



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Estudio de la Función Plaquetaria y Micropartículas Plasmáticas
en Pacientes con Hemofilia A en Tratamiento Profiláctico**

**Dña. Antonia Melero Amor
2017**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio de la función plaquetaria y micropartículas
plasmáticas en pacientes con Hemofilia A en tratamiento
profiláctico

ANTONIA MELERO AMOR

2017

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

A José María Moraleda Jiménez, por su fe en mí.

A Noemí Marín Atucha, por iniciarme en la parcela de la investigación.

A María Juliana Majado Martínez, por sus consejos, sin los cuales no hubiese sido posible este trabajo.

A Faustino García Candel, por estimularme en este campo tan apasionante.

A José Raúl Franco Sandoval, por su paciencia.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AA	Ácido araquidónico
ABC	Área bajo la curva
AD	Autosómico dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AR	Autosómico recesivo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASH	American Society of Hematology
ASPI	Ácido araquidónico
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
Ca ²⁺	Calcio
CD62-p	P-selectina
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CMF	Citometría de flujo
COL	Colágeno tipo I
COL/ADP	Colágeno/adenosin difosfato
COL/EPI	Colágeno/epinefrina
COX	Ciclooxigenasa
CXCL7	Chemokine (C-X-C motif) ligand 7. Isoforma de β tromboglobulina
D	Desconocido
DDVAP	1-ácido- 8-D-arginina vasopresina o desmopresina
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético
EPI	Epinefrina
FA	Fibrilación auricular
FITC	Sotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato
FL	Fosfolípidos
FS	Fosfatidilserina
FT	Factor tisular
FVIII	Factor VIII
FvW	Factor von Willebrand
FXa	Factor X activado
Gp	Glicoproteína
GPRP	Glycyl-L-prolyl-L-arginy-L-proline
HA	Hemofilia A
HB	Hemofilia B
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HCUVA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
IAM	Infarto agudo de miocardio

IC	Índice de correlación de Pearson
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleukina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
ISTH	Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia
K ⁺	Potasio
LPS	Lipopolisacárido
MP	Micropartícula
MPs	Micropartículas
MSA	Multi Sample Agitator, termobloque agitador
Na ⁺	Sodio
ON	Óxido nítrico
Orail	Calcium release-activated calcium channel protein 1
Ox-LDL	Lipoproteína oxidizada
p	Significación estadística (significativa si $p < 0,05$)
P2Y ₁₂	Receptor para el adenosin difosfato
PAC-1	First procaspase activating compound
PAI	Inhibidor del plasminógeno activado
PAR-1	Receptor de la proteasa activada 1
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR	Proteína C reactiva
PDI	Proteína disulfido isomerasa
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PF4	Factor plaquetario 4
PLAQ-LEUCO	Agregados plaqueta-leucocito
PLC	Fosfolipasa C
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRP	Plasmar rico en plaquetas
PSGL-1	P-selectina glicoproteína ligando-1
Rap1GTP	Rap1 guanosintrifosfato
RISTO	Ristocetina
RISTO H	Ristocetina a altas dosis
RISTO L	Ristocetina a bajas dosis
ROS	Especies de oxígeno reactivo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
STIM1	Stromal interaction molecule 1
TEG	Tromboelastograma
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TO	Tiempo de obturación
TP	Tiempo de protrombina

