

INSTITUTO DE ANGIOLOGIA

Concentraciones mínimas de agregantes plaquetarios capaces de inducir respuesta en una muestra sana

Por:

Lic. ROBERTO FANO VIAMONTE* y Téc. MARITZA GARCIA RODRIGUEZ**

Fano Viamonte R.; M. García Rodríguez. *Concentraciones mínimas de agregantes plaquetarios capaces de inducir respuesta en una muestra sana*. Rev Cub Med 23: 5, 1984.

Con los objetivos de hallar las menores concentraciones finales de ADP y epinefrina capaces de inducir registros bifásicos y la menor concentración de extracto de tendón bovino que origine una respuesta elocuente en un *pool* de plasmas y conocer sus efectos en una muestra supuestamente sana, se estudian varios *pool* y una muestra de hombres y mujeres supuestamente sanos. Las concentraciones finales de ADP, epinefrina y extracto de tendón bovino obtenidas en *pool* de plasma fueron 7,5 x 1(H m, 1 x 1(H m y extracto puro, respectivamente. La agregación inducida con extracto puro de tendón fue la más precisa de las tres técnicas. En la muestra control, los valores promedios de agregación con ADP, epinefrina y colágeno resultaron ser $46 \pm 11,8$; $55,8 \pm 20$ y $44 \pm 25,3$, respectivamente. Se discuten los resultados.

INTRODUCCION

Actualmente la prueba más empleada para explorar la función de las plaquetas es la determinación de la agregación plaquetaria a través del método turbidimétrico de Born,¹ usando equipos específicos llamados agregómetros; existen diversos modelos de este equipo, pero todos poseen en común una fuente luminosa, un sistema de agitación continua, un sistema de calentamiento termostataado y un aparato de registro gráfico.

* Biólogo, sección trombosis. Departamento de bioquímica. Instituto de Angiología.

** Técnica de laboratorio clínico, sección trombosis. Departamento de bioquímica.
Instituto de Angiología.

La intensidad de la agregación y la dinámica del fenómeno son apreciados a través de las variaciones de densidad óptica del plasma rico en plaquetas.

La agregación es inducida por diversas sustancias, tales como ADP, epinefrina, trombina colágeno y otras, cuyas concentraciones finales de utilización son variables. Estas variaciones en las concentraciones finales de los agentes agregantes empleados se deben principalmente a los diseños seguidos por los diferentes investigadores en sus estudios.

Entre los criterios seguidos para interpretar las curvas de agregación están: medida de la pendiente de la primera fase, medida del tiempo de latencia para la agregación con colágeno, agregación máxima observada para un tiempo constante, concentración necesaria de inductor para obtener el aspecto bifásico y medida de la desagregación.²

Debido a la pluralidad de criterio existentes entre los investigadores en cuanto a la concentración final del sistema biológico objeto de estudio, nos hemos propuesto el presente trabajo, cuyos objetivos son los siguientes:

1. Hallar las menores concentraciones finales de ADP y epinefrina capaces de inducir registros bifásicos, así como la menor concentración de extracto de tendón bovino que origine una respuesta elocuente en un *pool* de plasma.
2. Determinar la precisión de las técnicas con cada agregante.
3. Estudiar sobre una muestra de sujetos supuestamente sanos, el efecto de las concentraciones finales de agregantes halladas en un *pool* de plasmas.

MATERIAL Y METODO

Reactivos

ADP: ácido adenosin-5-difosfático sal trisódica (Merck)

Epinefrina: L'adrenalina cristalizada (Merck).

Extracto de tendón bovino: Se preparó en nuestro laboratorio a partir de tendón bovino obtenido de reses recién sacrificadas en el matadero "Ciro Redondo" de Ciudad de La Habana.

Se limpiaron los tendones y se pesó 1 g de los mismos, depositándolo en una batidora que contenía 30 ml de *tampon* tyroides diluido 1/20 en agua destilada. Se batió en etapas de 30 seg con reposo de 30 seg, durante diez minutos. El producto obtenido se filtró a través de tres capas de gasa fina y se envasó en alícuotas de 500 μ l, las cuales se mantuvieron a -20°C hasta el momento de ser usadas.

