



**Universidad de Costa Rica**

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en  
Microbiología y Química Clínica

Evaluación de los valores de referencia y variables en el análisis de agregometría  
plaquetaria, realizada en el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos  
Afines (CIHATA)

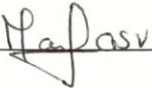
Estudiante: Manrique Vargas Soto

Carné: B27056


Fecha de presentación: agosto de 2018

*Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:*


Dra. Mariela Solano Vargas

  
Tutora

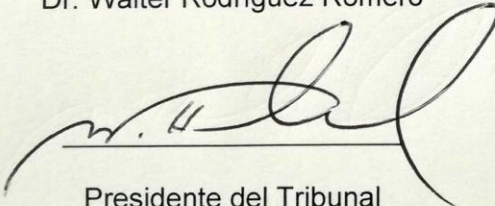
Dr. Ricardo Chinchilla Monge

  
Lector

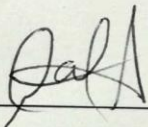
Dra. Melissa Granados Zamora

  
Lectora

Dr. Walter Rodríguez Romero

  
Presidente del Tribunal

Dra. María José Suárez Sánchez

  
Profesora asignada

## Agradecimientos

A todo el personal del CIHATA y los estudiantes que colaboraron ahí en el periodo 2016-2017, en especial a la Dra. Mariela Solano Vargas, el Bach. Leonardo Calvo Flores y al Dr. Ricardo Chinchilla Monge, quienes me asesoraron y acompañaron antes y durante el proceso de realización de este proyecto. Además agradezco a la Dra. Melissa Solano Barquero, quien nos asesoró en la realización del análisis de los datos.

**Índice**

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>1</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>2</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>Marco teórico</b> .....	<b>6</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>31</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>33</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>34</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>39</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>47</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>52</b>
<b>Limitaciones y recomendaciones</b> .....	<b>54</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>56</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>63</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1: Esquema del modelo celular de la coagulación .....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 2: Estructura de la plaqueta .....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 3: Esquema de la metodología.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4: Cambio en la turbidez de las muestras .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5: Curvas de agregación plaquetaria .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 6: Distribución de los datos de porcentaje de agregación .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 7: Histograma de los valores de porcentaje de agregación.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 8: Gráfico de dispersión de datos de porcentajes de agregación (ADP) .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9: Gráfico de dispersión de datos de porcentajes de agregación (EPI) .....</b>	<b>44</b>

## Abreviaturas

μL: microlitro, microlitros

ADP: adenosín difosfato

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

APC: proteína C activada

CLSI: Clinical & Laboratory Standard Institute

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa 2

EPCR: receptor endotelial de la proteína C

FVa: factor cinco activado

FVII: factor siete

FVIIa: factor siete activado

FVIIIa: factor ocho activado

FIX: factor nueve

FIXa: factor nueve activado

FX: factor diez

FXa: factor diez activado

FXI: factor once

FXIa: factor once activado

FXIII: factor trece

FT: factor tisular

GP: glicoproteína

PARs: receptores activados por proteasas

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PPP: plasma pobre en plaquetas

PRP: plasma rico en plaquetas

tPA: activador tisular del plasminógeno

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta

uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa o uroquinasa

## Introducción

Las plaquetas tienen como función principal crear un tapón temporal para evitar grandes pérdidas de sangre cuando hay un daño en los vasos sanguíneos y cumplen otras funciones en el cuerpo, tales como el reclutamiento de leucocitos al sitio de lesión en el vaso sanguíneo, para evitar posibles infecciones, su participación en el proceso de coagulación y fibrinólisis. Por ello es de gran relevancia evaluar su correcta funcionalidad para descartar alguna anomalía.

Las pruebas de funcionalidad plaquetaria son exámenes que no se realizan de rutina, su uso es restringido a laboratorios especializados y tienen la limitante de la variabilidad del método en sí. Principalmente se realiza a personas con presentación clínica de diátesis hemorrágica. Una de las pruebas más utilizadas por su relativa baja complejidad de realización es la prueba de agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas por transmisión de luz.

Para este método no hay un rango de valores de referencia internacionales estrictamente aceptado que permitan la comparación de los porcentajes de agregación obtenidos, por lo que el análisis que se realiza principalmente es cualitativo (con las gráficas de agregación obtenidas), o bien, comparando los porcentajes de agregación con datos de publicaciones internacionales. De ahí la importancia de establecer valores de referencia propios de cada laboratorio, como así lo indican guías internacionales como la CLSI (del inglés "Clinical & Laboratory Standard Institute").



En el presente trabajo, se realiza una verificación de los valores de referencia del porcentaje de agregación plaquetaria obtenidos por el método de Born (agregación plaquetaria por el método de transmisión de luz), realizada a 44 individuos, todos participantes voluntarios que asistieron a campañas de donación realizadas por el Laboratorio Clínico de la Universidad de Costa Rica durante el año 2017. Además, con 12 muestras se analizaron algunas variaciones al método, tomando en consideración las variables analíticas críticas del proceso (tiempo de análisis, concentración de plaquetas y concentración de agonista).

## **Marco teórico**

### **Hemostasia**

La hemostasia es el proceso de equilibrio fisiológico que tiene como objetivo preservar la integridad de los vasos sanguíneos, minimizando la pérdida excesiva de sangre en caso de algún daño vascular y manteniendo la fluidez de la sangre en condiciones normales. Este equilibrio se logra por medio de vías de regulación, manteniendo a las plaquetas en un estado quiescente cuando no hay injurias y por otro lado el control de los componentes del sistema de coagulación inactivos. Si se perturba este estado de equilibrio se pueden dar problemas de sangrado o trombosis. El primero se da si no se logra un sellado correcto del daño en los vasos, por un defecto en la formación del coágulo o por una destrucción prematura de los tapones; y el segundo, por una desregulación de los estímulos protrombóticos (Fredenburgh & Weitz, 2017). Los componentes de este sistema son principalmente el endotelio vascular, las plaquetas, el sistema de coagulación y el sistema fibrinolítico.

### **Endotelio vascular**

Es una capa de células que delimita la superficie interna de los vasos, separando la sangre de los vasos sanguíneos, que contienen componentes protrombóticos. Participa activamente en el control de la hemostasia, inhibiendo a las plaquetas, suprimiendo la coagulación, promoviendo la fibrinólisis y modulando el tono muscular y la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Fredenburgh & Weitz, 2017). Además de su función anticoagulante, también tiene capacidad

procoagulante, al sintetizar el inhibidor del activador de plasminógeno I (PAI-1), el factor de von Willebrand, los receptores activados por proteasas (PARs) y algunas veces el factor tisular (Aird, 2013).

### *Inhibición plaquetaria*

Las células del endotelio vascular liberan prostaciclina y óxido nítrico a circulación, que además de funcionar como potentes vasodilatadores, inhiben a las plaquetas estimulando a la adenilato ciclasa y de esta forma aumentan los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc estimula a una proteína quinasa dependiente de AMPc, la cual fosforila a las proteínas G de la familia Ras y Rho, que inhiben la liberación de calcio de compartimentos intracelulares y la modulación del citoesqueleto para el cambio estructural de las plaquetas (Smolenski, 2012). Además, estas células expresan en su superficie CD39, una ecto-adenosín difosfato asociada a membranas, la cual atenúa la activación de las plaquetas por medio de la degradación del adenosín difosfato (ADP) (Fredenburgh & Weitz, 2017).

### *Actividad anticoagulante*

Las células endoteliales producen proteoglicanos de heparán sulfato, los cuales se unen a la antitrombina circulante y aceleran el rango al cual inhiben a la trombina y a otras enzimas de coagulación (Van Hinsbergh, 2012).

Las células endoteliales también modulan la generación de la trombina, expresando trombomodulina y el receptor endotelial de la proteína C (EPCR) en sus superficies. La trombomodulina se una a la trombina y altera su especificidad

enzimática y se convierte en un potente activador de la proteína C. La proteína C activada (APC) funciona como un anticoagulante, inactivando los factores V activado (FVa) y VIII activado (FVIIIa). La proteína S actúa como un cofactor en esta reacción y el EPCR potencia esta vía, uniéndose a la proteína C y presentándola al complejo trombina-trombomodulina, para su posterior activación. La proteína C además funciona como un regulador de la inflamación y preserva la función de barrera del endotelio vascular (Fredenburgh & Weitz, 2017).

#### *Actividad fibrinolítica*

El endotelio vascular promueve la fibrinólisis sintetizando y liberando tPA y uPA; la acción de estos compuestos permite convertir el plasminógeno en plasmina, cuya función se explicará más adelante. La liberación del tPA se da principalmente en respuesta a un estímulo, como por ejemplo la trombina y la bradiquinina; la uPA se produce en casos de inflamación y reparación de daño vascular. Las células endoteliales también producen el inhibidor del activador del plasminógeno-1, el cual regula a la tPA y a la uPA (Fredenburgh & Weitz, 2017).

#### *Modulación del tono muscular y la permeabilidad de los vasos sanguíneos*

Además de la producción de vasodilatadores como el óxido nítrico o la prostaciclina, las células endoteliales también producen péptidos reguladores conocidos como endotelinas, las cuales son sustancias vasoconstrictoras. Se ha visto que las uniones entre células endoteliales afectan directamente la permeabilidad endotelial, donde situaciones como la vasodilatación, altas concentraciones de heparina o una severa trombocitopenia, pueden aumentar la

permeabilidad endotelial, que contribuye a problemas de sangrado (Saenz, Valverde & Rodríguez, 2016).

El endotelio y las plaquetas pueden colaborar con los procesos de coagulación y fibrinólisis, junto con otros componentes, cuando así sea requerido (Hoffman & Monroe, 2001).

## Coagulación

Existen diferentes modelos para explicar el proceso de la coagulación. Entre ellos el modelo de la cascada de la coagulación y el modelo celular. A continuación se explicará el modelo celular, el cual ocurre en tres fases: la iniciación, la amplificación y la propagación (Ver Figura 1).

### *Iniciación*

Cuando hay una lesión en el endotelio, las células que expresan factor tisular (FT) son expuestas a la sangre; el FT es una proteína transmembrana que actúa como receptor y cofactor del Factor siete (FVII). Cuando el FVII se une al FT se convierte en FVIIa, formando el complejo FVIIa/FT, que es catalizador de la activación del Factor diez (FX) y del Factor nueve (FIX). El Factor diez activado (FXa) formado en la célula portadora de FT interactúa con su cofactor, el FVa, con el fin de crear complejos de protrombinasa y generar pequeñas cantidades de trombina en las células que expresan FT. El FIX no actúa en la célula portadora del FT y no juega un papel importante en la fase de iniciación de la coagulación. Si hay plaquetas adheridas cerca del sitio donde se encuentran las células

portadoras de FT, el Factor nueve activado (FIXa) puede difundir a la superficie, unirse a receptores de plaquetas, interactuar con su cofactor Factor ocho activado (FVIIIa) y activar al FX directamente en la superficie de las plaquetas (Hoffman & Monroe, 2001).

### *Amplificación*

Cuando hay un daño en la vasculatura, las plaquetas se adhieren a componentes de la matriz extravascular, como el colágeno o factor von Willebrand. Este proceso de adhesión activa parcialmente a las plaquetas, además de localizarlas cerca del sitio de la lesión. Las pequeñas cantidades de trombina generada por las células portadoras de FT amplifican la señal procoagulante, que mejora la adhesión de las plaquetas, su posterior activación y que activan a los factores V, VII y XI. La trombina actúa en la superficie de la plaqueta "preparándola" para ensamblar el complejo procoagulante (Hoffman & Monroe, 2001).

La trombina es un potente activador plaquetario que actúa por la vía de los receptores tipo proteasa. Durante su activación las plaquetas liberan el FV los gránulos alfa hacia la superficie. Luego el FV es activado por la trombina o el FXa. Algunas de las moléculas de trombina unidas a otros receptores como la glicoproteína (GP) Ib/IX, permanecen activas y pueden activar otros factores de la coagulación en la superficie de la plaqueta. El complejo factor von Willebrand-FVIII se une a la plaqueta y es adherido de manera efectiva por la trombina, para que pueda activar al FVIII y liberarlo del factor von Willebrand; el FVIIIa permanece unido a la superficie de la plaqueta. Cuando las plaquetas están activadas y tienen adherido a su superficie los factores V y VIII activados, puede darse a cabo el

ensamblaje de complejos procoagulantes y la producción a gran escala de trombina (Hoffman & Monroe, 2001).

### *Propagación*

En la fase de propagación los complejos tenasa y protrombinasa se ensamblan en la superficie de las plaquetas y se genera trombina a gran escala. Las plaquetas expresan diversos receptores para los factores IX, X y XI.

El complejo tenasa (FVIIIa/FIXa), se ensambla cuando el FIX llega a la superficie de la plaqueta. El FIXa puede difundir hacia otras superficies desde su sitio de activación en las células portadoras de FT ya que no se ve inhibido rápidamente por inhibidores de proteasas. También, el FIX se puede unir a las plaquetas activadas, lo que facilita su activación por la trombina y permite proveer más de este factor en la superficie de la plaqueta. El complejo FVIIIa/FIXa activa al FX, lo que permite que el resultante FXa forme un complejo con su cofactor, el FVa. El complejo FXa/FVa puede entonces producir la trombina necesaria para formar un tapón de fibrina (Hoffman & Monroe, 2001).