TP	Receptor para el tromboxano A ₂
TRAP	Péptido activador del receptor de trombina
TRAP-6	Péptido-6 que estimula el receptor PAR1 de la trombina
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activada
TxA ₂	Tromboxano A ₂
U	Unidades
UA	Unidades arbitrarias
UKHCDO	The United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation
VCM	Volumen corpuscular medio
VEGF	Factor endotelial vascular
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPM	Volumen plaquetario medio
VWF: Ag	Factor von Willebrand antigénico
VWF: Rco	Factor von Willebrand-cofactor de la ristocetina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA HEMOFILIA.....	2
1.1.1. Definición.....	2
1.1.2. Recuerdo histórico.....	3
1.1.3. Clínica	5
1.1.4. Cascada de la Coagulación.....	6
1.1.5. Diagnóstico	7
1.1.6. Tratamiento	8
1.2. PLAQUETAS	10
1.2.1. Definición y fisiopatología	10
1.2.2. Hemostasia primaria y secundaria	12
1.2.3. Plaquetas y hemofilia	16
1.2.4. Estudio de la hemostasia primaria	18
1.3. MICROPARTÍCULAS	27
1.3.1. Definición y fisiopatología	27
1.3.2. Micropartículas y hemofilia.....	35
1.4. RELEVANCIA.....	36
1.4.1. Modelo tisular de la coagulación	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivo principal	40
2.2. Objetivos secundarios	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Diseño del estudio	42
3.2. Protocolo experimental.....	44
3.3. Parámetros analizados	47
3.3.1. Hemograma	47
3.3.2. Pruebas de coagulación especial.....	49
3.3.3. Función plaquetaria mediante PFA-100	51
3.3.4. Multiplate, agregación plaquetaria por impedancia	52
3.3.5. Chronolog, agregómetro óptico/espectrofotómetro con plasma rico en plaquetas	57
3.3.6. Función plaquetaria mediante citometría de flujo.....	59
3.3.6.1. Medición de la agregación plaquetaria en sangre entera.....	61
3.3.6.2. Determinación de la activación plaquetaria	63
3.3.6.3. Agregados plaqueta-leucocito	64
3.3.6.4. Agregados plaqueta-Factor tisular	66
3.3.7. Análisis de micropartículas procoagulantes mediante citometría de flujo.....	68
3.3.8. Análisis del calcio citosólico en plaquetas mediante citometría de flujo.....	72
3.4 Metodología estadística	75
4. RESULTADOS	76
4.1. Descripción de la población a estudio	77
4.1.1. Clínica hemorrágica	78
4.1.2. Estado mutacional	79
4.1.3. Serología para hepatitis B, hepatitis C y VIH	81

4.1.4. Afectación articular	82
4.1.5 Profilaxis	83
4.1.6 Inhibidor	86
4.1.7. Otras patologías.....	89
4.2. Variables analíticas estudiadas	90
4.2.1. Datos del hemograma	90
4.2.2. Coagulación especial	91
4.2.3. Función plaquetaria mediante PFA-100®	93
4.2.4. Función plaquetaria mediante agregación óptica con plasma rico en plaquetas , Chronolog®	96
4.2.5. Función plaquetaria mediante impedancia con sangre total, Multiplate®	98
4.2.6. Función plaquetaria mediante citometría de flujo.....	101
4.2.7. Estudio de las micropartículas plasmáticas.....	105
4.2.8. Liberación de calcio citoplasmático plaquetario	109
4.2.9. Comparación entre las técnicas de agregación plaquetaria utilizadas en nuestros estudio.....	111
4.2.9.1. Agregación con trombina. Impedancia versus citometría de flujo	111
4.2.9.2. Agregación con trombina. Agregación óptica versus citometría de flujo	111
4.2.9.3. Agregación con trombina. Agregación óptica versus impedancia.	113
4.2.9.4. Agregación con colágeno. Agregación óptica versus impedancia.....	114
4.2.9.5 Agregación con ADP. Agregación óptica versus impedancia	115
4.2.9.6 Agregación con epinefrina. Agregación óptica versus impedancia.....	117
4.2.9.7. Agregación con ASPI. Agregación óptica versus impedancia	117
4.2.9.8. Agregación con ristocetina. Agregación óptica versus impedancia	119
4.2.9.9. Tiempo de obturación versus citometría de flujo	120
4.2.9.10. Tiempo de obturación versus impedancia	120
4.2.9.11. Tiempo de obturación versus agregación óptica	122
5. DISCUSIÓN	123
5.1. Población de estudio.....	124
5.2. Dificultades del proyecto.....	124
5.3. Variables clínicas.....	124
5.4. Variables analíticas	126
5.4.1. Datos del hemograma	126
5.4.2. Coagulación especial	127
5.4.3. Función plaquetaria mediante PFA-100®	128
5.4.4. Función plaquetaria mediante Multiplate®.....	129
5.4.5. Función plaquetaria mediante Chronolog®	130
5.4.6. Agregación y activación plaquetaria mediante citometría de flujo	131
5.4.7. Correlación entre los analizadores utilizados para el análisis de función plaquetaria	134
5.4.8. Estudio de micropartículas plasmáticas	134
5.4.9. Análisis de la movilización de calcio citosólico en plaquetas mediante citometría de flujo.....	137
6. CONCLUSIONES	139
7. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS	141

