
Estudio de la adhesión plaquetaria mediante técnicas de perfusión. Su interés clínico y experimental

A. Ordinas, E. Bastida, G. Escolar y R. Castillo

Servicio Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

Introducción

La interacción de las plaquetas con el subendotelio es uno de los primeros eventos que tiene lugar al desencadenarse el mecanismo de la hemostasia^{1,2}. La monocapa de células, que tapiza los vasos sanguíneos, no es reactiva para las plaquetas y por lo tanto la adhesión de las mismas sobre el endotelio vascular no se produce en condiciones de integridad vascular; sin embargo, la pérdida de una o varias células endoteliales produce la exposición de la denominada matriz extracelular, cuya composición tiene propiedades activadoras. Cuando se produce la lesión vascular, las plaquetas circulantes entran en contacto con los componentes del subendotelio emitiendo pseudópodos y extendiéndose sobre la zona expuesta³. Las plaquetas activadas liberan el contenido de sus gránulos, los cuales, entre otras sustancias activas, liberan productos que favorecen la interacción plaqueta-plaqueta, y que inician la formación de los agregados plaquetarios. Entre los productos liberados por las plaquetas hay también factores quimotácticos y mitogénicos, los cuales promueven la migración y la proliferación de las células musculares lisas. Este fenómeno constituye una importante fase en los procesos de reparación vascular, pero también se relaciona con la patogénesis de la metástasis y la arteriosclerosis^{4,5}.

Se han descrito varios factores que modulan la interacción de las plaquetas con el subendotelio vascular. El transporte de las plaquetas hacia la zona periférica del vaso está influenciado por ciertos parámetros de naturaleza mecánica y hemodinámica, tales como el coeficiente de cizallamiento, el hematócrito y el tamaño y deformabilidad de los hematíes⁶⁻⁸. Aparte de estos factores físicos, la reactividad de varios

componentes subendoteliales es así mismo importante en la interacción de las plaquetas.

El subendotelio vascular está constituido por diferentes tipos de colágenos, tejido elástico, proteoglicanos y proteínas tales como laminina, nidogén, factor de von Willebrand, fibronectina y trombospondina^{9,10}. Ciertas proteínas plasmáticas están así mismo implicadas en la adhesión de las plaquetas a uno o varios de los componentes del subendotelio¹¹. Estas uniones se producen con participación de los receptores específicos existentes en la membrana plaquetaria¹².

Con el fin de estudiar detalladamente los fenómenos relacionados con la interacción de las plaquetas y el subendotelio vascular, se han desarrollado varios modelos experimentales, los cuales han tenido en cuenta los fenómenos reológicos que en condiciones fisiológicas regulan la mayor parte de estas interacciones.

De entre estos modelos experimentales denominados genéricamente sistemas de perfusión, los más utilizados son el sistema de perfusión anular de Baumgartner y el sistema de flujo laminar de Sakariassen.

Sistema de perfusión de Baumgartner

Consiste en un cámara de plástico en cuyo interior se ajusta un eje, también de plástico, en el cual se han colocado uno o dos segmentos vasculares evertidos. Dicho eje queda en la parte central de la cámara y puede ser expuesto al contacto de sangre circulante¹³. El espacio anular, calculado de forma que corresponde al lumen vascular humano, entre la superficie y la cámara exterior permanece constante. De esta forma los parámetros reológicos como el flujo y el coeficiente de cizallamiento pueden calcularse para simular un sistema fisiológico^{14,15}. La

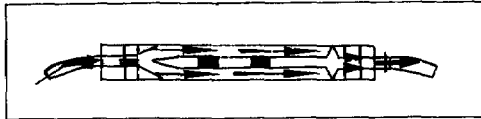


Fig. 1. Detalle de la cámara de perfusión anular de Baumgartner.

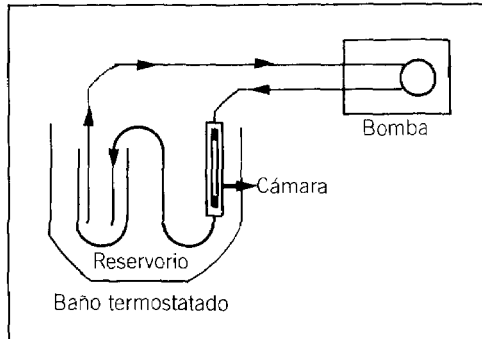


Fig. 2. Esquema completo del sistema de perfusión de Baumgartner.