Sangre: la sangre empleada tanto en la serie de experiencias previas como en la normalización de las técnicas de agregometría, era procedente de donantes del Banco Provincial de Sangre de Ciudad de La Habana, extraída por punción venosa en el antebrazo y colectada en citrato trisódico 3,8% en la proporción 1/10 en tubos de vidrio sili- conados.

Plasma rico en plaquetas (PRP): Se obtuvo centrifugando la sangre a 1 000 rpm durante cinco minutos. Las plaquetas se contaron con microscopio de contraste de fase según el método Brecher y su número promedio fue de $290 \times 10^3/\text{mm}^3$.

Plasma pobre en plaquetas (PPP): Se obtuvo al centrifugar a 3 500 rpm, durante 20 min. el sedimento remanente de la primera centrifugación.

Para obtener concentraciones de ADP y extracto de tendón bovino capaces de inducir agregación, se procedió a probar concentraciones de ADP y diluciones de extracto de tendón en orden creciente frente a volúmenes fijos de *pool* de PRP (200 μl) y agente agregante (100 μl). No fue necesario realizar esta experiencia con epinefrina, pues en ensayos previos realizados, aceptamos como adecuada la concentración de 5×10^{-3} M utilizada por *Anaya et al.*³

Posteriormente, para hallar las concentraciones finales de los inductores, procedimos a probar concentraciones y volúmenes fijos de los mismos sobre una serie de volúmenes de *pool* de PRP de sujetos supuestamente sanos.

El criterio seguido por nosotros para interpretar las curvas fue: hallar la menor concentración final de inductor con la cual obtener agregogramas bifásicos con el empleo de ADP y epinefrina y agregogramas elocuentes, empleando extracto de tendón.

Encontradas las concentraciones finales de inductores que satisficieran nuestro criterio de interpretación, la probamos en una muestra de sujetos supuestamente sanos, compuesta de 36 hombres (edad promedio 30 años) y cuatro mujeres (edad promedio 28 años) para conocer su efecto sobre la misma.

Los cálculos de los porcentajes de agregación se realizaron teniendo en cuenta que el papel está dividido en diez partes. La división 1 corresponde al 0% calibrado con PRP y la división 9 corresponde al 100% calibrado con PPP. El valor de agregación máxima obtenido a los cuatro minutos después de añadir el inductor, se halló dividiendo el número de divisiones alcanzadas, entre el número de divisiones que corresponde al 100% y multiplicando el cociente $\times 100$, para expresar el resultado en porcentaje.

Para hallar la precisión de las técnicas, se repitieron las mismas 20 veces sucesivas sobre un *pool* de PRP diferente para cada inductor.

Se comprobó si los valores de agregación obtenidos en la muestra supuestamente sana seguían una distribución estadística normal.

RESULTADOS

La búsqueda de una concentración de ADP y de una dilución de extracto de tendón capaces de inducir agregación, nos condujo a los resultados señalados en el cuadro I. Todas las concentraciones de ADP fueron capaces de agregar en mayor o menor grado. Puede observarse que las concentraciones 25 μM y 50 μM indujeron agregación, pero más tarde se produjo desagregación. Aceptamos como buena la concentración de ADP 60 μM . La dilución pura de extracto de tendón bovino fue la única que indujo agregación.

Los resultados obtenidos en la búsqueda de las concentraciones finales de los inductores empleando 50 μl de las mismas en concentraciones 60 μM de ADP, 5×10^{-3} M de epinefrina y extracto puro de tendón sobre diferentes volúmenes de PRP se muestran en el cuadro II. Nótese que a mayores volúmenes de PRP correspondían menores porcentajes de agregación. En el volumen de 200 μl se obtuvieron magníficos agregogramas con los tres agentes. El registro bifásico de 56,3% (gráfico 1), obtenido con epinefrina 5×10^{-3} M cumple con el criterio de interpretación elegido por nosotros. De igual modo sucede con el registro de 37,5% (gráfico 2), obtenido con extracto puro de tendón. Con 50 de ADP 60 μM encontramos que los registros hallados en 300 y 400 μl de PRP evocaban segundas olas de agregación que no se definían totalmente.

