

Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria

J. RIVERA, L. NAVARRO-NÚÑEZ, M.^aL. LOZANO, C. MARTÍNEZ, J. CORRAL,
R. GONZÁLEZ CONEJERO, V. VICENTE

Centro Regional de Hemodonación. Unidad de Hematología y Oncología Clínica. Universidad de Murcia

Introducción

Las plaquetas tienen un papel principal en la hemostasia¹. Su participación comienza con su adhesión a la matriz subendotelial, continúa con su extensión, activación y agregación sobre la zona de lesión, y finaliza proporcionando una superficie celular óptima que activa la coagulación y favorece la formación de un trombo estable que evita la hemorragia y facilita la reparación del vaso. Así, la disminución severa del número de plaquetas o su hipofunción congénita o adquirida facilita la hemorragia.

Por otra parte, se ha demostrado que las plaquetas también desempeñan un papel preponderante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares más comunes, incluyendo los síndromes coronarios agudos, el infarto cerebral, la enfermedad vascular periférica y la diabetes mellitus². Por ello, la terapia antiplaquetaria es una herramienta básica en la prevención y tratamiento de la patología aterotrombótica, la primera causa de muerte en la sociedad occidental.

La importancia de las funciones que desempeñan las plaquetas justifica que, desde su identificación por Bizzozero, haya existido un interés creciente en el desarrollo de pruebas de laboratorio que permitan valorar su funcionalidad. Puesto que estas funciones son muy diversas, complejas y están influidas por múltiples variables, es muy difícil que una sola prueba sea capaz por sí misma de informar de todas las potenciales disfunciones de las plaquetas. Nuestro objetivo es hacer una breve revisión de estos ensayos de función plaquetaria y su potencial utilidad en distintos contextos.

Métodos de análisis de la función plaquetaria: ensayos clásicos y nuevas técnicas

La batería de pruebas de función plaquetaria es actualmente amplia y diversa (Tabla 1).

Ensayos clásicos

Tiempo de hemorragia

El tiempo de hemorragia (TH), desarrollado por Duke en 1910 y modificado por Ivy, es el ensayo más anti-

guo usado para la valoración de la función de las plaquetas³. El TH es un ensayo simple que evalúa *in vivo* el funcionamiento global de la hemostasia primaria, en la que participan las plaquetas y otras células sanguíneas y componentes de la pared vascular. Consiste en medir el tiempo que tarda en detenerse la hemorragia después de realizar una pequeña incisión en la cara anterior del antebrazo. La variabilidad depende de la forma de realizar la incisión disminuye con la aplicación de un sistema estándar equipado con dos pequeñas cuchillas estériles y desechables (Simplat II®, Organon Technika Co.). EL TH normal oscila entre 2 y 10 minutos, y se prolonga hasta más de 30 minutos en pacientes con defectos plaquetarios o con enfermedad de von Willebrand (EvW) severa. En pacientes con trastornos moderados, el TH es muy variable, puede ser normal hasta en un 50% de ellos, e incluso variar considerablemente de un día a otro en el mismo paciente.

En la década de los setenta se extendió el uso del TH en el ámbito de la cirugía, a raíz de los estudios de Harker⁴, mostrando que el TH se correlaciona con la cifra de plaquetas y con la tendencia hemorrágica en pacientes con trombocitopenia inmune y en enfermos urémicos. Sin embargo, la revisión de su utilización puso de manifiesto sus limitaciones técnicas, pobre reproducibilidad, carácter invasivo y escasa sensibilidad. A finales de los noventa se retiró la recomendación de su empleo para predecir la hemorragia quirúrgica, sin que esto se haya traducido en un aumento de las complicaciones hemorrágicas en cirugía, del número de transfusiones, o en un cambio relevante en la práctica clínica^{5,6}.

A pesar de sus limitaciones metodológicas y de no tener valor pronóstico en el ámbito quirúrgico, el TH ofrece una valoración global de la hemostasia primaria. En la investigación sobre su utilidad potencial aún hay aspectos por aclarar, como por ejemplo si la forma de realizarlo (antebrazo u otra localización, con o sin presión en el antebrazo) modifica su capacidad de predecir la hemorragia al menos en ciertos grupos de pacientes, o qué características de las plaquetas (contenido granular, proteínas plaquetarias, polimorfismos en receptores plaquetarios) influyen de forma relevante en el TH y pueden explicar en parte su variabilidad interindividual³. Por ello, quizá es prematuro desechar completamente su utilización.

Tabla 1. Pruebas de función plaquetaria

Prueba	Aspecto valorado	Ventajas	Desventajas
Tiempo de hemorragia	Duración de hemorragia <i>in vivo</i> tras incisión estándar	Prueba de hemostasia fisiológica	Poco reproducible, insensible, invasivo
Agregación en plasma rico en plaquetas (PRP)	Agregación entre plaquetas valorada por cambio de transmisión de luz del PRP tras activación con agonistas y a bajo flujo	Muy versátil (agonistas/dosis) Es el método de referencia Diagnóstico	Laborioso, caro, personal cualificado Exige alto volumen de sangre y manipulación previa Respuesta plaquetaria en condiciones no fisiológicas No válido si hay trombopenia intensa
Agregación en sangre total (ST)	Agregación entre plaquetas valorada por cambio de impedancia en ST tras adición de agonistas	Versátil Menos volumen de ST y sin manipulación	Limpieza de electrocitos (no en los nuevos equipos) Menos sensible que agregación estándar en PRP No detecta la segunda onda
Lumiagregometría (PRP o ST)	Agregación entre plaquetas (cambio de transmisión de luz si PRP o impedancia si ST) y liberación de ATP/ADP por aumento de luminiscencia	Informativo de agregación y secreción granular	Las mismas de la agregación
Ensayos bioquímicos de proteínas de activación	Concentración de proteínas granulares en suero, o plasma (basal o tras activación plaquetaria) (PF4, β -TG, sCD40L, etc.) medida por ELISA/RIA	Cuantitativos y sensibles Ensayos comerciales muy estandarizados	Requieren una estricta obtención y manipulación de las muestras; laboriosos y caros
Ensayos bioquímicos de metabolitos de ácido araquidónico	Concentración de TxB2 o 11-dehidro-TxB2 en plasma, suero u orina, medida por ELISA/RIA	Cuantitativo y sensible Ensayos comerciales estandarizados (AspirinWorks®) Método de referencia para efecto de aspirina	Requieren una estricta obtención y manipulación de las muestras (sobre todo si PRP estimulado); largos y caros; alta influencia de función renal (11-d-TxB2)
Unión con ligandos radiactivos	Unión específica de ligandos radiactivos (anticuerpos, proteínas adhesivas, agonistas) a receptores	Cuantitativos y muy sensibles	Muy laborioso y caro; personal e instalaciones autorizadas para uso de radiactividad
Citometría de flujo	Unión de ligandos marcados con fluorocromos a plaquetas, usando un citómetro de flujo; cuantificación de agregados entre plaquetas o entre plaquetas y leucocitos	Poco volumen de muestra (ST, PRP, o plaquetas lavadas); muy versátil (identificación de receptores; marcadores de activación, agregados celulares, micropartículas, etc.); uso cada vez más extendido	Personal cualificado; reactivos caros; los citómetros son equipos caros y delicados
Análisis genómico	Identificación de alteraciones moleculares en genes que codifican proteínas plaquetarias	Requieren poco volumen de ST; es posible el envío a otros laboratorios; muy sensibles; diagnósticos	Personal cualificado; equipos caros y delicados No excluyen la demostración de alteración funcional

Agregación plaquetaria

El estudio de la agregación plaquetaria es el método de referencia y el más usado en la identificación y diagnóstico de la disfunción plaquetaria^{7,8}. El ensayo clásico, desarrollado de forma independiente por Born y O'Brien a principios de los años sesenta, se basa en medir el aumento en la transmisión de luz a través de una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP) mantenido en agitación, tras inducir la agregación con un agonista (ADP, colágeno, epinefrina, etc.). El PRP del paciente es la muestra más opaca (0% de transmisión de luz o 0% de agregación) y su plasma pobre en plaquetas (PPP) la máxima transparencia alcanzable (100% de agregación). El patrón de agregación más clásico es bifásico, con una primera onda que corres-

ponde a la respuesta primaria al agonista añadido, y una segunda onda en la que intervienen los agonistas producidos y/o secretados de los gránulos *in situ* por las propias plaquetas. Esta respuesta bifásica puede quedar enmascarada cuando se usan concentraciones muy altas de agonistas que inducen respuestas primarias muy intensas. Además de la amplitud de la agregación (porcentaje de agregación máxima), otros parámetros como el tiempo de inicio, o *lag time*, y la pendiente o velocidad de agregación también son característicos de la respuesta plaquetaria a cada agonista. Su valoración también puede informar de alteraciones funcionales específicas.

La gran ventaja de la agregación plaquetaria es su flexibilidad en cuanto a los agonistas y concentraciones posibles, lo que nos permite obtener información

Tabla 1. Pruebas de función plaquetaria (cont.)

