preferiblemente mediante el uso de contraste de fase, si está disponible.

Materiales/equipos:

- ✓ Cámara de recuento delgada de fondo plano (hemocitómetro de contraste de fase con regla de Neubauer)
- ✓ Microscopio de contraste de fase equipado con condensador de fase de larga distancia de trabajo, si está disponible; de lo contrario, un microscopio óptico ordinario
- ✓ Pipeta de 20 µl
- ✓ Pipeta graduada de 2 ml
- ✓ Tubo de 12 x 75 mm
- ✓ Mezclador mecánico

Reactivo: Fluido diluyente: oxalato de amonio al 1 % en agua destilada. Guárdelo en el refrigerador y siempre filtre justo antes de usarlo.

Muestra: Si la muestra de sangre proviene de una punción capilar, el sitio de la punción debe estar limpio y la sangre debe fluir libremente. Limpie la primera gota de sangre. Si la muestra de sangre proviene de sangre venosa, debe recogerse en una jeringa de plástico seca (o vidrio siliconado) con una aguja corta no menor de calibre 21. La aguja debe retirarse antes de que la sangre se coloque en un recipiente de plástico con EDTA. La sangre y el anticoagulante deben mezclarse suavemente, para evitar la formación de espuma, sin demora.

Método: Pipetear 0,38 ml de líquido diluyente en un tubo de ensayo. Llene la pipeta de 20 µl hasta la marca y limpie el exterior de la pipeta. Vierta el contenido de la pipeta en el líquido diluyente y lave la pipeta extrayendo la sangre y vertiéndola en el tubo unas cuantas veces. Mezclar durante al menos 10 minutos a mano o, preferiblemente, con batidora mecánica. Llene el hemocitómetro, como se describe a continuación. Cubra la cámara con una placa de Petri durante 10 a 20 minutos para permitir que las plaquetas se asienten. Deje un trozo de algodón húmedo o papel filtro en el plato para evitar la evaporación. Con un microscopio, cuente las plaquetas en cuadrados grandes de 1 mm (= 0,1 µl). Cuente las plaquetas en tantos cuadrados como sea necesario para alcanzar un conteo de al menos 100. Las plaquetas parecen redondas u ovaladas, y su estructura granular interna y su brillo púrpura permiten distinguirlas de los desechos. En el fondo se ven fantasmas de los glóbulos rojos que han sido lisados por el oxalato de amonio. Si no se dispone de contraste de fase, se puede utilizar un microscopio óptico ordinario, siempre que el condensador esté alejado de la muestra para reducir la intensidad de la luz. Calcule el número de plaquetas por litro de sangre de acuerdo con la siguiente fórmula.

El hemocitómetro: La cámara de recuento del hemocitómetro, con regla de Neubauer o Neubauer mejorada, está construida de manera que la distancia entre la parte inferior del cubreobjetos y la superficie de la cámara es de 0,1 mm. La superficie de la cámara contiene dos áreas especialmente rayadas con dimensiones como se muestra en la Figura 21. El 1 mm2 central tiene líneas de límite dobles o triples. En las áreas centrales, hay 25 casillas en el Neubauer mejorado y 16 casillas en el fallo Neubauer. Cada cuadrado tiene un área de 0,04 mm2 (0,2 x 0,2 mm). Estos cuadrados se dividen, a su vez, en cuadrados más pequeños, cada uno de 0,0025 mm2 (0,05 x 0,05 mm). Los cuadrantes exteriores del área rayada son cada uno de 1 mm2 y se dividen en 16 cuadrados.

Cálculos:

La fórmula para calcular el recuento de células es:

Recuento (células/l) = N x D/A x 10 x 10^6

Donde N = número total de células contadas

D = dilución

A = área total contada (en mm2)

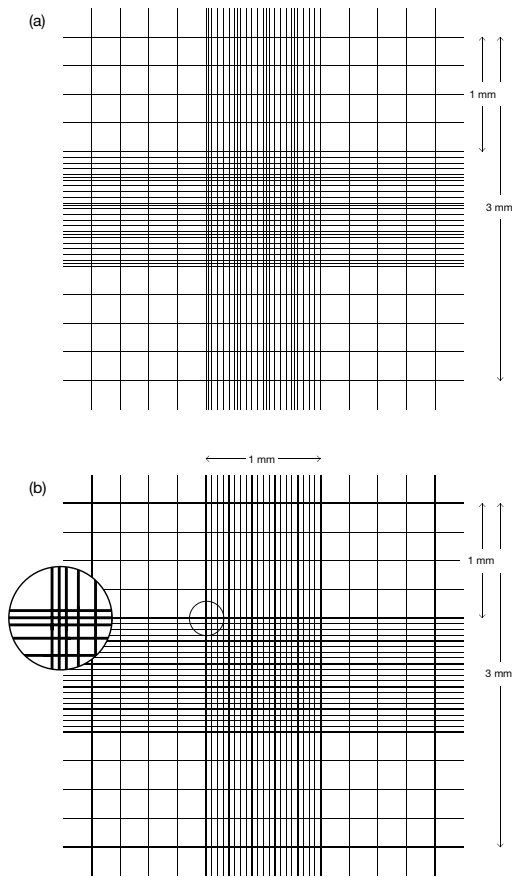
10 = factor para calcular el volumen en µL a partir del área (en mm^2) y la profundidad de la cámara (0,1 mm)

10^6 = factor para convertir conteo/µl a recuento/l

Fuentes de error en el recuento de células: Cuando se utiliza sangre capilar, se debe obtener una gota que fluya libremente. Cuando se utiliza sangre anticoagulada, la muestra debe mezclarse cuidadosamente invirtiendo el tubo de sangre al menos 20 veces antes de tomar una muestra. No agite el tubo, ya que al agitar se crea espuma, lo que hace imposible un pipeteo preciso. Incline el tubo bien mezclado en un ángulo de 45° o un poco más, y pipetee desde el borde del tubo, siguiendo los mismos procedimientos que para la sangre capilar. Las pipetas para muestras de sangre deben estar limpias y secas. La pipeta debe llenarse rápidamente y la sangre debe extraerse con precisión mediante el uso de un dispositivo de succión de pipeta conectado a la pipeta, llenándola hasta la línea deseada. Si la línea se sobrepasa ligeramente, el exceso de sangre puede expulsarse tocando el borde de la pipeta con un trozo de papel filtro o servilleta de papel. Si la línea se sobrepasa, se debe utilizar una pipeta nueva. No debe haber burbujas de aire en la columna de sangre. El exterior de la pipeta debe limpiarse para eliminar la sangre (teniendo cuidado de no extraer sangre de la punta) antes de introducirla en el líquido diluyente. Una vez que el contenido de la pipeta se ha descargado en el diluyente, el líquido diluyente debe introducirse en la pipeta con una succión constante varias veces, para garantizar que toda la sangre se descargue en el fluido. El tubo que contiene la sangre diluida debe agitarse suavemente durante al menos dos minutos con la mano o, preferiblemente, en un agitador mecánico. Una vez agitado el tubo, la cámara se llena inmediatamente mediante una pipeta Pasteur o un tubo capilar. La cámara se llena por capilaridad, con el flujo de fluido de la pipeta o capilar regulado para que se llene rápida y suavemente. Debe llenarse por completo, pero el líquido no debe derramarse en el canal de contención. Deje que las celdas se asienten en el área de conteo durante 10 a 20 minutos, luego continúe con el conteo. La cámara del hemocitómetro y la cubierta de vidrio deben estar limpias y secas antes de usarlas. Pueden introducirse errores importantes por huellas dactilares o una película aceitosa. Se debe contar un número suficiente de células para reducir el error debido a la distribución aleatoria de las células. En la práctica, se deben contar al menos 100 células. Como control adicional de la correcta distribución de las células en la cámara, el número de células contadas en cada área (es decir, en los cuadrados grandes) no debe diferir en más del 10%.

Controles: Se deben hacer dos diluciones y tomar la media de los dos recuentos; los dos recuentos deben coincidir dentro del 10%.