| Concentración | ADP | | Extracto de tendón | |
|-------------------|-----|-----------|--------------------|-----------|
| | | Respuesta | Dilución | Respuesta |
| 25 μM | | 35 % * | 1/32 | No hay |
| 50 μM | | 41,3% * | 1/16 | No hay |
| 60 μM | | 56,2% | 1/8 | No hay |
| 100 μM | | 63,8% | 1/4 | No hay |
| 125 μM | | 67,5% | 1/2 | No hay |
| 200 μM | | 73,8% | Puro | 37,5 % |

* Se produjo desagregación
TI-10
Instituto de Angiología, 1982

CUADRO II

AGREGACIONES OBTENIDAS EMPLEANDO 50 μ l DE INDUCTOR SOBRE DIFERENTES VOLUMENES DE PRP

| Volumen de PRP | ADP 60 μ m Respuesta | Epinefrina 5 x 10 ⁻³ m Respuesta | Extracto de tendón puro, respuesta |
|----------------|--------------------------|---|------------------------------------|
| 200 l | 96,3 % | 56,3 % * | 37,5 % |
| 300 l | 71,3 % | No hay | 12,5 % |
| 400 l | 55 % | No hay | 3,8 % |
| 500 l | No hay | No hay | 1,3 % |
| 600 l | No hay | No hay | 1,3 % |
| 700 l | No hay | 8,7 % | No hay |
| 800 l | No hay | No hay | No hay |

Gráfico 1
CONCENTRACIONES MINIMAS DE AGREGANTES

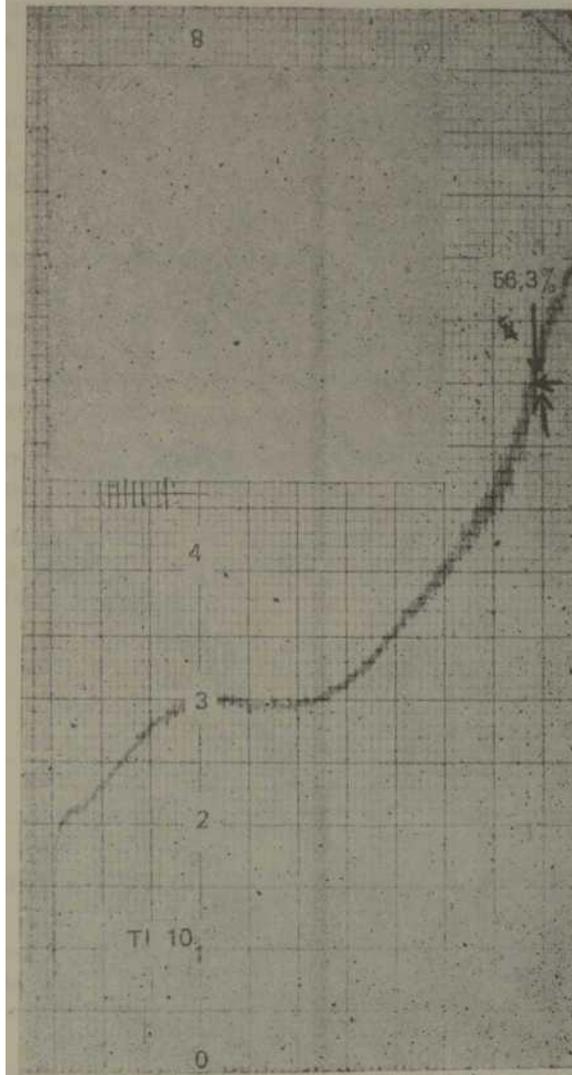
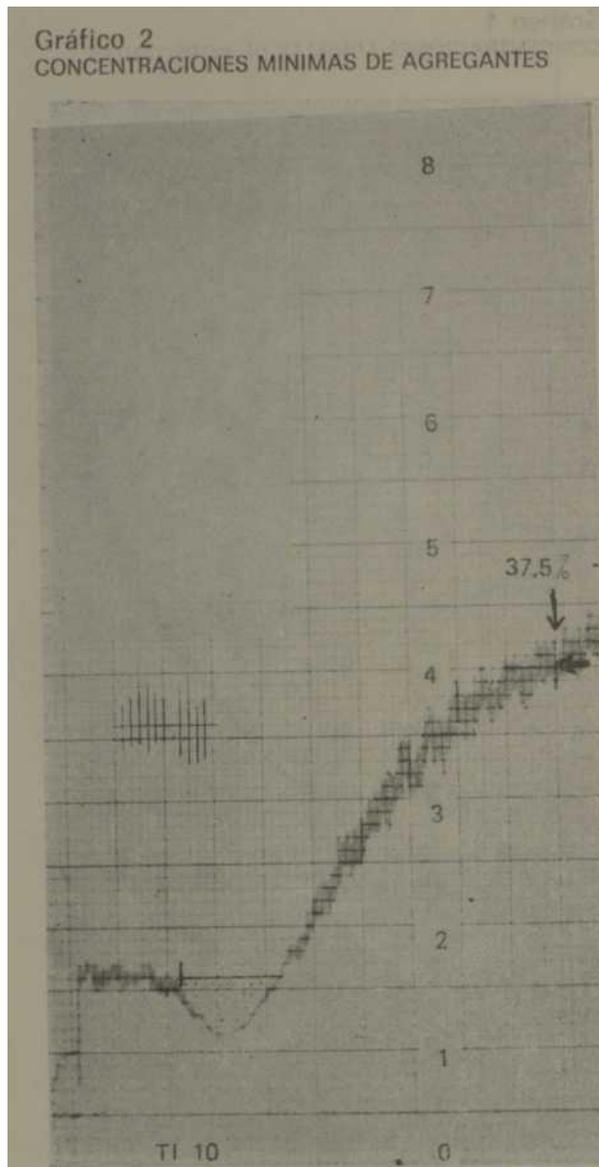


