

6 Capítulo

Trastornos cualitativos de las plaquetas

Antonio Moscardó Martínez y Ana María Latorre Campos

PUNTOS CLAVE

- Existen multitud de trastornos de la función plaquetaria, de muy variada gravedad e incidencia y probablemente infradiagnosticados.
- El punto de partida para su estudio debe ser una completa historia clínica.
- Los estudios funcionales de las plaquetas son complejos de realizar e interpretar.
- La experiencia en el estudio de los defectos cuantitativos de las plaquetas es clave para decidir las pruebas concretas que se deben realizar para llegar a un diagnóstico.
- Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento están suponiendo un gran avance en el estudio y diagnóstico, aunque no siempre es fácil decidir el momento adecuado para aplicarlas.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los defectos cualitativos de las plaquetas es complejo, tanto en tiempo como en la necesidad de técnicas y personal altamente especializados, así como en la interpreta-

ción de los resultados. Parte de esta complejidad nace de la heterogeneidad de estos defectos en sus manifestaciones clínicas y en sus bases moleculares (1). Mientras que algunos de los defectos más graves, pero también más infrecuentes como la trombastenia de Glanzmann o el síndrome de Bernard-Soulier son relativamente sencillos de identificar, existe un gran grupo de defectos plaquetarios intermedios de difícil diagnóstico y cuya prevalencia es en muchos casos desconocida y probablemente subestimada (2,3), y además en muchos casos carecemos de criterios diagnósticos.

Existen múltiples ejemplos de algoritmos diagnósticos para el estudio de los defectos cualitativos de las plaquetas (4). En este capítulo seguiremos básicamente las recomendaciones del Subcomité de Fisiología Plaquetaria de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) (5) (Figura 1). Sin embargo, como bien sabrán todos aquellos clínicos, biólogos, genetistas, etc. que se han visto alguna vez enfrentados al reto de diagnosticar un defecto en la función plaquetaria, es un desafío muy superior a lo pretendido con este capítulo intentar realizar un algoritmo diagnóstico que sea capaz de englobar todos los defectos plaquetarios. En definitiva, el estudio de la función plaquetaria en pacientes con complicaciones hemorrágicas requiere sin duda de un diálogo fluido entre

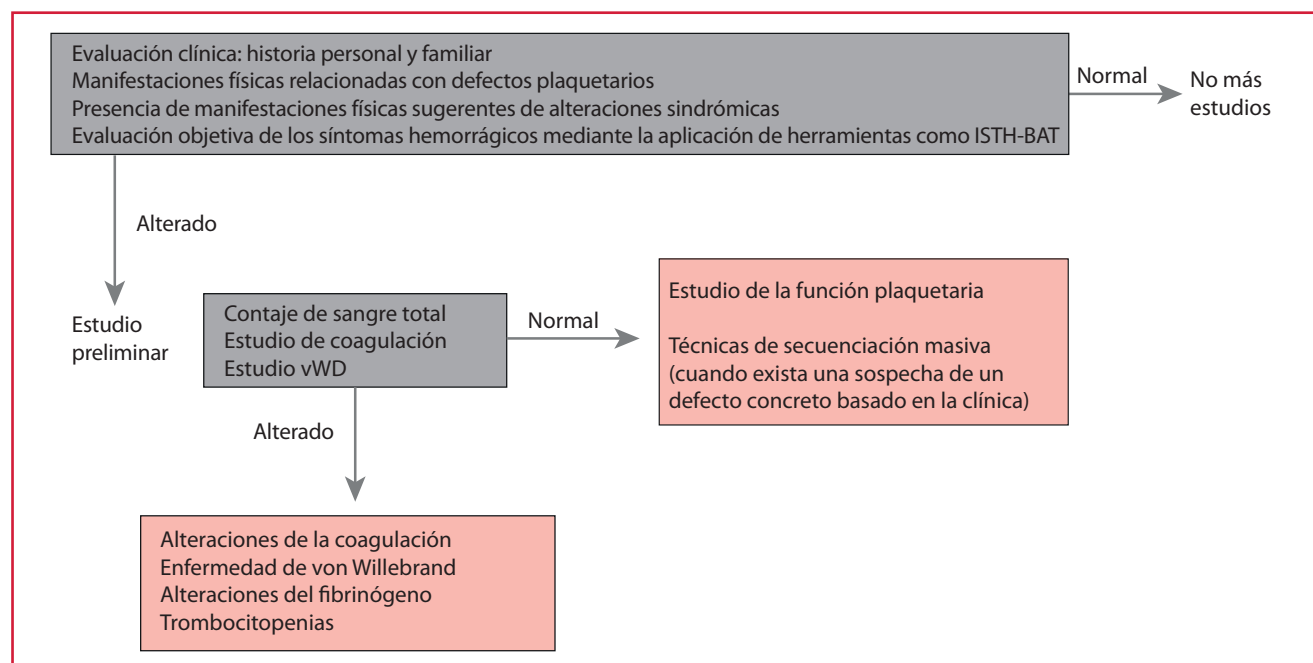


Figura 1. Algoritmo de toma de decisiones en pacientes con trastornos hemorrágicos.