Fuentes de error en el recuento de plaquetas: La sangre obtenida por venopunción es preferible a la sangre capilar, porque las plaquetas se adhieren a la herida y las diluciones sucesivas de un pinchazo en el dedo no siempre son reproducibles. Los errores generales del pipeteo y la hemocitometría se describen anteriormente. Además, se debe prestar especial atención a garantizar que la cámara de recuento esté escrupulosamente limpia, ya que la suciedad y los residuospueden contarse como plaquetas. Lave la cámara con agua jabonosa, luego enjuague con agua destilada, deje secar y limpie con un pañuelo sin pelusa. Asegúrese de que el cubreobjetos esté limpio antes de usarlo. La presencia de grupos de plaquetas impide realizar recuentos fiables. Si la muestra contiene grumos, se debe recoger una muestra fresca. El diluyente de oxalato de amonio debe mantenerse refrigerado y debe desecharse si hay evidencia de contaminación bacteriana. El espécimen debe contarse dentro de las tres horas posteriores a la recolección.



10.2 Prueba de función plaquetaria

10.3 Retracción del coágulo

10.4 Medida de la agregación plaquetaria

Figura 21. Cámara de conteo del hemocitómetro (a) Neubauer y (b) Neubauer mejorado

Prueba de función plaquetaria: La función principal de las plaquetas es apoyar la hemostasia mediante la formación de tapón plaquetario en los sitios de la lesión vascular. Cuando el vaso sanguíneo se lesiona y las microfibrillas subendoteliales y las fibras de colágeno quedan expuestas, las plaquetas se unen a la pared del vaso, un proceso llamado adhesión plaquetaria. En los sitios de alto cizallamiento, las plaquetas se unen a los vasos indirectamente con la ayuda de multímeros FVW de alto peso molecular. El FVW se une al colágeno expuesto a través de su dominio A3, y las plaquetas se unen al FVW unido al colágeno a través de su receptor GPIba. Las plaquetas también pueden adherirse directamente al colágeno en el subendotelio con los receptores de glicoproteína VI (GPVI) e integrina a2|31. Una vez que las plaquetas se adhieren a la pared del vaso, experimentan una serie de cambios. A través de la reorganización del

citoesqueleto plaquetario, pasan de pequeñas estructuras en forma de disco a esferas espiculadas al desarrollar filopodios. La difusión transversa por la membrana transloca los fosfolípidos procoagulantes aniónicos, principalmente fosfatidilserina, a la superficie externa de las plaquetas, lo que forma una buena plataforma para la generación de trombina. Las plaquetas liberan el contenido que sea alfa (por ejemplo, fibrinógeno, FV, FVW y factores de crecimiento) y gránulos densos (por ejemplo, ADP, ATP, calcio y serotonina). Esto provoca una mayor activación de las plaquetas. La formación de tromboxano A2 (TXA_2) se produce a partir del ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la TXA_2 sintasa. Los agonistas plaquetarios (ADP, TXA_2 y trombina) se unen a receptores específicos de membrana e inician la agregación plaquetaria mediante la activación del receptor de integrina, α2β3 (GPIIb-IIIa) que se une al fibrinógeno y/o al FVW para formar el tapón plaquetario. Las anomalías en cualquiera de estas vías que causan adhesión, activación, degranulación y agregación plaquetaria pueden causar disfunción plaquetaria. Los trastornos plaquetarios incluyen defectos cuantitativos (trombocitopenia) o cualitativos y pueden ser hereditarios o adquiridos. Los síntomas hemorrágicos son principalmente mucocutáneos, como equimosis, sangrado de encías, hematomas fáciles, menorragia, hemorragia posparto y hemorragia gastrointestinal (melena, hematemesis o hematoquecia). Los síntomas pueden ser leves o graves dependiendo de la anomalía. En la Tabla 33 se muestra una lista de trastornos hereditarios de la función plaquetaria (THFP) con características clínicas y de laboratorio destacadas asociadas. Se desconoce la verdadera prevalencia de los trastornos plaquetarios. Se cree que los trastornos de la función plaquetaria son más comunes de lo que se creía anteriormente debido al sub-diagnóstico. En las zonas del mundo donde la consanguinidad es común, los trastornos autosómicos recesivos como la trombastenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard Soulier tienen una mayor prevalencia. Si bien el diagnóstico de la trombastenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard Soulier son relativamente fáciles debido al patrón de agregación típico, el diagnóstico de la mayoría de los otros THFP es engorroso y requiere ensayos complejos. En la investigación de pacientes con sospecha de DPIP, es importante recopilar una historia clínica detallada, que incluya antecedentes personales y familiares. Se recomienda encarecidamente el uso de un BAT validado como el BAT del ISTH. Los antecedentes también deben incluir los antecedentes farmacológicos, la ingesta reciente de alimentos que posiblemente puedan interferir con la función plaquetaria y la presencia de otras características (p. ej., eccema, infecciones recurrentes, casos familiares de mielodisplasia, LMA) y posibles características sindrómicas (p. ej., pérdida de audición, defectos cardíacos, dismorfia facial u ósea, albinismo) que pueden ayudar en el diagnóstico. Las investigaciones preliminares de laboratorio deben incluir un hemograma completo, incluido el recuento de plaquetas, el examen de una muestra de sangre para buscar la morfología de las plaquetas y otras características de las células sanguíneas (ver más abajo), la determinación del tiempo de sangrado cutáneo (descrito en la sección 11), las pruebas de cribado para las pruebas hemostáticas secundarias (TP y TTPA) y el ensayo de fibrinógeno para excluir otros trastornos de la coagulación. Se recomienda realizar pruebas de detección de la EVW (es decir, actividad del FVW, antígeno del FVW) al mismo tiempo o antes de un estudio más extenso para los trastornos de la función plaquetaria. La enfermedad de Von Willebrand, la enfermedad de Von Willebrand tipo 2B y la enfermedad de Von Willebrand por tipo de plaquetas también pueden presentarse con macrotrombocitopenia y también deben considerarse en pacientes con recuentos bajos de plaquetas. Otra prueba sencilla que puede dar una indicación de la presencia de un defecto en la función plaquetaria es el método de retracción del coágulo, que se describe a continuación.

Retracción del coágulo: La retracción del coágulo en la sangre entera coagulada puede dar una indicación del número y la función de las plaquetas. Cuando el coágulo se retrae, se expone el suero y se puede medir el grado de retracción del coágulo.

Método: Recoja 1 ml de sangre en un tubo de ensayo de vidrio (75 mm x 10 mm) y colóquelo a 37 ° C. Examine el tubo visualmente hasta que quede un coágulo firme. Dejar reposar a 37 °C durante una hora más. Mida la distancia desde la base del tubo hasta el menisco. Retire con cuidado el coágulo con un palito fino de madera (por ejemplo, un palito de cóctel), dejando el suero que se ha extraído del coágulo en el tubo. Mide la distancia desde la base del tubo hasta el menisco del suero. Divide la distancia del suero por la distancia total y multiplícala por 100 para obtener un porcentaje.

Interpretación: Normalmente, se expresa más del 40% de suero. Una disminución de la expresión está presente en algunos defectos plaquetarios, en particular la trombastenia de Glanzmann. También puede ser anormal en la tromobocitopenia grave, el síndrome de Wiskott Aldrich y el síndrome de Stormorken.

Notas: Los tubos y el palillo de madera deben estar absolutamente limpios para evitar que el coágulo se adhiera al tubo. El coágulo debe retirarse con cuidado y suavidad para evitar que se exprima y, por lo tanto, se extraiga más suero.