Gráfico 2
CONCENTRACIONES MINIMAS DE AGREGANTES



Tuvimos en cuenta esas respuestas discretas y preparamos ocho volúmenes de PRP intermedios entre 300 y 440 μ l, para encontrar en cuál de ellos se originaba bien definido, el registro bifásico evocado. El mismo se reveló (gráfico 3) con 350 μ l de PRP y tradujo un 52,5% de agregación a los cuatro minutos de añadirse el ADP. Así, pues, las concentraciones finales de ADP, epinefrina y extracto de tendón capaces de satisfacer nuestro criterio de interpretación de los registros de agregación, son $7,5 \times 10^{-6}$ m, 1×10^{-3} m y extracto puro, respectivamente (cuadro III).

La precisión de las técnicas, expresada en forma del coeficiente de variación (CV), fue de 22%, 17% y 10,3% para ADP, epinefrina y extracto de tendón, respectivamente.

Los diferentes tipos de respuestas encontradas en la muestra de 40 sujetos supuestamente sanos, al añadir los inductores en las concentraciones finales determinadas en *pool* de PRP se señalan en el cuadro IV. De 40 registros inducidos con ADP, sólo se obtuvieron siete curvas bifásicas; con epinefrina los resultados fueron mejores (21 curvas bifásicas de 40 posibles), pero igualmente insuficientes y con extracto de tendón dos sujetos no agregaron.

Los porcentajes de agregación obtenidos con cada inductor siguen una distribución estadísticamente normal.

Los valores promedios de agregación (\bar{x}) y las desviaciones típicas (DT) obtenidas con los tres agregantes sobre la muestra supuestamente sana se señalan en el cuadro V.