Finalmente, ocurre el proceso de retracción del coágulo. Luego de formado el trombo el citoesqueleto de las plaquetas permite que el coágulo sea estabilizado y fijado, evitando así que este sea acarreado por el flujo sanguíneo y forme émbolos posteriores (Saenz, Valverde & Rodríguez, 2016).





visto que las plaquetas pueden participar del proceso de fibrinólisis, ya que estas pueden unir al plasminógeno en su membrana, sin embargo, se desconocen los receptores involucrados en este proceso (Mutch, 2013).

## Plaquetas

Las plaquetas son fragmentos anucleados de forma discoide con dimensiones de aproximadamente  $3,0 \times 0,5 \mu\text{m}$  y un volumen promedio de 7-11 fL, con una vida media aproximada de 7 a 10 días y son formados a partir del citoplasma de los megacariocitos (Hartwig, 2006; Italiano & Hartwig, 2018; Saenz, Valverde & Rodríguez, 2016). La formación de las plaquetas inicia cuando el citoplasma de los megacariocitos maduros empieza a erosionarse en un polo y a formar múltiples prolongaciones similares a pseudópodos, las cuales se extienden y elongan para producir túbulos finos. Conforme estos túbulos van creciendo, se ramifican y desarrollan diferentes densidades a lo largo, esto produce formas similares a cuentas de rosario llamadas proplaquetas (Italiano & Hartwig, 2018).

La maduración de las plaquetas en las puntas de las proplaquetas termina cuando un microtúbulo se separa del grupo de microtúbulos y se enrolla en una espiral. Para completar la construcción de las plaquetas maduras, una vez distribuidos los componentes del citoesqueleto, los brotes deben llenarse con organelas y gránulos. Los gránulos son enviados a las plaquetas por medio de las vías de microtúbulos. Una vez que los gránulos y organelas entran en la plaqueta naciente, no pueden regresar al eje de las proplaquetas, debido a un mecanismo de atrapamiento final (Italiano & Hartwig, 2018).

Finalmente, las plaquetas son liberadas directamente a la circulación. Se sugiere que su liberación es posible mediante un mecanismo de extensión de las proplaquetas dentro del hueso en los sinusoides de la médula ósea (Italiano & Hartwig, 2018).

Cuando ocurre un daño en los vasos sanguíneos, se expone la matriz subendotelial. Las plaquetas llegan al sitio del daño y se adhieren a las proteínas expuestas de la matriz; las plaquetas adheridas además de liberar sustancias agonistas que reclutan a otras plaquetas (epinefrina, trombina, ATP, colágeno y tromboxano A<sub>2</sub>) (Flores, Ramírez, Meza & Nava, 2014), también promueven la generación de trombina y la subsecuente formación de fibrina. Finalmente, las plaquetas se agregan para formar un tapón que sella el daño en la vasculatura (Saenz, Valverde & Rodríguez, 2016).

Las plaquetas tienen dos principales estructuras de almacenamiento: los gránulos densos o gránulos delta y los gránulos alfa. Una plaqueta contiene de seis a nueve gránulos densos y de 70 a 90 gránulos alfa. Los gránulos densos almacenan ADP y ATP, altas concentraciones de calcio y serotonina, los cuales son necesarios para el proceso de agregación y vasoconstricción. Por su parte, los gránulos alfa contienen sustancias que regulan la hemostasia y los procesos inflamatorios, como el factor von Willebrand, FV, FVII, factor de crecimiento derivado de plaquetas y alfa-2-antitripsina (Rendu & Brohard, 2001).

Las plaquetas, en estado normal se mantienen en constante movimiento dentro de los vasos por el flujo de sangre. Si llega a suceder un daño en algún vaso, las plaquetas circulantes empezarán a frenar sobre la pared vascular y se activarán y adherirán, formando un tapón poco estable, pero lo suficientemente fuerte para

detener el sangrado de manera momentánea (López & Macaya, 2013). Estas etapas del proceso serán desarrolladas a continuación.

### *Adhesión*

La adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial es el primer paso en la hemostasia primaria. El factor von Willebrand y el colágeno expuesto luego de un daño a la vasculatura, forman una asociación entre sí, sirviendo como sitio de unión para las plaquetas. Las plaquetas, que han disminuido su velocidad, interaccionan con estos compuestos y se adhieren (Jurk & Kehrel, 2005). La capa de plaquetas formada promueve la generación de trombina y la subsecuente formación de fibrina. Estos eventos se dan a cabo por medio de interacciones de distintos receptores en las plaquetas, como por ejemplo el  $\alpha_2\beta_1$  y la glicoproteína (GP) VI, que se unen al colágeno, y las GP Ib/IX/V, Ib $\alpha$  y IIb/IIIa, que se unen al factor von Willebrand (Jurk & Kehrel, 2005) (Fredenburgh & Weitz, 2017) [Ver Figura 2].

### *Activación y secreción*

La adhesión de las plaquetas al colágeno y al factor von Willebrand inicia una serie de vías que terminan en la activación plaquetaria. Estas vías inducen a la ciclooxigenasa-1 (COX-1), la cual transforma al ácido araquidónico en prostaglandina G<sub>2</sub>, precursor del tromboxano A<sub>2</sub>. También inducen a la liberación de ADP de los gránulos densos, a la liberación de calcio del sistema tubular y la movilización de estos gránulos a la superficie de la plaqueta (Michelson, 2013; Rendu & Brohard, 2001). El tromboxano A<sub>2</sub> es un potente vasoconstrictor

que de igual forma que el ADP, activa las plaquetas y las recluta al sitio de daño vascular; este proceso termina en una expansión del tapón plaquetario. Para que el tromboxano A2 y el ADP puedan activar a las plaquetas, deben unirse a sus receptores en la superficie de las plaquetas. El receptor del tromboxano A2 es un receptor ligado a una proteína G; este receptor no está únicamente en la superficie de las plaquetas, sino que también se encuentra en las células endoteliales, por eso es que puede actuar como un vasoconstrictor además de activador plaquetario (Fredenburgh & Weitz, 2017).

El ADP interacciona con receptores ligados a las proteínas G en la superficie de las plaquetas. Algunos gránulos también contienen ATP, el cual puede contribuir al reclutamiento de otras plaquetas en el sitio de sangrado. A pesar de actuar por medio de vías diferentes, tanto el ADP como el ATP al ser liberados aumentan los niveles de calcio dentro de las plaquetas; esto hace que se induzca un cambio en su forma por medio de un rearrreglo del citoesqueleto, movilización, liberación de gránulos y la subsecuente agregación plaquetaria. Las plaquetas activadas promueven el proceso de coagulación induciendo el movimiento de la fosfatidilserina desde la bicapa interna de fosfolípidos hacia la capa externa. La exposición de este fosfolípido es esencial para el ensamblaje de complejos de factores de coagulación ( Fredenburgh & Weitz, 2017; Jurk & Kehrel, 2005).

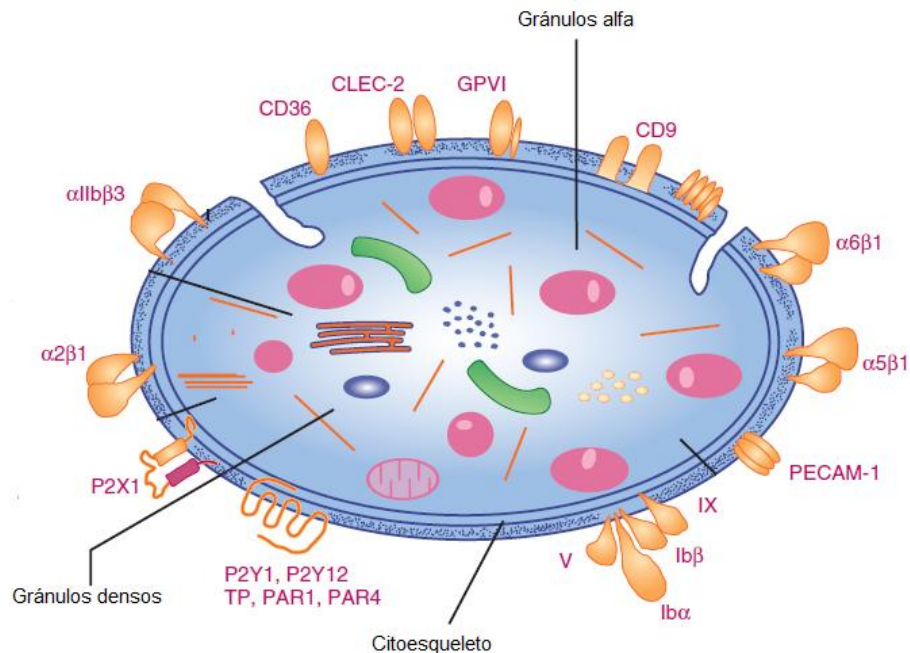
Las plaquetas activadas proveen una superficie donde se puedan ensamblar los factores de la coagulación, además promueven la formación de fibrina y la subsiguiente estabilización que libera FV, FXI, fibrinógeno y FXIII. En el proceso de activación plaquetaria, estas liberan proteínas de adhesión, como el factor von Willebrand, la trombospondina y la fibronectina (las cuales aumentan la adhesión

de las plaquetas en el sitio de daño), además, liberan factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Fredenburgh & Weitz, 2017; Jurk & Kehrel, 2005).

### *Agregación*

La GP IIb/IIIa media las uniones entre plaquetas que se dan cuando hay formación de grumos de plaquetas. Cuando las plaquetas se empiezan a activar, la GPIIb/IIIa sufre una transformación conformacional, la cual hace que mejore la afinidad por sus ligandos (fibrinógeno y factor de von Willebrand). Cuando el factor de von Willebrand es sometido a una ruptura, este expone sus dominios de unión a plaquetas, lo que permite la interacción con la GP IIb/IIIa activada. De manera similar, la unión de la GP IIb/IIIa con el fibrinógeno lleva a un cambio conformacional que expone nuevos sitios de unión. Las moléculas divalentes de fibrinógeno y las multivalentes de factor de von Willebrand sirven como puentes y unen a plaquetas adyacentes (Fredenburgh & Weitz, 2017; Jurk & Kehrel, 2005; Michelson, 2013).

Una vez unidas a la GP IIb/IIIa, el fibrinógeno y el factor von Willebrand inducen señales que aumentan la activación de las plaquetas, que resulta en la activación de más receptores de la GP IIb/IIIa, creando un proceso de retroalimentación positiva. Por último, la fibrina une los agregados de plaquetas y los ancla a la pared del vaso sanguíneo en el sitio de la lesión (Fredenburgh & Weitz, 2017; Jackson, 2007; Michelson, 2013; Saenz, Valverde & Rodríguez, 2016).



**Figura 2.** Estructura de la plaqueta: receptores, gránulos y citoesqueleto (Modificado de Hoffman, 2017).

## Pruebas de función plaquetaria

Las pruebas de funcionalidad plaquetaria detectan si existe algún defecto primario o adquirido en estas, en algunos casos independientemente del número de plaquetas. Además se pueden utilizar para evaluar la eficiencia de algún tratamiento como las terapias de antiagregación.

Estas pruebas no se realizan de rutina, sino que se aplican en pacientes con clínica asociada a problemas plaquetarios o aquellos a los que se les esté dando una terapia que pueda afectar la manera en la que estas funcionan.

Dentro de las pruebas más conocidas están: tiempo de sangrado, agregación plaquetaria en plasma y sangre total, análisis en equipo automatizado (PFA-100,

PFA-200), tromboelastografía, citometría de flujo, microscopía electrónica y liberación de gránulos.

### *Tiempo de sangrado*

Es una prueba antigua que fue relacionada con disfunción plaquetaria por Duke en 1910. Luego, fue estandarizada por Ivy en el año 1940, donde definió la presión ejercida y el largo y la profundidad de la cortada. La prueba consiste en aplicar presión en el brazo del paciente con ayuda de un manómetro, seguidamente se le hace una incisión de 5 mm de largo y de 1 mm de profundidad en el antebrazo. A partir del momento en el que se realiza el corte en la piel, se cuenta el tiempo que tarda en formarse un coágulo en la herida que permita que se detenga el sangrado. En la actualidad existen dispositivos comerciales que contienen bisturí e implementos estériles para su realización (Lordkipanidzé, 2016).

Esta prueba evalúa la parte de la hemostasia en la que están involucradas las plaquetas y algunas proteínas del plasma, como el factor von Willebrand. El inconveniente de esta prueba, a pesar de no utilizar equipo muy sofisticado, es que no es reproducible, es muy invasiva, consume mucho tiempo y puede no detectar algunos trastornos plaquetarios. Debido a estos inconvenientes, esta prueba ha caído en desuso y ha sido reemplazada por otras pruebas (Lordkipanidzé, 2016).