Prueba	Aspecto valorado	Ventajas	Desventajas
Plateletworks®-ICHOR	Disminución del recuento de plaquetas tras la activación con agonistas	Simple y rápido; poco volumen de ST; ensayo comercial disponible; posible en laboratorios clínicos	Método indirecto, depende de la respuesta de agregación
PFA-100®	Tiempo de formación de un trombo oclusivo sobre membrana trombogénica en condiciones de alto flujo	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos Amplia experiencia de uso	Inflexible; caro; muy dependiente de hematocrito, FW y recuento plaquetas; no específico, insensible a deficiencias moderadas
VerifyNow®	Agregación de plaquetas sobre bolas cargadas con fibrinógeno, en respuesta a agonistas	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos Licencia FDA para monitorización de antiagregantes	Inflexible; caro; no específico; limitada experiencia
Impact®	Adhesión y agregación a alto flujo sobre superficie trombogénica	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos Versátil (varios modelos)	En vías de comercialización; limitada experiencia
Gorog Thrombosis Test®	Formación de trombo y degradación fibrinolítica	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos	Requiere sangre fresca no anticoagulada; informa básicamente de la función procoagulante; limitada experiencia
Hemostasis Analysis System® (HAS)	Fuerza contráctil plaquetaria, elasticidad del trombo, generación de trombina	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos	Contempla básicamente la función procoagulante; limitada experiencia
Tromboelastografía (TEG®, ROTEM®)	Velocidad y calidad de la formación del trombo	Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos	Contempla básicamente de función procoagulante (salvo uso de agonistas); limitada experiencia de uso
Generación de trombina (Thrombinoscope®)	Incremento de fluorescencia proporcional a la generación de trombina	Simple y rápido; poco volumen de sangre total, plasma o PRP plasma; posible en laboratorios clínicos	Contempla básicamente de función procoagulante; escasa estandarización; requiere estricta manipulación de muestras; personal cualificado; limitada experiencia

relevante sobre distintos aspectos de la bioquímica y función plaquetaria. Además, el ensayo muestra una buena relación dosis-respuesta y es compatible con varios tipos de anticoagulantes (citrato, heparina, ACD-A, PPACK). Existen varios modelos de agregómetros (Aggrecoorder II de Menarini Inc., Platelet Aggregation Profiler® PAP-8E de Bio/Data Co., Chrono-Log M700 de Chrono-Log Co.) que facilitan la realización y estandarización de la técnica y que permiten el análisis simultáneo de varias muestras y el registro informatizado de los resultados. Algunos de estos equipos pueden medir al mismo tiempo transmisión de luz y luminiscencia, los llamados lumiagregómetros, y así analizan simultáneamente la agregación plaquetaria y la secreción de nucleótidos de los gránulos plaquetarios durante la segunda onda de agregación⁹.

Entre las limitaciones de la agregación plaquetaria, destaca en primer lugar que mide la respuesta plaquetaria bajo condiciones no fisiológicas, en una muestra de plaquetas aisladas de otras células sanguíneas, con una agitación moderada equivalente a una baja velocidad de turbulencia o *shear rate*, y tras la adición exógena de un(os) agonista(s) a dosis arbitrarias. Además, se trata de un procedimiento caro, laborioso y relativamente complejo que requiere personal entrenado en su realización. El volumen de sangre necesario es grande cuando se requiere ensayar múltiples agonistas y concentraciones, y su uso está

limitado en caso de trombocitopenia. Por último, distintas variables, independientes del individuo evaluado, pueden afectar la respuesta de agregación, tales como el grado de activación inducido al extraer la muestra, el tipo de anticoagulante, el tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre, la contaminación del PRP con hematíes o lípidos, el pH y la temperatura de la muestra al inicio del ensayo, y el ajuste o no de la concentración de plaquetas. El impacto de todas estas variables y la ausencia de controles de calidad validados para los distintos tipos de agregómetros existentes dificultan la reproducibilidad de la agregación plaquetaria intra- e interlaboratorios^{7,8}. Recientemente, la ISTH ha instado a la creación de un grupo de trabajo en agregación plaquetaria, con el objetivo de promover la estandarización y reproducibilidad del ensayo.

Además de la agregación plaquetaria en PRP, se han desarrollado métodos para valorar la agregación plaquetaria en sangre total anticoagulada. El más clásico emplea la tecnología de la impedancia, y se basa en medir el cambio en la resistencia o impedancia eléctrica entre dos electrodos a medida que las plaquetas, activadas con un agonista, se adhieren y agregan sobre ellos¹⁰. Esta técnica tiene las ventajas de usar una muestra más fisiológica y no manipulada, necesitar menos volumen de sangre, ser más rápida y poder combinarse también con luminiscencia para medir simultáneamente la secreción granular. Por el contra-

rio, con este método no se observan las dos ondas de agregación, y la correlación entre agregación y secreción es peor que con la agregación plaquetaria en PRP. La agregación en sangre total también puede verse influida por las variables relevantes en la agregación plaquetaria en PRP, como la extracción de la muestra, anticoagulante, tiempo postextracción de la sangre, etc. Existen comercialmente varios modelos de instrumentos para medir la agregación plaquetaria en sangre total, multicanal, computerizados, y con cubetas/electrodos desechables y preparados para distintos agonistas y aplicaciones diagnósticas o de monitorización de antiagregación (Multiplate® Dynabyte Medical de Hart Biologicals).

Otra forma de valorar la agregación plaquetaria en sangre totales mediante la comparación del recuento plaquetario en la sangre anticoagulada antes y después de la adición de un agonista. La agregación inducida por el agonista provocará una disminución proporcional en la cifra de plaquetas, que podemos medir con contadores celulares automáticos o mediante citometría de flujo¹¹. Se han comercializado ensayos (Plateletworks® e Ichor Full Blood Counter, Helena Biosciences) para valorar de forma rápida la agregación plaquetaria en sangre total, basados en la diferencia de recuento entre una muestra de sangre recogida en EDTA y otra recogida en citrato y activada con ADP o colágeno.

Ensayos bioquímicos

Además del TH y de la agregación, clásicamente se han usado varios ensayos bioquímicos para estudiar distintos aspectos de la función plaquetaria¹². Así, la activación y secreción se puede valorar con inmunoensayos, ELISA o RIA, que miden la concentración de proteínas granulares (β -tromboglobulina, factor plaquetario 4 [PF4], factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF]) en el sobrenadante de las plaquetas estimuladas. La secreción granular puede también valorarse usando plaquetas cargadas con ¹⁴C-serotonina antes de la estimulación con los agonistas¹³. Este ensayo de liberación de serotonina sigue siendo de referencia en el diagnóstico de patologías como la trombocitopenia inducida por heparina, causada por anticuerpos que en presencia de heparina provocan la activación y agregación de las plaquetas vía PF4. Otros métodos bioquímicos clásicos son los ensayos de unión con ligandos plaquetarios (ADP, trombina, factor de von Willebrand [FvW], fibrinógeno, colágeno) marcados radiactivamente (¹²⁵I, ³H, ¹⁴C), que permiten la cuantificación de los receptores de estos ligandos en la superficie plaquetaria¹². Finalmente, la medida por RIA o ELISA de los niveles de segundos mensajeros proagregantes como el tromboxano A₂ o inhibidores de la agregación como el AMPc ayuda a

conocer el estado de activación de las plaquetas y el funcionamiento de estas vías enzimáticas clave para el proceso de la activación plaquetaria¹². La medida de la síntesis de tromboxano A₂ durante la coagulación de una muestra de sangre o en PRP tras la activación con un agonista es generalmente considerada el método de referencia para verificar el efecto de la aspirina.

Microscopia electrónica

La microscopia electrónica ha sido una herramienta de gran utilidad para el conocimiento básico de la morfología, estructura y bioquímica plaquetaria, así como de los cambios que experimentan las plaquetas durante su activación. Igualmente, esta metodología tiene valor en el estudio de pacientes con defectos o características congénitas o adquiridas que afectan la ultraestructura plaquetaria o el número o contenido granular¹⁴. Generalmente, los protocolos de microscopia electrónica de plaquetas son laboriosos y complejos y en ellos se usan secciones finas de plaquetas fijadas en las que se pueden ver la mayoría de los orgánulos y elementos estructurales. No obstante, algunos orgánulos como los gránulos densos se pueden distinguir con facilidad usando preparaciones no fijadas ni teñidas, lo que simplifica el procedimiento y facilita su uso para el estudio de pacientes con sospecha de deficiencias en este tipo de gránulos¹⁴. En los últimos años ha habido un gran avance en microscopia y análisis de imagen, y se han desarrollado sistemas que permiten visualizar en tiempo real la formación de un trombo *in vivo*. Con ellos, se está empezando a conocer mejor la dinámica de la interacción de las plaquetas con otras células y con el sistema de coagulación durante la formación del trombo¹⁵.

Citometría de flujo

La introducción de la citometría de flujo ha sido inequívocamente uno de los mayores avances en el estudio de las plaquetas¹⁶. El citómetro de flujo analiza a gran velocidad las características de tamaño y dispersión de luz de cada tipo celular, así como de la intensidad de fluorescencia que emiten las células problema tras su incubación con anticuerpos u otros ligandos marcados con fluorocromos. En los protocolos aplicados al estudio de plaquetas que usan PRP o plaquetas lavadas persiste el riesgo de activación artificial durante la manipulación de las muestras. Sin embargo, en los ensayos actuales se usa mayoritariamente sangre total anticoagulada, con citrato u otros anticoagulantes compatibles según el parámetro a evaluar, y diluida para minimizar la formación de agregados. La sangre se incuba simultáneamente con dos anticuerpos marcados con fluorocromos dis-

tintos, lo que permite seleccionar específicamente la población de plaquetas e identificar aquellas positivas para el parámetro evaluado. El análisis de imagen y numérico se realiza de forma rápida con programas específicos.