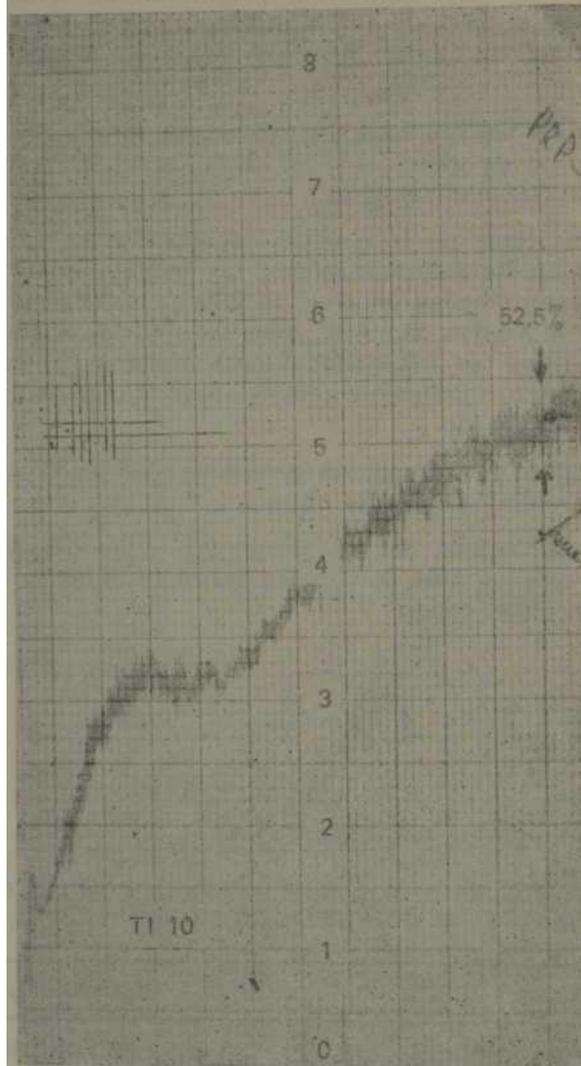
CUADRO III

CONCENTRACIONES FINALES DE LOS INDUCTORES QUE CUMPLEN CON EL CRITERIO DE INTERPRETACION ELEGIDO

| Inductor | Concentración final |
|-------------------------|--|
| ADP | $7,5 \times 10^{-6}$ m en 350 μ l de PRP |
| Epinefrina | 1×10^{-3} m en 200 μ l de PRP |
| Extracto puro de tendón | 50 μ l en 200 μ l de PRP |

TI-10.
Instituto de Angiología, 1982.

Gráfico 3
CONCENTRACIONES MINIMAS DE AGREGANTES



CUADRO IV

TIPOS DE RESPUESTAS ENCONTRADAS EN LA MUESTRA SUPUESTAMENTE SANA

| Inductor | Respuesta | | | | Total |
|--------------------|------------|----------|---------------|---------------|-------|
| | Monofásica | Bifásica | Desagregación | No. agregaron | |
| ADP | 27 | 7 | 6 | — | 40 |
| Epinefrina | 11 | 21 | 8 | — | 40 |
| Extracto de tendón | 38 | — | — | 2 | 40 |

Instituto de Angiología, 1982.

CUADRO V

VALORES PROMEDIOS (\bar{x}) Y DESVIACIONES TÍPICAS (DT) DE LA AGREGACION PLAQUETARIA INDUCIDA CON ADP, EPINEFRINA Y EXTRACTO DE TENDON

| Inductor | \bar{x} | DT |
|--------------------|-----------|------|
| ADP | 46 | 11,8 |
| Epinefrina | 55,8 | 20 |
| Extracto de tendón | 44 | 25,3 |

TI-10.
Instituto de Angiología, 1982.

DISCUSION

Ya hemos señalado que las concentraciones de los diferentes agregantes empleados por los investigadores son muy variadas. Las concentraciones finales de ADP, $7,5 \times 10^{16}$ m, de epinefrina, 1×10^{13} m de extracto de tendón hallados por nosotros en *pool* de PRP y aceptados para nuestro propósito difieren de las de otros autores,^{4,6} aunque pertenecen al mismo orden de la molaridad empleada.

