

T.D.  
G/93

# ALTERACIONES LA FUNCION

## PLAQUETARIA

### INDUCIDAS EN CIRUGIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 83 número 103 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 18 III 1990

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Alena Caffite*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

JOSE GONZALEZ CAMPOS

Depositado en

la  
esta Universidad desde el día  
sta el día

Sevilla de

de 19

EL DIRECTOR DE



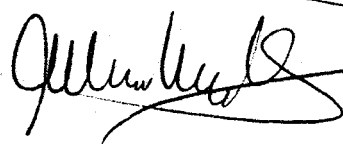

Servicio Andaluz de Salud.  
HOSPITAL UNIVERSITARIO  
"VIRGEN MACARENA"  
SEVILLA

JUNTA DE ANDALUCIA  
Consejería de Salud

MANUEL CONSTANTINO BERMEJO, Profesor Asociado y  
Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospi-  
tal Universitario Virgen Macarena

C E R T I F I C A que D. JOSE GONZALEZ CAMPOS ha estado  
realizando en este Servicio y bajo su  
dirección, el estudio titulado "ALTERACIONES DE LA FUNCION  
PLAQUETARIA INDUCIDAS EN CIRUGIA", trabajo que presenta pa-  
ra la obtención del grado de Doctor.

Sevilla, cinco de Julio de mil novecientos noventa.





AVDA. DR. FEDRIANI S/N  
SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
DIRECCION

RAMON PEREZ CANO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA:

AUTORIZA: a D. José González Campos, Licenciado en Medicina y  
Cirugía, a presentar el trabajo titulado "ALTERACIONES DE LA FUNCION  
PLAQUETARIA INDUCIDAS EN CIRUGIA", para optar al título de Doctor  
en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla a seis de Julio  
de mil novecientos noventa.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
Departamento de Medicina  
DIRECCION  
Prof. Dr. R. Pérez Cano

Fdo.: R. Pérez Cano

DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

0. INDICE.

I. INTRODUCCION.	1
1. Conceptos generales sobre hemostasia.	1
1.1. Vasoconstricción localizada.	2
1.2. Formación del trombo plaquetario.	2
1.3. Formación del trombo de fibrina -- Coagulación.	3
1.3.1. Factores de la coagulación.	4
1.3.2. Proceso de la coagulación.	7
1.3.2.1. Activación de la protrombina.	9
1.3.2.1.1. Vía extrínseca de la coagulación.	9
1.3.2.1.2. Vía intrínseca de la coagulación.	10
1.3.2.2. Formación de la trombina.	11
1.3.2.3. Formación de la fibrina.	12
1.3.3. Mecanismos de control.	13
1.3.3.1. Inhibidores de la coagulación.	14
1.3.3.2. Mecanismos de retroalimentación.	16
2. Morfología.	18
2.1. Zona periférica.	19
2.1.1. Glucocáliz.	20
2.1.2. Membrana plasmática.	21
2.1.3. Zona submembranosa.	22
2.2. Zona sol-gel.	22
2.2.1. Microtúbulos.	23
2.2.2. Microfilamentos.	24
2.3. Zona de orgánulos.	25
2.3.1. Cuerpos densos.	25
2.3.1.1. Contenido.	27
2.3.1.2. Origen.	29

2.3.1.3. Mecanismo de secreción.	29
2.3.2. Gránulos alfa.	30
2.3.2.1. Contenido.	31
2.3.2.2. Origen.	31
2.3.2.3. Mecanismo de secreción.	32
2.3.3. Lisosomas.	32
2.3.3.1. Contenido.	33
2.3.3.2. Origen.	33
2.3.3.3. Mecanismo de secreción.	33
2.4. Sistema interno de membranas.	36
3. Funcionalismo plaquetario.	38
3.1. Interacción plaqueta-superficie vascular.	38
3.2. Cambio de forma y extensión plaquetaria.	42
3.3. Agregación plaquetaria.	22
3.3.1. Proceso de agregación.	45
3.3.2. Vías de la agregación.	48
3.4. Reacción de liberación.	50
4. Interacciones plaquetas-plasma.	55
4.1. Factores de la coagulación de la plaqueta	56
4.1.1. Factores de contacto.	58
4.1.2. Factores activadores de la protrombina.	59
4.1.3. Fibrinógeno.	60
4.1.4. Factor de von Willebrand.	61
4.2. Mecanismos plaquetarios de activación de la coagulación.	61
4.3. Acciones de la vía de la coagulación sobre la plaqueta.	65

5. Proteínas anti-heparina.	67
5.1. Descubrimiento de las proteínas anti-heparina.	67
5.2. Beta-Tromboglobulina.	70
5.3. Factor Plaquetario 4.	73
5.4. Significación clínica.	76
5.5. BTG y FP 4 en diversos estados patológicos.	77
6. Fisiología del postoperatorio.	81
6.1. Efectos metabólicos del trauma.	83
6.2. Respuesta catabólica a la intervención.	86
6.3. Metabolismo del potasio.	88
6.4. Déficit calórico.	89
6.5. Efectos catabólicos sobre los tejidos muscular y adiposo.	89
6.6. Alteraciones de la hemostasia tras la cirugía.	91
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	94
III. MATERIAL Y METODOS.	96
1. Selección de pacientes y obtención de muestras.	96
1.1. Selección de pacientes.	96
1.2. Obtención de muestras.	99
2. Técnicas de laboratorio.	103
2.1. Agregación plaquetaria.	103
2.1.1. Fundamento del método.	103
2.1.2. Reactivos y aparataje.	103
2.1.3. Método de trabajo.	105
2.1.3.1. Obtención de plasma rico en plaquetas.	105

2.1.3.2. Obtención de plasma pobre en plaquetas.	106
2.1.3.3. Método de trabajo.	106
2.1.4. Resultados.	109
2.1.4.1. Interpretación de curvas de agregación.	109
2.2. BTG y FP 4.	112
2.2.1. Fundamento del método.	112
2.2.2. Reactivos.	115
2.2.3. Método de trabajo.	116
2.2.3.1. Obtención de muestras.	116
2.2.3.2. Preparación de los reactivos.	117
2.2.3.3. Procesamiento de las muestras.	119
2.2.3.4. Elaboración de la curva de calibración.	121
2.2.3.5. Pruebas de optimización.	122
2.2.3.6. Observaciones.	122
2.2.4. Resultados.	123
2.3. Métodos estadísticos.	123
 IV. RESULTADOS.	 124
1. Análisis estadístico descriptivo.	124
1.1. Valores obtenidos antes de la intervención.	126
1.2. Valores obtenidos después de la intervención.	128
1.3. Valores obtenidos de controles sanos.	130
2. Comparación de los enfermos con los controles.	131
3. Comparación entre los valores obtenidos antes y después de la intervención.	133
4. Comparación de los valores obtenidos en los distintos subgrupos.	133





V. DISCUSION.	166
1. Estadística descriptiva.	167
1.1. Agregación plaquetaria.	167
1.2. BTG y FP 4.	174
2. Comparación de los pacientes con los controles.	176
3. Comparación pre-postintervención.	178
4. Comparación entre grupos.	180
5. Comparación con estudios anteriores.	182
VI. CONCLUSIONES.	185
VII. RESUMEN.	187
VIII. BIBLIOGRAFIA.	190

## I. INTRODUCCION.

## 1. CONCEPTOS GENERALES SOBRE HEMOSTASIA.

Se entiende por hemostasia el proceso encaminado a mantener la integridad del árbol vascular, evitando y corrigiendo alteraciones y obstrucciones en alguno de sus segmentos (1, 2, 3).

En la hemostasia profiláctica la resistencia parietal de los vasos desempeña el papel principal, pero también intervienen, contribuyendo al adecuado mantenimiento del endotelio vascular, las plaquetas y los factores de la coagulación.

La hemostasia correctora, a la cual nos referimos normalmente cuando usamos este nombre, puede subdividirse a su vez en las siguientes fases:

- 1) Vasoconstricción localizada a nivel del área afectada.
- 2) Formación de un trombo plaquetario sobre la superficie vascular lesionada.
- 3) Formación de fibrina que refuerza el trombo plaquetario.
- 4) Eliminación de los depósitos de fibrina.

### 1.1. Vasoconstricción localizada.

Después de la incisión vascular se produce una vasoconstricción inicial, resultado de la estimulación por mecanismos reflejos de terminaciones simpáticas en la musculatura lisa de la pared de los vasos. Este fenómeno es suficiente para cohibir la hemorragia cuando se trata de pequeños vasos.

Después de esta fase inicial se produce una vasoconstricción secundaria mediada probablemente por adrenalina, serotonina y tromboxanos, sustancias liberadas por las plaquetas activadas. Sin embargo, no se ha demostrado que esta vasoconstricción secundaria juegue un papel importante.

### 1.2. Formación del trombo plaquetario.

En ella intervienen de forma primordial las plaquetas, y por ser éstas el objeto principal de este estudio se tratará con mayor profundidad más adelante.

### 1.3. Formación del trombo de fibrina -- Coagulación.

La coagulación sanguínea es una modificación del estado físico del plasma que consiste en el paso de un estado líquido a un estado de gel. Esta transformación es debida a la modificación de una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno, que se transforma en una red insoluble de fibrina, encierra entre sus mallas los elementos formes de la sangre (hematíes y leucocitos) y refuerza el trombo plaquetario ya formado para detener de forma definitiva la hemorragia.

McFarlane por una parte (4), y Davie y Ratnoff por otra (5), propusieron en 1964 una teoría según la cual el proceso de coagulación consistía en una serie de reacciones enzimáticas, en la que cada componente actúa como sustrato del inmediatamente superior y es enzima del inmediatamente inferior. Este proceso continúa hasta que el fibrinógeno se transforma en fibrina, y por ello recibe el nombre de reacción en cascada.

En todo este proceso intervienen una serie de compuestos conocidos como factores de la coagulación, los cuales van a ser expuestos a continuación antes de explicar toda la cascada enzimática.

### 1.3.1 Factores de la coagulación.

Todos los factores plasmáticos de la coagulación se encuentran contenidos en la fracción globulínica del plasma, y se pueden ver en la TABLA I junto con algunas de sus propiedades. Con respecto a éstas pueden ser divididos en tres grupos (6, 7, 8, 9):

#### 1) Factores de la coagulación vitamina K-dependientes.

Son los factores II, VII, IX, y X, así como las proteínas S y C del sistema fibrinolítico.

Son sintetizados por las células del parénquima hepático. Todos ellos poseen en su estructura el aminoácido gamma-carboxiglutámico, que es donde se fija el calcio durante el proceso de la coagulación.

En caso de ausencia de vitamina K (malabsorción, obstrucción biliar o empleo terapéutico de anticoagulantes orales con acción antagonista), la síntesis de estos factores persiste, pero el aminoácido gamma-carboxiglutámico es sustituido por el glutámico. Como consecuencia de este cambio de aminoácido estos factores pierden su actividad fisiológica, ya que desaparece su capacidad para unirse al calcio, la cual es fundamental

TABLA IFACTORES DE LA COAGULACION

NOMBRE			CONC. PLASMA (mcg/ml)	P. MOLEC. (X 1000)
I	Fibrinógeno	&	3000	344
II	Protrombina	*	100	72.5
V	Proacelerina	&		350
VII	Proconvertina	*	2	53
VIII	F. antihemofílico A	&	5-10	860
IX	F. antihemofílico B	*	3-5	57
X	F. Stuart-Prower	*	6-8	55
XI	F. antihemofílico C	+	6	160
XII	F. Hageman	+	30	170
XIII	F. estabil. fibrina	&		80
	F. Fletcher o precalicreina		50	320
	F. Fitzgerald o HMWK		70	110

\*: Factores vitamina K-dependientes

&: Factores sensibles a la trombina

+: Factores de contacto

para que pueda realizar su función.

## 2) Factores de la coagulación sensibles a la trombina.

Se trata del fibrinógeno o factor I, factor V, factor VIII y factor XIII.

Todos estos factores son activados directamente por la trombina. Normalmente no se encuentran en el suero, excepto el factor XIII, que se halla a muy baja concentración.

## 3) Factores de contacto.

Este grupo está formado por los factores XI y XII, la precalicreína y el quinínogeno de alto peso molecular (HMWK).

Intervienen en las primeras fases de la coagulación, en la formación de cininas y en el inicio del proceso de fibrinolisis. Normalmente se encuentran en el suero.



#### 4) Tromboplastina hística y calcio iónico.

Anteriormente eran considerados como factores de la coagulación con los nombres respectivos de factor III y IV. Su presencia es condición *sine qua non* para el correcto funcionamiento de la hemostasia.

La tromboplastina hística o factor hístico, desencadenante de la vía extrínseca, es una lipoproteína cuya fracción lipídica posee una actividad similar a la del factor plaquetario 3.

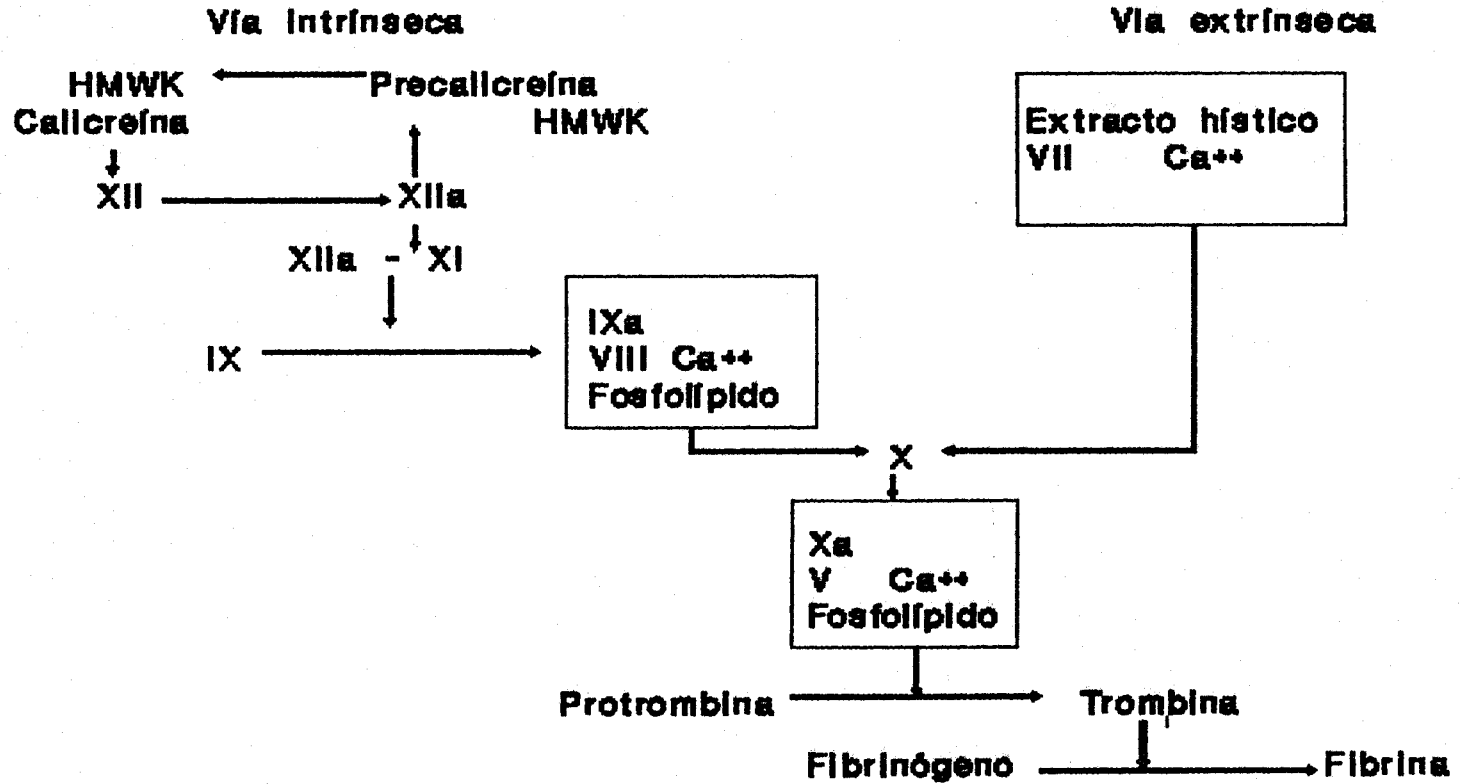
#### 1.3.2. Proceso de la coagulación.

La secuencia de los mecanismos que terminan en la coagulación de la sangre puede resumirse en tres grandes etapas (7, 10, 11):

- 1) Activación de la protrombina.
- 2) Formación de trombina.
- 3) Formación de fibrina.

Todo este mecanismo se puede ver con más claridad en la FIGURA I.

# FIGURA I COAGULACION SANGUINEA



### 1.3.2.1. Activación de la protrombina.

El activador de la protrombina es un complejo lipoproteico formado por el factor X, el factor V el fosfolípido plaquetario (factor plaquetario 3) y los iones de calcio.

La activación previa del factor X puede realizarse a través de dos vías diferentes, conocidas como extrínseca e intrínseca, pero que confluyen en un mismo punto final.

#### 1.3.2.1.1. Vía extrínseca de la coagulación.

Se denomina extrínseca porque para su puesta en marcha requiere de la entrada en la circulación sanguínea de sustancias procoagulantes procedentes del espacio intersticial, más exactamente de tejidos lesionados.

La tromboplastina hística o factor hístico, al mezclarse con el plasma, forma un complejo con el factor VII en presencia de calcio, siendo dicho complejo el que produce la activación del factor X. Una vez activado éste último, junto con el factor V, el fosfolípido o factor plaquetario 3, y en presencia de calcio iónico, transforman la protrombina en trombina (12).

### 1.3.2.1.2. Vía intrínseca de la coagulación.

En 1953, Biggs, Douglas y McFarlane descubrieron que la sangre, en ausencia de extracto histico, era capaz de generar por si sola actividad procoagulante. Este sistema exclusivamente sanguíneo capaz de inducir la formación de fibrina constituye la vía intrínseca de la coagulación.

Su inicio tiene lugar con la activación del factor XII en el momento en que la sangre entra en contacto con el subendotelio de una superficie vascular lesionada (in vivo) o con una superficie de cristal no siliconado y cargado negativamente (in vitro).

La activación del factor XII se inicia con una primera fase de activación parcial inmediatamente después de entrar en contacto con superficies extrañas, en la que no parece existir fenómeno de proteólisis, sino simplemente un cambio de conformación de la molécula proteica que la hace más sensible a un efecto proteolítico posterior.

Después de esta primera etapa, el factor XII activado (XIIa) ejerce una acción proteolítica sobre una proteína llamada precalicreína o factor de Fletcher, que se transforma en calicreína, la cual, a su vez, tiene un efecto proteolítico sobre el factor XIIa monocatenario,

transformandose éste en factor XIIIa bicatenario. Esta forma bicatenaria produce la activación inmediata del factor XI.

Tanto la formación de calicreína como la activación del factor XI resultan estimuladas en presencia del llamado quininógeno de alto peso molecular (HMWK) o factor de Fitzgerald.

En presencia de calcio, el factor XIa activa a su vez al factor IX o factor antihemofílico B y lo transforma en factor IXa, el cual forma un complejo con el fosfolípido plaquetario y el calcio, capaz de activar el factor X y convertirlo en factor Xa. La velocidad con que acontece esta reacción de activación se ve notablemente incrementada por la presencia de factor antihemofílico A o factor VIII.

#### 1.3.2.2. Formación de trombina.

La protrombina o factor II se halla normalmente presente en plasma, pero carece de actividad. El factor activador de la protrombina (factor Xa), formado por una u otra vía, actúa transformando la protrombina en trombina en presencia de fosfolípido plaquetario, calcio y factor V.

### 1.3.2.3. Formación de fibrina.

El fibrinógeno es una proteína de peso molecular 340.000 presente en el plasma, formada por tres cadenas polipeptídicas (alfa, beta y gamma) unidas entre si por puentes disulfuro. Posee dos fibrinopéptidos (A y B). Al actuar la trombina sobre él, se rompen los enlaces arginina-glicina que unian respectivamente las cadenas alfa y beta con los fibrinopéptidos A y B, con la consiguiente liberación de éstos.

La molécula resultante se conoce con el nombre de monómero de fibrina, y su carga superficial, diferente a la de la molécula completa de fibrinógeno, facilita su polimerización espontánea con formación de enlaces de hidrógeno entre los monómeros, lo que da lugar a los llamados cordones de fibrina. Estos constituyen el primer grado de polimerización. La malla resultante, debido a la escasa fuerza de los enlaces, es soluble en urea.

Simultáneamente a este proceso, la trombina estimula la conversión del factor XIII en factor XIIIa. Este último factor cataliza la formación de enlaces fuertes entre los grupos amino-terminales de las cadenas alfa y beta mediante un proceso de transglutaminación. Con ello se libera una molécula de amoniaco y se forma un enlace covalente (enlace

peptídico) muy fuerte y capaz de resistir la acción de la urea. Este proceso estabiliza la malla de fibrina, dando lugar a la formación del trombo definitivo.

### 1.3.3. Mecanismos de control.

La coagulación se limita a la zona de la lesión vascular gracias a la existencia de mecanismos inhibidores que neutralizan la acción de los factores de la coagulación activados. Estos mecanismos son de distintos tipos (7, 13, 14):

- 1) Rápida dilución de los factores trombogénicos por el torrente sanguíneo.
- 2) Eliminación de la circulación de los factores activados por medio de metabolización hepática.
- 3) Presencia de sustancias inhibidoras.
  - 3.1) Antitrombinas.
  - 3.2) Inhibidores de los factores de la coagulación.
- 4) Mecanismos de retroalimentación.

De todos estos puntos el más estudiado ha sido el correspondiente a la existencia de inhibidores, el que vamos a tratar a continuación.

### 1.3.3.1. Inhibidores de la coagulación.

Se han encontrado sustancias inhibidoras de cada uno de los factores de la coagulación, pero los de mayor importancia son los que poseen actividad antitrombina. De entre ellos, que se hallan expuestos en la TABLA II junto con alguna de sus propiedades destacan (7, 15):

#### 1) Antitrombina III.

Es el inhibidor fisiológico más importante de la trombina, con el que forma un complejo irreversible a consecuencia de lo cual ambos compuestos quedan inactivos. La heparina aumenta la velocidad de formación de este complejo, lo que es la base de su actividad anticoagulante. Tiene acción, además de sobre la trombina, sobre otras serín-proteasas como los factores IXa y Xa.

#### 2) Alfa-2-macroglobulina

Interfiere la actividad coagulativa de trombina formando un complejo irreversible con ésta. Inactiva la trombina en presencia de fibrinógeno pero no interfiere la polimerización de la fibrina.



TABLA VINHIBIDORES DE LA COAGULACION

NOMBRE	ACCION	P. MOLEC. (X 1000)
Proteína C	Anti VIIIa	62
	Anti Va	
Proteína S	Cofactor Proteína C	69
Antitrombina III	Antitrombina	65
	Anti Xa	
	Cofactor heparina	
Alfa-2-macroglobulina	Antitrombina	725
	Antiplasmina	
	Anticalicreína	
Alfa-1-antitripsina	Antitrombina	54
	Antiplasmina	
Alfa-2-antiplasmina	Antitrombina	70
	Antiplasmina	
	Anti Xa	
	Anticalicreína	
Proteínas de la osteogénesis		?

### 1.3.3.2. Mecanismos de retroalimentación.

La función obvia de la trombina en la coagulación de la sangre es la conversión del fibrinógeno en fibrina. No obstante, también activa el factor XIII, inicia la agregación plaquetaria y ejerce efectos profundos sobre los factores V y VIII.

La trombina ejerce un efecto autocatalítico sobre la activación de la protrombina. Esta última consiste en una molécula formada por una sola cadena polipeptídica, que por acción de la trombina es convertida en una serie de intermediarios. Tras la acción de ésta, aquella queda dividida en dos porciones, el extremo carboxilo-terminal, conocido como intermediario 2, es posteriormente atacado por el factor Xa para dar trombina. El extremo amino-terminal, conocido como intermediario 3, es un inhibidor, probablemente competitivo, de la activación de la protrombina por el factor Xa.

Existe otra modalidad de hidrólisis de la protrombina por la trombina, en la que se produce el llamado intermediario 1, que es ulteriormente hidrolizado por el factor Xa a trombina, pero es un mal sustrato para este compuesto.

De esta forma, la trombina puede interferir la activación de la protrombina tanto convirtiendo a ésta en un mal sustrato para la protrombinasa como creando un antagonista competitivo. No obstante, el principal efecto inhibitorio de la trombina en la activación del factor II parece ser la inactivación de los factores V y VIII.

Se ha visto también que el factor Xa influye sobre la coagulación por los efectos sobre los factores que lo preceden en la secuencia. De esta forma, convierte al factor VII desde una forma en una sola cadena a una de dos cadenas con actividad aumentada, y cuando está presente en grandes concentraciones lo inactiva. También es capaz de convertir el factor IX en su forma activa.

## 2. MORFOLOGIA.

La plaqueta en reposo tiene un característico aspecto lentiforme, y su superficie es lisa. Su diámetro se encuentra entre 2 y 5 micras y su volumen entre 5 y 10 micras cúbicas, aunque estos valores se mueven dentro de unos márgenes muy amplios.

Al microscopio óptico y con tinción panóptica la plaqueta presenta el aspecto de una célula anucleada, una masa de citoplasma claro redondeado u ovalado, débilmente basófilo y con granulación azurófila frecuentemente. A pesar de esto, un cierto número de plaquetas no son discoides, sino que presentan una gran variedad de formas.

Con un número elevado de aumentos y el uso de secciones finas se puede observar, al microscopio electrónico, que su superficie es dentellada, debido a la desembocadura de los canales del Sistema Canalicular Abierto (SCA). Así mismo, se puede comprobar que presenta una gran complejidad en su estructura interna. Por esto, y para poder relacionar su actividad funcional y bioquímica con su estructura, esta última se ha dividido en cuatro regiones (16, 17):

1) Zona periférica.

Formada por la membrana citoplásmica y las estructuras con ella relacionadas.

2) Zona sol-gel o matriz plaquetaria.

Compuesta por microtúbulos y microfilamentos, situada por debajo de la membrana, y que es la encargada de mantener la forma de la célula.

3) Zona de orgánulos.

Donde se encuentran los gránulos y mitocondrias.

4) Sistema interno de membrana.

Formado por el Sistema Canalicular Abierto (SCA) y el Sistema Tubular Denso (STD).

## 2.1 Zona periférica.

Mide en su conjunto entre 150 y 200 A, y está formada por tres estructuras, que son:

- a) Revestimiento externo o glicocáliz; es la capa más externa, rica en glucoproteínas.

b) Membrana citoplásmica; con su típica estructura de bicapa lipídica.

c) Zona inmediatamente inferior a la membrana.

Externamente a estas tres zonas está el llamado microambiente plaquetario, que si bien no forma parte de la estructura de la célula en sí misma, sí está fuertemente influenciado por ésta. Dicha zona es la que recibe las señales químicas y está influenciada por fenómenos físicos que provienen del ámbito inmediatamente circundante. A través de ella se emiten los mensajes químicos originados en la plaqueta y que influyen tanto en otras plaquetas como en otras células (18).

#### 2.1.1. Glucocáliz.

El primero de los tres elementos estructurales en que se divide esta zona periférica es el glucocáliz. Este se halla constituido por al menos nueve glucoproteínas (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, IIIa, IV, V, IX), que presentan como característica el que la mayor parte de sus azúcares contienen en su composición ácido siálico.

El complejo de la glucoproteína I (GP I) tiene un peso

molecular de 150 KD, y es el que presenta un mayor grado de sialización. Su función parece estar relacionada con la adhesividad plaquetaria, por la unión de uno de sus componentes, la GP Ib al Factor de von Willebrand (FvW). El complejo GP IIb-IIIa tiene un peso molecular de 135 KD, y es el receptor para el fibrinógeno y el calcio, necesarios para la agregación de la plaqueta; también parece que se une al FvW. Por último, se ha descubierto recientemente que la GP Ia es capaz de unirse a las fibras de colágeno (19).

También existen en esta capa mucopolisacáridos ácidos, así como una ATPasa magnesio-dependiente.

### 2.1.2. Membrana plasmática.

La membrana plasmática presenta la típica estructura de mosaico fluido con su bicapa lipídica en la que se encuentran las proteínas. Mide entre 70 y 90 Å y se encuentra formada por un 35 % de lípidos, 57 % de proteínas y 8 % de hidratos de carbono (20).

Dentro de los lípidos, existe una molécula de colesterol por cada dos de fosfolípidos. Estos últimos, si son neutros (fosfatidilcolina y esfingomielina) se encuentran en la cara externa de la bicapa, mientras que si

son aniónicos (fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina) lo están en la interna. También es de destacar la gran cantidad de ácido araquidónico, así como el Factor Plaquetario 3, un fosfolípido esencial para la cascada de la coagulación, ya que sirve de superficie catalítica para las proteínas de dicho sistema (20).

Los carbohidratos se hallan principalmente en forma de glucoproteínas y glucosaminoglicanos.

### 2.1.3. Zona submembranosa.

Es la región que se encuentra por debajo de la membrana, y contiene un sistema regular de elementos filamentosos distintos al sistema de membranas. Estos filamentos cooperan con los microtúbulos circunferenciales de la matriz para mantener la forma discoide de la plaqueta. También permiten la emisión de pseudópodos interaccionando con otros elementos del sistema contráctil de la célula (21).

### 2.2. Zona sol-gel.

Esta zona es la matriz del citoplasma plaquetario y sus



elementos, resistentes a los detergentes, forman el citoesqueleto celular. Corresponde a la zona denominada de hialoplasma al microscopio óptico, que se puede considerar como un fluido o una solución de sales en el cual están dispersos los orgánulos.

Aquí existen numerosos sistemas de fibras en distintos estadios de polimerización que son el soporte de la forma discoide, así como el sistema contráctil que interviene en el cambio de forma, en la emisión de pseudópodos, en la contracción interna y en la secreción.

Estos sistemas de fibras son al menos tres: los filamentos submembranosos que también forman parte de la zona anterior, los microtúbulos y los microfilamentos.

### 2.2.1. Microtúbulos.

Los microtúbulos son haces de túbulos que, si se observan en una sección ecuatorial de la plaqueta, recorren toda su circunferencia apenas bajo la membrana, y en una sección transversa se presentan como un grupo de túbulos de contorno circular en número entre ocho y veinticuatro. Además, están estrechamente relacionados pero anatómicamente separados de la membrana, y el espacio existente entre

ambos está ocupado por los filamentos submembranosos (22).