En los últimos años, la mayor disponibilidad comercial de reactivos, incluso en formato de *kits* comerciales con todos los componentes necesarios, hace de la citometría de flujo una metodología muy versátil para el estudio de las plaquetas y su uso se ha extendido mucho con múltiples fines¹⁷. Su principal limitación es que sigue siendo un procedimiento caro, laborioso y que requiere experiencia para minimizar la variabilidad intra- e interlaboratorios.

Nuevos métodos automatizados

La mayoría de ensayos de función de las plaquetas comentados arriba presentan el inconveniente de ser laboriosos y complejos, poco reproducibles y requieren personal cualificado. Por ello, su uso se restringe a laboratorios especializados y son difíciles de aplicar al estudio de todos los pacientes con sospecha de alteraciones plaquetarias congénitas o adquiridas, o con el objetivo de monitorizar la eficacia de la terapia antiagregante. Como alternativa a esos métodos, en los últimos veinte años se han desarrollado nuevos ensayos con equipos compactos que intentan reproducir *in vitro* la respuesta hemostática y pueden ser realizados de una forma rápida, con un volumen de sangre pequeño y sin una alta especialización de los operadores^{18,19}. El valor de estas nuevas herramientas tanto en estudios básicos plaquetarios como para el diagnóstico y manejo de pacientes en distintas situaciones clínicas está siendo objeto de intensa investigación. En la Tabla 1 se listan estos nuevos ensayos, algunos de los cuales se comentan brevemente a continuación.

PFA-100

El analizador de función plaquetaria (PFA-100®, Dade-Behring) valora automáticamente la adhesión y agregación plaquetaria inducida simultáneamente por una alta velocidad de flujo y por una mezcla de colágeno con ADP o con epinefrina²⁰. Esencialmente, una muestra de sangre (0,8 mL) anticoagulada con citrato se dispensa en el reservorio de un cartucho desechable que contiene un capilar dirigido hacia una membrana con un orificio de 150 µm de diámetro. La membrana está recubierta de colágeno y ADP (col-ADP) o con colágeno y epinefrina (col-Epi). Al iniciar el ensayo, un vacío constante (40 mbar) hace que la sangre circule a alto flujo (4000-6000 s⁻¹) por el capilar hasta atravesar el orificio de la membrana del cartu-

cho. El alto flujo, que *per se* induce activación, la presencia de colágeno, que promueve la adhesión de las plaquetas vía GP Ib/IX y la activación inducida por el ADP/epinefrina de la membrana y por los componentes intraplaquetarios liberados *in situ* provocan la formación de un trombo plaquetario que termina por impedir el flujo de sangre a través del orificio. Así, la respuesta hemostática se expresa como el tiempo necesario para obstruir el flujo (TO). Algunos autores han propuesto para el TO la definición de TH *in vitro*. Conceptualmente, TO muy largos estarían asociados a hipofunción plaquetaria y tiempos muy cortos a hiperreactividad. El equipo está diseñado para cuantificar sólo TO inferiores a 300 s; superado este tiempo el ensayo se corta automáticamente y el resultado se expresa como TO > 300 s. Otros parámetros del ensayo son la velocidad y volumen máximo de sangre que atraviesa la membrana.

El PFA-100 ofrece simplicidad y rapidez, escaso requerimiento de sangre y la valoración de la respuesta hemostática bajo condiciones de alto flujo. Por el contrario, es un equipo inflexible (sólo dos tipos de cartuchos), de limitada sensibilidad frente a trastornos leves por la intensa activación que induce, y con una pobre especificidad. Se ha demostrado que múltiples variables, aparte de la función plaquetaria intrínseca, pueden afectar sensiblemente el resultado del PFA-100, en particular, la cifra de plaquetas, el hematocrito y el contenido de FvW en la muestra de sangre. Así, un TO normal con ambos cartuchos prácticamente excluye la existencia de un trastorno severo de la hemostasia primaria pero no descarta un trastorno moderado. Un TO anormal no es diagnóstico y requiere confirmación con otras pruebas^{21,22}. A pesar de la gran cantidad de estudios realizados en los últimos años con el PFA-100, sigue siendo muy controvertida la fiabilidad de esta prueba en el diagnóstico de pacientes con alteraciones de función plaquetaria, especialmente si son moderadas, y para predecir complicaciones trombóticas o hemorrágicas en pacientes de riesgo, en particular aquellos con tratamiento antiagregante. Las recomendaciones más recientes consideran el PFA-100 como un ensayo opcional en la evaluación rutinaria de la disfunción plaquetaria²².

VerifyNow®

El sistema VerifyNow®, denominado hasta hace poco Ultegra-RPFA® (Accumetrics Inc.), se basa en el mismo principio que la agregación plaquetaria, es decir, la medida del cambio en la turbidez o la transmisión de luz a través de una muestra de sangre como consecuencia de la formación de agregados de plaquetas inducida con un agonista²³. Sus grandes ventajas frente a la agregación plaquetaria son el uso de un peque-

ño volumen de sangre total anticoagulada, simplicidad, completa automatización del ensayo y rapidez. Básicamente, el sistema es un fotómetro compacto automático en el que se insertan unos cartuchos de plástico con muestras de sangre. Estos cartuchos incluyen bolas recubiertas de fibrinógeno que sirven de soporte de la agregación, y un agonista plaquetario que varía según el tipo de prueba. Iniciado el ensayo, el detector mide automáticamente (16 veces) la transmisión de luz a través de la muestra, y calcula la velocidad de aglutinación en función de la pendiente de cambio de la absorbancia. El resultado se imprime automáticamente expresado en unidades arbitrarias de respuesta al agonista.

El diseño de este sistema se ha enfocado particularmente a la monitorización de la terapia antiagregante, y ha sido aprobado por la FDA para esta aplicación. Hasta la fecha se han comercializado tres modalidades de ensayo: a) VerifyNow® I Ib/IIIa, dirigido a la monitorización de la terapia con antagonistas de GP I Ib/IIIa; b) VerifyNow Aspirin® para valorar el efecto de la aspirina; c) VerifyNow P2Y₁₂® para el control del tratamiento con antagonistas del receptor de ADP denominado P2Y₁₂. Los estudios comparativos en sujetos sanos y pacientes en tratamiento antiagregante han encontrado una buena correlación del ensayo VerifyNow® (Aspirin y I Ib/IIIa) con la agregación plaquetaria o los ensayos de unión de ligandos radiactivos a GP I Ib/IIIa. La utilidad potencial de este ensayo en contextos distintos a la terapia antiagregante (diagnóstico de pacientes con defectos plaquetarios, predicción de hemorragia, etc.) está por evaluar²³.

Impact®: analizador de cono y placa

El Impact® (DiaMed), nueva versión del antiguo viscosímetro de cono, es otro equipo compacto y automatizado que intenta reproducir la hemostasia midiendo la adhesión y agregación plaquetaria bajo condiciones de alto flujo (1800 s⁻¹)²⁴. En este caso, una pequeña muestra de sangre anticoagulada (130 µL) se dispensa en una placa de poliestireno (en la versión previa recubierta de colágeno o matriz extracelular). En la placa se coloca entonces un cono que se hace girar a gran velocidad generando un alto flujo que induce la adhesión y agregación de las plaquetas a la superficie trombogénica de la placa. El instrumento dispone de un microscopio y realiza de forma automática la tinción y análisis de imagen de las plaquetas adheridas y agregadas. Los resultados, obtenidos en sólo 6 minutos, se expresan como superficie media cubierta y tamaño medio de los trombos formados. Existe una versión modificada del equipo, Impact®, que permite la modificación de la velocidad de flujo y que está concebida para valorar la agrega-

ción plaquetaria inducida por agonistas. En esta versión la sangre problema se preincuba con dosis bajas de agonistas (ADP 0,75 µM, TRAP 5 µM, o ácido araquidónico 0,275 mM; 1 minuto con suave agitación), lo que induce trombocitopenia en la muestra por la formación de microagregados. La sangre se ensaya entonces con Impact® y el resultado se compara con el obtenido en paralelo en otra muestra no tratada con el agonista. La activación con esas dosis bajas de agonista induce una disminución significativa y transitoria en la adhesión de las plaquetas a la superficie trombogénica de la placa.

En el ensayo Impact®, la adhesión es dependiente del hematocrito y del recuento plaquetario, con disminuciones significativas por debajo de valores del 30% y de 25·10⁹/L, respectivamente²⁴. Asimismo, la reducida adhesión observada con muestras de sangre de pacientes con trombastenia de Glanzmann (TG), con afibrinogenemia, y con EvW tipo III, pone de manifiesto la relevancia que tiene en este ensayo la inmovilización de fibrinógeno y FvW en la placa, y la interacción de estas proteínas con sus receptores GP I Ib/IIIa y GP Ib/IX.

Otros ensayos

Además de los comentados arriba, durante los últimos años se han desarrollado otros equipos y ensayos, la mayoría de ellos usados sólo con fines de investigación básica (Tabla 1). El Gorog Thrombosis Test® es un equipo multicanal que realiza una valoración conjunta de la función plaquetaria y la trombosis bajo condiciones de alto flujo²⁵. La participación de las plaquetas en la generación de trombina se puede valorar ahora mediante fluorimetría usando sustratos fluorescentes de trombina y *software* específicos²⁶. La tromboelastografía es una vieja técnica de valoración de la formación del trombo, incorporada recientemente en equipos automatizados (TEG®, ROTEM® Gamma). Tradicionalmente usada en el ámbito quirúrgico como marcador del riesgo de hemorragia, la aplicación en tromboelastografía de activadores plaquetarios que inducen agregación más que coagulación (Thrombelastograph Platelet Mapping System® que usa ADP y ácido araquidónico) amplía la potencial utilidad de estos equipos en la valoración de la terapia antiagregante^{19,27}. Por último, el Hemostasis Analysis System® (HAS) es un equipo que mide, tras inducir la coagulación de una muestra de sangre con calcio u otros agentes, la fuerza generada por las plaquetas en la retracción del coágulo, la elasticidad del coágulo y el tiempo de generación de trombina. El ensayo HAS ofrece así una valoración global de la hemostasia y puede ser potencialmente útil para monitorizar terapias procoagulantes y anticoagulantes¹⁸.