### *Agregación plaquetaria con sangre total*

Esta prueba consiste en medir el cambio en la impedancia eléctrica que resulta luego del proceso de agregación plaquetaria, en respuesta a agonistas. Utiliza

sangre diluida en solución salina y electrodos colocados dentro de esta solución (Solomon, Traintinger, Ziegler, Hanke, Rahe-Meyer, Voelckel & Schöchl, 2011). Tiene la ventaja de que no necesita un proceso de separación del plasma, lo que reduce el riesgo de activación de las plaquetas o de pérdida de subpoblaciones de estas (Aradi, Storey, Komócsi, Trenk, Gulba, Kiss, Huber, 2014), pero tienen otras variables que pueden influir en los resultados, como por ejemplo el hematocrito, la concentración de las plaquetas y el anticoagulante utilizado (Lordkipanidzé, 2016).

#### *Analizador de función plaquetaria*

El PFA-100, actualizado recientemente a PFA-200, es un equipo automatizado para evaluar la función plaquetaria, que utiliza cartuchos con diferentes agonistas. Un volumen pequeño de muestra (sangre total) es aspirado por una membrana recubierta de agonistas plaquetarios, hasta que la apertura es completamente ocluida por un tapón plaquetario, lo que el sistema reporta como "tiempo de cierre" (Lordkipanidzé, 2016).

#### *Tromboelastografía*

Este ensayo se utiliza para evaluar el cambio en la viscoelasticidad del coágulo que se forma en sangre total al ponerla en contacto con un activador de la coagulación. Utiliza una copa precalentada donde se coloca la muestra y un pin que se sumerge dentro de la muestra de sangre. La copa y el pin, luego de agregada la muestra, tienen un movimiento oscilatorio. En una muestra de sangre normal anticoagulada, el pin no se va a ver afectado, pero conforme se va desarrollando el coágulo, esta muestra una resistencia hacia el movimiento del



pin; esta resistencia es traducida en una computadora como una curva, representando la fuerza del coágulo formado (Chen & Teruya, 2009). La retracción del coágulo (disociación de las hebras de fibrina por el proceso de fibrinólisis), disminuye la resistencia al movimiento y se traduce como una disminución de la fuerza, por lo que la curva disminuye (Bolliger, Seeberger, & Tanaka, 2012).

La fuerza viscoelástica está dada por la interacción entre los receptores activados de la GP IIb/IIIa y la polimerización de la fibrina durante la generación endógena de trombina y también de la degradación de la fibrina por el proceso de fibrinólisis (Bolliger *et al.*, 2012).

### *Citometría de flujo*

La citometría de flujo consiste en hacer pasar las células de manera individual por uno o varios láseres (que indican el tamaño y la granularidad de las plaquetas); también se puede medir la intensidad de diferentes marcadores fluorescentes que se unen a componentes específicos de las plaquetas. Esto permite que se puedan estudiar aspectos de funcionalidad plaquetaria en respuesta a distintos agonistas. Tiene la ventaja que utiliza sangre total, además de que usa un volumen muy pequeño de muestra (escala de microlitros) y da un resultado en un periodo corto de tiempo (Ramström, Södergren, Tynngård, Lindahl, & Lindahl, 2016). Otra ventaja es que pueden analizarse muestras de pacientes con trombocitopenia, ya que se puede realizar la prueba independientemente de la cantidad de plaquetas (Frelinger *et al.*, 2015).

### *Microscopía electrónica de transmisión*

La microscopía electrónica permite observar las diferentes estructuras internas de las plaquetas, que permite detectar defectos en estas y relacionarlo a patologías. Para la examinación de las muestras estas deben ser procesadas, pasando por pasos de fijación, deshidratación, endurecimiento con una resina, corte ultrafino y colección en rejillas de cobre o níquel. Un haz de electrones pasa a través de la muestra y luego es enfocada en una placa fotográfica, lo que crea una imagen de la muestra, que permite analizar los detalles de las plaquetas (Clauser & Cramer-Bordé, 2009).

### *Liberación de gránulos*

En un espectrofotómetro es posible medir la liberación de los gránulos densos luego de la activación de la plaqueta al utilizar una luciferasa de libélula. Además, otras sustancias como las presentes en los gránulos alfa, pueden ser medidas por citometría de flujo, cuando se liberan y se mantienen en la superficie (Rand, Leung, & Packham, 2003).

### *Agregación plaquetaria en plasma*

Existen distintos métodos de cuantificación de la agregación plaquetaria en plasma, por ejemplo el óptico, el de impedancia y el de luminiscencia. El método óptico descrito por Born en 1962) es uno de los más utilizados (Linnemann, Schwonberg, Mani, Prochnow, & Lindhoff-Last, 2008). Este método consiste en colocar la muestra (plasma rico en plaquetas) en un agregómetro acoplado a un espectrofotómetro y medir el cambio en la transmisión de luz al formarse un

agregado de plaquetas luego de agregar un agonista; estos cambios son graficados por el equipo y se observa una curva, donde el área bajo esta indica el porcentaje de agregación plaquetaria. Se considera que el PRP permite el 0% de transmisión de luz, es decir, el 0% de agregación, mientras que el PPP permite el 100% de transmisión de luz, equivalente al 100% de agregación plaquetaria (Linnemann *et al.*, 2008).

La agregometría debe realizarse bajo ciertas condiciones, con el fin de llevar a cabo la reacción de manera óptima. Entre las condiciones está: control de la temperatura a 37°C, concentración de plaquetas entre 200 000 y 300 000 plaquetas/ $\mu$ L, volumen de agonista que no supere el 10% del volumen de plasma para no diluir la muestra (por ejemplo, 5  $\mu$ L de agonista en 500  $\mu$ L de muestra) y tiempo de análisis de la muestra (no mayor a 4 horas luego de obtenida la muestra) (Breddin, 2005; Linnemann *et al.*, 2008).

Algunos de los agonistas que se han utilizado para este método son adenosín difosfato (ADP), epinefrina, ácido araquidónico, ristocetina y colágeno (Montiel, 2003).

#### *Agonistas*

En el Cuadro I se resume el mecanismo de los agonistas más utilizados en la prueba de agregación plaquetaria por el método de transmisión de luz.

**Cuadro I.** Agonistas más utilizados en la prueba de agregación plaquetaria y su mecanismo de acción

<b>Agonista</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<b>ADP</b>	El ADP se une a receptores de membrana de las plaquetas que están acoplados a proteínas G. Uno de estos receptores, el P2Y <sub>12</sub> , activa a la fosfolipasa C, induce un cambio conformacional e inicia la agregación plaquetaria por medio de movilización de calcio (Zhou & Schmaier, 2005).
<b>Epinefrina</b>	La epinefrina actúa sobre receptores alfa adrenérgicos, causando la inhibición de la adenilato ciclasa. Esto hace que se libere calcio del retículo endoplásmico por medio del inositol-3-fosfato; esta liberación de calcio induce la agregación plaquetaria (Zhou & Schmaier, 2005).
<b>Ácido araquidónico</b>	El ácido araquidónico induce la activación plaquetaria al transformarse en tromboxano A <sub>2</sub> por otros estímulos, esto lleva a la activación de receptores internos y a la liberación de calcio y al posterior proceso de agregación (Cattaneo, 2009).
<b>Ristocetina</b>	La ristocetina, un antibiótico, es una sustancia que induce la síntesis de tromboxano A <sub>2</sub> , haciendo que las plaquetas se activen y continúen hacia el proceso de agregación (Cattaneo, 2009).
<b>Colágeno</b>	Las plaquetas se unen al colágeno por medio de receptores específicos, activando a la plaqueta por medio de cascadas de fosfolipasas C. Esta activación resulta en la movilización de calcio y la subsecuente agregación de las plaquetas (Sangkuhl, Shuldiner, Klein, & Altman, 2011).

En este estudio se utilizaron como agonistas el ADP y la epinefrina, ya que estos dos son los agonistas que mayormente se ven alterados en la población (ya sea por defectos hereditarios o adquiridos).

## Drogas antiagregantes

### *Tienopiridinas (Clopidogrel, Prasugrel)*

Es una droga antiplaquetaria que funciona como antagonista de los receptores de ADP (principalmente del P2Y<sub>12</sub>), por lo que evita la activación de las plaquetas, además no permite la degranulación y evita la activación del receptor GP IIb/IIIa. Es una prodroga y necesita activarse a nivel de hígado por medio del citocromo P-450. Afecta la curva de agregación plaquetaria del ADP (Jaffer & Weitz, 2017)

### Aspirina

Es una de las drogas más utilizadas a nivel mundial. Funciona inhibiendo de manera irreversible a la COX-1 (ciclooxigenasa 1), por lo que la plaqueta es incapaz de producir tromboxano A<sub>2</sub>. También es capaz de evitar la secreción de los gránulos densos (Ruiz, 2006). En cantidades muy elevadas, puede inhibir también a la COX-2 (ciclooxigenasa 2); este compuesto inicia la síntesis de la prostaciclina, que es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. La COX-1, y en parte la COX-2, participa en la síntesis prostanoideas en otras células, por lo que también se afecta la producción de estos (Warner, Nylander, & Whatling, 2011).

## Situación en Costa Rica de la prueba de agregación plaquetaria

En Costa Rica la prueba de agregación plaquetaria no es una prueba rutinaria, sino que se realiza en el caso de pacientes con sospecha clínica de alguna deficiencia que relacione a las plaquetas, ya sea primaria (como la trombocitopenia de

Glanzmann y el síndrome de Bernard Soulier) o adquirido (por ejemplo, trastornos mieloproliferativos crónicos, síndromes mielodisplásicos, disfunción hepática, paraproteinemia o aquellos observados en terapias con medicamentos como la aspirina, los antagonistas del receptor del ADP [tienopiridinas] o inhibidores de la GP IIb/IIIa) (Sharathkumar & Shapiro, 2008). En los casos de estudio de pacientes que poseen tratamiento con antiagregantes, el cual es uno de los estudios más importantes, el objetivo principal es saber si este ha sido óptimo y es funcional.

En el sector público, la prueba se realiza en el Hospital San Juan de Dios, en el Hospital México y en el Hospital Nacional de Niños. Además, se realiza en el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), de la Universidad de Costa Rica. En los hospitales se realiza la prueba en pacientes con sospecha clínica de alguna enfermedad relacionada con una afección en las plaquetas. En el CIHATA, la prueba se realiza principalmente en pacientes adultos que están consumiendo terapia de antiagregantes como el clopidogrel o la aspirina.

En Costa Rica, en el año 2014, se realizó un trabajo acerca de la prueba de agregometría plaquetaria en plasma, realizada en el Hospital de Niños en población pediátrica (López, Cartín, Calvo, Suárez & Navarrete, 2014). Es el único trabajo publicado de agregación plaquetaria que existe en el país. En este se habla de que esta prueba puede utilizarse para la detección de defectos plaquetarios, además de recalcar la importancia de la estandarización de esta.

Como en el país no existen intervalos de referencia de porcentajes de agregación plaquetaria estrictamente aceptados, los valores obtenidos con los diferentes agonistas se comparan con valores establecidos en publicaciones científicas en el

extranjero, o bien, se compara el comportamiento obtenido en las gráficas de agregación con las esperadas según lo estipulado en la literatura, siempre de la mano con la historia clínica del paciente y su sintomatología.

### Valores a nivel internacional

Existen pocas publicaciones a nivel internacional del establecimiento de los valores de referencia del porcentaje de agregación plaquetaria realizada por el método de transmisión de luz.

En el presente trabajo, se utilizarán como referencia dos publicaciones realizadas en América Latina y una publicación realizada en Canadá. La primera publicación, escrita por Mesa y colaboradores, utilizó 192 participantes, todos donantes aceptados por el banco de sangre; el único criterio de exclusión que mencionan es el no haber consumido algún fármaco 10 días atrás. No detallan la concentración de los agonistas utilizados. Los valores de referencia obtenidos fueron calculados utilizando los percentiles 2,5 y 97,5; dichos valores se detallan a continuación: ADP: 44.1-86.7%, EPI: 50.8-80%.

La segunda publicación fue escrita por Falcone y Granero, donde utilizaron 63 individuos; no se detallan los criterios de inclusión y exclusión. La concentración de ADP utilizada fue de 5  $\mu\text{mol/L}$  y de epinefrina de 10  $\mu\text{mol/L}$ . Los valores obtenidos fueron calculados utilizando los percentiles 2, 5 y 97,5, para los límites inferior y superior, respectivamente. Los valores obtenidos de valores de referencia de porcentaje de agregación plaquetaria se detallan a continuación: ADP: 49-87%, EPI: 42-85%.

La tercera publicación fue escrita por Hayward y colaboradores; se utilizaron los datos de 171 individuos, escogidos para donación sanguínea. Los criterios de exclusión que se mencionan son el haber padecido algún problema de sangrado anteriormente o el haber consumido algún antiinflamatorio no esteroideo en los últimos 7 días. Utilizaron ADP con una concentración de 5  $\mu\text{mol/L}$  y epinefrina con una concentración de 6  $\mu\text{mol/L}$ . Los valores obtenidos fueron calculados utilizando pruebas no paramétricas (sin detalle). Los valores de referencia de porcentaje de agregación plaquetaria obtenidos se detallan a continuación: ADP: 41-97%, EPI: 9-101%.