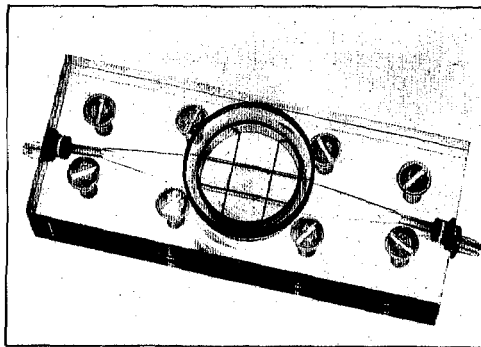


Fig. 3. Cámara de perfusión plana (Sakariassen).

figura 1 muestra en detalle la cámara de Baumgartner.

En este sistema de perfusión la sangre circula desde un reservorio a la bomba, la cual le confiere la velocidad deseada; después la sangre pasa a través de la cámara y vuelve al reservorio. Todo el sistema se halla termostatado a 37 °C.

En la figura 2 se puede observar un esquema del sistema de perfusión anular de Baumgartner.

Una vez transcurrido el tiempo de perfusión, las plaquetas que han interactuado con el segmento vascular perfundido pueden cuantificarse por métodos isotópicos, en el caso de que estas plaquetas hubieran estado previamente marcadas con algún isótopo radiactivo, o bien pueden valorarse por métodos morfométricos. La valoración morfométrica es mucho más exacta y permite un estudio más detallado de las plaquetas en interacción con el subendotelio, ya que permite no sólo una evaluación global del número de plaquetas, sino también conocer el estado de estas plaquetas en interacción¹⁷.

Sistema de perfusión en cámara plana

El modelo de perfusión en cámara plana (Sakariassen) consta de una cámara de plástico de dimensiones calculadas¹⁸ con una ranura interna, modelada en el plástico de la propia cámara, por la cual se hace circular la sangre impulsada por una bomba. En la zona interna de la cámara se coloca un cubreobjetos recubierto con la superficie elegida para el estudio de interacción plaquetaria (fig. 3). Esta superficie puede ser una proteína purificada o la matriz extracelular generada por las células endoteliales en cultivo. Las plaquetas interactúan con la mencionada superficie durante el tiempo de perfusión en las condiciones previamente fijadas, pudiéndose estudiar la reactividad de los distintos componentes del subendotelio¹⁹.

La evaluación de las plaquetas en interacción con la superficie perfundida se puede efectuar de la misma forma descrita para la técnica de perfusión continua de Baumgartner.

La aplicación de esta técnica de perfusión ha sido de gran utilidad para el estudio de la contribución de los distintos componentes del tejido subendotelial en la adhesión de las plaquetas y en la formación del trombo plaquetario²⁰.

Utilidad de las técnicas de perfusión

El desarrollo de los métodos de perfusión ha permitido no sólo profundizar en el conocimiento de los mecanismos reguladores de la interacción de las plaquetas al subendotelio, sino que además ha sido de gran ayuda para confirmar el diagnóstico de síndromes hemorrágicos previamente descritos, así como para el estudio de nuevas deficiencias plaquetarias y plasmáticas.

De esta forma se ha podido elucidar que la carencia de glucoproteína Ib en la membrana de las plaquetas en la enfermedad de Bernard

y Soulier se correlaciona directamente con un defecto en la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular²¹. También la ausencia del complejo glucoprotéico IIb/IIIa que ocurre en la trombostenia de Glanzman se ha asociado a los defectos de las plaquetas en cuanto a la capacidad de adherirse al subendotelio una vez han contactado con él, y a la facultad de formar agregados²².

Por otra parte, la utilización de los sistemas de perfusión bajo condiciones reológicas definidas ha permitido distinguir el papel de alguno de los factores plasmáticos que se presentan ausentes o deficitarios en ciertos tipos de patologías. Así, se ha podido observar el papel fundamental del factor de von Willebrand como puente de unión entre las plaquetas y el subendotelio, y que este proceso se presenta en zonas del árbol vascular donde se produce un elevado índice de cizallamiento, y no en otras zonas donde los coeficientes de colisión de las plaquetas con las estructuras del subendotelio son menores²³.