Tabla 2. Aplicaciones clínicas potenciales de las pruebas de función plaquetaria

Identificación y diagnóstico de disfunción plaquetaria congénita (TG, SBS, <i>storage pool disease</i> , etc.)
Caracterización de disfunción plaquetaria adquirida (uremia, síndromes mieloproliferativos, leucemia aguda y síndromes mielodisplásicos, <i>bypass</i> cardiopulmonar, cirrosis, consumo de drogas, etc.)
Identificación de alteraciones de FvW (EvW) y fibrinógeno (afibrinogenemias)
Identificación de pacientes de alto riesgo de hemorragia quirúrgica; requerimientos transfusionales en pacientes quirúrgicos
Detección de estados de hiperactivación plaquetaria (adquirida o congénita) asociados a mayor riesgo trombótico
Monitorización de terapia antiagregante estándar (aspirina; antagonistas de GP IIb/IIIa; antagonistas de receptores de ADP; etc.)
Evaluación de nuevos fármacos antiplaquetarios/antitrombóticos
Monitorización de terapia pro-hemostática estándar (desmopresina, concentrados de FvW, rFVII)
Evaluación de nuevos fármacos pro-hemostáticos
Valoración de donantes de plaquetas
Valoración de requerimientos de transfusión de plaquetas en pacientes trombopénicos; valoración de eficacia transfusional
Control de calidad de concentrados de plaquetas estándar
Evaluación de nuevos productos plaquetarios

Utilidad clínica de los métodos de análisis de la función plaquetaria

Tradicionalmente, las pruebas de función plaquetaria han tenido como objetivo primario el diagnóstico de pacientes con disfunción de la hemostasia primaria, que manifiestan tendencia o mayor riesgo de hemorragia. Adicionalmente, existe en la actualidad un interés creciente en el uso de estas pruebas para la identificación precoz de pacientes con alto riesgo trombótico por una hiperreactividad plaquetaria sostenida. El interés se extiende a que estos ensayos también pueden ser aplicables a la monitorización de la terapia antiplaquetaria (aspirina, clopidogrel, anti-GP IIb/IIIa), y de los tratamientos prohemostáticos (desmopresina [DDAVP], FvW, etc.). En el ámbito de la medicina transfusional se pueden emplear en la valoración de donantes de plaquetas, para el control de calidad *in vitro* de productos plaquetarios (estándar o nuevos productos plaquetarios) y para la indicación y valoración de la transfusión de plaquetas en pacientes trombopénicos. A continuación, comentaremos brevemente estas aplicaciones de las pruebas de función plaquetaria (Tabla 2).

Identificación y diagnóstico de pacientes con anomalías de hemostasia primaria

Como para cualquier otra patología, la investigación de un trastorno hemorrágico conlleva la realización rigurosa de la historia clínica y el examen físico del

enfermo. Las características clínicas observadas son clave para diferenciar un desorden de la hemostasia primaria (trombocitopenia, disfunción plaquetaria, EvW) de un trastorno de la coagulación (p. ej., hemofilia)²⁸. En particular, la presencia de petequias y de hemorragia espontánea, excesivo e inmediato en situaciones de riesgo (lesión, cirugía, intervención dental, parto, etc.) son signos indicativos de disfunción de la hemostasia primaria. Por el contrario, hemartrosis, hematomas intramusculares y una hemorragia retrasado ante maniobras de riesgo apunta hacia un trastorno de la coagulación. El siguiente nivel es la realización del panel básico de pruebas de laboratorio que ayudan a discriminar ambos tipos de alteraciones. Este panel incluye a) hemograma y en su caso extensión de sangre para confirmar la trombocitopenia o la alteración morfológica de las plaquetas; b) pruebas de coagulación (APTT, PT y TT), que informan sobre posibles trastornos de la coagulación a investigar con ensayos más específicos, y c) análisis del FvW realizando el FVIII coagulante, FvW antigénico y cofactor de ristocetina, puesto que la EvW es la alteración de la hemostasia primaria más frecuente y su sintomatología es muy similar a la de los trastornos plaquetarios²⁸.

El TH ha sido hasta los años noventa una prueba muy empleada en el estudio de pacientes con sospecha de anomalías en la hemostasia primaria³. Sin embargo, incluso realizado bajo condiciones controladas, su variabilidad es muy considerable y su sensibilidad pobre. El TH puede ser normal hasta en un 50% de los pacientes con EvW o con defectos pla-

quetarios de secreción³. Su sensibilidad en pacientes en hemodiálisis ronda el 20%, y en pacientes con historia de hemorragia mucocutáneo personal y familiares del 30%²⁹.

Como hemos mencionado arriba, algunos nuevos instrumentos automatizados se asemejan *in vitro* al TH, entre ellos los equipos PFA-100 e Impact. En la mayoría de estudios realizados, el ensayo PFA-100 ofrece una alta sensibilidad, alrededor del 80%, en la detección de pacientes con EvW, aunque tiene escaso valor en la caracterización de la severidad y tipo de la enfermedad. Su sensibilidad también es muy alta frente a defectos severos de receptores plaquetarios (TG o síndrome de Bernard Soulier [SBS]), pero menor y muy variable (<50% en promedio) en deficiencias granulares y de secreción, y en alteraciones de la señalización plaquetaria que normalmente cursan con clínica hemorrágica moderada^{21,22}. En un estudio de 148 pacientes con hemorragia mucocutáneo hereditario, Quiroga *et al.* han demostrado que la sensibilidad del PFA-100 en este ámbito es baja (30%) y no superior a la del TH²⁹. En mujeres con menorragia, síntoma habitual en las mujeres sometidas a histerectomía, la monitorización con PFA-100 puede ser útil y coste-efectiva por la alta incidencia de EvW y trastornos plaquetarios en este grupo de enfermos³⁰.

La mayor limitación de la prueba PFA-100 es su falta de especificidad, y su uso no permite discriminar por ejemplo entre una EvW y un trastorno plaquetario. Igualmente, un patrón de tiempo largo con col-Epi y normal con col-ADP puede corresponder tanto a un paciente con un defecto plaquetario de almacenamiento (*storage pool disease*) como a un individuo que ha tomado aspirina. El significado de encontrar prolongado sólo el TO de col-ADP es desconocido y sólo puede ser clarificado con una investigación usando otras técnicas. En conclusión, si en un paciente se obtiene un resultado de PFA-100 normal, prácticamente podemos excluir un trastorno severo en la hemostasia primaria, pero no uno moderado. Por el contrario, un resultado de PFA-100 anormal no indica necesariamente una disfunción de la hemostasia primaria, ni excluye la necesidad de nuevas pruebas para precisar el diagnóstico. En la mayoría de los casos, una buena historia clínica y la accesibilidad a un laboratorio capaz de realizar otras pruebas más específicas hacen prescindible el ensayo PFA-100, y sólo en circunstancias contrapuestas esta prueba puede tener un valor clínico relevante^{22,31}.

La experiencia clínica con el ensayo Impact en el diagnóstico de pacientes con EvW y defectos plaquetarios hereditarios es muy limitada, pero se ha encontrado un resultado anómalo en pacientes con TG, EvW o afibrinogenemia. La adición a las muestras de sangre de FvW o fibrinógeno antes de la prueba y el uso de la versión modificada del ensayo (Impact-R, preac-

tivando la muestra con agonistas plaquetarios) puede ayudarnos a discriminar entre estas patologías²⁴.

En general, para la caracterización de un defecto plaquetario congénito hay que recurrir al uso de pruebas clásicas, comúnmente agregación plaquetaria (en PRP o sangre total), ensayos bioquímicos, citometría de flujo, y más raramente microscopia electrónica.

Las deficiencias congénitas de los receptores adhesivos principales son relativamente fáciles de identificar por el patrón de agregación en respuesta a distintos agonistas³². Así, en la TG (deficiencia de GP IIb/IIIa), las plaquetas no agregan, o la agregación está muy disminuida, en respuesta a ADP, epinefrina, colágeno, ácido araquidónico o trombina (TRAP), pero sí aglutinan en respuesta a ristocetina. Por el contrario, en el SBS (deficiencia en GP Ib/IX/V) no hay aglutinación con ristocetina, pero las plaquetas agregan en respuesta al resto de agonistas. Este mismo patrón se da en pacientes con EvW, excepto en el tipo IIb, donde la aglutinación con ristocetina es anormalmente alta, y será la medida de los niveles de FvW y el estudio de su estructura multimérica lo que permita discriminar entre SBS y EvW. La ausencia de agregación específicamente a un solo agonista, muy poco frecuente excepto en el SBS, orienta hacia la deficiencia en el paciente del receptor para ese agonista. Así, se han identificado algunos pacientes con carencia de GP Ia/IIa o de GP VI y ausencia de agregación en respuesta a colágeno, algunos enfermos cuyas plaquetas muestran una agregación muy disminuida y reversible con ADP por alteraciones congénitas en los receptores P2Y₁₂, y en una familia japonesa se encontró una agregación deficiente específica con ácido araquidónico y análogos de tromboxano causada por una mutación en el receptor de este prostanoides³². Las anomalías del patrón de agregación en pacientes con trastornos plaquetarios de secreción (*storage pool disease*; deficiencias de gránulos alfa y/o densos) o de la señalización intraplaquetaria no son homogéneas. Muchos presentan ausencia o disminución significativa de la segunda onda de agregación en respuesta a ADP, epinefrina, colágeno o ácido araquidónico, secundaria a la carencia de liberación de nucleótidos de los gránulos. Sin embargo, en otros pacientes el patrón de agregación es normal. Para el diagnóstico de estos pacientes los ensayos de agregación son insuficientes, y normalmente se recurre a ensayos bioquímicos y/o de citometría de flujo (ver más adelante).

