EMOSTASIA PRIMARIA

ANTONIO MOSCARDÓ MARTÍNEZ

Instituto Investigación Sanitaria La Fe

Unidad de Estudios Avanzados en Plaquetas

Stago

Antonio Moscardó

HEMOSTASIA PRIMARIA

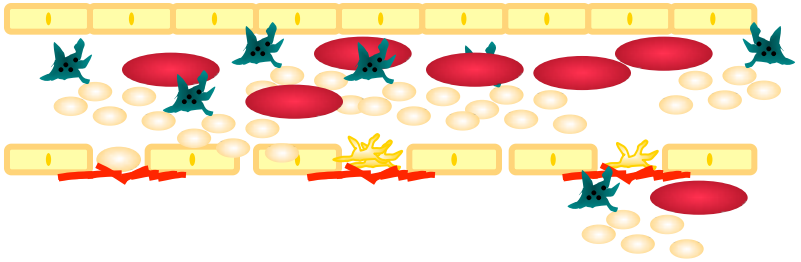
Las plaquetas en la Hemostasia….y mucho mas

Stago

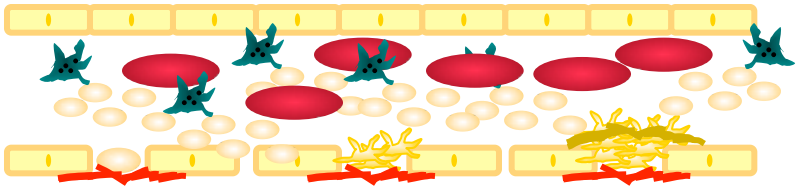
Hemostasia: respuesta fisiológica normal que mantiene la sangre circulante en estado fluido e impide la pérdida excesiva de sangre tras una lesión vascular

Hemostasia Primaria: formación del tapón plaquetario

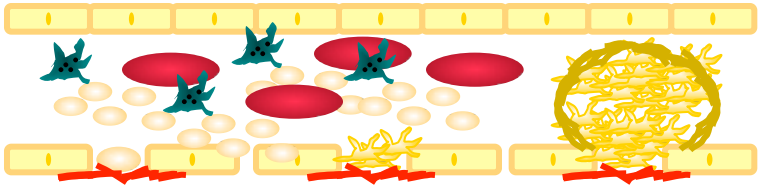
HEMORRAGIA



HEMOSTASIA

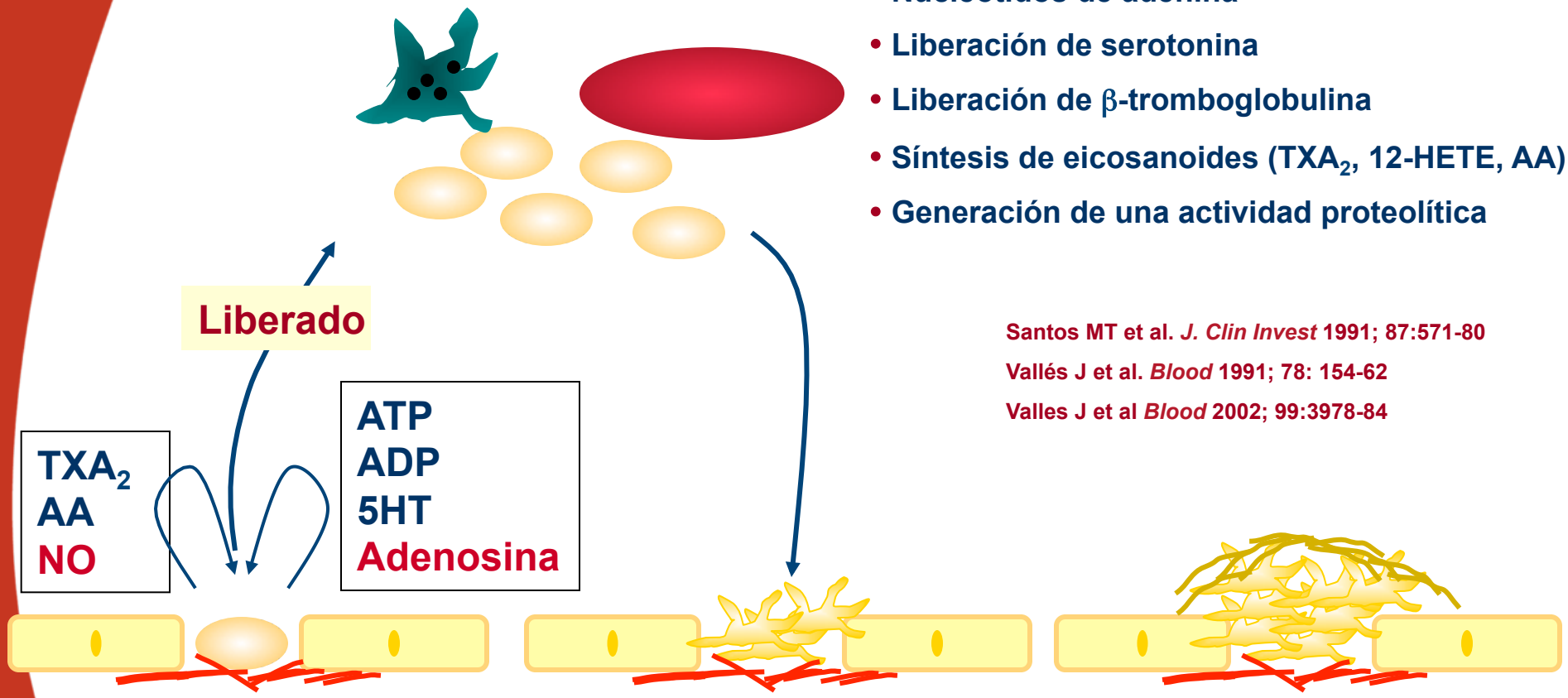


TROMBOSIS



Stago

- Nucleótidos de adenina
- Liberación de serotonina
- Liberación de β-tromboglobulina
- Síntesis de eicosanoides (TXA_2, 12-HETE, AA)
- Generación de una actividad proteolítica



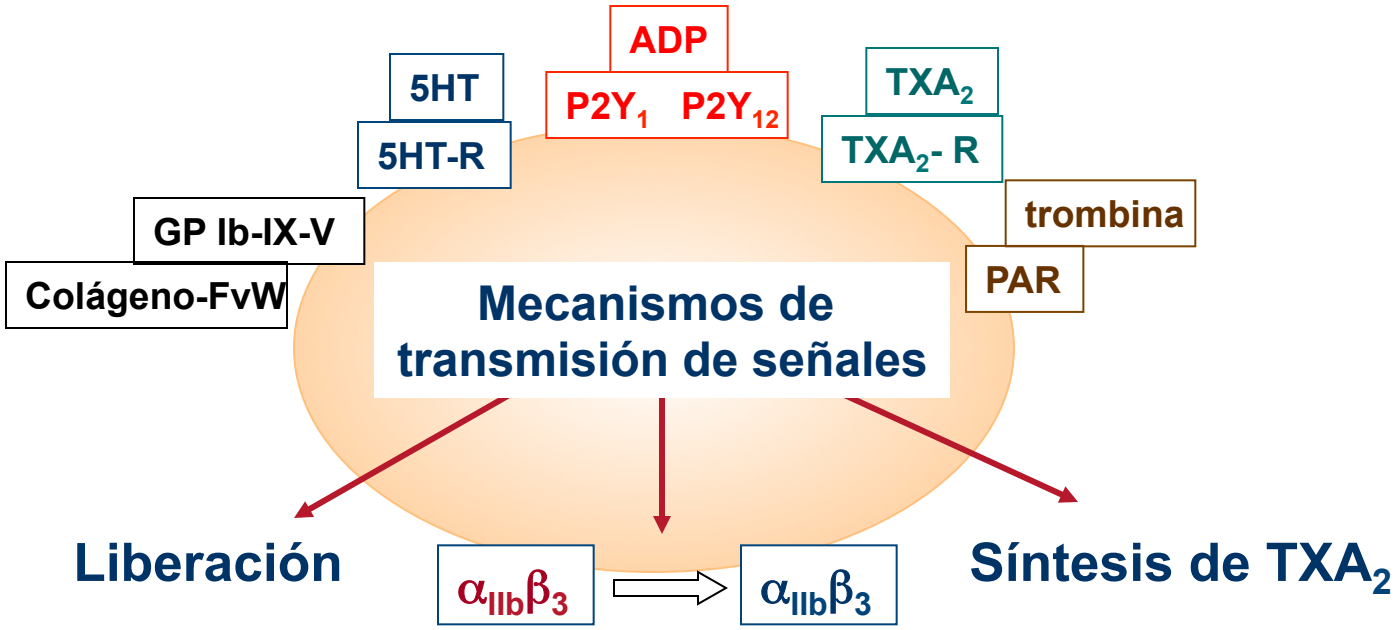
Santos MT et al. *J. Clin Invest* 1991; 87:571-80

Vallés J et al. *Blood* 1991; 78: 154-62

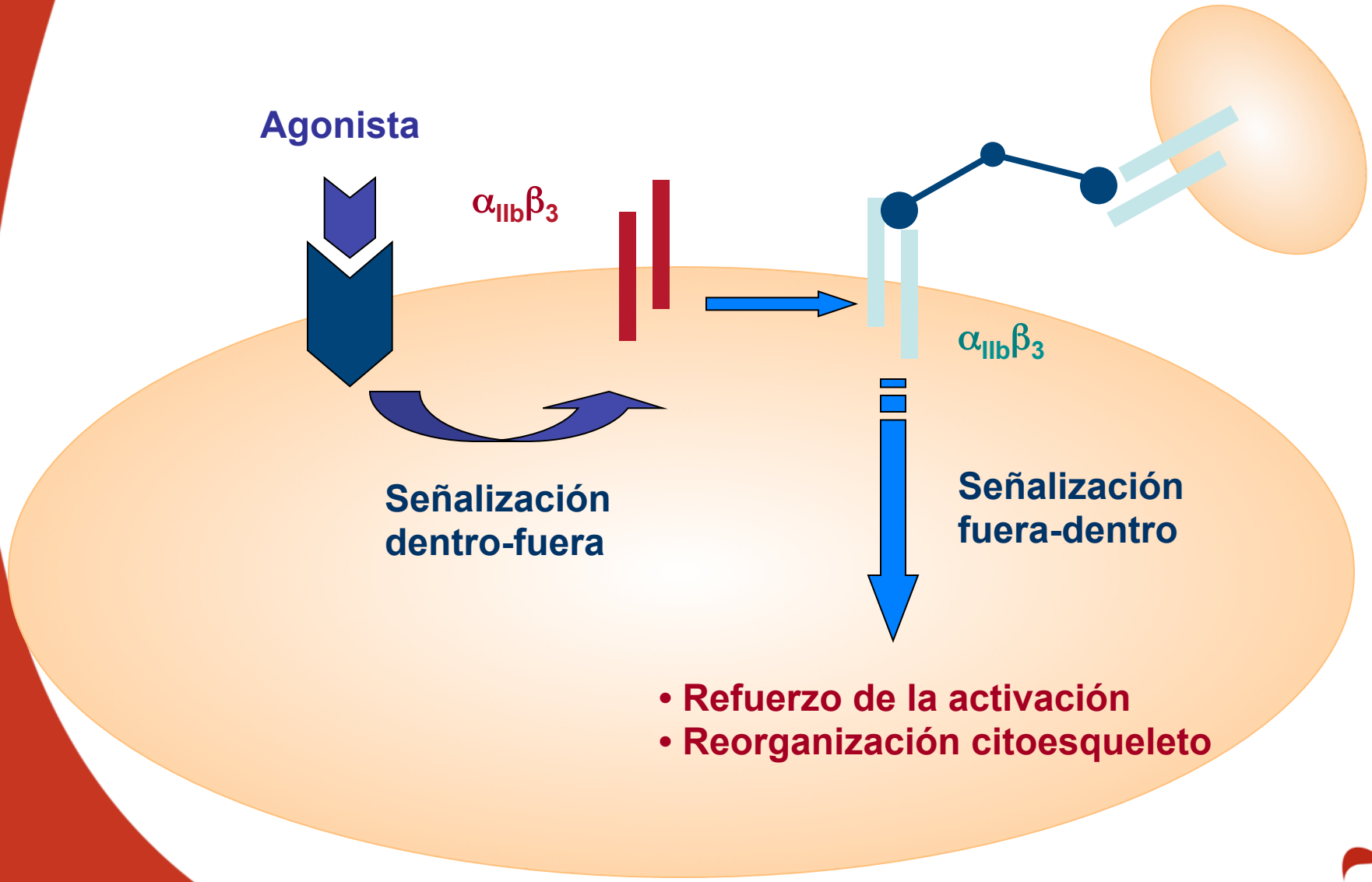
Valles J et al *Blood* 2002; 99:3978-84

Stago

Activación Plaquetaria

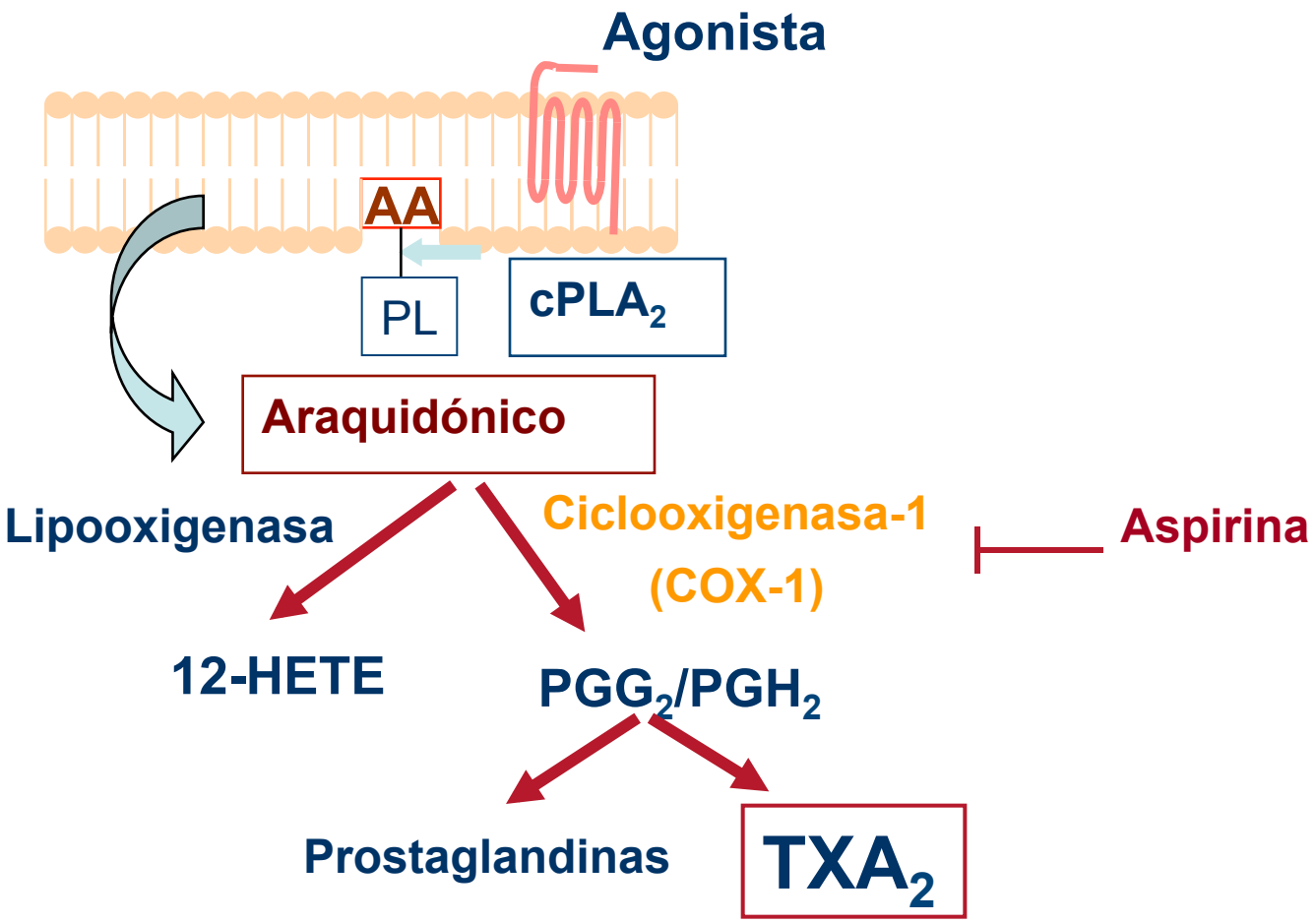


Transmisión de señales a través de $\alpha_{IIb}\beta_3$



Stago

Mecanismo de síntesis del TXA_2



La aspirina reduce en un 25% la probabilidad de sufrir un nuevo evento trombótico arterial

BMJ 2002;324:71-86

Stago

Platelet function in malignant hematological disorders

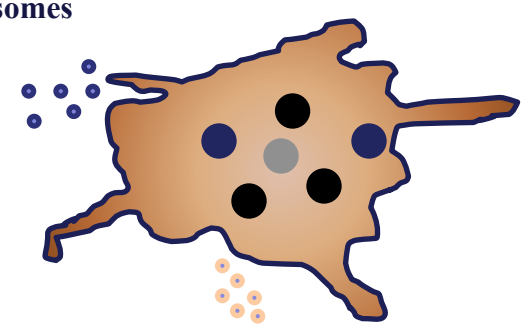
Antonio Moscardó[a], Ana Latorre[a], María Teresa Santos[a], Santiago Bonanad[b], and Juana Vallés[a]

Proteases and anti-Proteases
MMP-1, -2, -4, -9, ADAMTS13, ADAMS10, ADAMS17 (TACE), TIMPs 1–4, Platelet inhibitor of FIX, C1 inhibitor, α1-antitrypsin

Growth and mitogenic factors
PDGF (A, B and C), EGF, IGF-1, VEGF (A and C), bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3

Microparticles, nanoparticles, exosomes

miRNA, mRNA



Dense granules
ATP, ADP, AMP, 5HT, polyphosphate, calcium

Lysosomes
β-N-acetylhexosaminidase (Hex), cathepsin, heparitinase, β-galactosidase, LIMP, LAMP-2

Anti-microbial proteins
Thrombocidins and kinocidins

Fibrinolytic factors and their inhibitors
Plasminogen, PAI-1, u-PA, α2-antiplasmin, histidine-rich glycoprotein, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI,) α2-macroglobulin

Membrane Glycoproteins
αIIbβ3, αvβ3, GPIb, PECAM-1, P-selectin, TLT-1, semaphorin 4D, CD63, CD40L, TF, LIGHT, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), FasL, furin, GLUT3, cellubrevin, SANP23, syntaxin-2, clathrin

Adhesive proteins
VWF + pro-peptide, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TSP-2, laminin-8 (also α5-laminin subunit),

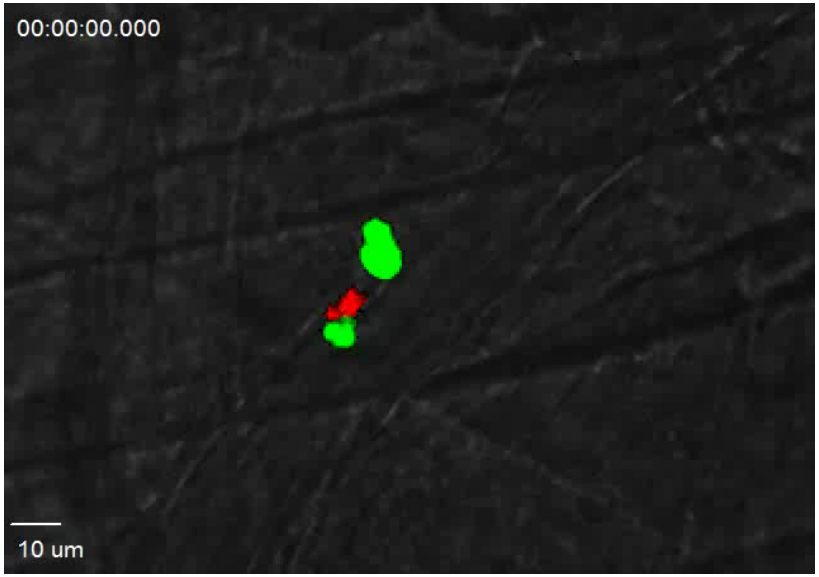
Clotting factors and their inhibitors
Factor V/Va, factor XI, multimerin, protein S, high-molecular-weight kininogen, protease nexin-1 and -2, TF pathway inhibitor (TFPI), protein C inhibitor, gas6

Others
Chondroitin 4-sulfate, albumin, immunoglobulins G and M, amyloid β-protein precurser, disabled-2, complement factor H, bile salt-dependent lipase (BSDL), semaphorin 3A, PrPC

Chemokines, cytokines and others
TGF-β1 and -β2, IL-1, RANTES (CCL5), IL-8 (CXCL8), MIP-1α (CCL3), MIP-2 (CXCL2), LIX (CXCL6) GRO-α (CXCL1), ENA-78 (CXCL5), SDF-1α (CXCL12), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), PF4 (CXCL4), pro-platelet basic protein (PBP), β-TG, NAP-2, connective-tissue-activating peptide III T(CXCL7), thymus and activation-regulated chemokine (TARC, CCL17), angiopoietin-1, High mobility group box 1 (HMGB1), IL-6sR, endostatin, osteonectin, bone sialoprotein, dickkopf-1, osteoprote gerin

Stago

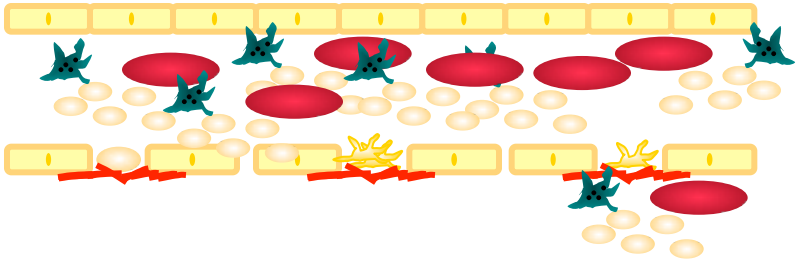
La hemostasia primaria está tirada…..