Recuento de plaquetas, morfología y examen del frotis de sangre periférica: las pruebas iniciales para un presunto trastorno de la función plaquetaria deben incluir un hemograma completo junto con una evaluación del frotis de sangre periférica. Esto ayuda a detectar anomalías en el número, el tamaño y la morfología de las plaquetas, lo que puede proporcionar pistas importantes para posteriores pruebas de laboratorio. El recuento de plaquetas se puede medir mediante un método microscópico manual, un recuento automatizado en analizadores de hematología y un marcaje inmunológico basado en citometría de flujo. La estimación del recuento de plaquetas en el frotis periférico debe realizarse para confirmar el recuento de plaquetas, especialmente en casos de macrotrombocitopenia o anisocitosis plaquetaria. En un frotis bien preparado y teñido, se cuenta el número promedio de plaquetas en 10 campos de inmersión en aceite (100x). Este valor debe multiplicarse por 15.000 para determinar el recuento de plaquetas/µL. Es importante revisar el frotis para evaluar los aglomerados de plaquetas, el tamaño de las plaquetas, la morfología y la granularidad. Se debe excluir la pseudotrombocitopenia debida a la aglomeración de plaquetas dependiente de EDTA y al satelitismo (neutrofilos que forman rosetas con las plaquetas). Es importante recordar que los aglomerados de plaquetas también se pueden ver en la EVW de tipo plaquetario o tipo 2B y no deben confundirse con la aglomeración inducida por EDTA. La EVW de tipo plaquetaria también puede mostrar plaquetas grandes en el frotis. Un tamaño anormal de las plaquetas suele ser una característica de los trastornos plaquetarios hereditarios (con o sin disfunción plaquetaria), como se muestra a continuación:

- Plaquetas pequeñas: síndrome de Wiskott-Aldrich, trombocitopenia ligada al cromosoma X, deficiencia de ADAP
- Plaquetas grandes/gigantes: síndrome de Bernard Soulier (gigantes), trastornos relacionados con MYH9 (gigante), síndrome de plaquetas grises y síndromes de deficiencia de α gránulos, EVW tipo plaquetas, trombocitopenia relacionada con ITGA2B/ITGB3 (variante GT), filaminopatía, trombocitopenia relacionada con SLFN14, defectos de GATA1, síndrome velocardiofacial
- Plaquetas normales: todos los demás trastornos

El volumen plaquetario medio (VPM) es un parámetro fácilmente disponible en los analizadores hematológicos de recuento de plaquetas basado en impedancia y proporciona una estimación sobre el tamaño de las plaquetas. Los laboratorios deben establecer sus propios rangos de referencia, ya que el VPM puede variar de un instrumento a otro. Las plaquetas pequeñas pueden pasarse por alto fácilmente por la microscopía óptica y un MPV reducido podría ser una primera pista para un posible síndrome de Wiskott Aldrich. Varios factores pueden afectar la medición del MPV e interferir con el recuento de plaquetas basado en la impedancia, como las anomalías de los glóbulos rojos y las plaquetas. La presencia de glóbulos rojos microcíticos y fragmentados puede sobrestimar los recuentos de plaquetas, mientras que la presencia de plaquetas grandes y/o gigantes puede pasar desapercibida, lo que provoca una subestimación de los recuentos de plaquetas. En estos escenarios, los recuentos de plaquetas y el MPV no serán confiables. Es muy útil observar concomitantemente el histograma de plaquetas que puede identificar anomalías en el tamaño de las plaquetas y posibles interferencias/contaminación. En la macrotrombocitopenia, los recuentos ópticos o fluorescentes de plaquetas proporcionan recuentos de plaquetas más verdaderos. En el síndrome de plaquetas grises se pueden observar plaquetas grandes y pálidas con citoplasma gris azulado con gránulos azurófilos ausentes o marcadamente reducidos debido a la deficiencia de gránulos α. El síndrome de Paris Trousseau muestra plaquetas de grandes a gigantes, algunas de las cuales muestran gránulos A aglomerados/fusionados que forman un gránulo grande y aglomerados. La anisocitosis plaquetaria (es decir, la variación en el tamaño de las plaquetas) y la anisogranularidad (es

decir, la variación de la granularidad de las plaquetas) con presencia de plaquetas de aspecto vacío y pálido es una característica clásica de la disfunción plaquetaria adquirida con eosinofilia (APDE). La DPA es una diátesis hemorrágica transitoria asociada a la eosinofilia, que se presenta con frecuencia en niños del sudeste asiático y se revierte con el tratamiento de la eosinofilia. Las anomalías morfológicas también se pueden observar en otras células sanguíneas. Presencia de cuerpos de inclusión similares a Dohle en neutrófilos en trastornos relacionados con MYH9, gránulos citoplasmáticos gigantes positivos para peroxidasa en neutrófilos y/u otros leucocitos en el síndrome de Chediak Higashi, cuerpos de Howell Jolly en el síndrome de Stormoken y diseritropoyesis en mutaciones de GATA-1.

Medición de la agregación plaquetaria mediante agregación de transmisión de luz: La agregometría de transmisión de luz (LTA) es el estándar de oro para las pruebas de función plaquetaria. Fue descrito por primera vez de forma independiente por O'Brien y Born en la década de 1960. El principio se basa en los cambios en la densidad óptica del plasma rico en plaquetas (PRP) a medida que las plaquetas se activan y forman agregados. El PRP es turbio debido a la suspensión de plaquetas en comparación con el PPP. Una vez que se agregan agonistas al PRP, las plaquetas forman agregados y se sedimentan, limpiando así el plasma y permitiendo que pase más luz. El cambio en la luz transmitida se mide a lo largo del tiempo mediante un agregador y se representa gráficamente. Al comparar el patrón de respuesta de agregación con cada agonista, se puede sospechar y diagnosticar el tipo de trastorno de la función plaquetaria. Se han publicado una serie de excelentes revisiones y guías para las pruebas de función plaquetaria y el diagnóstico de los THFP.

Precauciones previas al estudio de la agregación plaquetaria (variables preanalíticas en la agregación plaquetaria): Las muestras de sangre para la LTA deben recogerse después de un breve período de descanso. Los sujetos deben abstenerse de fumar durante al menos 30 minutos antes y de tomar cafeína al menos 2 horas antes de la prueba. Se debe documentar un registro de todos los medicamentos, incluidos los medicamentos nativos/herbales tomados durante los últimos 10 días. Para obtener una lista de fármacos que pueden interferir con la función plaquetaria, consulte las guías de la Sociedad Británica de Hematología sobre las pruebas de función plaquetaria a las que se hace referencia a continuación. Los fármacos que se sabe que inhiben reversiblemente la función plaquetaria (por ejemplo, los AINE) deben suspenderse al menos 3 días antes de la toma de muestras. Los fármacos que se sabe que inhiben irreversiblemente la función plaquetaria (por ejemplo, aspirina, tienopiridinas) deben suspenderse al menos 10 días antes de la toma de muestras, a menos que su efecto esté siendo investigado específicamente. Lo ideal es que los pacientes estén en ayunas, preferiblemente después del ayuno nocturno. Si no está en ayunas, evite tomar muestras después de las comidas grasosas. Muchos otros componentes dietéticos "normales", como el alcohol, las cebollas, el ajo, el pimiento y el jengibre, también pueden inhibir la agregación plaquetaria. Esto debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar los resultados. La sangre debe extraerse con venostasis mínima o sin venostasis utilizando una aguja de al menos calibre 21 en un anticoagulante tamponado con citrato de sodio de 109 mM o 129 mM. Los primeros 3-4 ml de sangre extraída deben desecharse o utilizarse para pruebas distintas de la LTA (por ejemplo, TP/TTPA). Cuando la recolección de muestras es difícil, los tubos con llenado insuficiente solo se pueden usar para excluir defectos graves de la función plaquetaria, como la trombastenia de Glanzmann o el síndrome de Bernard-Soulier.

