

15. *Wichseer, M.; J. K. Lattimer*: Evaluation of the current nephritic regimen for renal tuberculosis. J Urol 113: 676, 1975.

Recibido: 19 de noviembre de 1981.
Aprobado: 30 de diciembre de 1982.

Dr. *Rafael Pila Pérez* Lugareño # 317. Apto. 403 E/Hnos. Agüero y Martí Camagüey,

INSTITUTO DE ANGIOLOGIA

Medición espectrofotométrica de la agregación plaquetaria inducida por ADP y epinefrina

Por:

Lic. ROBERTO FANO VIAMONTE* y Téc. INES P. GONZALEZ SOSA"

Viamonte Fano, R.; I. P. González Sosa. *Medición espectrofotométrica de la agregación plaquetaria inducida por ADP y epinefrina*. Rev Cub Med 23: 1, 1984.

Se plantea que con la finalidad de tipificar y expresar cuantitativamente el fenómeno de la agregación plaquetaria inducida por ADP y epinefrina en una población supuestamente sana, hallar longitud de onda adecuada y concentración de epinefrina capaz de provocar el fenómeno de agregación plaquetaria, se realiza un estudio a una muestra compuesta de 80 *pool* de plasma rico en plaquetas. Se hallaron los límites de normalidad y los coeficientes de variación de los valores de agregación obtenidos con ADP y epinefrina. El método resultó preciso con ambos agregantes. Se discuten resultados.

INTRODUCCION

Las plaquetas están involucradas en el desarrollo de trombos en respuesta al daño vascular y la repetida formación de émbolos plaquetarios y émbolos de plaquetas y fibrina procedentes de los trombos murales; pueden ser uno de los factores que causan complicaciones clínicas de aterosclerosis.¹

† Biólogo. Laboratorio de coagulación.

* E Técnica. Laboratorio de coagulación.

Los progresos de las técnicas de exploración de las plaquetas permiten hoy un estudio mucho más fino, no sólo cuantitativo, sino cualitativo, de estos elementos. A pesar de los progresos en el estudio de las insuficiencias plaquetarias, hay que constatar las dificultades persistentes de evidenciar un hiperfuncionamiento plaquetario que podría estar correlacionado con predisposición a trombosis.²

La agregación plaquetaria con ADP y epinefrina ha sido objeto de estudio de diferentes autores,³⁻⁵ valiéndose del método fotométrico, el cual permite cuantificar el fenómeno.

Existen diferentes equipos específicos diseñados por diferentes fabricantes que cumplen este propósito; sin embargo, no todos los laboratorios que pretenden dar asistencia pueden disponer de ellos con facilidad. En los estudios de agregación plaquetaria inducida por ADP realizados por *Vainer* y *Caen*,⁶ se empleó un equipo no específico y los resultados obtenidos no fueron desdeñables.

Teniendo en cuenta los hechos precedentes y disponiendo de un espectrofotómetro sensible y de excelentes cualidades, disponible en la mayoría de los laboratorios, hemos intentado, empleando el método propuesto por *Vainer* y *Caen*, tipificar y expresar cuantitativamente el fenómeno de la agregación plaquetaria *en vivo*, inducida por ADP y epinefrina en una población supuestamente sana. Otros objetivos generales de nuestro trabajo son:

1. Hallar una longitud de onda que permita observar adecuadamente el fenómeno de agregación plaquetaria.
2. Hallar una concentración de epinefrina capaz de provocar el fenómeno de agregación plaquetaria.

MATERIAL Y METODO

La sangre fue obtenida por punción venosa, empleando como anticoagulante una solución de citrato trisódico 3,8% (una parte para 9 partes de sangre). La muestra estaba compuesta de 80 *pool* de PRP de sujetos supuestamente sanos, donantes del banco provincial de sangre de La Habana.

Plasma rico en plaquetas (PRP)

Se obtuvo centrifugando la sangre a 1 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (25°C).

Plasma pobre en plaquetas (PPP)

Se obtuvo centrifugando el sedimento de la primera centrifugación a 3 500 rpm durante 20 minutos.

Para los estudios de agregación con ADP se prepararon 40 *pool* de PRP y 40 *pool* de PPP (cada *pool* contenía plasma de 4 sujetos) procedentes de hombres y mujeres cuyos rangos de edad se encontraban entre 17 y 56 años para los hombres y 18 y 47 años para las mujeres.

Para los estudios de agregación con epinefrina, también se prepararon 40 *pool* en la forma ya descrita, y se encontraba la edad de los hombres entre 18 y 49 años y la de las mujeres entre 21 y 53 años.

Los valores promedios del número de plaquetas en las muestras empleadas para la agregación con ADP y epinefrina fueron 476×10^3 y 394×10^3 , respectivamente. Se utilizó método de *Brecher* para el recuento de plaquetas.

Para hallar la longitud de onda, se realizó la agregación con ADP (*Merck*) en una concentración de 200 ng en tres longitudes de onda diferentes [600, 610 y 640 nm].