…..o tal vez sólo estamos empezando a conocerla

Stago

HEMORRAGIA



Desórdenes plaquetarios congénitos o adquiridos

Desórdenes plaquetarios de número (trombocitopenia) o función (trombocitopatía)

……o de todo un poco

Stago

- What scientists think:
  - Doctors can easily identify most patients with platelet related bleeding disorders

- What doctors think:
  - Scientists can easily tell you the genetic defect of most patients with platelet related bleeding disorders

Mike Makris

Sheffield, UK

- Los síntomas son variables incluso en pacientes con un defecto concreto

- En ocasiones es difícil distinguir entre un sujeto sano y un paciente con un defecto plaquetario “grave”

Síntomas en los pacientes con defectos plaquetarios:

Hematomas
Sangrado excesivo en heridas
Epistasis
Sangrado de las encías
Reglas abundantes
Sangrado excesivo (extracción dental, parto, cirugía)

Prevalence of bleeding symptoms in healthy individuals (data from 11 studies n=2637 patients)

Symptoms	Prevalence (%)
Epistaxis	23
Easy bruising	20
Menorrhagia	35
Post dental extraction bleeding	6
Muscle haematomas	3
Bleeding from minor wounds	5
Gum bleeding	28
Post surgical bleeding	4
Post partum bleeding	13
Blood in stools	7
Joint bleeding	2
Haematuria	5

Mauer et al. JTH 2010; 9:100-108

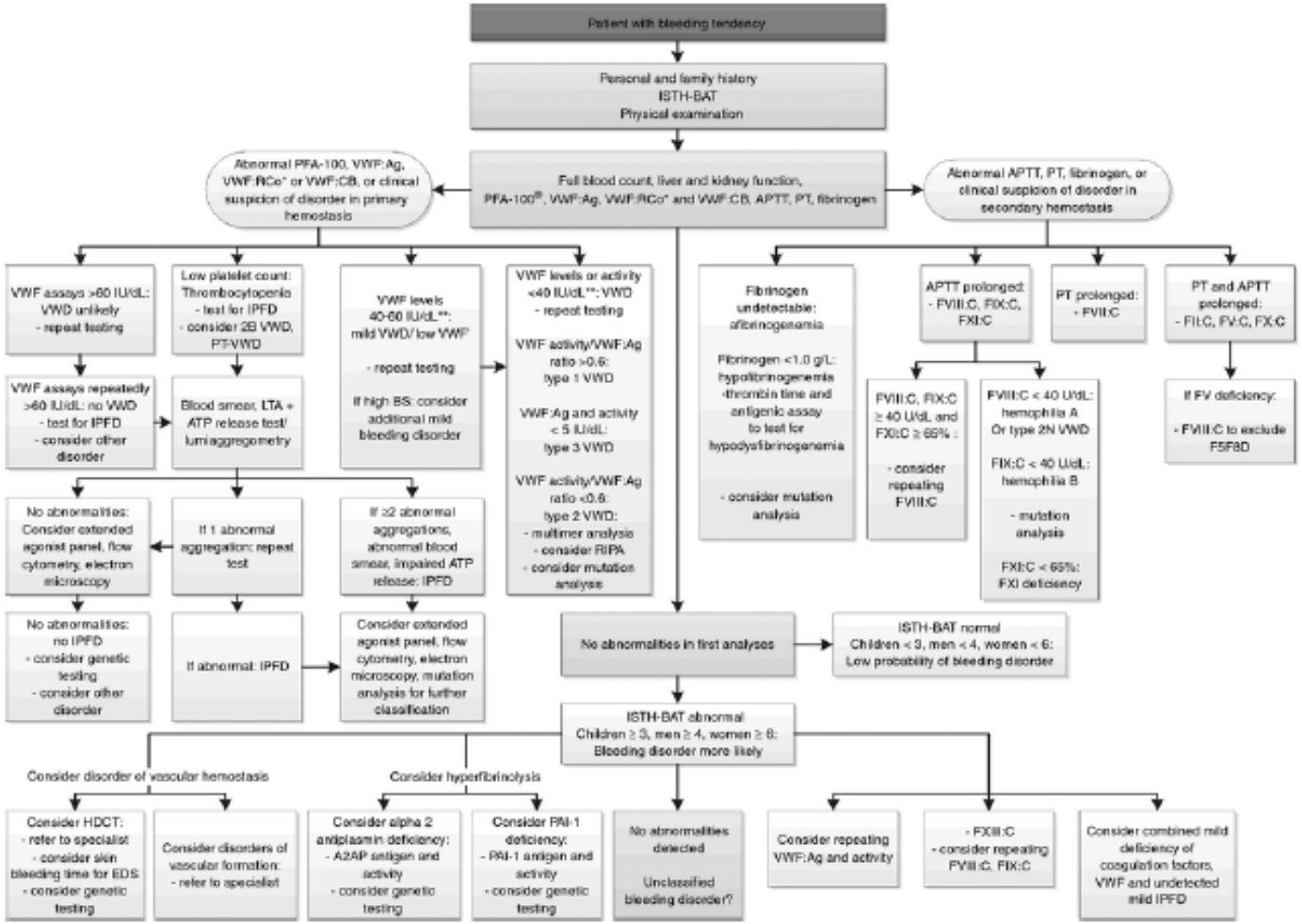
¿Quién decide que una historia de sangrado es clínicamente significativa?

- El clínico experto

- Bleeding Assessment Tool ISTH-BAT https://bleedingscore.certe.nl/

Stago

A diagnostic approach to mild bleeding disorders



JTH 2016; 14:1507-1516

Defectos del número de plaquetas

El número importa

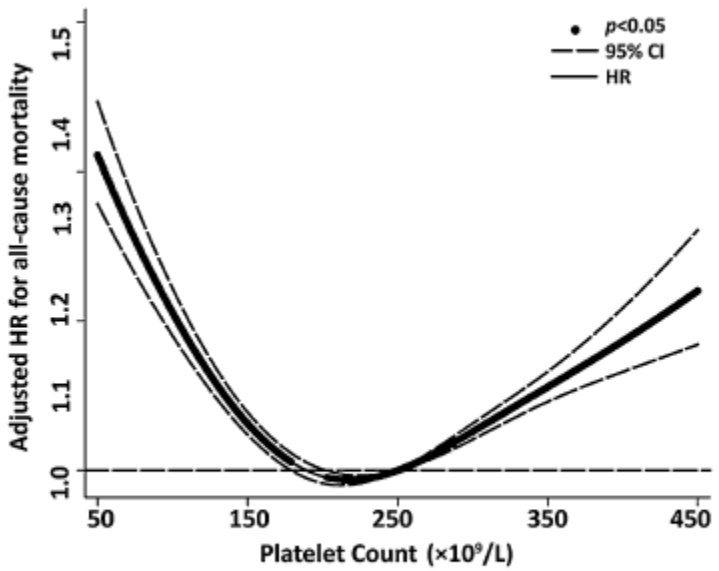


Figure 1. Adjusted HR for all-cause mortality according to platelet counts in all 131 308 older people. A cubic spline curve was plotted to show a U-shaped curve relationship between platelet counts and overall mortality.

Table 1. Incidence and risks of all-cause and cause-specific mortality in older people

Platelet count, ×10⁹/L	No. of events	No. of person-years	Incidence rate*	Cox proportional hazard models			
				Crude HR (95% CI)	P	Adjusted HR† (95% CI)	P
All-cause mortality							
<100	602	10730	56.10	2.80 (2.58-3.04)	<.001	1.93 (1.77-2.11)	<.001
100 to <200	7598	304486	24.95	1.25 (1.21-1.29)	<.001	1.08 (1.05-1.12)	<.001
200 to <300	7827	393530	19.89	1		1	
300 to <400	1384	52724	26.25	1.33 (1.26-1.41)	<.001	1.18 (1.11-1.25)	<.001
≥400	348	5987	58.13	3.00 (2.69-3.33)	<.001	1.67 (1.49-1.87)	<.001
Cardiovascular mortality‡							
<100	72	9256	7.78	1.78 (1.41-2.26)	<.001	1.24 (0.97-1.59)	.086
100 to <200	1405	267048	5.26	1.20 (1.12-1.29)	<.001	1.06 (0.98-1.14)	.151
200 to <300	1529	350235	4.37	1		1	
300 to <400	215	47125	4.56	1.05 (0.91-1.21)	.511	0.96 (0.82-1.11)	.568
≥400	50	5233	9.55	2.17 (1.63-2.89)	<.001	1.38 (1.02-1.86)	.037
Thrombotic CV mortality‡							
<100	57	9256	6.16	1.59 (1.22-2.07)	.001	1.10 (0.84-1.45)	.494
100 to <200	1223	267048	4.58	1.18 (1.09-1.28)	<.001	1.04 (0.95-1.12)	.406
200 to <300	1355	350235	3.87	1		1	
300 to <400	191	47125	4.05	1.05 (0.90-1.22)	.518	0.94 (0.80-1.11)	.487
≥400	47	5233	8.98	2.30 (1.71-3.09)	<.001	1.44 (1.06-1.97)	.021
Hemorrhagic CV mortality‡							
<100	15	9256	1.62	3.28 (1.94-5.56)	<.001	2.32 (1.33-4.04)	.003
100 to <200	182	267048	0.68	1.36 (1.11-1.68)	.004	1.21 (0.97-1.52)	.094
200 to <300	174	350235	0.50	1		1	
300 to <400	24	47125	0.51	1.03 (0.67-1.58)	.884	1.08 (0.71-1.67)	.720
≥400	3	5233	0.57	1.17 (0.37-3.66)	.790	0.91 (0.29-2.89)	.875
Cancer mortality							
<100	233	10730	21.71	3.47 (3.03-3.97)	<.001	2.66 (2.31-3.05)	<.001
100 to <200	2392	304486	7.86	1.26 (1.19-1.33)	<.001	1.10 (1.03-1.16)	.003
200 to <300	2448	393530	6.22	1		1	
300 to <400	457	52724	8.67	1.40 (1.26-1.54)	<.001	1.31 (1.18-1.45)	<.001
≥400	106	5987	17.71	2.86 (2.35-3.48)	<.001	1.91 (1.55-2.35)	<.001
Sepsis mortality							
<100	61	10730	5.68	2.75 (2.12-3.57)	<.001	1.74 (1.32-2.29)	<.001
100 to <200	780	304486	2.56	1.25 (1.13-1.38)	<.001	1.06 (0.95-1.18)	.276
200 to <300	806	393530	2.05	1		1	
300 to <400	142	52724	2.69	1.29 (1.08-1.55)	<.001	1.06 (0.87-1.28)	.583
≥400	52	5987	8.69	4.31 (3.25-5.70)	<.001	1.85 (1.37-2.49)	<.001
Mortality due to other causes							
<100	207	10730	19.29	2.82 (2.45-3.25)	<.001	1.84 (1.59-2.13)	<.001
100 to <200	2585	304486	8.49	1.25 (1.18-1.32)	<.001	1.08 (1.02-1.14)	.009
200 to <300	2665	393530	6.77	1		1	
300 to <400	500	52724	9.48	1.43 (1.30-1.57)	<.001	1.22 (1.10-1.34)	<.001
≥400	129	5987	21.55	3.32 (2.78-3.95)	<.001	1.56 (1.30-1.89)	<.001

U-shaped mortality curve associated with platelet count among older people: a community-based cohort study

Der-Cherng Tarng

BLOOD, 24 SEPTEMBER 2015 • VOLUME 126, NUMBER 13

Stago

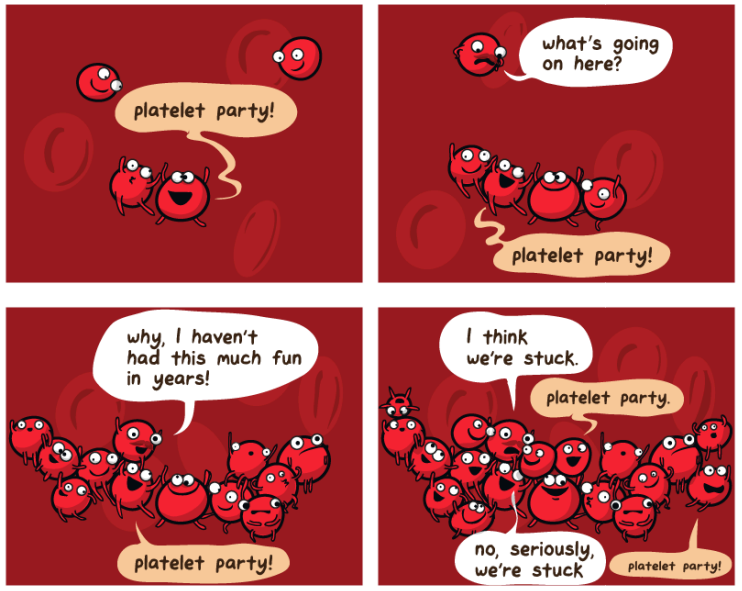
El número importa….. pero hasta qué punto?

Sangrado espontáneo **Sangrado quirúrgico**

10.000 50.000 100.000 150.000 400.000

Severa Moderada Leve Normalidad

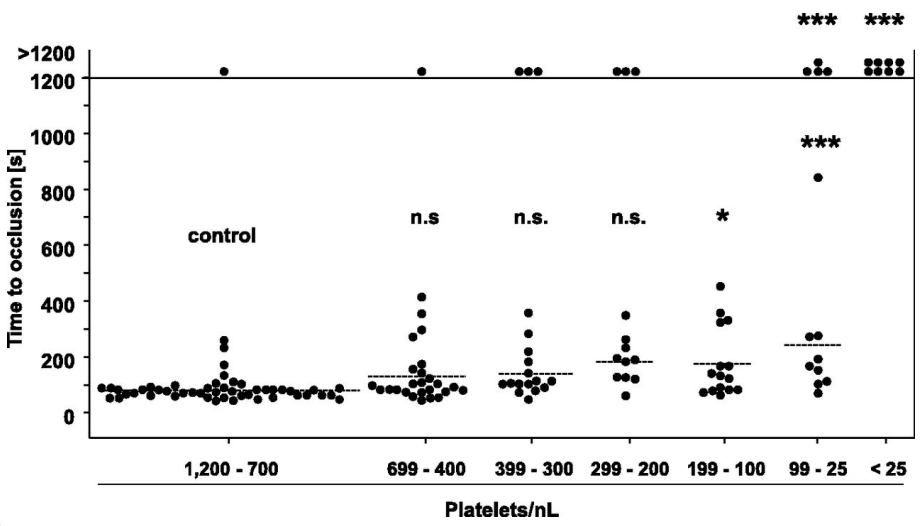
Trombopenia



Stago

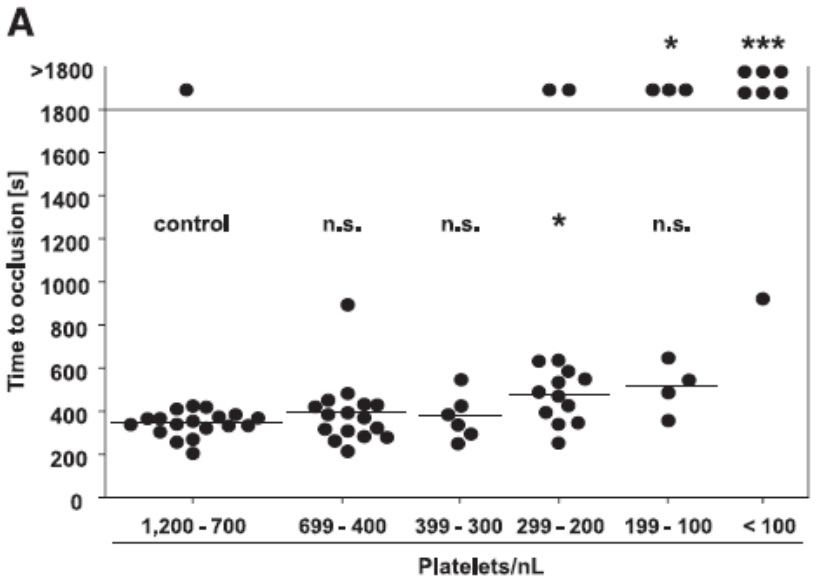
El número importa….. pero hasta qué punto?

SANGRADO



< 3% plaquetas

TROMBOSIS



< 20% plaquetas

¿Nos sobran plaquetas para su función hemostática?

PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

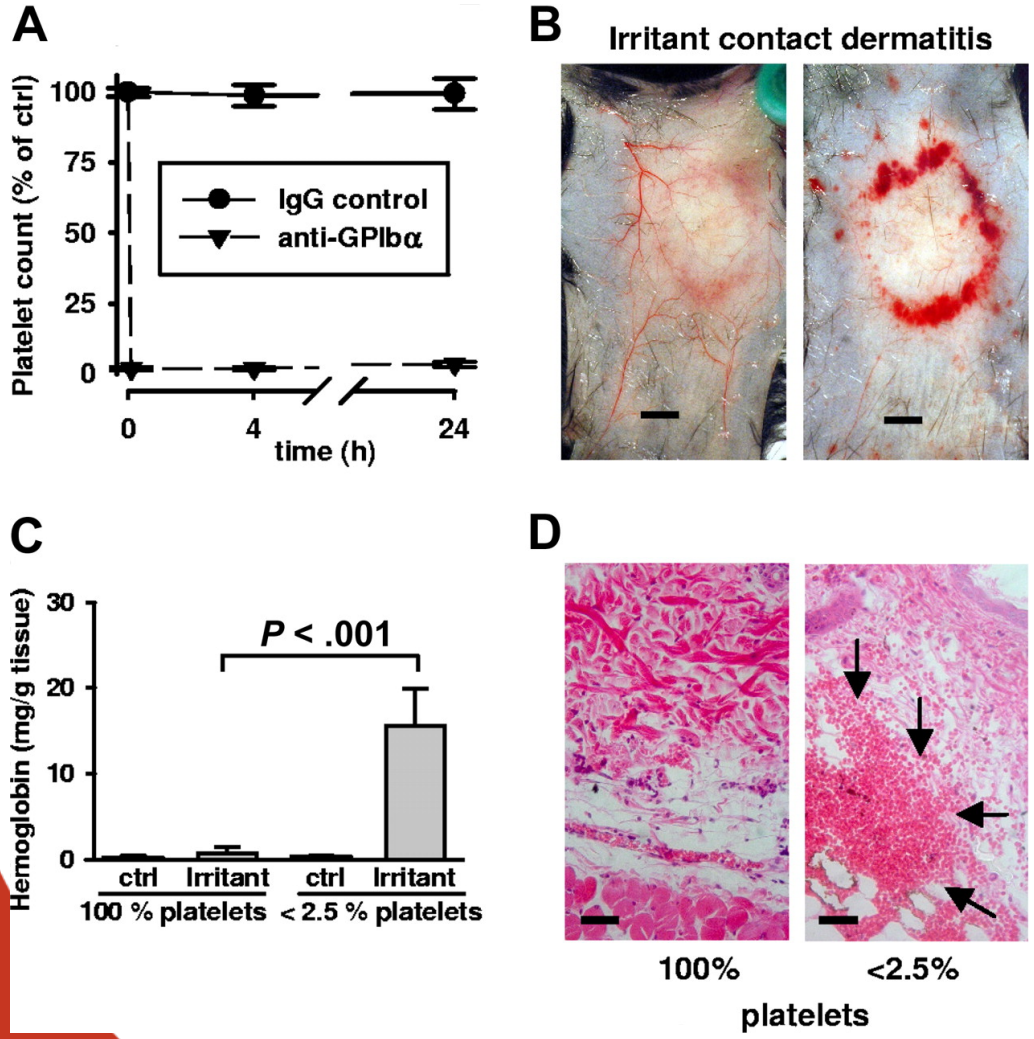
Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice

Martina Morowski,[1] Timo Vögtle,[1] Peter Kraft,[2] Christoph Kleinschnitz,[2] Guido Stoll,[2] and Bernhard Nieswandt[1]

BLOOD, 13 JUNE 2013 • VOLUME 121, NUMBER 24

Stago

El número importa….. pero hasta qué punto?