También se han utilizado estas técnicas para la elucidación de los mecanismos relacionados con las complicaciones trombóticas asociadas a la enfermedad cancerosa, estudiándose la acción trombogénica de distintos tipos de células tumorales humanas, así como los factores plasmáticos implicados en estos fenómenos de activación^{24,25}.

Como una de las últimas aplicaciones de los métodos de perfusión, tanto desde el punto de vista de investigación básica como de futuras perspectivas clínicas, hay que citar la utilización de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra epítomos determinados de las moléculas que intervienen en los fenómenos de interacción de las plaquetas con el subendotelio²⁶.

Por otra parte, ha sido de interés terapéutico la información obtenida con estas técnicas en cuanto a la determinación de la potencia relativa de distintos tipos de fármacos antiplaquetarios en la inhibición de la interacción de las plaquetas con el subendotelio vascular o de la interacción de las plaquetas entre sí²¹.

BIBLIOGRAFÍA

1. SIXMA JJ, WESTER J. The hemostatic plug. *Semin Hematol* 1977; 14:265-299.
2. SIXMA JJ. Role of blood vessel, platelet and coagulation interactions in haemostasis. En: Bloom AL,

- Thomas DP, eds. *Haemostasis and thrombosis*. Edimburgo, Churchill-Livingstone, 1981; 252-267.
3. WEISS HJ, TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate-dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome. *J Lab Clin Med* 1978; 92:750-764.
 4. BASTIDA E, ESCOLAR G, ORDINAS A, GIARDINA LL, JAMIESON GA. Effects of divalent cations on the interaction of platelets with tumor cells: aggregation and perfusion studies with two homologous human systems. *J Lab Clin Med* 1985; 106:68-74.
 5. ROSS R, GLOMSET JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Eng J Med* 1976; 295:369-376.
 6. TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Platelet interaction with subendothelium in flowing rabbit blood: effect of blood shear rate. *Microvasc Res* 1979; 17:38-54.
 7. AARTS PAMM, HEETHAAR RM, SIXMA JJ. Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium. *Blood* 1983; 62:214-217.
 8. AARTS PAMM, HEETHAAR RM, SIXMA JJ. Red blood cell deformability influences platelets-vessel wall interaction in flowing blood. *Blood*, 1984; 64:1.228-1.233.
 9. SAKARIASSEN KS, BOLHUIS PA, SIXMA JJ. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 1979; 279:636-638.
 10. KOTELIANSKY VE, LEYTN VL, SVIRIDOV DD, REPIN VS, SMIRNOV VN. Human plasma fibronectin promotes the adhesion and spreading of platelets on surfaces coated with fibrillar collagen. *FEBS Lett* 1981; 123:59-62.
 11. SAKARIASENN KS, BANGA JD, DE GROOT PG, SIXMA JJ. Comparison of platelet interaction with subendothelium of human renal and umbilical arteries and the extracellular matrix produced by human venous endothelial cells. *Thromb Haemost* 1984; 52:60-65.
 12. GEORGE JN, NURDEN AT, PHILLIPS DR. Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N Eng J Med* 1984; 311:1.084-1.098.
 13. BAUMGARTNER HR. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 1973; 5:167-179.
 14. BAUMGARTNER HR, MUGGLI R. Adhesion and aggregation: morphological demonstration and quantitation in vivo and in vitro. En: Gordon JL, ed. *Platelets in Biology and Pathology*. Amsterdam, Elsevier, 1976; 23-60.
 15. BAUMGARTNER HR. Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with α -chymotrypsin-digested subendothelium. *Thromb Haemost* 1977; 37:1-16.
 16. BAUMGARTNER HR, TSCHOPP TB, MEYER D. Shear rate dependent inhibition of platelet adhesion and aggregation on collagenous surfaces by antibodies to human factor VIII/von Willebrand factor. *Br J Haematol* 1980; 44:127-139.