### Valores de referencia

Según algunas instituciones, principalmente el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), se recomienda que cada laboratorio defina sus propios valores de referencia de las pruebas que se realicen, para así tener datos más confiables de los valores que se obtienen. Algunas guías, como la EP28-A3c, de la CLSI, definen que para el establecimiento de valores de referencia se debe tener la participación de al menos 120 sujetos de estudio, los cuales deben ser personas saludables. Esta definición de "saludable" sigue siendo un parámetro muy subjetivo y no tiene una definición universal. Algunos estudios utilizan sujetos al azar que cumplan con el criterio que ellos definen de saludables, otros utilizan sujetos aceptados para donación sanguínea, pues estos pasan primero por una evaluación de su salud. El utilizar donantes de sangre como población para el establecimiento de valores de referencia es un buen filtro, pues se selecciona a la



parte “sana” de la población; aunque tiene el inconveniente de que cada evaluación es dependiente del lugar donde se realice el proceso de donación, es decir, que no existe una estandarización de la selección por donantes de sangre (CLSI & IFCC, 2008).

Los valores de referencia se obtienen a partir del análisis de individual de participantes, luego estos valores son agrupados y se observa la distribución de los datos de manera estadística. Finalmente, se calculan los valores de referencia. (Solberg, 1987).

Para que los diferentes individuos puedan participar en el estudio, estos deben estar de acuerdo con un consentimiento informado que se les brinda antes de que formen parte del estudio. En este documento se debe indicar que el personal de laboratorio tiene permitido la obtención de muestras biológicas, además que la información brindada por los sujetos y los valores de laboratorio obtenidos se utilizarán para la determinación de los valores de referencia (CLSI & IFCC, 2008).

Las variables preanalíticas y analíticas deben ser tomadas en consideración antes de empezar el estudio. Para mejorar la reproducibilidad de los datos y la estandarización de estos es necesario describir las variables preanalíticas, pues es en estas donde ocurre la mayoría de los errores. Estas variables incluyen todos los aspectos antes de analizar una muestra, desde la selección de participantes hasta la obtención y transporte de la muestra. Las variables analíticas incluyen la variabilidad en el método utilizado, el control del equipo, reactivos, estándares de calibración y los métodos de cálculos. Estas variables deben ser controladas con el fin de garantizar la trazabilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos (Ozarda, 2016).

Para la obtención de los valores de referencia se debe hacer un análisis estadístico de los datos. Se recomienda el uso de percentiles para el establecimiento de los valores de referencia, donde se usa el percentil 2,5 como límite inferior y el percentil 97,5 como límite superior; esto principalmente para valores con una distribución no normal. Aun así, para grupos de muestras con distribución normal, se pueden utilizar pruebas no paramétricas, pues se ha visto que los resultados obtenidos de ambas formas son muy similares entre sí (CLSI & IFCC, 2008).

Existe también el concepto de verificación de los valores de referencia, que funciona como comparación con otros valores de referencia ya definidos. La ventaja de la verificación es que se necesitan al menos 20 sujetos, por lo que es más sencillo y rápido de realizar. La verificación se puede hacer comparando con manuales de usuario o publicaciones científicas. Al igual que en los estudios de establecimiento de valores de referencia, los sujetos participantes deben pasar por un proceso de selección, con criterios de inclusión y exclusión, como el caso del establecimiento de valores de referencia (CLSI & IFCC, 2008).

La verificación consiste en analizar los datos obtenidos y observar cuántos de estos se encuentran dentro del intervalo que se está utilizando como referencia. Si dos datos o menos se salen del intervalo, estos valores pueden ser usados como valores de referencia para la metodología que se está estudiando. En el caso de que tres o más datos no entren en el intervalo de referencia, se debe continuar con la determinación de valores para recolectar más datos; se recomienda que se continúe hasta obtener 120 valores, con el fin de determinar los intervalos de referencia (Horowitz, 2008).

## Justificación

Las plaquetas son importantes en el proceso de hemostasia, pues evitan que se den grandes pérdidas de sangre al formar un tapón mientras otros componentes de la coagulación actúan sobre el daño. Además, en los últimos años se ha visto que tienen otras funciones, como el reclutamiento de leucocitos al sitio de lesión (Cimmino, Fischetti, & Golino, 2017; Smyth, Mcever, Weyrich, Morrell, Hoffman, Arepally & Becker, 2009).

La agregación plaquetaria permite evaluar en un periodo corto de tiempo, la funcionalidad de las plaquetas, además de su baja complejidad de realización (Arenas, De La, Estrada, & Weber, 2010). Pese a que no detecta todos los casos de anomalías funcionales, es usada como primera opción de diagnóstico, pues sigue siendo el estándar de oro (Cattaneo, 2009; Lordkipanidzé, 2016).

Instituciones internacionales como la CLSI, instan a los laboratorios a establecer sus propios valores de referencia para las pruebas que en estos se realizan. La prueba de agregometría no cuenta con valores de referencia estrictamente establecidos y su interpretación se hace principalmente de manera cualitativa con las curvas de agregación. Por lo tanto el establecimiento de estos valores mejoraría la interpretación de los datos.

Para el establecimiento de valores de referencia en una prueba se necesita al menos 120 datos, lo cual para algunos laboratorios es un proceso laborioso, por lo que existe una alternativa con la recolección de al menos 20 datos, que es la verificación, donde se puede utilizar valores de estudios previos de revistas científicas como base de comparación (Howard, 2008). En este estudio se realiza

una verificación con tres publicaciones científicas como alternativa al establecimiento de valores de referencia (proyecto del que se deriva este estudio). Además, como esta metodología aún no está completamente estandarizada, también es importante el estudiar posibles variaciones al método que permitan obtener resultados óptimos.

## Objetivos

### Objetivo general

- Evaluar los valores de referencia para la prueba de agregometría plaquetaria realizada en el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), e interferentes relacionados a la prueba, a partir de plasma de donantes que asistieron a campañas de donación de sangre del Laboratorio Clínico de la Universidad de Costa Rica durante el año 2017, para la obtención de intervalos de referencia aplicables en la práctica clínica del CIHATA.

### Objetivos específicos

- Verificar los valores de porcentaje de agregación plaquetaria a partir de plasma de los participantes del estudio (utilizando ADP y epinefrina como agonistas), con valores de publicaciones científicas, con el fin de obtener rangos de referencia para utilizarlos en la práctica clínica del CIHATA.
- Comparar los porcentajes de agregación plaquetaria obtenidos con respecto a los reportados en la literatura para la valoración de la aplicabilidad de estos en el laboratorio.
- Describir las posibles variaciones en los porcentajes de agregación plaquetaria con respecto al tiempo de análisis, concentración de plaquetas y concentración de agonista en 12 de las muestras de los participantes del estudio, para la estandarización de estas variables en el método.

## **Metodología**

### **Reclutamiento de participantes**

Para el estudio se escogieron 44 individuos, todos donantes de sangre que asistieron a algunas campañas de donación realizadas por el Laboratorio Clínico de la Universidad de Costa Rica durante el año 2017. Los individuos fueron participantes voluntarios, aceptados para la donación sanguínea y pasaron por el proceso de consentimiento informado (Ver Anexo #2), el cual fue aplicado por la Dra. Mariela Solano Vargas. El estudio posee el permiso del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica (Ver Anexo #1).

### **Criterios de inclusión y exclusión**

Los individuos participantes del estudio fueron escogidos fuera de la sala de donación, mientras esperaban a ser atendidos para la respectiva entrevista. Se aceptaron aquellos elegidos al azar fuera de la sala y que se aceptaron para la donación sanguínea. Se rechazaron aquellos individuos escogidos para el estudio pero que no fueran aptos para la donación según la entrevista (Anexo #3) o aquellos que pasaron la entrevista pero luego de un hemograma preliminar en un contador hematológico, tenían valores por debajo de los límites inferiores establecidos según su sexo, como la concentración de hemoglobina, el conteo de leucocitos, el porcentaje de linfocitos, el porcentaje de neutrófilos o el número de plaquetas.

## Obtención de las muestras

Los participantes fueron llevados a camillas especiales para donación sanguínea y luego de la perforación con la aguja de donación (calibre 16), se llenaba una bolsa accesoria, que se utiliza como filtro para los primeros mililitros de sangre. Esta bolsa estaba adaptada a un capuchón, para la obtención de muestras de sangre con la utilización de tubos al vacío con anticoagulante. A partir de las bolsas accesorias se obtuvieron de 4 a 6 tubos de sangre por cada participante, los cuales contenían citrato de sodio; cada tubo tenía una capacidad de 3,5 mL y contenían una concentración de citrato de sodio de 3,2%. Los tubos se transportados en constante movimiento hasta su llegada al laboratorio.

## Preparación de las muestras

Los tubos de sangre obtenidos se centrifugaron a 145 g por 10 minutos para recolectar el plasma rico en plaquetas (PRP), se separó en tubos de plástico y fueron mantenidos en constante agitación hasta el momento de su análisis. Una vez separado el PRP, los tubos con sangre citratada fueron centrifugados a 1300 g durante 10 minutos para obtener el plasma pobre en plaquetas o PPP y se separó en tubos de plástico.

Se utilizó el contador hematológico Sysmex XT 1800i, se cuantificó la concentración de plaquetas en el PRP. Si la concentración de plaquetas era mayor a 250 000 plaquetas/ $\mu$ L, se realizó la dilución respectiva con el PPP. No se cuantificó el PPP.

## Determinación de los porcentajes de agregación

Una vez estandarizada cada muestra a la concentración escogida de 250 000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (valor que se utiliza en el CIHATA), se procedió a determinar los porcentajes de agregación plaquetaria mediante la técnica de Born, con la utilización del equipo CHRONO-LOG modelo 490 2D y los agonistas ADP y epinefrina. Se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de la dilución en un tubo de vidrio con un agitador magnético metálico, para mantener la muestra en agitación constante, y en otro tubo sin agitador se colocaron 500  $\mu\text{L}$  del respectivo PPP del participante. Ambos tubos se incubaron en el equipo por 5 minutos, para que cada muestra llegase a 37°C. Luego se colocó cada tubo en su respectivo pocillo (el PPP en el pocillo de blanco y el tubo con agitador en el pocillo de prueba) y se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de ADP en el tubo de prueba. Se controló la agregación por 5 minutos. El procedimiento se repitió utilizando epinefrina en vez de ADP, la cual se preparó reconstituyendo una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  en 450  $\mu\text{L}$  de solución salina. Los valores del porcentaje de agregación plaquetaria se almacenaron para su análisis estadístico, utilizando el programa SPSS. La concentración utilizada de los agonistas se detalla en el Cuadro II.

**Cuadro II.** Concentración de ADP y epinefrina utilizada en el ensayo de agregación plaquetaria por el método de transmisión de luz

<b>Agonista</b>	<b>Concentración inicial (mmol/L)</b>	<b>Concentración final (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
<b>ADP</b>	1	10
<b>Epinefrina</b>	1	10

Nota: la concentración inicial es la concentración en el vial de almacenamiento, la concentración final es la concentración luego de agregada la alícuota en el PRP.



## Variaciones al método

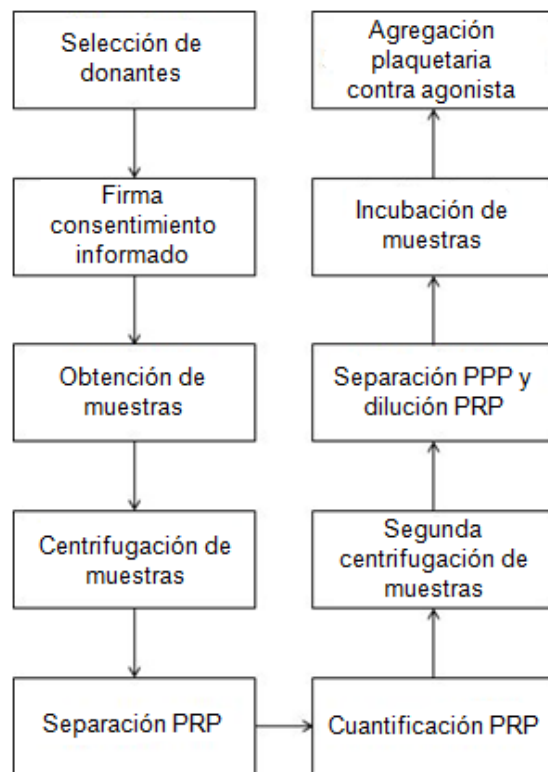
Para 12 muestras elegidas al azar, en caso de contar con volumen suficiente de plasma (tanto de plasma rico como de pobre en plaquetas), luego de determinar cada valor de porcentaje de agregación con la metodología convencional, se hizo alguna de las siguientes variaciones al método: se omitió la dilución, se determinó el porcentaje de agregación luego del tiempo establecido en la literatura (4 horas) o se agregó el doble del volumen de agonista.

## Análisis de datos

Para la verificación de los porcentajes de agregación obtenidos, primero se eliminaron los valores desviados, con el programa SPSS. Después se vieron cuántos datos se salían de los intervalos de las publicaciones científicas, además se utilizaron gráficos de dispersión para observar la distribución de los datos.