La agregación plaquetaria también se usa frecuentemente en el estudio de alteraciones plaquetarias adquiridas³³. Así, en pacientes cirróticos nosotros hemos demostrado una hipoagregación con ristocetina causada por el déficit adquirido de GP Ib³⁴. En pacientes urémicos se ha descrito una agregación disminuida y reversible en respuesta a ADP, epinefrina,

colágeno y ácido araquidónico, y respuestas normales con trombina y ristocetina. Sin embargo, no suele haber correlación entre las alteraciones de agregación en estos pacientes y la causa de la enfermedad renal, su severidad, y las complicaciones hemorrágicas. En pacientes con enfermedades mieloproliferativas no es infrecuente un patrón de agregación disminuida a múltiples agonistas, en particular a epinefrina, lo que se ha relacionado en algunos estudios con un déficit adquirido en el número de receptores α_2 -adrenérgicos³³. Algunos de estos enfermos muestran, sin embargo, una agregación normal, e incluso un patrón de agregación espontánea. Por último, mencionar que la hemorragia en algunos pacientes no trombopénicos con leucemia aguda o síndromes mielodisplásicos se ha relacionado con una situación adquirida de disfunción plaquetaria. En estos pacientes también se ha encontrado una agregación disminuida en respuesta a ADP, epinefrina o colágeno³³.

La citometría de flujo es actualmente una técnica habitual en los laboratorios especializados en plaquetas, aunque rara vez se emplea de forma aislada sino en combinación con otras. Con esta técnica es relativamente sencillo y fiable la confirmación del diagnóstico del SBS o la TG empleando anticuerpos o ligandos específicos para los complejos Ib/IX y IIb/IIIa^{16,17}. Los nuevos ensayos de citometría permiten cuantificar la densidad de estos receptores, y así identificar pacientes en heterocigosis. Más difícil es su uso en la identificación de defectos de otros receptores (ADP, epinefrina, colágeno o tromboxano A₂), cuyo nivel de expresión puede ser inferior a la sensibilidad del equipo (unas 500 copias/plaqueta). En estos casos hay que recurrir a ensayos de unión con ligandos radiactivos. La citometría de flujo también se usa comúnmente en el diagnóstico de trastornos plaquetarios congénitos de la secreción (*storage pool disease*). El método consiste en marcar las plaquetas con el compuesto fluorescente mepacrina, que se une específicamente a los nucleótidos de adenina en los gránulos densos, y luego se cuantifica la fluorescencia en la población de plaquetas en el citómetro¹⁷. Esta misma técnica es válida para la identificación de trastornos adquiridos de almacenamiento de nucleótidos en gránulos densos, como por ejemplo ocurre en algunos pacientes con coagulación intravascular diseminada, síndrome hemolítico urémico, trastornos mieloproliferativos, o leucemias o síndromes mielodisplásicos³³.

Existen protocolos de citometría de flujo para valorar la activación plaquetaria en respuesta a los distintos agonistas: algunos basados en la exocitosis de proteínas granulares (P-selectina, CD63, etc.) reconocidas con anticuerpos específicos, otros en el cambio de conformación de la GP IIb/IIIa (identificable con el anticuerpo PAC-1 o con fibrinógeno marca-

do con un fluorocromo). Estos protocolos son aplicables en el diagnóstico de anomalías congénitas o adquiridas de la señalización intraplaquetaria¹⁷, aunque no nos permiten identificar la proteína anómala concreta. Por último, la identificación de la externalización de fosfolípidos negativos por citometría de flujo usando anexina-V marcada con un fluorocromo se ha aplicado en el diagnóstico de anomalías congénitas de la actividad plaquetaria procoagulante como el síndrome de Scott^{17,32}.

Como se comentó arriba, los laboratorios especializados en plaquetas suelen contar también con una batería de ensayos bioquímicos para confirmar el diagnóstico de disfunción plaquetaria (liberación de nucleótidos, captación-liberación de serotonina, medida de segundos mensajeros por ELISA o RIA, identificación de proteínas de señalización por Western-blot). Junto a éstos, en los últimos años hemos asistido a una expansión exponencial del uso de procedimientos moleculares para la identificación precisa de los elementos plaquetarios alterados. La explicación de estos métodos está fuera del objeto de esta revisión, pero sirva como ejemplo de su utilidad nuestra identificación de la alteración molecular subyacente en un paciente con síndrome de Hermansky-Pudlak³⁵.

Predicción de la hemorragia en pacientes quirúrgicos

La hemorragia excesiva no es un riesgo irrelevante en pacientes sometidos a cirugía, especialmente considerando que un 3-5% de ellos son portadores de una alteración congénita o adquirida de la hemostasia primaria, EvW o disfunción plaquetaria. Además, es conocido que algunos tipos de cirugía, como el *bypass* cardiopulmonar, inducen un estado de hipocoagulabilidad. En el ámbito de la cirugía siempre ha existido un notable interés en la utilización de ensayos o instrumentos para la valoración rápida de la hemostasia preintervención.

Como se mencionó arriba, está suficientemente demostrado que el uso rutinario del TH en todos los pacientes carece de valor como marcador de la hemorragia quirúrgica^{5,6}. No obstante, su sensibilidad alcanza el 75% en pacientes quirúrgicos con historia de hemorragia previa³⁶.

El PFA-100 también se ha ensayado en este contexto. Así, de 1.342 pacientes de cirugía de tiroides, se encontraron TO de PFA-100 alargados en un 2,7% de los enfermos³⁷. En otro estudio prospectivo reciente, Koscielny y *et al.*³⁶ estudiaron preoperativamente a 5.649 pacientes, de los cuales un 11,2% resultaron tener historia de hemorragia. En este último subgrupo, se obtuvo un resultado anormal con PFA-100 en el 40% de los casos. En sólo 9 pacientes sin histo-

ria de hemorragia se obtuvo un resultado de PFA-100 anómalo y en ninguno se identificó un desorden plaquetario. Estos resultados ilustran que el uso rutinario precirugía del ensayo PFA-100 no es coste-efectivo ni aporta más valor que la historia clínica. En todo caso su uso potencial debería restringirse al subgrupo de enfermos con historia de hemorragia.

La experiencia en el uso de Impact como marcador de la hemorragia quirúrgica es anecdótica. En un estudio de 50 pacientes sometidos a cirugía cardíaca, se ha observado una correlación negativa significativa entre el porcentaje de adhesión plaquetaria obtenida con Impact antes de la intervención y el volumen de hemorragia quirúrgica²⁴. Son necesarios nuevos estudios con este equipo antes de establecer su valor predictivo en este ámbito.

En conclusión, el uso indiscriminado de los ensayos de función plaquetaria para predecir la hemorragia quirúrgica no es actualmente coste-efectivo. La historia clínica, prestando especial atención al historial de hemorragia y a la medicación reciente, junto con el examen físico del enfermo siguen siendo los elementos clave en la identificación de aquellos pacientes con alto riesgo de hemorragia excesivo.

Identificación de pacientes con hiperfunción plaquetaria y/o alto riesgo trombótico

Actualmente no hay ninguna duda del papel clave que desempeñan las plaquetas en la patología atero-trombótica², y por ello es relevante disponer de pruebas que permitan identificar de forma sencilla y fiable a los individuos con hiperfunción plaquetaria. Sin embargo, hasta ahora pocos estudios prospectivos han evaluado el valor de las diferentes pruebas de función plaquetaria disponibles para predecir la trombosis.

En el estudio prospectivo Caerphilly, que incluye a 2000 pacientes con un seguimiento de 10 años, se constató que ni el TH ni la agregación plaquetaria, en PRP o sangre total, se correlacionan con la ocurrencia de infarto de miocardio o cerebral en estos sujetos³⁸. Análogamente, en el estudio Northwick Park la agregación plaquetaria con ADP o epinefrina tampoco se correlacionaba con el desarrollo de enfermedad isquémica coronaria³⁹. Aunque estos datos sugieren que la agregación plaquetaria no es útil para predecir la ocurrencia de eventos cardiovasculares, el reciente estudio de Yee *et al.*⁴⁰ muestra que la agregación con dosis bajas de agonistas, en particular epinefrina, identifica de manera reproducible a individuos sanos con fenotipo de hiperreactividad plaquetaria mantenida en el tiempo (aproximadamente el 15% de los individuos estudiados). Estos resultados reabren el debate acerca del valor potencial del ensayo de agre-

gación plaquetaria como marcador del riesgo trombótico.