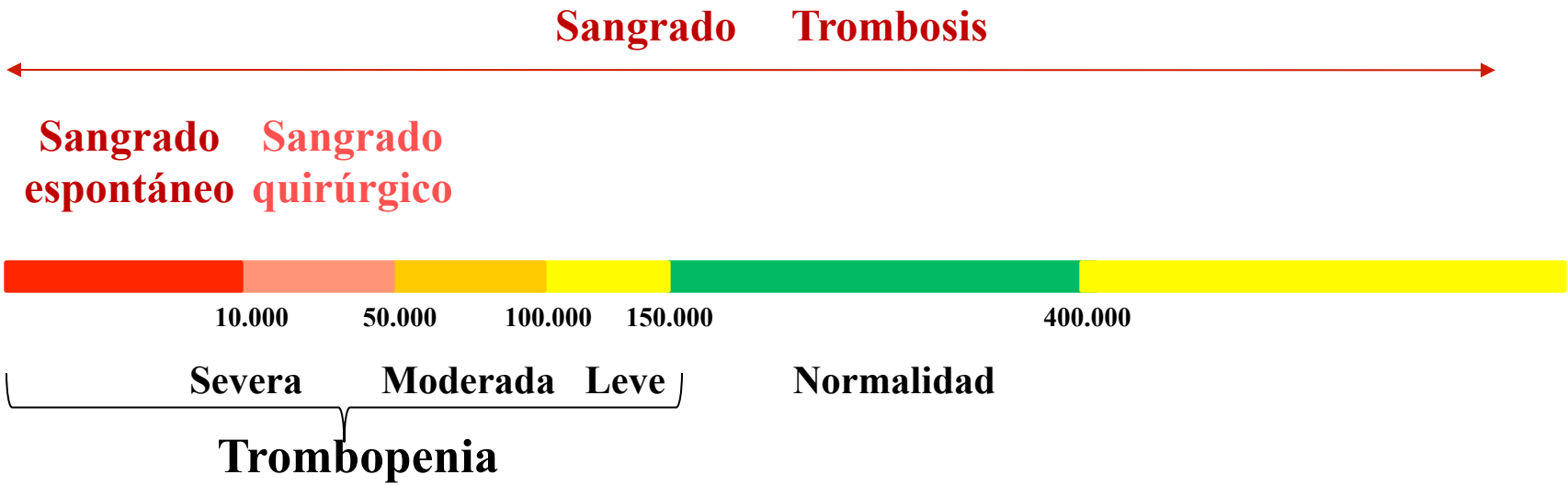


Un factor **desencadenante** como la **inflamación** puede ser el **detonante** de un problema **hemorrágico** en una **trombopenia**

Tobias Goerge et al. Blood 2008;111:4958-4964

Stago

El número importa….. pero hasta qué punto?



Aparecen problemas trombóticos y hemorrágicos con números “normales” de plaquetas

Las plaquetas son mucho más que un número:

- **Cantidad**
- **Calidad (Función)**

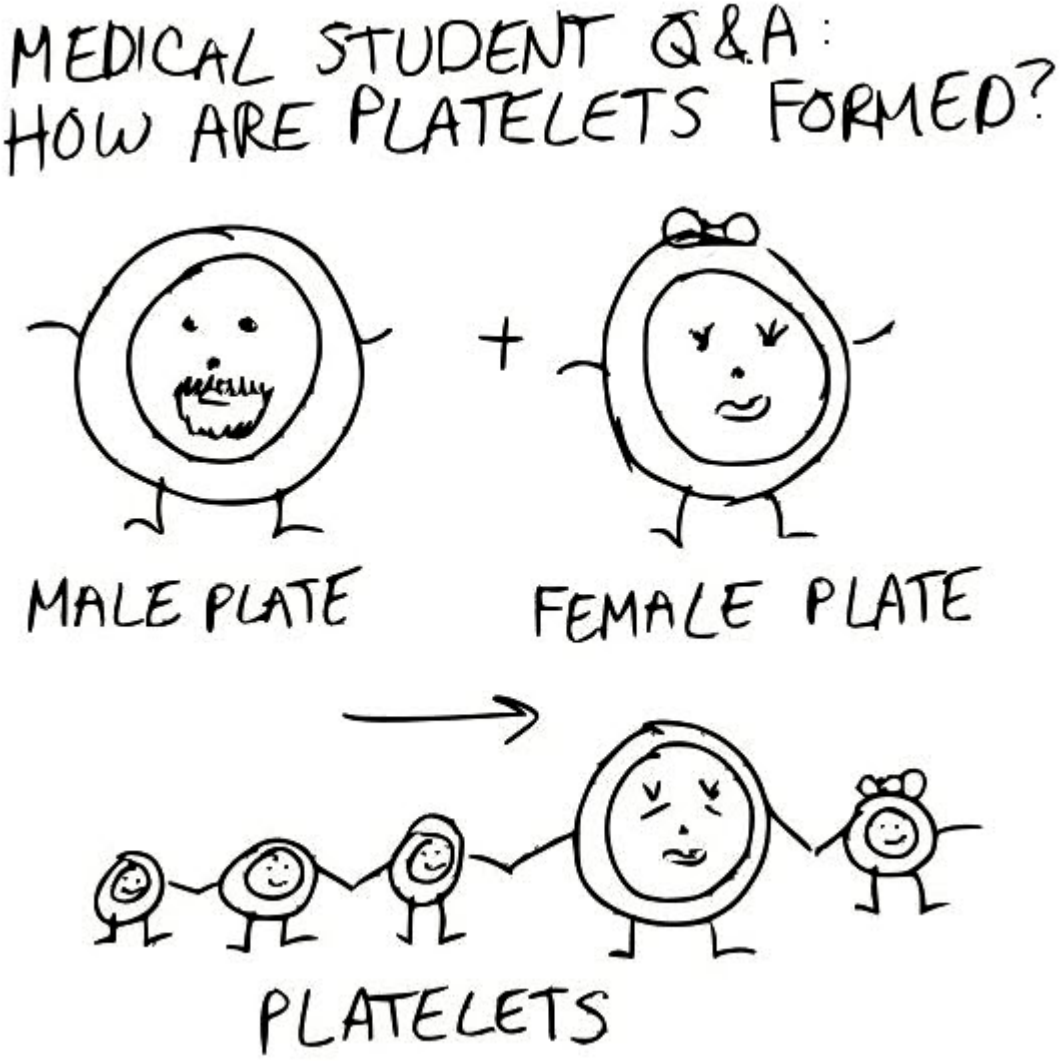
¿Cómo se regula el número de plaquetas en circulación?

Biogénesis

Vida media

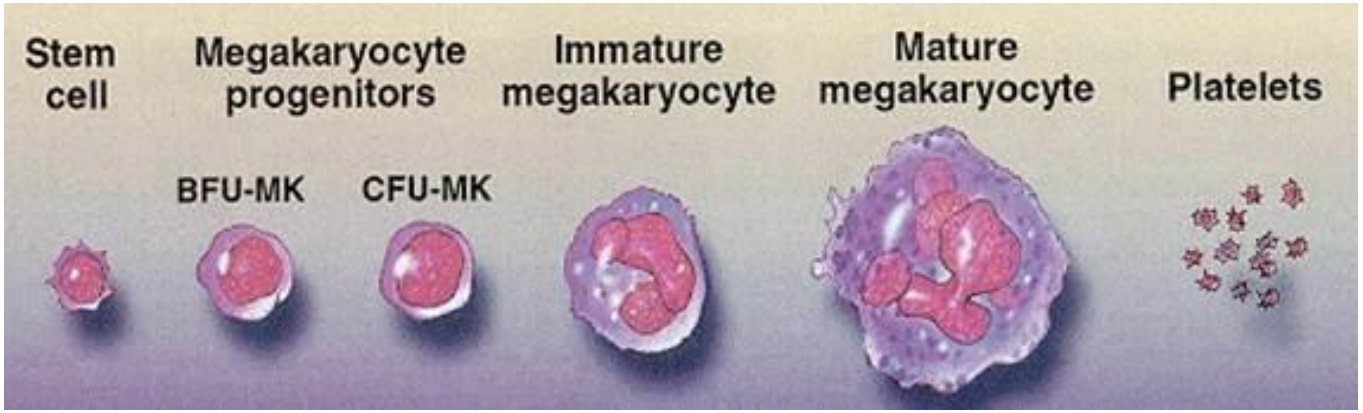
Muerte

BIOGÉNESIS PLAQUETAS



BIOGÉNESIS PLAQUETAS

MEGACARIOPOYESIS **TROMBOPOYESIS**



BIOGÉNESIS PLAQUETAS

1) **Autoperpetuación** de las células madre hematopoyéticas (HSC) en el nicho osteoblástico

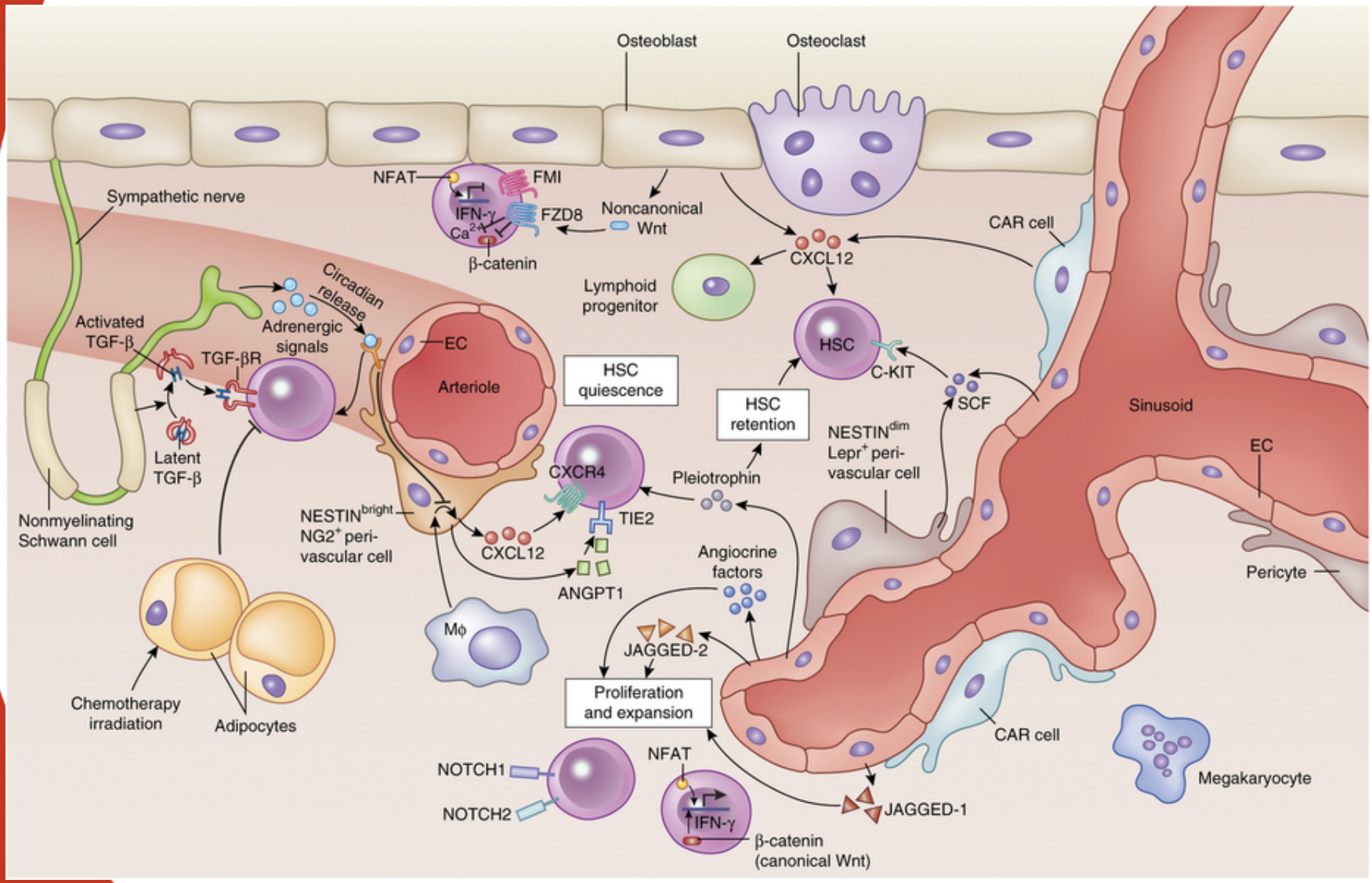
2) **Proliferación** de las HSC y **diferenciación** para incrementar el número de precursores megacariocíticos

3) En un proceso conocido como **endomitosis** se replica el DNA pero falla la división nuclear, dando lugar a **células poliploides**

4) **Formación de proplaquetas, preplaquetas y liberación de plaquetas**

Stago

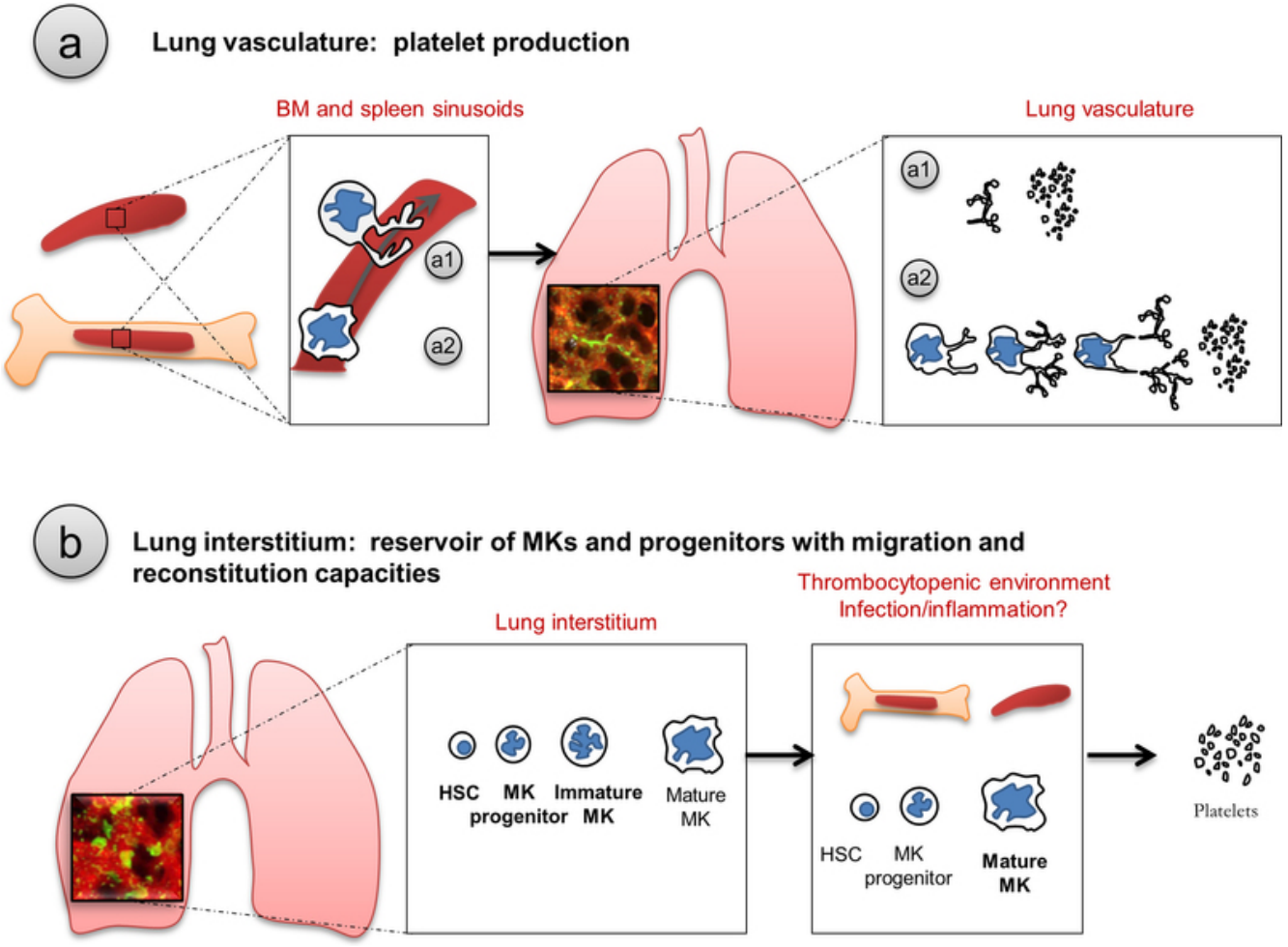
La importancia del “nicho”



Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration
Avital Mendelson & Paul S Frenette
Nature Medicine 20, 833–846 (2014)

Stago

Generación de plaquetas en los pulmones!!



Nature. 2017 Apr 6;544(7648):105-109. doi: 10.1038/nature21706. Epub 2017 Mar 22.

The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors.

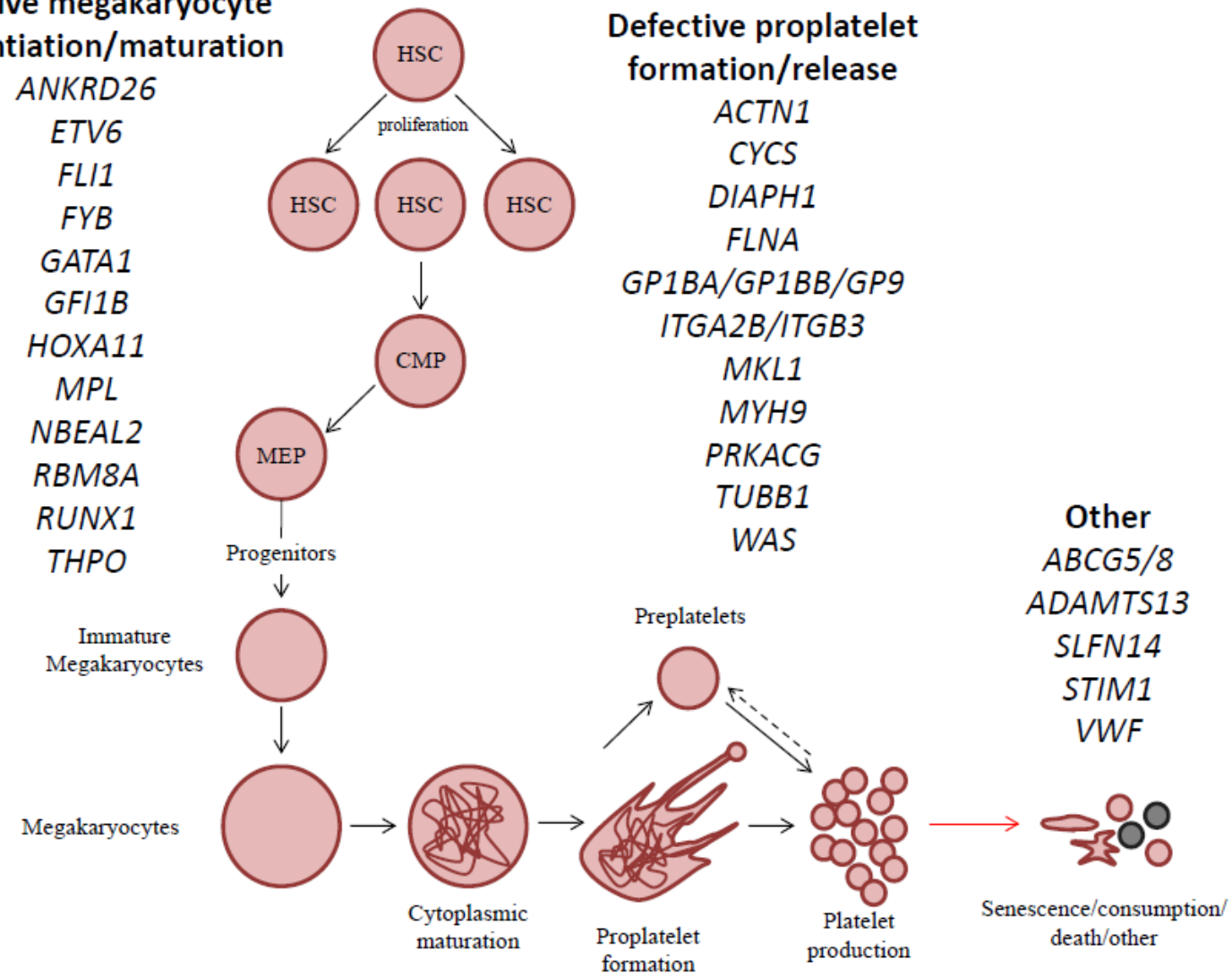
Lefrançais E[1], Ortiz-Muñoz G[1], Caudrillier A[1], Mallavia B[1], Liu F[1], Sayah DM[2], Thornton EE[3], Headley MB[3], David T[4], Coughlin SR[4], Krummel MF[3], Leavitt AD[1], Passegué E[1], Looney MR[1,5].