Luego, con el programa estadístico SPSS, se determinó la normalidad de los datos (con la prueba de Shapiro-Wilk y el uso histogramas) y después se calcularon los percentiles 2,5 y 97,5 con el fin de obtener datos comparables con los de los artículos científicos. El análisis de los datos con respecto a los valores de referencia de las publicaciones se hizo de manera descriptiva.

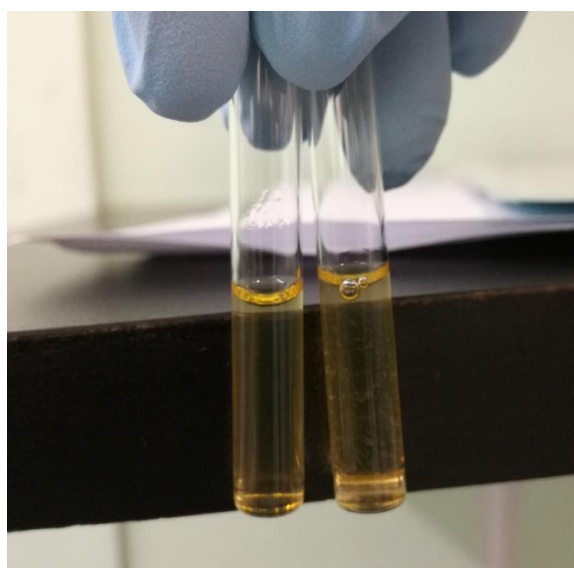
En la Figura 3 se muestra un esquema resumen de los pasos metodológicos del proyecto, tanto experimentales como estadísticos.



**Figura 3.** Esquema de la metodología de la obtención de valores de porcentaje de agregación plaquetaria.

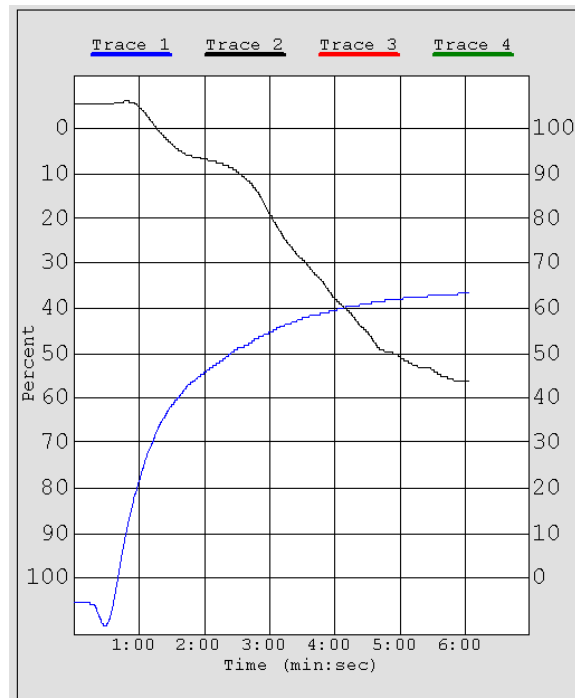
## Resultados

Luego que se agregó cada uno de los agonistas a la muestra de plasma de cada participante, se obtuvo el porcentaje de agregación plaquetaria. Como se observa en la Figura 4, los plasmas cambiaron de turbio a claro, con algunos grumos de plaquetas (agrupados blanquecinos observables a simple vista), indicando que el proceso de agregación se llevó a cabo.



**Figura 4.** Cambio en la turbidez de la muestra luego de realizada la prueba de agregación plaquetaria. A la izquierda se observa el PPP; a la derecha el PRP luego de ser agregado un volumen de agonista.

Se obtuvieron, además, las curvas de agregación plaquetaria, proporcionadas por el software del agregómetro (Ver Figura 5)



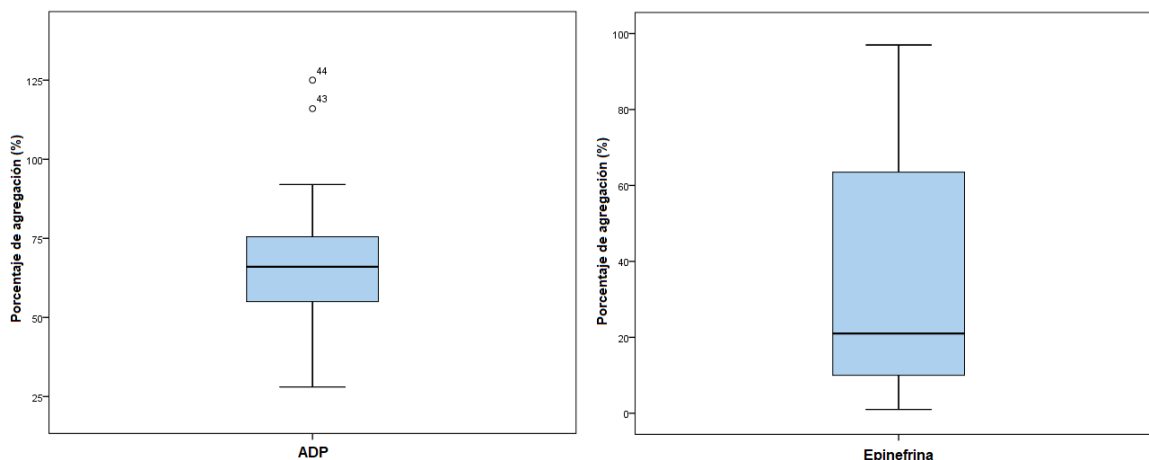
**Figura 5.** Curvas de agregación plaquetaria obtenidas por el método de transmisión de luz, utilizando ADP (azul) y epinefrina (negra) como agonistas

Se analizaron los 44 datos de porcentaje de agregación plaquetaria utilizando ADP y epinefrina (EPI), obteniendo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación que se muestran en el Cuadro III.

**Cuadro III.** Promedio (X), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) de los porcentajes de agregación plaquetaria obtenidos mediante el método de transmisión de luz, utilizando ADP y epinefrina como agonistas

Agonista	X	DE	CV
ADP	65,73	19,30	29
Epinefrina	35,68	30,48	85

Con el programa SPSS, se detectaron y eliminaron los valores desviados (Ver Figura 6). Para ADP se detectaron 2 valores y para epinefrina no se detectó ninguno.



**Figura 6.** Distribución de los datos de porcentaje de agregación plaquetaria con los agonistas ADP (izquierda) y epinefrina (derecha), obtenidos por el método de transmisión de luz

Se calcularon los nuevos valores de promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, obteniendo los resultados mostrados en el Cuadro IV.

**Cuadro IV.** Promedio ( $\bar{X}$ ), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) de los porcentajes de agregación plaquetaria obtenidos mediante el método de transmisión de luz, con el uso de ADP y epinefrina como agonistas, luego de eliminados los valores desviados

<b>Agonista</b>	<b>X</b>	<b>DE</b>	<b>CV</b>
<b>ADP</b>	63,12	15,38	24
<b>Epinefrina</b>	35,68	30,48	85

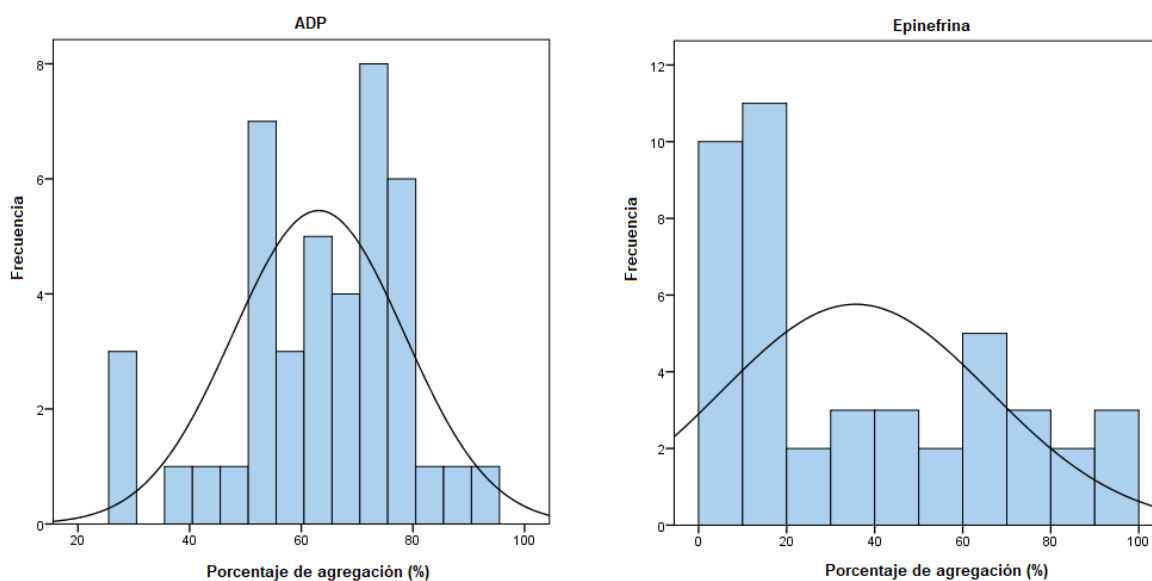
Luego de eliminar los valores desviados de las listas de trabajo se procedió a evaluar la normalidad de los datos realizando la prueba de Shapiro-Wilk, con el programa SPSS. En el Cuadro V se muestran los datos para la evaluación.

**Cuadro V.** Datos de la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los valores de porcentaje de agregación obtenidos

Agonista	Significancia
ADP	0,083
EPI	0,000

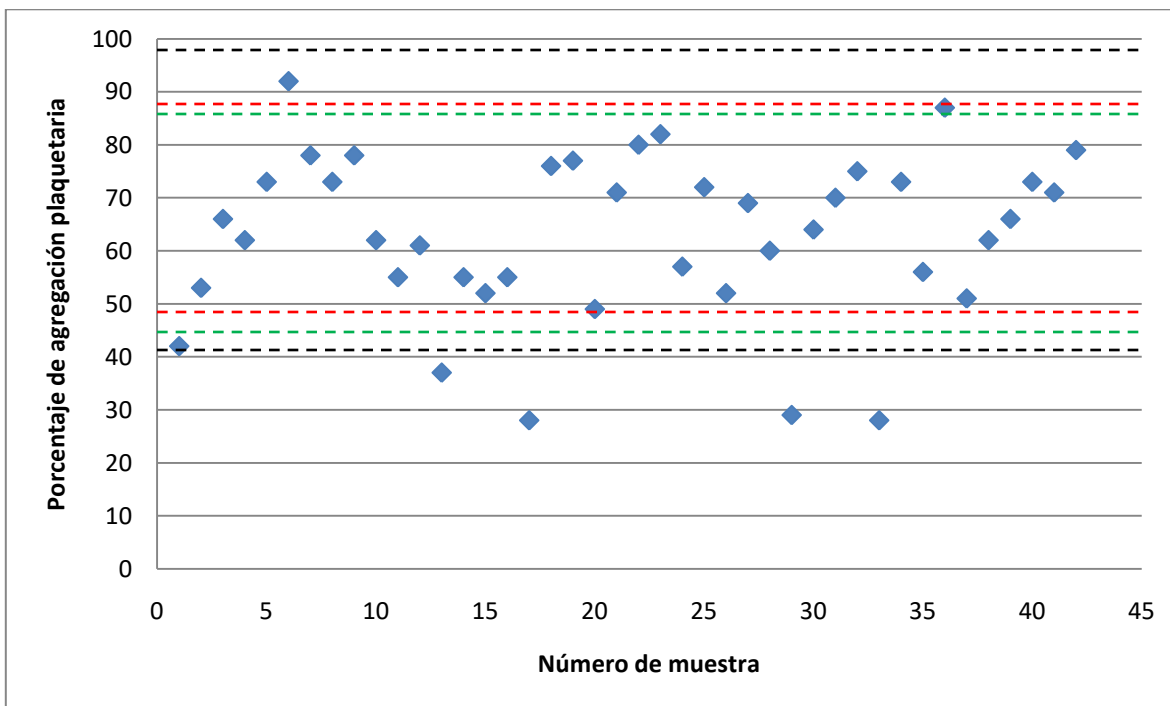
Nota: los grupos de valores con una significancia mayor a 0,05 son considerados valores con una distribución normal.

Se procedió a realizar un histograma de los valores obtenidos (Ver Figura 7) para evaluar la normalidad mediante figuras.