clínicos y responsables del laboratorio, lo que recomienda la creación de unidades mixtas especializadas en el estudio de las disfunciones plaquetarias.

IDENTIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CANDIDATOS A ESTUDIO DE LABORATORIO

El punto de partida para el estudio de pacientes con sangrados excesivos debe ser la evaluación clínica objetiva de su historia hemorrágica, la historia familiar y el examen físico, seguido si procede del estudio en el laboratorio. Hay que tener presente que los desórdenes plaquetarios (tanto cualitativos como cuantitativos) son prevalentes entre aquellos pacientes con trastornos hemorrágicos. Sin embargo, clínicamente puede ser muy difícil distinguirlos de otros trastornos hemorrágicos, especialmente de la enfermedad de von Willebrand (6). Además, no es infrecuente que aparezca asociado un defecto plaquetario con otro trastorno de la coagulación, de tal forma que un estudio de la función plaquetaria será recomendado siempre que las pruebas rutinarias de laboratorio no sean capaces de explicar completamente los síntomas de un paciente con diátesis hemorrágica.

En la realización de la historia clínica especialmente hay que tener en cuenta la presencia de epistaxis, sangrados mucocutáneos, heridas superficiales que sangren en exceso, sangrados de la cavidad oral, sangrado gastrointestinal, hematuria,

extracciones dentales, sangrados quirúrgicos, menorragia, sangrado posparto, hematomas o hemartrosis, sangrados del sistema nervioso central, etc. Es importante tener en cuenta los posibles tratamientos o suplementos alimenticios que pueden interferir con la función plaquetaria (7,8).

La evaluación objetiva de los síntomas hemorrágicos de un paciente (6) es uno de los mayores retos para el diagnóstico de las patologías plaquetarias, ya que en muchos casos se trata de consideraciones subjetivas que pueden estar bien sobredimensionando complicaciones leves o, por el contrario, minusvalorando síntomas más preocupantes. Por este motivo se han desarrollado una serie de herramientas que permitan al clínico estandarizar una historia con complicaciones hemorrágicas (6,9,10). Estas herramientas persiguen mejorar el diagnóstico, para evitar pruebas innecesarias de laboratorio, predecir el riesgo hemorrágico en un paciente concreto, describir la severidad de los síntomas de forma objetiva y administrar el tratamiento adecuado (en caso de ser necesario). Una de estas herramientas es el ISTH-BAT, que ha demostrado su utilidad en la valoración de la gravedad de los síntomas y en la identificación de los pacientes (6,9,10), aunque se requieren más estudios para recomendar su uso generalizado. Adicionalmente a los síntomas de sangrado, es muy recomendable la evaluación de una serie de características físicas que con frecuencia aparecen asociadas a los trastornos plaquetarios, como son problemas de audición, alteraciones morfológicas en el corazón, el rostro o los huesos, problemas oculares, pérdida de coloración en piel o cabello o manifestaciones neurológicas que indicarían un trastorno de tipo sindrómico.

ESTUDIO PRELIMINAR

En aquellos pacientes en los que aparecen alteraciones en la historia clínica o valores elevados en los índices de riesgo hemorrágico, debe realizarse una extracción de sangre para evaluar un contejo celular en sangre total, pruebas generales de bioquímica, pruebas básicas de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y un panel de pruebas de enfermedad de von Willebrand (VWF antigénico, actividad del cofactor de la ristocetina y actividad coagulante del factor VIII) (Figura 1). La utilidad del sistema PFA-100 para la detección de defectos plaquetarios está en cuestión. En pacientes con defectos graves de la función plaquetaria (trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier o la enfermedad de von Willebrand de tipo plaquetario), se va a encontrar un claro alargamiento del PFA-100, por lo que puede ser útil en la detección de estas patologías (11). Sin embargo, los resultados son mucho menos concluyentes en el caso de los defectos plaquetarios moderados o leves, los más frecuentes, de forma que un resultado normal no permite descartar la existencia de una patología plaquetaria.