Preparación de plasma rico en plaquetas y pobre en plaquetas: Las muestras de sangre deben dejarse "reposar" a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos antes de la centrifugación. La refrigeración de las plaquetas puede causar activación y, por lo tanto, las muestras siempre deben mantenerse a temperatura ambiente. El PRP debe prepararse centrifugando muestras de sangre a 200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (~21 °C) sin utilizar un freno. Para muestras con plaquetas muy grandes, como el síndrome de Bernard-Soulier, el PRP debe prepararse mediante sedimentación sanguínea durante 30 minutos. El PRP se retira cuidadosamente, evitando la contaminación con glóbulos rojos o la capa leucocitaria (la agregación disminuirá si alguno de los dos está presente), en un tubo de polipropileno tapado que se mantiene en posición vertical a 20-25 ° C. El PPP debe prepararse centrifugando sangre completa, o los tubos de sangre de los que se extrajo el PRP, a temperatura ambiente a 1500 g durante

15 minutos. Las muestras hemolizadas macroscópicas deben ser rechazadas. Si la muestra es lipémica, indíquelo en el informe final. Es necesario comprobar el recuento de plaquetas del PRP. Los resultados de los estudios de LTA pueden ser inexactos cuando el recuento de plaquetas en la muestra de PRP es inferior a 150 x 109/l. Las muestras con recuentos bajos de plaquetas deben interpretarse con precaución, pero se pueden analizar para excluir trastornos graves de la función plaquetaria, como la trombastenia de Glanzmann, el síndrome de Bernard Soulier, la EVW tipo 2B y la EVW plaquetaria. El recuento de plaquetas de las muestras de PRP NO debe ajustarse a un valor estandarizado con PPP autólogo. El recuento de plaquetas en PRP en muestras de sujetos con recuento de plaquetas normal (200-600 x 109/l) no afecta a los resultados de los estudios de LTA. El ajuste del recuento de plaquetas en PRP utilizando PPP autólogo dentro de este rango puede inhibir la capacidad de respuesta de las plaquetas. Esto se debe probablemente a que el PPP puede contener sustancias liberadas por las plaquetas durante el trauma adicional de la centrifugación a mayor velocidad utilizada en la preparación del PPP. Persiste la incertidumbre sobre cuál es la mejor práctica a seguir cuando el recuento de plaquetas en PRP supera las 600 x 109/l. Para recuentos de PRP extremadamente altos (>1000 x 109/l), puede ser ventajoso ajustar el recuento de plaquetas a un nivel más adecuado con el PPP del paciente.

Agentes agregantes o agonistas: Hay dos tipos de agonistas, agonistas débiles y agonistas fuertes. Los agonistas débiles (por ejemplo, ADP y epinefrina) en concentraciones críticas muestran una onda primaria inicial de agregación debido al efecto inducido directamente por el agonista, seguida de una onda secundaria de agregación causada por la liberación de gránulos de plaquetas y la síntesis de TXA2. Por otro lado, los agonistas fuertes (por ejemplo, trombina, colágeno, TXA2) muestran una sola curva sin distinción entre agregación primaria y secundaria, ya que estos agonistas inducen directamente la agregación plaquetaria, la síntesis de TXA2 y la liberación de gránulos. En la figura 22 se muestran las diferentes fases de la agregación plaquetaria, que solo se evidencia con agonistas débiles.

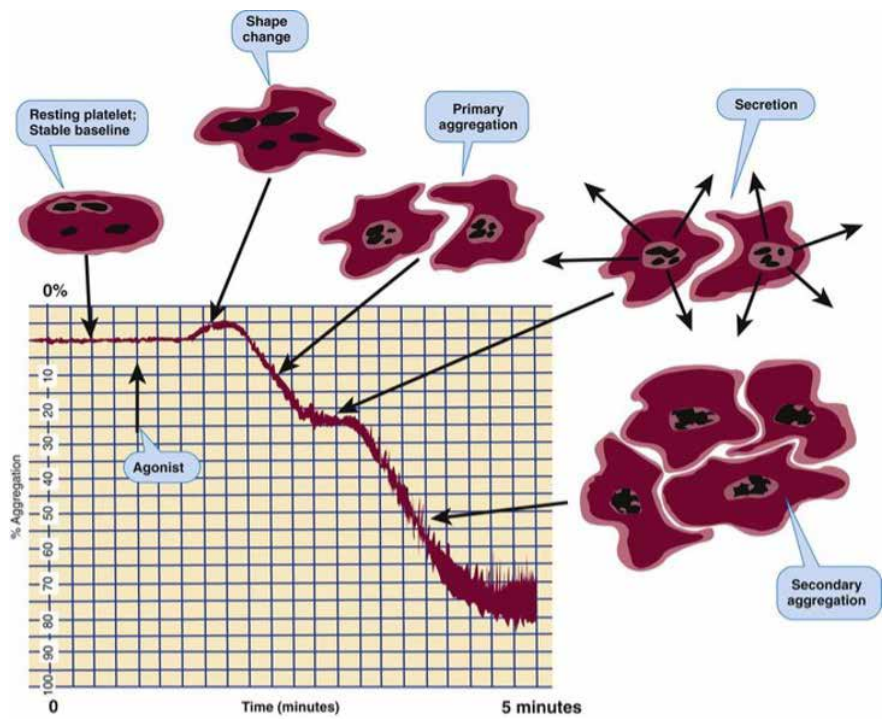


Figura 22. Imagen de Hematología de Rodak: Principios clínicos y aplicaciones, 5ª edición

Tabla 33. Resumen de los agonistas recomendados junto con las concentraciones que se pueden utilizar como panel inicial y panel ampliado (concentraciones según las guías de I STH)

Agonista	Panel inicial y concentración	Panel extendido y concentración
ADP*	2 µM	5 µM, 10 µM
Epinefrina*	5 µM	10 µM
Colágeno (Horm o fibrilar tipo 1)	2 µg/ml	
Ácido araquidónico	1mM	
Ristocetina (dosis baja)	0.5-0.7 mg/ml	
Ristocetina (dosis alta)	1.2-1.5 mg/ml	
Péptido activador del receptor de trombina (TRAP)*, PARI	-	10 µM
Tromboxano A2 mimético U46619	-	1 µM

*Se deben usar concentraciones más altas si se observan resultados anormales con la concentración inicial.

Adenosina-5-difosfato (ADP): Se prepara una solución madre de 1 mM/l de sal disódica en OBS y se almacena en pequeñas cantidades a -40 °C. Esto es estable durante al menos tres meses. Una vez descongelada, la solución debe usarse dentro de las tres horas o desecharse. Para su uso, se preparan diluciones adicionales en OBS. El patrón de respuesta al ADP depende de su concentración final. A 2 pmol/l, se pueden ver ondas primarias y secundarias claramente definidas: la primera representa el efecto inducido por agonistas directos y la segunda se debe a la liberación de ADP endógeno y a la generación de TXA2, que a su vez agrega plaquetas. Por debajo de 2 pmol/l, un número cada vez menor de sujetos normales muestran una respuesta secundaria, y la onda primaria suele invertirse a medida que el ADP se degrada enzimáticamente. Por encima de 3 pmol/l, la fase primaria suele ser tan intensa que se enmascara la distinción entre ella y la fase secundaria. El ADP induce un cambio en la forma de las plaquetas de un disco a una esfera puntiaguda. Esto provoca inicialmente un ligero aumento en la densidad óptica de la suspensión plaquetaria, que solo se puede ver si la agregación primaria está afectada.

Adrenalina (epinefrina): Se prepara una solución madre de 1 mM/l de sal de bitartrato en OBS. Debe almacenarse y utilizarse como para ADR. Con la adrenalina, las concentraciones utilizadas y los patrones de respuesta son similares a los de la ADR. Sin embargo, en ausencia de una onda secundaria, la onda primaria no se invierte, ni es tan intensa que la onda secundaria quede enmascarada.

Colágeno: Una suspensión muy estable de fibrillas de colágeno del tendón equino (1 mg/ml), disponible en Hormon-Chemie, Munich, Alemania, es ampliamente utilizada. Una serie de otros materiales son igualmente adecuados. Se almacena a 4 °C y debe mezclarse bien inmediatamente antes de la dilución en el tampón envasado con él. Debe utilizarse a una concentración final de 0,5-2,0 µg/ml en PRP, y las suspensiones diluidas son estables durante una semana a 4 °C. Con el colágeno, no se produce una onda primaria. La respuesta suele definirse por la duración de la fase de retraso antes del inicio de la agregación y por la intensidad de esta última. Un ligero aumento en la densidad óptica causado por el cambio de forma precede a la agregación. El colágeno de varias fuentes diferentes está en uso. Tanto el tipo de colágeno como la especie a partir de la cual se prepara el preparado (por ejemplo, equino o bovino) pueden tener un efecto importante en los resultados obtenidos. De hecho, se requiere un rango de concentraciones más de cien veces, dependiendo del material de origen. Por lo tanto, es importante seleccionar una fuente adecuada y establecer un rango de referencia local para este material, que debe ser reevaluado si se cambia la fuente. Para una revisión, véase Jennings et al. (2008).

Ristocetina: A una concentración final de ristocetina de 1 mg/ml en PRP, generalmente se distinguen ondas primarias y secundarias distintas, pero por encima de esto el efecto directo es tan intenso que las dos fases se fusionan. La onda primaria es una medida de la cantidad de FVW presente en el plasma, mientras que la segunda onda se debe a la liberación de sustancias endógenas.