El volumen de 50 ul de agregante elegido por nosotros es semejante al usado por otros investigadores.^{3,7}

En nuestras experiencias realizadas previamente sobre *pool* de PRP para elegir las concentraciones finales de agregante, elegimos como umbrales aquellas con las cuales pudieran obtenerse registros bifásicos empleando ADP y epinefrina, pues se ha señalado que el importante papel del ADP intrínseco se demuestra a través del patrón bifásico de agregación, que se origina cuando las plaquetas son agitadas en presencia de epinefrina y norepinefrina y con concentraciones críticas de ADP (Weiss, 1969). Así pues, si existen desórdenes hemorrágicos relacionados con defectos en la liberación de ADP no metabólico, pensamos que un exceso en la liberación de este nucleótido, podría ser, entre otros, un factor importante en el desarrollo del evento trombótico, que es su contrapartida, y su efecto se nos podría revelar con registros bifásicos o monofásicos significativamente mayores a los patrones bifásicos obtenidos en una muestra supuestamente sana. Sin embargo, cuando empleamos sobre una muestra control las concentraciones finales de inductores halladas en *pool de plasmas*, obtuvimos resultados que no nos complacen, ya que con ADP, sólo se obtuvieron siete curvas bifásicas (17,5%) y con epinefrina 21, que representa el 52,5%. Los resultados obtenidos con el extracto puro de tendón tampoco nos satisfacen: dos sujetos no agregaron, esto hizo que la DT se elevara a 25,3. Logan *et al*,⁸ reportan que en 48 PRP de sujetos controles en los que se indujo agregación con epinefrina, se registraron 31 curvas bifásicas, ocho monofásicas y nueve sujetos no agregaron. No obstante, nuestros resultados nos indican que la elección de la menor concentración final de ADP y epinefrina que origine registros bifásicos y la menor de extracto de tendón que origine una curva de agregación elocuente, debe ser hallada a partir de PRP de controles individuales y no a partir de *pool* de PRP control, porque parece que la respuesta individual de cada sujeto supuestamente sano no concuerda en muchas ocasiones con el criterio de sanidad escogido, lo cual trae como consecuencia que obtengamos valores extremos muy distantes entre sí, y aún más, casos que no responden o lo hacen muy pobremente a los inductores.

Sólo la agregación plaquetaria inducida con extracto puro de tendón resultó precisa. En la literatura consultada no se reportan valores de precisión para estas técnicas, lo cual nos impide hacer comparaciones.

Ya hemos expresado que son numerosos los criterios seguidos en los estudios de agregación plaquetaria. Algunos autores⁹ han señalado que la variabilidad de las técnicas y de los criterios empleados hacen difícil la comparación de los resultados entre los diferentes investigadores.

David *et al*,¹⁰ reportan un valor promedio de 45 ± 15 para la agregación inducida con ADP, mientras Anaya *et al* (1977), reportan valores de $87 \pm 9,1$; $91 \pm 6,6$ y $88 \pm 4,3$ obtenidos con ADP, epinefrina y colágeno, respectivamente, en un laboratorio de referencia. No nos fue posible comparar nuestros valores con los reportados por Sagel *et al*,¹¹ Dougherty *et al* (1977), Instituto de Hematología (Cuba) y otros, debido a los criterios y procedimientos (concentración final, cálculos de porcentajes de agregación) seguidos por los mismos en sus estudios.

CONCLUSIONES

1. Se hallaron las menores concentraciones finales de ADP y epinefrina capaces de inducir registros bifásicos y la menor concentración de extractos de tendón bovino capaz de originar una respuesta elocuente en un *pool* de PRP.
2. La agregación inducida con extracto de tendón es la más precisa de las tres y la única aceptable estadísticamente.
3. Los porcentajes de agregación hallados con los tres inductores siguen una distribución estadísticamente normal.
4. Deben realizarse estudios ulteriores encaminados a hallar las concentraciones finales de inductores sobre PRP de controles individuales.
5. Deben realizarse estudios ulteriores en los cuales se profundice acerca de las diferencias individuales encontradas en los plasmas controles estudiados, así como la no concordancia entre el criterio de sanidad elegido y la respuesta encontrada.