Stago

El estudio de **defectos cuantitativos y cualitativos** de plaquetas ha permitido la identificación de múltiples genes implicados en la biogénesis de plaquetas

Defective megakaryocyte differentiation/maturation

ANKRD26
ETV6
FLI1
FYB
GATA1
GFI1B
HOXA11
MPL
NBEAL2
RBM8A
RUNX1
THPO



Defective proplatelet formation/release

ACTN1
CYCS
DIAPH1
FLNA
GP1BA/GP1BB/GP9
ITGA2B/ITGB3
MKL1
MYH9
PRKACG
TUBB1
WAS

Other

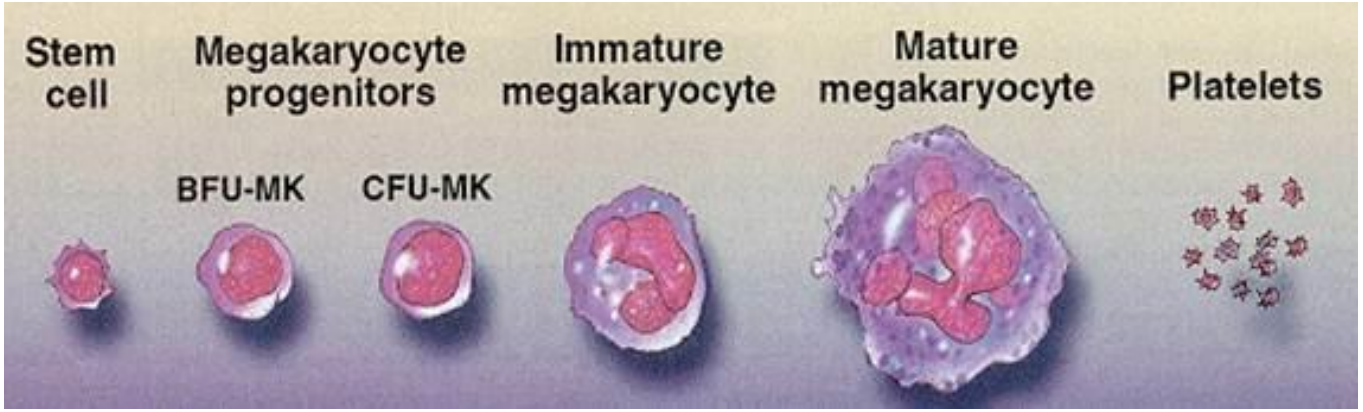
ABCG5/8
ADAMTS13
SLFN14
STIM1
VWF

Johnson et al (2016) *Platelets*

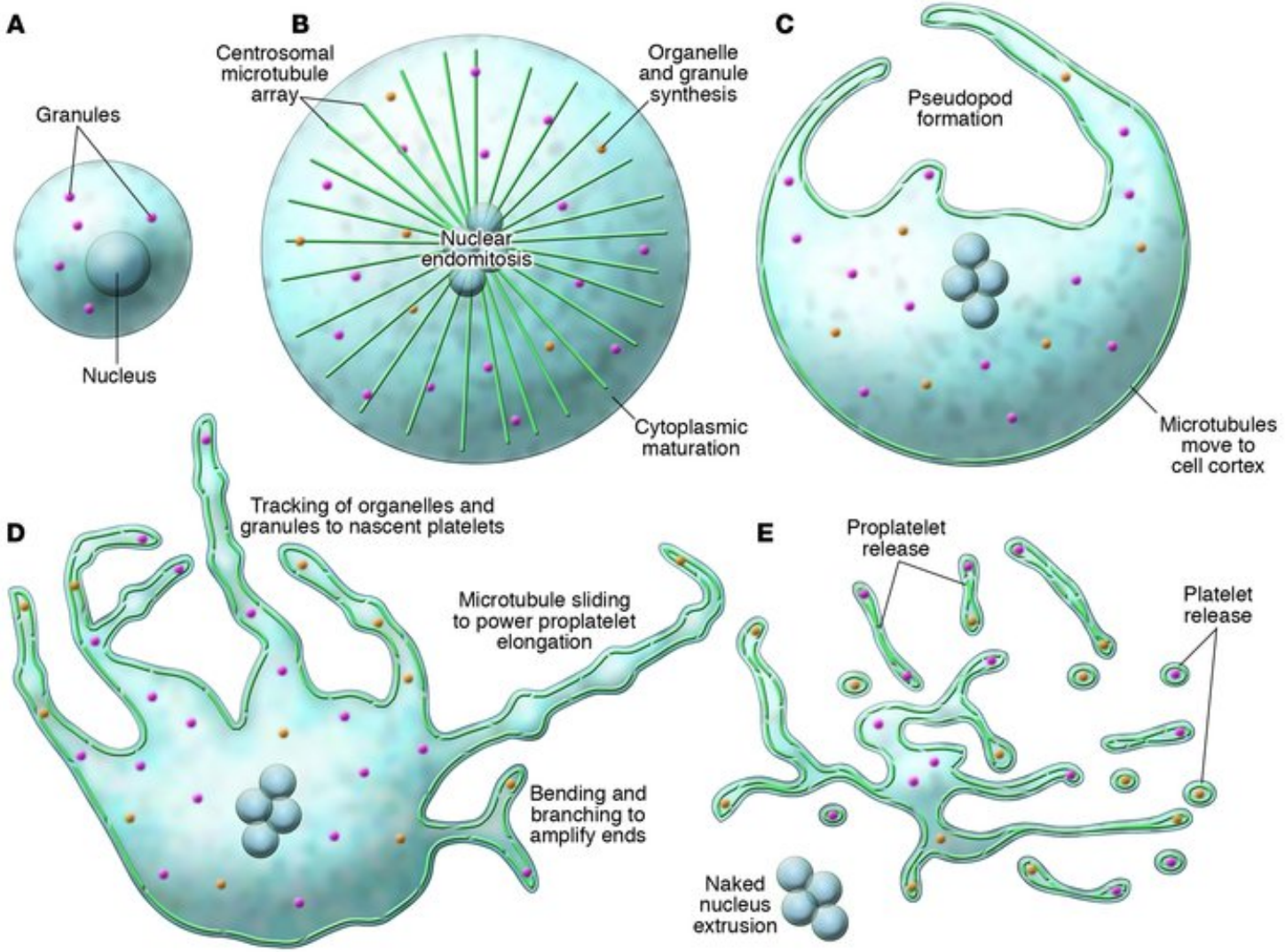
Stago

BIOGÉNESIS PLAQUETAS

MEGACARIOPOYESIS **TROMBOPOYESIS**



Producción de plaquetas a partir del megacariocito

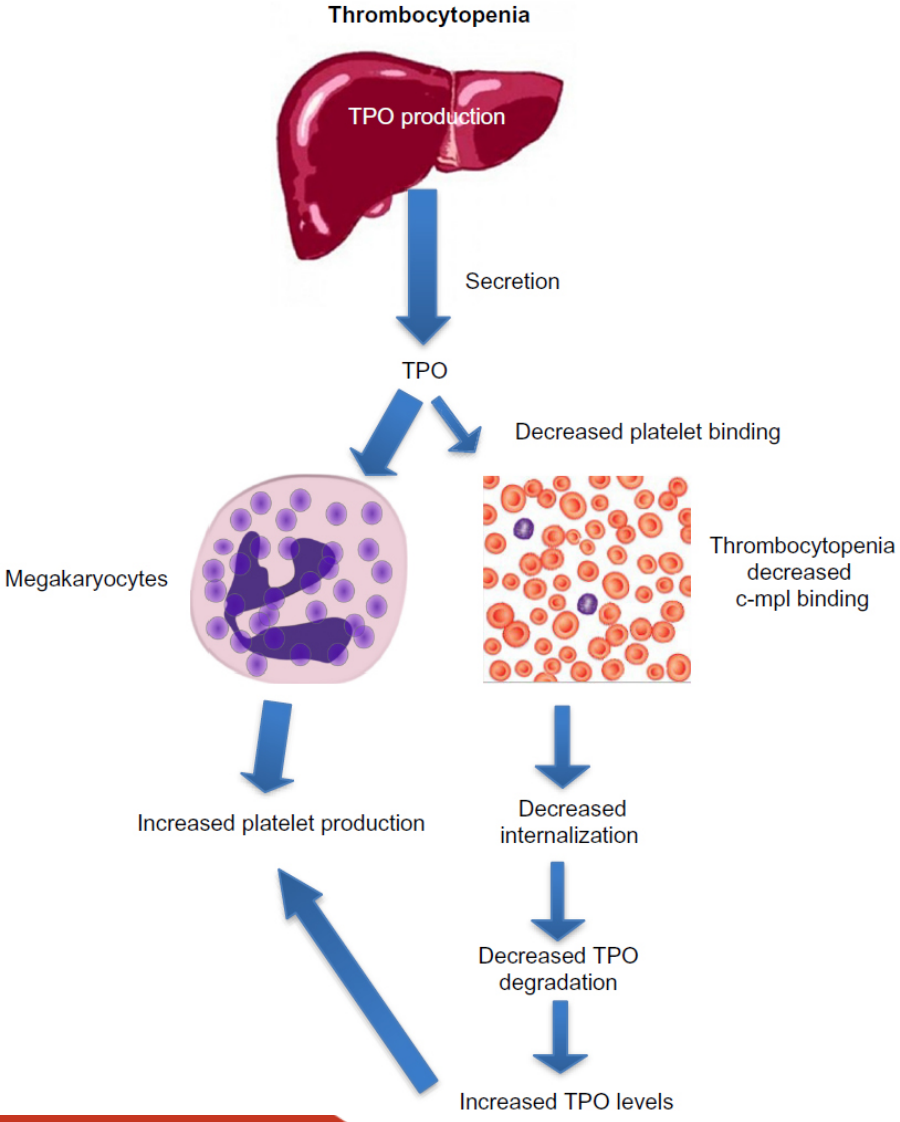


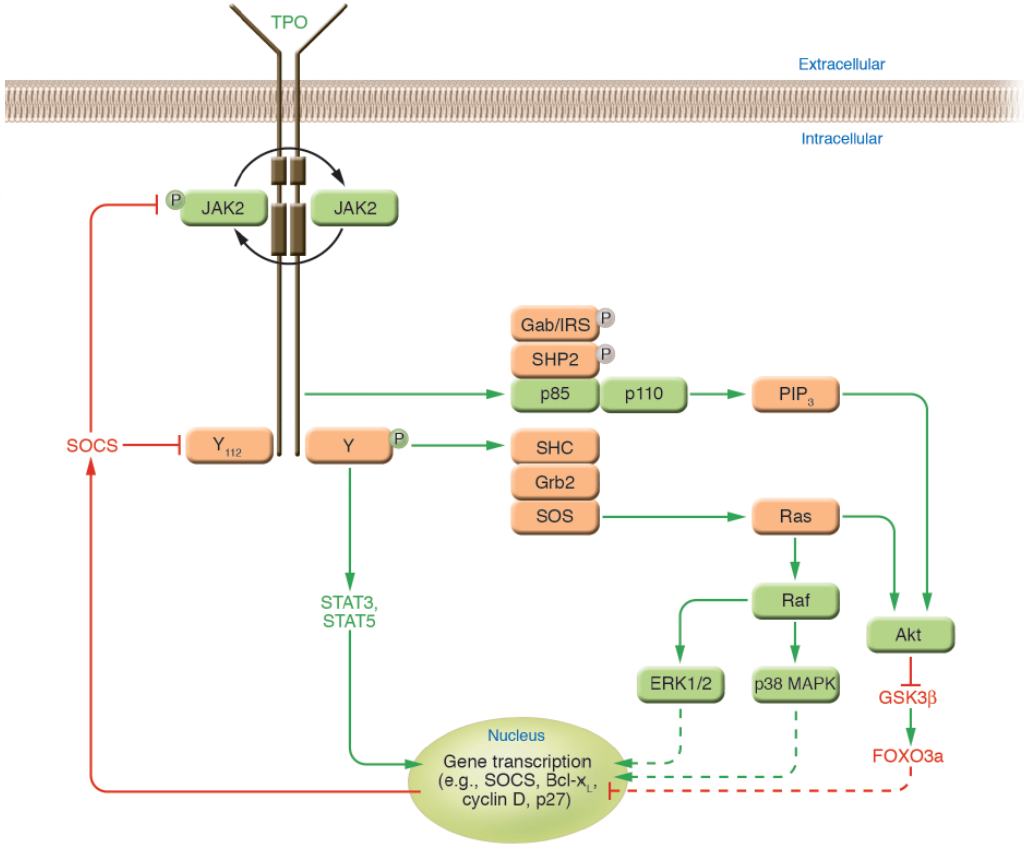
The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets
Sunita R. Patel, John H. Hartwig, Joseph E. Italiano Jr.
J Clin Invest. 2005;115(12):3348-3354

Stago

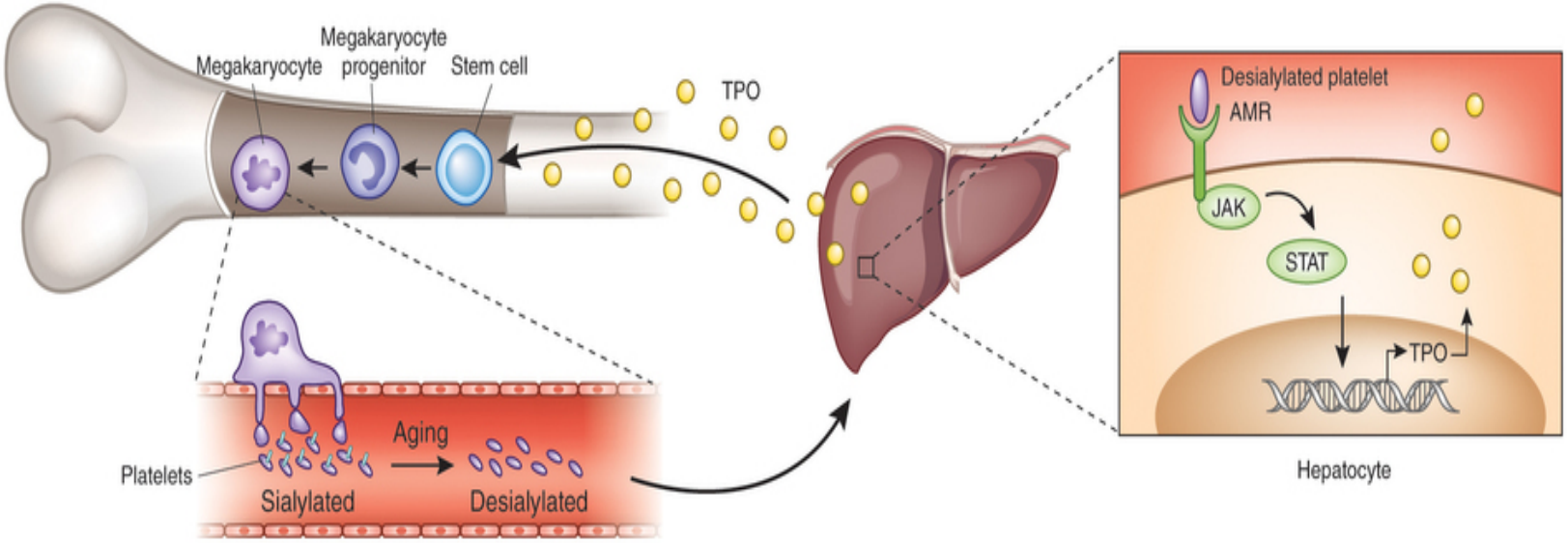
¿Cómo se regula el número de plaquetas en circulación? Las plaquetas como "esponja" de la trombopoyetina

Fig 2. Professor Endre Kelemen (1921–2000) is credited with proposing the name and functional attributes of 'thrombopoietin' in 1958. Reprinted from The Lancet, 354, (No author listed), Endre Kelemen, 1220, © 1999, with permission from Elsevier.





¿Cómo se regula el número de plaquetas en circulación?
Uniendo envejecimiento de plaquetas y síntesis de TPO

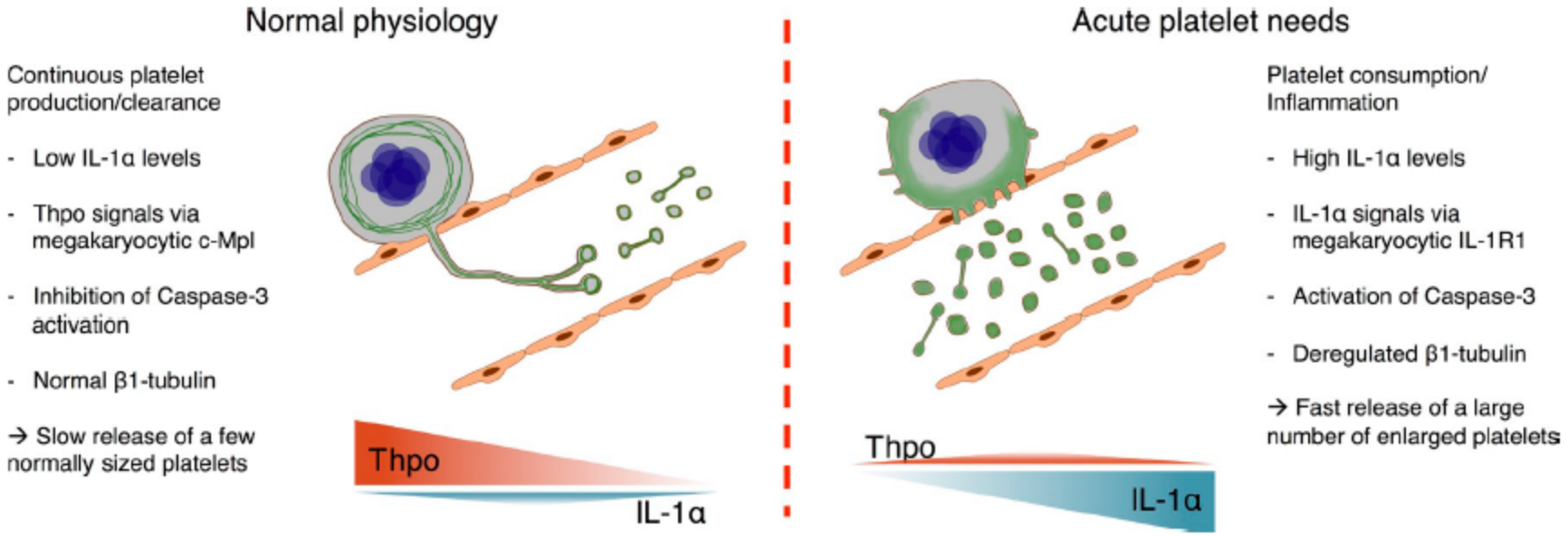


Blood. 2015 Oct 15; 126(16): 1877–1884.

Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond

Renata Grozovsky, Silvia Giannini, Hervé Falet, and Karin M. Hoffmeister

¿Cómo se regula el número de plaquetas en circulación?
Producción "explosiva" de plaquetas



IL-1α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs

Satoshi Nishimura,[1,2,5,6] Mika Nagasaki,[1,3] Shinji Kunishima,[7] Akira Sawaguchi,[8] Asuka Sakata,[5] Hiroyasu Sakaguchi,[9] Tsukasa Ohmori,[5] Ichiro Manabe,[1] Joseph E. Italiano Jr.,[10] Tomiko Ryu,[11] Naoya Takayama,[12] Issei Komuro,[1,2] Takashi Kadowaki,[2,4] Koji Eto,[12] and Ryozo Nagai[5]

J. Cell Biol. Vol. 209 No. 3 453–466

Megakaryocyte rupture for acute platelet needs

Bernhard Nieswandt and Simon Stritt

Stago

¿Cómo se regula el número de plaquetas en circulación?

La **trombopoyetina** es clave en la regulación de los mecanismos de generación de plaquetas y control de su número, en un proceso regulado por el receptor c-mpl

La producción de plaquetas se regula por otros mecanismos como **IL-6, colesterol, ROS, CCL5, etc**

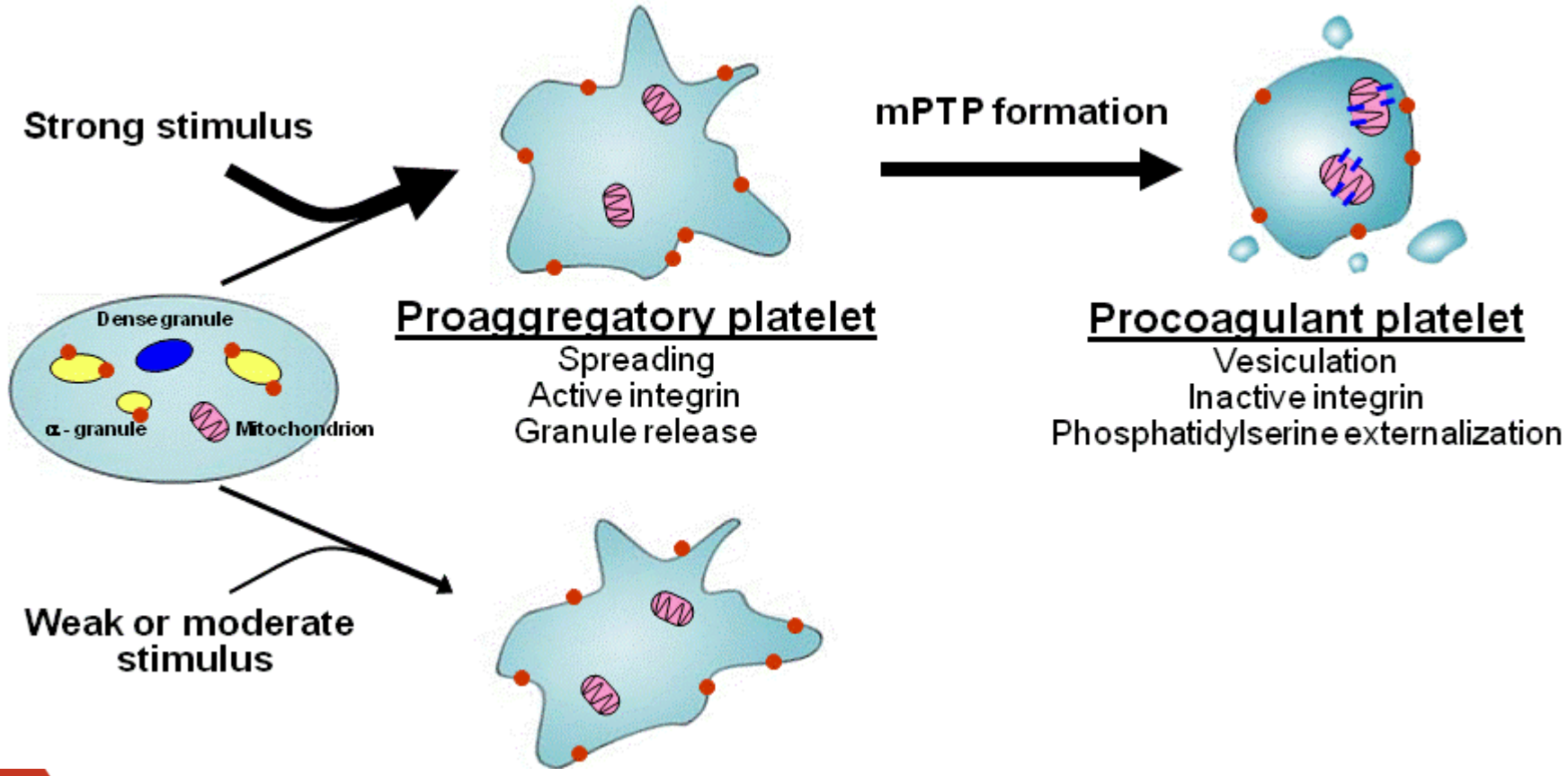
El envejecimiento plaquetario regulado por mecanismos de **deasilación** puede a su vez regular la producción de plaquetas a través del receptor hepático **Ashwell-Morrell** que a su vez regula la síntesis de TPO

En situaciones de **necesidad aguda** de plaquetas, se pueden generar plaquetas en gran número induciendo la **ruptura incontrolada** del megacariocito en un proceso mediado por **IL-1α**

Stago

¿Son todas las plaquetas iguales?

Subpoblaciones plaquetarias: **COAT** (collagen and thrombin)



Subpoblaciones plaquetarias: reticuladas = jóvenes?

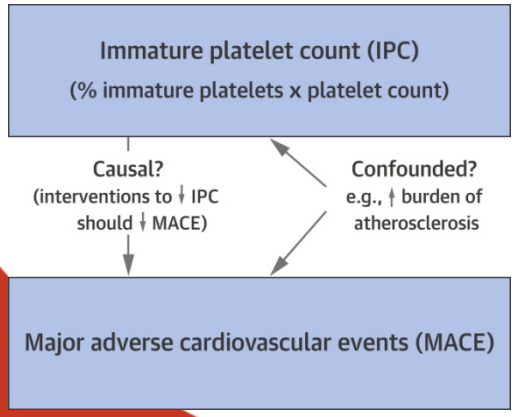
Se identifican por tener un elevado contenido en **mRNA**

Su porcentaje puede determinarse mediante **citometría de flujo** o con los analizadores automáticos **Sysmex** o **Abbott CEL-DYN Sapphire**

Su determinación tiene valor diagnóstico en las **trombocitopenias** y en la valoración de la **función medular**

Puede tener utilidad en otras patologías como el **síndrome coronario agudo**

La aparición acelerada de nuevas plaquetas puede condicionar el efecto de los **fármacos antiplaquetarios**. Aspirina dos veces al día



Immature Platelet Count:
Part of the Cardiologist's Complete Blood Count?
John W. Eikelboom
J Am Coll Cardiol. 2014;64(20):2130-2132

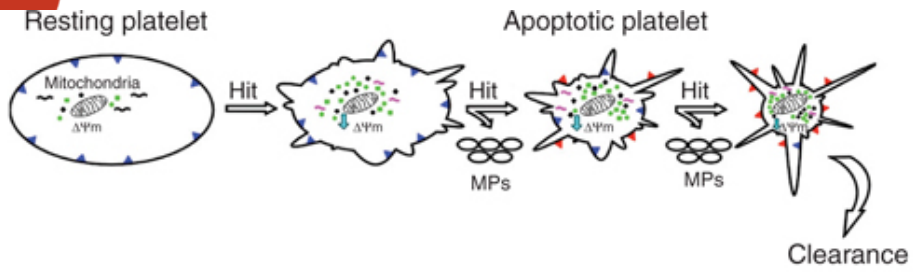
Stago

La presencia de distintas **subpoblaciones** plaquetarias puede tener importantes consecuencias clínicas

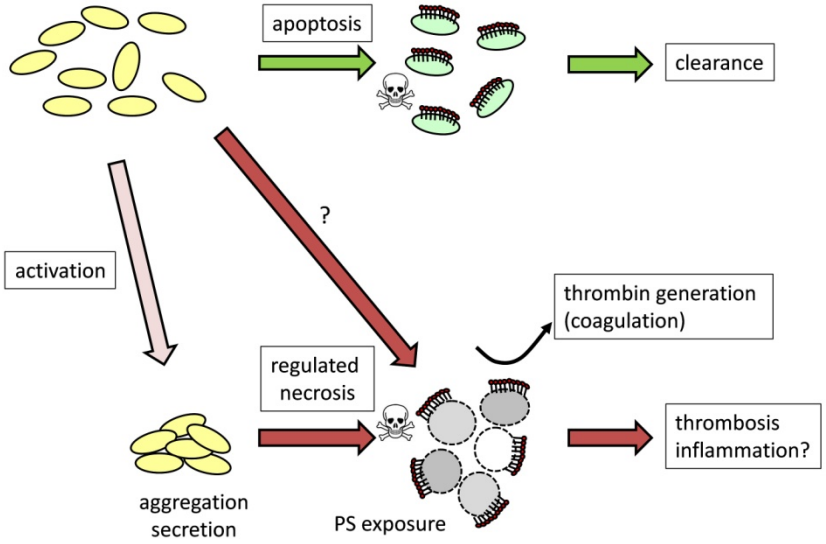
De momento hemos identificado poblaciones de plaquetas **jóvenes** y plaquetas **COAT**, pero probablemente existen muchos otros subtipos

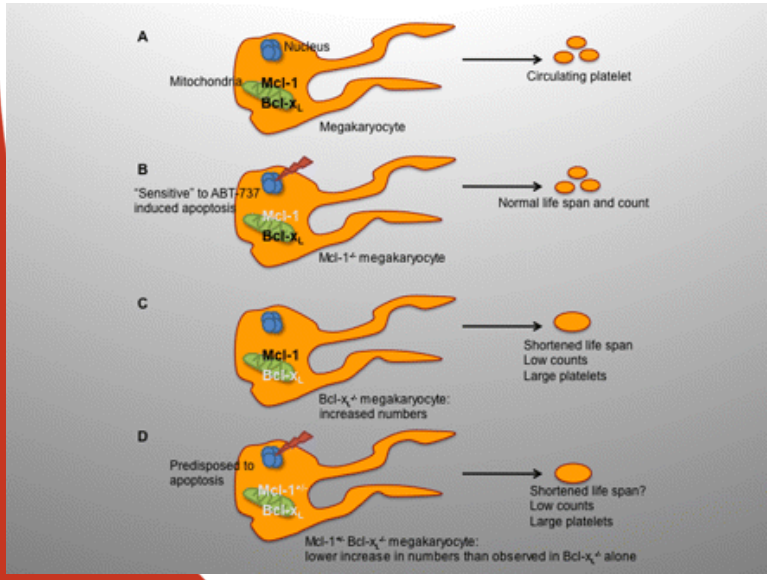
Stago

Muerte de una plaqueta



Hypothetical multiple-hit model of platelet apoptosis. Adapted with permission from V Leytin *et al*, Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets, *Biochem Biophys Res Comm* 2004;320:303–310.





Death regulates platelet birth and life
Karin M. Hoffmeister
Blood 2012 119:5617-5618;

La muerte de las plaquetas es un proceso **regulado**

Intervienen mecanismos **apoptóticos** que dotan a las plaquetas de un "**reloj**" interior

Existen otros mecanismos de eliminación de plaquetas (anticuerpos, desialización, etc)

Stago

Existen múltiples defectos tanto congénitos como adquiridos que afectan al número de plaquetas

Estos defectos pueden afectar desde la génesis de las plaquetas hasta la regulación de su eliminación

Las técnicas de secuenciación masiva están contribuyendo a establecer las bases génicas de bastantes de estas patologías

No siempre vamos a encontrar una relación directa entre número de plaquetas y complicaciones hemorrágicas

Stago

Defectos de la función plaquetaria

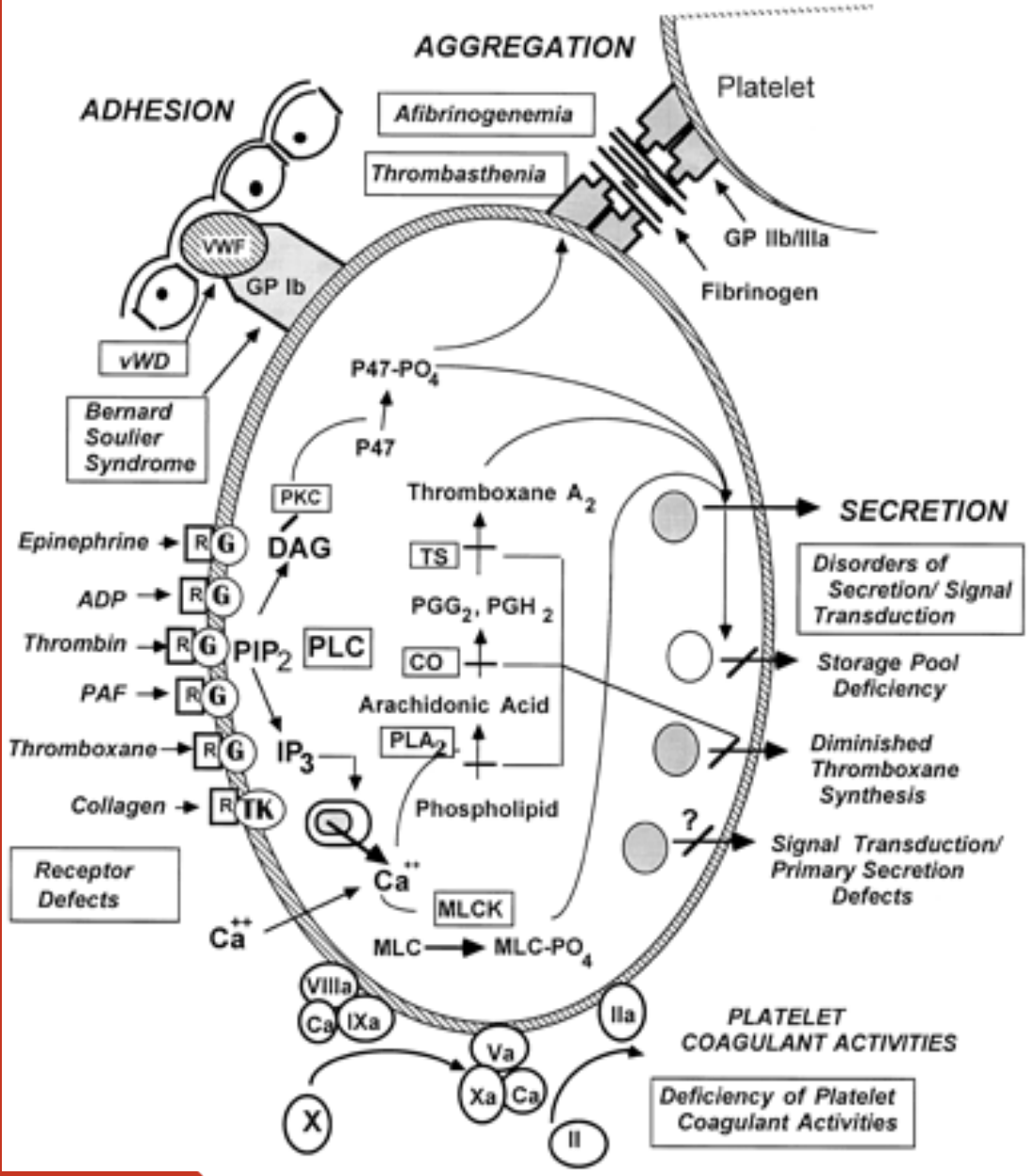
Defectos Plaquetarios

- Los pacientes con sospecha de un defecto en la función plaquetaria se presentan con sangrado mucocutáneo y hemorragia excesiva tras un proceso quirúrgico o un trauma

- Cada laboratorio debe contar con sus controles “normales”, teniendo en cuenta que no es infrecuente encontrar un aparente defecto de la función plaquetaria en personas que no refieran un problema previo de sangrado

- Es necesario alcanzar un mayor nivel de consenso y estandarización en el empleo de las distintas técnicas para definir cuándo existe un problema en la función plaquetaria

Stago



Classification of Congenital Disorders of Platelet Function

- Defects in platelet–vessel wall interaction (disorders of adhesion)
  - von Willebrand disease (deficiency or defect in plasma vWF)
  - Bernard-Soulier syndrome (deficiency or defect in GPIb)
- Defects in platelet-platelet interaction (disorders of aggregation)
  - Congenital afibrinogenemia (deficiency of plasma fibrinogen)
  - Glanzmann's thrombasthenia (deficiency or defect in GPIIb-IIIa)
- Disorders of platelet secretion and signal transduction
  - Abnormalities of granules
    - Storage pool deficiency
    - Quebec platelet disorder
  - Signal transduction defects (primary secretion defects)
    - Defects in platelet-agonist interaction (receptor defects)
      - Receptor defects: TxA_2, collagen, ADP, epinephrine
    - Defects in G-protein activation
      - $G\alpha_q$ deficiency
    - Defects in PI metabolism
      - PLC-β2 deficiency
    - Defects in calcium mobilization
    - Defects in protein phosphorylation (pleckstrin)
  - Abnormalities in arachidonic acid pathways and TxA_2 synthesis
    - Impaired liberation of arachidonic acid
    - Cyclooxygenase deficiency
    - Tx synthase deficiency
  - Defects in cytoskeletal regulation
    - Wiskott-Aldrich syndrome
- Disorders of platelet coagulant-protein interaction
  - Defect in factor Va-Xa interaction on platelets (Scott syndrome)

Rao AK *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2000;20:285

Stago

Técnicas aplicables al estudio de:

- **Desórdenes plaquetarios**
- **Terapias antiplaquetarias**

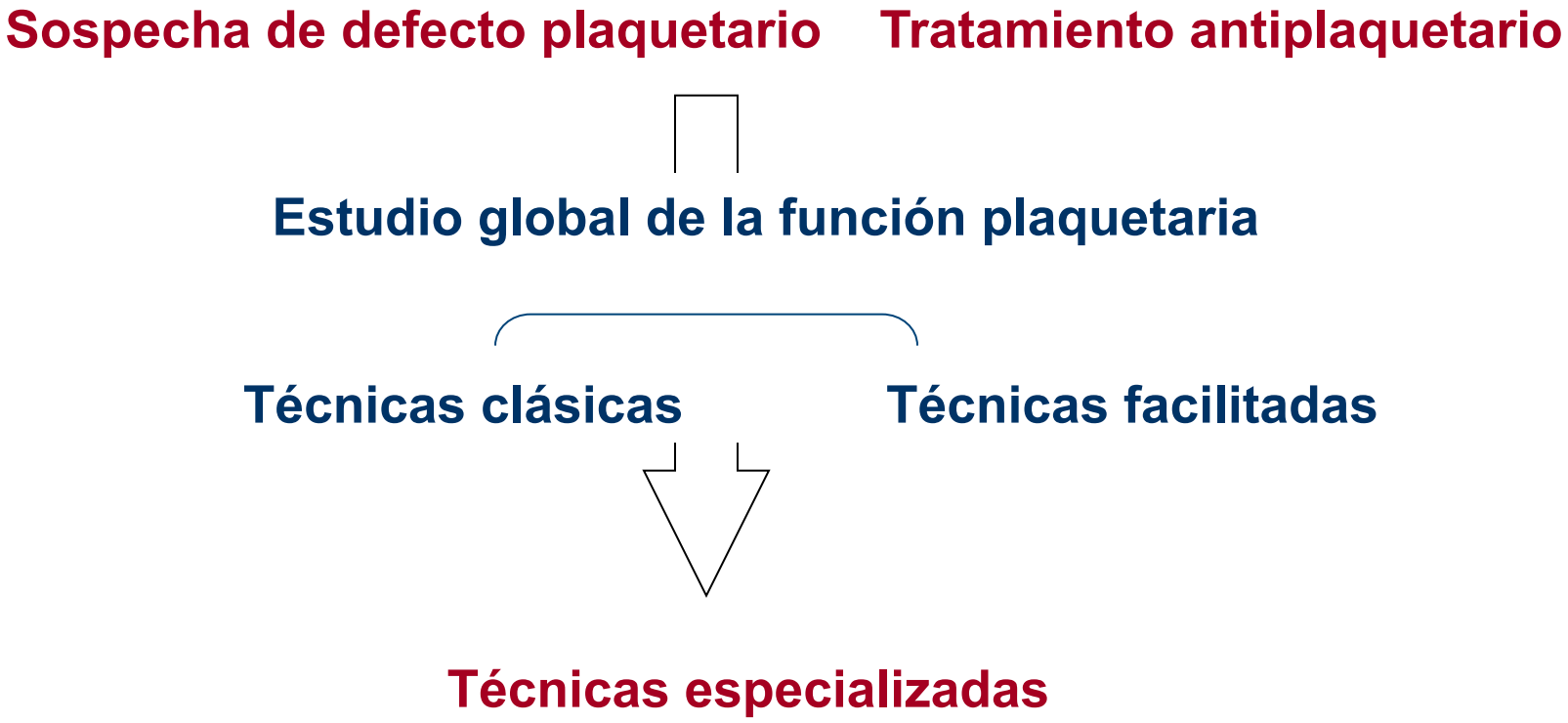
Aunque las técnicas empleadas van a ser básicamente las mismas, variarán las condiciones utilizadas para detectar defectos en la función plaquetaria o monitorizar el efecto de fármacos antiplaquetarios