Cada microtúbulo, de unos 250 Å de diámetro, está compuesto a su vez por unos 12-15 subfilamentos de 50 Å colocados en paralelo, y físicamente indistinguibles de los microfilamentos y filamentos submembrana (23).

La localización de estos microtúbulos, compuestos principalmente por tubulina, sugiere que tienen un papel fundamental en el citoesqueleto plaquetario, en el mantenimiento de la forma y en las ondas contráctiles que aparecen en la plaqueta activada.

### 2.2.2. Microfilamentos.

Los microfilamentos constituyen el segundo sistema de fibras de la zona sol-gel. Cerca del 15-35 % de todas las proteínas plaquetarias están representadas por la actina, que es la que constituye principalmente estos microfilamentos, aunque existen también menores cantidades de miosina, actinmiosina, tropomiosina y trombospondina. El modo de acoplamiento de los filamentos de actina está asociado a la respuesta física inicial de la plaqueta activada. La formación de filamentos acaso es el primer paso, que es seguido después por todo el proceso (24).

### 2.3. Zona de orgánulos.

Esta tercera zona está compuesta por gránulos, cuerpos densos, peroxisomas, lisosomas y mitocondrias dispersos al azar por el citoplasma. Es la sede de los procesos metabólicos, como depósito de enzimas y diversas sustancias. Lo más importante de esta zona son los gránulos plaquetarios, de los que nos vamos a ocupar con mayor extensión.

Además de estos componentes, a veces se pueden visualizar gránulos de glucógeno, sáculos aplastados que recuerdan el Aparato de Golgi, trozos de retículo endoplásmico y restos nucleares.

Las plaquetas contienen tres clases diferentes de gránulos con depósitos de secreción, cuyo contenido se muestra en la TABLA III y vamos a exponer con mayor detalle desde tres puntos de vista: su contenido, su origen y su mecanismo de secreción (25).

#### 2.3.1. Cuerpos densos.

Este primer tipo de gránulos tiene un diámetro que oscila entre los 250 y los 300 nm. Reciben el calificativo

TABLA IIICONTENIDO DE LOS GRANULOS PLAQUETARIOS*Gránulos alfa*

Factor Plaquetario 4	Beta-Tromboglobulina
Proteoglicano transportador	Factor von Willebrand
Fibrinógeno	Factor V
Factor XIII	Alfa-1-antiplasmina
Trombospondina	Alfa-2-macroglobulina
Proteínas ricas en histidina	Factor quimiotáctico
Proteínas sensibles a la trombina	
Factor mitogénico derivado de las plaquetas (PDGF)	

*Cuerpos densos*

Nucleótidos de adenina	Serotonina
Calcio	Magnesio
Pirofosfato	Potasio

*Lisosomas*

Hidrolasas ácidas

de densos por tres cuestiones (26):

- Absorben electrones en muestras sin fijar y sin tefir, lo que los convierte en densos *per se*.
- Son los gránulos plaquetarios más osmiófilos.
- Son los orgánulos plaquetarios con mayor peso específico, 1.21 g/c.c.

#### 2.3.1.1. Contenido.

En todas las especies animales investigadas, estas estructuras contienen ATP, ADP y serotonina, así como cationes divalentes (magnesio y calcio) que varían de una especie a otra (27). En un extremo del espectro se encuentran las plaquetas humanas, que poseen casi exclusivamente calcio, y en el otro las procedentes del cerdo que solo contienen magnesio; en otras especies existen ambos iones en proporciones variables. Existen igualmente pequeñas cantidades de GTP, GDP, fósforo inorgánico y pirofosfato (28).

La concentración en los cuerpos densos de los nucleótidos de adenina y el calcio son extremadamente altas, en el rango de 1-2 M (26), de tal modo que estos gránulos serían inestables si dichas sustancias se encontraran

libres en solución.

Recientes estudios utilizando fósforo marcado y resonancia magnética nuclear (RMN) han revelado que estos dos tipos de sustancias se encuentran formando agregados de 25-30.000 D. En ellos, los anillos de purina de los nucleótidos están aparentemente amontonados unos sobre otros y probablemente unidos por puentes de cationes divalentes entre los grupos polifosfatos de los anillos cercanos (29).

La serotonina no es imprescindible para la formación de los agregados nucleótidos-metal, y no altera las propiedades de estos por muy elevada que sea la concentración a la que ésta se halle. Los análisis con RMN indican que esta sustancia se incorpora a los agregados de forma que alguno de los átomos de su anillo indólico se encuentre a 1-2 Å de los átomos de los anillos de purina. De este modo, se puede pensar que la serotonina se encuentra anclada entre las moléculas de adenosina y con su anillo 5-hidroxiindólico paralelo a los anillos de purina, lo que sugiere la existencia de una fuerte interacción entre ambas moléculas (30).

### 2.3.1.2. Origen.

La serotonina es fácilmente transportada a través de la membrana por un sistema de difusión facilitada (31). Este transporte es conducido por un gradiente de pH (interior ácido con pH 5.7) creado por una bomba de protones dependiente de ATP y localizada en la membrana granular. La serotonina cruza la membrana en forma de una molécula sin carga eléctrica, y una vez en el interior toma un protón. Esto produce un gradiente de serotonina sin carga dirigido hacia el interior del gránulo que facilita todo el proceso (32).

Por último, en lo referente a los nucleótidos, se sabe que el ATP presente en el citoplasma plaquetario atraviesa la membrana del gránulo, y en el interior de éste es hidrolizado para dar ADP, pero no en una cantidad significativa, por lo que se supone que estas moléculas se acumulan en los gránulos durante la fase de trombopoyesis, aún dentro del megacariocito (33).

### 2.3.1.3. Mecanismo de secreción .

No existen claras evidencias que permitan discernir este mecanismo de secreción durante la activación

plaquetaria. Ultraestructuralmente no se ha podido demostrar que los gránulos se fusionen con la membrana plasmática o alguna de sus invaginaciones. De todas formas, el hecho de que nucleótidos de adenina radiactivos y pirofosfato inorgánico sean liberados de plaquetas preincubadas con fosfato marcado, junto con el resultado de estudios de RMN y de plaquetas de pacientes con enfermedades de déficit de almacenamiento, hace prácticamente imposible que este proceso sea alguno distinto al de exocitosis (34).

### 2.3.2. Gránulos alfa.

Los gránulos alfa son los gránulos de almacenamiento más abundantes dentro de la plaqueta. Por contra de los cuerpos densos, muestran una gran variedad de formas, desde ovalados a circulares con una zona excéntrica de material osmiófilo, pasando por formas que recuerdan bastones. Son fácilmente separables del resto del contenido celular mediante centrifugación en gradientes de densidad. Su pH interno es ácido, como en el resto de orgánulos de almacenamiento (26).



### 2.3.2.1. Contenido.

Su contenido es exclusivamente proteico y puede ser dividido en dos categorías: proteínas plasmáticas y proteínas específicas plaquetarias. Entre las primeras se incluyen algunos factores de la coagulación, como el Factor V, VIII y fibrinógeno, así como fibronectina, albúmina, calicreína, alfa-2-antiplasmina, y glucoproteína G. Entre los segundos beta-tromboglobulina, factor plaquetario 4, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y proteínas básicas (25).

### 2.3.2.2. Origen.

No sabemos prácticamente nada acerca del origen de estas proteínas, aunque algunas de las catalogadas como plasmáticas, *verbi gracia* el Factor V, poseen receptores específicos en la superficie plaquetaria, lo que sugiere la posibilidad que hallan entrado en la célula mediante una endocitosis mediada por este receptor durante el estadio de megacariocito (35).

### 2.3.2.3. Mecanismo de secreción.

Las proteínas de estos gránulos se encuentran tanto en su matriz como en su membrana, pero solamente las primeras son liberadas tras la activación celular, lo que indica que el mecanismo de esta liberación es la exocitosis. Existen pruebas de que los gránulos alfa se unen entre si antes de fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al exterior. (36). Igualmente, parece que el calcio está involucrado en todo este proceso (37).

### 2.3.3. Lisosomas.

Los lisosomas son orgánulos que por su aspecto recuerdan pequeños gránulos alfa, pero que normalmente tienen un forma circular y carecen de la zona excéntrica de material osmiófilo.

Se ha cuestionado mucho el que estos orgánulos puedan ser considerados como lisosomas, ya que aunque si lo son desde el punto de vista de su contenido, no lo son en lo referente a su función, ya que la función principal de los lisosomas es el digerir las partículas fagocitadas por la célula, y las plaquetas no realizan dicha función.

### 2.3.3.1. Contenido.

Se ha demostrado que contienen aril-sulfatasa y hidrolasas ácidas, como la beta-hexosaminidasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, beta-arabinosidasa y beta-glicerofosfatasa. Todos estos enzimas se hallan en la TABLA II (25).

### 2.3.3.2. Origen.

Estos enzimas son glucoproteínas que poseen un resto de manosa terminal en su molécula de carbohidrato. Cuando esta manosa es fosforilada en posición 6 es reconocida por un enzima existente en la membrana lisosomal, y transferida al interior del orgánulo, siendo conocida como enzima de alta captación. Cuando la manosa no es fosforilada no se une al enzima y por tanto no pasa a su interior, es el enzima de baja captación (26).

### 2.3.3.3. Mecanismo de secreción.

Esta secreción solo se produce cuando las plaquetas son expuestas a la acción de agonistas fuertes, como es el caso de la trombina. En contraste con los otros dos orgánulos de



TABLA IVHIDROLASAS LIBERADAS POR LOS LISOSOMAS

---

Alfa-arabinosidasa

Ariil-sulfatasa

Beta-galactosaminidasa

Beta-galactosidasa

Beta-glucuronidasa

Beta-glucosaminidasa

Catepsina

Colagenasa

Elastasa

Endoglucosidasa

Para-nitrofenilfosfatasa

Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos

almacenamiento, los lisosomas vierten al exterior solo una parte de su contenido aun cuando se produzca la máxima estimulación de la plaqueta. La proporción en que es secretado cada uno de sus componentes varía de uno a otro; así, la beta-hexosaminidasa se libera en un 55% y la beta-glucuronidasa y galactosidasa entre un 20 y un 30%. (38).

Durante el periodo de secreción máxima, las plaquetas acidifican el medio de una manera más acusada que la que se produce por la acumulación concomitante de ácido láctico. Los agonistas débiles, como el ADP y la adrenalina, producen la completa secreción de los contenidos de los gránulos densos y alfa sin una excesiva acidificación del medio, lo que es una evidencia de que no producen la secreción de los lisosomas (24).

Los enzimas liberados por la trombina y otros agonistas fuertes son los que anteriormente denominamos de baja captación, mientras que la fracción que es retenida corresponde a la de alta captación. El tratamiento de las plaquetas con agentes lisosomotrópicos produce la liberación de ambos tipos de enzimas (40).

Todo esto está de acuerdo con la hipótesis de que el enzima que entra en el lisosoma como de alta captación

permanece unido al receptor en el interior de la luz lisosomal. El efecto de estos agentes parece ser el de crear un pH desfavorable para la unión receptor-enzima, y que de esta forma éste quede libre y por tanto secretable.

#### 2.4. Sistema interno de membranas.

Este último, es un apartado que merece un particular interés dentro de la anatomía plaquetaria. Está formado a su vez por dos sistemas; el Sistema Tubular Denso (STD) y el Sistema Canalicular Abierto (SCA).

El SCA forma un sistema de canaliculos que se asemejan a los túbulos transversos y los sarcotúbulos de la célula muscular embrionaria, y cuya misión fundamental es la de aumentar enormemente la superficie de la plaqueta que se encuentra expuesta al plasma, y de esta forma ser la zona de comunicación físico-química entre esta célula y el medio que la rodea.

El STD es el lugar donde el calcio, que da la señal de inicio para todo el proceso contráctil, se halla almacenado. Además, en éste se encuentran los enzimas necesarios para la síntesis de prostaglandinas. Sus canales STD son distinguibles de los anteriores por el material amorfo que

contienen, similar al del citoplasma circundante. Estos canales están dispersos por todo el citoplasma, y parece que algunos de ellos están en estrecha relación con la banda circunferencial, por lo que podrían jugar un papel fundamental en la elaboración de los microtúbulos encargados del mantenimiento de la forma discoide.

El SCA deriva de la membrana plasmática del megacariocito, mientras que el STD es un residuo del retículo endoplásmico liso, de lo que se deduce que ambos sistemas son totalmente independientes. Pero una inspección más detallada permite encontrar una asociación de los dos sistemas en las zonas de sol-gel del citoplasma y en la zona excéntrica de la célula.

Los estudios al microscopio electrónico definen a la plaqueta como una célula muscular, y esta analogía permite comprender mejor el sistema de membranas involucrado en la activación plaquetaria. Como en la célula muscular, la contracción de los filamentos de actina-miosina está modulada por el flujo intracelular de calcio. El STD es capaz de almacenar calcio y secretarlo hacia el citoplasma, igual que sucede con los sarcotúbulos de la célula muscular; y los canales del SCA conducen las señales captadas en el exterior hacia el interior de la célula, de forma análoga a los túbulos transversos de la fibra muscular (41, 42).

### 3. FUNCIONALISMO PLAQUETARIO.

Las plaquetas son componentes sanguíneos perfectamente diseñados para desempeñar un importante papel en la fisiología de la hemostasia (43). Cuando se encuentran en reposo presentan una forma discoidal característica que facilita su movimiento en la periferia de la columna de sangre circulante, cerca de la superficie del endotelio.

La exposición del subendotelio subsiguiente a la aparición de una zona dañada en la pared vascular o la presencia de una gran variedad de agentes físicos y químicos capaces de estimular su activación conduce a la aparición importantes alteraciones tanto en su morfología como en su estado físico-químico (44).

#### 3.1. Interacción plaqueta-superficie vascular.

El daño producido en una pared vascular pone en marcha una serie de reacciones, tanto agudas como crónicas, que aíslan esta zona y tienden a su curación (45). El hecho capital que conlleva la participación de las plaquetas en el proceso de reparación vascular es la pérdida de células endoteliales, con la consiguiente exposición del tejido



conectivo subendotélico a la corriente sanguínea (46). Las plaquetas se adhieren casi inmediatamente a la pared vascular, se extienden por toda la zona lesionada y atraen otras plaquetas (47).

El elemento crítico de todo este proceso no ha sido aun esclarecido, aunque existen varios candidatos, cada uno con hechos a favor y en contra.

De todas formas, lo que sí parece ser cierto es que debe existir colágeno tipo III con estructura cuaternaria intacta en forma de alfa-hélice para que se inicie todo este proceso. Se ha propuesto que el receptor al que se une en la membrana es una glucosiltransferasa, la glucoproteína Ia o la fibronectina, aunque bien pudiera ser que no existiera ningún receptor específico para esta molécula (20).

El contacto con componentes tisulares conlleva la conversión de la protrombina en trombina, un potente agonista plaquetario que puede ser el causante de la activación plaquetaria. Pero la adhesión de estas puede llevarse a cabo antes de que se genere una cantidad significativa de este compuesto (48).

El ADP procedente de, los hematies o del tejido dañado, que alcanza altas concentraciones locales, puede ser a su

vez un factor importante en la interacción plaqueta-pared vascular, ya que ésta no se lleva a cabo sin la presencia de hematíes en el flujo sanguíneo (49).

El daño vascular puede suprimir la síntesis de prostaciclina y favorecer la de tromboxanos (50). De todos modos, la aspirina, que inhibe la ciclo-oxigenasa y la prostaciclín-sintetasa no previene la adhesión de las plaquetas cuando se encuentra expuesto el subendotelio (51).

Las proteínas adhesivas como el fibrinógeno, fibronectina, laminina y el factor de von Willebrand (FvW) están todas presentes en el lugar de la lesión para facilitar la adhesión plaquetaria. De cualquier forma, las plaquetas circulantes se encuentran en forma discoide, y por tanto sus lugares para la adhesión (la glucoproteína Ib para el factor de von Willebrand, el complejo de glucoproteínas IIb-IIIa para el fibrinógeno y el calcio), se hallan ocultos (52).

Debido a esto se ha propuesto que debe existir un cierto cambio de forma antes de que se produzca la adhesión, y que conduzca a la salida al exterior de estos receptores. A pesar de ello, estudios con microscopio electrónico indican que en las fases iniciales de la interacción

plaqueta-endotelio esta célula mantiene su forma de reposo (53).

Otro de los factores implicados es el número de plaquetas, aunque más importante que éste en sí mismo es la masa plaquetaria total. De esta forma, pacientes que presentan plaquetas gigantes pero en número reducido como pueden ser la Anomalia de May-Hegglin o el Síndrome de Epstein (54), no suelen presentarse trastornos hemorrágicos. Diferente es el caso que se presenta en las trombocitopenias adquiridas, ya que aunque en éstas existen plaquetas jóvenes de volumen elevado, su número no es el suficiente como para mantener niveles adecuados de masa plaquetaria (55).

Aunque hay implicadas en este proceso múltiples moléculas aun desconocidas, es razonable el sugerir que el factor de von Willebrand y los receptores intrínsecos de la superficie plaquetaria son fundamentales en la interacción plaqueta-pared vascular. La importancia de éstos para la adhesión al subendotelio es puesta de manifiesto por la existencia de alteraciones tales la Enfermedad de von Willebrand (52), en la que hay un déficit del factor de su mismo nombre; o el Síndrome de Bernard-Soulier, en el que no existe receptor para dicho factor (GP Ib); y en la Tromboastenia de Glanzman, en la que el déficit se encuentra

en el complejo GP IIb-IIIa (56).

Así, el factor de von Willebrand parece ser indispensable para el proceso de adhesión, lo que explicaría que se encontrara tanto en las plaquetas como en las células endoteliales, la sangre circulante y la pared vascular (57).

### 3.2. Cambio de forma y extensión plaquetaria.

La adhesión de las plaquetas al subendotelio solo es el primer paso de la respuesta hemostática. Las plaquetas pierden rápidamente su forma discoide y se extienden sobre la superficie lesionada. El proceso de la extensión plaquetaria es muy similar al de fagocitosis de grandes partículas extrañas por los leucocitos polimorfonucleares.

La activación de las plaquetas en forma discoide conduce a su transformación en formas irregulares que recuerdan esferas espinosas (58), mediante un proceso dinámico, que incluye la emisión y retracción de pseudópodos de forma repetitiva (59). La activación puede conllevar la aparición de cambios físicos irreversibles, o, si el estímulo cesa rápidamente, completamente reversibles.

En cierto modo, las plaquetas se pueden considerar como células musculares, y la respuesta que sigue a la adhesión como una preparación para una actividad contráctil, siendo todas ellas manifestaciones del ensamblaje de los filamentos de actina (60). Estos filamentos forman haces paralelos que siguen el contorno de la membrana, y en un número variable guían la emisión de los pseudópodos, extienden la membrana de superficie en forma de una fina película, estabilizan la célula sobre la irregular superficie del vaso y facilitan la contracción necesaria para formar el tapón hemostático (61).

Los gránulos, dispersos al azar por toda la célula, se agrupan en el centro de ella. Los microtúbulos que sostenían la forma discoide de la plaqueta se contraen formando anillos alrededor de los orgánulos que se agrupan en el centro (62). Los filamentos de actina también están presentes alrededor de estos anillos de microtúbulos, pero son difícilmente identificables.

El sistema canalicular se dilata, y contiene sustancias secretadas por los gránulos. La actino-miosina se concentra en el centro de la célula formando densos conglomerados de gel contráctil.

### 3.3. Agregación plaquetaria.

Todo el proceso anteriormente descrito conduce a la formación de una monocapa de plaquetas unidas a la superficie dañada. Pero para asegurar la total curación del vaso se necesita que este conglomerado sea de mayor tamaño, por lo que es necesario un mayor número de estas células. Pero esto presenta el inconveniente de que ya no existe subendotelio expuesto, por lo que éste no puede reaccionar con nuevas plaquetas y activarlas.

El proceso mediante el cual estas nuevas plaquetas son activadas y se unen a las anteriores para reforzar el trombo es la llamada agregación plaquetaria, que fundamentalmente sigue los mismos caminos que la adhesión, ya que en el fondo no es más que la adhesión de unas plaquetas a otras.

Esta agregación es dependiente de los llamados agonistas o inductores de la agregación, sustancias liberadas por las mismas plaquetas o las células dañadas y que son capaces de activar a aquellas. Cuando las concentraciones plasmáticas de éstos son bajas, lo que ocurre en los primeros momentos, la agregación es reversible, es decir, las plaquetas ya unidas pueden volver a separarse. Pero con el tiempo, esta concentración aumenta, con lo que la agregación se hace irreversible. Este aumento

en la concentración de agonista viene sustentada por el proceso de liberación o secreción, que describiremos posteriormente, pero que ocurre a la par del de agregación. En la reversibilidad del trombo en sus primeros momentos parece que influye de manera importante el consumo de los inductores producidos por las células allí presentes.

### 3.3.1. Proceso de la agregación plaquetaria.

Este proceso va íntimamente unido a la secreción, de tal modo que no pueden ser separados totalmente, y los mismos hechos que forman parte de uno también lo hacen del otro.

Para su puesta en marcha es necesario un aumento de la cantidad de calcio intracitoplásmico. Recientes estudios sugieren que esto se realiza a través de la activación del metabolismo del fosfoinositol. La activación de las plaquetas conduce a una movilización del calcio de membrana y la estimulación de la fosfolipasa C. Este enzima cataliza la conversión de fosfatidilinositol en diacilglicerol, y dispara la cascada que conduce a la formación de fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato (63, 64). El diacilglicerol es rápidamente convertido en ácido fosfatídico y lisofosfatídico (26).

Estos compuestos son importantes en el transporte de calcio al interior de la plaqueta y en la fusión de los gránulos con el Sistema Canalicular Abierto. Además el diacilglicerol puede producir la activación de la protein-kinasa C independientemente del calcio.

La producción de fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato es incluso más importante. Este actúa en un sistema interno de membranas, el sistema tubular denso, para liberar calcio. Este sistema es, en esencia, el retículo endoplásmico de la plaqueta (65). La liberación de calcio por sus canales debido a la acción de éste compuesto produce un aumento en sus niveles citoplásmicos. Este catión divalente activa la fosfolipasa A-2 asociada con las membranas del STD, con el resultado de su unión al ácido araquidónico de ésta.

El 50 % del ácido araquidónico liberado por la acción de este enzima es convertido por la lipo-oxigenasa en una serie de productos conocidos como leucotrienos, que probablemente tienen un escaso papel en el control de la hemostasia, pero que tienen gran actividad quimiotáctica sobre los leucocitos. El ácido restante es utilizado en la vía de la ciclo-oxigenasa, que lo convierte en endoperóxidos cíclicos (PGG-2 y PGH-2), que son muy lábiles. La mayor parte de estos productos son transformados en tromboxano A-2 (TXA-2) por el complejo de la tromboxano-sintetasa, mientras



que una pequeña cantidad del ácido araquidónico acaba como prostaglandinas (PGE-2, PGD-2 y PGF-2).

El TXA-2 tiene una vida media corta, de apenas 45 segundos, antes de ser degradado a TXB-2, un compuesto inactivo. Pero en este corto periodo de tiempo realiza importantísimas funciones desde el punto de vista de la agregación plaquetaria. Produce vasoconstricción local. Sobre la plaqueta conlleva una mayor elevación de los niveles internos de calcio, fundamentalmente a partir del STD; también tiene una acción directa sobre las membranas de los gránulos induciendo el proceso de liberación, con lo que un mayor número de plaquetas se suman a la constitución del trombo.

El calcio liberado por el STD por acción del tromboxano está acoplado con la calmodulina. El complejo formado de esta forma modula la activación de la kinasa de cadenas ligeras de miosina y la fosforilación de una proteína de 20 KD. Igualmente, la proteín-kinasa C activada induce la fosforilación de una nueva proteína, de 47 KD. La proteína de 47 KD ha sido relacionada con el proceso de cambio de forma, y la de 20 KD con la contracción y secreción. De todas formas, estudios más recientes han sugerido que este cambio de forma y la secreción pueden desarrollarse

independientemente de la fosforilación de dichas proteínas. (26).

Además de todo esto, la agregación no se pone en marcha sin la presencia en plasma de fibrinógeno, que se une junto con calcio iónico a la membrana de la plaqueta, exactamente al complejo GP IIB-IIIa. Para que esta unión se produzca es necesario que la plaqueta se encuentre ya activada, puesto que, como hemos dicho anteriormente, este complejo no se encuentra expuesto en el exterior de la célula cuando ésta se encuentra en forma discoide (66).

Con respecto a estas glucoproteínas, parece que en cada plaqueta existen entre 1100 y 1600 de ellas conocidas como de alta afinidad por el fibrinógeno (Kd 0.029-0.045  $\mu$ M), y unos 45-75000 de baja afinidad (Kd 1.2-2  $\mu$ M). Además, la unión fibrinógeno-receptor se satura cuando la concentración de éste se encuentra por encima de 1200 nM. Esta unión, parece hacerse irreversible con el tiempo. (42, 67).

### 3.3.2. Vías de la agregación plaquetaria.

Los agonistas de la agregación, que hemos citado con anterioridad, pueden ser divididos en dos grupos según la intensidad de su efecto, y desde cierto punto de vista de su

modo de acción:

1) Agonistas fuertes.

1.1) Trombina.

1.2) Colágeno.

2) Agonistas débiles.

2.1) ADP.

2.2) Adrenalina.

Los agonistas débiles, así como bajas concentraciones de los fuertes, tras unirse a receptores situados en la membrana plaquetaria, activan toda la vía de la agregación tal como acabamos de exponer. Por su parte, los agonistas fuertes a altas dosis comienzan su acción del mismo modo, pero producen una tan alta elevación inicial del calcio intracitoplásmico que la vía continúa excluyendo o minimizando el paso de la producción de prostaglandinas.

Existe otro tipo de agonista, y que ejerce su acción por una tercera vía. Se trata del Factor Activador de la Plaqueta (PAF). Este compuesto efectúa su acción por una vía aún no bien conocida, pero independiente del calcio y de las prostaglandinas.

Con respecto al ADP, parece que existe un limitado número de receptores para él en cada plaqueta, que se cree

que es una proteína con un Pm de 100 KD.

La trombina por su parte y a concentraciones fisiológicas (<10 nM) reacciona con unos 1000 receptores en cada plaqueta; a concentraciones 500 veces superiores con 50000. Su receptor parece que es la GP I.

La adrenalina se une a receptores alfa-2 en la plaqueta. Para que provoque la agregación a de estar a concentraciones micromolares, que no se alcanzan fisiológicamente, y a éstas últimas solo es capaz de modular la acción producida por otros agonistas. Cuando induce la agregación no se produce el cambio de forma tal como ocurre con el resto de las sustancias que la provocan (20).

#### 3.4. Reacción de liberación.

En 1962, Grette descubrió la súbita liberación de constituyentes plaquetarios tras la exposición a la trombina. Desde entonces, el término "reacción de liberación plaquetaria" ha sido aceptado para el proceso que conlleva la secreción del contenido de los cuerpos densos, lisosomas y gránulos alfa.

Como orientación general, en la TABLA V se exponen los diversos agentes que se sabe son capaces de inducir la reacción de liberación. En la TABLA III aparecen todas las proteínas liberadas en esta reacción, y en la TABLA IV todas las hidrolasas plaquetarias que son liberadas por los lisosomas (27, 68).

Los cuerpos densos contienen serotonina, o que serotonina puede producir vasoconstricción, pero que parece tener sólo un pequeño papel en la hemostasia humana; el ADP, que otras plaquetas; calcio y fosfato inorgánico.

Los productos secretados por los gránulos alfa tienen un amplio espectro de actividad (69). Varias de estas proteínas son capaces de unirse a la heparina. Por su capacidad neutralizante de ésta pueden potenciar la influencia local de la trombina.

Otras proteínas provenientes de estos mismos gránulos tienen un efecto quimiotáctico, atrayendo leucocitos hacia el lugar del daño vascular. Este hecho parece ser un paso importante en la resolución del trombo.

Algunas proteínas secretadas pueden tener un importante papel en el estímulo de la adhesividad. De este tipo son la trombospondina, que tiene actividad "lectin-like" (70, 71),

TABLA VINDUCTORES DE LA REACCION DE LIBERACION

---

*Sustancias de bajo peso molecular*

ADP, adrenalina, serotonina, vasopresina, tromboxanos, prostaglandinas, ácidos grasos, endotoxinas, complemento activado, poli L-lisina, cristales de urato, productos de la degradación del fibrinógeno solubles.

*Enzimas proteolíticas*

Trombina, tripsina, papaina, pronasa, subtilisina, proteasas de veneno de serpiente.

*Agentes aglutinantes*

Ristocetina en combinación con Factor VIII humano, Factor VIII bovino, zymosan, anticuerpos antiplaquetarios, complejos inmunes, lectinas, ionoforos de cationes divalentes.

*Agentes físicos*

Bajas temperaturas, radiación ultravioleta, superficies aniónicas, agitación mecánica.

*Otros*

Colágeno, poliestireno, látex, cristal, caolín, bacterias, virus.

el fibrinógeno, otro y la fibronectina (72).

*El Factor Mitogénico Derivado de las Plaquetas (PDGF)*, (73, 74) es una proteína que se une a la membrana de las células con capacidad mitogénica como las musculares lisas y los fibroblastos de la pared vascular produciendo su proliferación, y de este modo puede fomentar la curación y finalmente la reendotelización del vaso dañado.

Otros productos liberados por los gránulos alfa, como se ha puesto de manifiesto anteriormente son la beta-Tromboglobulina y el Factor Plaquetario 4, considerados como marcadores de la activación de esta célula y que serán estudiados con mayor detalle más adelante.

Los lisosomas son participantes reacios en la reacción de liberación. Sus productos no son secretados hasta que la plaqueta está estimulada al máximo. Por lo tanto, excretados en el espacio circundante, no parecen ser necesarios para la formación del trombo. Más probablemente son coadyuvantes, y sirven solamente para reforzar la actividad antibacteriana de los neutrófilos y macrófagos.

El mecanismo de secreción del producto de los gránulos de las plaquetas humanas parece ser único. Las plaquetas parecen esponjas, ya que un sistema de canales en

continuidad con la superficie celular, el sistema canalicular abierto, forma un enrejado interconectado que se extiende por todo el citoplasma (65).