Ácido araquidónico: El araquidonato de sodio (99% de pureza) se disuelve en OBS a una concentración de 10mM/1. Las pequeñas alícuotas se colocan en viales de vidrio oscurecido que se enjuagan con nitrógeno para evitar la oxidación, luego se tapan herméticamente y se almacenan congelados por debajo de -20 ° C. La agregación es generalmente monofásica y está precedida por una breve fase de retraso.

Reactivos: A continuación, se muestran algunos ejemplos de concentraciones y diluciones de reactivos

Nota: Estas concentraciones son apropiadas si se añade una parte a nueve partes de PRP. Las diluciones se pueden hacer en agua destilada o solución salina, o según las instrucciones del fabricante.

- ✓ ADP (solución madre 1000 µM)

Haga una dilución 1 en 10 = 100 µM (es decir, 0,1 ml de solución de 10.000 µM + 0,9 ml de OBS). A partir de esto, haga las concentraciones de trabajo adecuadas: 20 µM (es decir, 0,2 ml 100 µM + 0,8 ml OBS), concentración final de PRP de 2-50 µM (es decir, 0,5 ml 100 µM + 0,5 ml OBS), concentración final de PRP de 5 µM. En los casos en los que se está probando la hiperagregabilidad, es posible que se necesiten fuerzas de trabajo de menor concentración (por ejemplo, 10 µM, 5 µM).

- ✓ *Adrenalina (epinefrina):* Diluir como para ADP para hacer una fuerza de trabajo de 50 µM. Esto dará una concentración final de PRP de 5 µM.
- ✓ *Colágeno:* Mezclar bien y diluir en OB/otros diluyentes: 1 en 500 (es decir, 0,1 ml de solución madre + 4,9 ml de OBS) = 20 µg/ml, concentración final de PRP de 2 µg/ml
- ✓ *Ristocetina:* Se utiliza hasta en dos concentraciones diferentes en función de los resultados obtenidos. Ristocetina en dosis normales de 15 mg/ml o 12,5 mg/ml, y ristocetina baja en 7,5 mg/ml o 5 mg/ml. Esto dará una concentración final de PRP de 1,5 mg/ml o 1,25 mg/ml, y una dosis baja de ristocetina de 0,75 mg/ml o 0,5 mg/ml respectivamente, dependiendo de la concentración utilizada.

Método/procedimiento: Los estudios de LTA deben completarse en un máximo de 4 horas después de la toma de muestras de sangre. Debido a la refractariedad de las plaquetas a la agregación después de la centrifugación, las muestras de PRP deben dejarse reposar a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos antes de la prueba. El PRP debe almacenarse en tubos completos y herméticamente tapados hasta que se realice la prueba. Antes de comenzar, lleve los reactivos/agonistas a temperatura ambiente. Prepare diluciones frescas de reactivos si es necesario. Encienda el agregador y la computadora/grabadora y espere hasta que la temperatura del agregador alcance los 37 °C. Ajuste la velocidad de agitación a 1000 rpm a menos que el fabricante del agregador especifique lo contrario. Pipetee 450 µl de PRP en una cubeta de vidrio con una barra de agitación magnética. El número de cubetas utilizadas depende del número de agonistas que se van a analizar. Precaliente las cubetas de PRP en los pocillos de incubación que rodean el bloque calefactor durante 2-5 minutos. Pipetee 500 µl de PPP en otra cubeta de vidrio sin barra de agitación y colocar en el pocillo de referencia en el blanco correspondiente. Se deben utilizar PRP y PPP autólogos para establecer la transmisión de luz del 0% y el 100% en el agregador. Deje correr durante 1 minuto antes de agregar el agonista. Pipetear 50 µl de agonista en el fondo de la cubeta de PRP sin producir burbujas. El volumen de agonista añadido para la LTA debe ser consistente y nunca más del 10% del volumen total de la muestra. Una muestra conocida de control debe correrse en paralelo con la del paciente. La agregación plaquetaria debe controlarse durante un mínimo de 3 minutos después de agregar un agonista, y hasta 10 minutos para los agonistas que no alcanzan la agregación máxima a los 3-5 minutos. Repita el procedimiento para cada agonista.

Notas: Si se observa una respuesta anormal con el panel inicial de agonistas, se puede agregar un panel extendido adicional (Tabla 35) junto con la liberación de ATP mediante lumiaggregometría (ver más abajo). Se deben utilizar concentraciones más altas de agonistas (por ejemplo, ADP, epinefrina) si se observa una respuesta anormal en la concentración inicial. Si no se observa ninguna respuesta de agregación con el ácido araquidónico, agregue el agonista, análogo del receptor TXA_2 (TRA), U46619. En los defectos de

síntesis de TXA_2 (deficiencia de COX/TXA_2 sintasa) o en el efecto de la aspirina, se observa una respuesta normal con TRA. En los casos de defecto del receptor TXA_2, se observan respuestas anormales tanto con el ácido araquidónico como con el TRA. Se puede observar una respuesta anormal aislada con epinefrina en una proporción de sujetos sanos. Sin embargo, esta puede ser la única característica de LTA del síndrome de plaquetas de Quebec. Cuando se estudia la agregación plaquetaria como parte de una evaluación de la hiperagregabilidad, el ADP y la adrenalina se utilizan en concentraciones más bajas para obtener una curva de dosis-respuesta. Las concentraciones utilizadas son: 2 µM, 1 µM, 0,5 µM y 0,1 µM de concentración final en PRP. También se realiza una agregación espontánea antes de probar el resto de los agonistas. Si las plaquetas se hiperagregan con 0,5 mg/ml de ristocetina, esto indica una posible EVW de tipo 2B o de tipo plaquetaria. Compruebe la agregación espontánea mediante el seguimiento del PRP en las mismas condiciones de agitación en el agregador sin añadir ningún agonista para estimular la agregación. Realice estudios de mezcla para diferenciar entre los dos subtipos. Esto se puede hacer mediante dos métodos. Procedimiento básico: Mezclar volúmenes iguales de plasma del paciente con plaquetas normales (es decir, 225 µl de PPP del paciente + 225 µl de PRP de control). A continuación, esta mezcla se analiza con ristocetina a 0,5 mg/ml. Si hay aglutinación, sugiere la EVW tipo 2B. La ausencia de aglutinación puede deberse a una EVW de tipo plaquetario. Es importante tener en cuenta que una respuesta ausente también puede deberse a la dilución adicional de PRP.

Procedimiento alternativo: Lavar al paciente y controlar las plaquetas tres veces con PBS-EDTA en tubos de centrífuga de 15 ml (baja velocidad de centrifugación para blandir las plaquetas). Resuspender cuidadosamente las plaquetas del paciente en plasma normal y las plaquetas normales en el plasma del paciente. Ajuste el recuento de plaquetas a 400 x 106 plaquetas granuladas. (Tenga en cuenta que el PBS-EDTA se prepara agregando 9 mM de EDTA disódico al PBS y ajustando el pH a 7.0. El PBS utilizado contiene 135 mM de NaCl, 2,6 mM de KCl, 8 mM de Na_2HPO_4 y 1,5 mM de KH_2PO_4, con un pH de 7,4). Repetir la prueba con ristocetina a 0,5 mg/ml. Las reacciones deben ajustarse a uno de los siguientes patrones.

Tabla 34. Interpretación de la EVW tipo 2B y de plaquetas

Tubo 1	Plaquetas lavadas del paciente + PPP de control	Sin aglutinación	Aglutinación
Tubo 2	Plaquetas lavadas del control + PPP del paciente	Aglutinación	Sin aglutinación
	INTERPRETACIÓN	EVW Tipo 2 B	EVW por tipo de plaquetas

Las guías de la EVW de 2021 favorecen el uso de pruebas genéticas específicas para el diagnóstico de la EVW tipo 2B y de tipo plaquetario. Sin embargo, esto puede no ser factible para muchos laboratorios debido a las limitaciones de costos. El estudio de mezcla RIPA todavía se mantiene como una de las pruebas en el algoritmo de diagnóstico según I STH.