Stago

Fármacos antiplaquetarios más utilizados

- Aspirina
- Bloqueantes de P2Y12
- Asociación de aspirina y bloqueantes de P2Y12
- Bloqueantes de IIb-IIIa

Stago

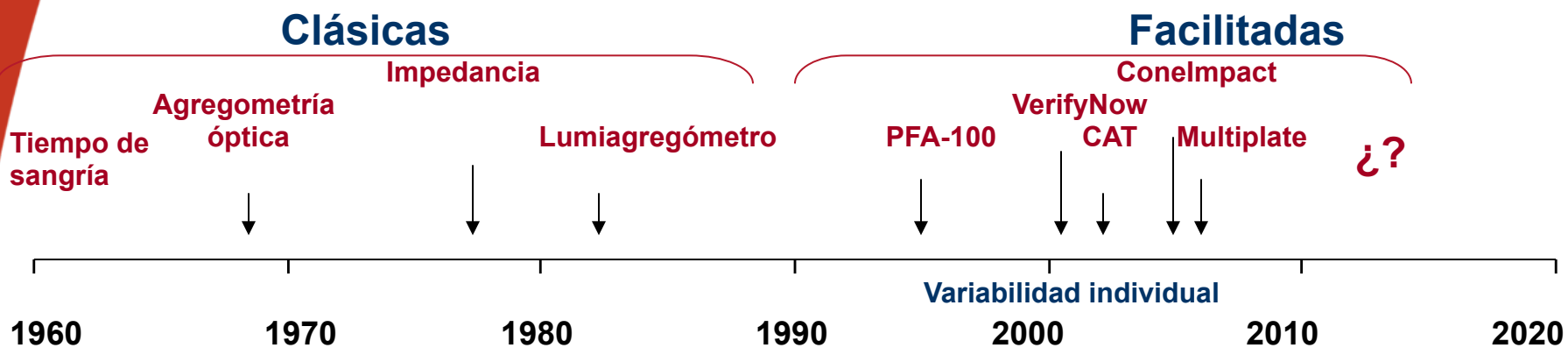

Sospecha de defecto plaquetario
Tratamiento antiplaquetario
Estudio global de la función plaquetaria
Técnicas clásicas
Técnicas facilitadas
Técnicas especializadas

Técnicas de estudio de la función plaquetaria

- Tiempo de hemorragia
- Agregometría óptica
- Agregometría impedancia
- VerifyNow
- Multiplate
- PFA-100

Stago

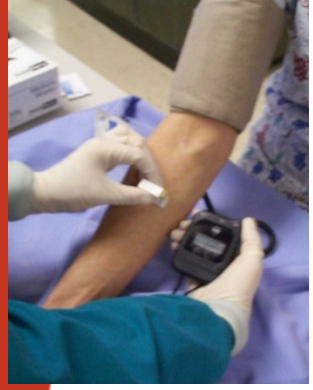
Técnicas para el estudio de la función plaquetaria



Las técnicas facilitadas se han desarrollado principalmente para valorar el efecto de los fármacos antiplaquetarios.

El desarrollo de nuevas técnicas ha avanzado en paralelo con un mayor conocimiento de la bioquímica de la plaqueta.

Stago



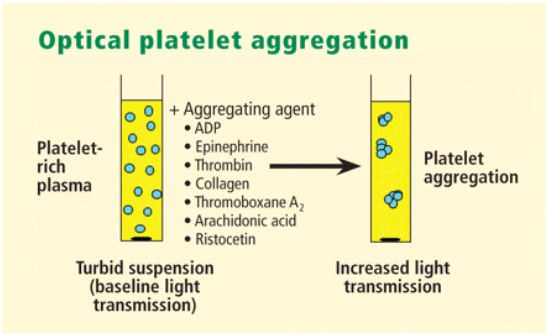
Tiempo de hemorragia

- Tiempo que tarda en detenerse la hemorragia producida por una incisión estandarizada (9mm de largo y 1 mm profundidad) en el antebrazo, manteniendo una presión con el manguito de 40 mmHg.
- Se ha utilizado para el control preoperatorio de la hemostasia primaria (detección de anomalías plaquetarias) y el estudio del efecto de fármacos antiplaquetarios.
- Es la única prueba “in vivo” de función plaquetaria en presencia de celulas sanguíneas y endotelio.
- Problemas: reproductibilidad, es invasiva, cicatriz.

Stago

Agregometría

Chrono-Log Corp



- Es el "estándar oro" con el que se comparan todas las técnicas de estudio de la función plaquetaria.
- Mide el cambio de transmisión de luz a través de una suspensión de plaquetas en PRP cuando se añade un agonista. Detecta defectos en la función plaquetaria y el efecto de todos los fármacos antiplaquetarios usando el agonista apropiado a la dosis correcta.
- Agonistas:

Fisiológicos: ADP, colágeno, trombina, ácido araquidónico, epinefrina, PAF, serotonina, etc.

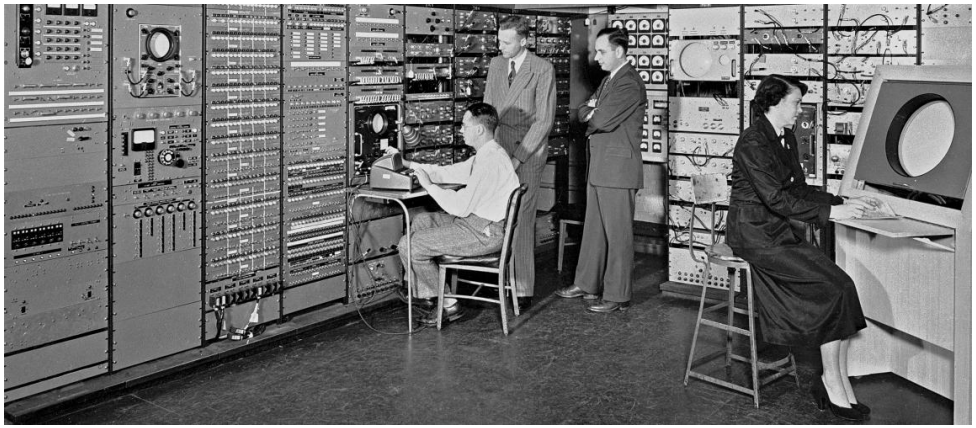
No fisiológicos: análogo del TXA_2 U46619,ionóforos de calcio, forbol miristato acetato (PMA), thrombin receptor agonista peptide (TRAP), etc.

Aglutinantes: ristocitina o botrocitina

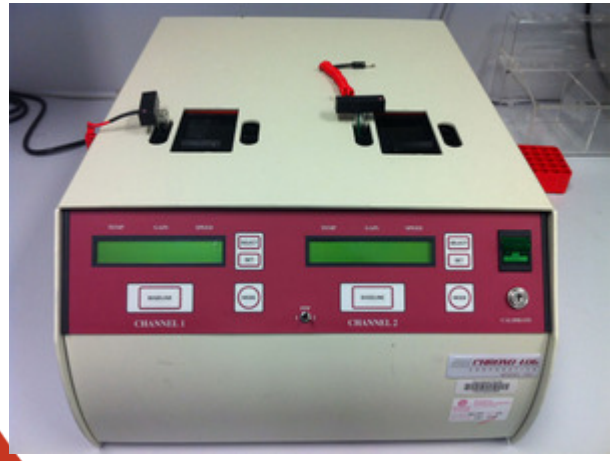
Stago

Nature. 1962 Jun 9;194:927-9.
Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.
BORN GV.

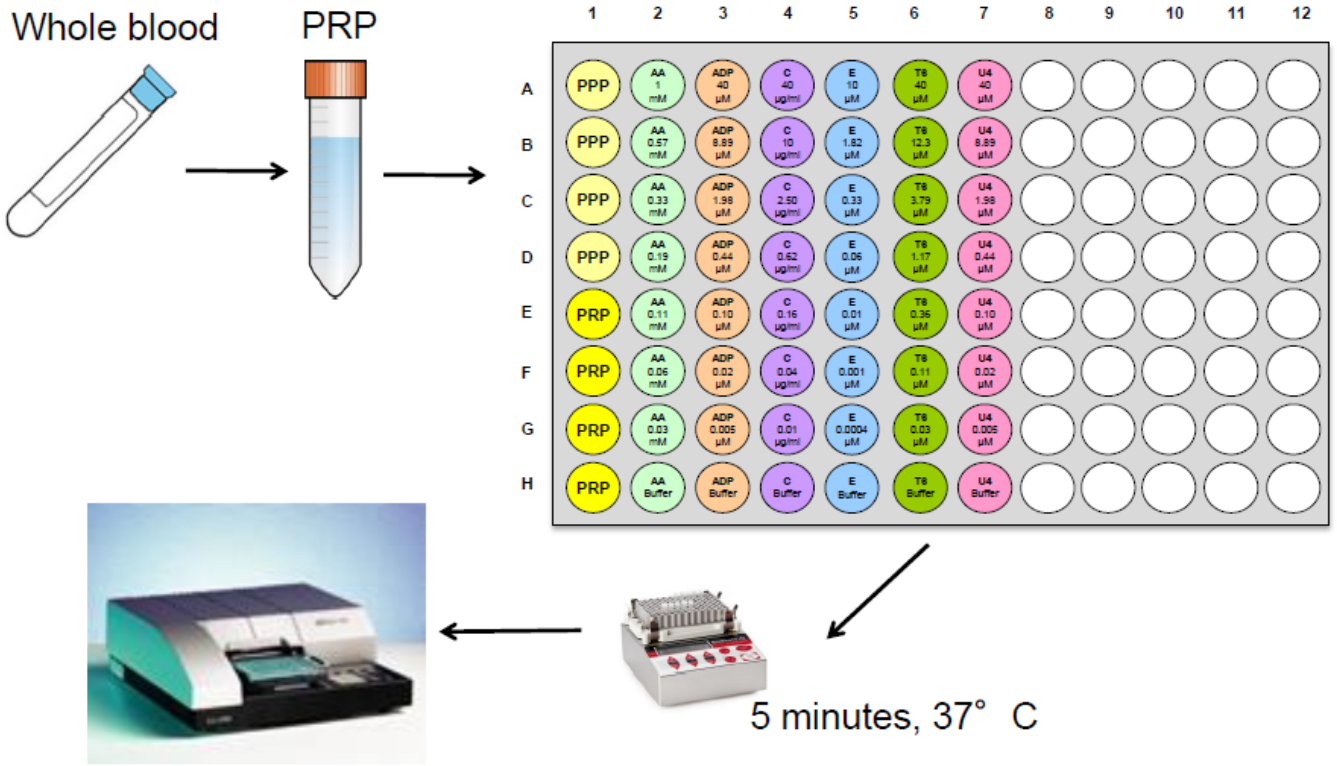
1970



2017



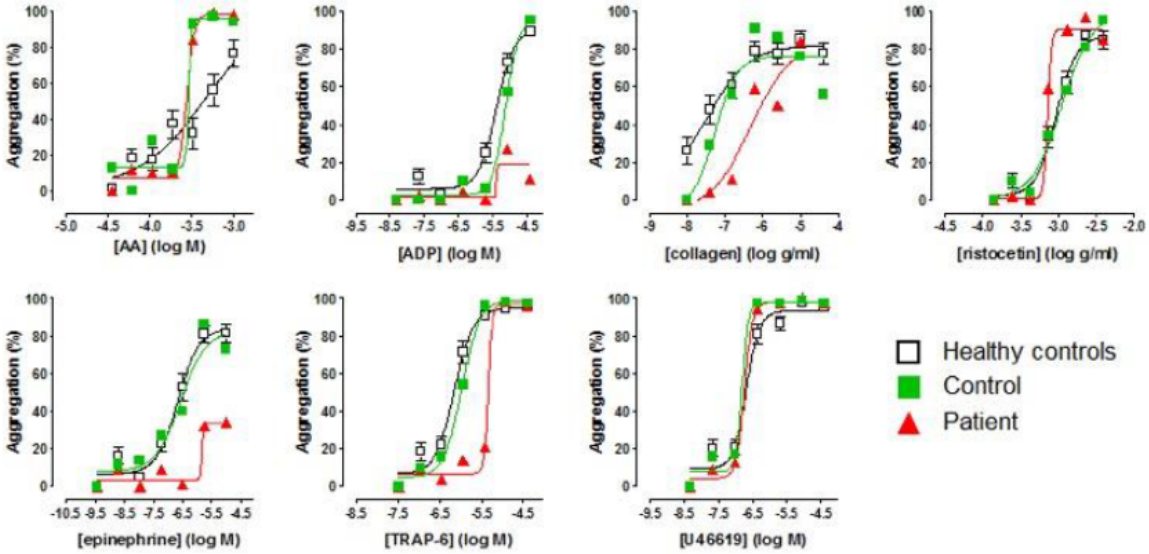
Methods: Optimul Plates



Chan et al. Platelets. 2011;22(7):485-94 / Chan & Warner. Platelets. 2012;23(5):404-8.

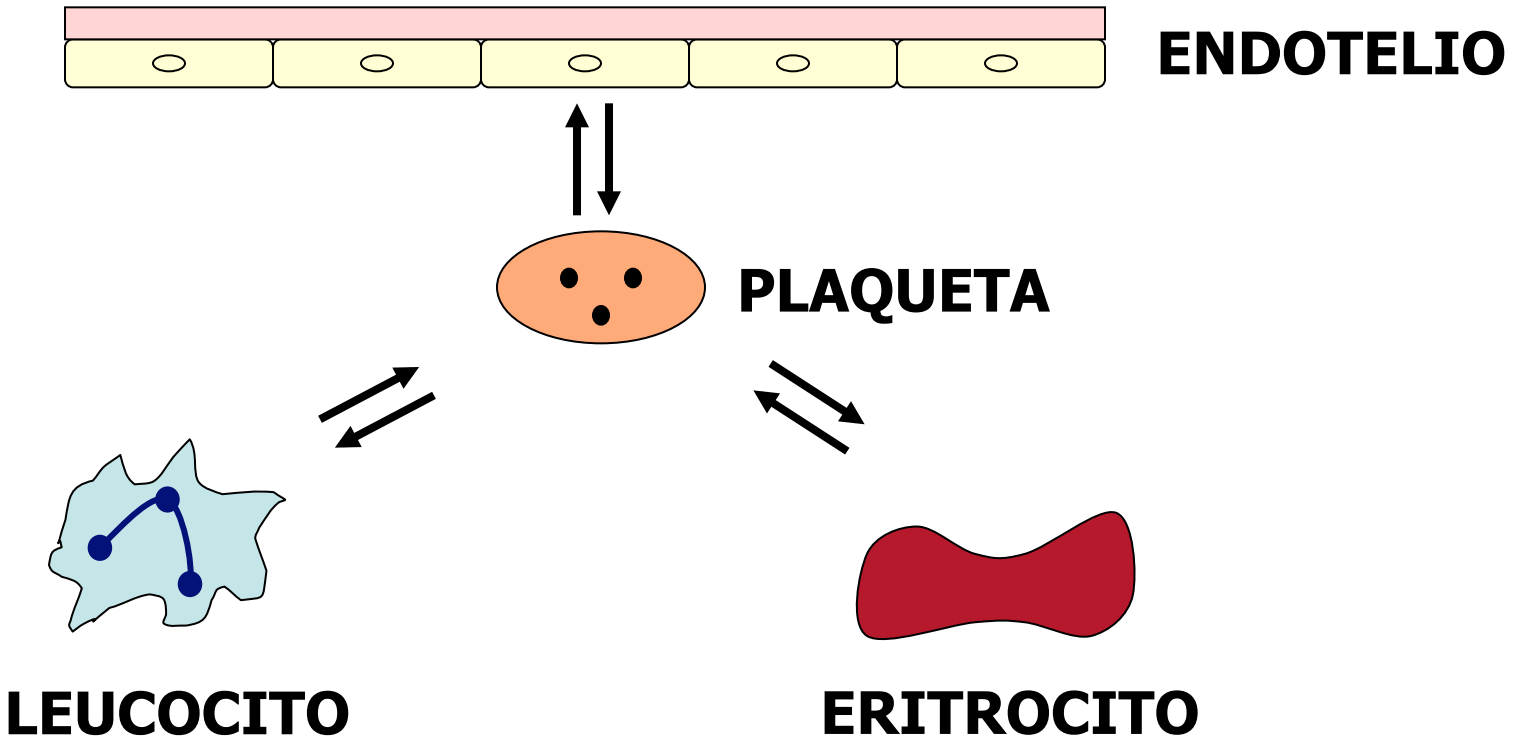
Stago

LTA vs Optimul in bleeding disorder



Lordkipanidzé et al. Blood. 2014 Feb 20;123(8):e11-22.

Stago


ENDOTELIO
PLAQUETA
LEUCOCITO
ERITROCITO

Agregometría

Impedancia: mide cambio de resistencia eléctrica al paso de corriente por un electrodo introducido en la sangre total diluida o PRP cuando se añade el agonista debido al depósito de plaquetas (y otras células) en el electrodo.

- Multiplate: sistema semifacilitado que se ha empleado para monitorizar los tratamientos antiplaquetarios con aspirina y tienopiridinas. No está clara su utilidad para detectar defectos en la función plaquetaria.

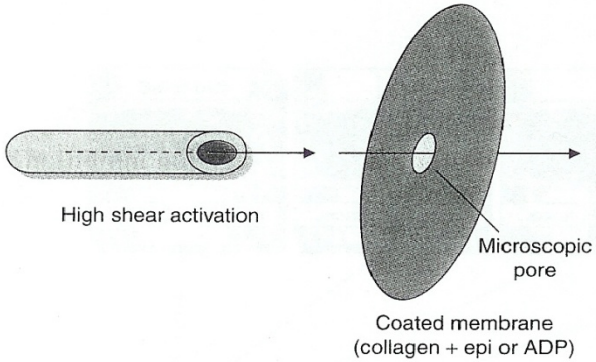
Lumiagregómetro: Equipado con un fluorímetro, mide simultáneamente la agregación plaquetaria y la liberación de ATP por la reacción luciferin-luciferinasa. Muy útil para detectar problemas plaquetarios de liberación.

Otros sistemas:

- Ultraflow-100:Doble contaje de plaquetas: EDTA vs Citrato + agonista
- Ichor-Platelet Works (Helena)

Stago

Platelet Function Analyzer (PFA-100)



- Mide tiempos de oclusión de un orificio sobre membranas recubiertas de colágeno + epinefrina (CEPI) o colágeno + ADP (CADP) por las que pasa sangre total con un flujo fijo elevado (4000-5000 s^{-1}).

- Puede detectar el efecto de ASA y bloqueantes de GPIIbIIIa. No se recomienda para detectar el clopidogrel.