Varios protocolos de citometría de flujo se están aplicando en la detección de activación plaquetaria sistémica en situaciones clínicas diversas²⁸. Así, usando citometría de flujo se han identificado niveles aumentados de plaquetas activadas (P-selectina, PAC-1, etc.), agregados monocito-plaqueta y micropartículas plaquetarias en enfermos sometidos a intervención coronaria percutánea, con infarto de miocardio, enfermedad coronaria estable, angina inestable, *bypass* cardiopulmonar, isquemia cerebrovascular, TIA, enfermedad vascular periférica, enfermedad renal, síndromes mieloproliferativos, Alzheimer y otros. Michelson *et al.* han mostrado que la cuantificación de agregados monocito-plaqueta es un marcador más sensible de hiperactivación plaquetaria sistémica que la P-selectina²⁸.

Aunque en general los nuevos equipos automatizados se han diseñado principalmente para identificar la hipofunción plaquetaria, potencialmente podrían ayudar a predecir la trombosis. Así, se ha descrito que los pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST muestran en el PFA-100 un TO del col-ADP acortado que correlaciona con la severidad del infarto⁴¹. Análogamente, los pacientes con enfermedad cardiovascular estable y TO más cortos (<91 s) triplican el riesgo de eventos trombóticos en comparación con aquellos con TO más largos (>91 s)⁴². Otro estudio reciente ha encontrado tiempos de PFA-100 acortados en los pacientes sometidos a intervención percutánea coronaria que sufren a corto plazo eventos trombóticos⁴³. Sin embargo, los datos disponibles en este aspecto son aún escasos, y es necesaria una mayor evidencia obtenida de nuevos estudios prospectivos para ratificar el aparente valor predictivo de la trombosis arterial del test de col-ADP en el sistema PFA-100.

Monitorización de la terapia antiagregante

El tratamiento con fármacos antiplaquetarios constituye la base del manejo clínico de los pacientes con patología aterotrombótica, la primera causa de muerte en la sociedad occidental. Aunque el concepto de *resistencia* a estos fármacos es controvertido, está reconocido que existe gran variabilidad entre los pacientes en la respuesta a estos tratamientos, que además no están libres de riesgo hemorrágico⁴⁴. Consecuentemente, hay un interés creciente en la monitorización de la terapia antiagregante, con el objetivo último de poder individualizar el tratamiento para conseguir la máxima eficacia anti-trombótica minimizando el riesgo hemorrágico. La cuestión clave, aún no resuelta, es si alguno de los

ensayos de función plaquetaria disponibles es capaz de predecir la respuesta clínica y la ocurrencia de eventos trombóticos en los pacientes. Como comentamos a continuación, algunos estudios, en general con pocos pacientes, apuntan en este sentido, pero por ahora no hay evidencia concluyente de que el resultado de resistencia a antiagregantes obtenido en el laboratorio pueda ser considerado marcador fidedigno de riesgo de trombosis. Tampoco hay estudios que muestren que la dosificación de las terapias en función de los resultados de laboratorio mejore la evolución clínica de los enfermos. Mientras que estudios amplios no establezcan inequívocamente esta relación, no está recomendada la monitorización rutinaria de las resistencias a antiagregantes con pruebas de función plaquetaria, ni el cambio de terapia en los enfermos en función de los resultados de las mismas.

Monitorización de aspirina

La aspirina es el fármaco antiagregante más usado y está demostrada su capacidad para reducir hasta en un 25% el riesgo de muerte vascular o eventos vasculares mayores en pacientes de alto riesgo. El término resistencia a aspirina es controvertido y se han usado en general dos acepciones⁴⁵: 1) la observación clínica de eventos cardiovasculares en los enfermos a pesar del tratamiento con el fármaco; 2) el hallazgo en el laboratorio de que las plaquetas de los individuos tratados mantienen su reactividad *in vitro*. La falta de una definición única justifica la gran variación en la incidencia de resistencia a aspirina descrita en la literatura (5-65% de los enfermos tratados).

Dado que la diana de la aspirina es la enzima ciclooxigenasa-1 (COX-1), el ensayo más obvio para valorar su efecto es cuantificar la generación de tromboxano (Tx) A₂ en los individuos tratados, midiendo con inmunoensayos sus metabolitos estables: a) TxB₂ en suero o PRP estimulado con ácido araquidónico; b) 11-dehidro-TxB₂ en orina. Un estudio ha sugerido que una concentración alta de 11-dehidro-TxB₂ (>34 ng/mmol creatinina) se asocia a mayor riesgo de eventos trombóticos en pacientes tratados con dosis bajas de aspirina⁴⁶. Nosotros hemos mostrado que en sujetos sanos los niveles de 11-dehidro-TxB₂ postratamiento son muy dependientes de los niveles pre-aspirina⁴⁷.

La agregación plaquetaria es otro de los métodos clásicos usados en la monitorización de la respuesta a aspirina. Aun considerando sus limitaciones metodológicas, varios estudios han descrito que la persistencia de agregación (inducida con ácido araquidónico y/o ADP en PRP, o inducida con ADP y/o colágeno en sangre total) a pesar de la aspirina se asocia a una mayor tasa de eventos trombóticos cardiacos en pacien-

tes con enfermedad coronaria estable y de reoclusión arterial postangioplastia¹⁹.

También se ha desarrollado algún protocolo de citometría de flujo para monitorizar la terapia con aspirina usando ácido araquidónico como agonista, pero estas técnicas han sido poco usadas en este contexto¹⁷.

En cuanto a los equipos compactos, el PFA-100 se ha empleado en numerosos estudios de resistencia a aspirina¹⁹. Genéricamente, la aspirina produce en los sujetos respondedores un alargamiento selectivo del TO del cartucho col-Epi, mientras que no afecta al TO de col-ADP. La limitación de esta prueba, como hemos comentado arriba, es que su resultado puede estar influenciado por muchas variables independientes de la aspirina. Así, otros grupos y nosotros hemos comprobado que hasta un 30% de los sujetos normales muestran con este ensayo un patrón de resistencia a dosis bajas de aspirina⁴⁷. En pacientes, el porcentaje de resistencia medido con el PFA-100 es mayor que con otras pruebas⁴⁷ y su valor clínico está por aclarar. Así, mientras algunos estudios sugieren que el ensayo PFA-100 no es informativo respecto de la incidencia de eventos trombóticos en pacientes con enfermedad coronaria, otros han mostrado asociación entre el resultado del ensayo PFA-100 y la incidencia de accidentes isquémicos cerebrales recurrentes^{19,45}.

El sistema VerifyNow Aspirin[®] ha sido específicamente diseñado para la monitorización del efecto de la aspirina, y en EE. UU. ha sido autorizado por la FDA para este fin. El sistema actual emplea ácido araquidónico como agonista, lo que aumenta su especificidad respecto a la aspirina. En estudios con pacientes y voluntarios sanos este ensayo ha mostrado muy buena correlación con la agregación plaquetaria²³. Los datos sobre su valor clínico son aún muy escasos. No obstante, en un estudio con 151 pacientes con enfermedad coronaria estable sometidos a angioplastia no urgente, se encontró que los pacientes identificados como resistentes con VerifyNow Aspirin[®] triplicaban el riesgo de mionecrosis, elevación de creatinina quinasa-MB, postangioplastia²³. Otro estudio prospectivo en pacientes estables con enfermedad coronaria mostró tras un año de seguimiento que aquellos con patrón de resistencia a aspirina con VerifyNow Aspirin[®] duplican el riesgo de eventos isquémicos. Estos datos son sugerentes del potencial valor clínico de esta prueba, pero son necesarios muchos más estudios confirmatorios antes de recomendar su uso clínico rutinario.

La experiencia con el ensayo Impact[®] en la monitorización de antiagregación es aún anecdótica. Dos estudios recientes han mostrado concordancia entre Impact[®] y agregación plaquetaria en la detección de resistencia a aspirina en sujetos sanos y pacientes sometidos a angioplastia²⁴.

Monitorización de clopidogrel

Clopidogrel es una tienopiridina de segunda generación que inhibe irreversible y específicamente el receptor de ADP $P2Y_{12}$ y representa, combinado con aspirina, la terapia de elección en la prevención de la trombosis del *stent* y en la prevención de eventos cardiovasculares mayores en pacientes de alto riesgo. Se ha constatado una considerable variabilidad en la respuesta de los pacientes a esta terapia y, dependiendo del criterio usado, entre un 4-30% de los pacientes tratados se consideran resistentes. Como en el caso de la aspirina, el fenómeno de resistencia a clopidogrel es complejo y en él se han implicado múltiples mecanismos⁴⁹.

La agregación plaquetaria ha sido el método usado en muchos estudios para valorar el efecto del tratamiento con clopidogrel, pero el criterio de resistencia con esta técnica no está bien establecido. La diferencia en la agregación plaquetaria inducida con 5 μ M y 20 μ M ADP antes y después del tratamiento se ha empleado como criterio para clasificar a los pacientes tratados con clopidogrel⁵⁰: no respondedores si diferencia < 10% con ambas dosis de ADP; respondedores intermedios si diferencia < 10% con 20 μ M ADP; respondedores si diferencia > 10% incluso con 20 μ M ADP. Sin embargo, no siempre es posible la medición pre-tratamiento. Por ello, muchos defienden que el efecto del clopidogrel sobre la agregación no se debe valorar de forma dicotómica, sino como un parámetro continuo que muestra una gran variabilidad entre enfermos⁴⁹. Aparte de otras limitaciones ya mencionadas, la agregación plaquetaria presenta en este caso un inconveniente de especificidad ya que en la agregación inducida con ADP no sólo interviene el receptor $P2Y_{12}$, diana del clopidogrel, sino también los otros receptores del nucleótido ($P2Y_1$, $P2Y_X$). Esto podría explicar en parte la heterogeneidad en la respuesta de agregación con ADP en los pacientes tratados con clopidogrel.