El cambio de forma y la emisión de pseudópodos característica de la plaqueta en respuesta a la activación vienen acompañadas de un proceso de transformación interna. Los orgánulos dispersos por la célula se agrupan en su centro dentro de un tejido de filamentos de actina y anillos de microtúbulos (62). Los orgánulos secretores se funden con los canales del SCA, y más de un gránulo se puede fundir en cada canal (75). Los canales y los gránulos vacíos permanecen en continuidad con la superficie plaquetaria, y los canaliculos son atravesados por una onda interna de contracción que causa la salida del contenido de los orgánulos al exterior.

La entrada de agua en el contenido de los gránulos produce el aumento de volumen tanto de éstos como de los canales, convirtiéndolos en estructuras saculares. Los sacos cerrados de los gránulos fusionados emigran hacia el exterior de la plaqueta para su descarga (76). De todas formas esta apariencia solo es producida por altas concentraciones de trombina. Bajas concentraciones de ésta u otros agentes estimuladores de la secreción no producen este gran aumento de tamaño de canales y gránulos.



#### 4. INTERACCION PLAQUETAS-PLASMA.

La coagulación de la sangre siempre ha sido vista como un intrincado y muy complejo proceso de interacciones entre proteínas plasmáticas que, formando una cascada, conducen a la polimerización de la fibrina y la aparición de una red en la que quedan atrapados los elementos formes, y entre ellos las plaquetas. Debido a esto, los estudios del proceso coagulativo fueron, al menos en los primeros momentos, encaminados primordialmente a la identificación, purificación, caracterización y cinética de interacción de dichas proteínas, poniendo menos énfasis en el papel correspondiente a las plaquetas.

En los años sesenta comenzaron con más profundidad los estudios plaquetarios, en un principio acerca de su morfología, y posteriormente acerca de su metabolismo energético, y su función (adhesión, agregación y secreción), primordial en la hemostasia primaria. Los últimos estudios van encaminados a la existencia de marcadores de la activación plaquetaria, tales como la beta-Tromboglobulina y el Factor Plaquetario 4.

Finalmente, se ha puesto el interés en la relación existente entre ambos sistemas hemostáticos, ya que parece

que se encuentran íntimamente unidos. De esta forma, se ha demostrado la existencia en la plaqueta, tanto en su interior como unidos a su membrana, de factores de la coagulación, y parece que dicha membrana sirve de superficie catalítica para este proceso.

#### 4.1. Factores coagulantes de la plaqueta.

Ya Adelson pensaba en la plaqueta como una esponja cuya función básica fuera el transporte de dichos factores a la localización del daño vascular (77). Aunque esto no es totalmente cierto, esta idea, unida a los actuales conocimientos acerca de la función del endotelio vascular, puede ser sumamente útil.

Un aspecto importante y preliminar del argumento en discusión es el hecho de que la plaqueta contenga factores de la coagulación tales como el fibrinógeno, factores V, XI, XIII y von Willebrand, kininógeno de alto peso molecular e inhibidores de las proteasas plasmáticas como la alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina y alfa-2-macroglobulina. Ello se expone en la TABLA VI (25, 68, 78, 79).

TABLA VIFACTORES DE LA COAGULACION PRESENTES EN LA PLAQUETA

NOMBRE	FUNCION	LOCALIZAC.
Fibrinógeno	Agregación ADP	Membrana
	Agregación trombina	G. alfa
Factor V	Receptor F Xa	G. alfa
Factor XI	Sustit. F XI plasmático	Membrana
Factor XIII	Componente F XIII plasm.	Citoplasma
Factor vW	Adhesividad	G. alfa
HMWK	Aum. activ. fase cont.	G. alfa
Alfa-2-antiplasmina	Similar plasmática	G. alfa
Alfa-2-macroglobulina	Similar plasmática	G. alfa
Alfa-1-antitripsina	Similar plasmática	G. alfa
Inhibidor C-1	Similar plasmático	G. alfa



#### 4.1.1. Factores de contacto.

El factor XI está específicamente ligado a la membrana plaquetaria y parece estructuralmente distinto del correspondiente factor plasmático. Contribuye a aumentar la actividad de la fase de contacto de la coagulación. Recientes estudios concluyen que existe una forma plaquetaria de éste, funcional y antigénicamente similar al plasmático, pero distinto en peso molecular y estructura de sus subunidades. El significado de este factor asociado a la membrana plaquetaria, aunque no definitivamente conocido, parece ser el de sustituir al factor XI plasmático en el mantenimiento de la hemostasia normal (80).

El factor XIII plaquetario está compuesto por una sola subunidad dimérica y un componente citoplásmico, y permanece intracelular durante la secreción de fibrinógeno y la reacción de liberación. Estudios con inmunofluorescencia han demostrado su presencia en el megacariocito, el cual parece ser su lugar de síntesis. Es probable que el factor XIII plaquetario sea la fuente de la subunidad A del plasmático (81).

Recientemente se ha demostrado la existencia de un kininógeno de alto peso molecular (HMWK) plaquetario, que es idéntico al plasmático. Se localiza en los gránulos alfa y

tiene un lugar de unión específico y saturable en la plaqueta activada y no activada. Su función es por ahora desconocida, aunque se piensa que puede ser un receptor para la interacción del factor XI con la plaqueta, ya que ambos circulan formando un complejo. Una segunda hipótesis es la que prevé que el HMWK activado por una o varias proteasas plasmáticas, aumenta su actividad coagulante acelerando la reacción de las proteasas de la vía dependiente del factor XII (82).

Del mismo modo, el HMWK plaquetario junto al plasmático puede funcionar como inhibidor de las proteasas plaquetarias que se activan cuando estas células son destruidas.

#### 4.1.2. Factores activadores de la protrombina.

Otro factor de la coagulación existente en estas células es el factor V, lo que se ha demostrado por métodos radio y enzimo-inmunológicos. Se localiza principalmente en los gránulos alfa, por lo que es secretado cuando la plaqueta es estimulada. Su presencia en el megacariocito también se ha comprobado mediante inmunofluorescencia, y recientemente también se ha hecho lo propio en lo referente a su síntesis en dicha célula.

El factor V es probablemente el receptor para el factor Xa. Esto se pone de manifiesto en los pacientes con déficit congénito de factor V, que presentan plaquetas con un número de receptores para el factor Xa disminuido. De igual modo, cuando existe un déficit de gránulos plaquetarios (Síndrome de Gray) aparece una moderada tendencia hemorrágica y formación de factor Va gravemente alterada. Parece también estar relacionado con la actividad del factor plaquetario 3 (83).

#### 4.1.3. Fibrinógeno.

El fibrinógeno ha sido localizado asociado a la superficie de los gránulos alfa. Varios estudios han indicado que es similar al plasmático inmunológica, electroforética, fisiológica, y estructuralmente, aunque existen autores que no se muestran totalmente de acuerdo en esto. Dicha molécula es secretada mediante un proceso que consume energía como respuesta a una serie de estímulos tales como el ADP, trombina y colágeno. También se ha demostrado que el fibrinógeno se sintetiza en el interior de los megacariocitos. La función de este compuesto no está totalmente clara, dado que plaquetas afibrinogénicas agregan normalmente en presencia de fibrinógeno exógeno (84).

#### 4.1.4. Factor de von Willebrand.

En los gránulos alfa también existe factor de von Willebrand. Parece que las plaquetas contienen multímeros de peso molecular muy elevado. Estos multímeros son hidrolizados por proteasas calcio-dependientes en fragmentos de peso molecular muy bajo. Este factor aparece en la superficie de la plaqueta activada, y tiene un papel esencial en su adhesión al subendotelio. Por contra de la localización de la síntesis del factor VIIIc, que no está en la actualidad totalmente esclarecida, se sabe que el factor de von Willebrand se produce en los megacariocitos y en las células endoteliales.

La alfa-1-antitripsina presente en la plaqueta y el megacariocito es idéntica a la plasmática, lo mismo que ocurre con la alfa-2-antiplasmina y el activador tisular del plasminógeno (80).

#### 4.2. Mecanismos plaquetarios de activación de la coagulación.

Tras la descripción de las proteínas de la coagulación asociadas a las plaquetas debe seguir la descripción temporal de la participación de estas células en la

activación de dicha vía.

Las experiencias de algunos grupos han probado que la plaqueta puede potenciar la activación por contacto promoviendo la activación de la precalicreína, factor XII y HMWK. Debido a la existencia en ella de inhibidores de las proteasas coagulativas, puede servir de lugar de regulación de la actividad de éstas (85).

Por otro lado, se ha postulado que la plaqueta es capaz de activar el factor XI mediante un mecanismo independiente de la presencia de factor XII, que es una propiedad de la plaqueta que ha sido llamada "actividad coagulante inducida por el colágeno" (86). De esta forma, el factor XI es capaz de puentear la fase de contacto de la coagulación. Esta vía alternativa puede producir por su ausencia un estado de diátesis hemorrágica.

La participación de la plaqueta en la activación del factor X también ha sido comprobada recientemente. Así, se ha demostrado que la plaqueta activada acelera la velocidad de activación del factor X por parte del factor IXa en presencia de factor VIII. El factor Xa así formado sobre la superficie de la plaqueta queda ligado a ella y es protegido de la inactivación por parte de los inhibidores de las proteasas plasmáticas (86).



Los estudios sobre el factor VIII y su participación en el complejo activador del factor X sugieren una estrecha semejanza con el factor V. Tanto el factor V como el VIII son cofactores de enzimas vitamina K-dependientes (factores IXa y Xa respectivamente), que junto con el calcio y la membrana plaquetaria activan la protrombina y el factor X y son inactivados por el tratamiento con quelantes fuertes como el EDTA, sugiriendo que los iones divalentes son importantes en la organización de la estructura de ambas proteínas. Esta unión con los iones divalentes es la que permite a los cofactores desarrollar un papel central en la aceleración de las reacciones coagulativas y unirse a la membrana plaquetaria (87).

La analogía entre los factores Va y VIIIa se extiende hasta la secuencia de aminoácidos del extremo amino. Por esta analogía con el factor V se puede pensar que el extremo carboxilo terminal del factor VIII contenga el sitio de unión con los lípidos de la membrana.

Aunque el factor IXa es capaz por si solo de catalizar la reacción de activación del factor X, la velocidad de ésta aumenta unas 100000 veces en presencia de factor VIIIa, es probable que mediante la formación de un complejo factor IXa-factor VIIIa que realice dicha función.

Se puede pensar que los complejos factor IXa-factor VIIIa y factor Xa-factor Va actúan de forma concertada en la superficie de la plaqueta y en zonas localizadas de ésta. El factor VIII se une de forma estequiométrica al factor IXa (1:1) catalizando la activación de una molécula de factor X cercana a otra de factor Va (83).

Estudios anteriores habían demostrado que el factor Xa y la protrombina se unían a micelas fosfolípídicas cargadas negativamente mediante un mecanismo calcio-dependiente, mientras que el factor V lo hacía de forma hidrofóbica en ausencia de calcio exógeno. Se forma así un complejo fosfolípido-proteína capaz de activar la protrombina. Por otra parte se había demostrado que las cadenas ligeras del factor X y de la protrombina contienen residuos gamma-carboxiglutámicos necesarios para la unión de la protrombina y el factor X a la superficie fosfolípídica mediante iones calcio (87).

El factor Va se une a los fosfolípidos que contienen fosfatidilserina mediante un enlace hidrofóbico a través de la cadena ligera E. En la superficie plaquetaria existen unos 3000 lugares de unión para dicho factor, y la unión de éste con aquellos es 1000 veces más intenso que la existente con las micelas fosfolípídicas sintéticas.

De esta manera el factor V queda insertado en la membrana plaquetaria formando un receptor para el factor X, el cual se une a éste mediante su grupo gamma-carboxi-glutámico. La protrombina, formada por tres regiones (fragmento 1, fragmento 2 y protrombina 2) se une al factor V a través de su fragmento 1, y al factor X y la superficie plaquetaria a través del 2 (80).

La consecuencia de esta unión a la superficie lipídica es la aceleración en unas 200000 veces de la velocidad de activación de la protrombina por parte del complejo factor Xa-factor Va-calcio-fosfolípidos comparada con la que se produce en ausencia de fosfolípidos y factor V. El segundo de ellos aumenta la velocidad máxima de la reacción, mientras que los primeros ejercen su efecto a través de una unión muy estrecha con el factor Xa y un decremento de su Km por la protrombina.

#### 4.3. Acción de la vía de la coagulación sobre la plaqueta.

Un último aspecto de interés es la interacción de la plaqueta con el fibrinógeno y el significado de esta interacción para la agregación y la retracción del coágulo. El papel esencial de dicha molécula en la agregación

plaquetaria es conocida desde hace más de veinte años.

El fibrinógeno no es capaz de unirse a plaquetas en estado de reposo, sino que requiere su activación previa por medio de alguna de las sustancias inductoras, y una vez producida ésta se une al complejo formado por las glucoproteínas IIb-IIIa y el calcio. De esta manera, el fibrinógeno forma puentes de unión entre las plaquetas para que éstas agreguen (88).

## 5. PROTEINAS ANTI-HEPARINA.

Las proteínas existentes en las plaquetas, especialmente las conocidas como proteínas específicas plaquetarias, han despertado un gran interés por ser marcadores moleculares de la activación de estas células. Esto se basa en parte en su especificidad por dichas células, su baja concentración en plasma y la posibilidad de ser detectadas mediante técnicas RIA y ELISA. Aunque el listado de estas proteínas es bastante extenso, dos de ellas han sido particularmente estudiadas, el Factor Plaquetario 4 y la beta-Tromboglobulina, ambas conocidas con el nombre genérico de proteínas anti-heparina.

### 5.1. Descubrimiento de las proteínas anti-heparina.

En 1944, Waugh y Ruddick observaron que a concentraciones fijas de heparina, los pacientes con altos recuentos plaquetarios presentaban un acortamiento del tiempo de coagulación, y llamaron a esta respuesta "efecto de reducción plaquetario".

En 1947 Allen notificó que la sangre de pacientes trombocitopénicos era más sensible a las variaciones de la

concentración de heparina en los estudios de coagulación.

Nuevos estudios hallaron que a menudo, en pacientes trombocitopénicos, eran necesarias grandes cantidades de sustancias anti-heparina, como el azul de toluidina o el sulfato de protamina para restaurar un tiempo de coagulación normal. Ellos atribuyeron este aumento de la sensibilidad a la heparina a la posible existencia de sustancias con actividad "heparin-like" (25, 68).

En 1948, Conley demostró cuantitativamente que la concentración de heparina requerida para inhibir la coagulación era directamente proporcional al número de plaquetas presentes. Comparando plasmas ricos y pobres en estas células encontraron que la acción inhibidora de la heparina sobre el tiempo de coagulación estaba inversamente relacionada con la concentración de aquellas. De esta forma se puso de manifiesto que la existencia de antagonistas de heparina era una hipótesis más plausible que la que achacaba este efecto a la presencia de sustancias "heparin-like".

En el comienzo de los años 50, van Creveld y Paulssen, usando técnicas de precipitación con sulfato de bario, fueron capaces de aislar un componente plaquetario que mostraba una elevada capacidad para inhibir la heparina unida a actividad tromboplastínica (89, 90). Rápidamente,

diversos investigadores distinguieron químicamente las fracciones con actividad anti-heparínica y tromboplastínica. Por fin, y ha propuesta de Seegers, Johnson y Deutsch, a este componente plaquetario con actividad anti-heparina se le llamó Factor Plaquetario 4 (91).

Por otra parte, en 1962 se descubrió la existencia de una beta globulina específicamente plaquetaria, la beta-Tromboglobulina, que era capaz de unirse a la heparina. A su vez, Rucinsky en 1974 encontró una nueva proteína con dicha actividad, aunque menor que la del Factor 4, por lo que la llamó Factor Plaquetario 4 de Baja Afinidad (LAPF 4) (91). Nuevas investigaciones descubrieron que ambas proteínas tenían características inmunológicas cruzadas, así como una secuencia de amino ácidos muy similar. Por todo esto se llegó a la conclusión de que la beta-Tromboglobulina era en realidad un producto de la proteólisis del LAPF 4 (92).

Una vez conocida la existencia de estas proteínas se intentó localizar su situación dentro de la plaqueta, lo que se consiguió mediante la centrifugación diferencial en un gradiente de densidad de sucrosa. De esta forma, estas proteínas fueron localizadas en la fracción 7 resultante de dicha centrifugación, que se corresponde con los gránulos alfa (93).

## 5.2. Beta-Tromboqlobulina.

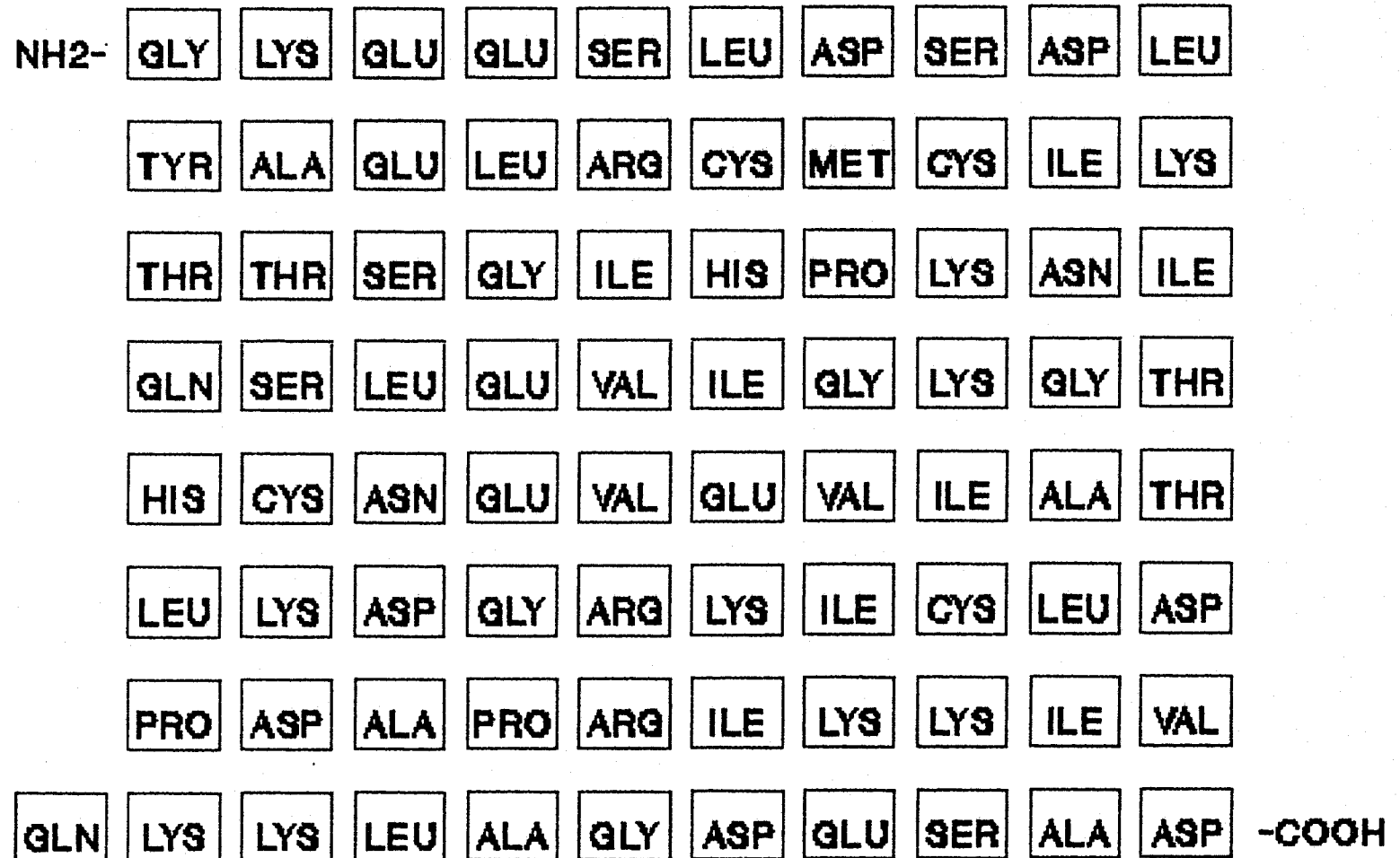
La BTG es la proteína específica plaquetaria más abundante, alcanzando en los gránulos alfa concentraciones 300.000 veces superiores a la existente en otras localizaciones del organismo. Es liberada por dichos gránulos durante la agregación in vitro inducida por el ADP, EPN, AA, colágeno y trombina, o mediante el uso de ultrasonidos, aproximadamente en un 70% del contenido total.

Ha sido aislada, caracterizada y bautizada por Moore. Tiene un Pm de 35.800 D y está constituida por cuatro subunidades de 81 a.a. cada una con un Pm de 8851. La secuencia de dichas subunidades se puede observar en la FIGURA II (94).

Está estructuralmente relacionada con el LAPP 4, con el que presenta reacciones inmunológicas cruzadas, e igual afinidad por la heparina (1 mg de LAPP 4 o BTG es capaz de neutralizar 2.6 U de heparina), y sus secuencias de aminoácidos son muy similares, de forma que el LAPP 4 tiene cuatro aminoácidos adicionales en su extremo carboxilo-terminal (Asn-Leu-Ala-Lis) siendo igual el resto de la cadena. Basado en esto se ha sugerido que la BTG es un fragmento proteolítico estable del LAPP 4.



**FIGURA II**  
**ESTRUCTURA DE BTG**



Las dos proteínas son distinguibles por su movilidad electroforética en acetato de celulosa a pH 8.6, en la que la BTG emigra en la región beta y el LAPF 4 en la gamma. Igualmente, los puntos isoelectricos en gel de poliacrilamida son de 7.0 y 8.0 respectivamente (92, 95). Realmente no se sabe aún si la sustancia liberada por la plaqueta es el LAPF 4, que en plasma pasa rápidamente a BTG o si ambas sustancias son secretadas.

La BTG no tiene actividad biológica conocida, aunque ya se ha expuesto su capacidad de unión a la heparina y se ha visto que es capaz de inhibir la producción de prostaciclina por el endotelio vascular. En vista de su alta concentración en los gránulos alfa (4-8 mcg en cien millones de plaquetas; 1-1.6 ng/g plaquetas; 2.5% del peso en seco de la plaqueta) se ha pensado que sería una proteína que tendría como misión el estabilizar los componentes activos de dichos gránulos.

Aproximadamente el 70% es liberado de la plaqueta por estímulos biológicos, de los cuales los más importantes son el colágeno y la trombina.

Su concentración plasmática media, según distintos autores, varía entre 30 y 35 ng/ml de media, con un intervalo de normalidad entre los 10 y 50. Por su parte, la

urinaria es el 0.5 % de aquella (79, 95). Esta última depende del flujo renal y de la reabsorción tubular de agua, ya que lo hace con ésta. No se sabe si en orina aparece la BTG como tal o como un metabolito con las mismas características inmunológicas. Dicha concentración también se puede expresar en U/ml, equivaliendo una unidad a un nanogramo.

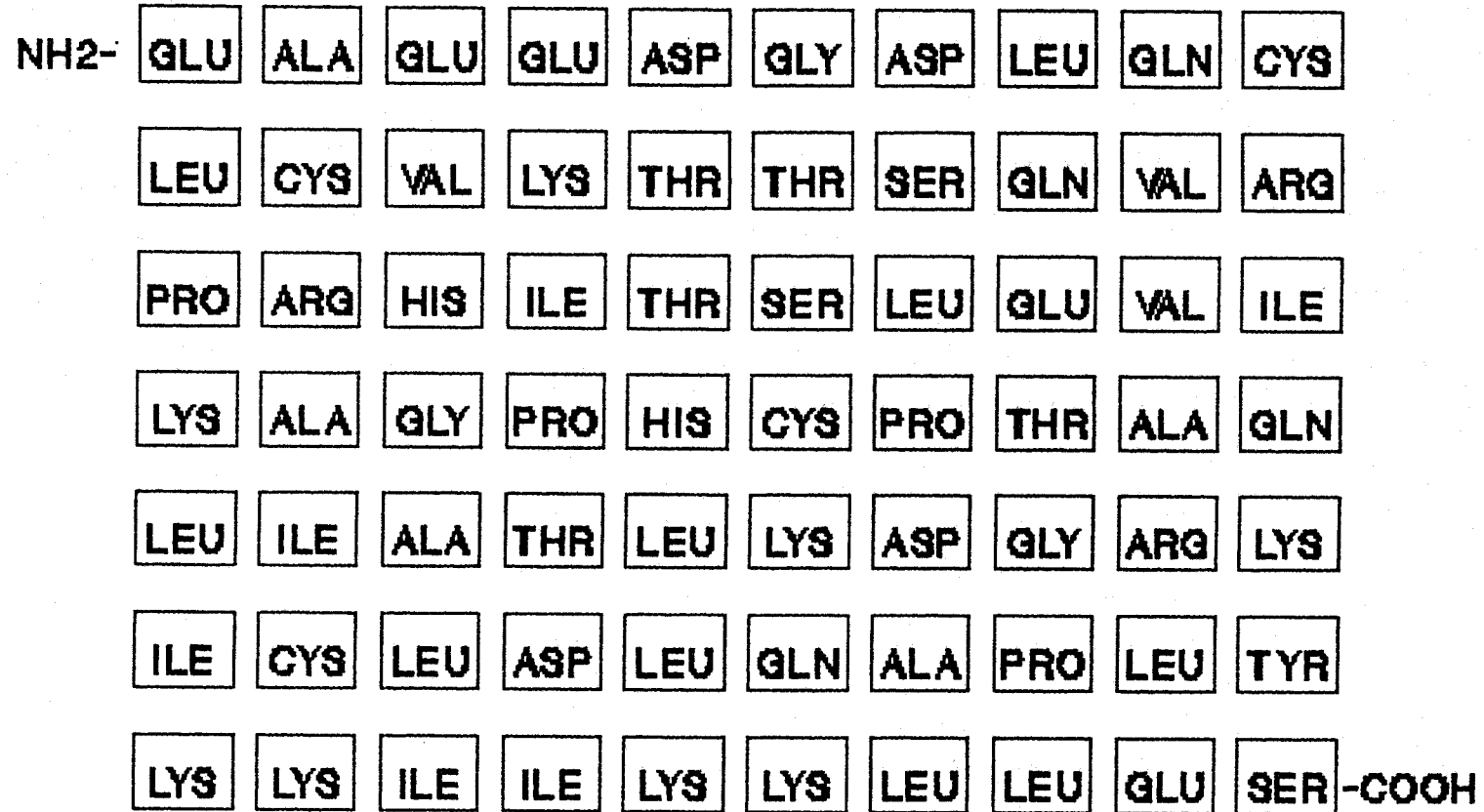
Atraviesa libremente las membranas biológicas, por lo que sus concentraciones en líquido sinovial y amniótico son similares a las plasmáticas, pero no atraviesa la barrera hematoencefálica (79).

Su vida media es de 100 minutos a 37 grados, siendo su eliminación fundamentalmente urinaria (96).

### 5.3. Factor Plaquetario 4.

El FP 4 está formado por cuatro subunidades de 70 amino ácidos con un peso molecular de 7780 cada una, con lo que se forma una proteína de 27199 D. Circula unida a un proteoglicano transportador que pesa 358000 D, formado a su vez por subunidades de condroitín-4-sulfato de 12000 D y cuya porción proteica es de 11000 D (95, 97). Su secuencia de amino ácidos, que se halla expuesta en la FIGURA III

**FIGURA III**  
**ESTRUCTURA DE FP 4**



(98), es bastante similar a la de la BTG, teniendo 43 aminoácidos iguales y colocados en la misma posición.

Es liberado a la par y en la misma cantidad que la BTG, pero su concentración plasmática es bastante más baja que la de ésta (entre 2.5 y 20 ng/ml) debido fundamentalmente a su rápida eliminación (99). Esta eliminación sigue una curva bifásica, en la cual la primera parte, la más importante, tiene una vida media menor a los 2 minutos. Esta primera fase parece debida a la rápida unión de este compuesto con las células endoteliales, mientras que la segunda se debe a su distribución por el organismo. No aparece en orina en condiciones normales, o si lo hace es en concentraciones tan bajas que no pueden ser detectadas con los métodos actuales.

Su unión a las células endoteliales se realiza por su gran afinidad por los glucosamino-glicanos de su membrana, sobre todo por el heparán y dermatán-sulfato. La afinidad por estos compuestos es mayor cuanto mayor es la cantidad de grupos fosfato que existen en ellos. De esta forma, es mayor por la heparina, en segundo lugar por el heparán y dermatán-sulfato, y en último lugar por el condrotín-4-sulfato que ejerce de transportador. Esto explica que tras ser secretado unido al transportador se libere rápidamente de éste para unirse a los componentes de las células endoteliales, y cuando hay heparina en el plasma abandona a éstos para

unirse a esta última. Este hecho explicaría tanto su rápida desaparición del plasma circulante tras su secreción como el aumento de su concentración cuando se realiza terapia heparínica (25).

#### 5.4. Significación clínica.

Desde hace algunos años es conocido el hecho de que en algunos estados patológicos que conllevan alteraciones de tipo trombótico se observan elevaciones de los niveles de BTG en sangre venosa. Diversos estudios han demostrado que esta sustancia es un marcador de la activación plaquetaria y un índice sensible de gran variedad de estados caracterizados por alteraciones de tipo arteriosclerótico o vasculopático, que conducen con el tiempo a la aparición de trombosis.

También se ha observado que otras situaciones, como por ejemplo la trombocitemia y algunas trombocitopenias, se acompañan de cambios en las concentraciones séricas y/o urinarias de dichas proteínas.

Como regla general, se puede considerar que la modificación de los niveles de BTG y FP 4 tienen la siguiente significación (100):

- Niveles elevados de BTG y normales o ligeramente elevados de FP 4 son índices de una liberación in vivo, siempre que el paciente no presente alteraciones de la función renal.
- Elevación de la concentración de ambas proteínas se hallan cuando se produce una liberación in vitro.
- Valores normales de BTG y elevados de FP 4 indican que el paciente está sometido a terapia heparínica.

Según algunos autores, más que las cifras de estas proteínas sería útil la expresión de su cociente. Esto, cuenta con el inconveniente de que es bastante difícil establecer un intervalo de referencia.

#### 5.5. BTG y FP 4 en diversos estados patológicos.

La BTG se ha demostrado estar significativamente elevada en sujetos afectos de desórdenes mieloproliferativos (mielofibrosis, policitemia vera, trombocitemia). En estos enfermos la concentración de FP 4 no se modifica (101).