Interpretación e informe de los resultados: El rastreo de la agregación plaquetaria debe evaluarse en función de la presencia de cambio de forma, la duración de la fase de retraso (algunos agonistas como el colágeno pueden tener una fase de retraso más larga), la agregación máxima (el método más conveniente y comúnmente utilizado para reportar los resultados), la pendiente de agregación (indica la tasa de agregación), el examen visual de los trazados de agregación (es decir, la desagregación). dosis bajas de ADP). La desagregación con ADP es particularmente llamativa con los defectos P2Y12 heredados. El PRP preparado de la misma manera a partir de un donante normal sano debe procesarse y correrse simultáneamente con el paciente como control de los reactivos. Esto es especialmente importante si se obtienen resultados anormales en el paciente, ya que algunos agonistas son lábiles, especialmente una vez diluidos a concentraciones de trabajo. Los laboratorios clínicos deben establecer intervalos de referencia apropiados para la concentración de cada agonista. Los resultados de sujetos normales sanos evaluados junto con el paciente se pueden utilizar para derivar rangos de referencia. Se requiere mucha precaución al interpretar los patrones de agregación plaquetaria. Una serie de factores técnicos pueden influir en los resultados. Hay que tener en cuenta que hay una serie de diferencias importantes entre la agregación

determinada por nefelometría y la que se produce en el organismo. No obstante, se puede obtener información diagnóstica útil, y en la Tabla 35 se muestran algunos ejemplos de patrones de agregación.

Tabla 35. La agregación plaquetaria da lugar a diversos trastornos

Desorden	ADP	Colágeno	Ristocetina 1,25 mg/ ml	Ristocetina 0,5 mg/ml	Ácido araquidónico	Adrenalina
EVW tipo 1 y 2A	N	N	A/R**	A	N	N
EVW tipo 2B	N	N	N	H	N	N
Síndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Trombastenia de Glanzmann	A	A	N	A	A	A
Enfermedad por almacenamiento de plasma combinado	P/N	R/N	N	A	R/N	P/N
Defecto de la ciclooxigenasa*	R/N	R	N	A	R/A	R/N

N = Normal; A = Ausente; R = Reducido; H = Respuesta intensificada; P = Solo onda primaria
*O efecto por aspirina
**Puede ser normal en la EVW tipo 1 de tipo silvestre o no mutada

Investigación adicional de la función plaquetaria: Si se observa un patrón de agregación anormal en un individuo, es aconsejable repetir la evaluación al menos una vez más para comprobar la consistencia de la anomalía. En presencia de una agregación anormal, puede ser útil realizar más investigaciones. Estos incluyen la medición del contenido de nucleótidos plaquetarios y su liberación durante la agregación plaquetaria. La cuantificación de las glicoproteínas de membrana se puede realizar para el diagnóstico inequívoco del síndrome de Bernard-Soulier y la trombastenia de Glanzmann (ver más abajo).

Liberación de ATP por lumiaggregometría: La lumiaggregometría es el método más utilizado para evaluar la función de liberación de gránulos densos plaquetarios. Tiene la ventaja de que la liberación de LTA y ATP de gránulos densos se puede medir simultáneamente. Se basa en el principio de la reacción luciferina-luciferasa. Cuando las plaquetas se activan, los gránulos densos liberan su ATP y ADP almacenados. El ATP liberado reacciona con la luciferina en presencia de luciferasa para dar luminiscencia que se puede cuantificar, en relación con un estándar de ATP. La secreción defectuosa de ATP se puede observar tanto en la deficiencia de gránulos densos como en los defectos de secreción primaria. La distinción entre las dos entidades requiere pruebas adicionales, como la medición del contenido total de ATP-ADP plaquetario mediante ensayos bioluminiscentes, ensayos de liberación de serotonina con 14C-5-HT radiomarcado, ensayo de mepacrina mediante citometría de flujo (ver más abajo) o evaluación de gránulos densos mediante microscopía electrónica de transmisión de montaje completo.

Tabla 36. Factores técnicos que influyen en la función plaquetaria

Anticoagulante	1/10avo volumen de citrato trisódico.
Hora	Comience las pruebas 30 minutos después de la preparación del PRP. Complete los estudios dentro de las cuatro horas posteriores a la extracción de sangre.
Centrifugación	Debería ser suficiente para eliminar los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, pero no las plaquetas grandes. Debe hacerse a temperatura ambiente, no a 4°C. Las plaquetas grandes se pueden separar por sedimentación.
Conteo plaquetario	Los recuentos bajos <100 x 10^9/l provocan respuestas lentas y débiles. Los recuentos altos >1000 x 10^9/l pueden mostrar una respuesta reducida.
pH	<pH 7.7 inhibe la agregación. >pH 8.0 mejora la agregación.
Velocidad de mezcla	<800 rpm muestra una agregación reducida. >1200 rpm rompe los aglomerados de plaquetas.
Hematocrito	>55% muestra progresivamente menos agregación, especialmente inhibición en la segunda fase debido al aumento de la concentración de citrato.
Temperatura	<35 °C muestra una disminución de la agregación con dosis regulares de todos los agonistas, pero una mayor respuesta a dosis bajas de ADP.
Lipemia	El aumento de quilomicrones provoca una reducción de la agregación.
Cubeta sucia	Puede causar una agregación espontánea aparente.
Sin barra de agitación	No hay respuesta sobre la adición del agente agregante
Burbujas de aire	Oscilaciones rápidas y grandes de la pluma antes de la agregación. También es causada por un recuento bajo de plaquetas.

Diferencias entre las condiciones in vivo e in vitro para la agregación plaquetaria: Con los análisis de sangre in vitro, la sangre se anticoagula, se eliminan los glóbulos rojos y los leucocitos, los componentes vasculares no están involucrados, la coagulación no está involucrada, se selecciona la población plaquetaria, se retienen los productos de activación y liberación de plaquetas, los reactivos utilizados son no fisiológicos en composición y dosis, las plaquetas son inestables fuera del cuerpo, y los fármacos pueden mostrar efectos más o menos marcados que in vivo.

Pruebas de función plaquetaria por citometría de flujo: La citometría de flujo puede proporcionar información útil para el diagnóstico y la clasificación de los trastornos de la función plaquetaria. Se puede utilizar para el análisis de los receptores de glicoproteínas, las pruebas de función plaquetaria después de la estimulación con agonistas, la medición de la función procoagulante plaquetaria (por ejemplo, la fijación de la anexina V) y la evaluación del contenido de gránulos alfa y densos. Las principales ventajas de la citometría de flujo son el requisito de pequeños volúmenes de muestra, se puede realizar en sangre total y no está limitada por la trombocitopenia. Esto se vuelve particularmente útil en sujetos pediátricos y trombocitopénicos.

Análisis de glicoproteínas de superficie plaquetaria por citometría de flujo: la trombastenia de Glanzmann, caracterizada por una αIIbβ3 anormal o ausente, puede detectarse con anticuerpos monoclonales GPIIb (CD41) o CDIIIa (CD61) marcados con fluorescencia, y el síndrome de Bernard Soulier, caracterizado por GP1 b/V/IX anormal o ausente, puede diagnosticarse utilizando anticuerpos dirigidos contra anticuerpos GPIb (CD42b) o GPIX (CD42a). Además, otras THFP menos comunes que afectan a los receptores α2β1 (CD49/CD29), GPIV (CD36) o GPVI también pueden diagnosticarse utilizando los anticuerpos respectivos. El análisis de las moléculas de superficie se puede realizar incluso hasta 24 horas después de la recolección. Prueba de activación plaquetaria por citometría de flujo (PACT). La PACT permite la medición simultánea de una amplia gama de diferentes marcadores de activación de la función plaquetaria, lo que permite un

análisis más completo de las diversas vías involucradas en la función plaquetaria. Las plaquetas pueden identificarse por sus características propiedades de dispersión lateral frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) y, preferiblemente, mediante la adición de un receptor de glicoproteína específico (por ejemplo, CD41). Algunos de los marcadores de activación más utilizados son: PAC-1 (anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la forma de conformación activada de αIIbβ3), CD62P o P-selectina (uno de los contenidos de los gránulos α, puede utilizarse como marcador de la liberación de gránulos α) y CD63 (puede utilizarse como marcador de la liberación de gránulos δ). Las pruebas se pueden realizar utilizando una combinación de agonistas para dirigirse a diferentes como el ADP, el péptido activador del receptor de trombina (TRAP) y la convulxina. La expresión de los marcadores de activación en las plaquetas se mide (utilizando MFI y/o %) al inicio (antes de añadir el agonista) y después de la estimulación del agonista. Una expresión reducida después de la estimulación con agonistas sugiere un defecto/anomalía en la vía específica. Es importante correr una muestra de control simultáneamente de manera similar a LTA.