8. BIBLIOGRAFÍA.....	143
9. ANEXOS.....	154
9.1.ANEXO 1. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica	155
9.2.ANEXO 2. Hoja de recogida de datos clínicos.....	156
9.3.ANEXO 3. Hoja de información y consentimiento informado	157
9.4. ANEXO 4. Biobanco	174
9.5.ANEXO 5. Participantes del proyecto	181

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA HEMOFILIA

1.1.1. Definición

El término hemofilia, cuyo significado es ‘‘amor a la sangre’’, fue creado y publicado en 1828 por Friedrich Hopff(1). Hasta esa fecha habían sido utilizados diferentes apelativos para hacer referencia a esta enfermedad, tales como hemorrea, hematofilia, enfermedad hemorrágica, diátesis hemorrágica hereditaria, etc (2).

La hemofilia fue la primera coagulopatía congénita conocida. Se trata de una enfermedad hereditaria de transmisión recesiva ligada al cromosoma X, es decir, ligada al sexo. Por tanto, las mujeres pueden transmitir la enfermedad pero no padecerla (existen escasos casos a nivel mundial de mujeres hemofílicas por homocigosis o doble heterocigosis en hijas de portadoras y padres hemofílicos o por existencia de otras alteraciones cromosómicas) (3).

Podemos distinguir dos tipos fundamentales: la hemofilia A (HA), que se caracteriza por una déficit de actividad de Factor VIII de la coagulación y la hemofilia B (HB) o enfermedad de Christmas por un déficit Factor IX.

La prevalencia de la hemofilia en los países industrializados es de 13-18/100.000 varones (4). La incidencia de la HA se estima en 1 caso por 5.000 varones nacidos (60% con afectación grave) y en 1/30.000 en el caso de la HB, por lo que la HA es 5-6 veces más frecuente que la HB (5,6).

Aparece en individuos de diferentes razas y grupos étnicos, aunque es rara en chinos e infrecuente en negros.

El primer registro nacional de trastornos hemorrágicos hereditarios fue en 1960 en Reino Unido. The United Kingdom Haemophilia Centre Doctor’s Organisation (UKHCDO) fue creada en 1991 para coordinar a los centros de hemofilia de este país y poseer un registro de ella, herramienta muy útil en enfermedades raras (7).

En 2009 se publicó el primer estudio epidemiológico transversal multicéntrico en España. Se estudiaron 2.400 pacientes con hemofilia, de 51 centros, en el año 2006: 2081 (86.7%) presentaban HA and 319 (13.3%) presentaban HB. La distribución de gravedad de la enfermedad era: 32.3% grave, 16.4% moderada, y 51.3% leve. De los pacientes con hemofilia severa el 45.8% estaban en régimen de tratamiento profiláctico. La media anual de episodios hemorrágicos fue de 4 en pacientes que no estaban en régimen profiláctico y de 1.3 en pacientes que sí. El 30% de los pacientes tenían artropatía hemofílica (en al menos una articulación). La tasa de inhibidor fue detectado en el 10% de HA y en el 6.5% de HB. El 16.8% de los pacientes eran virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

positivos y el 34.8% virus hepatitis C (VHC) positivos. Este estudio sugiere que 1 de cada 7.700 personas padecen esta enfermedad; ratio 6,5 (HA):1 (HB) (7).