Los pacientes diabéticos en los que no existen signos de complicación vascular no muestran diferencias significativas con los grupos control. Cuando aparecen estas

complicaciones, así como las neurológicas, suben los niveles de la primera proteína, pero no se modifica la segunda. No se han apreciado diferencias cuando el proceso se trata con insulina o con antidiabéticos orales (102).

Cuando se sufre un proceso leucémico, tanto agudo como crónico y linfoide como no linfoide, la BTG se encuentra moderadamente aumentada según algunos autores, aunque según otros está baja tanto en las leucosis agudas como en las aplasias medulares (100, 103).

Algunos pacientes con artrosis de cadera totales la presentan elevada. Después de la intervención para insertar prótesis de cadera, en los seis primeros días, los valores de BTG se encuentran elevados. Por su parte, los de FP 4 aumentan sólo después de la intervención, al sexto día (104).

Valores altos de ambas proteínas se encuentran en pacientes afectos de arteriopatías coronarias, sobre todo cuando existen antecedentes de infarto agudo de miocardio. Lo mismo sucede en las cuatro horas posteriores a la presentación de un cuadro de angina inestable, para posteriormente volver a la normalidad. En la fase aguda del infarto de miocardio aparece una rápida elevación de la BTG seguida de una gradual normalización (96, 105).



Pacientes sometidos a intervenciones de by-pass aorto-coronario presentan un aumento de la BTG en los meses posteriores a dicha intervención. Por esta causa se ha sugerido que la revascularización coronaria no es suficiente para eliminar la causa de la activación plaquetaria (96).

La BTG también está elevada en todas las situaciones que conllevan una vasculopatía, siendo dicha elevación proporcional a la gravedad del proceso morboso. De esta forma ocurre en el fenómeno de Raynaud, en el que también se aprecia un aumento de la agregación plaquetaria inducida por el ADP (106).

En personas con hipertensión arterial esencial también vemos altos niveles de esta proteína, elevación que se halla en relación con los de LDL, VLDL-colesterol y colesterol total, pero no con los de HDL. Igual ocurre en la hiperlipidemia tipo IIb (107, 108).

En algunas collagenopatías, como la esclerodermia, la elevación de la BTG va acompañada de la presencia de agregados plaquetarios circulantes.

La coagulación intravascular diseminada, la púrpura trombótica trombocitopénica y el síndrome hemolítico-urémico son situaciones en las que se observa elevación de

la BTG. Hay que tener en cuenta que si estas entidades coexisten con una insuficiencia renal los niveles serán aún más elevados, y que si en su terapia se utiliza heparina también subirán los de FP 4 (103).

Así mismo, la patología venosa (trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar) conlleva una liberación de ambas proteínas, principalmente si el episodio ha sido reciente (109).

En la pre-eclampsia gravídica, a causa del sufrimiento placentario también se elevada la BTG (110).

En las enfermedades renales aumentan tanto la BTG como el FP 4 en plasma de forma paralela a la disminución de la tasa de filtrado glomerular. También se encuentra elevada la BGT en orina. Cuando se realiza hemodiálisis, se produce un aumento de esta proteína unas 3 horas tras la realización de ésta; por su parte, no se han demostrado alteraciones en el caso de la diálisis peritoneal (111).

En las enfermedades vasculo-cerebrales obstructivas se encuentran elevadas estas sustancias en la fase aguda, pero no así en la crónica, en la que se normalizan (112).

## 6. FISILOGIA DEL PERIODO POSTOPERATORIO

Después de un acto quirúrgico exitoso, el curso postoperatorio debe ser el rápido retorno a la salud. Tanto la anestesia como la cirugía en sí mismas tienen efectos que alteran temporalmente la fisiología del cuerpo humano. Una sencilla operación ejecutada bajo anestesia local causa efectos generales mínimos; una amplia incisión abdominal, ocasionará alteraciones importantes a la fisiología.

Las molestias por la incisión serán agudas, durante 24-48 horas, y gradualmente deberán ir desapareciendo al tercer o cuarto día. Durante dicho periodo la inmovilización de los músculos abdominales pueden interferir en la respiración profunda y el reflejo tusígeno.

La disección intraabdominal y la irritación del peritoneo durante la intervención, resulta en la parálisis temporal de la actividad peristáltica del intestino (ileo paralítico), normal después de cualquier procedimiento quirúrgico abdominal. Si el campo de la operación está limitado, por ejemplo en una simple apendicectomía, el ileo puede no persistir durante más de 12-24 horas. Después de procedimientos quirúrgicos mayores asociados con traumas mecánicos del intestino o del peritoneo, la parálisis de la



actividad intestinal puede continuar durante 3-4 días.

Además de los cambios locales que resultan del traumatismo, es inevitable una reacción general (de stress) después de toda cirugía mayor. Esta reacción es proporcional a la magnitud del traumatismo quirúrgico y la pérdida de sangre, líquidos y electrolitos.

La respuesta a cualquier lesión es catabólica, ya que el organismo moviliza proteínas, grasas y glúcidos para proporcionar energía y poder de esta forma reparar los tejidos dañados. Este mecanismo es activado por ciertos factores metabólicos y endocrinos. Después de algunos días, que pueden prolongarse hasta varias semanas, se observa una respuesta anabólica. La ingestión calórica aumenta, y el balance nitrogenado cambia hasta hacerse positivo.

El aumento de la actividad metabólica está asociado con la "respuesta al stress", caracterizada por un aumento de los niveles circulantes de cortisol, catecolaminas, glucagón y otras hormonas catabólicas.

A menos que se desarrollen complicaciones, la temperatura corporal rara vez excede de los 37 grados. La frecuencia del pulso y la respiración rara vez exceden las cifras normales peroperatorias. El gasto cardiaco y el

consumo de oxígeno aumentan proporcionalmente. Un aumento de la temperatura por encima de 38 grados, o una elevación notoria de la frecuencia cardíaca o respiratoria son signos inequívocos de la presentación de complicaciones postoperatorias.

A continuación vamos a exponer con más detenimiento algunos de los aspectos del postoperatorio, con mayor detenimiento en lo referente a las alteraciones metabólicas y hemostáticas que se producen en éste.

#### 6.1. Efectos metabólicos del trauma.

El concepto de lesión (accidental o como procedimiento quirúrgico planeado) como evento que afecta a todo el cuerpo es relativamente nuevo en Medicina. Una herida implica el desencadenamiento de una serie de respuestas que están relacionadas con la preservación del aporte de oxígeno, regulación ácido-básica, gasto cardíaco y homeostasis general. Después de la fase global de compensación ocurren etapas secuenciales que depauperan las fuentes energéticas del organismo y pueden causar un deterioro progresivo de la masa corporal.

Se ha descrito un sistema para medir el grado de lesión en una escala 1-10, en la cual las diferentes intervenciones quirúrgicas están graduadas según su efecto sobre el organismo total. De esta forma, algunas operaciones externas consideradas comúnmente como inocuas tienen un alto precio desde el punto de vista metabólico, mientras que otras consideradas como mayores causan una menor demanda sobre las reservas energéticas del organismo.

La convalecencia de las heridas quirúrgicas ha sido dividida de esta forma en cuatro fases clínicas:

- 1) Fase de lesión o catabólica.
- 2) Punto de viraje.
- 3) Fase anabólica o de síntesis muscular.
- 4) Fase de recuperación de peso.

Estas fases se correlacionan clínicamente con los diferentes cambios en las cifras de hormonas, producción de energía, estado nutricional y equilibrio hidroelectrolítico. La duración de cada fase es variable, dependiendo en grado considerable de la magnitud del incidente.

Durante la fase inicial después de la intervención, el dolor ordinariamente limita el movimiento de la parte afectada. Con esto, si esta región ha sido el tórax o el

abdomen, la inspiración suele ser menos profunda, lo que se compensa con una hiperventilación, y esta produce una presión parcial baja de anhídrido carbónico y una alcalosis respiratoria.

Como respuesta a la pérdida de volumen sanguíneo, herida depauperante o agentes anestésicos, ocurrirá una liberación masiva de corticosteroides a través de los estímulos aferentes que llegan al SNC y actúan sobre el hipotálamo. Estas hormonas aceleran la gluconeogénesis y aumentan el depósito de glucógeno hepático. Además, la movilización de la grasa almacenada como tejido adiposo produce cifras séricas elevadas de ácidos grasos libres. El efecto neto es el causar la elevación de los intermediarios de los carbohidratos y lípidos para producir la llamada "diabetes de la lesión".

Quizás, más significativa para el mantenimiento del volumen plasmático adecuado, sea la liberación de mineralcorticoides provenientes de la corteza adrenal. Después del trauma, y en especial de la pérdida aguda de sangre, la secreción de aldosterona puede aumentar hasta treinta veces su valor normal. La circulación sanguínea renal disminuida puede liberar también renina, la cual convierte el angiotensinógeno presente en el plasma en angiotensina, con la consecuente vasoconstricción y aumento

de la liberación de aldosterona. La aldosterona incrementa la reabsorción de sodio y agua a nivel tubular, lo contrario de lo que sucede con el potasio. Por todo esto se produce un aumento del volumen y la presión sanguíneos.

Estimulada por la pérdida de sangre o por efecto directo del trauma quirúrgico, la liberación de vasopresina por la neurohipófisis conserva agua mediante un aumento de la permeabilidad tubular renal y la reabsorción. El efecto neto es la reducción del volumen de orina y el aumento de su osmolaridad. Aunada a la retención de sodio, la reexpansión del volumen extracelular se logra mediante un llenado iterativo transcápsular en menos de 24 horas.

Después de la estabilización de la lesión, la compleja interacción entre la composición del cuerpo, nutrientes administrados por vía exógena y mecanismos endocrinos, determinará si el paciente sanará de sus heridas o si por el contrario sucumbirá.

## 6.2. Respuesta catabólica a la intervención.

A menudo se ha observado que la velocidad de excreción de nitrógeno está aumentada después de un trauma o stress quirúrgico, lo que no es solo debido al déficit de su



ingesta. Un individuo con ingesta cero de nitrógeno en forma de proteínas, mantiene su excrección de nitrógeno urinario a una velocidad normal o algo reducida (4-6 g/día) por algún tiempo, después de lo cual ocurre sólo una reducción gradual a cifras bajas.

Como contraste, tras cirugía mayor o trauma intenso, la excrección de nitrógeno puede estar aumentada hasta 7-15 g/día durante 2-5 días, y si éstos han sido muy intensos puede alcanzar los 20 g/día. Si además, la herida se complica con una infección, aumentan las pérdidas de tejido, lo cual hace subir estas pérdidas hasta los 30 g, equivalentes a 180 g de proteínas, proveniente de 1 Kg de músculo esquelético (peso húmedo).

Aún cuando grandes cantidades de proteínas y calorías fácilmente utilizables sean administradas durante el periodo de catabolismo nitrogenado, la cantidad perdida de éste puede ser solo disminuída pero no abolida. Esto sugiere que los efectos metabólicos del traumna sobre la nutrición proteica no son atribuibles al grado de déficit alimentario. Debido a la naturaleza, obligatoria en apariencia, del catabolismo nitrogenado durante el periodo incial después del trauma, no parece deseable, aunque fuera factible, el administrar una ingesta nutricional tan elevada como para corregir las pérdidas.

Debido al aumento de la tasa de excrección de nitrógeno que sigue a la inyección de ACTH y ciertos corticoides adrenales, y debido a que la hiperactividad adrenal es un componente del stress que se produce en una intervención, el catabolismo posterior a ésta ha sido atribuido a dichos efectos endocrinos. Sin embargo, la naturaleza de una herida, en particular su duración como herida abierta, afecta también a la excrección de nitrógeno y pueden ocurrir cambios posteriores en el metabolismo de éste, incluso de forma independiente de cambios demostrables en la producción de corticosteroides. Lo mismo puede decirse de la naturaleza de la pérdida de este elemento en el anciano previamente debilitado, que no se correlaciona con cifras hormonales.

### 6.3. Metabolismo del potasio.

Las pérdidas de potasio son excesivas después de cualquier evento asociado a la destrucción de tejidos y pérdida de nitrógeno como es una intervención quirúrgica. En el primer día después de ésta se pueden excretar entre 2.5 y 3.5 gr, equivalentes a 40-50 mEq. En contraste con el nitrógeno, las pérdidas de potasio tienden a disminuir con rapidez, de manera que si se administran cantidades adecuadas de este catión el balance positivo se recupera en 3-6 días.

#### 6.4. Déficit calórico.

Constituye virtualmente una certeza el que la ingesta calórica inadecuada seguirá a las lesiones graves o intervenciones quirúrgicas extensas, en particular si la cirugía involucra a la cavidad peritoneal. Por lo tanto el paciente debe perder peso en los primeros días del periodo postoperatorio, y si esto no ocurre se deberá pensar que se está produciendo una retención hidrosalina.

La deficiencia exógena de energía requerirá que las fuentes de ésta desde el interior del organismo se movilicen para enfrentarse con las necesidades energéticas mínimas. Los carbohidratos, en su mayoría glucógeno muscular y hepático y glucosa del líquido extracelular, serán rápidamente utilizados. La totalidad de dichos compuestos disponibles en esta forma no sobrepasa los 300-500 gr, lo que equivale a 1200-2000 calorías, cifra que será consumida en apenas 8-16 horas.

#### 6.5. Efectos catabolismos sobre el tejido muscular y adiposo.

Ya han sido descritos los efectos del catabolismo inducido por la cirugía sobre los proteínas. Ningún tejido

que no fuera el muscular podría soportar una pérdida de sustancia tan importante como la que se produce en estos casos. De este modo, tras una intervención quirúrgica, y sobre todo si ésta va seguida de un proceso infeccioso, se puede perder hasta un 30 % de la masa muscular del organismo.

La pérdida de proteínas musculares que resulta en la pérdida de 20 gr de nitrógeno por orina conlleva la aparición de alrededor de 125 gr de glucosa, lo que equivale a 500 calorías.

No obstante, debe quedar claro que ni los carbohidratos prefabricados ni los producidos a partir de la neoglucogénesis pueden proporcionar una cantidad significativa de calorías. Consecuentemente, el aporte de éstas debe venir por parte de la grasa acumulada en el tejido adiposo. Después de un trauma mayor, la grasa corporal es movilizad a una velocidad de 250-500 g/día (2000-4500 cal.).

La oxidación de 1 Kg de grasa produce algo más de 1000 ml de agua de oxidación. La misma cantidad de tejido muscular conlleva la aparición de 730 ml de agua celular y 250 de agua de oxidación. Por tanto, toda esta fuente de agua endógena adicional debe ser tenida en cuenta a la hora

de calcular las necesidades hídricas del paciente en el postoperatorio (113, 114).

#### 6.6. Alteraciones de la hemostasia tras la cirugía.

La intervención quirúrgica y las circunstancias que la rodean producen cambios en la integridad del proceso hemostático y alteran su respuesta. Las plaquetas, el fibrinógeno y otros elementos lábiles son consumidos, los niveles de AT III se reducen y hay activación de la fibrinolisis. Estos cambios son agravados por procedimientos que incluyen transfusiones de sangre y exposición de la sangre a superficies extrañas como ocurre en los casos en los que se utilizan prótesis y circulación extracorpórea.

Estas alteraciones son principalmente de dos tipos: la aparición de hemorragias y trombosis. Las primeras, que no son objeto de estudio en este trabajo se pueden deber fundamentalmente a la realización defectuosa de la técnica quirúrgica o la existencia previa de déficits de la coagulación de la sangre. Nosotros, vamos a ocuparnos fundamentalmente de la segunda complicación, de las trombosis postoperatorias.

Hay tantos factores que pueden contribuir a la trombosis venosa dentro del postoperatorio que no se debe dogmatizar acerca de la importancia excesiva de ninguno de ellos. La asociación de varios, como son la intervención quirúrgica cruenta en un paciente anciano, obeso, con insuficiencia cardíaca previa, con varices y un largo periodo de inmovilización en cama tras la intervención, facilita sin duda la aparición de esta complicación.

A pesar de todo lo dicho, quizás el factor predisponente más importante sea la historia previa de trombosis venosas; aunque no raramente el primer indicio de una ellas es un embolismo pulmonar fatal que ocurre inesperadamente tras una intervención banal en un sujeto joven que se encontraba con anterioridad en buenas condiciones.

Tanto la anestesia como la intervención en si misma predisponen al éstasis venoso. Ciertas posturas en la mesa de operaciones y algunas técnicas anestésicas favorecen el estancamiento de la sangre en las venas. La depresión del tono de todos los músculos esqueléticos, y los efectos directos del trauma quirúrgico (como en las operaciones de la pelvis) acompañan normalmente a muchas intervenciones, y se acentúan si la operación se alarga o se acompaña de oligohemia.

La mayoría de las trombosis de las venas profundas comienzan durante la intervención quirúrgica o en el periodo postoperatorio inmediato, esto es, dentro de las primeras 72 horas.

Es difícil decidir cuales son los factores desencadenantes más importantes. Durante el postoperatorio existe un éstasis venoso secundario a la inmovilización o restricción de los movimientos musculares, que además de las variaciones metabólicas producidas por la cirugía, pueden alterar el normal equilibrio entre los factores trombogénicos y antitrombogénicos, dando lugar a una tendencia a la formación de trombosis. Además, la existencia de una infección, quirúrgica o no, concomitante acentúa esta tendencia.

De todas formas, no todos los pacientes que reúnen las características que hemos referido anteriormente sufren trombosis en el curso del postoperatorio, por lo que parece evidente que debe existir algo en cada enfermo que determine el que aparezcan o no. Este algo, que lógicamente debe formar parte del proceso hemostático, no está aun aclarado, pero parece evidente que puede ser tanto perteneciente a la vía coagulativa como a los procesos relacionados con la plaqueta (115).

**II. PLANTEAMIENTO**  
**DEL PROBLEMA.**



Es un hecho aceptado ampliamente la existencia de un mayor número de procesos trombóticos que ocurren en personas que han sido sometidas recientemente a una intervención quirúrgica que el que presenta la población general. Pero por otro lado, no todas las personas sometidas a dicho procedimiento terapéutico sufren esta complicación.

Evidentemente, esta complicación puede ser debida a un fallo técnico o humano durante la intervención. Pero existe un gran porcentaje de pacientes en la que se presenta la trombosis sin que exista dicho fallo. Por ello habría que pensar que el proceso quirúrgico puede modificar de algún modo alguno de los mecanismos que intervienen en la normal hemostasia sanguínea.

Dentro de ésta, los mecanismos que pueden ser modificados y como consecuencia de lo cual producirse una trombosis son los siguientes:

- 1) Formación del trombo plaquetario.
- 2) Cascada de la coagulación de la sangre.
- 3) Sistema fibrinolítico.

De estos tres apartados el primero de ellos ha sido el menos estudiado, en gran parte debido al escaso número de

métodos fiables y reproducibles para el estudio del funcionalismo plaquetario disponibles hasta fecha reciente. Por ello, este trabajo va encaminado a investigar la posible influencia de una intervención quirúrgica sobre los parámetros de función plaquetaria.

De entre todos los métodos disponibles para dicho estudio hemos elegido dos: una prueba utilizada desde hace bastante tiempo, pero que ha recibido un notable impulso recientemente con la aparición de nueva instrumentación como es la agregación plaquetaria; y una de las más recientes adquisiciones en este apartado, el estudio mediante técnicas de ELISA de la liberación de sustancias específicas de las plaquetas, como son la beta-Tromboglobulina y el Factor Plaquetario 4.

Esta elección la hemos hecho de acuerdo con dos criterios principales: la facilidad de realización de la prueba, y la cantidad de información que aporta. Hemos obrado de este modo por considerar que existen pruebas muy simples y fáciles de realizar, por lo que son ampliamente utilizadas, pero con las que se obtiene escasa información. Por el contrario, hay otros métodos que dan gran cantidad de datos, pero debido a su complicación no es rentable su aplicación a la práctica clínica diaria.

III. MATERIAL Y  
METODOS.

## 1. SELECCION DE PACIENTES Y OBTENCION DE MUESTRAS.

### 1.1. Selección de pacientes.

Se han tomado muestras de sangre venosa de un total de 64 pacientes elegidos al azar de entre los sometidos a intervención quirúrgica reglada en los Servicios de Cirugía General y Cirugía Torácica del Hospital Universitario Virgen Macarena y que cumplieran las siguientes condiciones:

- 1) No sufrir alteraciones de la coagulación de la sangre conocidas ni anemias severas.
- 2) No padecer ningún proceso que se sepa sea capaz de alterar la función plaquetaria. Estos figuran en las TABLA VII y TABLA VIII.
- 3) No estar recibiendo desde una semana antes de la primera toma y hasta después de la segunda medicamentos que alteren la función plaquetaria, tales como los que aparecen en la TABLA IX.
- 4) Poseer un recuento plaquetario superior a 125.000 por m.c.
- 5) Poseer una función renal normal, determinada por las cifras de creatininemia.

Del mismo modo hemos tomado muestras de un total de 35 individuos sanos, entre personal sanitario y voluntarios que acuden a Cámara de Donantes de Sangre.

La edad media de los pacientes ha sido de 58 años, con unos máximo y mínimo de 24 y 79 respectivamente. A su vez, las correspondientes a los controles han sido de 47, 19 y 57 años. De entre los los primeros 36 han sido varones y 28 hembras; y de entre los segundos 19 y 14 respectivamente.

Los diagnósticos de los pacientes han sido los siguientes:

1) Colelitiasis -----	18 casos.
2) Carcinoma de colon -----	15 casos.
3) Carcinoma de pulmón -----	8 casos.
4) Hernia de hiato -----	4 casos.
5) Carcinoma gástrico -----	3 casos.
6) Ca. intestino delgado -----	3 casos.
7) Divertículo de colon -----	3 casos.
8) Quiste de ovario -----	2 casos.
9) Carcinoma de esófago -----	2 casos.
10) Ulcus gastroduodenal -----	1 caso.
11) Pseudoquiste pancreático -----	1 caso.
12) Ca. vesícula biliar -----	1 caso.
13) Eventración postlaparotomía -----	1 caso.

- 14) Prolapso rectal ----- 1 caso.  
 15) Colitis ulcerosa ----- 1 caso.

Estos 64 enfermos fueron divididos en tres grupos según el tipo de intervención al que fueron sometidos:

- 1) Cirugía torácica ----- 14 enfermos.  
 a) Lobectomías ----- 8 casos.  
 b) Funduplicaturas ----- 4 casos.  
 c) Esofaguectomías ----- 2 casos.
- 2) Cirugía abdominal alta --- 25 enfermos.  
 a) Colectomías ----- 19 casos.  
 b) Gastrectomías ----- 4 casos.  
 c) Pancreatectomía ----- 1 caso.  
 d) Herniorrafia ----- 1 caso.
- 3) Cirugía abdominal baja --- 25 enfermos.  
 a) Hemicolectomías ----- 19 casos.  
 b) Ileoyeyunectomías ----- 3 casos.  
 c) Anexectomías ----- 2 casos.  
 d) Rectopexia ----- 1 caso.

Esta distribución por la modalidad de cirugía se halla en la FIGURA IV.

Todos estos enfermos fueron intervenidos utilizando neuroleptoanalgesia.

### 1.2. Obtención de muestras.

Una vez seleccionados los pacientes, se obtuvo de éstos sangre mediante punción venosa, siendo conservada en los medios anticoagulantes específicos para cada prueba como se expone en el apartado de Métodos.

De cada paciente se tomaron dos muestras:

- 1) El día inmediatamente anterior a la intervención.
- 2) Tres días después de ésta.

TABLA VIIDEFECTOS CONGENITOS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

---

*Defectos de la adhesión.*

Enfermedad de von Willebrand.

Enfermedad de Bernard-Soulier.

*Defectos de la agregación.*

Tromboastenia de Glanzmann.

Afibrinogenemia.

*Defectos de la secreción.*

Déficit de cuerpos densos.

Síndrome de Hermansky-Pudlak.

Síndrome de Wiscott-Aldrich.

Síndrome de Chediak-Higashi.

Trombocitopenia con ausencia de radio.

Déficit de gránulos alfa.

Síndrome de la plaqueta gris.

Déficit combinados.



TABLA VIIIDEFECTOS ADQUIRIDOS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

---

*Defectos de la adhesión.*

Enfermedad de von Willebrand adquirida.

*Defectos de la agregación.*

Coagulación intravascular diseminada.

*Defectos de la secreción.*

Leucemia aguda.

Anticuerpos antiplaquetarios.

Administración de mitramicina.

By-pass cardiopulmonar.

*Defectos múltiples de la función plaquetaria.*

Uremia.

Administración de penicilinas.

Procesos mieloproliferativos crónicos.

Disproteinemias.

TABLA IXINHIBIDORES DE LA FUNCION PLAQUETARIA

---

*Agentes estabilizantes de membrana.*

Alfa-antagonistas.  
Beta-bloqueantes.  
Anestésicos locales.  
Antihistamínicos.  
Antidepresivos tricíclicos.

*Agentes que afectan la síntesis de prostanoïdes.*

Acido acetilsalicílico.  
Antiinflamatorios no esteroïdeos.  
Corticoides.

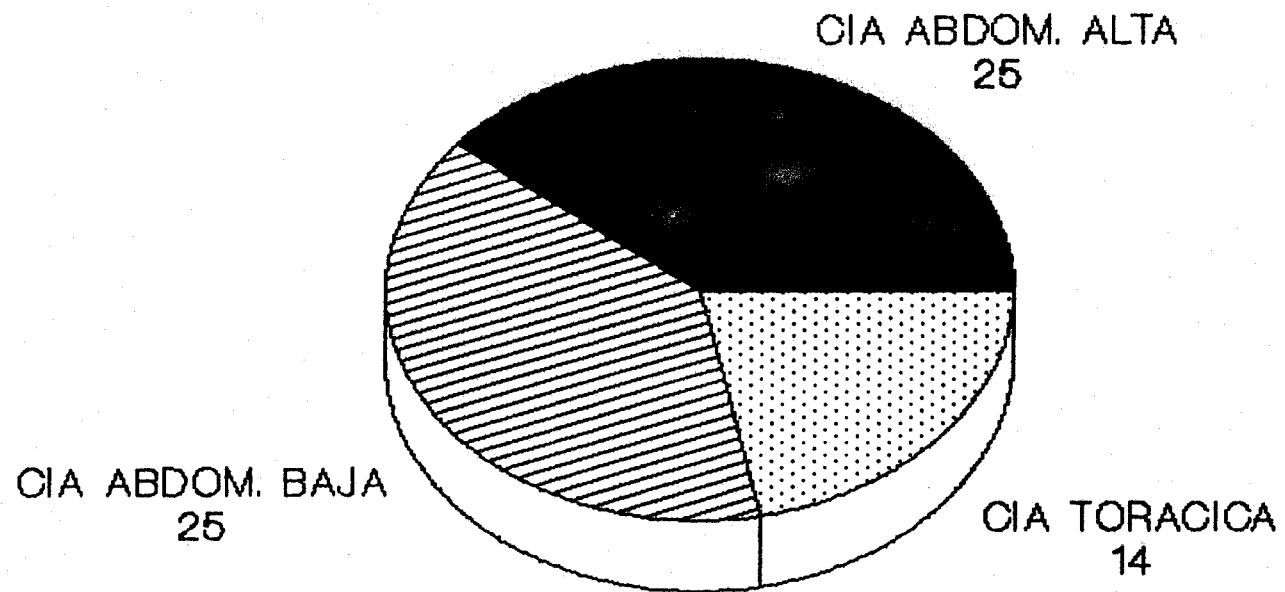
*Antibióticos.*

Penicilinas.  
Cefalosporinas.

*Otros agentes.*

Heparina.  
Dextranos.  
Etanol.  
Fenotiacinas.  
Clofibrato.

**FIGURA IV**  
**DISTRIBUCION POR INTERVENCIONES**



## 2. TECNICAS DE LABORATORIO.

### 2.1. Agregación plaquetaria.

#### 2.1.1. Fundamento del método.

Las plaquetas son capaces de agregarse unas a otras en presencia de agentes inductores adecuados. Al producirse esta agregación desaparecen las plaquetas libres del plasma, con lo que la turbidez de éste disminuye. Esta disminución de la turbidez puede cuantificarse por métodos fotocolorimétricos y será proporcional al porcentaje de plaquetas que han agregado, tomando como índice de 100 % el plasma pobre en plaquetas y como 0 % el plasma rico en plaquetas. Este es el llamado método turbidométrico de Born (116).

#### 2.1.2. Reactivos y aparataje.

Los reactivos usados como inductores de la agregación han sido los siguientes:

- 1) ADP, 100 mM = 50.7 mcg/ml.
- 2) Colágeno de tendón bovino, 100 mcg/ml.

- 3) Adrenalina, en forma de bitartrato de L-adrenalina, 500 mcM = 91.5 mcg/ml.
- 4) Ristocetina, 16.5 mg/ml.
- 5) Acido araquidónico, 14.3 mM.

Todos los reactivos han sido suministrados por Menarini Diagnósticos excepto la ristocetina que lo ha sido por Dia Med ID.

A partir de estos reactivos iniciales, y mediante dilución con una solución de tampón se consiguen los reactivos de trabajo a las concentraciones deseadas, que son:

- 1) ADP: 50, 20 y 10 mcM; así como la mínima necesaria para obtener una doble onda que será distinta para cada caso.
- 2) Adrenalina: 100 y 25 mcM
- 3) Colágeno: 20 mcg/ml.
- 4) Ristocetina: 12 mg/ml.
- 5) Acido araquidónico: Sin dilución.

La solución tampón está compuesta por:

- 1) Agua bidestilada.
- 2) Tris buffer, 0.05 M pH 7.4
- 3) Cloruro sódico, 2.2 g/l.

Las agregaciones se han realizado utilizando como agregómetro el AGGRECORDER II, suministrado por Menarini Diagnósticos.

### 2.1.3. Método de trabajo.

El método consiste en líneas generales en obtener plasma rico en plaquetas, en el que se va a realizar la agregación, y plasma pobre en plaquetas, para calibrar el agregómetro. Una vez conseguidos estos, se dispensa el inductor deseado en cada caso y comienza el proceso.

#### 2.1.3.1. Obtención de plasma rico en plaquetas. (PRP)

- Obtener 20 c.c. de sangre venosa citratada a una proporción 1:10.
- Centrifugar ésta durante 10 minutos a 160 g.
- Separar el plasma.
- Hacer un conteo de plaquetas y ajustar su cifra a 125-450.000 con plasma pobre en plaquetas si excediera de ésta última.