Fijación del FVW inducido por ristocetina por citometría de flujo: La función del receptor GP1b/V/IX y el FVW también puede evaluarse mediante citometría de flujo midiendo la expresión de FVW en las plaquetas después de la adición de dosis normales y bajas de ristocetina. Se puede utilizar un anticuerpo monoclonal contra el FVW. La mezcla de estudios con plasma de pacientes y plasma de control y viceversa a dosis bajas de ristocetina puede diferenciar entre el tipo 2B y la EVW por tipo de plaquetas.

Ensayo de captación y liberación de mepacrina mediante citometría de flujo: El ensayo de captación y liberación de mepacrina también puede utilizarse para evaluar defectos de 6 gránulos. La mepacrina es un derivado fluorescente de la acridina que se une a los nucleótidos de adenosina plaquetaria con alta afinidad. Después de la incubación de las plaquetas con mepacrina a 37 °C durante 30 minutos, es absorbida selectivamente por gránulos densos que se pueden medir mediante el aumento de la fluorescencia mediante citometría de flujo. La función de liberación también puede evaluarse midiendo la fluorescencia de la mepacrina después de la estimulación con agonistas (por ejemplo, convulxina o TRAP). La fluorescencia se mide al inicio del estudio (solo plaquetas), después de la adición de mepacrina (plaquetas + mepacrina) y después de la adición de un agonista (plaquetas + mepacrina + agonista). Se pueden calcular las relaciones de absorción y liberación. La disminución de la absorción y liberación se observa en la deficiencia de gránulos densos, mientras que una absorción normal con liberación reducida se observa en los defectos de secreción.

Actividad procoagulante plaquetaria: Tras la estimulación simultánea de las plaquetas con convulxina y trombina, un subconjunto de plaquetas expresa fosfolípido procoagulante aniónico, fosfatidilserina en la superficie de las plaquetas activadas. Esto puede evaluarse utilizando anexina V o lactadherina marcada con fluorescencia, que se une a la fosfatidilserina. La translocación de fosfolípidos procoagulantes facilita el ensamblaje de factores de coagulación para la generación de trombina en la superficie de las plaquetas. La citometría de flujo permite detectar la alteración (síndrome de Scott) o el aumento de la actividad procoagulante (síndrome de Stormoken) y sus síndromes asociados.

Tabla 37a. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de los receptores de glicoproteínas					
Tromboastenia de Glanzmann	ITGA2B, ITGB3	Normal	Ausencia de respuesta a todos los agonistas, excepto la aglutinación a la ristocetina	La citometría de flujo identifica la deficiencia de GPIIb/GPIIIa	Hemorragia autosómica recesiva grave
Trombocitopenia relacionada con ITGA2B/ITGB3	ITGA2B, ITGB3	Macrotrombocitopenia con anisocitosis	Respuesta ausente/ deficiente a todos los agonistas excepto la aglutinación a la ristocetina	Reducción de la expresión de GPIIb/ GPIIIa Expresión defectuosa de PAC1	Sangrado autosómico dominante, de leve a moderado
Síndrome de Bernard Soulier	GP1BA, GP1BB, GP9	Macrothrombocytopaenia	Ausencia de respuesta aglutinante a la ristocetina	La citometría de flujo identifica la deficiencia de GP1b-IX-V	Hemorragia autosómica recesiva, moderada/grave
DiGeorge/ Síndrome velocardiofacial/ Síndrome de deleción 22q11.2	Del22q11.2	Recuentos de plaquetas normales/levemente reducidos con plaquetas grandes.	Agregación normal/variable (respuesta reducida a Ristocetina en ~30% de los casos)	Reducción de la expresión de GP1 b/IX/V por citometría de flujo	Paladar hendido, defectos cardíacos, facies anormal, discapacidades del desarrollo, inmunodeficiencia, sangrado leve a significativo
Tipo de plaquetas EVW	Mutación de ganancia de función en GP1BA	Macrotrombocitopenia, grupos de plaquetas	Aumento de la aglutinación con baja concentración de ristocetina	Reducción de multímeros de FVW de alto peso molecular (reducción de la actividad del FVW)	Sangrado autosómico dominante, de leve a moderado
Defectos de los receptores de colágeno	GP6 ND	Normal	Respuesta aislada de agregación reducida al colágeno	Deficiencia de GPVI o a2|31 por citometría de flujo	Sangrado autosómico recesivo, leve

Tabla 37b. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Anomalías de los receptores acoplados a proteínas G					
Defecto del receptor TXA2 (TP)	TBXA2R	Normal	Agregación anormal con análogos AA y TXA2 (U46619)		Diátesis hemorrágica autosómica recesiva leve
Defecto del receptor ADP (P2Y12)	P2Y12	Normal	Respuesta de agregación marcadamente alterada a ADP (solo onda primaria); También se puede observar una respuesta reducida con otros agonistas	Disminución de la expresión de marcadores de activación en la estimulación de agonistas por ADP	Hemorragia autosómica recesiva, leve después de un traumatismo/ cirugía
Defectos de los gránulos de plaquetas (aislados/sindrómicos)					
Defectos de los gránulos alfa					
Síndrome de las plaquetas grises	NBEAL2	Macrotrombocitopenia; plaquetas grandes con citoplasma gris azulado y ausencia de gránulos azurófilos	Anomalías variables y leves; puede ser normal	Expresión de P-selectina disminuida/ ausente por citometría de flujo/ ELISA	Autosómico recesivo, sangrado leve, mielofibrosis progresiva con esplenomegalia
Síndrome de artrogriposis, disfunción renal y colestasis (ARC)	VPS33B, VIPAS39	Plaquetas grises grandes	Anomalías variables y leves; puede ser normal	La P-selectina EM está reducida en algunos y es normal en otros	Contracturas en flexión, hipotonía, ictericia colestásica, acidosis tubular renal, retraso del crecimiento, ictiosis, infección, diátesis hemorrágica leve
Síndrome de París-Trousseau/ Jacobsen	Del11q23 incluyendo FL1	Plaquetas grandes, pocas con gránulos A fusionados	variable	Gigante fusionó un gránulo en EM, dismegacariopoi-esis	Diátesis hemorrágica leve, retraso en el desarrollo, defectos cardíacos, anomalías craneofaciales

Tabla 37c. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de gránulos densos					
Deficiencia aislada de gránulos densos/6 deficiencias del almacenamiento combinado		Normal	Variable. Puede disminuirse a varios agonistas: ADP, colágeno y epinefrina, o normal	Disminución de la liberación de ATP por lumi-aggregometría Reducción de la ADP plaquetaria y aumento de la relación ATP/ADP Gránulos densos reducidos/ausentes por TEM de montaje completo Reducción de CD63 y disminución de la captación y liberación de mepacrina por citometría de flujo	
Síndrome de Hermansky-Pudlak	HPS1, AP3B1 (HPS2), HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1 (HPS7), B LOCI 83 (HPS8) y BLOC1S6 (HPS9)	Normal	Variable		Albinismo oculocutáneo, inmunodeficiencia, diátesis hemorrágica leve, fibrosis pulmonar, colitis granulomatosa y neutropenia.
Trombocitopenia relacionada con SLFN14	SLFN14	Macrotrombocitopenia	Variable		
Síndrome de Chediak-Higashi	LYST	Giant peroxidase positive cytoplasmic granules in leucocytes; lymphohistiocytosis	Variable		Albinismo oculocutáneo variable, infecciones recurrentes potencialmente mortales, diátesis hemorrágica leve
Trastornos combinados de α-gránulos/δ-gránulos	ND	Pale grey platelets by light microscopy	Variable	Ausencia o reducción de gránulos α y δ- en TEM, y otras características como se observa en los trastornos de gránulos alfa y densos	Diátesis hemorrágica leve a moderada
Defecto de secreción de gránulos o defecto de secreción primaria	ND	Normal	Variable	Disminución de la liberación de ATP por lumi-aggregometría, absorción normal de mepacrina con liberación reducida de mepacrina por citometría de flujo Reducción de la expresión de CD63 por citometría de flujo; alfa normal y gránulos densos por EM	Diátesis hemorrágica leve a moderada.