La realización de un contejo de sangre total es un paso imprescindible en el estudio de pacientes con sangrados anormales. Hay que destacar que la presencia de trombocitopenia no descarta la existencia de una alteración funcional de las plaquetas. Es importante también tener en cuenta la posible presencia de anemia, que podría justificar las complicaciones hemorrágicas. Por su parte, el estudio de un frotis de sangre total permitirá la detección de alteraciones en el tamaño y forma de las plaquetas, así como alteraciones en otros tipos celulares. En este sentido, en una reciente investigación se ha puesto de manifiesto el interés de un estudio del frotis sanguíneo mediante inmunofluorescencia para la detección de alteraciones plaquetarias (12).

ESTUDIOS ESPECÍFICOS DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA (Figura 2)

Pruebas de primer nivel

En aquellos pacientes en los que los resultados de las pruebas previas lo sugieran, deberá realizarse un estudio específico de función plaquetaria. Este debería incluir al menos un estudio de agregometría óptica con un panel de agonistas incluyendo ácido araquidónico, adenosindifosfato (ADP), epinefrina, colágeno y ristocetina. La agregometría óptica es una técnica laboriosa y que requiere de personal especializado para su realización, y debe realizarse de acuerdo con las guías más recientes para su uso (13). La agregación debe realizarse durante al menos 5 minutos tras la adición del agonista y preferiblemente durante 10 minutos. No debe observarse tan

solo la intensidad máxima de agregación, sino que también son importantes otras variables como el tiempo de latencia, la pendiente de la curva, la desagregación, etc. En general, es importante el análisis visual de la curva de agregación por personal especializado, ya que el trazado puede proporcionar mucha información al especialista.

Agregaciones defectuosas a uno o más de los agonistas empleados pueden ser indicativas de un defecto plaquetario. Es importante recordar que en un porcentaje importante de pacientes podemos encontrar una respuesta disminuida a la epinefrina, sin que esto tenga consecuencias clínicas aparentes.

Debido a la dificultad en la realización de la agregometría óptica, se han realizado algunos intentos de semiautomatizarla, como es el caso de la agregación en placa o más recientemente el sistema Optimul (14), los cuales permiten en un tiempo corto la realización de múltiples agregaciones con diversas concentraciones de varios agonistas. Sin embargo, aunque son técnicas prometedoras, todavía es necesario avanzar en su desarrollo y aplicabilidad antes de sustituir a la agregometría tradicional. También se ha intentado el uso de técnicas de agregometría en sangre total como es el caso del sistema semiautomatizado Multiplate, aunque parece ser un sistema poco sensible para la detección de los defectos plaquetarios.

El estudio de la liberación de gránulos, tanto densos como α debe realizarse también en esta primera fase. Una técnica muy útil para medir simultáneamente agregación y liberación de gránulos densos es la lumiagregometría (15). Otras técnicas como la medida de ATP en liberados de agregación mediante luminiscencia o HPLC (*high-performance liquid chromatography*), la medida de la captación y liberación de mepacrina mediante citometría de flujo o la medida de la liberación de serotonina mediante marcaje radioactivo o ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) también han demostrado su utilidad. El estudio de la liberación de gránulos α puede realizarse mediante ELISA para sustancias granulares en los liberados de agregación, o mediante citometría de flujo para alguno de los marcadores que permanecen unidos a la membrana plasmática (como P-selectina).

La citometría de flujo también debe emplearse en esta fase para la cuantificación de algunos de los receptores plaquetarios más importantes (16): GPIIb/IIIa, GPIb/IX, así como para valorar la activación de GPIIb/IIIa (unión del anticuerpo específico PAC-1).

Pruebas de segundo nivel

En aquellos pacientes en los que el primer nivel de pruebas no haya sido capaz de llegar a un diagnóstico, o como confirmación de este, las pruebas que se deben realizar a