### 2.1.3.2. Obtención de plasma pobre en plaquetas (PPP)

- Centrifugar el resto de la sangre citratada durante 20 minutos a 1.000 g.
- Separar el plasma.

### 2.1.3.3. Método de trabajo.

- Encender el AGGRECORDER II durante 20 minutos antes de su utilización.
- Graduar la velocidad de giro de la barra magnética a 750-1250 rpm. Esto es necesario para producir agitación en el plasma, ya que si no se producen choques entre las plaquetas estas no agregan.
- Pipetear en una cubeta (tubo de hemólisis) 0.5 c.c. de agua destilada.
- Introducir la cubeta en el canal y presionar varias veces el botón PPP hasta que el número que aparece en la pantalla bajo el número del canal (CH.) se estabiliza. Si éste es mayor de 750-1250 rpm limpiar el canal.

- Repetir esta operación en los cuatro canales.
- Presionar el botón \*.
- Indicar la fecha y número de identificación de la muestra.
- Indicar los números de los canales a utilizar.
- Indicar los inductores y concentraciones de estos utilizados para cada canal, así como el tiempo que durará la prueba, que será de 8 minutos.
- Pipetear en una cubeta 0.5 c.c. de PPP.
- Pipetear 0.45 c.c. de PRP en cada cubeta, una por cada prueba a realizar. Introducir en cada cubeta una barra magnética y ponerlas a incubar durante tres minutos a 37 grados centígrados.
- Introducir la cubeta con PPP en el canal y presionar varias veces el botón PPP hasta que el número que aparece en PPP OD se estabilice. La luz bajo este botón se hará intermitente. Esto se realiza para calibrar el aparato, ya que esta cifra será tomada como el 100% de agregación.



- Repetir la operación en cada uno de los canales a utilizar.
  
- Introducir una cubeta con PRP en cada uno de los canales.
  
- Añadir a la cubeta 0.05 c.c. del inductor deseado mientras se presiona la tapa del canal. Si la operación ha sido correcta la luz del canal utilizado se hará continua.
  
- Con esto se ha realizado una nueva dilución 1:10 de los agentes inductores, con lo que las concentraciones finales a las que nos referiremos de ahora en adelante son:
  - + ADP: 5, 2 y 1 mcM.
  - + Adrenalina: 10 y 2.5 mcM.
  - + Colágeno: 2 mcg/ml.
  - + Ristocetina: 1.2 mg/ml.
  - + Acido araquidónico: 1.43 mM
  
- Repetir la operación en cada uno de los canales a utilizar.
  
- Al finalizar el tiempo programado para la prueba se apagará la luz del canal. Al finalizar todos los canales utilizados se imprimirá automáticamente el resultado.

- Si se desea terminar la prueba antes del tiempo programado presionar el botón PPP.

#### 2.1.4. Resultados.

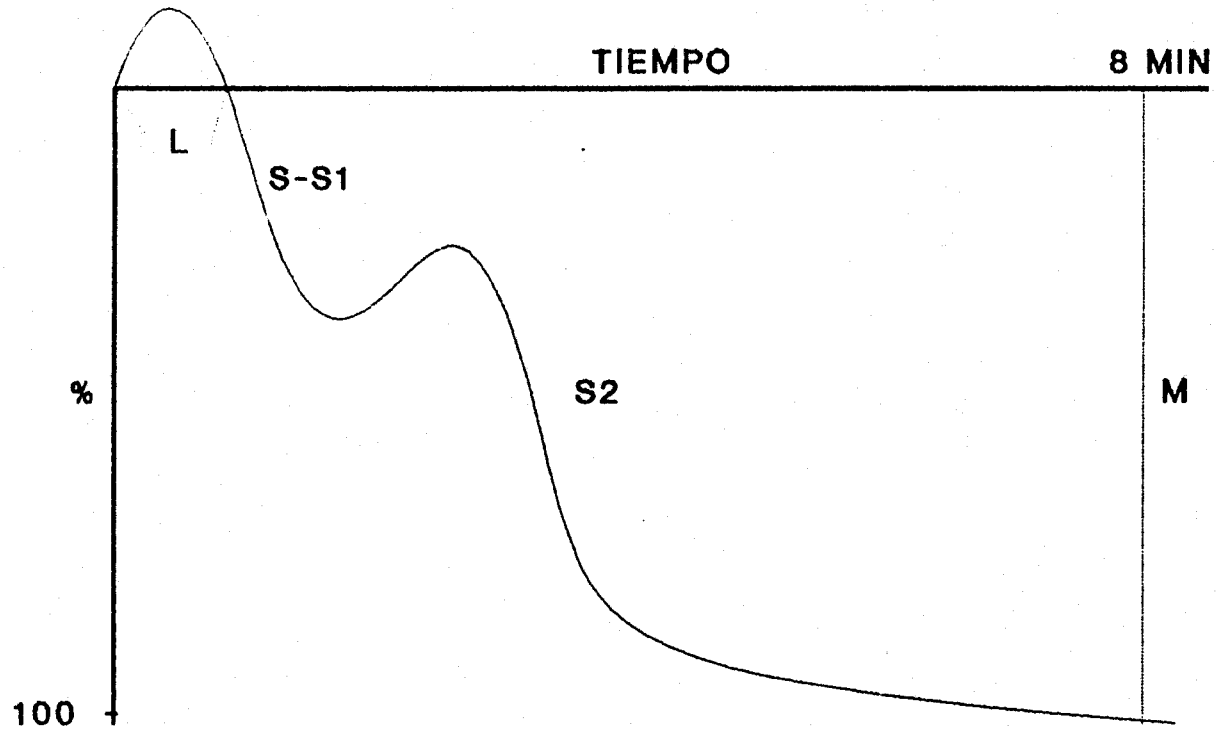
Con este método se consigue una curva que representa el porcentaje de agregación con respecto al tiempo. Para cada uno de los inductores y concentraciones utilizados se obtiene una curva hasta cierto punto característica, y en la que pueden analizarse una serie de parámetros que están expuestos a continuación y en el ESQUEMA I:

- 1) Porcentaje máximo de agregación (M).
- 2) Tiempo necesario para alcanzarlo.
- 3) Pendiente de la curva (S-S1).
- 4) Tiempo de latencia o "lag phase" (L). Sólo en el caso del colágeno.
- 5) Concentración mínima necesaria para obtener doble onda. Solo en el caso del ADP.
- 6) Pendiente de la segunda onda (S2). Sólo con ADP.

##### 2.1.4.1. Interpretación de las curvas de agregación.

Una vez puesto en contacto el inductor con la plaqueta

# ESQUEMA I CURVAS DE AGREGACION



tiene lugar el proceso de agregación, que comienza con el cambio de forma de la plaqueta. Al producirse éste, aumenta la turbidez del medio, por lo que la curva de agregación, en un primer momento, sube por encima del 0. Inmediatamente comienza la agregación en sí, que es representada por un descenso de la curva.

Cuando la concentración de inductor, en este caso ADP, es baja ( $<0.5$  mM), la agregación es reversible, por lo que la curva volverá a subir poco a poco, es la conocida como onda de agregación primaria o reversible. Si por el contrario ésta ha sido lo suficientemente alta ( $>2.5-5$  mM), se produce una agregación irreversible manteniéndose baja la curva durante los 8 minutos que dura la prueba, es la llamada onda secundaria o masiva. Estas dos curvas son respectivamente los modelos C y A de la FIGURA V.

A concentraciones medias (1-2 mM) comienza la agregación inducida por el ADP suministrado, pero al consumirse éste la agregación comienza a ser reversible. Si esta concentración ha superado un determinado nivel, distinto para cada persona, se habrá producido la reacción de liberación en la plaqueta, con la aparición en el medio de ADP propio de ella y la curva bajará de nuevo hasta hacerse masiva. Este hecho, que recibe el nombre de doble onda, es fundamental para demostrar el buen funcionamiento

de la plaqueta, ya que como se ha expuesto en el apartado correspondiente a Introducción, las plaquetas no funcionantes pueden ser agregadas de forma pasiva en presencia de altas concentraciones de inductores. De este tipo es la curva B de la FIGURA V.

Las ondas producidas por la adrenalina reproducen una curva sigmoide. Con este agente no se produce el cambio de forma previo a la agregación, lo que ha sido comprobado mediante microscopía electrónica, y por tanto la curva no sube por encima del cero. Sigue el modelo de la curva E de la FIGURA VI.

El colágeno presenta un tiempo de latencia, bastante prolongado en comparación con el resto de los agonistas, en que la curva se mantiene por encima de cero, y que representa el periodo de tiempo en que la plaqueta está activada y ha cambiado de forma pero aún no comenzado a agregarse con las demás. Este es el dato más característico y a la vez más importante para dicho agente. Esta curva es similar a la que se muestra denominada como D en la FIGURA VI.

Por último, la ristocetina y el ácido araquidónico presentan ondas masivas similares a las de altas concentraciones de ADP, pero con una pendiente mucho mayor,

y en el caso del ácido araquidónico se puede presentar un tiempo de latencia similar al del colágeno aunque de menor duración. (Curva A de la FIGURA V) (66, 117).

## 2.2. Beta-Tromboglobulina y Factor Plaquetario 4.

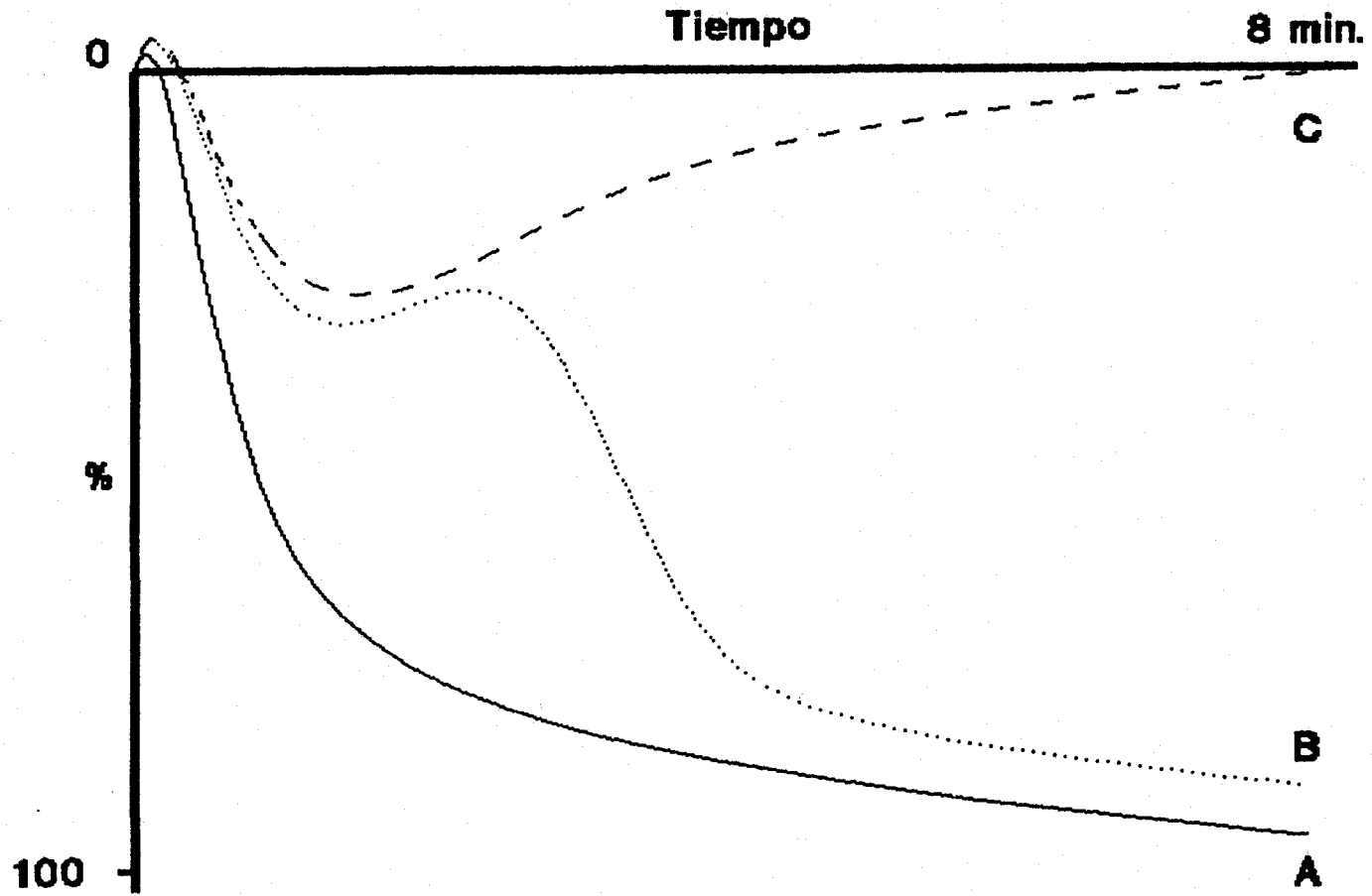
### 2.2.1. Fundamento del método.

La medición de los niveles de beta-Tromboglobulina (BTG) y Factor Plaquetario 4 (FP4) utiliza una técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) conocida como técnica de Sandwich.

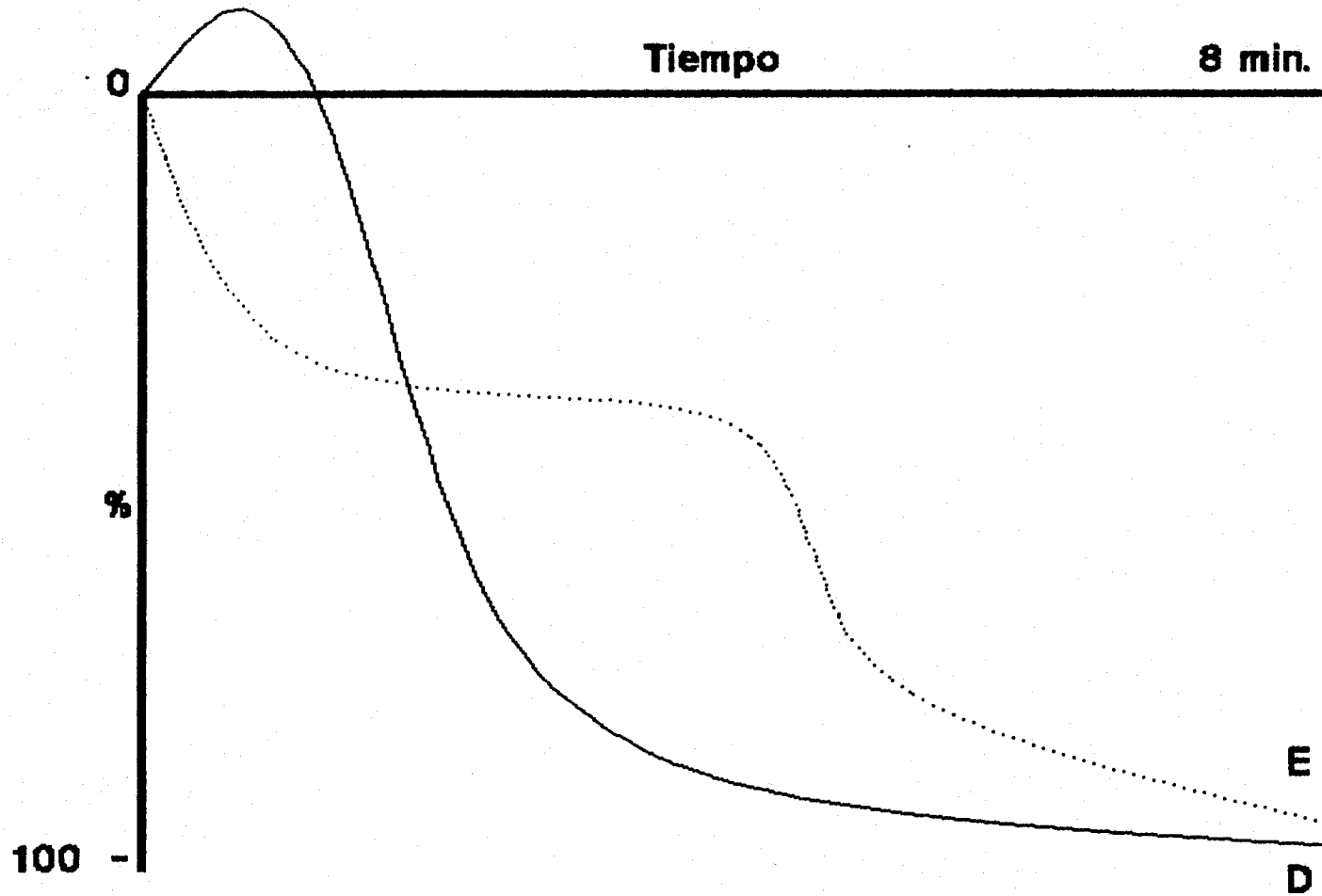
Esta consiste en unir dichas sustancias presentes en la muestra a un soporte mediante un anticuerpo específico, la llamada solución de recubrimiento. Posteriormente, y al ser la BTG y el FP4 moléculas que poseen varios determinantes antigénicos, se une este complejo a un nuevo anticuerpo que lleva unida una molécula de peroxidasa (POD), es el conjugado anticuerpo-POD. Como último paso se añade peróxido de hidrógeno y un cromógeno, orto-fenilendiamina en este caso, con lo que se desarrollará un color cuya intensidad, será medida por fotolorimetría y proporcional a la cantidad de BTG o FP 4 presente en la muestra (118, 119).



**FIGURA V**  
**GRAFICAS DE AGREGACION**



**FIGURA VI**  
**GRAFICAS DE AGREGACION**





### 2.2.2. Reactivos.

#### 1) Solución de recubrimiento.

Fragmentos F(ab')<sub>2</sub> específicos contra BGT o FP 4, 5 mcg/ml.

El uso de estos fragmentos en vez de inmunoglobulinas completas evita la interferencia por el factor reumatoide cuando éste se encuentra presente en el plasma.

#### 2) Conjugado anticuerpo-POD.

Inmunoglobulinas completas unidas a peroxidasa, 7.5 mcg/ml.

#### 3) Substrato cromogénico.

Tampón fosfato, 0.05 M.

Orto-fenilendiamina, 0.4 mg/ml.

#### 4) Tampón de dilución.

Tampón fosfato, 0.05 M.

Cloruro sódico, 0.15 M.

Tween 20, 0.1%.

Albúmina bovina, 1%.

#### 5) Solución de lavado.

Cloruro sódico, 0.15 M.

Tween 20, 0.1%.

6) Solución standard de BTG o FP 4, 20 UI/ml.

7) Peróxido de hidrógeno al 30 %.

8) Acido sulfúrico 3 M.

Estos reactivos, excepto el peróxido de hidrógeno y el ácido sulfúrico, han sido suministrados por BOEHRINGER MANNHEIM en forma de preparado comercial.

### 2.2.3. Método de trabajo.

#### 2.2.3.1. Obtención de muestras.

- Obtener sangre por punción venosa, si es posible sin utilizar torniquete.
  
- Desechar los primeros 2 ml de la sangre obtenida y dispensar 4.5 ml en un tubo que contiene 0.5 ml de CTAD como anticoagulante (citrato sódico, teofilina, adenina y dipiridamol).
  
- Incubar la muestra en hielo durante 15 minutos.

- Centrifugar a 2000 g durante 30 minutos a 2-8 grados antes de transcurrida 1 hora de la extracción.
- Del sobrenadante conseguido, pipetear una tercera parte de éste, la correspondiente a la zona media, sin acercarse a la superficie de contacto con el aire, a la superficie celular o las paredes del tubo.
- Congelar a -30 grados durante un periodo máximo de un mes.

#### 2.2.3.2. Preparación de los reactivos.

- Disolver el contenido del frasco 1 (solución de recubrimiento) en 20 ml de agua destilada. ESTABILIDAD: 72 h. a +2-8 grados. NO CONGELAR.

Como alternativa tras realizar la disolución proceder al coating como se describe en el apartado de procesamiento de muestras y guardar las microplacas con su contenido y tapadas en refrigerador. ESTABILIDAD: 15 días a 2-8 grados.

- Disolver parte del contenido del frasco 4 (tampón de dilución) con agua destilada en una proporción 1+9. ESTABILIDAD: 15 días a +2-8 grados.

- Disolver el contenido del frasco 2 (conjugado anticuerpo-POD) con 20 ml de tampón de dilución. ESTABILIDAD: 24 h. a +2-8 grados.

Como alternativa se puede disolver el contenido del frasco en 2 ml de agua destilada, dividirlo en alicuotas y congelarlo a -30 grados; antes de su uso descongelarlo y diluir con tampón de dilución en proporción 1+9. ESTABILIDAD: 1 mes a -30 grados.

- Disolver el contenido del frasco 3 (substrato cromógeno) en 20 ml de agua destilada y añadir 10 mcl de peróxido de hidrógeno al 30%. ESTABILIDAD: 1 h. a +15-25 grados y protegido de la luz solar.

Como alternativa, disolver el contenido del frasco en 2 ml de agua destilada, dividirlo en alicuotas y congelarlo a -30 grados; antes de su uso descongelarlo y diluir en una proporción 1+4 con agua destilada y el resultante volver a diluir 1+1 con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.03 % (50 mcl de éste al 30 % más 50 ml de agua destilada). ESTABILIDAD: 15 días a -30 grados.

- Disolver parte del contenido del frasco 5 (solución de lavado) con agua destilada en una proporción 1+19. ESTABILIDAD: 15 días de +2-8 grados.

- Disolver el contenido del frasco 6 (BTG o FP 4 standard) con EXACTAMENTE 5 ml de tampón de dilución. ESTABILIDAD: 24 h. a +2-8 grados.

Como alternativa disolver el contenido del frasco en 0.5 ml de agua destilada y congelar en porciones; antes de su uso descongelarla y diluirla con solución tampón en proporción 1+9. ESTABILIDAD: 1 mes a -30 grados.

#### 2.2.3.3. Procesamiento de las muestras.

- Dispensar en cada pocillo a utilizar 200 mcl de solución de coating.
- Incubar durante una noche a 15-25 grados.
- Lavar tres veces con 250 mcl de solución de lavado.
- Diluir las muestras en una proporción 1+10 en el caso de BTG y 1+5 en el caso de FP 4 con tampón de dilución. En caso de altas concentraciones se usarán diluciones 1+20 y 1+10 respectivamente.
- Dispensar en cada pocillo 200 mcl de muestras o standard diluidos.

- Incubar durante 1 h. a 15-25 grados.
- Lavar tres veces con 250 mcl de solución de lavado.
- Dispensar en cada pocillo 200 mcl de conjugado anticuerpo POD.
- Incubar durante 1 h. a 15-25 grados.
- Lavar tres veces con 250 mcl de solución de lavado.
- Dispensar 200 mcl de solución cromógeno.
- Incubar durante el tiempo de reacción del sustrato determinado en las pruebas de optimización, como se explica más adelante, a 15-25 grados.
- Añadir 50 mcl de ac. sulfúrico para detener la reacción.
- Incubar durante 10 minutos a 15-25 grados.
- Medir la densidad óptica de la muestra con una longitud de onda de 492 nm antes de transcurridas 2 h.



#### 2.2.3.4. Elaboración de la curva de calibración.

Para cada serie de medidas se necesita una curva de calibración como la que se indica a continuación:

- Tubo 1: 1.0 ml de solución standard de BTG o FP 4. Conc: 20 UI/ml
- Tubo 2: 0.5 ml deL tubo 1 más 0.5 ml de solución de dilución. Conc: 10 UI/ml.
- Tubo 3: 0.5 ml deL tubo 2 más 0.5 ml de solución de dilución. Conc: 5 UI/ml.
- Tubo 4: 0.5 ml deL tubo 3 más 0.5 ml de solución de dilución. Conc: 2.5 UI/ml.
- Tubo 5: 0.5 ml deL tubo 4 más 0.5 ml de solución de dilución. Conc: 1.25 UI/ml.
- Tubo 6: 0.5 ml deL tubo 5 más 0.5 ml de solución de dilución. Conc: 0.625 UI/ml.
- Tubo blanco: 0.5 ml de solución de dilución. Conc: 0 UI/ml.
- Traspasar los resultados a una gráfica doble logarítmica o lineal para valores muy altos.
  
- Multiplicar los resultados obtenidos por 11 si la dilución ha sido 1+10 ó por 21 si ha sido 1+20 (sólo para altas concentraciones), en el caso de BTG. Si se trata de FP4 se multiplicará por 6 si la dilución ha sido 1+5 o por 11 si ésta ha sido 1+10.

#### 2.2.3.5. Pruebas de optimización.

Esta prueba tiene como finalidad determinar el tiempo óptimo en que la reacción de color se lleva a cabo. Para esto se determina la densidad óptica del standard no diluido, que debe encontrarse entre 1.0 y 1.5.

- Al pocillo correspondiente a un standard no diluido (tubo 1), una vez lavado tres veces con solución de lavado, añadir 200 mcl de solución cromógeno.
- Incubar durante 3 minutos a 15-25 grados.
- Dispensar 50 mcl de ac. sulfúrico.
- Leer la densidad óptica a una longitud de onda de 512 nm.
- Si ésta es inferior a 1.0 volver a repetir la operación aumentando el tiempo de incubación.
- Si ésta es superior a 1.5 volver a repetir disminuyendo el tiempo de incubación.

#### 2.2.3.6 Observaciones.

- Realizar las determinaciones por duplicado.



- Mantener tapados los pocillos para evitar la evaporación.
- No dejar nunca los pocillos vacíos.
- Durante la reacción de color evitar la luz solar directa.

#### 2.2.4. Resultados.

Estas reacciones son lineales en unos límites que se encuentran entre 5 y 250 UI/ml en plasma para la BTG y entre 1 y 100 UI/ml para el FP 4, con una sensibilidad mínima de 0.5 y 0.2 UI/ml respectivamente.

#### 2.3. Métodos estadísticos.

Para comparar distintos grupos de casos entre sí, como ocurre cuando se comparan los pacientes y los controles o los subgrupos de pacientes divididos por el tipo de intervención, se ha utilizado en test de análisis de varianza. Cuando comparamos la modificación de las distintas variables con la intervención se ha utilizado un análisis de diferencia de medias mediante un test t-Student para datos apareados.

#### IV. RESULTADOS.

De acuerdo con lo expuesto en el apartado de Material y Métodos hemos tomado muestras de sangre venosa a un total de sesenta y cuatro pacientes elegidos al azar de entre los sometidos a intervención quirúrgica reglada en los Servicios de Cirugía General y Cirugía Torácica del Hospital Universitario Virgen Macarena. De igual modo hemos tomado muestras a un total de treinta y cinco individuos sanos, entre personal sanitario y voluntarios que acuden a Cámara de Donantes de Sangre, que servirán como controles.

### 1. Análisis estadístico descriptivo.

A cada uno de los pacientes se les ha estudiado un total de veintitrés variables de función plaquetaria: beta-Tromboglobulina (BTG), Factor Plaquetario 4 (FP 4), el cociente entre ambos (C) y veinte parámetros de agregación plaquetaria con los distintos agentes inductores.

Para su análisis estadístico, estos enfermos han sido estudiados tanto en conjunto como separados en tres subgrupos, que han sido:

- 1) Pacientes sometidos a intervención quirúrgica abdominal alta ----- 25 casos.

- 2) Pacientes sometidos a intervención quirúrgica abdominal baja ----- 25 casos.
- 3) Pacientes sometidos a intervención quirúrgica torácica ----- 14 casos.

Esta distribución por intervenciones se halla en la FIGURA IV.

Dicho estudio de las diversas variables, tanto en su conjunto como dividido en los distintos subgrupos aparece expuesto en la TABLA X (valores obtenidos antes de la intervención) y en la TABLA XI (valores obtenidos después de la intervención), donde se muestran los valores máximo y mínimo de su distribución, su valor medio y su desviación standard.

En dichas tablas aparecen el nombre y concentración del inductor utilizado en cada caso seguido de una letra:

- a) M: Dicho parámetro expresa el porcentaje de agregación máxima.
- b) S: Indica la pendiente de la curva de agregación.
- c) S1 (solo para ADP 2 y ADP 1): Tiene el mismo significado que S en el resto de los casos.
- d) S2 (solo para ADP 2 y ADP 1): Representa la pendiente de la segunda onda que puede aparecer en estos casos.

e) L (solo para el colágeno): Es el valor del tiempo de latencia, expresado en segundos, que aparece al utilizar dicho inductor.

En la TABLA XII aparecen, expresados de igual modo, los datos referidos a los controles.

### 1.1. Valores obtenidos antes de la intervención.

A continuación vamos a exponer los datos referentes al total de los pacientes estudiados, que se hallan expuestos en la TABLA X.

Los valores de BTG antes de la intervención varían entre 3.1 y 142.8 UI/ml, con un valor medio de  $33.7 \pm 24.2$ , mientras que los del FP 4 lo hacen entre 1.0 y 50.0 con media de  $9.3 \pm 6.9$ , y los del cociente entre ambos entre 0.8 y 11.0, con media de  $4.1 \pm 2.5$ .

En lo referente a la agregación plaquetaria cuando se utiliza ADP, la concentración mínima que hay que utilizar para que aparezca la doble onda, que sólo lo hace en 60 de los 64 casos, tiene un valor medio de  $2.1 \pm 1.1$  mCM, variando entre 0.25 y 5.0. El porcentaje máximo de agregación es de  $77.7 \pm 12.8$  % para el ADP 5,  $50.8 \pm 26.7$

para el ADP 2 y  $29.5 \pm 28.3$  para el ADP 1. Los rangos de variación son respectivamente de 32.0 a 97.0, 11.5 a 94.5, y 0 a 92.5 %.

Los valores de la pendiente de la curva para dichos agentes son de  $74.3 \pm 16.3$  y 35.0 a 111.0;  $58.1 \pm 18.5$  y 11.0 a 98.0; y  $37.9 \pm 22.7$  y 0.0 a 91.0 respectivamente. Por último, la pendiente de la segunda onda para el ADP 2, que sólo aparece en 31 de los 64 casos, varía entre 3.0 y 57.0, con valor medio de  $26.3 \pm 11.3$ ; y para el ADP 1, presente en 15 casos del total, de 0.0 , 57.0 y  $28.2 \pm 18.8$ .