Para hallar la concentración adecuada de epinefrina se realizó la agregación con la longitud de onda encontrada anteriormente y se ensayaron dos concentraciones diferentes de epinefrina (*Merck*) ($5 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$).

Todos los estudios de agregación fueron llevados a cabo en un espectrofotómetro SP 500 "*Pye Unicam*" según el método descrito por *Vainery Caen* (1963).

Todos los estudios fueron realizados a 20°C, aunque las muestras de PRP y PPP, la solución amortiguadora y las soluciones de ADP y epinefrina se encontraban a 38°C hasta el momento de su utilización.

El fenómeno fue estudiado considerando el porcentaje de luz transmitida a través del PRP sin el agente agregante, con éste y además el grado

de agregación fue obtenido a través de la expresión
$$\frac{(T_f - T_i) \times 100}{T_f},$$

donde T_i es el porcentaje de transmitancia observado en el PRP sin agregante y T_f es el porcentaje de transmitancia observado en el PRP después de añadir el agregante.

Los límites de normalidad (LN) se hallaron considerando $x \pm 2\text{DS}$.

El coeficiente de variación (CV) de la agregación plaquetaria con ADP se halló en un *pool* de PRP, procedente de 16 hombres, cuyas edades estaban comprendidas entre 21 y 48 años ($x = 24,6$ años), repetida 20 veces consecutivas.

El CV de la agregación plaquetaria con epinefrina se halló en un *pool* de PRP procedente de 3 mujeres, cuyas edades estaban comprendidas entre 41 y 48 años ($x = 43,3$ años) y 13 hombres de 22-43 años ($x = 30,7$ años).

RESULTADOS

Tanto en las agregaciones inducidas por ADP como en las inducidas por epinefrina, encontramos aumento del porcentaje de transmitancia en el PRP al añadir el agente agregante.

Al comparar los porcentajes de agregación inducida por ADP hallados con las tres longitudes de onda empleadas, no hallamos diferencia significativa.

Los LN y el CV fueron hallados a los resultados obtenidos con la longitud de onda 610, por haberse obtenido con la misma, una $(T_f - T_i)$ mayor que en las otras (cuadro).

CUADRO

LIMITES DE NORMALIDAD (LN) Y COEFICIENTES DE VARIACION (CV) OBTENIDOS EN LAS AGREGACIONES PLAQUETARIAS INDUCIDAS CON ADP Y EPINEFRINA

Agente	LN (%)	CV (%)
ADP	48 - 95	5,96
Epinefrina	54 - 96	4,85

$T_i \pm 7$

Tampoco hallamos diferencia significativa entre los valores de agregación obtenidos con las dos concentraciones diferentes de epinefrina. Los LN y el CV fueron hallados a los resultados obtenidos con la concentración de epinefrina 5 μ M, pues en un estudio colateral de la agregación macroscópica cualitativa inducida por ambas concentraciones,⁸ el fenómeno fue mejor observado con ésta. Los valores de $(T_f - T_i)$ observados con ambas concentraciones resultaron casi idénticos.

DISCUSION

El efecto obtenido al añadir ambos agregantes fue el esperado e igual al referido por otros autores (disminución de la DO; aumento del porcentaje de transmitancia), aunque nosotros trabajamos con los porcentajes de transmitancia y no con DO.

La elección de una longitud de onda adecuada era imprescindible por cuanto los autores del método emplearon una longitud de onda de 610 angstroms no obtenible en nuestro equipo. Los resultados hallados en cuanto a la comparación de las longitudes de onda, eran esperados, pero necesitábamos comprobarlos para elegir una de ellas.

Son distintas las concentraciones y cantidades de epinefrina empleadas en los estudios de agregación (*Sahud y Aggeler*,⁹ *Weiss et al.*, 1969; *Caen et al.*,¹⁰ *Weiss*), y de ahí la necesidad de escoger una que se ajustara a los resultados esperados (aumento de la transmitancia al añadir el agente agregante).

Nuestros resultados estadísticos nos indican que cualquiera de las dos concentraciones de epinefrina probadas podía ser escogida, pero preferimos la de 54 μ M informada por *Weiss*, 1972, por cuanto con la misma el fenómeno era mejor observado macroscópicamente.

El grado de agregación hallado por nosotros con el empleo de la expresión descrita antes, nos permite cuantificar, tipificar y hallar los LN de la agregación plaquetaria inducida por ADP y epinefrina de una población supuestamente sana. *Weiss*, 1967,

1972, expresa sus resultados en función de las DO. Otros, *Mehta et al.*¹² expresan el porcentaje de agregación como el porcentaje de transmisión de luz observado en el gráfico a los 5 minutos después de añadir el agente agregante. Nosotros expresamos el porcentaje de agregación como el porcentaje que de Tf es la diferencia de trasmittancias.

Los LN hallados para el porcentaje de agregación con ADP y epinYzina tienen valores semejantes, como pueden observarse en el cuadro. Varios autores consultados no refieren ninguno.