17. ESCOLAR G, BASTIDA E, CASTILLO R, ORDINAS A. Development of a computer program to analyze the parameters of platelet-vessel wall interaction. *Haemostasis* 1986; 16:8-14.
18. SAKARIASSEN KS, AARTS PAMM, DE GROOT PG, HOUDIJK WPM, SIXMA JJ. A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix and purified components. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 522-535.
19. HOUDIJK WPM, SAKARIASSEN KS, NIEVELSTEIN PFEM, SIXMA JJ. Role of factor VIII-von Willebrand factor and fibronectin in the interaction of platelets in flowing blood with monomeric and fibrillar human collagen types I and III. *J Clin Invest* 1985; 75:531.
20. HOUDIJK WPM, SIXMA JJ. Fibronectin in artery subendothelium is important for platelet adhesion. *Blood* 1985; 65:598.
21. SAKARIASSEN KS, NIEVELSTEIN PFEM, COLLER BS, SIXMA JJ. The role of platelet membrane glycoprotein Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Br J Haematol* (en prensa).
22. WEISS HJ, TURITTO VT, BAUMGARTNER HR. Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib and storage granules. *Thromb Haemost* 1985; 54:50.
23. TURITTO VT, WEISS HJ, BAUMGARTNER HR. Decreased platelet adhesion on vessel segments in von Willebrand's disease: a defect in initial platelet attachment. *J Lab Clin Med* 1983; 102:551.
24. MARCUM JM, MCGILL M, BASTIDA E, ORDINAS A, JAMIESON GA. The interaction of platelets, tumor cells and vascular subendothelium. *J Lab Clin Med* 1980; 96:1.046-1.051.
25. BASTIDA E, ESCOLAR G, ALMIRALL L, ORDINAS A. Platelet activation induced by a human neuroblastoma tumor cell lines is reduced by prior administration of ticlopidine. *Thromb Haemost* 1986 (en prensa).
26. STEL HV, SAKARIASSEN KS, SCHOLTE BJ et al. Characterization of 25 monoclonal antibodies to factor VIII-von Willebrand factor: relationship between ristocetin-induced platelet aggregation and platelet adherence to subendothelium *Blood* 1984; 63: 1.408-1.415.

DISCUSIÓN

J. COSIN: Quería hacer un comentario de orden práctico en relación con las plaquetas. Existe en cardiología un creciente interés por la fisiología de la activación y la agregación plaquetar y su influencia en la oclusión vascular, no sólo la aguda por espasmo o por liberación de sustancias vasoactivas, sino en la crónica por aterosclerosis. De modo tradicional se administran antiagregantes en aquellas situaciones donde se sospecha que las plaquetas puedan estar activadas, por ejemplo en los pacientes con antecedentes de infarto agudo de miocardio. Esta terapéutica se administra muchas veces de forma empírica, ya que no parece existir una prueba *in vivo* que permita saber en primer lugar qué pacientes deben recibir antiagregantes y en segundo lugar qué fármacos son útiles en cada tipo de pacientes para lograr el efecto terapéutico adecuado. En consecuencia, da la impresión de que seguimos una serie de modas a la espera de una recomendación definitiva.

A. ORDINAS: Estoy totalmente de acuerdo, pero conviene tener en cuenta que nos enfrentamos a una enfermedad multifactorial que es la aterosclerosis. No se puede enfocar el problema del infarto agudo de miocardio simplemente intentando ajustar la dosis de un nuevo antiagregante mediante una prueba que sirva de orientación para administrar 500 mg

o 150 mg de ácido acetilsalicílico, diariamente o a días alternos, efervescentes o no. Los últimos estudios sobre la permeabilidad del *bypass* aortocoronario sugieren que el ácido acetilsalicílico asociado a dipiridamol es la terapia más adecuada. Sin embargo, es posible que sea la más adecuada para la prevención de la oclusión del *bypass*, pero no para la prevención de la claudicación intermitente. Opino que actualmente es imposible sentar unas recomendaciones rígidas, por lo que cada cual debe actuar de acuerdo con su propio criterio y su experiencia, ya que extrapolar las conclusiones de unos ensayos clínicos multicéntricos a los casos concretos de cada uno no es tan sencillo. Además, aparte de las plaquetas intervienen otros muchos factores.

J. COSIN: La cuestión es que la agregación plaquetaria, uno de los aspectos importantes del problema multifactorial, es algo que de modo crónico se nos escapa y al parecer se nos va a seguir escapando.

A. ORDINAS: Lamentablemente, creo que efectivamente así es.

F.J. GONZÁLEZ DE DIOS: En relación con la pregunta anterior y con respecto al ácido acetilsalicílico, ¿tiene algo que ver la diferencia de dosis? ¿Podría usted comentar este «diálogo» que se dice que existe entre la plaqueta y la pared vascular?