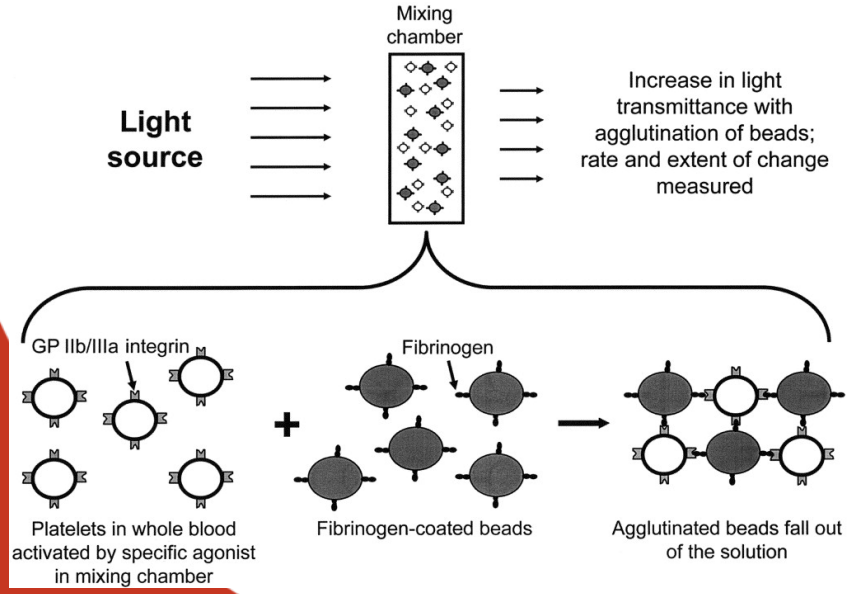
Hayward CP J Thromb Haemostas 2006;4:312-19

- Detecta los defectos severos de función plaquetaria (TG, BS), no así los defectos medios

Favaloro EJ Semin Thromb Hemost 2008;34:709-33

Stago

VerifyNow (RPFA)



- Totalmente automatizado y ajustado para que emule la agregación en PRP
- Cartuchos especiales para monitorizar aspirina, clopidogrel y bloqueantes de GPIIbIIIa.
- No se ha ensayado para detectar defectos plaquetarios

Stago

Técnicas avanzadas para el estudio de la función plaquetaria

- Citometría de flujo
- Determinación del calcio citosólico
- Determinación bioquímica de marcadores solubles
- Generación de trombina
- Retracción del coágulo
- Proteómica
- Técnicas de adhesión: microfluídica

Stago

Citometría de flujo

La citometría de flujo puede aplicarse al estudio de:

- Plaquetas activadas circulantes
- Plaquetas activadas *in vitro*
- Superficie plaquetaria procoagulante
- Micropartículas plaquetarias
- Recambio de plaquetas
- Interacciones entre plaquetas y otras células sanguíneas

Nos permite detectar:

- Alteraciones congénitas en la función de las plaquetas
- Monitorización del tratamiento antiplaquetario (VASP-P)

Stago

- Un mayor conocimiento de la bioquímica plaquetaria permitirá el desarrollo de nuevas técnicas para la monitorización de la función plaquetaria.

- Tanto la detección de un defecto plaquetario como la monitorización de los fármacos antiplaquetarios puede exigir el empleo simultáneo de varias técnicas para obtener una visión global de la función plaquetaria.

- Necesitamos alcanzar una mayor estandarización y protocolización en el empleo de las diversas técnicas.

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 7: 1029 DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03458.x

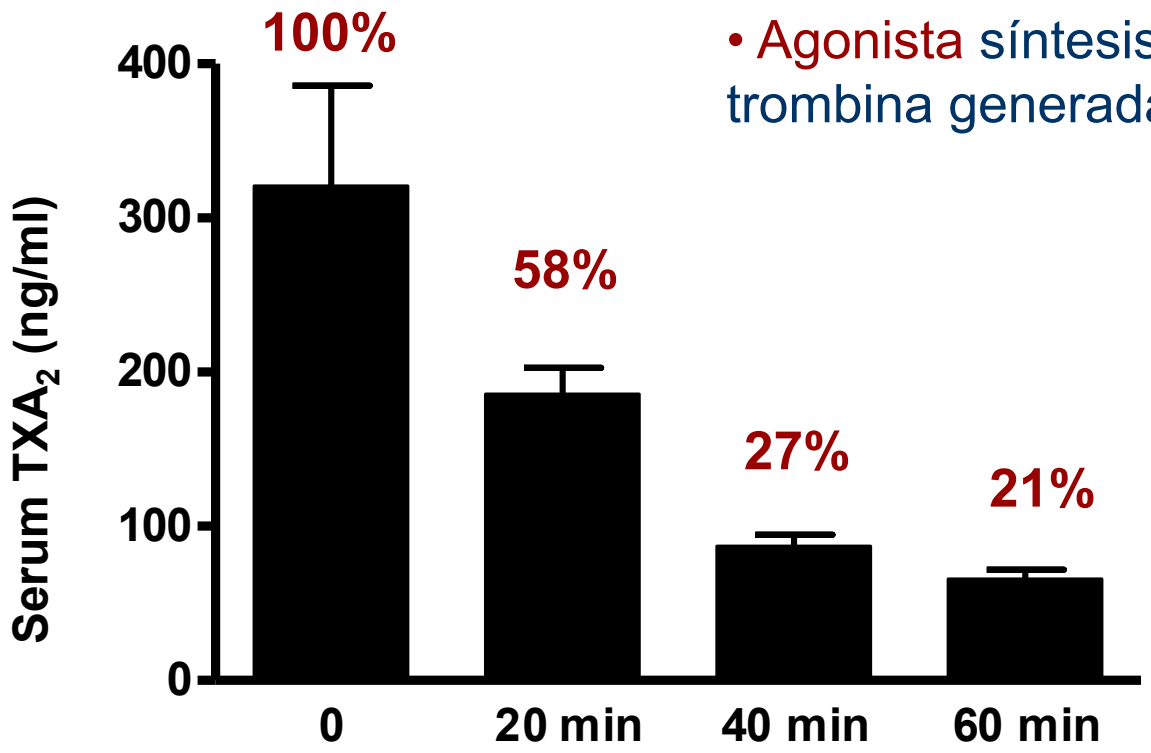
OFFICIAL COMMUNICATION OF THE SSC

Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH

M. CATTANEO,[1]* C. P .M. HAYWARD,[1]†‡§ K. A. MOFFAT, ‡§ M. T. PUGLIANO,* Y. LIU‡ and A. D. MICHELSON¶

Stago

La determinación del TXB_2 en suero: requiere la inmediata incubación en baño a 37 ºC.



- Agonista síntesis de TXA_2: trombina generada en el suero.

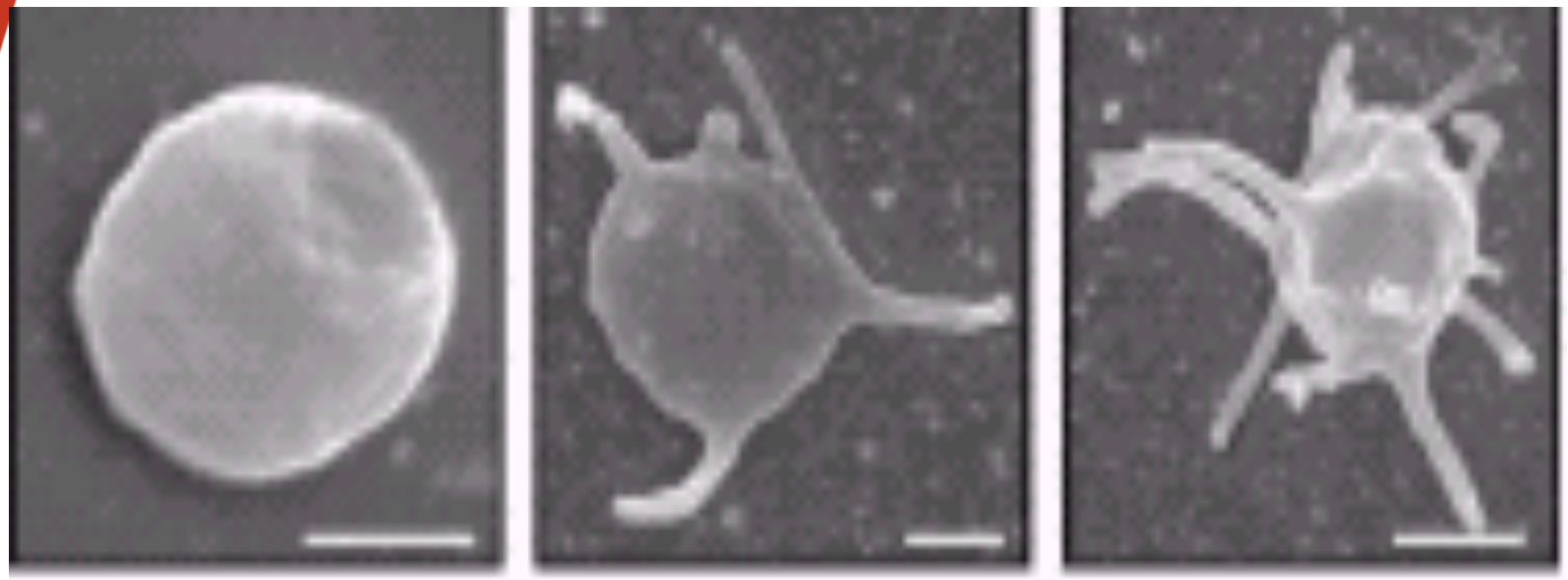
Sujetos normales (n= 8); * P<0.0001. Todos después 60 min. a 37º C

Santos MT Platelets 2016

Stago

CÁNCER
TROMBOSIS
INFLAMACIÓN
HEMOSTASIA
PLAQUETAS
INMUNIDAD
Stago

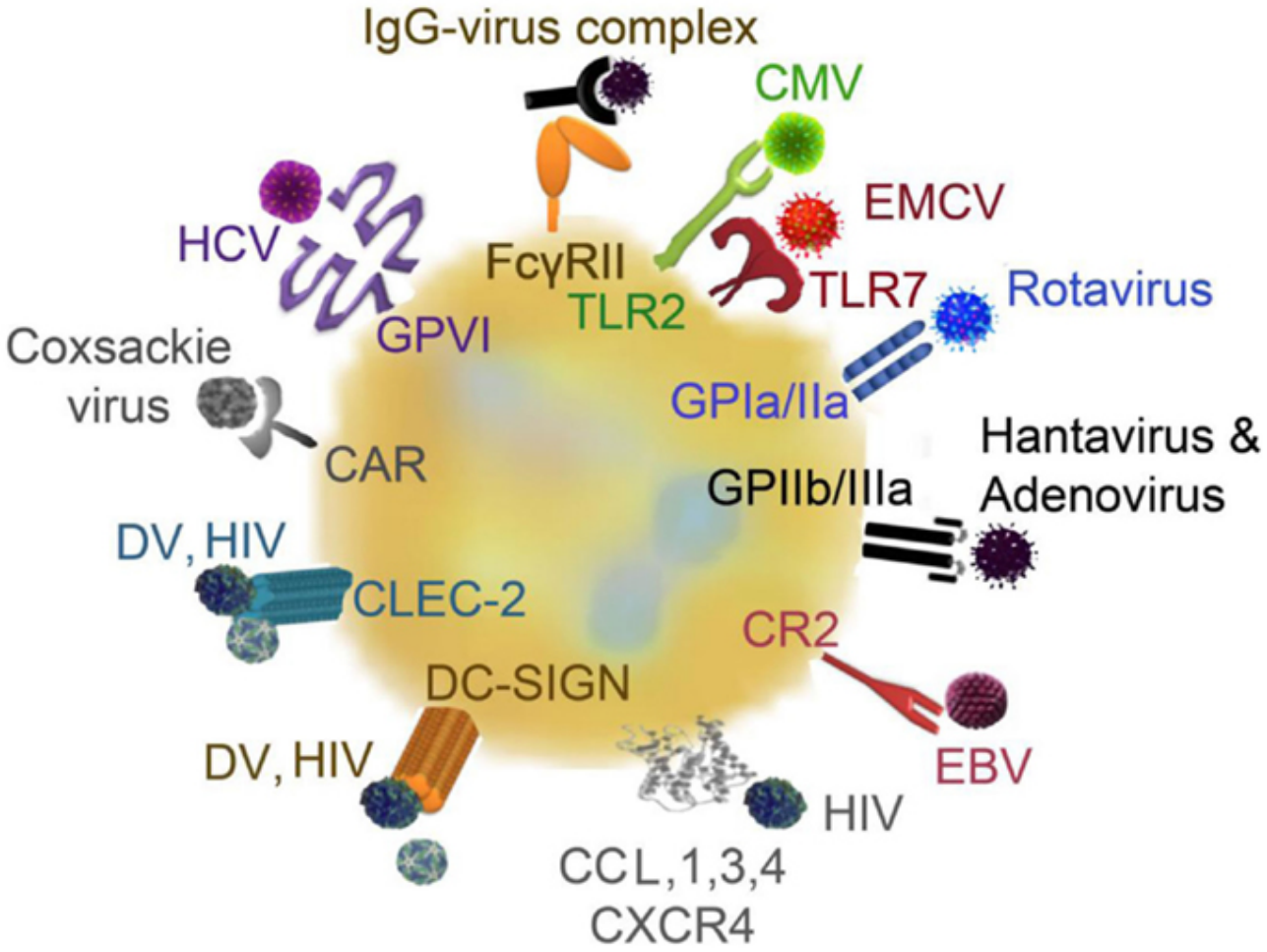
Las Plaquetas



- Son pequeñas (células) (3µm) anucleadas, pero con una elevada complejidad estructural y bioquímica.
- Vida media 7-10 días y están en la sangre a una concentración de 150-450x10^3/µL.
- Aproximadamente un 10% de las plaquetas se renuevan diariamente (±100.000.000.000!!!)
- Estudios de proteómica (U Lewandrowsky 2009) demuestran la presencia en plaquetas de1282 proteínas.

Stago

Las plaquetas son capaces de unir virus



frontiers in IMMUNOLOGY

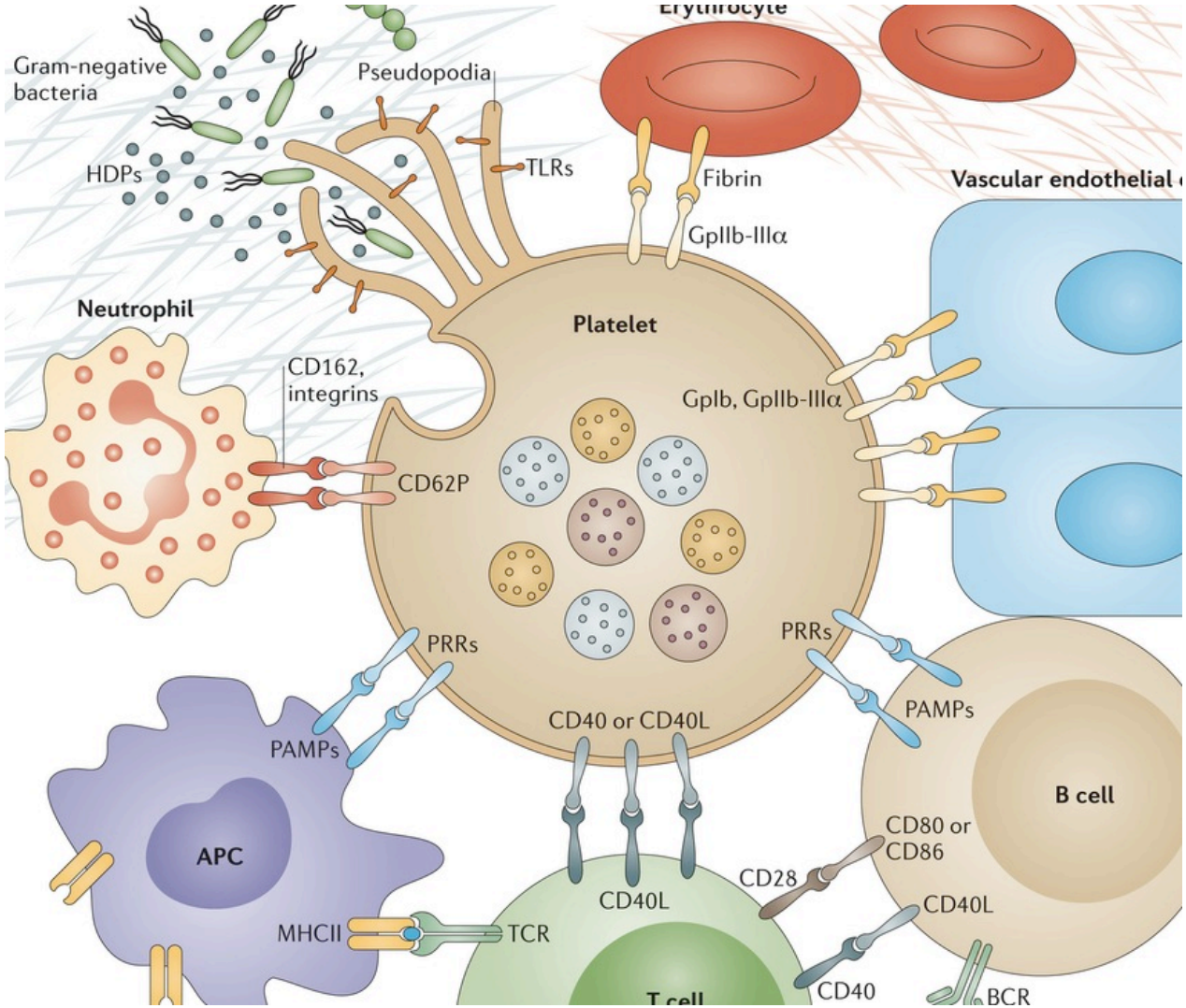
REVIEW ARTICLE
published: 19 December 2014
doi: 10.3389/fimmu.2014.00649

Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection

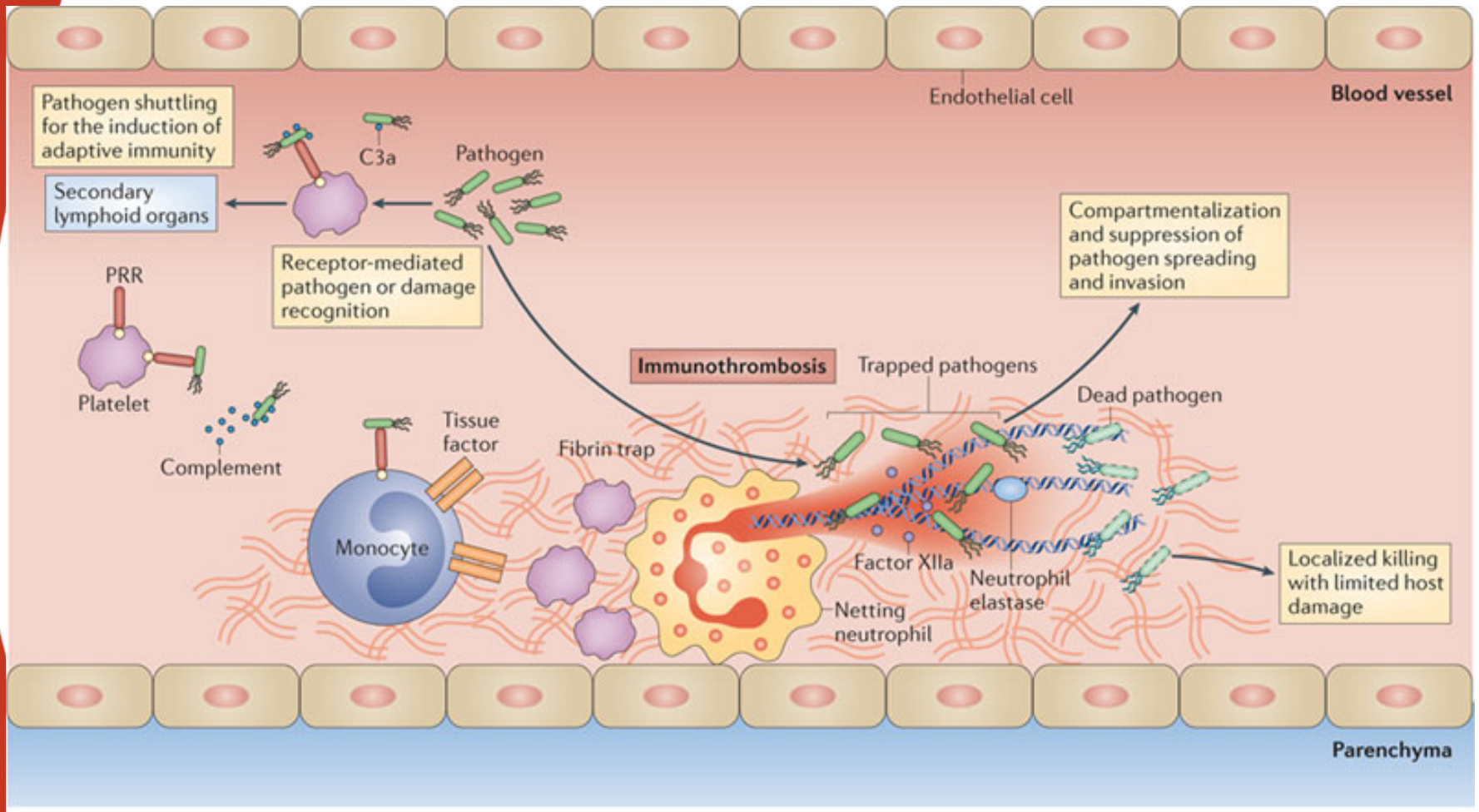
Alice Assinger[1,2]*

Stago

……favoreciendo la activación plaquetaria y su unión a otras células.