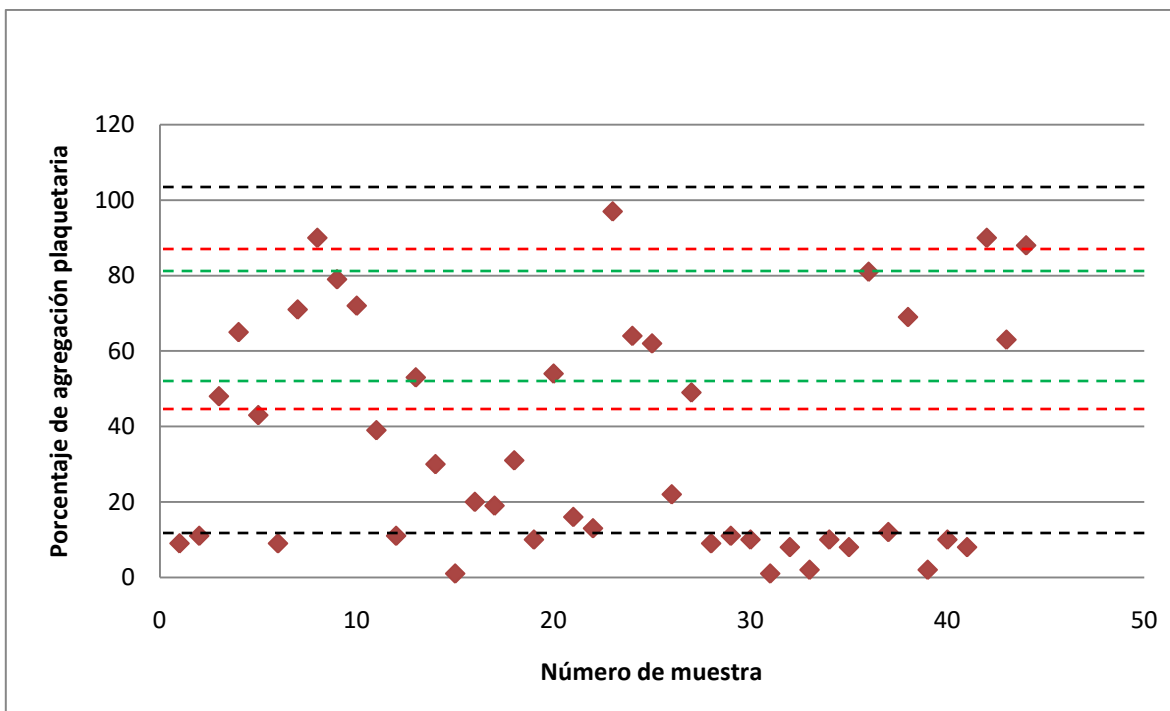


**Figura 7.** Histograma de los valores de porcentaje de agregación plaquetaria obtenidos por el método de transmisión de luz. A la izquierda se observan los valores utilizando ADP como agonista y a la derecha epinefrina

Para la verificación de los valores de referencia se hicieron dos gráficos de dispersión (Ver Figura 8 y Figura 9), para observar cuántos datos entraban en el intervalo de los valores de referencia de las publicaciones científicas mencionadas en la sección “Marco Teórico”.



**Figura 8.** Gráfico de dispersión de los porcentajes de agregación plaquetaria obtenidos por el método de transmisión de luz, con el ADP como agonista. Las líneas punteadas representan los valores superiores e inferiores de las publicaciones científicas utilizadas como comparación: roja (Falcone & Granero), verde (Mesa *et al.*), negra (Hayward *et al.*)



**Figura 9.** Gráfico de dispersión de los porcentajes de agregación plaquetaria obtenidos por el método de transmisión de luz, con la epinefrina como agonista. Las líneas representan los valores superiores e inferiores de las publicaciones científicas utilizadas como comparación: roja (Falcone & Granero), verde (Mesa *et al.*), negra (Hayward *et al.*)

Con estos datos se calcularon los percentiles 2,5 y 97,5, obteniendo los resultados desplegados en el Cuadro VI.

**Cuadro VI.** Valores de referencia del porcentaje de agregación plaquetaria obtenidos utilizando el método de transmisión de luz

Percentil	ADP	EPI
2,5	28,00	1
97,5	91,62	96,13

Se realizó un cálculo de la cantidad de mujeres y hombres que participaron del estudio, donde se descartan aquellos casos en los que no había suficientes datos



de porcentaje de agregación por algún inconveniente durante el experimento y aquellos sujetos que fueron diferidos de la donación sanguínea (Cuadro VII)

**Cuadro VII.** Distribución de los sujetos de estudio por sexo

<b>Característica</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>	<b>Total de sujetos</b>
<b>Cantidad</b>	32	23	55
<b>Diferidos</b>	4	3	7
<b>Eliminación por falta de datos</b>	3	1	4
<b>Trabajo</b>	25	19	44
<b>Edad promedio</b>	27	29	28
<b>Conteo de plaquetas/<math>\mu</math>L</b>	366 000	380 000	372 000

Con aquellas muestras cuyo volumen era suficiente, se les realizaron las variaciones al método (evaluación de la agregación en el plasma no diluido, agregar doble volumen de agonista para duplicar su concentración y el análisis del plasma 5 horas luego de obtenida la muestra). Los valores de porcentaje de agregación plaquetaria obtenidos se detallan en el Cuadro VIII.

**Cuadro VIII.** Datos de porcentaje de agregación basales y luego de alguna variación de 12 sujetos del estudio, obtenidos por el método de transmisión de luz

<b>Sujeto</b>	<b>ADP</b>	<b>EPI</b>	<b>ADP doble</b>	<b>EPI doble</b>	<b>ADP 5 horas</b>	<b>EPI 5 horas</b>	<b>ADP plasma no diluido</b>	<b>EPI plasma no diluido</b>
<b>1</b>	74	73	85	62	-	-	-	-
<b>2</b>	78	43	75	52	78	79	72	72
<b>3</b>	98	69	91	74	80	74	-	-
<b>4</b>	72	6	72	13	68	4	84	4
<b>5</b>	97	17	70	20	-	-	84	30
<b>6</b>	78	92	75	66	-	-	-	-
<b>7</b>	84	6	79	20	76	21	89	61
<b>8</b>	79	12	72	18	-	-	-	-
<b>9</b>	36	15	-	-	-	-	68	66
<b>10</b>	78	21	83	18	64	11	89	25
<b>11</b>	59	9	72	24	-	-	73	6
<b>12</b>	45	14	41	13	78	15	-	-

(-): No se realizó la variación

## Discusión

Para la comparación de resultados, se utilizaron tres publicaciones de establecimiento de valores de referencia para la prueba de agregometría: la publicación realizada por Mesa y colaboradores, la escrita por Falcone y Granero y la publicación de Hayward y colaboradores (explicadas en la sección “Marco teórico”). Para ambos casos de agonistas, más de tres valores de porcentaje de agregación plaquetaria se salen de los intervalos estipulados en las publicaciones científicas, por lo que estos valores no pueden ser utilizados como referencia. Se debe continuar con la recolección de datos para establecer los valores de referencia para esta prueba, como lo indican las guías (CLSI & IFCC, 2008) (Howard, 2008).

Los valores de porcentaje de agregación plaquetaria obtenidos para el ADP mostraron una distribución normal, mientras que los obtenidos para la epinefrina no. Según lo establecido en la guía de la CLSI en el año 2008, para variables con distribución normal se pueden calcular los valores de referencia utilizando los límites superior e inferior o utilizando métodos no paramétricos, como los percentiles; para los datos con distribución no normal se deben usar métodos no paramétricos.

Para el caso del ADP, se puede observar que ambos valores de porcentaje de agregación plaquetaria se alejan de los valores reportados por Mesa, *et al.* Falcone & Granero y Hayward *et al.* De ambos valores, el valor superior es el que menos se aleja de lo reportado.

Con respecto a los valores de porcentaje de agregación de epinefrina, se puede observar que estos difieren con lo reportado en las publicaciones científicas de Mesa y Falcone & Granero, pero para el caso de la publicación de Hayward, se puede observar que son más similares entre sí, principalmente el valor superior.

**Cuadro IX.** Valores de referencia de porcentaje de agregación plaquetaria para los agonistas ADP y epinefrina (EPI) obtenidos por el método de transmisión de luz

<b>Trabajo</b>	<b>ADP valor inferior</b>	<b>ADP valor superior</b>	<b>EPI valor inferior</b>	<b>EPI valor superior</b>
<b>Análisis</b>	28	91,62	1	96,13
<b>Falcone &amp; Granero</b>	49	87	42	85
<b>Mesa <i>et al.</i></b>	44,1	86,7	50,8	80
<b>Hayward <i>et al.</i></b>	41	97	9	101

En el caso de los histogramas, el de ADP muestra una ligera tendencia a la normalidad, mientras que en el caso de la epinefrina no se observa una tendencia a la normalidad, sino que hay valores desviados hacia la izquierda.

Como se observa en los coeficientes de variación (Cuadro IV), la variabilidad de los resultados es mayor en el caso de la epinefrina, por ello el intervalo de valores de referencia es tan amplio, como se observa en el estudio de Hayward *et al.* Estas variaciones pueden deberse al tipo de población en estudio, pues los sujetos fueron escogidos completamente al azar, además el único filtro que se tuvo fue la entrevista (en la que se utilizaban variables como infecciones recientes, consumo de medicamentos [en especial aspirina] y conductas sexuales de riesgo) y los valores de hemoglobina, hematocrito y porcentaje de neutrófilos y linfocitos del paciente (que se miden antes de aceptarlo para la donación); no se toman en consideración otras características como la dieta, el ejercicio y el fumado,

variables que pueden afectar la agregación plaquetaria (Lordkipanidz, 2016; Miller, 2014).

Se puede notar que se tiene una mayor participación de mujeres que de hombres, aunque esta diferencia no es significativa. De lo que no se tiene un control es de los grupos etarios y etnias que participan del estudio, lo cual podría influir en los datos obtenidos (Miller, 2014); lo que se conoce es que la mayoría de la población que participó en el estudio eran jóvenes menores de 30 años (promedio 28). También, se puede observar que el promedio del conteo plaquetario permite la realización del estudio, el cual se realizó utilizando una concentración de 250 000 plaquetas/ $\mu$ L, aunque se ha visto que no es necesaria esta dilución (Cattaneo, 2009; Linnemann & Schwonberg, 2008). La limitante que pudo presentarse era la concentración baja de plaquetas (menor a 100 000 plaquetas/ $\mu$ L), concentración a la cual no se puede realizar el método de agregación plaquetaria en plasma, pues los resultados pueden verse alterados (Córdova, Vargas *et al.*, 2011). Esta variable no se analizó en este estudio.

El alto porcentaje de la población que agregó pobremente con epinefrina se ha visto en otras publicaciones científicas, en las cuales se ha observado que frecuentemente hay individuos que no agregan correctamente con este agonista, sin tener ninguna patología de fondo detectada (Gresele *et al.*, 2015). Además se deben considerar cuestiones metodológicas, como la manipulación del PRP para la realización de la dilución (que se comentará más adelante). Se debe continuar con la recolección de datos para evaluar este comportamiento, pues la cantidad de datos no es suficiente para sacar alguna conclusión.

Con respecto a las variaciones realizadas al método (volumen doble de agonista, no dilución del plasma y tiempo de análisis): en el caso del aumento de la concentración, este no mostró una diferencia con los valores base de cada sujeto, por lo que parece que la concentración de agonista que se utiliza es la adecuada. En el caso de la muestra no diluida, el porcentaje de agregación aumentó en la mayoría de las muestras, principalmente en el caso de la epinefrina, esto puede deberse a que, como mencionan Linnemann & Schwonberg y Cattaneo y colaboradores, al diluirse el PRP con el PPP se inhiba la agregación plaquetaria por presencia de sustancias inhibitorias en el PPP, liberadas de las células sanguíneas luego del centrifugado de los tubos a mayor velocidad (segundo paso de centrifugación), además hay mayor manipulación del PRP aumentando la probabilidad de activación y consecuente agregación de las plaquetas

Con respecto al tiempo de análisis, se puede observar que en el caso del ADP no hay una gran diferencia al analizar la muestra a las 5 horas, aunque en la mayoría de los casos hubo una disminución de los porcentajes de agregación. Por lo tanto, es mejor analizar las muestras máximo 4 horas luego de recolectadas, como menciona Lordkipanidz. En el caso de la epinefrina se puede observar que se obtuvo aumento, disminución y cambios pequeños en los porcentajes de agregación. Con estos datos no se puede concluir el comportamiento de las muestras a esta variación, por lo que se deben analizar plasmas de otros sujetos.

Cabe destacar que, a pesar de los valores obtenidos, las muestras deben analizarse en el menor tiempo posible, con el fin de obtener valores más confiables de lo que sucede de manera *in vivo* en el paciente, además de manipular la muestra lo menos posible.

Con respecto a los estudios de agregación plaquetaria en Costa Rica, hay poca información acerca de esta y solamente hay un trabajo publicado por López y Cartín, donde mencionan que esta prueba permite detectar algunos defectos plaquetarios en nuestra población. Además, al igual que lo observado en este estudio, se recalca la importancia de la estandarización de la metodología siguiendo lineamientos de guías internacionales. Hasta la fecha en el país no hay estudios publicados acerca de valores de referencia de porcentaje de agregación plaquetaria.