Tabla 37d. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de los factores de transcripción					
Trastornos plaquetarios familiares con neoplasia mieloide maligna asociada (FPD/ LMA)	RUNX1	Trombocitopenia	Agregación anormal a múltiples agonistas	Defecto de secreción de δ gránulos	Predisposición a desarrollar MDS y AML
Defecto de δ gránulos relacionado con FLI1	FLI1	Trombocitopenia	Reducción de la agregación a colágeno y TRAP	Defecto de secreción de δ gránulos	
GATA1 - defecto	GATA1	Macrotrombocitopenia	Reducción de la agregación a colágeno y ristocetina	Reducción del contenido y liberación de gránulos A	
Defecto relacionado con GFI1 B	GFI1B	Macrotrombocitopenia, diseritropoyesis	Normal	Liberación reducida de gránulos A	Autosómico dominante
Defectos de proteínas de transducción de señales					
Defecto de la fosfolipasa A2 citosólica / Deficiencia de ciclooxigenasa / Deficiencia de TXA2 sintasa	PLA2G4A/ ND/TBXAS1	Normal	Ausencia de respuesta con AA y respuesta normal con TXA_2		
Defecto de CalDAG-GEFI	RASGRP2	Normal	Respuesta marcadamente reducida/ausente a ADP, epinefrina, respuesta reducida/normal al colágeno, TRAP y ristocetina	Expresión normal de GPIIb/ GPIIIa Expresión defectuosa de PAC1	Hemorragia autosómica recesiva grave
Deficiencia de adherencia leucocitaria	FERMT3	Leucocitosis	Patrón similar a GT	Expresión normal de GPIIb/ GPIIIa Expresión defectuosa de PAC1	Autosómico recesivo, infección bacteriana grave, mala cicatrización de heridas, sangrado intenso

Tabla 37e. Resumen de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria con características clínicas y de laboratorio

Desorden	Defecto genético	Recuento y morfología de plaquetas/otras características del PBS	LTA	Características adicionales del laboratorio	Características clínicas adicionales (+/- características sindrómicas)
Defectos de las proteínas del citoesqueleto					
Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS) /trombocitopenia ligada al cromosoma X	ERA	Microtrombocitopenia		Disminución de los subconjuntos de células T y de la función de las células asesinas naturales, disminución de los gránulos α y δ por TEM	WAS: herencia ligada al cromosoma X; Eczemas, inmunodeficiencias, neoplasias malignas y autoinmunidad.
Enfermedad relacionada con MYH9 (anteriormente conocida como síndromes de Sebastian, May-Hegglin, Fechtner y Epstein)	MYH9	Inclusión de Macrothrombocitopenia, tipo Dohle en neutrófilos	Normal		Autosómico dominante; Asociación variable con hipoacusia neurosensorial, cataratas y nefritis
Defecto de ADAP	FYB	Microthrombocytopenia		Aumento de la expresión de P-selectina y PAL-1, pero alteración de la expresión tras la activación	
Defectos de los fosfolípidos de membrana					
Síndrome de Scott	TMEM16F	Normal	Normal	Reducción de la fijación de anexina por citometría de flujo	Autosómico recesivo
Síndrome de Stormorken	STIM1, ORAI1	Anemia Howell Cuerpos alegres	Normal	Unión mejorada a la anexina V y expresión defectuosa de PAL-1	Dismorfia faical, ictifosis, miopatía
Aumento de la actividad fibrinolítica plaquetaria					
Trastorno plaquetario de Quebec	PLAU (duplicación)	Trombocitopenia variable	Respuesta anormal con epinefrina	Exceso de activador de uroquinasa del plasminógeno plaquetario causante de proteólisis de proteínas α-granuladas y fibrinólisis	Sangrado autosómico dominante, de aparición tardía después de una cirugía/ traumatismo, que no responde a los antifibrinolíticos, pero sí a los antifibrinolíticos

Referencias

Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen 5, Liesner RJ et al. Una revisión de los trastornos plaquetarios hereditarios con pautas para su manejo en nombre de la UKHCDO. *BrJ Haematol* 2006; 135(5): 603-633.

Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Detección y diagnóstico de trastornos plaquetarios hereditarios. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.

Grupo de Trabajo de Hemostasia y Trombosis de la Sociedad Británica de Hematología. Directrices sobre las pruebas de función plaquetaria. *J Clin Pathol* 1988; 41(12): 1322-1330.

Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, Lecompte T, Latger-Cannard V. Utilidad de la captación/liberación de mepacrina por citometría de flujo combinada con el ensayo CD63 en el diagnóstico de pacientes con sospecha de trastorno de gránulos densos plaquetarios. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(3): 282-291.Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D et al. Recomendaciones para la estandarización de la agregometría de transmisión de luz: Un consenso del grupo de trabajo del subcomité de fisiología plaquetaria de SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013; 11 (6): 1183-1189.

Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Resultados de una encuesta mundial sobre la evaluación de la función plaquetaria mediante aggregometría de transmisión de luz: un informe del subcomité de fisiología plaquetaria del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7(6): 1029.

Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Estudios de agregación plaquetaria: el plasma autólogo pobre en plaquetas inhibe la agregación plaquetaria cuando se agrega al plasma rico en plaquetas para normalizar el recuento de plaquetas. *Haematologica* 2007; 92(5): 694-697.

Chanarin I (ed). *Hematología de laboratorio: una descripción de las técnicas de laboratorio*. Edimburgo: Churchill Livingstone; Año 1989.

Dave RG, Geevar T, Chellaiya GK, Mammen JJ, Vijayan R, Samuel A, Gown M, Nair SC. Estabilidad y utilidad de las pruebas de activación plaquetaria por citometría de flujo: una modalidad para cerrar la brecha entre la demanda y la oferta de diagnóstico. *Plaquetas* 2022; 33(7): 1043-1051.

Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Aspectos clínicos, de laboratorio y terapéuticos de la enfermedad de von Willebrand tipo plaqueta. *IntJ Lab Hematol* 2008; 30(2): 91-94.

Frontroth JP, Favaloro EJ. Estudios de agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) y mezcla RIPA. *Métodos Mol Biol* 2017; 1646: 473-494.

Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Diagnóstico clínico y de laboratorio de los trastornos plaquetarios hereditarios en adultos y niños: una guía de la Sociedad Británica de Hematología. *BrJ Haematol* 2021; 195(1): 46-72.

Gresele P. Diagnóstico de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria: orientación del SSC de la ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13(2): 314-322.

Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Ensayos de función plaquetaria en el diagnóstico: una actualización. *Expert Rev Hematol* 2019; 12(1): 29-46.

Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Diagnóstico de laboratorio de trastornos de la función plaquetaria clínicamente relevantes. *IntJ Lab Hematol* 2018; 40 Supμl 1:34-45.

Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Pruebas de función plaquetaria: práctica entre los participantes del Plan Nacional de Evaluación de Calidad Externa del Reino Unido para la Coagulación de la Sangre, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61(8): 950-954.

Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidze M. Avances en las pruebas de función plaquetaria: agregometría de transmisión de luz y más allá. *J Clin Med* 2020; 9(8): 2636.

Linnemann B, Sch won berg J, Mani H, ProchnowS, Lindhoff-Last E. Estandarización de la agregometría de transmitancia luminosa para el seguimiento de la terapia antiplaquetaria: no es necesario un ajuste para el recuento de plaquetas. *J Thromb Haemost* 2008; 6(4): 677-683.

Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Diagnóstico de laboratorio de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria. Transferencias *Apher Sci* 2018; 57(4): 485-493.

van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, Huisman A, Korporaal SJA, Urbanus RT. Validación del análisis de citometría de flujo de la función plaquetaria en pacientes con sospecha de defecto de la función plaquetaria. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 689-698.