Cuando se utiliza colágeno, el valor medio del valor de agregación máxima es de  $78.7 \pm 16.6$  %, con una variación de 7.5 a 95.5. Su pendiente se mueve entre 4.0 y 119.0, con media de  $75.3 \pm 23.5$ . Por último, el tiempo de latencia que aparece cuando se utiliza dicho agente inductor tiene una media de  $97.8 \pm 40.8$  seg, con límites de 40 y 215 seg.

Al utilizar adrenalina a una concentración de 10 mcM, la agregación máxima es de  $74.2 \pm 21.0$  %, con variación entre 4.5 y 95.0 %; la pendiente se encuentra entre 7.0 y 96.0, con una media de  $42.0 \pm 20.2$ . Cuando la concentración de esta sustancia es de 2.5 mcM, los valores son de  $63.0 \pm 27.3$ , 2.5 y 95.5 % para la agregación máxima y  $34.0 \pm 18.4$ , 3.0 y 82.0 para la pendiente.

La ristocetina produce un porcentaje de agregación del  $89.3 \pm 5.4$  %, con un rango de 69.5 a 100.0 %; mientras que el ácido araquidónico se mueve entre el 67.0 y 98.5 % con una media de  $85.3 \pm 6.8$ . Los valores respectivos de las pendientes son de  $74.2 \pm 14.3$  y 45.0 a 114.0 y de  $88.1 \pm 21.7$  y 25.0 a 137.0.

### 1.2. Valores obtenidos tras la intervención.

.Los valores medios de BTG y FP 4 tras la intervención son de  $45.5 \pm 32.2$  % y  $8.7 \pm 6.0$  UI/ml respectivamente con rangos de variabilidad de 4.2 a 176.0 y de 1.0 a 34.0. El cociente entre ambos valores oscila entre 1.0 y 27.0 con un valor medio de  $6.1 \pm 4.2$ .

La aparición de la doble onda se consigue con una concentración de ADP de  $1.25 \pm 0.75$  mM, pudiendo estar entre 0.125 y 3.5. Del mismo modo que en los valores medidos antes de la intervención, solo aparece en 60 casos.

Las agregaciones máximas cuando se utiliza este mismo agente varían entre 59.0 y 100.0 % cuando la concentración es de 5 mM, 12.5 y 96.0 % cuando es de 2 mM, y 53.4 y 30.5 % cuando es de 1 mM. Sus valores medios son respectivamente de  $84.8 \pm 10.1$ ,  $71.6 \pm 20.3$  y  $53.4 \pm 30.5$ . Las pendientes de

la curva, para los mismos agentes son de  $83.7 \pm 19.4$  y  $48.0$  a  $128.0$ ,  $68.4 \pm 17.4$  y  $25.0$  a  $108.0$ , y  $50.3 \pm 18.0$  y  $8.0$  a  $81.0$ .

El porcentaje máximo de agregación para el colágeno tras la intervención es de  $85.4 \pm 10.0$  %, pudiendo hallarse entre el  $44.5$  y el  $100.0$  %. Su pendiente está entre  $27.0$  y  $127.0$ , con un valor medio de  $82.5 \pm 22.8$ . Por último, el tiempo de latencia, que varía entre  $10$  y  $180$  seg., tiene un valor medio de  $79 \pm 32$ .

En el caso de la adrenalina  $10$  mcM, la media de agregación máxima es de  $84.9 \pm 12.7$  %, con un rango de  $27.0$  a  $100.0$  %; la pendiente tiene un valor medio de  $47.2 \pm 16.4$  y una variabilidad de  $17.0$  a  $97.0$ . Si utilizamos adrenalina  $2.5$  mcM, los valores respectivos son de  $77.3 \pm 20.3$ ,  $22.5$  y  $100.0$  %, y de  $43.3 \pm 19.3$  y  $9.0$  a  $97.0$  para la pendiente.

La respuesta a la ristocetina tiene un máximo de  $92.4 \pm 4.9$  % (entre  $75.5$  y  $100.0$ ) y una pendiente de  $81.3 \pm 15.0$  (entre  $31.0$  y  $121.0$ ); mientras que la del ácido araquidónico es de  $88.0 \pm 8.9$  % (entre  $33.5$  y  $100.0$ ), y su pendiente de  $97.7 \pm 19.0$  (entre  $48$  y  $140$ ).



### 1.3. Valores obtenidos de controles sanos.

El valor medio calculado para la BTG en estos individuos es de  $40.1 \pm 22.2$  UI/ml, con unos máximo y mínimo de 14.3 y 88.9. Estos valores para el FP 4 son de  $9.3 \pm 4.5$ , 3.3 y 17.2 UI/ml respectivamente; y para el cociente entre ambos de  $5.2 \pm 3.0$ , 1.6 y 11.0.

La concentración mínima de ADP con la que ha aparecido doble onda ha sido de 0.25 mM, y la máxima de 3.0. Con esto se obtiene una media de  $1.75 \pm 1.0$  mM.

La máxima agregación obtenida con ADP 5 tiene un valor medio de  $82.8 \pm 11.8$  %, con una variación de 44.0 a 100.0 %; la pendiente ha sido de  $81.9 \pm 16.7$  y un rango de variabilidad de 38.0 a 109.0. Cuando se usa ADP 2, estos valores son respectivamente de  $64.3 \pm 26.7$ , y 19.5 a 99.5; y  $67.3 \pm 19.1$  y 27.0 a 120.0; mientras que los valores de la pendiente de la segunda onda para esta concentración son  $30.2 \pm 11.8$  y 11.0 a 53.0. En el caso de ADP 1 mM, los valores de agregación máxima se hallan entre 1.5 y 93.0 %, con una media de 40.7; la pendiente se mueve entre 6.0 y 77.0 para la primera onda y entre 20.0 y 64.0 para la segunda, con unas medias de  $42.5 \pm 20.3$  y  $37.9 \pm 14.4$ .

El colágeno produce una agregación máxima de 76.7  $\pm$  23.6 %, una pendiente de 75.7  $\pm$  29.6 y un tiempo de latencia de 93.6  $\pm$  35.7 seg. Los rangos de variabilidad para cada caso son de 8.0 a 96.0 %, 16.0 a 128.0 y de 45 a 128 seg.

Al utilizar adrenalina, la agregación máxima es de 75.2  $\pm$  24.0 % (11.5 a 94.5) cuando la concentración es de 10.0 mcM y de 63.5  $\pm$  35.4 % (7.5 a 97.5) cuando es de 2.5. Los valores de las pendientes son de 39.4  $\pm$  23.7 (5.0 a 84.0) para ésta y de 46.9  $\pm$  22.9 (6.0 a 88.0) para aquella.

Los valores calculados para la ristocetina son de 92.4  $\pm$  3.8 % con una variación de 83.5 a 99.0 para la agregación máxima y de 78.6  $\pm$  13.7 y rango de 48.30 a 105.0 para la pendiente.

En lo referente al ácido araquidónico, dichos valores son de 79.8  $\pm$  27.3 y 4.0 a 98.0 %, y de 93.5  $\pm$  39.6 y 4.0 a 144.0.

## 2. Comparación de los enfermos con los controles.

El primer análisis que hemos realizado ha sido estudiar si existen diferencias entre los valores obtenidos en los

enfermos antes de ser sometidos a la intervención y los correspondientes a los controles. La finalidad de este análisis es comprobar si la enfermedad por la que es intervenido el paciente ha influido de algún modo en el estado de la función plaquetaria de éste.

Para conseguir dicho propósito se ha utilizado un test de análisis de varianzas. Los datos obtenidos con este análisis se hallan expuestos en la TABLA XIII donde hemos indicado las medias de cada uno de los dos grupos, así como con distintos signos los diferentes niveles de significación estadística que hayamos encontrado en cada caso. Dichos signos han sido un asterisco (\*) cuando  $p < 0.05$ , una cruz (+) cuando  $p < 0.01$  y N.S. cuando no hemos hallado diferencias significativas. También se puede ver gráficamente en la FIGURA VII, VIII y IX.

El mismo procedimiento hemos realizado entre el grupo control y los datos obtenidos después de la intervención, con el fin de ver si éstos últimos se hallan más o menos próximos a la normalidad que los obtenidos antes del proceso quirúrgico. Los datos se hallan en la TABLA XIV y la FIGURA VII, VIII y IX.

### 3. Comparación entre los valores obtenidos antes y después de la intervención.

El siguiente paso ha sido estudiar la posible influencia de la intervención quirúrgica en los valores de función plaquetaria estudiados, para lo que hemos comparado los valores obtenidos antes y después de la intervención.

Con este fin hemos utilizado un análisis de diferencia de medias mediante un test t-Student para datos apareados. Los resultados obtenidos se encuentran en la TABLA XV, donde los signos utilizados han sido los mismos que en la TABLA XII, y en las mismas figuras que en el apartado anterior.

### 4. Comparación de los valores obtenidos en los distintos subgrupos.

Es un hecho conocido el que existen algunos tipos de intervención quirúrgica que presentan complicaciones tromboembólicas con mayor frecuencia que otras. Es por esta causa por lo que el total de los pacientes ha sido dividido en tres grupos con respecto al tipo de intervención al que han sido sometidos.

Tras realizar esta división hemos hallado la diferencia que existe entre los parámetros obtenidos antes y después de la intervención. Más tarde, hemos comparado dicha diferencia del grupo correspondiente a cirugía abdominal con el correspondiente a cirugía torácica, y más tarde los de cirugía abdominal alta con los de baja.

El análisis estadístico utilizado en este caso ha sido un test de análisis de varianza.

TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == TOTAL PACIENTES

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	33.7	24.2	3.1	142.8
FP 4	9.3	6.9	1.0	50.0
C	4.1	2.5	0.8	11.0
D.O.	2.0	1.0	0.25	5.0
APD 5 M	77.7	12.8	32.0	97.0
ADP 5 S	74.3	16.3	35.0	111.0
ADP 2 M	50.8	26.7	11.5	94.5
ADP 2 S1	58.1	18.5	11.0	98.0
ADP 2 S2	26.3	11.3	3.0	57.0
ADP 1 M	29.5	28.3	0.0	92.5
ADP 1 S1	37.95	22.7	0.0	91.0
ADP 1 S2	28.2	18.8	0.0	57.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == TOTAL PACIENTES

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	78.6	16.6	7.5	95.5
COL S	75.3	23.5	4.0	119.0
COL L	97.8	40.8	40.0	215.0
EPN 10 M	74.2	21.0	4.5	95.0
EPN 10 S	42.0	20.2	7.0	96.0
EPN 2.5 M	63.0	27.3	2.5	95.5
EPN 2.5 S	34.0	18.4	3.0	82.0
RIST M	89.3	5.4	69.5	100.0
RIST S	74.2	14.3	45.0	114.0
A.A. M	85.3	6.8	67.0	98.5
A.A. S	88.0	21.7	25.0	137.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL ALTA

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	40.2	31.7	9.9	142.8
FP 4	11.7	9.8	2.5	50.0
C	3.9	2.5	0.8	11.0
D.O.	2.0	1.0	0.5	3.5
APD 5 M	79.7	12.1	54.0	97.0
ADP 5 S	78.3	18.0	48.0	108.0
ADP 2 M	54.5	28.9	11.5	94.5
ADP 2 S1	58.5	17.4	22.0	89.0
ADP 2 S2	28.2	14.5	3.0	57.0
ADP 1 M	32.9	30.5	4.5	92.5
ADP 1 S1	38.7	19.1	6.0	72.0
ADP 1 S2	38.7	17.6	15.0	57.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.



TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL ALTA

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	82.1	15.0	22.0	95.5
COL S	84.2	22.9	18.0	119.0
COL L	85.8	34.3	40.0	185.0
EPN 10 M	77.5	20.5	4.5	95.0
EPN 10 S	47.9	24.1	7.0	96.0
EPN 2.5 M	69.1	26.5	2.5	95.5
EPN 2.5 S	40.6	20.5	3.0	82.0
RIST M	89.3	5.6	74.5	98.0
RIST S	75.2	16.7	45.0	114.0
A.A. M	85.3	7.9	69.5	98.5
A.A. S	92.8	23.4	35.0	137.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL BAJA

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	30.6	19.1	3.1	74.8
FP 4	8.0	3.8	1.0	17.0
C	4.3	2.8	1.0	10.8
D.O.	2.0	1.25	0.25	5.0
APD 5 M	75.6	15.0	32.0	89.5
ADP 5 S	72.8	15.9	35.0	111.0
ADP 2 M	51.4	26.3	12.5	89.0
ADP 2 S1	58.7	20.6	11.0	95.0
ADP 2 S2	24.9	7.8	10.0	38.0
ADP 1 M	27.8	26.6	0.0	88.0
ADP 1 S1	37.2	26.5	0.0	91.0
ADP 1 S2	21.5	16.4	0.0	45.0

*Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.*

*Min: Mínimo. Max: Máximo.*

TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL BAJA

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	73.6	20.3	7.5	92.0
COL S	68.2	24.9	4.0	107.0
COL L	109.0	44.1	55.0	215.0
EPN 10 M	70.4	22.6	13.5	92.0
EPN 10 S	38.8	16.9	7.0	81.0
EPN 2.5 M	60.2	28.4	5.0	91.0
EPN 2.5 S	30.7	15.8	7.0	61.0
RIST M	88.7	5.6	69.5	100.0
RIST S	74.3	12.5	47.0	95.0
A.A. M	84.8	6.6	67.0	94.5
A.A. S	84.2	22.2	25.0	119.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == CIRUGIA TORACICA

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	28.2	14.8	5.5	62.8
FP 4	7.5	3.8	2.5	15.5
C	4.2	2.0	1.4	8.5
D.O.	2.5	1.25	0.75	4.25
APD 5 M	77.8	9.6	59.5	90.0
ADP 5 S	69.7	13.1	54.0	90.0
ADP 2 M	43.4	23.6	20.5	89.0
ADP 2 S1	56.8	17.6	37.0	98.0
ADP 2 S2	25.0	12.4	16.0	43.0
ADP 1 M	26.6	28.6	3.0	88.0
ADP 1 S1	37.9	22.9	14.0	86.0
ADP 1 S2	20.7	21.7	1.0	44.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES PRE-INTERVENCION == CIRUGIA TORACICA

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	81.1	8.7	58.0	88.0
COL S	72.2	17.2	43.0	99.0
COL L	99.3	42.3	45.0	180.0
EPN 10 M	74.9	19.2	22.0	91.5
EPN 10 S	37.4	16.2	11.0	73.0
EPN 2.5 M	57.3	28.1	12.5	92.5
EPN 2.5 S	28.1	16.1	6.0	57.0
RIST M	90.3	5.1	82.5	97.5
RIST S	72.4	13.4	51.0	97.0
A.A. M	86.1	5.4	77.0	93.0
A.A. S	86.3	16.9	51.0	108.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST INTERVENCION == TOTAL PACIENTES

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	45.5	32.2	4.2	176.0
FP 4	8.7	6.0	1.0	34.0
C	6.1	4.2	1.0	27.0
D.O.	1.25	0.75	0.125	3.5
APD 5 M	84.8	10.1	59.0	100.0
ADP 5 S	83.7	19.4	48.0	128.0
ADP 2 M	71.6	20.3	12.5	96.0
ADP 2 S1	68.4	17.4	25.0	108.0
ADP 2 S2	29.7	11.1	12.0	63.0
ADP 1 M	53.4	30.5	5.5	94.5
ADP 1 S1	50.3	18.0	8.0	81.0
ADP 1 S2	30.5	16.1	9.0	70.0

*Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.*

*Min: Mínimo. Max: Máximo.*

TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST-INTERVENCION == TOTAL PACIENTES

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	85.4	10.0	44.5	100.0
COL S	82.5	22.8	27.0	127.0
COL L	79.3	32.4	10.0	180.0
EPN 10 M	84.9	12.7	27.0	100.0
EPN 10 S	47.2	16.4	17.0	97.0
EPN 2.5 M	77.2	20.3	22.5	100.0
EPN 2.5 S	43.3	19.3	9.0	97.0
RIST M	92.4	4.9	75.5	100.0
RIST S	81.3	15.0	31.0	121.0
A.A. M	88.0	8.9	33.5	100.0
A.A. S	97.7	19.0	48.0	140.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL ALTA

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	51.2	33.2	5.5	132.0
FP 4	10.2	8.4	1.0	34.0
C	6.0	3.5	1.8	18.8
D.O.	1.25	0.75	0.125	2.75
APD 5 M	83.1	9.6	63.0	99.0
ADP 5 S	81.6	21.0	51.0	128.0
ADP 2 M	72.1	16.3	40.5	91.5
ADP 2 S1	69.1	15.1	51.0	108.0
ADP 2 S2	27.5	9.0	12.0	47.0
ADP 1 M	48.4	28.1	11.5	92.5
ADP 1 S1	51.6	14.0	26.0	76.0
ADP 1 S2	20.8	8.8	9.0	39.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.



TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL ALTA

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	82.3	13.6	44.5	100.0
COL S	75.6	23.6	27.0	114.0
COL L	83.8	39.8	10.0	180.0
EPN 10 M	86.0	10.9	51.0	100.0
EPN 10 S	47.1	16.5	24.0	97.0
EPN 2.5 M	77.6	18.8	34.0	100.0
EPN 2.5 S	43.9	19.3	14.0	97.0
RIST M	91.9	5.5	75.5	100.0
RIST S	80.2	13.5	53.0	112.0
A.A. M	84.7	12.5	33.5	100.0
A.A. S	91.9	22.7	48.0	140.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL BAJA

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	46.8	37.2	4.2	176.0
FP 4	7.0	3.6	1.0	17.0
C	7.2	5.3	1.0	27.0
D.O.	1.0	0.8	0.25	3.5
APD 5 M	86.4	8.5	59.0	96.5
ADP 5 S	84.9	15.3	55.0	121.0
ADP 2 M	74.0	20.0	19.0	91.5
ADP 2 S1	70.8	19.1	25.0	121.0
ADP 2 S2	30.2	12.3	14.0	63.0
ADP 1 M	59.5	30.0	7.0	93.0
ADP 1 S1	52.0	18.9	10.0	81.0
ADP 1 S2	33.1	14.3	14.0	64.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST-INTERVENCION == CIRUGIA ABDOMINAL BAJA

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	87.3	6.4	65.5	95.5
COL S	89.2	19.9	45.0	127.0
COL L	68.6	17.9	40.0	110.0
EPN 10 M	84.2	14.9	27.0	96.0
EPN 10 S	48.7	16.4	17.0	78.0
EPN 2.5 M	79.3	18.2	25.5	96.5
EPN 2.5 S	45.3	17.9	15.0	81.0
RIST M	91.9	3.8	85.0	97.0
RIST S	85.0	13.7	62.0	121.0
A.A. M	89.8	3.7	84.0	97.5
A.A. S	102.3	13.7	59.0	121.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.



TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST-INTERVENCION == CIRUGIA TORACICA

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	33.7	15.0	14.3	66.0
FP 4	9.0	4.0	3.5	19.0
C	4.4	2.4	1.2	9.4
D.O.	1.4	0.9	0.25	2.75
APD 5 M	84.9	13.6	60.5	100.0
ADP 5 S	85.4	23.8	48.0	121.0
ADP 2 M	66.8	26.9	12.5	96.0
ADP 2 S1	62.8	18.0	25.0	87.0
ADP 2 S2	33.6	12.1	15.0	47.0
ADP 1 M	51.5	35.5	5.5	94.5
ADP 1 S1	44.9	22.8	8.0	76.0
ADP 1 S2	41.8	22.4	13.0	70.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES POST-INTERVENCION == CIRUGIA TORACICA

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	87.8	6.0	75.5	95.5
COL S	83.0	24.2	44.0	127.0
COL L	90.4	34.4	40.0	155.0
EPN 10 M	84.0	12.2	62.5	100.0
EPN 10 S	44.8	16.9	22.0	73.0
EPN 2.5 M	72.9	26.3	22.5	100.0
EPN 2.5 S	38.9	22.1	9.0	72.0
RIST M	94.2	5.7	78.5	100.0
RIST S	76.6	18.7	31.0	105.0
A.A. M	90.8	6.3	77.0	100.0
A.A. S	100.1	18.2	71.0	126.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES CONTROL

	Media	D.S.	Min	Max
BTG	40.1	22.2	14.3	88.9
FP 4	9.3	4.5	3.3	17.2
C	5.2	3.0	1.6	11.0
D.O.	1.75	1.0	0.25	3.0
APD 5 M	82.8	11.8	44.0	100.0
ADP 5 S	81.9	16.7	38.0	109.0
ADP 2 M	64.3	26.7	19.5	99.5
ADP 2 S1	67.3	19.1	27.0	120.0
ADP 2 S2	30.2	11.8	11.0	53.0
ADP 1 M	40.7	34.4	1.5	93.0
ADP 1 S1	42.5	20.3	6.0	77.0
ADP 1 S2	37.9	14.4	20.0	64.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIIESTADISTICA DESCRIPTIVAVALORES CONTROL

	Media	D.S.	Min	Max
COL M	76.7	23.6	8.0	96.0
COL S	75.7	29.6	16.0	128.0
COL L	93.6	35.7	45.0	200.0
EPN 10 M	75.2	24.0	11.5	94.5
EPN 10 S	46.9	22.9	6.0	88.0
EPN 2.5 M	63.5	35.3	7.5	97.5
EPN 2.5 S	39.4	23.7	5.0	84.0
RIST M	92.4	3.8	83.5	99.0
RIST S	78.6	13.6	48.0	105.0
A.A. M	79.8	27.3	4.0	98.0
A.A. S	93.5	39.6	4.0	144.0

Media: Media aritmética. D.S.: Desviación standard.

Min: Mínimo. Max: Máximo.

TABLA XIIICOMPARACION CON LOS VALORES NORMALESVALORES PRE-INTERVENCION

	M1	M2	S.E.
BTG	33.7+/-24.2	40.1+/-22.2	N.S.
FP 4	9.3+/-6.9	9.3+/-4.5	N.S.
C	4.1+/-2.5	5.2+/-3.0	N.S.
D.O.	2.0+/-1.0	1.75+/-1.0	N.S.
ADP 5 M	77.7+/-12.8	82.8+/-11.8	N.S.
ADP 5 S	74.3+/-16.3	81.9+/-16.7	N.S.
ADP 2 M	58.8+/-26.7	64.3+/-26.7	N.S.
ADP 2 S1	58.1+/-18.5	67.3+/-19.1	*
ADP 2 S2	26.3+/-11.3	30.2+/-11.8	N.S.
ADP 1 M	29.5+/-28.3	40.7+/-34.4	N.S.
ADP 1 S1	37.9+/-22.7	42.5+/-20.3	N.S.
ADP 1 S2	28.2+/-18.8	37.9+/-14.3	N.S.

M1: Valores pre-intervención. M2: Valores normales.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.



TABLA XIIICOMPARACION CON LOS VALORES NORMALESVALORES PRE-INTERVENCION

	M1	M2	S.E.
COL M	78.6+/-16.6	76.7+/-23.6	N.S.
COL S	75.3+/-23.5	75.7+/-29.6	N.S.
COL L	97.8+/-40.8	93.6+/-35.7	N.S.
EPN 10 M	74.2+/-21.0	75.2+/-24.0	N.S.
EPN 10 S	42.0+/-20.2	46.9+/-22.9	N.S.
EPN 2.5 M	63.0+/-27.6	63.5+/-35.3	N.S.
EPN 2.5 S	34.0+/-18.4	39.4+/-23.7	N.S.
RIST M	89.3+/-5.4	92.3+/-3.8	+
RIST S	74.2+/-14.3	78.6+/-13.6	N.S.
A.A. M	85.3+/-6.8	79.8+/-27.3	N.S.
A.A. S	88.0+/-21.7	93.5+/-39.6	N.S.

M1: Valores pre-intervención. M2: Valores normales.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

TABLA XIIICOMPARACION CON LOS VALORES NORMALESVALORES POST-INTERVENCION

	M1	M2	S.E.
BTG	45.5+/-42.2	40.1+/-22.2	N.S.
FP 4	8.7+/-6.0	9.3+/-4.5	N.S.
C	6.1+/-4.2	5.2+/-3.0	N.S.
D.O.	1.25+/-0.75	1.75+/-1.0	*
ADP 5 M	84.8+/-10.1	82.8+/-11.8	N.S.
ADP 5 S	83.7+/-19.4	81.9+/-16.7	N.S.
ADP 2 M	71.6+/-20.4	64.3+/-26.7	*
ADP 2 S1	68.4+/-17.4	67.3+/-19.1	N.S.
ADP 2 S2	29.7+/-11.1	30.2+/-11.8	N.S.
ADP 1 M	53.4+/-30.5	40.7+/-34.4	*
ADP 1 S1	50.3+/-18.0	42.5+/-20.3	*
ADP 1 S2	30.5+/-16.1	37.9+/-14.3	*

M1: Valores post-intervención. M2: Valores normales.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

TABLA XIIICOMPARACION CON LOS VALORES NORMALESVALORES POST-INTERVENCION

	M1	M2	S.E.
COL M	85.4+/-10.0	76.7+/-23.6	+
COL S	82.4+/-22.8	75.7+/-29.6	N.S.
COL L	79.3+/-32.4	93.6+/-35.7	N.S.
EPN 10 M	84.9+/-12.7	75.2+/-24.0	+
EPN 10 S	47.2+/-16.4	46.9+/-22.9	N.S.
EPN 2.5 M	77.2+/-20.3	63.5+/-35.3	+
EPN 2.5 S	43.3+/-19.3	39.4+/-23.7	N.S.
RIST M	92.4+/-4.9	92.3+/-3.8	N.S.
RIST S	81.3+/-15.0	78.6+/-13.6	N.S.
A.A. M	88.0+/-8.9	79.8+/-27.3	N.S.
A.A. S	97.7+/-20.0	93.5+/-39.6	N.S.

M1: Valores post-intervención. M2: Valores normales.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

TABLA XIVCOMPARACION PRE - POST INTERVENCION

	M1	M2	S.E.
BTG	33.7+/-24.2	45.5+/-32.2	+
FP 4	9.3+/-6.9	8.6+/-6.0	N.S.
C	4.1+/-2.5	6.1+/-4.2	+
D.O.	2.0+/-1.0	1.25+/-0.75	+
ADP 5 M	77.7+/-12.8	84.8+/-10.1	+
ADP 5 S	74.3+/-16.3	83.7+/-19.4	+
ADP 2 M	58.8+/-26.7	71.6+/-20.3	+
ADP 2 S1	58.1+/-18.5	68.4+/-17.4	+
ADP 2 S2	26.3+/-11.3	29.7+/-11.1	N.S.
ADP 1 M	29.5+/-28.3	53.4+/-30.5	+
ADP 1 S1	37.9+/-22.7	50.3+/-18.0	+
ADP 1 S2	28.2+/-18.8	30.5+/-16.1	N.S.

M1: Valores preintervención. M2: Valores postintervención.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

TABLA XIVCOMPARACION PRE - POST INTERVENCION

	M1	M2	S.E.
COL M	78.6+/-16.6	85.4+/-10.0	+
COL S	75.3+/-23.5	82.5+/-22.8	*
COL L	97.8+/-40.8	79.3+/-32.4	+
EPN 10 M	74.2+/-21.0	84.7+/-12.7	+
EPN 10 S	42.0+/-20.2	47.2+/-16.4	*
EPN 2.5 M	63.0+/-27.6	77.2+/-20.3	+
EPN 2.5 S	34.0+/-18.4	43.3+/-19.3	+
RIST M	89.3+/-5.4	92.4+/-4.9	+
RIST S	74.2+/-14.3	81.3+/-15.0	+
A.A. M	85.3+/-6.8	88.0+/-8.9	*
A.A. S	88.0+/-21.7	97.7+/-19.0	+

M1: Valores preintervención. M2: Valores postintervención

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

TABLA XVCOMPARACION ENTRE GRUPOSCIRUGIA ABDOMINAL - TORACICA

	M1	M2	S.E.
BTG	-13.6+/-5.7	-10.5+/-21.9	N.S.
FP 4	1.3+/-6.7	-2.2+/-6.0	N.S.
C	-2.5+/-4.5	-0.4+/-1.4	N.S.
D.O.	1.0+/-2.0	1.1+/-0.8	N.S.
ADP 5 M	-7.1+/-12.1	-5.2+/-12.1	N.S.
ADP 5 S	-7.7+/-22.5	-9.6+/-28.8	N.S.
ADP 2 M	-20.1+/-23.1	-22.7+/-16.8	N.S.
ADP 2 S1	-11.4+/-21.6	-5.0+/-16.4	N.S.
ADP 2 S2	-2.0+/-17.3	-10.0+/-9.6	N.S.
ADP 1 M	-23.6+/-33.2	-23.4+/-27.9	N.S.
ADP 1 S1	-13.8+/-24.1	-7.7+/-20.0	N.S.
ADP 1 S2	-11.6+/-18.7	-9.5+/-3.5	N.S.

M1: Cirugía abdominal. M2: Cirugía torácica.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

TABLA XVCOMPARACION ENTRE GRUPOSCIRUGIA ABDOMINAL - TORACICA

	M1	M2	S.E.
COL M	-6.9+/-17.5	-5.7+/-11.2	N.S.
COL S	-6.2+/-32.3	-7.7+/-37.6	N.S.
COL L	21.2+/-48.1	5.6+/-27.7	N.S.
EPN 10 M	-11.1+/-20.9	-10.8+/-20.6	N.S.
EPN 10 S	-4.5+/-24.6	-8.4+/-17.2	N.S.
EPN 2.5 M	-13.8+/-26.6	-17.1+/-29.6	N.S.
EPN 2.5 S	-8.9+/-22.0	-8.3+/-19.5	N.S.
RIST M	-2.9+/-5.4	-1.3+/-6.2	N.S.
RIST S	-7.9+/-20.1	1.7+/-18.6	N.S.
A.A. M	-2.2+/-11.2	-3.6+/-5.0	N.S.
A.A. S	-8.6+/-31.2	-15.1+/-33.6	N.S.

M1: Cirugia abdominal. M2: Cirugia torácica.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

TABLA XVCOMPARACION ENTRE GRUPOSCIRUGIA ABDOMINAL ALTA - BAJA

	M1	M2	S.E.
BTG	-10.9+/-34.6	-16.8+/-36.7	N.S.
FP 4	1.6+/-8.7	1.0+/-4.4	N.S.
C	-2.1+/-2.7	-2.9+/-5.6	N.S.
D.O.	0.9+/-1.0	1.1+/-1.0	N.S.
ADP 5 M	-3.4+/-10.9	-10.4+/-12.3	*
ADP 5 S	-3.3+/-25.2	-12.7+/-18.7	N.S.
ADP 2 M	-17.6+/-26.1	-23.8+/-20.3	N.S.
ADP 2 S1	-10.6+/-23.5	-13.1+/-20.0	N.S.
ADP 2 S2	4.5+/-17.7	-7.1+/-15.7	N.S.
ADP 1 M	-15.5+/-33.8	-33.6+/-32.1	N.S.
ADP 1 S1	-12.9+/-22.6	-16.0+/-26.2	N.S.
ADP 1 S2	6.9+/-48.0	0.3+/-20.5	N.S.