## Conclusiones

- Al haber más de tres datos que no entraron en el intervalo de los valores de referencia de las publicaciones científicas utilizadas, no se pueden verificar los valores de porcentaje de agregación obtenidos. Se debe continuar con la determinación de valores hasta obtener 120 datos como mínimo, para establecer los valores de referencia para esta prueba.
- Existe una diferencia entre los valores de porcentaje de agregación reportados por otros autores y los observados en este estudio, pudiendo deberse a las diferentes estandarizaciones que se hacen al método entre cada laboratorio.
- Según los datos obtenidos el utilizar muestras de plasmas no diluidos mejora los datos de porcentaje de agregación plaquetaria, probablemente al evitar la inhibición por sustancias liberadas durante la centrifugación a altas velocidades y al disminuir la manipulación del plasma.
- Para el caso del ADP el analizar las muestras luego del tiempo recomendado (4 horas luego de obtenida la muestra) disminuye un poco los valores de porcentaje de agregación plaquetaria con respecto a los valores obtenidos durante este tiempo.
- El aumento de la concentración de agonista no mostró un cambio notable con respecto a los valores bases de cada individuo respectivo, por lo que se pueden seguir utilizando las concentraciones anteriormente establecidas.
- Todos los valores que se obtengan de porcentajes de agregación deben ser interpretados con las guías internacionales y criterios médicos, además de



valorar las curvas obtenidas y tomar en cuenta las variables preanalíticas y analíticas que puedan afectar los resultados, pues valores bajos en el porcentaje pueden no estar correlacionados con alguna patología (como lo observado en el caso de la epinefrina).

- Al igual que lo mencionado en el trabajo del año 2014 en población pediátrica en Costa Rica, se observó que es necesaria la estandarización del método de agregación plaquetaria en plasma siguiendo las recomendaciones de guías internacionales, para obtener los resultados óptimos y así mejorar la detección de defectos plaquetarios.

## Limitaciones y recomendaciones

El estudio tiene la limitación que por cada campaña de donación, se pueden analizar entre 5 y 6 muestras de plasmas, por el tiempo que se invierte separando las muestras y analizando cada agonista. Además, las campañas de donación realizadas por el Laboratorio Clínico de la Universidad de Costa Rica, solamente se realizan cada dos semanas, limitando aún más la cantidad de muestras que se pueden analizar mensualmente.

Además, la mayoría de la población que participa del estudio es proveniente del Gran Área Metropolitana, por lo que puede no representar a la totalidad de la población del país.

El estudio de las variaciones al método tiene la limitante de no poderse realizar en la totalidad de las muestras, ya que estos dependían del volumen que sobrara luego de analizar los plasmas en las condiciones establecidas. Además, al ser el estudio una derivación de un proyecto de investigación más grande de establecimiento de valores de referencia, se deben obtener los porcentajes de agregación con otros agonistas (colágeno, ácido araquidónico y ristocetina), por lo que es más limitado el volumen de plasma “sobrante”.

Al no poder verificar los valores de referencia, se recomienda continuar con el estudio y evaluar los resultados cuando se tengan los 120 valores que se necesitan para el establecimiento de los valores de referencia. Los valores obtenidos son un primer corte que da una visión exploratoria del comportamiento de los valores de la prueba de agregación plaquetaria. Además estos valores

servirán como guía para evaluar el comportamiento de la agregación plaquetaria con epinefrina, que no se pudo realizar en este estudio.

También, es recomendable siempre correr un control de plasma normal (lo cual no se realizó en este estudio), para asegurar la confiabilidad de los datos obtenidos (Favaloro, 2009).

Otra recomendación es evaluar plasmas diluidos hasta llegar a concentraciones menores a 200 000 plaquetas/ $\mu$ L con diferentes agonistas, para observar el comportamiento a bajas concentraciones plaquetarias y valorar si el método puede ser aplicable a pacientes con conteos bajos de plaquetas.

## Bibliografía

1. Aird, W. C. (2013). Endothelium. *Consultative Hemostasis and Thrombosis: Third Edition*, 33–41.
2. Aradi, D., Storey, R. F., Komócsi, A., Trenk, D., Gulba, D., Kiss, R. G., Huber, K. (2014). Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *European Heart Journal*, 35(4), 209–215.
3. Arenas, A. C., De La, V. A., Estrada, G., & Weber, F. R. (2010). El valor de la agregometría en el diagnóstico diferencial de alteraciones plaquetarias, 8(1), 25–32.
4. Bolliger, D., Seeberger, M. D., & Tanaka, K. A. (2012). Principles and Practice of Thromboelastography in Clinical Coagulation Management and Transfusion Practice. *Transfusion Medicine Reviews*, 26(1), 1–13.
5. Born, G. (1962). *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal*. *Nature*, 194(4832), 927-929
6. Breddin, H. K. (2005). Can platelet aggregometry be standardized?. *Platelets*, 16(3-4), 151-158.
7. Cattaneo, M. (2009). Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 35(2), 158–167.
8. Cattaneo, M., Lecchi, A., Zighetti, M. , Lussana, F. (2007). *Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet*

- count. Haematologica*, 92(5), 694-697.
9. Chen, A., & Teruya, J. (2009). Global Hemostasis Testing Thromboelastography: Old Technology, New Applications. *Clinics in Laboratory Medicine*, 29(2), 391–407.
  10. Cimmino, G., Fischetti, S., & Golino, P. (2017). The Two Faces of Thrombosis: Coagulation Cascade and Platelet Aggregation. Are Platelets the Main Therapeutic Target? *Journal of Thrombosis and Circulation: Open Access*, 3(1), 1–6.
  11. Clauser, S., & Cramer-Bordé, E. (2009). Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 35(2), 213–223.
  12. CLSI and IFCC, C28-A3 document; *Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline-third edition*, 2008;28:1-76
  13. Córdova, V., Vargas, P., Vega, C., Quintero, M., & Hurtado, R. (2011). Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. *Medicina Interna de México*, 27(1), 58.
  14. Falcone, M.; Granero, R. (2012). Intervalos de referencia para agregación plaquetaria en individuos sanos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 46(4)
  15. Favaloro, E. J. (2009, March). Internal quality control and external quality assurance of platelet function tests. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 35, No. 02, pp. 139-149). Thieme Medical Publishers.
  16. Flores-Rivera, O. I., Ramírez-Morales, K., Meza-Márquez, J. M., & Nava-

- López, J. A. (2014). Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37(S2), 382-386.
17. Fredenburgh, J., Weitz, J. (2017) Overview of Hemostasis and Thrombosis. *Hematology*, 1831–1842
18. Frelinger, A. L., Grace, R. F., Gerrits, A. J., Berny-Lang, M. A., Brown, T., Carmichael, S., Michelson, A. (2015). Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood*, 126(7), 873–879.
19. Gresele, P., Harrison, P., Gachet, C., Hayward, C., Kenny, D., Mezzano, D., Cattaneo, M. (2015). Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(2), 314–322.
20. Hartwig, J. H. (2006). The platelet: Form and function. *Seminars in Hematology*, 43(SUPPL. 1), 94–100.
21. Hayward, C., Moffat, K., Pai, M., Liu, Y., Seecharan, J., McKay, H., Webert, K., Cook, R. & Heddle, N. (2008). An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission platelet aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thrombosis and haemostasis*, 100(01), 01-12
22. Hoffman, M., & Monroe III, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, 85(06), 958-965.
23. Hoffman, M., & Monroe, D. M. (2007). Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematology/Oncology Clinics*, 21(1), 1-11.
24. Horowitz, G. L. (2008). Reference intervals: Practical

- aspects. *EJIFCC*, 19(2), 95.
25. Italiano, J. E., & Hartwig, J. H. (2018). Megakaryocyte and Platelet Structure. *Hematology*, 1857–1869.
26. Jackson, S. P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, 109(12), 5087-5095.
27. Jaffer, I. H., & Weitz, J. I. (2018). *Antithrombotic Drugs. Hematology* (Seventh Ed, Vol. 1). Elsevier Inc.
28. Jurk, K., Ph, D., Kehrel, B. E., & Ph, D. (2005). Platelets : Physiology and Biochemistry, 1(212), 381–392.
29. Linnemann, B., Schwonberg, J., Mani, H., Prochnow, S., & Lindhoff-Last, E. (2008). Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(4), 677–683.
30. López, A., & Macaya, C. (2013). Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista española de cardiología suplementos*, 13, 2-7.
31. López, J., Cartin, W., Calvo, M., Suarez, C., Valverde, B., Jensen, E., & Navarrete, M. (2014). Platelet Function Testing In A Pediatric Population In Costa Rica: Is It Possible To Consistently Detect Qualitative Platelet Defects In A Third World Setting?. *American Journal Of Hematology*, 89(6), E20.
32. Lordkipanidzé, M. (2016). Platelet function tests. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(3), 258–267.
33. Mesa, L., Castañeda, M., Montero, M., Mojena, X., Ricardo, N., Jiménez, M. (2017). Estudio de agregación plaquetaria con diferentes agonistas.

- Valores de referencia. *Revista Cubana de Medicina*. 56 (1), 39-49.
34. Miller, C. H., Rice, A. S., Garrett, K., & Stein, S. F. (2014). Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *British journal of haematology*, 165(6), 842-853.
35. Montiel, G. (2003). Temas selectos de laboratorio e investigación en Hematología. VIII. *Hemostasia Primaria*. *Gac Méd Méx*, 95-97
36. Mutch, N. (2013). The Role of Platelets in Fibrinolysis. *Platelets*. Third edition. ELSEVIER
37. Ozarda, Y. (2016). Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemia medica: Biochemia medica*, 26(1), 5-16.
38. Ramström, S., Södergren, A., Tynngård, N., Lindahl, T., & Lindahl, T. L. (2016). Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives? Platelet function determined by flow cytometry -new perspectives? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 3(42), 268–281.
39. Rand, M. L., Leung, R., & Packham, M. A. (2003). Platelet function assays. *Transfusion and Apheresis Science*, 28(3), 307–317.
40. Rendu, F., & Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12(5), 261-273.
41. Ruiz, E. (2006). Antiagregantes plaquetarios. *Revista Peruana de Cardiología*, 32(1), 29
42. Sáenz, G; Valverde, B.; Rodríguez, W. (2016). *Hematología Analítica*. Editorial Nacional de Salud y Seguridad Social. San José, Costa Rica



43. Sangkuhl, K., Shuldiner, A., Klein, T., & Altman, R. (2011). Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(8), 516–521.
44. Sharathkumar, A., & Shapiro, A. (2008). Trastornos de la función plaquetaria. *Tratamiento de la Hemofilia*, 19, 1-22.
45. Smyth, S., Mcever, R., Weyrich, A., Morrell, C., Hoffman, M., Arepally, G., Becker, R. C. (2009). Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(11), 1759
46. Solberg, H. E. (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta*, 170(2-3), S13-S32
47. Solomon, C., Traintinger, S., Ziegler, B., Hanke, A., Rahe-Meyer, N., Voelckel, W., & Schöch, H. (2011). Platelet function following trauma. *Thrombosis and haemostasis*, 105(02), 322-330.
48. Van Hinsbergh, V. W. M. (2012). Endothelium - Role in regulation of coagulation and inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 34(1), 93–106.
49. Warner, T. D., Nylander, S., & Whatling, C. (2011). Anti-platelet therapy: Cyclo-oxygenase inhibition and the use of aspirin with particular regard to dual anti-platelet therapy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(4), 619–633.

50. Zhou, L., & Schmaier, A. H. (2005). Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma. *American Journal of Clinical Pathology*, 123(2), 172–183.

# Anexos

## Anexo #1



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

**VI** Vicerrectoría de  
Investigación

21 de febrero de 2017  
VI-1401-2017

Mariela Solano Vargas  
Investigadora  
Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
CENTRO DE INVESTIGACION EN HEMATOLOGIA  
Y TRASTORNOS A FINES

24 FEB 2017

**RECIBIDO**

Por: \_\_\_\_\_

El Comité Ético Científico (CEC) en su sesión No.48, celebrada el 15 de febrero de 2017 sometió a consideración el Proyecto de Investigación "Determinación de valores de referencia para las pruebas de agregometría y de coagulación realizadas en el CIHATA".

Después del análisis respectivo, el Comité acuerda:

**Acuerdo N°6:** Se acuerda declarar aprobado el Proyecto de Investigación "Determinación de valores de referencia para las pruebas de agregometría y de coagulación realizadas en el CIHATA", de la Investigadora Mariela Solano Vargas.

Quedamos en la entera disposición de colaborar ante cualquier consulta.  
Sin más por el momento, se suscribe cordialmente,



M.Sc. Alfonso Chacón Mata  
Presidente Comité Ético Científico



dha  
C.c Consejo Científico, CIHATA **Copia para**  
M.Sc. Dario Hernández. Gestor de proyectos  
Archivo/consecutivo.

---

Tel: 2511-1350 | Fax: (506) 2224-9367 | Correo electrónico: vi@vinv.ucr.ac.cr | Portal de Investigación:  
www.vinv.ucr.ac.cr. Dirección: Cuarto piso de la Biblioteca Demetrio Tinoco. Sede Rodrigo Facio.