La citometría de flujo es una metodología de uso creciente en la monitorización de clopidogrel. Entre los protocolos de citometría usados con este fin, se encuentra la medida de marcadores de activación plaquetaria inducida con ADP (P-selectina o GP IIb/IIIa activada con el anticuerpo PAC-1) o la medida del porcentaje de agregados entre leucocitos y plaquetas⁵¹. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo protocolo que consiste en la medida por citometría en sangre total de la fosforilación intraplaquetaria de la proteína estimulada por vasodilatadores VASP (VASP-P) en respuesta a la estimulación con PGE_1 . Para ello se usa un detergente que hace permeable la membrana plaquetaria y un anticuerpo anti-VASP-P específico marcado con un fluorocromo⁵². Esta fosforilación PKA-dependiente está mediada por el au-

mento en la concentración de AMPc que induce el prostanoide. En presencia de ADP, la activación de $P2Y_{12}$ vía G_i inhibe la síntesis de AMPc y con ello la fosforilación de VASP. Sin embargo, en los pacientes con clopidogrel $P2Y_{12}$ está bloqueado y el ADP es incapaz de reducir la fosforilación de VASP por PGE_1 . El ensayo es así más específico de $P2Y_{12}$, ya que $P2Y_1$ no interviene en este proceso. Otra ventaja es que las muestras de sangre se pueden fijar tras la activación con los agonistas, lo que permite demorar el análisis o remitirlo a un laboratorio especializado.

El ensayo VerifyNow $P2Y_{12}$ [®] ha sido diseñado para la monitorización del efecto de antagonistas de $P2Y_{12}$, y también emplea la combinación de ADP y PGE_1 como estimulantes plaquetarios para aumentar su especificidad. La presencia de una concentración baja de PGE_1 (22 nM) tiene como objetivo disminuir el aumento del calcio intracelular vía $P2Y_1$ y, por tanto, la contribución de este receptor en la respuesta de agregación de las plaquetas sobre las bolas recubiertas de fibrinógeno. Adicionalmente, el ensayo evalúa en paralelo la agregación inducida con TRAP, proporcionando así un valor de comparación interna muy útil cuando no se dispone de la respuesta del paciente preclopidogrel²³.

Otros métodos potencialmente válidos para la monitorización de la terapia con clopidogrel, pero con los que hay muy poca experiencia, son la tromboelastografía, Plateletworks o Impact^{®19}. El equipo PFA-100 es relativamente insensible al efecto del clopidogrel, probablemente por la alta concentración de ADP y colágeno que se usa en el sistema.

Varios estudios en pacientes han investigado el valor de la monitorización de clopidogrel con los distintos ensayos de función plaquetaria en relación con la evolución clínica de los enfermos⁴⁹. Así, el estudio CREST, y algunos otros estudios con un número pequeño de enfermos, ha mostrado que la alta reactividad plaquetaria residual posclopidogrel, valorada mediante agregación plaquetaria, GPIIb/IIIa activada y VASP-P, incrementa significativamente el riesgo de trombosis subaguda del *stent*. En el estudio prospectivo EXCELSIOR, con 802 pacientes que recibieron 600 mg de clopidogrel 2 h antes de la implantación de un *stent*, se ha observado que una mayor agregación residual con 5 μ M ADP incrementa hasta siete veces y de forma independiente el riesgo de eventos cardíacos mayores a los 30 días posintervención. Asimismo, se ha descrito que los pacientes con dosis bajas de clopidogrel sometidos a angioplastia que mostraban mayor agregación residual con ADP presentan un mayor riesgo de eventos isquémicos posprocedimiento⁴⁹.

Estos datos que sugieren un potencial valor pronóstico de las pruebas de función plaquetaria en el contexto del tratamiento agudo y crónico con clopidogrel

deberán ser confirmados en nuevos estudios prospectivos, incluyendo números altos de pacientes.

Monitorización de antagonistas de GP IIb/IIIa

Los antagonistas de la GP IIb/IIIa, integrina clave en el proceso de agregación plaquetaria, se han convertido en un tratamiento común en la prevención de complicaciones trombóticas en pacientes sometidos a cateterismos o enfermos que se presentan con síndrome coronario agudo. En la monitorización de su efecto se han usado ensayos clásicos como la agregación plaquetaria, la citometría de flujo o los ensayos de unión con anticuerpos anti-GP IIb/IIIa, y también las nuevas técnicas automatizadas^{18,19}. En el caso de la agregación plaquetaria se pueden usar distintos agonistas, aunque típicamente se utiliza ADP 20 μ M en sangre anticoagulada con PPACK. En cuanto a los métodos de citometría, se emplean protocolos directos de unión de ligandos contra GP IIb/IIIa (anticuerpos, fibrinógeno, péptidos RGD), marcados con fluorocromos o técnicas indirectas como la medida de la unión de anticuerpos anti-LIBS inducida por los antagonistas o la agregación valorada por dispersión de luz. El sistema VerifyNow® IIb/IIIa se diseñó originalmente con este fin. La reactividad plaquetaria observada con esta prueba en pacientes tratados con abciximab u otros antagonistas de GP IIb/IIIa se correlaciona muy bien con la agregación plaquetaria⁵³. El estudio multicéntrico prospectivo GOLD mostró en 500 pacientes sometidos a cateterismo una asociación significativa entre los resultados con VerifyNow® IIb/IIIa y el riesgo de eventos trombóticos cardíacos⁵⁴. El sistema PFA-100 es muy sensible al bloqueo de GP IIb/IIIa con antagonistas, observándose TO > 300 s en la gran mayoría de los enfermos tratados. Su resultado correlaciona bien con la agregación plaquetaria y con los ensayos de unión de anticuerpos contra GP IIb/IIIa¹⁹. Es destacable que un estudio ha descrito que un TO < 300 s en el PFA-100 se asocia en los pacientes tratados con antagonistas de GP IIb/IIIa con mayor incidencia de eventos trombóticos cardíacos⁵⁵. Tanto en sujetos normales como en pacientes sometidos a angioplastia o implantación de *stent* carotídeo, se ha visto que los antagonistas de GP IIb/IIIa provocan de forma dosisdependiente una disminución muy profunda de la adhesión plaquetaria medida con el equipo Impact que correlaciona bien con la disminución en la agregación plaquetaria²⁴.

Monitorización de la terapia prohemostática

Como en el caso de la terapia antiagregante, los ensayos de función plaquetaria son potencialmente útiles para monitorizar las terapias prohemostáticas usa-

das actualmente, como por ejemplo DDAVP, o factores de crecimiento plaquetarios. También en este caso la cuestión clave, no resuelta, es si estos ensayos pueden ser predictivos de la eficacia clínica del tratamiento, en este caso la prevención de la hemorragia.

La alta sensibilidad del sistema PFA-100 a los niveles de FvW es una ventaja de cara a su uso en la evaluación del efecto de DDAVP²². En sujetos sanos la DDAVP acorta los TO de col-ADP y Col-Epi. Esta corrección también se ha observado en algunos pacientes con trastornos plaquetarios de la secreción. Asimismo, se ha descrito que DDAVP normaliza los TO en pacientes con EvW tipo I que responden al fármaco, aumentando sus niveles de FvW plasmáticos, pero no lo hace en aquellos con niveles bajos de FvW plaquetario. En pacientes con EvW severa, el tratamiento con concentrados de FvW no siempre acorta los TO del PFA-100, lo que se ha relacionado con ausencia en estos fármacos del perfil normal de multímeros de FvW. Una observación interesante es que en sujetos sanos la DDAVP acorta el TO tras el tratamiento con antiagregantes. Todos estos datos sugieren que la monitorización de DDAVP con el PFA-100 pudiera tener valor clínico. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que hayan evaluado el valor predictivo del acortamiento de los TO en el PFA-100 en relación con la incidencia de hemorragia en enfermos tratados con DDAVP por defectos plaquetarios o de FvW, o como terapia de prevención de la hemorragia secundario a antiagregantes²².

Hemodonación y hemoterapia

Las pruebas de función plaquetaria son potencialmente útiles en distintas facetas de la medicina transfusional⁵⁶. Así, estudios recientes en los que se ha empleado el sistema PFA-100 han demostrado que una proporción relevante de donantes de sangre exhiben una disfunción plaquetaria, probablemente por ingesta no reconocida de inhibidores plaquetarios⁵⁷. Esta observación puede ser especialmente relevante si se trata de donantes de plaquetas por aféresis, ya que la hipofunción de la unidad transfusional de plaquetas resultante puede comprometer su valor para prevenir la hemorragia en el enfermo transfundido con ella.

En múltiples estudios se han usado pruebas de función plaquetaria (agregación, citometría, ensayos de unión, etc.) para valorar *in vitro* los cambios en los concentrados de plaquetas durante su almacenamiento en el banco de sangre¹². Estos estudios han puesto de manifiesto los cambios metabólicos (disminución de glucosa, aumento del pH, cambios en pO₂ y pCO₂), la activación progresiva (aumento de P-selectina y CD63) y la pérdida de funcionalidad *in vitro* (respuesta al choque osmótico, agregación, unión de

FvW y fibrinógeno) que experimentan las plaquetas durante su almacenamiento estándar (22 °C y agitación suave) en el banco de sangre¹².