SUMMARY

Fano Viamonte, R.; M. García Rodríguez. *Minimal concentrations of platelet aggregating agents able to induce response in a healthy sample*. Rev Cub Med 23: 5, 1984.

In order to find minor final concentrations of ADP and epinephrine able to induce biphasic records and minor concentration of extract of bovine tendon originating an eloquent response in plasma pool and to know its effects in a supposedly healthy sample, several pool and a sample of supposedly healthy men and women, are studied. Final concentrations of ADP, epinephrine and extract of bovine tendon obtained in plasma pool were $7,5 \times 10^{-6}$ M, 1×10^{-3} M and pure extract, respectively. Aggregation induced with pure extract of tendon was the most accurate of the three techniques. In the control sample, aggregation mean values with ADP, epinephrine and collagen resulted: $46 \pm 11,8$; $55,8 \pm 20$; and $44 \pm 25,3$, respectively. Results are discussed.

RÉSUMÉ

Fano Viamonte, R.; M. García Rodríguez. *Concentrations minimales d'agrégants plaquet-taires capables d'induire une réponse chez un échantillon sain*, Rev Cub Med 23: 5, 1984.

Les auteurs étudient des *pools* de plasma et un échantillon composé par des hommes et des femmes supposément sains dans le but de trouver les moindres concentrations finales de ADP et d'épinéphrine capables d'induire des registres biphasiques et la moindre concentration d'extrait de tendon de bovin qui donne lieu à une réponse éloquentes dans un *pool* de plasma et elle permet de connaître leurs effets sur un échantillon supposément sain. Les concentrations finales de ADP, épinéphrine et extrait de tendon bovin obtenus en *pool* de plasma ont été $7,5 \times 10^{-6}$ M, 1×10^{-3} M et extrait pur de tendon a été la plus précise des trois techniques. Les valeurs moyennes d'aggrégation avec ADP, épinéphrine et collagène trouvées dans l'échantillon contrôle ont été: $46 \pm 11,8$; $55,8 \pm 20$ et $44 \pm 25,3$, respectivement. Les résultats sont discutés.

BIBLIOGRAFIA

1. *Born, G. U. R.*: Agregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194: 927-929, 1962.
2. *Migne, J.*: Comunicación personal.
3. *Anaya, R. et al.*: Valores normales de agregación plaquetaria en población mexicana. *Rev Invest Clin* 29: 127-135, 1977.
4. *Sahud, M. A.; P. A. Aggeler*: Platelet dysfunction. Differentiation of newly recognized primary type from that produced by aspirin. *Engl J Med* 280 (9): 453, 1969.
5. *Weiss, H. J. et al.*: A familial defect in platelet function. Associated with impaired release of adenosine diphosphate. *N Engl J Med* 281 (23): 1264, 1969.
6. *Daugherty, J. H. et al.*: Platelet activation in acute cerebral ischaemia. (Serial measurements of platelet function in cerebrovascular disease). *Lancet*, April, Pp. 821-823, 1977.
7. *Ly, B. et al.*: A syndrome of Factor VII deficiency and abnormal platelet release reaction. *Scand J Haematol* 21: 206, 1978.
8. *Logan, L. J. et al.*: Albinism and abnormal platelet function. *N Engl J Med* 284 (24): 1340, 1971.
9. *Cristol, R. et al.*: Etude pluriparamétrique du comportement plaquettaire dans un groupe d'artériopathies des membres inférieurs. *Union Med Can* 107 (10): 1-5, octubre, 1978.
10. *Davis, J. W. et al.*: Platelet aggregation. Adult-onset Diabetes Mellitus and coronary artery disease. *JAMA* 239 (8): 732, 1978.
11. *Sagel, J. et al.*: Increased platelet aggregation in early Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med* 82: 733-738, 1975.

Recibido: 24 de agosto de 1983

Aprobado: 15 de diciembre de 1983.

Lic. *Roberto Fano Viamonte*
Instituto de Angiología
Calzada del Cerro No. 1551
Cerro. Ciudad de La Habana.