## Anexo #2



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN  
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO  
Teléfono/Fax: (506) 2511-4201/(506) 2224-9367

Centro de Hematología y Trastornos  
Afines (CIHATA)

**FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
(para ser sujeto de investigación)

**Implementación de valores de referencia en agregometría**

Código (o número) de proyecto: \_\_\_\_\_

Nombre de la Investigadora Principal: Mariela Solano Vargas

Nombre del/la participante: \_\_\_\_\_

- A. **PROPÓSITO DEL PROYECTO:** En el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA) de la Universidad de Costa Rica, realizará un estudio sobre una prueba de laboratorio que mide la función de unos elementos de la sangre llamados plaquetas. Establecer los valores normales que se deben obtener en esta prueba es importante porque muchos pacientes la requieren y porque se ve influenciada por factores como la temperatura, cuanto se dura en tomar la muestra, los medicamentos que toman, entre otros. A causa de no conocer aún los valores normales, cuesta mucho relacionar cuando la prueba está alterada por que realmente las plaquetas no funcionan o porque otra condición del paciente o al realizar la metodología no está funcionando. Esta prueba es necesaria para el apoyo en el diagnóstico de algunas enfermedades relacionadas con sangrados o con trombos en la sangre, por lo que saber los valores de referencia y qué factores la afectan permitirán un resultado adecuado que sirve para que médicos tomen decisiones importantes acerca de tratamiento con los pacientes afectados, por lo que usted contribuiría a determinar dichos valores normales de la prueba. Este proyecto será financiado por la Universidad de Costa Rica, toda la información adquirida será confidencial y el estudio durará 2 años en el cual se analizarán las muestras de los participantes. Dichos datos se manejarán en una base de datos del centro y su análisis y publicación de resultados serán totalmente anónimos. Los registros de resultados, consentimientos informados estarán resguardados en el CIHATA.

**¿QUÉ SE HARÁ?:** Si la persona acepta participar en este estudio, tendrá que llenar un formulario donde se recolectarán algunos datos de información personal y de su estado de salud. Luego se obtendrán 2 tubos de 4 ml con la sangre del participante, lo que consiste en una toma de sangre convencional como cuando se va a la clínica o el EBAIS, la persona encargada limpiará la zona con alcohol, posteriormente pincha la vena resaltada, extrae los dos tubos de tapón celeste, los retira, saca la aguja y pone un algodón o curita en la zona.

Firma de sujeto participante: \_\_\_\_\_  
Comité Ético Científico - Universidad de Costa Rica - Número de sesión en que fue aprobado el proyecto: \_\_\_\_\_



A partir de estas muestras se obtendrá plasma para así calcular el porcentaje de agregación de sus plaquetas. Este procesamiento se debe hacer el mismo día, el análisis de datos se hará cuando se complete la totalidad para análisis estadísticas.

**B. RIESGOS:**

La participación en este estudio no significará ningún daño grave, solamente se podrá sentir una molestia general que implica la toma de sangre y, a veces, un morete en el sitio de la punción. Este proceso lo realizará personal experimentado y calificado del CIHATA o de un centro de salud.

**C. BENEFICIOS:**

Como resultado de la participación usted no obtendrá un beneficio directo, sin embargo si contribuye con la determinación de los valores de referencia de la prueba llamada agregometría, importante para el abordaje de ciertas enfermedades o seguimiento de tratamiento en algunos pacientes.

De esta manera los investigadores podrán conocer más acerca de la enfermedad en algunas personas y ayudarán a los médicos especialistas a la hora de interpretar las pruebas de sus pacientes.

**D. VOLUNTARIEDAD:**

Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiere.

**E. CONFIDENCIALIDAD:**

Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima.

**F. MUESTRAS BIOLÓGICAS:**

Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores del Centro, bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).

**G. INFORMACIÓN:**

Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con la Dra. Mariela Solano Vargas ella debe haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a (Mariela Solano Vargas) al teléfono (88847392) en el horario (L-V de 8am -4pm), o al CIHATA de la universidad de Costa Rica al teléfono (22231385). Además, puedo consultar sobre los derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación a la Dirección de Regulación de Salud del Ministerio de Salud, al teléfono 22-57-20-90, de lunes a viernes de 8 a.m. a 4 p.m. Cualquier consulta adicional puede comunicarse a la Vicerrectoría de

2

Firma de sujeto participante: \_\_\_\_\_

Comité Ético Científico - Universidad de Costa Rica - Número de sesión en que fue aprobado el proyecto: \_\_\_\_\_



Investigación de la Universidad de Costa Rica a los teléfonos 2511-4201 ó 2511-5839, de lunes a viernes de 8 a.m. a 5 p.m.

H. Usted NO perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

I. Usted recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.

**CONSENTIMIENTO**

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla (Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada). Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio

Nombre, cédula, lugar y firma del sujeto fecha

Nombre, cédula, lugar, firma del/la testigo fecha




Nombre, cédula, lugar, firma de la investigadora que solicita el consentimiento fecha

NUEVA VERSIÓN FCI – APROBADO EN SESION DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO (CEC) NO. 149 REALIZADA EL 4 DE JUNIO DE 2008.  
CELM-Form.Consent-Inform 06-08

Firma de sujeto participante: \_\_\_\_\_  
Comité Ético Científico - Universidad de Costa Rica – Número de sesión en que fue aprobado el proyecto: \_\_\_\_\_



## Anexo #3

		
<b>RE-239 CUESTIONARIO PARA DONANTES DE SANGRE</b>	<b>Versión 04</b>	
<p>Estimado donante de sangre: este documento debe ser llenado en forma individual y privada. La información que nos suministre es totalmente confidencial. Si tiene alguna pregunta, no dude en consultarle al entrevistador.</p>		
<b>INFORMACIÓN PERSONAL DEL DONANTE</b>		
Fecha: _____		
Nombre Completo: _____		
Nº de identificación: _____	Nacionalidad: <input type="checkbox"/> Costarricense <input type="checkbox"/> _____	Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino
Fecha de nacimiento: _____	Edad: _____	Estado Civil: _____
Lugar de domicilio: _____		
Ocupación u oficio: _____	Correo electrónico: _____	
Teléfono de Residencia: _____	Celular: _____	Fax: _____
<b>POR FAVOR, CONTESTE LAS SIGUIENTES PREGUNTAS</b>		
Marque su respuesta en la casilla de la derecha		
1. ¿Leyó y entendió el material informativo que se le entregó previamente?	SI	NO
2. ¿Tiene alguna duda?	SI	NO
<b>El día de hoy</b>		
3. ¿Se siente bien de salud?	SI	NO
4. ¿Está tomando algún medicamento? ¿Cuál? _____	SI	NO
<b>En las últimas 24 horas</b>		
5. ¿Ha ingerido bebidas alcohólicas?	SI	NO
<b>En las últimas 48 horas</b>		
6. ¿Ha tomado medicamentos como Alka Seltzer, Tabcin, Aspirina?	SI	NO
<b>En los últimos 3 días</b>		
7. ¿Ha ido al dentista?	SI	NO

En las últimas 4 semanas		
8. ¿Ha tenido gripe u otros síntomas (malestar general, dolor de cabeza, fiebre, cansancio)	SI	NO
9. ¿Ha recibido vacunas? Si su respuesta es SI, indique cual: _____	SI	NO
En los últimos 12 meses		
10. ¿Le han practicado alguna cirugía? Si la respuesta es afirmativa, hace cuanto tiempo y que tipo de cirugía: _____	SI	NO
11. ¿Ha estado internado en algún centro para pacientes psiquiátricos o en alguna cárcel por más de 72 horas?	SI	NO
12. ¿Ha recibido algún tipo de transfusión de sangre o de productos sanguíneos?	SI	NO
13. ¿Ha recibido algún trasplante o implante de órganos y tejidos?	SI	NO
14. ¿Se ha realizado algún tatuaje, recibido acupuntura, punzado accidentalmente o se ha perforado la piel con aretes?	SI	NO
15. ¿Ha tenido tuberculosis?	SI	NO
16. ¿Ha tenido o tiene alguna enfermedad de transmisión sexual como sífilis o gonorrea?	SI	NO
17. ¿Ha presentado de manera constante diarrea intensa, pérdida de peso, ganglios inflamados, tos persistente de evolución crónica, fiebre?	SI	NO
18. ¿Ha estado en contacto directo con la sangre de otra persona?	SI	NO
19. ¿Ha tenido contacto sexual con más de una persona?	SI	NO
20. ¿Ha tenido contacto sexual (anal, vaginal, oral) con o sin protección con personas que cobran por sexo?	SI	NO
21. ¿Ha tenido contacto sexual con alguien que tenga VIH/SIDA o que haya tenido un resultado positivo en una prueba para VIH/SIDA?	SI	NO
22. ¿Ha tenido contacto sexual con alguien que haya usado jeringas para consumir drogas?	SI	NO
23. ¿Ha tenido contacto sexual o ha vivido con alguna persona con hepatitis?	SI	NO
Alguna vez usted:		
24. ¿Ha donado sangre o algún componente sanguíneo? ¿Cuándo donó por última vez? (mes y año): _____ ¿Durante y después de la donación se sintió bien? _____	SI	NO
25. ¿Se ha inyectado o ha consumido drogas ilegales?	SI	NO
26. ¿Recibió dinero, drogas u otro pago a cambio de sexo?	SI	NO
27. ¿Ha tenido hepatitis?	SI	NO



## RE-239 CUESTIONARIO PARA DONANTES DE SANGRE

Versión 04

**Alguna vez usted:**

28. ¿Ha padecido paludismo (malaria)? ¿Ha visitado recientemente zonas con casos de Malaria?	SI	NO
29. ¿Ha sido picado por los chinches chupa sangre (triatominos) o ha tenido mal de Chagas?	SI	NO
30. ¿Ha tenido algún tipo de cáncer o tumor? En caso afirmativo, favor indique de que tipo: _____	SI	NO
31. ¿Ha recibido algún tratamiento de quimioterapia o radioterapia?	SI	NO
32. ¿Ha padecido de asma o alergias?	SI	NO
33. ¿Le han diagnosticado Diabetes? Si su respuesta es afirmativa ¿Utiliza insulina como tratamiento? _____	SI	NO
34. ¿Ha tenido problemas de Presión Arterial?	SI	NO
35. ¿Tiene alguna enfermedad del corazón o de los pulmones?	SI	NO
36. ¿Ha presentado sangrados anormales, o alguna enfermedad de la sangre?	SI	NO
37. ¿Se ha realizado la prueba del HIV (virus causante del SIDA)? En caso afirmativo, indique cuál fue el resultado (positivo o negativo): _____	SI	NO
38. ¿Ha padecido alguna enfermedad que no esté indicada aquí como hemofilia, alcoholismo u otras? En caso afirmativo, indique cuál: _____	SI	NO

**Si usted es Donante Femenina, por favor responda las siguientes preguntas**

39. ¿Está menstruando el día de hoy?	SI	NO
40. ¿Está usted embarazada o ha sufrido algún aborto reciente?	SI	NO
41. ¿Está en período de lactancia?	SI	NO
42. ¿Ha tenido contacto sexual con un hombre que alguna vez haya tenido relaciones con otro hombre?	SI	NO

**Si usted es Donante Masculino, por favor responda la siguiente pregunta**

43. ¿Ha tenido contacto sexual con otro hombre alguna vez?	SI	NO
--	----	----

## RE-240 - CONSENTIMIENTO INFORMADO

Versión 03

## Documento Confidencial

Nombre Completo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**Estimado Donante:**

A continuación se enlista una serie de aspectos que deben ser de su conocimiento para continuar con el proceso de donación, por favor lea la información atentamente:

**DOY MI CONSENTIMIENTO PARA QUE**

1. Se realice la extracción de mi sangre y se utilice en la transfusión de otras persona.
2. Se utilicen mis datos personales con el fin de notificar cualquier resultado importante referente a la donación.
3. Se use mi derecho de imagen al captar, emitir, reproducir y publicar imágenes y vídeos y sin límite temporal en cualquier medio, soporte o formato, en medios de comunicación, páginas web del Laboratorio Clínico UCR.

**DECLARO QUE**

1. He recibido la información necesaria para la comprensión de:
  - El proceso de donación y la forma de extracción de la sangre.
  - Las razones por las cuales es necesaria la información solicitada en el cuestionario, los posibles motivos de exclusión de la donación y la importancia del consentimiento informado.
  - Las razones por las cuales se puede excluir la sangre donada para su transfusión en pacientes.
  - El compromiso del Banco de Sangre de ofrecerme la información obtenida de los análisis de sangre en caso de que fuera importante para mi salud.
2. He comprendido toda la información que me han suministrado.
3. Toda la información que he suministrado en el cuestionario y la entrevista es verdadera.
4. El Banco de Sangre ha garantizado la confidencialidad de toda la información que he suministrado.

Firma

Cédula

## Espacio para uso exclusivo del Banco de Sangre

**Exámen médico**

Peso: \_\_\_\_\_ (Kg)  
 Estatura: \_\_\_\_\_ (m)  
 Temperatura: \_\_\_\_\_ (°C)  
 Frecuencia Cardíaca: \_\_\_\_\_ (ppm)  
 Presión Arterial: \_\_\_\_\_ (mmHg)  
 Hemoglobina: \_\_\_\_\_ (g/dL)  
 Hematocrito: \_\_\_\_\_ (%)

Grupo ABO: \_\_\_\_\_  
 Rh: \_\_\_\_\_  
 El donante ha sido:  
 Aceptado   
 Diferido   
 Rechazado   
 Tiempo: \_\_\_\_\_  
 Razón: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Extracción**

Brazo: \_\_\_\_\_  
 Duración: \_\_\_\_\_ (min)  
 Volumen: \_\_\_\_\_ (mL)  
 Tipo de bolsa: \_\_\_\_\_  
 # Segmento de bolsa: \_\_\_\_\_  
 PA final: \_\_\_\_\_ (mmHg)

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Flebotomista: \_\_\_\_\_

Responsable: \_\_\_\_\_