Por último, aunque las pruebas de función plaquetaria no se usan rutinariamente en la indicación de la transfusión de plaquetas ni en la valoración de su eficacia, un estudio reciente con pocos pacientes ha empleado el sistema PFA-100 con este objetivo⁵⁸.

Conclusiones

La batería de pruebas de función plaquetaria es actualmente amplia y diversa. A las más clásicas, como el TH ya en desuso, la agregación y algunos ensayos bioquímicos, se han unido en pocos años metodologías de gran versatilidad como la citometría de flujo y buen número de equipos automatizados que valoran diferentes aspectos de la biología de las plaquetas. Estos últimos ofrecen la posibilidad de una aplicación rutinaria fuera de los laboratorios especializados, por su sencillez, rapidez, y no requerir de personal altamente cualificado. Por otra parte, a la aplicación clásica de estas pruebas en el diagnóstico de alteraciones congénitas y adquiridas de hipofunción plaquetaria, se unen ahora otras novedosas como la identificación de pacientes con hiperfunción plaquetaria y riesgo trombotico, o la posible monitorización de la terapia antiagregante. Estas nuevas aplicaciones son potencialmente de gran trascendencia social y económica por la dimensión de las enfermedades cardiovasculares en nuestra sociedad. Sin embargo, aún es necesario realizar estudios amplios, prospectivos y aleatorizados que establezcan el valor predictivo de las actuales o futuras pruebas de función plaquetaria en estos contextos. Hasta entonces, su uso rutinario no está justificado.

Agradecimientos

Grupo de investigación financiado por el Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología (SAF 2004-07535 y SAF 2006-06212), Instituto de Salud Carlos III, Programas Redes (Red RECAVA) y Fundación Séneca (03116 PI/05). L. Navarro-Núñez es becaria del Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2005-7496). C. Martínez es contratado del Ramón y Cajal por la Universidad de Murcia.

Bibliografía

- George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355: 1531-9.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8: 1227-34.
- Lind SE, Kurkjian CD. The bleeding time. In: Michelson AD (ed). *Platelets*. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2007. p. 485-94.
- Harker LA, Slichter SJ. The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. *N Engl J Med* 1972; 287: 155-9.
- Peterson P, Hayes TE, Arkin CF, Bovill EG, Fairweather RB, Rock WA Jr, et al. The preoperative bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and American Society of Clinical Pathologists' position article. *Arch Surg* 1998; 133: 134-9.
- Lehman LM, Blaylock RC, Alexander DP, Rodgers GM. Discontinuation of the bleeding time test without detectable adverse clinical impact. *Clin Chem* 2001; 47: 1204-11.
- Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 172-83.
- Jennings LK, White MM. Platelet aggregation. In: Michelson AD (ed). *Platelets*. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2007. p. 495-507.
- White MM, Foust JT, Mauer AM, Robertson JT, Jennings LK. Assessment of lumiaggregometry for research and clinical laboratories. *Thromb Haemost* 1992; 67: 572-7.
- Ingerman-Wojenski C, Smith JB, Silver MJ. Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 44-52.
- Jarvis GE. Platelet aggregation in whole blood: impedance and particle counting methods. *Methods Mol Biol* 2004; 272: 77-87.
- Rivera J, Lozano ML, Vicente V. In vitro changes of platelet parameters: lessons from blood banking. *Methods Mol Biol* 2004; 273: 57-72.
- Crosby D, Poole AW. Platelet dense-granule secretion: the [3H]-5-HT secretion assay. *Methods Mol Biol* 2004; 272: 95-6.
- White JG. Electron microscopy methods for studying platelet structure and function. *Methods Mol Biol* 2004; 272: 47-63.
- Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* 2005; 115: 3355-62.
- Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-36.
- Michelson AD, Linden MD, Barnard MR, Furman MI, Frelinger AL. Flow cytometry. In: Michelson AD (ed). *Platelets*. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2007. p. 545-63.
- Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005; 19: 111-23.
- Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006; 98 (10 Suppl 1): S4-10.
- Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, García C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21 Suppl 2: 106-12.
- Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol* 2005; 130: 3-10.
- Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 312-9.
- Steinhuyl SR. The VerifyNow System. In: Michelson AD (ed). *Platelets*. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2007. p. 509-18.
- Varon D, Savion N. Impact cone and plate(let) analyzer. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier; 2007. p. 535-44.
- Yamamoto J, Yamashita T, Ikarugi H, Taka T, Hashimoto M, Ishii H, et al. Gorog Thrombosis Test: a global in-vitro test of

- platelet function and thrombolysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 31-9.
26. Gerotziakas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-ThrombinoScope assay. *Thromb J* 2005; 3: 16.
27. Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clin Lab Haematol* 2005; 27: 81-90.
28. Michelson AD. The clinical approach to disorders of platelet number and function. In: Michelson AD (ed). *Platelets*. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2007. p. 825-30.
29. Quiroga T, Goycoolea M, Muñoz B, Morales M, Aranda E, Panes O, et al. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 892-8.
30. James AH, Lukes AS, Brancizio LR, Thames E, Ortel TL. Use of a new platelet function analyzer to detect von Willebrand disease in women with menorrhagia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 449-55.
31. Favarolo EJ. Investigating people with mucocutaneous bleeding suggestive of primary hemostatic defects: a low likelihood of definitive diagnosis. *Haematologica* 2007; 92: 292-6.
32. Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelets function: an update. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 157-62.
33. Rao AK. Acquired disorders of platelet function. In: Michelson AD (ed). *Platelets*. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2007. p. 1051-76.
34. Sánchez Roig MJ, Rivera J, Moraleta JM, Vicente V. Quantitative defect of glycoprotein Ib in severe cirrhotic patients. *Am J Hematol* 1994; 45: 10-5.
35. González-Conejero R, Rivera J, Escolar G, Vicente V, Corral J. Molecular, ultrastructural and functional characterization of a Spanish family with Hermansky-Pudlak syndrome: role of insC974 in platelet function and clinical relevance. *Br J Haematol* 2003; 123: 132-8.
36. Koscielny J, Ziemer S, Radtke H, Schmutzler M, Pruss A, Sinha P, et al. A practical concept for preoperative identification of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004; 10: 195-204.
37. Franchini M, Zugni C, Veneri D, Gandini G, Lippi G, Manza-to F, et al. High prevalence of acquired von Willebrand's syndrome in patients with thyroid diseases undergoing thyroid surgery. *Haematologica* 2004; 89: 1341-6.
38. Elwood PC, Beswick A, Pickering J, McCarron P, O'Brien JR, Renaud SR, et al. Platelet tests in the prediction of myocardial infarction and ischaemic stroke: evidence from the Caerphilly Prospective Study. *Br J Haematol* 2001; 113: 514-20.
39. Meade TW, Cooper JA, Miller GJ. Platelet counts and aggregation measures in the incidence of ischaemic heart disease (IHD). *Thromb Haemost* 1997; 78: 926-9.
40. Yee DL, Sun CW, Bergeron AL, Dong JE, Bray PF. Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals. *Blood* 2005; 106: 2723-9.
41. Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, et al. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 1392-7.
42. Christie DJ, Kottke-Marchant K, Gorman R. High shear platelet function is associated with major adverse events in patients with stable cardiovascular disease (CVD) despite aspirin therapy. *J Thromb Haemost* 2005; 3 Suppl 1: P2204.
43. Gianetti J, Parri MS, Sbrana S, Paoli F, Maffei S, Paradossi U, et al. Platelet activation predicts recurrent ischemic events after percutaneous coronary angioplasty: a 6 months prospective study. *Thromb Res* 2006; 118: 487-93.
44. Patrono C, Collier B, Fitzgerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126 Suppl: 234S-264S.
45. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Sanak M. Aspirin resistance. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1655-62.
46. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105: 1650-5.
47. González-Conejero R, Rivera J, Corral J, Acuna C, Guerrero JA, Vicente V. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* 2005; 36: 276-80.
48. Harrison P, Segal H, Blasbery K, Furtado C, Silver L, Rothwell PM. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke* 2005; 36: 1001-5.
49. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1505-16.
50. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1392-6.
51. Michelson AD, Linden MD, Furman MI, Barnard MR, Fox ML, Lau WC, et al. Evidence that pre-existent variability in platelet response to ADP accounts for 'clopidogrel resistance'. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 75-81.
52. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 85-92.
53. Wheeler GL, Braden GA, Steinhubl SR, Kereiakes DJ, Kottke-Marchant K, Michelson AD, et al. The Ultegra rapid platelet-function assay: comparison to standard platelet function assays in patients undergoing percutaneous coronary intervention with abciximab therapy. *Am Heart J* 2002; 143: 602-11.
54. Steinhubl SR, Talley JD, Braden GA, Tcheng JE, Casterella PJ, Moliterno DJ, et al. Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention: results of the GOLD (AU-Assessing Ultegra) multicenter study. *Circulation* 2001; 103: 2572-8.
55. Madan M, Berkowitz SD, Christie DJ, Smit AC, Sigmon KN, Tcheng JE. Determination of platelet aggregation inhibition during percutaneous coronary intervention with the platelet function analyzer PFA-100. *Am Heart J* 2002; 144: 151-8.
56. Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang* 2005; 88: 153-63.
57. Harrison P, Segal H, Furtado C, Verjee S, Sukhu K, Murphy ME. High incidence of defective high-shear platelet function among platelet donors. *Transfusion* 2004; 44: 764-70.
58. Salama ME, Raman S, Drew MJ, Abdel-Raheem M, Mahmood MN. Platelet function testing to assess effectiveness of platelet transfusion therapy. *Transfus Apher Sci* 2004; 30: 93-100.