Inmunotrombosis, un nuevo concepto



Nature Reviews | Immunology

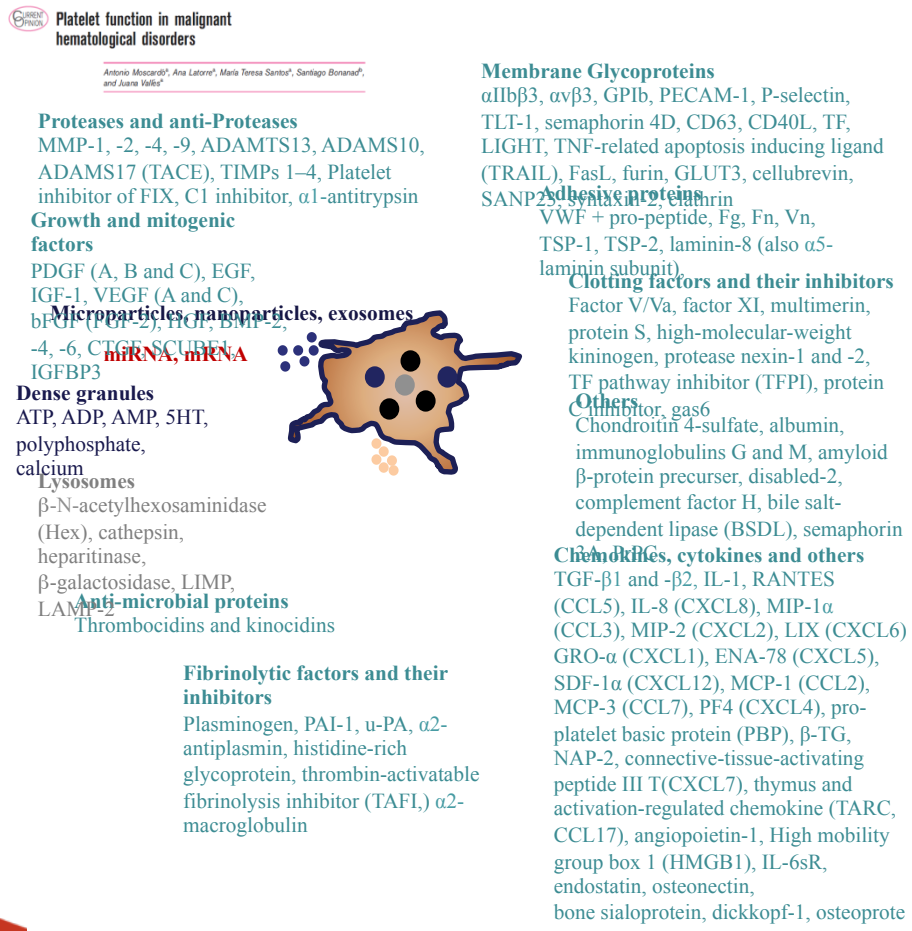
Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity
Bernd Engelmann & Steffen Massberg
Nature Reviews Immunology **13**, 34-45 (January 2013)

Stago

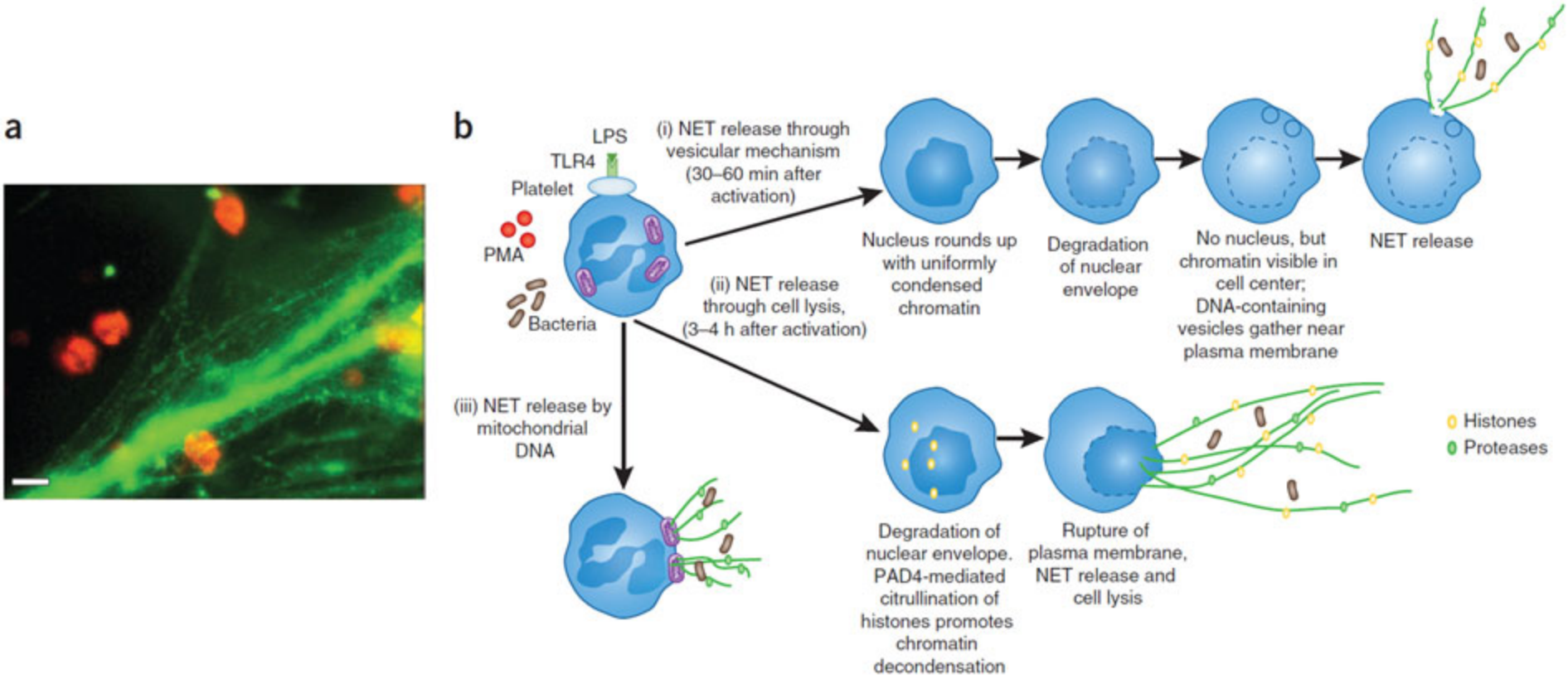
Plaquetas e inflamación

La liberación de sustancias por las plaquetas le permite participar en el proceso inflamatorio, pero también en la inmunidad y el progreso y desarrollo tumoral

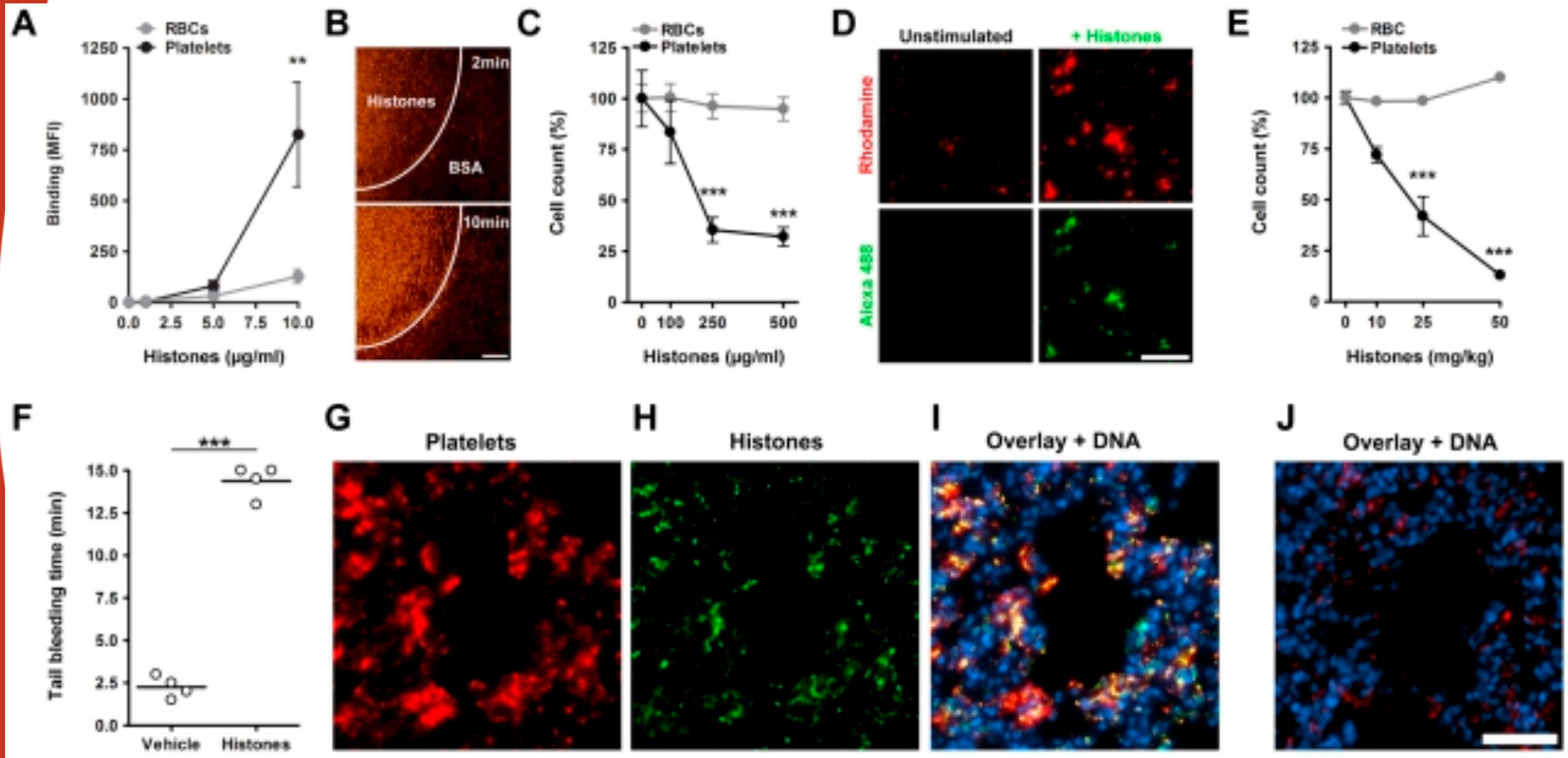
Los mecanismos de liberación de sustancias por las plaquetas son complejos, y no se conoce bien su nivel de especificidad frente al estímulo



The neutrophil in vascular inflammation
Mia Phillipson & Paul Kubes
Nature Medicine 17, 1381–1390 (2011)



Las histonas presentes en los NETs activan a las plaquetas



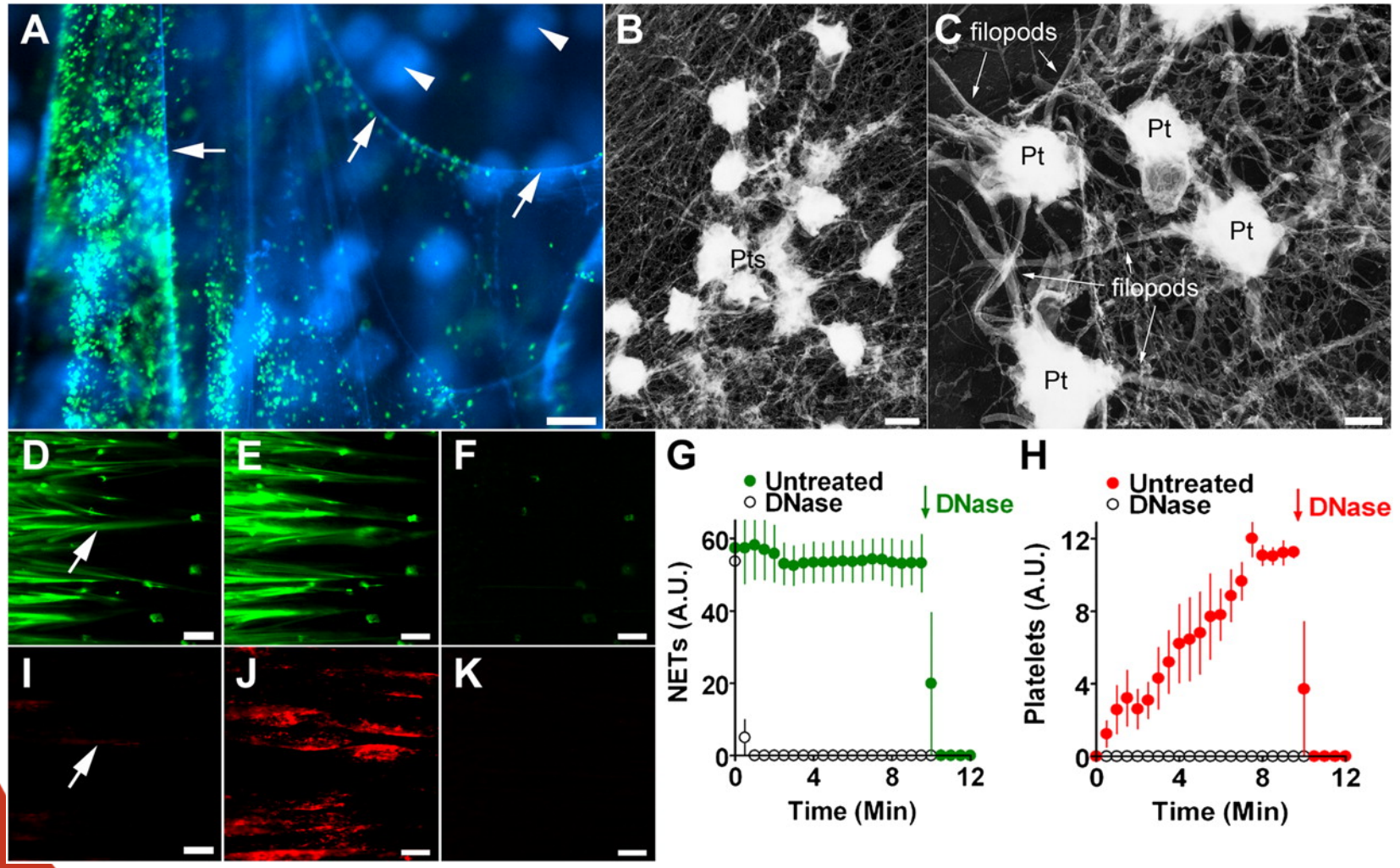
Blood. 2011 Sep 29;118(13):3708-14.

Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice

Fuchs TA, Bhandari AA, Wagner DD.

Stago

Los NETs proporcionan una estructura para la adhesión y activación plaquetaria



Fuchs T A et al. PNAS 2010;107:15880-15885

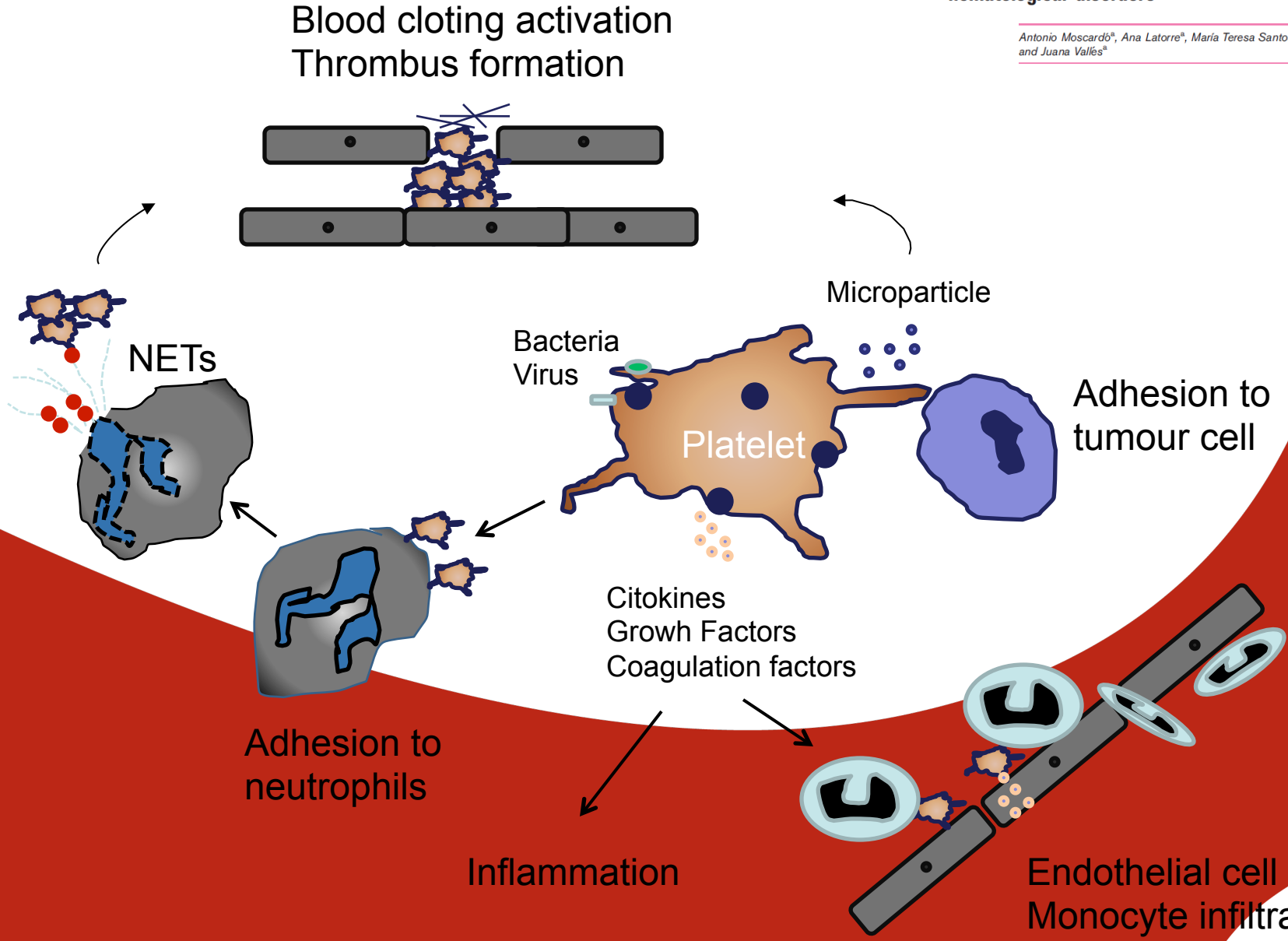
©2010 by National Academy of Sciences

La interacción de las plaquetas con los neutrófilos es un elemento clave en la formación de los NETs

A través de la formación de NETs interactúan los procesos trombóticos, inflamatorios e inmunes

Current Opinion
Platelet function in malignant hematological disorders

Antonio Moscardó[a], Ana Latorre[a], María Teresa Santos[a], Santiago Bonanad[b], and Juana Vallés[a]



Stago

• Las plaquetas son células complejas, con participación en múltiples procesos fisiopatológicos

• Aunque es evidente que el número de plaquetas es clínicamente relevante, no podemos olvidar que las plaquetas también tienen una "calidad", y en muchas ocasiones va a ser esta función la que realmente se relacione con complicaciones hemorrágicas o trombóticas.

• Un mayor conocimiento de la bioquímica plaquetaria permitirá el desarrollo de nuevas técnicas para la monitorización de la función plaquetaria.

• Tanto la detección de un defecto plaquetario como la monitorización de los fármacos antiplaquetarios puede exigir el empleo simultáneo de varias técnicas para obtener una visión global de la función plaquetaria.

• Necesitamos alcanzar una mayor estandarización y protocolización en el empleo de las diversas técnicas.

• **Necesitamos nuevas técnicas para estudiar las nuevas funciones de las plaquetas!!**

Stago

En el corazón de la hemostasia

Stago