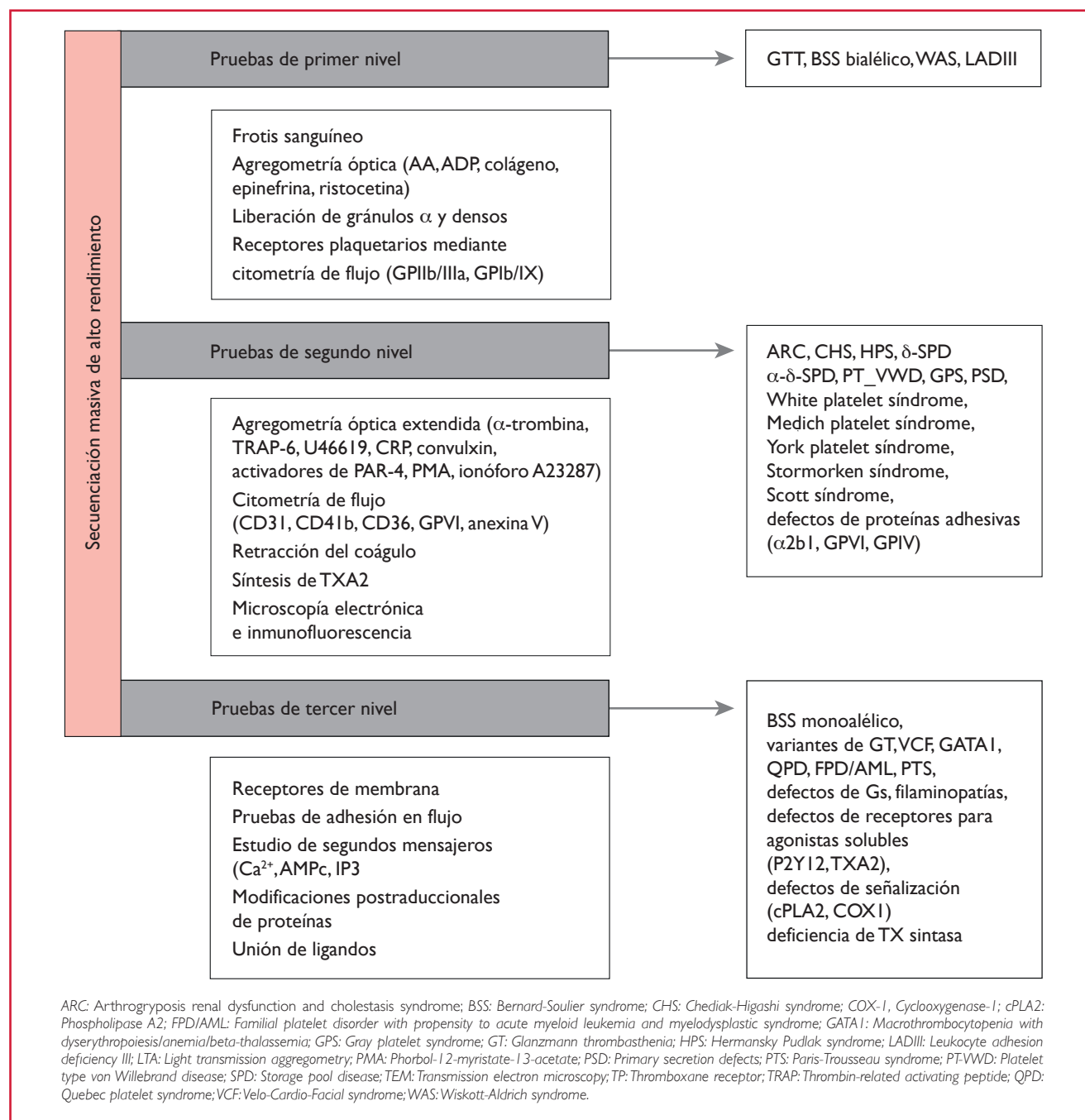


Figura 2. Secuencia de pruebas de estudio en pacientes con sospecha de trastorno de la función plaquetaria.

continuación deberían incluir la agregometría óptica con un panel extendido de agonistas (α-trombina, TRAP-6, U46619, proteína C reactiva [CRP], convulxina, activadores de PAR-4, phorbol-12-myristate-13-acetate [PMA] y el ionóforo A23287). El empleo de estos agonistas especializados no debe realizarse de forma rutinaria, sino con una sospecha diagnóstica

en mente, ya que de lo contrario puede llevar a conclusiones erróneas con facilidad.

La citometría de flujo puede resultar especialmente útil en esta fase de estudio para determinar, entre otros, la presencia en la membrana plaquetaria de los receptores CD31, CD41b, CD36, GPVI, o confirmar los defectos que sugieran los

resultados de agregometría. También mediante citometría de flujo se puede ensayar la actividad procoagulante de las plaquetas por unión de anexina V.

El estudio de la retracción del coágulo puede orientar hacia defectos en la integrina IIb/IIIa, pero también a defectos en la transmisión de señales o los procesos de reorganización del citoesqueleto necesarios para la retracción.

La medida de la síntesis de TXB₂ mediante ELISA será útil para la identificación de los defectos plaquetarios asociados al metabolismo del AA, aunque hay que tener la precaución de no confundir con los defectos en la señalización mediada por el TXA₂.