M1: Cirugia abdominal alta. M2: Cirugia abdominal baja.

S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.



TABLA XVCOMPARACION ENTRE GRUPOSCIRUGIA ABDOMINAL ALTA - BAJA

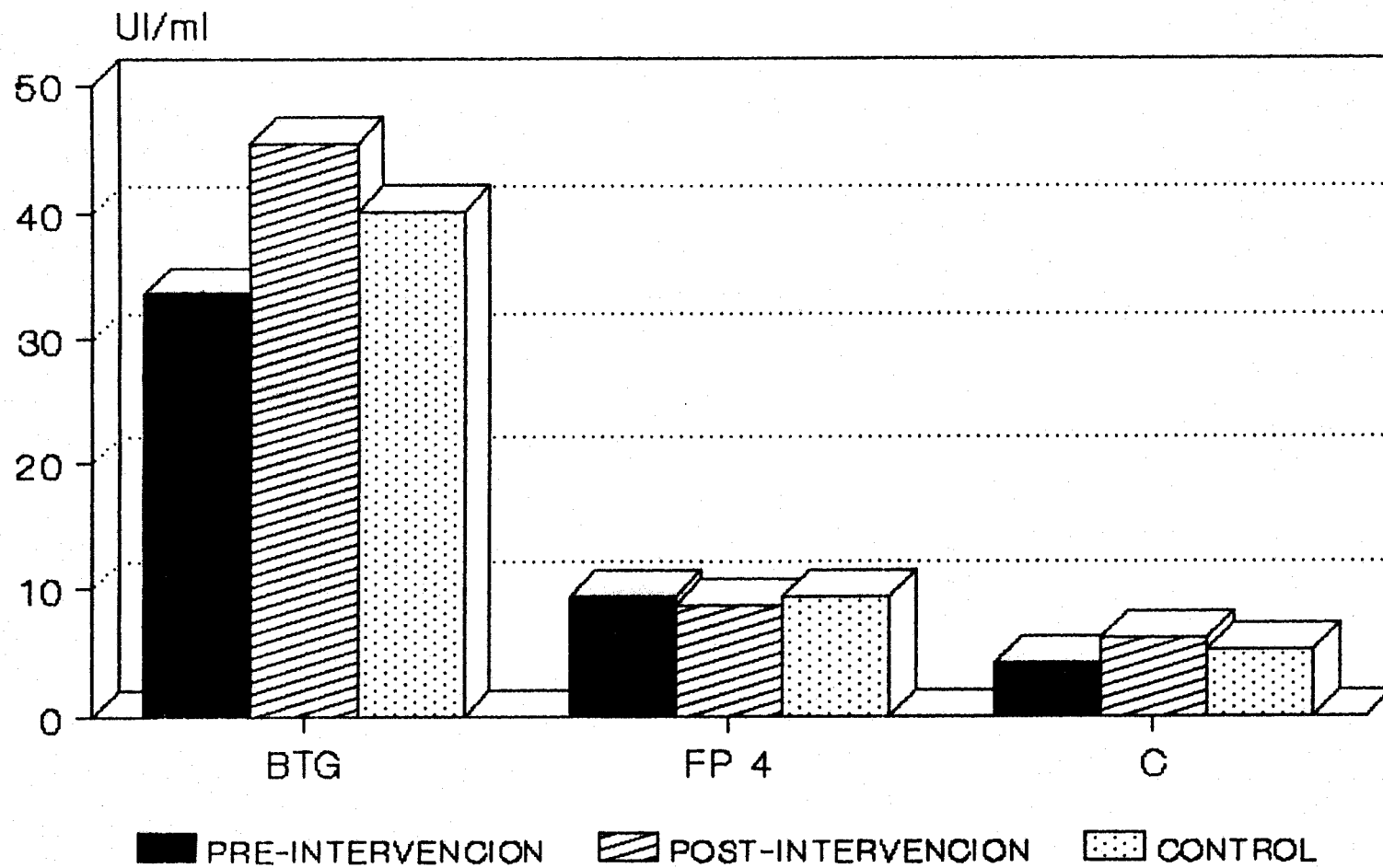
	M1	M2	S.E.
COL M	-0.2+/-12.7	-13.4+/-18.9	+
COL S	8.6+/-29.6	-22.6+/-28.8	+
COL L	2.0+/-42.8	44.0+/-48.9	+
EPN 10 M	-8.5+/-23.3	-13.2+/-18.1	N.S.
EPN 10 S	0.8+/-28.3	-9.8+/-19.0	N.S.
EPN 2.5 M	-8.5+/-27.9	-18.4+/-24.4	N.S.
EPN 2.5 S	-3.3+/-22.1	-14.5+/-20.5	N.S.
RIST M	-2.6+/-5.5	-3.2+/-5.3	N.S.
RIST S	-5.1+/-20.4	-10.3+/-19.4	N.S.
A.A. M	0.6+/-14.3	-5.0+/-5.9	N.S.
A.A. S	0.9+/-32.0	-18.0+/-27.4	N.S.

M1: Cirugía abdominal alta. M2: Cirugía abdominal baja

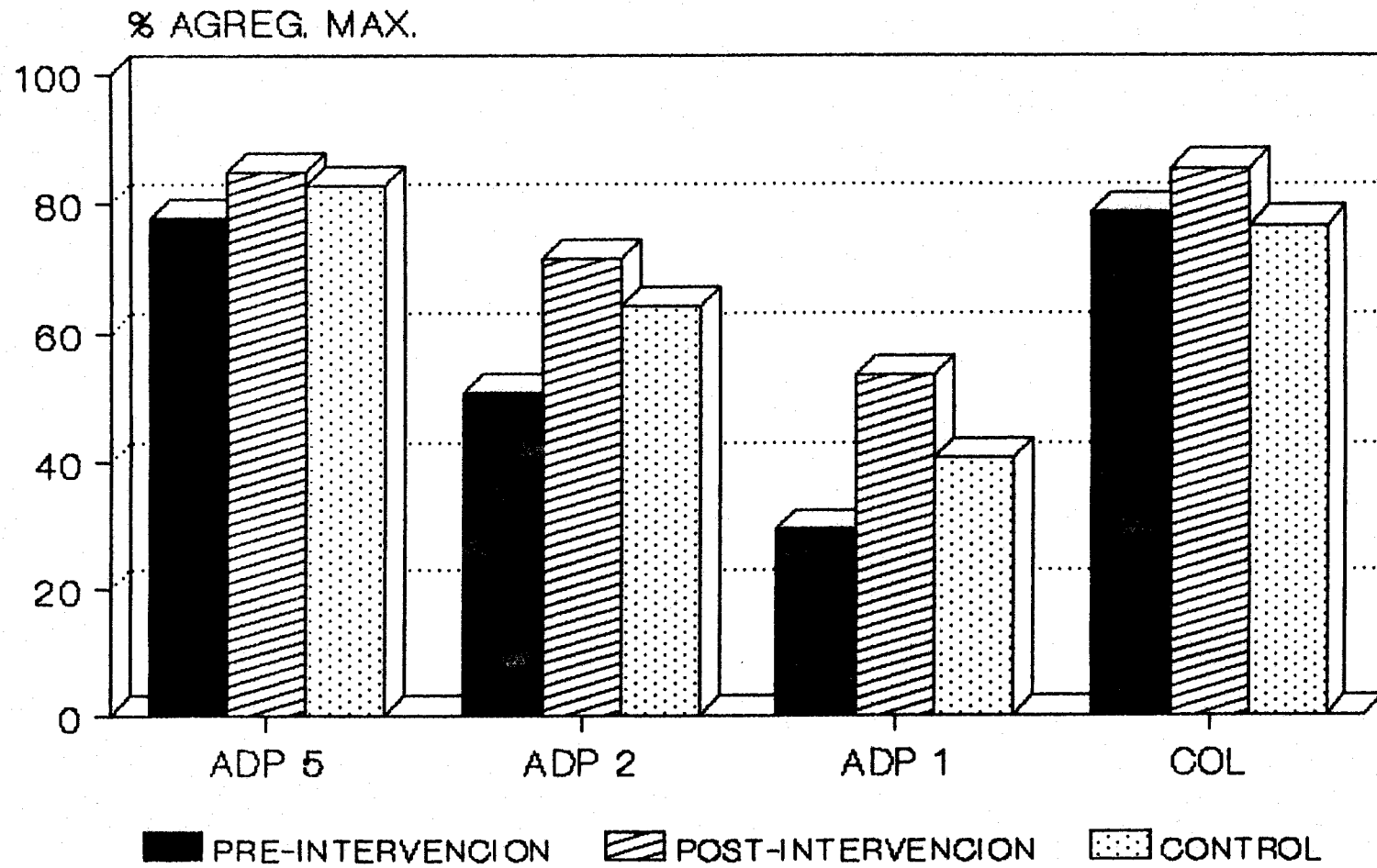
S.E.: Significación estadística. +:  $p < 0.01$ .

\*:  $p < 0.05$ . N.S.: No significativo.

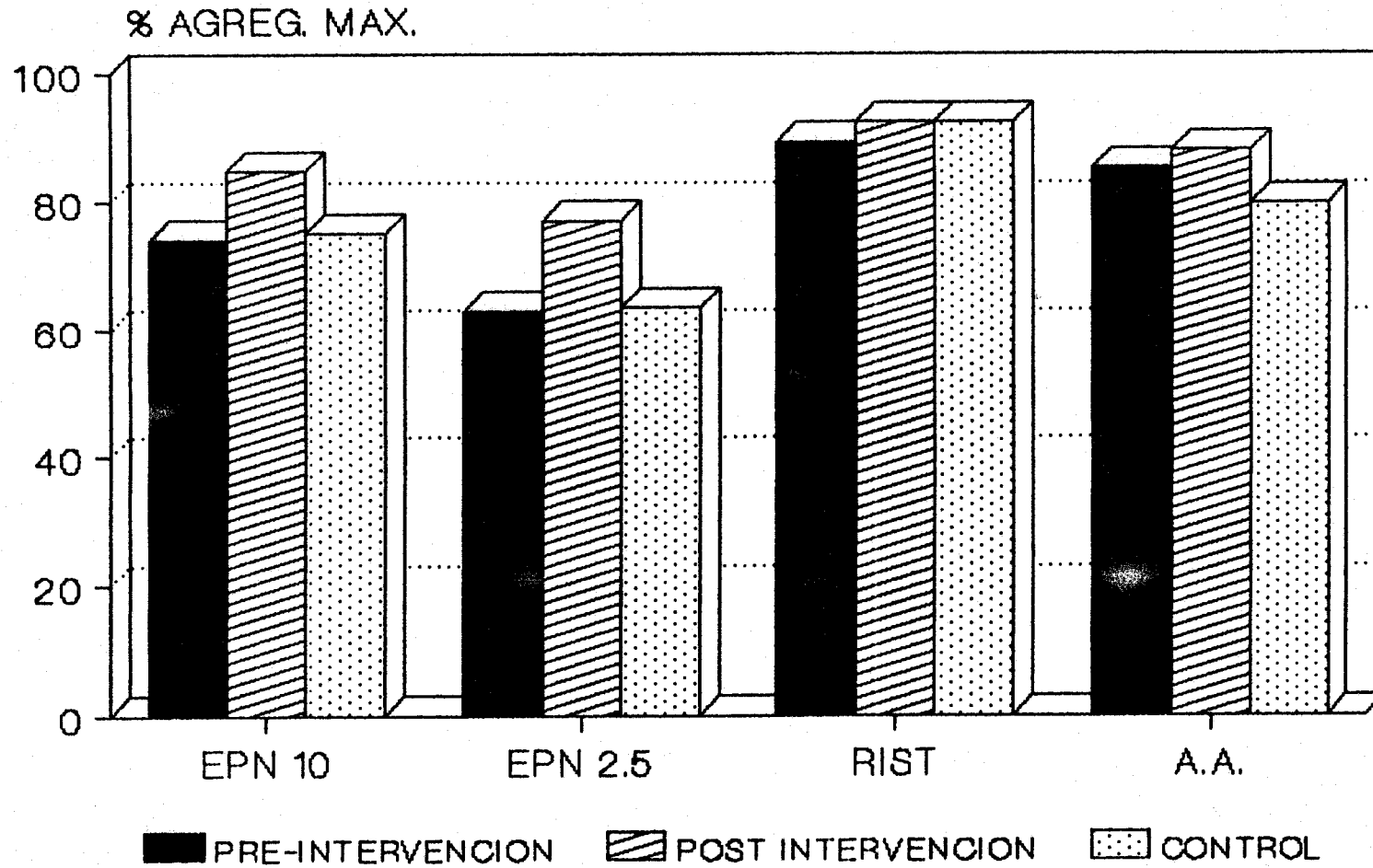
## **FIGURA VII** **ESTADISTICA DESCRIPTIVA**



## FIGURA VIII ESTADISTICA DESCRIPTIVA



## FIGURA IX ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA



V. DISCUSSION.

La incidencia de procesos trombóticos en pacientes sometidos a intervención quirúrgica varía de acuerdo con las distintas fuentes consultadas según el tipo de intervención que se utiliza en cada caso y los criterios que se aplican para su diagnóstico. De esta forma, y en pacientes sometidos a cirugía digestiva, la incidencia de trombosis postoperatorias es del 26 % cuando se tienen en cuenta solamente criterios clínicos, pero aumenta hasta el 43 % en la misma serie si se utiliza para el diagnóstico la detección del trombo mediante gammagrafía con fibrinógeno marcado (120).

Utilizando el mismo método diagnóstico en todos los casos (la gammagrafía se ha impuesto en este sentido), existen diferentes incidencias según el tipo de cirugía. Dicha incidencia es mayor en el caso de las intervenciones traumatológicas, y dentro de estas en las que se coloca una prótesis completa de cadera. De todas formas, y gracias a los avances terapéuticos, esta incidencia ha ido disminuyendo con el transcurso de los años, ya que aparecía en el 60 % de las intervenciones en los años setenta (121), en el 50 % a principios de los ochenta (122), y se reduce al 15 % en las series más recientes (123). Por su parte, las trombosis son una secuela del 30 al 35 % de las intervenciones de cirugía abdominal (124, 125).

Este porcentaje de incidencia es bastante superior al existente en la población general, por lo que se ha pensado que durante o después de la intervención debe ponerse en marcha algún mecanismo que sea el responsable de este hecho.

Este mecanismo debe encontrarse en uno de los tres que intervienen en el proceso hemostático. Estos son, como es sabido, la formación del trombo plaquetario, la coagulación de la sangre y la fibrinólisis. Este trabajo va encaminado a explorar si el proceso quirúrgico provoca alguna perturbación en la fase de formación del trombo plaquetario, para lo que se han estudiado varios parámetros de funcionalismo plaquetario.

## 1. Estadística descriptiva.

### 1.1 Agregación plaquetaria.

De los 64 pacientes estudiados en solo 60 de ellos (93.8 %) aparece una doble onda en la agregación con ADP tanto antes como después de la intervención. En los cuatro casos restantes han aparecido ondas irreversibles de distinta amplitud según la concentración del ADP utilizado. La concentración mínima a la que aparece ésta se halla en 5 casos (7.8 %) por debajo de los límites considerados como

normales cuando es antes de la intervención, y en 19 de ellos (29.7 %) cuando es después de ésta, lo que hace un total de 24 casos (18.8 %). Por encima de dicho rango se encuentra en 14 casos (10.9 %); 13 pre (20.3 %) y 1 postintervención (1.6 %).

Cuando se hace referencia al número de casos fuera de la normalidad antes o después de la intervención el porcentaje expresado entre paréntesis es el correspondiente a las agregaciones realizadas antes o después de dicho proceso, es decir 64, no al número total de éstas que ha sido de 128.

Del total de 128 agregaciones realizadas, cuando la concentración de ADP utilizada ha sido de 5 mCM no se ha encontrado ningún caso en el que el valor de la agregación máxima se halle por encima de los límites considerados como normales, mientras que en 18 casos (14.1 %) se hallaban por debajo de los mismos; de estos, 12 han sido antes de la intervención (18.8 %) y 6 después de ella (9.4 %). Su pendiente en otros 12 pacientes se encontraba por encima de la normalidad, correspondiendo 3 casos (4.7 %) a muestras tomadas antes de la intervención y las 9 restantes (14.1 %) a después de ella. Por su parte, dicha pendiente es menor de lo normal en 16 enfermos (12.5 %), siendo 10 antes (15.6 %) y 6 después (9.4 %).



La agregación máxima con ADP 2 es alta en solo 2 enfermos (1.6 %) ambos después de la cirugía; y en 30 (23.4 %) está baja, de éstos 26 (40.0 %) antes y 4 (6.3 %) después de ella. La primera pendiente de la curva tiene valores elevados con respecto a lo normal en 8 pacientes (6.3 %), 2 y 6 respectivamente (3.1 y 9.4 %). Se halla baja en 18 (14.1 %), que son 14 (21.9 %) antes y 4 (6.5 %) después. La pendiente de la doble onda, que aparece en 82 casos (64.1 %) es superior a lo normal en 1 solo caso (1.2 %), después de la intervención; mientras que se halla baja en 9 casos (11.0 %), 4 antes (12.9 %) y 5 después (9.8 %).

Con ADP 1 se encuentra la máxima agregación elevada en 29 casos (22.7 %), 7 (10.9 %) y 22 (34.4 %) respectivamente, mientras que está descendida en 11 casos (8.6 %), que son 10 (15.6 %) y 1 (1.6 %). El valor de la pendiente es superior a lo normal en 5 pacientes antes de la intervención (7.8 %), y en 13 después de ella (20.3 %), lo que hace un total de 18 (14.1 %); y está disminuida en 18 (28.1 %) antes y 4 después (6.3 %), 22 en total (17.8 %). La pendiente correspondiente a la doble onda que está presente en 47 casos (36.7 %) es baja en 2 casos tras la intervención (4.3 %).

El colágeno tiene una agregación máxima aumentada en un solo paciente (0.8 %), después de la cirugía, y disminuida

en 3 antes de ella (2.3 %). La pendiente de la curva se encuentra por encima de los valores normales en 3 casos antes y 6 después de la intervención (4.7 y 9.4 %), en total 9 (7.0 %). Esta variable se encuentra baja en 7 enfermos (5.5 %), 4 pre (6.3 %) y 3 postintervención (4.7 %). El tiempo de latencia que aparece con este inductor está alargado en 9 pacientes antes del proceso quirúrgico (14.1 %) y 3 después de él (4.6 %), lo que totaliza 12 (9.4 %); se halla acortado en 4 enfermos antes y en otros 3 después (6.3 y 4.6 %), con lo que son 7 (5.5 %).

Cuando se utiliza adrenalina como agente agregante no aparece ningún caso por encima de los límites considerados como normales para la agregación máxima, ya que éstos alcanzan el 100 %. Si aparecen 11 casos en los que están por debajo de éstos (8.6 %), 10 antes (15.6 %) y 1 después (1.6 %) de la intervención. Este número y distribución aparece tanto cuando la concentración de dicho es de 10 mcM como cuando es de 2.5. La pendiente sí que aumenta, en un caso preintervención para ambas concentraciones (1.6 %), y 4 después (6.3 %) cuando se usa EPN 10 y 5 (7.8 %) cuando es 2.5, lo que totaliza 5 casos para la primera concentración y 6 para la segunda (3.9 y 4.7 %).

Algo similar ocurre cuando se utiliza ristocetina o ácido araquidónico, ya que la agregación máxima se considera

normal hasta un 100 %. Por debajo del rango de normalidad aparecen 12 casos (9.4 %) (9 que equivalen al 14.1 % y 3 que 10 hacen al 4.6) para la ristocetina y 3 (2.3 %) (2 que es el 3.1 % y 1 que es el 1.6) para el araquidónico. La pendiente de la curva de ristocetina antes de cirugía está elevada en 3 enfermos (4.7 %) y baja en otros 3. El ácido araquidónico produce elevadas pendientes en 4 casos (3.1 %), que se reparten al 50 % antes y después de la intervención.

Analizando en conjunto para cada agente los datos que ofrece la curva (agregación máxima para cada concentración, pendientes de la curva, tiempo de latencia para el colágeno), y teniendo en cuenta que no todos los parámetros tienen la misma importancia (de todos ellos la concentración mínima para la doble onda es el más importante, la agregación máxima tiene mayor valor que la pendiente de la curva, y los datos referidos a ADP y colágeno más que los concernientes al resto de los agentes), podemos deducir los siguientes hechos.

Al utilizar ADP, la agregación después de la intervención es mayor que la que se presenta antes de ésta en un total de 54 enfermos (84.4 %), es menor en 6 y no muestra cambios considerables en 4 de ellos. De los primeros 54 un total de 43 corresponden a cirugía abdominal (20 altos y 23 bajos), lo que representa un 86.0 % de los sometidos a

este tipo de intervención, mientras que 11 son pacientes con patología torácica (78.6 %).

Cuando el agente utilizado es el colágeno la respuesta está aumentada en 39 casos (60.9 %), de los cuales 30 son pacientes abdominales (60.0 %) y 9 torácicos (64.3 %); baja en 9 y no se modifica en 16 pacientes. Con la adrenalina los resultados son bastante similares al colágeno, pues hay una mayor agregación en 41 enfermos (31 abdominales y 10 torácicos), menor en 8 e igual en 15.

La mitad de los pacientes estudiados, es decir 32, no modifican su respuesta a la ristocetina tras intervención, mientras que 28 lo hacen en sentido ascendente y 4 en descendente. El ácido araquidónico mantiene sus cifras en 21 pacientes, las aumenta en 31 y las descende en 12.

Analizando globalmente la agregación para los distintos agentes, y teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente expuestas, de los 64 enfermos estudiados, 49 presentan una elevación de los parámetros de agregación tras la intervención quirúrgica (76.6 %), de los que 38 (17 y 21) presentaban una patología abdominal y 11 torácica (76.0 y 78.6 % respectivamente). En 2 pacientes la intervención causó un disminución de ellos (3.1 %), ambos casos de cirugía abdominal y en 13 no produjo alteraciones.

Por tanto, se podría decir que la agregación plaquetaria está aumentada en una mayoría de los pacientes estudiados cuando se les somete a intervención quirúrgica. De entre los agentes utilizados el ADP es el que presenta una respuesta aumentada en un mayor número de enfermos, mientras que la ristocetina es la que lo hace en una menor cantidad de ellos, prevaleciendo en relación con este agente los pacientes sin alteraciones. Por su parte, el colágeno, adrenalina y ácido araquidónico muestran un comportamiento intermedio entre los dos anteriores, encontrándose el último de ellos bastante más cerca de la ristocetina que del ADP.

Al comparar los distintos tipos de cirugía entre sí, los porcentajes en que cada uno de ellos se hallan modificados en algún sentido son similares unos a otros y con los del grupo total, por lo que no parece que la modalidad de intervención sea un factor determinante en esto.

De todas formas, en el análisis realizado hasta ahora se han tenido en cuenta solamente el número de pacientes en que estos parámetros están alterados, sin atender en ningún momento el valor cuantitativo de dicha alteración, y si ésta es estadísticamente significativa. Por todo ello, aún no es posible obtener conclusiones.

### 1.2. Beta-Tromboglobulina y Factor Plaquetario 4.

La beta-Tromboglobulina se halla elevada en un total de 17 casos (13.3 %), de los que 6 son antes de la intervención (9.4 %) y 11 después de ella (17.2 %); todos los 17 corresponden a pacientes con patología abdominal, mientras que ninguno de ellos era torácico. Esta proteína se encuentra baja en 13 pacientes pre y 8 postcirugía (20.3 y 12.5 %), lo que hace un total de 21 casos (16.4 %). De estos 21, 17 fueron sometidos a intervención abdominal y 4 a torácica.

Existen valores por encima de lo considerado como normal de Factor Plaquetario 4 en 11 casos (8.6 %), 8 antes y 3 después de la intervención (12.5 y 4.7 %). Separados por patologías 9 eran abdominales y 2 torácicos. Por debajo de estos límites aparecen 9 casos, 4 antes y 5 después de la cirugía (7.0, 6.3 y 7.8 % respectivamente); de estos 9 solo uno fue sometido a una intervención en torax, mientras que los 8 restantes lo fueron en abdomen .

Por último, en lo referente al cociente entre ambos valores, se encuentra elevado en 11 pacientes con patología abdominal y 2 torácica, lo que totaliza 13 (10.2 %), repartidos en 6 pre y 7 postintervención (9.4 y 10.9 %). Los valores bajos son un total de 8 (6.3 %), 5 antes de la

intervención (7.8 %) y 3 tras ella (4.7 %); las mismas cantidades corresponden respectivamente a los procesos abdominales y torácicos.

Al calcular las diferencias entre los valores obtenidos antes y después de la intervención para cada parámetro, en el caso de la BTG ésta aumenta en 34 pacientes, disminuye en 21 y no se modifica en 9. El FP 4 sube en 24 pacientes, baja en 31 y queda igual en otros 9. El cociente BTG/FP 4 se eleva en 44 de los 64 enfermos, desciende en 12 y es estable en 8.

Analizando estos datos, la tromboglobulina está elevada en el mismo número de pacientes que en los que está baja, lo mismo que ocurre con el Factor 4, pero no así con el cociente, ya que se encuentra elevado en el doble de casos de los que está disminuido. Después de la intervención el número de pacientes en los que ambas proteínas están elevadas es el doble al que existe antes de la intervención, lo mismo que sucede con los valores disminuidos de BTG. Por su parte, no existen diferencias apreciables entre el número de enfermos fuera de los límites antes y después de la intervención en lo que concierne al cociente BTG/FP 4.

Esto último parece indicar que existe una mayor variabilidad de los valores de dichas proteínas después de

cirugía que antes de esta. De todas formas, el que ninguno de los tres parámetros se comporte de forma similar a los demás al analizarlos en conjunto, ni separados con respecto al tipo de intervención ni teniendo en cuenta el que se hayan obtenido antes o después ella, impide que podamos obtener conclusiones provisionales tras este primer análisis tal como lo habíamos conseguido en el caso de la agregación plaquetaria.

## 2. Comparación de los pacientes con los controles.

Cuando se comparan los valores obtenidos antes de la intervención quirúrgica con los pertenecientes a individuos normales se aprecia que los correspondientes a los enfermos son menores que los referentes a los controles, excepto en el caso del colágeno en que son iguales y del ácido araquidónico en que son mayores. Pero solamente en el caso de la agregación máxima para la ristocetina ( $p < 0.01$ ) y de la primera pendiente del ADP 2 ( $p < 0.05$ ) las diferencias fueron significativas.

.Mayor variación se comprueba cuando la comparación se realiza entre los valores normales y los obtenidos tras el procedimiento quirúrgico. En este caso el valor de la doble onda tras la operación es significativamente menor que la



normalidad ( $p < 0.05$ ), al igual que la segunda pendiente de la onda que produce el ADP 1, y al contrario agregación máxima para ADP 2 y ADP 1 y la primera pendiente para este último. No sufren variación los valores concernientes al ADP 5.

La máxima agregación, tanto del colágeno como de la adrenalina en las dos concentraciones utilizadas, se encuentran por encima de lo normal con mayor grado de significación que en el caso del ADP ( $p < 0.01$ ), mientras que sus pendientes y el tiempo de latencia del colágeno también son mayores pero no significativamente.

Por lo que respecta a la ristocetina y al ácido araquidónico las diferencias halladas tampoco tienen un nivel suficiente de significación estadística ( $p > 0.05$ ). Lo mismo sucede con los valores de BTG, FP 4 y el cociente entre ambos.

De todo esto se puede sacar la conclusión de que la patología que provoca la intervención no modifica de manera significativa ni la agregación plaquetaria ni los niveles de BTG y FP 4, ya que consideramos que la disminución aislada de la pendiente del ADP 2 y la agregación máxima de la ristocetina son de escaso valor al no hallarse acompañadas de otras alteraciones.

Por su parte, tanto la disminución de la concentración necesaria para la obtención de la doble onda con ADP como el aumento de la agregación máxima para él, indican un aumento de la respuesta a dicho agente después de la intervención. El mismo significado tienen el aumento de la agregación para el colágeno y adrenalina. El resto de los cambios producidos, aunque ninguno de ellos tenga significación estadística van en el mismo sentido, por lo que cual se podría decir que la agregación producida tras la intervención es mayor que la que se observa en individuos sanos.

### 3. Comparación pre-postintervención.

Este apartado es el considerado de mayor importancia dentro de este estudio, ya que es el que aclarará de un modo definitivo si la intervención quirúrgica influye o no en los parámetros de función plaquetaria, y si lo hace en que sentido es el cambio que se produce.

Todos los parámetros, tanto los referidos a la agregación plaquetaria como a la liberación de sustancias por dichas células (BTG Y FP 4) están elevados después de la intervención con respecto a antes de ésta, excepto en los casos del FP 4, la concentración mínima para la doble onda

del ADP y el tiempo de latencia del colágeno. Pero hay que tener en cuenta que la disminución de estos dos últimos tienen el mismo significado que el aumento de todos los demás, es decir, un aumento en la respuesta a los distintos agentes agregantes.

Ahora bien, no todas estas variaciones tienen el mismo nivel de significación estadística. De este modo, la disminución del valor del Factor 4 (el único dato que va en contra de un ascenso de la actividad plaquetaria post-intervención) y el aumento de las segundas pendientes de la onda de ADP 1 y ADP 2 no tienen nivel significativo suficiente. Las diferencias obtenidas en lo referente a la pendiente de la onda cuando se utiliza colágeno y adrenalina 10 mM, y la agregación máxima para el ácido araquidónico son de menor significación ( $p < 0.05$ ) que la del resto de los casos ( $p < 0.01$ ).

Además, considerando que no todos los parámetros tienen la misma importancia cualitativa, los más destacados de entre estos, es decir, la agregación máxima para cada agente, la latencia del colágeno, la concentración necesaria para la doble onda, la BTG y su cociente con el FP 4 tienen el nivel de significación más elevado (si exceptuamos lo concerniente al ácido araquidónico).