A. ORDINAS: Hace ya algún tiempo, al profundizar en el estudio del metabolismo de las prostaglandinas se comprobó que el producto final del mismo en la plaqueta era el tromboxano, que es un potente vasoconstrictor y además es proagregante plaquetario. Por el contrario, a nivel endotelial el metabolismo de las prostaglandinas es similar al de las plaquetas, pero el producto final en lugar de ser el tromboxano es la prostaciclina.

La prostaciclina es el antiagregante más potente que se conoce y además es un vasodilatador. Tanto el tromboxano como la prostaciclina proceden del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxigenasa, y el ácido acetilsalicílico bloquea esta enzima, con lo cual se interrumpe la síntesis de tromboxano que es nocivo porque es proagregante, pero también se bloquea la síntesis de la prostaciclina que es antiagregante. Y de aquí surge el dilema de qué dosis de ácido acetilsalicílico administrar para intentar bloquear una vía sin afectar a la otra, aunque en realidad este dilema es teórico, ya que en la plaqueta, dado que la misma carece de capacidad de síntesis de nuevas proteínas, el efecto del ácido acetilsalicílico es irreversible, mientras que en la célula endotelial el efecto se reversibiliza a las pocas horas por su capacidad de producir nuevos enzimas.

C. SERRANO: En primer lugar, me ha llamado la atención el hecho de que el hematócrito influya sobre la agregación de las plaquetas y la adherencia de éstas a la pared vascular. En este contexto mi pregunta se refiere a en qué forma el hematócrito influye sobre esta adherencia, y en segundo lugar, quisiera preguntar si los pacientes con hematócrito elevado tienen tendencia a una mayor agregabilidad y serían por tanto candidatos a un tratamiento con antiagregantes plaquetarios. Es decir, si independientemente de su mayor propensión a la trombosis por hiperviscosidad también serían candidatos a tratamiento antiagregante a efectos de influir sobre las plaquetas.

A. ORDINAS: La respuesta a la primera pregunta se basa simplemente en principios físicos. Es decir, las partículas de mayor tamaño que son los hematíes ocupan la parte central del flujo circulatorio y empujan a partículas más pequeñas, como las plaquetas, contra las paredes. Si hay pocos hematíes, las plaque-

tas circularán más por el centro, y su interacción con la pared vascular será menor.

En cuanto a la segunda cuestión, se han intentado iniciar algunos ensayos multicéntricos en pacientes con patologías tales como la hemocromatosis, que cursan con un aumento del número de hematíes. Pero curiosamente, en estos pacientes no se sabe exactamente por qué razón coincide un trombotopatía, es decir, sus plaquetas están funcionalmente alteradas. Por eso no se han continuado los estudios de antiagregación plaquetaria en dichas situaciones, que cursan con hematócrito elevado.

J.V. CASTELL: Quisiera preguntar al Dr. Ordinas si en ausencia de fibronectina tiene lugar la agregación plaquetaria *in vitro*.

A. ORDINAS: Está disminuida en mayor o menor grado, dependiendo del agente agregante utilizado. Los conocimientos que hemos adquirido sobre el papel de las glucoproteínas de membrana son gracias a que existe una patología congénita que cursa con ausencia de alguno de estos receptores. Sabemos que la glucoproteína I es muy importante para la adhesión plaquetaria, porque en una enfermedad congénita como es el síndrome de Bernard-Soulier no existe esta glucoproteína, y hay una alteración de la adhesión plaquetaria. Conocemos también el papel del factor von Willebrand cuyo déficit cursa con una prolongación del tiempo de sangría, entre otros ejemplos. Sin embargo, el déficit congénito de fibronectina no existe porque es incompatible con la vida; la fibronectina es importante no tan sólo para la hemostasia sino también para multitud de procesos.

J.V. CASTELL: Ahora bien, existen situaciones patológicas en las cuales los niveles de fibronectina son bajos. ¿De alguna forma han tenido experiencia o conocen situaciones en las cuales la fibronectina esté baja y ello se traduzca en una disminución de la agregación plaquetaria, *in vivo* en este caso?

A. ORDINAS: No, porque aunque en determinadas situaciones se han podido demostrar antigénicamente unos niveles bajos de fibronectina en plasma, la fibronectina que se libera de otros elementos celulares, independientemente del déficit plasmático, compensa el defecto, con lo cual no aparecen manifestaciones clínicas.