La microscopía electrónica o de fluorescencia son instrumentos muy útiles para el estudio de la morfología plaquetaria y para el conteo y estudio morfológico de los gránulos plaquetarios.

Pruebas de tercer nivel

Se engloban aquí todas aquellas pruebas (funcionales, bioquímicas, etc.) que será necesario realizar para estudiar un paciente en el que se sospecha clínicamente un defecto plaquetario que no hemos sido capaces de identificar previamente. Probablemente el uso más importante de este tipo de pruebas va a ser confirmar la implicación funcional de las alteraciones genéticas encontradas en los estudios de secuenciación, especialmente en aquellos casos en los que no resulta evidente la relación entre gen y fenotipo, o cuando se encuentran varias alteraciones genéticas asociadas.

ESTUDIOS GENÉTICOS

Hasta hace pocos años, el estudio genético solo tenía sentido cuando las pruebas de laboratorio permitían señalar a un gen candidato, e incluso así en un porcentaje grande de casos no éramos capaces de llegar a la caracterización molecular de la patología. Sin embargo, la irrupción de las técnicas de secuenciación masiva de alto rendimiento, así como su continuo abaratamiento, han favorecido su empleo cada vez más frecuente en el estudio de las patologías funcionales de las plaquetas (17,18). Sin embargo, no existe un consenso general sobre en qué momento deben aplicarse estas técnicas en un paciente que se estudia por una sospecha de trastorno plaquetario. Los consensos más recientes recomiendan realizar el estudio genético mediante paneles de secuenciación cuando la sospecha clínica del defecto plaquetario sea elevada. En el resto de casos, el estudio genético debería ir precedido de pruebas funcionales de primer, y probablemente de segundo nivel, aunque esto

va a depender del defecto concreto. En otras palabras, debe ser la experiencia la que dicte cuándo realizar el estudio genético, aunque es evidente que con los continuos avances en este campo, y la creciente lista de alteraciones con base molecular establecida, la tendencia debe ser claramente adelantar cada vez más el estudio genético en los pacientes con sospecha de una trombopatía.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gresele P, Harrison P, Bury L, Falcinelli E, Gachet C, Hayward CP, et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: Results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost* 2014;12(9):1562-9.
2. Israels SJ, El-Ekiaby M, Quiroga T, Mezzano D. Inherited disorders of platelet function and challenges to diagnosis of mucocutaneous bleeding. *Haemophilia* 2010;16(Suppl 5):1529.
3. Quiroga T, Goycoolea M, Panes O, Aranda E, Martínez C, Belmont S, et al. High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica* 2007;92(3):35765.
4. Gresele P, Bury L, Falcinelli E. Inherited platelet function disorders: Algorithms for phenotypic and genetic investigation. *Semin Thromb Hemost* 2016;42(3):292-305.
5. Gresele P, Harrison P, Gachet C, Hayward C, Kenny D, Mezzano D, et al. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015;13(2):314-22.
6. Rodeghiero F, Tosetto A, Castaman G. How to estimate bleeding risk in mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2007;5:157-66.
7. Scharf RE. Drugs that affect platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2012;38(8):865-83.
8. Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, De Roos B. Dietary manipulation of platelet function. *Pharmacol Ther* 2014;144:97-113.
9. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Collier B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: A standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010;8:2063-5.
10. Lowe GC, Lordkipanidzé M, Watson SP. Utility of the ISTH bleeding assessment tool in predicting platelet defects in participants with suspected inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2013;11(9):1663-8.
11. Lassila R. Platelet function tests in bleeding disorders. *Semin Thromb Hemost* 2016;42(3):185-90.
12. Greinacher A, Pecci A, Kunishima S, Althaus K, Nurden P, Balduini CL, et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2017;15(7):1511-21.
13. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: A consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013;11(6):1183-9.

14. Lordkipanidzé M, Lowe GC, Kirkby NS, Chan M V, Lundberg MH, Morgan NV, et al. Characterization of multiple platelet activation pathways in patients with bleeding as a high-throughput screening option: Use of 96-well Optimul assay. *Blood* 2014;123:e11-22.
15. Mumford AD, Frelinger AL, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost* 2015;114:14-25.
16. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI. Evaluation of Platelet Function by Flow Cytometry. *Methods [Internet]* 2000;21(3):259-70.
17. Freson K, Turro E. High-throughput sequencing approaches for diagnosing hereditary bleeding and platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2017;15(7):1262-72.
18. Bastida Bermejo JM, Hernández-Rivas JM, González-Porras JR. Novel approaches for diagnosing inherited platelet disorders. *Med Clin* 2017;148(2):71-7.