Mientras, los que podríamos considerar como menos importantes, como son las la segunda pendiente de la doble onda para el ADP, son los que no presentan diferencias significativas. Lo mismo se podría decir con respecto a los niveles de FP 4, ya que como se ha expuesto en el apartado de Introducción, el valor de éste no refleja tanto la actividad secretora de la plaqueta en sí misma, sino cuando se valora mediante el cociente con la beta-Tromboglobulina.

#### 4. Comparación entre grupos.

No se han hallado diferencias para ninguno de los parámetros al comparar los pacientes sometidos a intervención abdominal con los correspondientes a intervención torácica.

Al comparar la variación de los valores pre y postintervención en cirugía abdominal alta y baja, encontramos que la agregación máxima cuando se utiliza ADP 5 aumenta de forma más acusada en el segundo tipo de cirugía que en el primero ( $p < 0.05$ ). Al utilizar colágeno como inductor, la agregación máxima aumenta en mayor proporción en la cirugía abdominal baja que en la alta; la pendiente de la curva aumenta en la primera modalidad de cirugía y disminuye en la segunda; y el tiempo de latencia apenas se

acorta en las intervenciones altas mientras que lo hace de manera bastante acentuada en las bajas. Estas tres variaciones de los parámetros referidos al colágeno tienen todas el mismo nivel de significación estadística ( $p < 0.01$ ). El resto de los parámetros no muestran variación entre un grupo y otro. Este hallazgo aislado lo consideramos de escaso interés dentro del estudio conjunto que se ha realizado.

Por tanto, y en resumen, se puede decir que no existen diferencias significativas entre los datos obtenidos de individuos sanos y los obtenidos de los pacientes antes de la intervención, de lo que se puede deducir que la enfermedad responsable de la operación no había modificado el estado de función plaquetaria; la agregación plaquetaria después de la intervención se halla, valorada en su conjunto, más alta que la de los individuos controles, lo que es un indicio de que dicho proceso ha podido alterarla, no existe por el contrario elevación significativa de los niveles de proteínas liberadas por las plaquetas; tanto la mayor parte de los parámetros de agregación como los valores de la beta-Tromboglobulina y el cociente de ésta y el Factor Plaquetario 4 se hallan elevados después del proceso quirúrgico con respecto a antes de éste; y por último, no hay diferencias significativas entre los cambios hallados en uno y otro grupo de pacientes cuando éstos se dividen por el

tipo de intervención quirúrgica a la que fueron sometidos.

##### 5. Comparación con estudios anteriores.

Analizando la bibliografía que existente acerca del tema que nos concierne es de destacar la escasez de ésta, por lo que no es posible el cotejar la totalidad los datos obtenidos en este estudio con otras fuentes.

Estos estudios anteriores, a los que a continuación nos referiremos, adolecen quizás de ser algo incompletos, pues los que se refieren a las pruebas de liberación plaquetaria solo analizan los niveles de beta-Tromboglobulina, no teniendo en cuenta los de Factor Plaquetario 4 y por tanto los del cociente entre ambos, quizás el parámetro de mayor importancia. Por su parte los estudios referentes a la agregación de las plaquetas solo analizan la concentración mínima necesaria para la obtención de la doble onda con ADP, considerando que es el parámetro de mayor valor, idea que también comparte este trabajo, pero que debe ser acompañado por otros valores, utilizando tanto este agente agregante como otros.

Cuando otros autores han estudiado el efecto de la intervención quirúrgica sobre las cifras plasmáticas de

Tromboglobulina (126) han encontrado un aumento de significativo de éstas de dicho proceso, lo que concuerda con los datos por nosotros obtenidos. Este aumento llega a ser de 300 % con respecto a los valores preintervención, lo que ocurre a las 12 horas tras ésta, y va descendiendo paulatinamente con el paso de los días hasta alcanzar los niveles basales.

Con respecto a la respuesta de agregación al ADP los resultados son contradictorios según la segunda toma de muestras se realice durante la misma intervención o inmediatamente tras ella, o si ésta se lleva a cabo más tarde.

En el primer caso se aprecia un periodo refractario en el que es necesario utilizar concentraciones mayores de ADP para conseguir la doble onda que la que se utilizaba antes de la intervención. Esto se explica como un bloqueo de la agregación in vitro debido a la existencia en el plasma de ADP secretado por las propias plaquetas durante el acto quirúrgico (127).

Por su parte, cuando el estudio ha sido realizado con un mayor margen de tiempo con respecto a la cirugía, en lo que coincide este, aparece una marcada hiperagregabilidad para dicho agente, lo que se traduce en una disminución de la

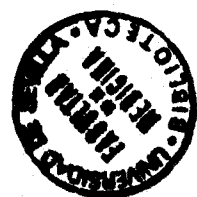
concentración de ADP necesaria. Esta disminución, que alcanza su punto máximo a las veinticuatro horas y se mantiene con ligeras oscilaciones a la baja durante 5-7 días varía entre un 50 y un 75 %. Estas observaciones concuerdan con las nuestras en este apartado, ya que la disminución calculado por nosotros al tercer día es del 60 % del valor preintervención (128).

En resumen, podemos decir que los datos obtenidos en lo referente a BTG y doble onda de ADP están en consonancia con los anteriormente disponibles al respecto. Por otra parte, en este trabajo han sido investigadas nuevas facetas del mismo fenómeno que contribuyen a clarificar el mecanismo de la manifiesta tendencia trombofílica que exhiben algunos pacientes en la fase postoperatoria.



## VI. CONCLUSIONES.

- 1) No existen diferencias significativas entre los valores de beta-Tromboglobulina, Factor Plaquetario 4 y parámetros de agregación obtenidos en pacientes antes de ser sometidos a intervención quirúrgica e individuos normales, por lo que se puede considerar que los procesos patológicos que motivaron la intervención no han modificado la función plaquetaria del paciente.
  
- 2) Después de dicha intervención, y con respecto a los individuos control, está aumentada la respuesta de agregación para el ADP a concentraciones de 1 y 2 mcM, la doble onda de éste, el colágeno y la adrenalina; mientras que no se modifica para el ADP 5 mcM, la ristocetina y el ácido araquidónico. Por lo tanto se puede decir que la agregación tras la operación es más alta que la de los dichos individuos.
  
- 3) Los valores de Tromboglobulina y del cociente entre ésta el Factor 4 se encuentran aumentados después del proceso quirúrgico con respecto a antes de éste, lo que indica un aumento de la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios.



- 4) Los valores de agregación máxima y pendiente de la curva para todos los inductores y a las diversas concentraciones utilizadas son más altos tras la intervención que antes de ella.
- 5) Tanto la concentración mínima necesaria para conseguir la doble onda con ADP como el tiempo de latencia del colágeno están disminuidos después de la cirugía.
- 6) Estos dos últimos hechos indican un aumento de la agregación plaquetaria tras la cirugía, lo que unido al aumento de la BTG conlleva un aumento global de la función plaquetaria debida a este proceso.
- 7) Los postoperados torácicos y abdominales tienen igual comportamiento, así como los abdominales altos y bajos cuando se comparan entre sí.
- 8) Es posible poder concluir, como resumen de este trabajo, que al aumento de la incidencia de fenómenos trombóticos en el periodo postoperatorio podría contribuir como mecanismo patogénico un estado de hiperfuncionalismo plaquetario desencadenado por el proceso quirúrgico.

**VII. RESUMEN.**

Se han tomado muestras de sangre venosa a un total de 64 pacientes elegidos al azar de entre los sometidos a intervención quirúrgica reglada en los Servicios de Cirugía General y Cirugía Torácica del Hospital Universitario Virgen Macarena. Dichas muestras fueron obtenidas el día anterior a la intervención y tres días después de ésta, absteniéndose el paciente de tomar fármacos que modifiquen de forma conocida la función plaquetaria desde una semana antes de la primera toma de muestras y hasta después de la segunda.

Del mismo modo se consiguió sangre de 35 individuos sanos, elegidos entre personal sanitario y voluntarios que acudían a Cámara de Donantes de Sangre, que serán utilizados como controles.

Las muestras fueron analizadas según la técnica de Born para obtener los parámetros de agregación plaquetaria. También, y utilizando un método ELISA, se determinaron los niveles plasmáticos de beta-Tromboglobulina y Factor Plaquetario 4, y posteriormente el cociente entre ambos.

Una vez obtenida la totalidad de los parámetros a estudiar se han comparado los correspondientes a los pacientes antes y después de la intervención quirúrgica con

los obtenidos en los individuos control. En el primer caso no se han observado diferencias significativas en lo que se refiere a la respuesta de agregación. Por su parte, tras la intervención y en comparación con los controles, está aumentada la respuesta de agregación cuando se utilizan como inductores ADP a concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{M}$ , colágeno y adrenalina; así como la aparición de la doble onda con ADP se consigue con concentraciones menores de éste. No se modifican la respuesta a ADP 5, ristocetina y ácido araquidónico.

Por lo que respecta a la BTG y el FP 4, tampoco existen diferencias entre los individuos controles y los pacientes antes de la cirugía, mientras que después de ella son más elevados los niveles de BTG y el cociente entre esta y el PF 4.

Tras esto, se compararon los valores obtenidos antes y después de la intervención para cada paciente por separado. De esta forma se observó que del total de 64 enfermos estudiados 49 (76.6 %) presentaron una elevación de los parámetros de agregación, en 2 (3.1 %) la intervención provocó una disminución de los mismos y en los 13 restantes (20.3 %) no produjo modificaciones. El análisis conjunto de estos datos mediante un estudio de diferencia de medias permite apreciar un aumento significativo de la agregación

plaquetaria después de la cirugía con respecto a antes de ella. Lo mismo sucede con los niveles plasmáticos de BTG.

Por último, se compararon entre sí distintos subgrupos de pacientes según su diagnóstico (cirugía torácica contra abdominal, y dentro de esta última abdominal baja contra alta), sin que se obtuvieran diferencias con significación estadística.

Como resumen final de este trabajo se podría concluir que el proceso inicial responsable de la intervención no modificó la función plaquetaria del paciente, y fundamentalmente, que ésta se halla significativamente elevada tras la cirugía con respecto a antes de ella, lo que podría contribuir como mecanismo patogénico al alto porcentaje de episodios trombóticos que se producen tras este tipo de actos terapéuticos.

VIII. BIBLIOGRAFIA.



- 1) Willimas WJ. Función de los vasos sanguíneos en la hemostasia primaria. En: "Hematología". SALVAT Ed. 2 edición. Barcelona. Tomo II: 1383-7, 1983.
- 2) Rozman C, Monserrat E. Hemostasia primaria. En: "Medicina Interna". Ed. DOYMA. 11 ed. Barcelona. 1476-1477, 1988.
- 3) Castillo R, Batsida E. Fisiología de la hemostasia. En: "Hematología clínica". Ed DOYMA. 2 edición. Barcelona. 547-51, 1988.
- 4) McFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. Nature 202: 498-509, 1964.
- 5) Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science 145: 1310-8, 1964.
- 6) Wright IS. The nomenclature of blood clotting factors. Thromb. Diath. Haemorr. 7: 381-5, 1962.
- 7) Vives JL, Aguilar JL. Fisiología general de la hemostasia. En: "Manual de técnicas de laboratorio en hematología ". SALVAT Editores. 1 Ed. Barcelona, 383-399, 1987.

- 8) Williams WJ. Bioquímica de los factores plasmáticos de la coagulación. En : "Hematología". SALVAT Ed. 2 edición. Barcelona. Tomo II; 1302-24, 1983.
- 9) Fernandez Nogueira A, Fernandez Pavón A. Fisiología de la coagulación. En : "Hemostasia". Publicaciones Científicas de la Asociación Española de Biopatología Clínica. Madrid. 27-38, 1988.
- 10) Williams WJ. Secuencia de las reacciones de la coagulación. En : "Hematología." SALVAT Editores. 2 edición. Barcelona. Tomo II; 1342-52, 1983
- 11) Lammle B, Griffin JH. Formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors. Clin. Haematol., 14: 281-342, 1985.
- 12) Straub W, Duckert F. The formation of the extrinsic protrombin activator. Thromb. Diath. Haemorrh. 5: 241-8, 1961.
- 13) Willimas WJ. Control de las reacciones de la coagulación. En : "Hematología". SALVAT Editores. 2 edición. Barcelona. Tomo II; 1353-62, 1983.



- 14) Salem HH. The natural anticoagulants. Clin. Haematol. 15: 371-92, 1986.
- 15) Abilgaard V. Antithrombins. Thromb. Diath. Haemorrh. (Suppl) 51: 295-303, 1971.
- 16) Brinkhouse KM. Platelets: their role in hemostasis and thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl. 26, 1967.
- 17) Hovig T. The ultrastructure of platelets in normal and abnormal states. Ser. Haematol. 1: 13, 1968.
- 18) Behnke O. Electron microscopical observations on the surface coating of blood platelets. J. Ultrastruct. Res. 24: 51, 1968.
- 19) Giometti CS, Anderson NG. Protein changes in activated human platelets. Clin. Chem. 30, 12: 2078-2083, 1964.
- 20) Shattil SJ, Bennett JS. Platelets and their membranes in hemostasis: physiology and pathophysiology. Ann. Int. Med. 94: 108-118, 1980.
- 21) White JG. The subcellular filaments of blood platelets. Am. J. Pathol. 56: 267, 1969.

- 22) Sixma JJ, Mollenar J. Microtubules and microfibrils in blood platelets. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 16: 153, 1966.
- 23) White JG. The substructure of human platelets microtubules. *Blood* 32:638, 1968.
- 24) Bettex-Gallar M, Luscher E. Extration of an actomyosin-like protein from human trombocytes. *Nature* 184: 276, 1959
- 25) Walz DA. Platelet-released protein as molecular markers for the activation process. *Sem. Thromb. Hemostas.* 10, 4: 270-9, 1984.
- 26) Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Sem. in Haematol.* 22, 3: 219-40, 1985.
- 27) Costa JL, Smith MA, Tanaka Y. Phosphorus and divalent cations in dog, rabbit and human platelets dense bodies as deduced from electron microscope studies of air-dried whole mounts. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* 32: 137-45, 1981.
- 28) Fukami MH, Dangelmaier CA, Bauer J. Secretion, subcellular localization and metabolic status of inorganic pyro-phosphate in human platelets. A major constituent of the amino-store granules. *Biochem. J.* 192: 99-105, 1980.

- 29) Ugurbil K, Fukami MH, Holmsen H. P-NMR studies of nucleotide storage in the dense granules of pig platelets. *Biochemistry* 23: 409-16, 1984.
- 30) Ugurbil K, Fukami MH, Holmsen H. P-NMR studies of nucleotide storage in the dense granules of pig platelets. *Biochemistry* 23: 416-428, 1984.
- 31) Holmsen H, Ostvold A-C, Day HJ. Behaviour of endogenous and newly absorbed serotonin in the platelet release reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 2599-2608, 1973.
- 32) Wilkins JA, Salganicoff L. Participation of a trans-membrane proton gradient in 5-hydroxytryptamine transport by platelet dense granules and dense granules ghosts. *Biochem. J.* 198: 113-123, 1981.
- 33) Reimers HJ, Packman MA, Mustard JF. Labeling of the releasable adenine nucleotides of washed human platelets. *Blood* 49: 89-99, 1977.
- 34) Ugurbil K, Holmsen H, Shulman RG. Adenine nucleotide storage pools and secretion in platelets as studied by P nuclear magnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2227-31, 1979.

- 35) Chesney CM, Pifer D, Colman RW. Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5180-4, 1981.
- 36) Gostad GO, Hagen I, Korsmo R. Evidence for release of soluble, but not of membrane-integrated, proteins from human platelets alpha-granules. Biochim. Biophys. Acta 702: 81-9, 1983.
- 37) Van der Meulen J, Grinstein S. Ca-induced lysis of platelet secretory granules. J. Biol. Chem. 257: 5190-5, 1982.
- 38) Holmsen H, Day HJ. The selectivity of thrombin-induced platelet release reaction: subcellular localization of released and retained substances. J. Lab. Clin. Med. 75: 840-55, 1970.
- 39) Akkerman JWN, Holmsen H. Interrelationship between platelet responses. Studies on the burst in proton liberation, lactate production and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca secretion. Blood 57: 956-66, 1981.

- 40) Vladutiu GD, Danglelmaier CA, VanOost BA. High- and low-uptake forms of beta-hexosaminidase in human platelets: selective retention of high-uptake form during stimulation with thrombin. *Biochim. Biophys. Acta* 802: 435-41, 1984.
- 41) Behnke O. Electron microscopic observations of the membrana system of the rat blood platelets. *Anat. Rec.* 158: 121, 1967.
- 42) White JG. Physiology of platelets. En: "State of the art in idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood." Padua, Proc. Satel. Symp. Ann. Meet. Eur. Soc. Paediat. Res.; 9-28, 1987.
- 43) Tocantis LM. The mammalian blood platelets in health and disease. *Medicine* 17: 155-9, 1938.
- 44) Zuccker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis* 5: 2, 1985.
- 45) Mustard JF, Packman MA. Normal and abnormal haemostasis. *Br. Med. Bull.* 33: 187,96, 1977.
- 46) Schafer AI, Handin RI. The role of platelets in thrombotic and vascular disease. *Prog. in Cardiovasc. Dis.* 22: 31-8, 1979.

- 47) Rouslahti E, Hayman EG, Pierschbacher MD. Extracellular matrices and cell adhesion. *Arteriosclerosis* 5: 581-6, 1985.
- 48) Borchgrevink CF, Owren PA. The hemostatic effect of normal platelets in hemophilia and factor V deficiency. The importance of clotting factors adsorbed on platelet for normal hemostasis. *Acta Med. Scand.* 170: 35-42, 1961.
- 49) Hellum AJ. The adhesiveness of human platelets in vitro. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 12:(Suppl. 51), 1, 1960.
- 50) Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interaction between platelets and blood vessel walls. *New Eng. J. Med.* 300: 1142-53, 1979.
- 51) Escolar G, Bastida E, Ordinas A, Catillo R. Interaction of platelets with subendothelium in humans treated with aspirin and dipyridamole alone or in combination. *Thromb. Res.* 40: 419-26, 1985.
- 52) Weiss HG. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *New Eng. J. Med.* 293: 531-580, 1975.
- 53) Baumgartner HR, Haudenschild C. Adhesion of platelets to subendothelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 201: 22-8, 1972.



- 54) Epstein CJ, Schaud ML, Piel CF, Goodman JR, Bernfield MR, Kuschner JH. Hereditary macrothrombocytopenia, nephritis and deafness. *Am. J. Med.* 52: 299-306, 1972.
- 55) Luscher JM, Iyer R. Idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Sem. Thromb. Hemostas.* 3: 175-82, 1977.
- 56) Ruggeri ZM, Zimmerman T. Platelets and von Willebrand's disease. *Sem. in Hematol.* 22: 203-12, 1985.
- 57) Turitto VT, Weiss HJ, Baumgartner HR. Platelet interaction with rabbit subendothelium in von Willebrand's disease. Altered thrombus formation distinct from defective platelet adhesion. *J. Clin. Invest.* 74: 1730-7, 1984.
- 58) Zucker MB, Borelli J. Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. *Blood* 30: 625-33, 1954.
- 59) Allen RD, Zacharski LR, Widirstky ST, Rosenstein R, Zaitlin M, Burgess PR. Transformation and motility of human platelets: details on the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. *Cell. Biol.* 83: 126-31, 1979.

- 60) White JG. Arrangements of actin filaments in the cytoskeleton of human platelets. Am. J. Pathol. 117: 207-16, 1984.
- 61) Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton on the resting and activated platelets in suspension. Am. J. Pathol. 123: 86-95, 1986.
- 62) White JG. The morphology of platelet function. Meth. Hematol. 8: 1-17, 1983.
- 63) White JG, Sauk JJ. Microtubule coils in spread blood platelets. Blood 64: 470-4, 1984.
- 64) Lapatina EG, Watson SP. La relative importance du métabolisme dans diacylglicerol, phosphatidate, inositol triphosphate et arachidonate en la signalisation de le récepteur de plaquette. Nouv. Rev. Franc. Hematol. 27: 235-42, 1985.
- 65) White JG. Interaction of membrane systems in blood platelets. Am. J. Pathol. 66: 295-306, 1972.
- 66) Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. J. Clin. Pathol. 39: 701-12, 1986.

- 67) Di Minno G, Thiagarajan P, Perussia B, Martinez J, Shapiro S, Trinchieri G, Murphy S. Exposure of platelet fibrinogen-binding sites by collagen, arachidonic acid and ADP: inhibition by a monoclonal antibody to the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 61, 1: 140-8, 1983.
- 68) Messmore HL Jr, Walenga JM, Fareed J. Molecular markers of platelet activation. *Sem. Thromb. Hemost.* 10, 4: 264-9, 1984.
- 69) Kaplan KL, Broekman MJ, Chernaff A, Legnik GR, Drillings M. Platelet granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 53: 604-18, 1979.
- 70) Gardner TK, Gerrard JM, White JG, Williams DC. The endogenous lectin of human platelets is an alpha granule component. *Blood* 58: 153-6, 1981.
- 71) Gardner TK, Gerrard JM, White JG, Williams DC. Fibrinogen is the receptor of the endogenous lectin of human platelets. *Nature* 289: 688-95, 1981.
- 72) Zucker MB, Masesson MW, Broeckman J. Release of fibronectin (cold insoluble globulin) from alpha-granules induced by collagen and thrombin: lack or requirement of

plasma fibronectin in ADP induced platelet aggregation. Blood 54: 8-15, 1979.

- 73) Ross R. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. Arteriosclerosis 1: 293-301, 1981.
- 74) Harker WA, Ross R. Pathogenesis of arterial vascular disease. Sem. thromb. Hemost. 5: 274-83, 1979.
- 75) White JG, Krumwiede M. Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. Blood 69: 1196-1203, 1987.
- 76) Ginsburg MH, Taylor W, Painter RG. The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. Blood 55: 661-9, 1981.
- 77) Adelson E. The platelet as a sponge: a review. Blood 17: 767-74, 1961.
- 78) Tuszynski GP. FXI antigen and activity in human platelets. Blood 59: 1148-56, 1982.

- 79) Dawes J, Smith RC, Pepper DS. The release, distribution and clearance of human beta-thromboglobulin and platelet factor 4. *Thromb. Res.* 12, 5: 851-61, 1978.
- 80) Del Bono R, Ascari E. Interazioni piastrina-plasma. En: "Lo studio della funzione piastrinica in laboratorio". Menarini Diagnostici s.a.s. 1 edición. Firenze. 141-60, 1988.
- 81) Schwatz ML. Human factor XIII from plasma and platelets: molecular weights, subunit structure, proteolytic activation and cross-linking of fibrinogen and fibrin. *J. Biol. Chem.* 248: 139-56, 1973.
- 82) Schmaier AH. High molecular weight kininogen: a secreted platelet protein. *J. Clin. Invest.* 71: 1477-84, 1983.
- 83) Baruch D. Thrombin-induced platelet factor Va formation in patients with a Gray platelet syndrome. *Thromb. Hemost.* 58: 768-73, 1987.
- 84) Peerschke EIB. The platelet fibrinogen receptor. *Semin. Hematol.* 22: 241-8, 1985.

- 85) Schmaier AH. High molecular weight kininogen: localization in unstimulated and stimulated platelets and activation by a platelet calpain(s). Blood 67: 119-26, 1986.
- 86) Rosing J, van Rijn JL, Bevers EM, van Dieijen G, Confuricus P, Zwaal RF. The role of activated human platelets in prothrombin and factor XI activation. Blood 64: 319-28, 1985.
- 87) Hultin MB. The role of platelets in factor VIII activation and factor X activation. Blood 62: 268-75, 1983.
- 88) Ganburg P. Studies on human platelets proteins: II. Effect of thrombin. Blood; 33: 590-6, 1969
- 89) Van Creveld S, Paulssen MMP. Singificance of clotting factors in blood platelets in normal and pathological conditions. Lancet 2: 242-4, 1951.
- 90) Van Creveld S, Paulssen MMP. Isolation and properties of a third clotting factor in blood platelets. Lancet 1: 23-5, 1952.

- 91) Deutsch E, Johnson SA, Seegers WH. Differentiation of certain platelet factor related to blood coagulation. *Cir. Res.* 3: 110-5, 1955.
- 92) Niewarowski S, Walz DA, James P, Rucinski B, Kueppers F. Identification and separation of secreted platelet proteins by isoelectric focusing. Evidence that low-affinity platelet factor 4 is converted to beta-thromboglobulin by limited proteolysis. *Blood* 55, 3: 453-6, 1980.
- 93) Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M. Platelet alfa-granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 53, 4: 604-18, 1979.
- 94) Begg GS, Pepper DS, Chesterman CN, Morgan FJ. Complete covalent structure of human beta-thromboglobulin. *Biochemistry* 17, 9: 1739-44, 1978.
- 95) Guidi GC, Schiavon R. *Biochimica della piastrina*. En: "Lo studio della funzione piastrinica in laboratorio". Menarini Farmaceutici s.a.s. 1 edición. Firenze. 31-50, 1984.
- 96) Zahavi J, Kakkar VV. Beta-thromboglobulin - a specific marker of in-vivo platelet release reaction. *Thromb. Hemostas.* 44: 23-9, 1980.

- 97) Barber AJ, Kaser-Glanzman R, Jakabova M, Luscher EJ. Characterization of a chondroitin-4-sulfate proteoglycan carrier for heparin neutralizing activity (PF 4) released from human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 286: 312-29, 1972.
- 98) Deuel TF, Keim P, Farmer M, Henrikson M. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 6: 2256-8. 1977.
- 99) Moore S, Peper DS, Cash JD. Platelet antiheparin activity: the isolation and characterization of platelet factor 4 released from thrombin aggregated washed human platelets and its dissociation into subunits and the isolation of membrane-bound antiheparin activity. *Biochim. Biophys. Acta* 379: 370-84, 1975.
- 100) Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vitro. *Blood* 57, 2: 199-202, 1981.
- 101) Ireland H, Lane DA, Wolff S, Foadi M. In vivo platelet release in myeloproliferative disorders. *Thromb. Hemostas.* 48: 41-5, 1982.



- 102) Burrows AW, Chaven SI, Hockaday TDR. Plasma thromboglobulin concentrations in diabetes mellitus. Lancet 1: 235-7, 1978.
- 103) Matsuda T, Seki T, Ogawara M, Miura R, Yokouchi M, Murakami M. Comparison between plasma levels of beta-thromboglobulin in various diseases. Thromb. Hemostas. 42: 288-95, 1979.
- 104) Paramo JA, Rocha E. Deep vein thrombosis and related platelet changes after total hip replacement. Hemostasis 15: 398-94, 1985.
- 105) Wadenvik H, Eriksson KA, Safai-Kutti S, Swedberg K, Kutti J. Plasma concentrations of platelet factor 4 in acute myocardial infarction. Scand. J. Haematol. 26: 359-63, 1981.
- 106) Blatter W, Diener R, Haerberli A, Straub PW. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in peripheral vascular disease. Vasa (Suppl. 12): 75-80, 1984.

- 107) Zahavi J, Betteridge DJ, Jones NAG, Galton DJ, Leyton J, Kakkar VV. Beta-thromboglobulin, platelet factor 4 and malondialdehyde formation in hyperlipidemic patients. *Thromb. Hemostas.* 42: 424-9, 1979.
- 108) Kjeldsen SE, Gjesdak K, Eide I, Aakesson I, Amudsen R, Foss OP. Increased beta-thromboglobulin in essential hypertension: interaction between arterial plasma adrenaline, platelet function and blood lipids. *Acta Med. Scand.* 213: 369-73, 1983.
- 109) De Boer AC, Han P, Turpie AGG, Butt R, Zielinski E, Genton E. Plasma and urine beta-thromboglobulin concentration in patients with deep vein thrombosis. *Blood* 58, 4: 693-98, 1981.
- 110) Arocha-Pikango CL, Ojeda A, Lopez G, Garcia L, Linares J. Beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in obstetrical cases. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 64: 115-20, 1985.
- 111) Van Hulsteijn H, Van Es A, Bertina R, Briet E. Plasma beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in renal failure. *Thromb. Res.* 24: 175-80, 1981.

- 112) Taomoto K, Asada M, Kanazawa Y, Matsumoto S. Usfulness of the measurement of plasma beta-thromboglobulin in cerebrovascular disease. *Stroke* 14, 4: 518-24, 1983.
- 113) Mathias JA. Unidades de cuidados especiales. En : "Anestesiología". SALVAT Editores. 3 edición. Barcelona. 324-30, 1983.
- 114) Harper HA, Sheldon GF. Consideraciones metabólicas y nutricionales en cirugía. En : "Diagnóstico y tratamiento quirúrgico". Ed. El Manual Moderno. 1 ed. Madrid. 187-205, 1976
- 115) Rodvien R, Salzman EW. Thrombotic and hemorrhagic problems in surgery. *Thromb. Haemost.* 39: 254-62, 1978.
- 116) Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 162: 67-71, 1962.
- 117) Day HJ, Rao AK. Evaluation of platelet function. *Sem. Hematol.* 23: 89-101, 1986.

- 124) Sue-Ling HM, Johnston D, McMahon MJ, Philips PR, Davies JA. Identificación preoperatoria de los pacientes con alto riesgo de trombosis venosa profunda tras cirugía mayor abdominal electiva. *The Lancet (ed esp)* 9; 4: 237-240, 1986.
- 125) Negus D, Pinto DH, Le Quesme LP, Brown N, Chapman M. I-labeled fibrinogen in the diagnosis of the deep vein thrombosis and its correlation with phlebography. *Br. J. Surg.* 55; 11: 1988.
- 126) Naesh O, Friis JT, Hindberg R, Winther K. Platelet function in surgical stress. *Thromb. Haemostas.* 54; 4: 849-52, 1985.
- 127) O'Brien JR, Nainbt-Luxmoore RC, Larsen AG, Henville J. Platelet aggregation during major operations. *Lancet* 1: 316-22, 1972.
- 128) O'Brien JR, Tulevski VG, Etherington M, Madgwick T, Alkjersig N, Fletcher A. Platelet function studies before and after operation and the effect of postoperative thrombosis. *J. Lab. Clin. Med.* 83:342-54, 1974.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los señores doctores  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. ....  
titulada .....

acordó otorgarle la calificación de Apto cum laude

Sevilla, 14 de Septiembre 1990

El Vocal,

El Presidente

El Vocal,

El Secretario,

El Vocal,

El Doctorado,