Los valores de los CV para la agregación inducida por ambos agentes, indican que el método tiene una precisión aceptable.

CONCLUSIONES

Analizados y discutidos los resultados obtenidos, podemos emitir las siguientes conclusiones:

- Podemos emplear longitudes de onda de 600, 610 y 640 nm, aunque debe utilizarse preferentemente la longitud de onda de 610 nm.
- Podemos emplear concentración de epinefrina 5 i M o 1 i M, aunque debe emplearse preferentemente la de mayor concentración.
- El presente método permite observar el aumento de transmisión de luz que se produce en un PRP cuando se añaden agentes agregantes como ADP y epinefrina, y nos permite cuantificar el grado de agregación que se produce en un PRP en presencia de tales agregantes.
- Sugerimos se realicen estudios bioclínicos ulteriores que permitan demostrar la utilidad de este método, o no, para formar parte de una batería de pruebas que estudie la función plaquetaria en relación con los estados pretrombótico y de trombosis establecida.

Agradecimiento

Deseamos hacer llegar nuestro agradecimiento al doctor Ramón Romero García, a la licenciada Carmen Victoria García-Viniegras y a la técnica Cristina Comas Alfonso por la ayuda prestada durante el desarrollo de este trabajo.

SUMMARY

Fano Viamontes, R.; I. P. González Sosa. *Spectrophotometric measurement of platelet aggregation induced by ADP and epinephrine*. Rev Cub Med 23: 1, 1984.

It is stated that in order to typify and quantitatively express the phenomenon of platelet aggregation induced by ADP and epinephrine in a supposedly healthy population, to find appropriate waveleght and apinephrine concentration able to produce platelet aggregation phenomenon, a study to a sample made up of 80 rich platelet plasma pool

Is carried out. Limits of normality and coefficient of variability of aggregation values obtained with ADP and epinephrine were found. Both aggregates made the method an accurate one. Results are discussed.

RÉSUMÉ

Fano Viamonte, R.; I. P. González Sosa. *Mesure spectrophotométrique de l'agrégation plaquettaire induite par ADP et épinéphrine*. Rev Cub Med 23: 1, 1984.

Afin de typifier et d'exprimer quantitativement le phénomène de l'agrégation plaquettaire induite par ADP et épinéphrine chez une population apparemment saine, et de trouver la longueur d'onde adéquate et la concentration d'épinéphrine capable de provoquer le phénomène d'agrégation plaquettaire, on étudie un échantillon composé de 80 *pool* de plasma riche en plaquettes. On a trouvé les limites de la normalité et les coefficients de variation des valeurs d'agrégation obtenues avec ADP et épinéphrine. La méthode a été précisée avec les deux agrégants. Les résultats sont discutés.

BIBLIOGRAFIA

1. *Mustard, J. F. et al.*: Platelets, thrombosis and atherosclerosis. Prog Biochem Pharmacol 13, 312-325, 1977.
2. *Samana, M.*: Plaquettes, hémostasie et thrombose. Gac Med France 85 (19): 2047-2048, 1978.
3. *Weiss, H. J.; J. et al.*: A familial defect in platelet function associated with impaired reaction. Studies on six unrelated patients. Blood 39, 187, 1972.
4. *Weiss, H. J.; J. Rogers*: Thrombocytopathia due to abnormalities in platelet release of adenosine diphosphate. N Engl J Med 281, 1264, 1969.
5. *Bernt, L. et al.*: A syndrome of Factor VII deficiency and abnormal platelet release reaction. Scand J Haematol 21, 206-214, 1978.
6. *Vainer, H.; J. Caen*: Utilisation d'un test photométrique pour l'étude de l'effet de l'ADP sur les plaquettes sanguines. Nouv Rev Fr Hematol 3, 149-158, 1963.
7. *Wintrobe, M. M.*: Hematología Clínica. Edición Revolucionaria. Instituto Cubano del Libro. Tercera Ed. La Habana.
8. *González Sosa, I. P.; R. Fano Viamonte*: Agregación plaquetaria cualitativa: comparación de dos agregantes. Instituto de Angiología, 1980.
9. *Sahud, M. A.; P. A. Aggeler*: Platelet dysfunction-differentiation of a newly recognized primary type from that produced by aspirin. N Engl J Med 280, 453, 1969.
10. *Caen, J. P. et al.*: A new familial platelet disease. Lancet 1, 203, 1968.
11. *Heiss, H. J.*: Platelet aggregation, adhesion and adenosine diphosphate release in thrombopathia (platelet factor III deficiency). Am J Med 4-3, 570, 1967.
12. *Mehta, J. et al.*: Platelet aggregation in aortic and coronary venous blood in patient with and without coronary disease. 3. Role of tachycardia stress and propranolol. Circulation 5, 881, 1978.

Recibido: 23 de abril de 1982.

Aprobado: 28 de abril de 1982.

Lic. *Roberto Fano Viamonte* Maceo
258, Campo Florido Ciudad de La
Habana.