1.1.2. Recuerdo histórico

La aparición de la HA se remonta a 65 millones de años atrás, a finales del periodo cretácico, donde se presentó en al menos tres órdenes de mamíferos placentarios: Perissodactyla (Ungulata), Fissipedia (Carnívora) y Anthroidea (Primates), estando descrita más en profundidad en caballos (8), perros (9) y humanos. La tasa de mutación en humanos se estima entre $2.5-4.2 \times 10^{-5}$ (2,10,11).

Una “enfermedad familiar hemorrágica”, probablemente la hemofilia, es descrita en el Talmud babilonio judío (siglo II a.d.C.); siendo la primera referencia existente sobre esta patología. En él se describe su carácter hereditario. De tal modo que, a pesar que la circuncisión era una costumbre religiosa, los rabinos modificaron estos reglamentos para ayudar a estas familias con problemas hemorrágicos; por lo que, un niño que hubiera tenido dos hermanos mayores fallecidos tras sangrado secundario a circuncisión, no debía ser circunciso (12).

En 1911, Bulloch y Fildes publicaron la primera gran monografía sobre la hemofilia en la que se recogían cerca de 1.000 referencias y 234 árboles genealógicos. Así mismo, ponían en evidencia la obligatoriedad del término “portadora obligada” para la transmisión de esta enfermedad (13).

Hasta el siglo XIX se pensaba que el problema de esta enfermedad radicaba en los vasos sanguíneos. No fue hasta finales del siglo XIX cuando se definió la hemofilia como un defecto de la coagulación de la sangre (14).

La difusión del conocimiento de esta enfermedad a nivel mundial se debe principalmente a su relación con las familias reales europeas. A finales del siglo XIX la hemofilia fue conocida como la “Enfermedad Real”, ya que afectó a miembros de las casas reales de Inglaterra, España, Prusia y Rusia (2,14), siendo la Reina Victoria de Inglaterra la primera portadora “real” conocida (2,15). El bisnieto de la Reina Victoria, Alexis, retratado en la figura 1, posiblemente sea el hemofílico más conocido ya que su biografía fue publicada en un libro (16) e historiadores han disputado la contribución de la hemofilia con los conflictos políticos que tuvieron lugar en esa época, como la Revolución Rusa (2,15).



Figura 1. Alexis, a la edad de 10 años. Obsérvese la pierna izquierda doblada, probablemente debido a un hemartros en esa rodilla. Tomado de Ingram GIC, 1976(2).

Bulloch y Fildes, publicaron los árboles genealógicos de las familias reales europeas. Estos escritos están todavía guardados en Library of The Royal Society of Medicine of London (13). Por las características clínicas se pensaba que se trataba de la HA hasta el año 2010, cuando salió publicado un artículo en la revista *Haemophilia* que consideraba que el tipo de hemofilia que había afectado a las casas reales europeas era la HB (17).

En 1935, A.J. Quick, inventó el test que actualmente conocemos como test del tiempo de la protrombina. Este test resultó normal en los pacientes con HA, sin embargo, observaban que el tiempo de coagulación de estos pacientes seguía siendo alargado. En 1940, Quick teorizó que el problema de los pacientes con hemofilia residía en sus plaquetas (18). En 1936 Patek y Stetson descartaron esta teoría (19). Nuevamente en 1973 Walsh et al mostraron diferencias en la reactividad plaquetaria de pacientes con HA correlacionándolos con el grado y severidad hemorrágica (20).

1.1.3. Clínica

La hemofilia representa un defecto en la hemostasia, dando lugar a la aparición de hemorragias. Esta alteración de la hemostasia se produce por déficit de factor VIII en el caso de la HA o de factor IX si hablamos de la HB. Actualmente, según la actividad del factor VIII, se clasifica a los pacientes con hemofilia en 3 grupos de gravedad según la Organización Mundial de la Salud: grave (actividad del factor VIII <1% o 0,01 UI/mL), moderado (1-5%) y leve (6-40%) (21), puesto que la frecuencia e intensidad de las manifestaciones hemorrágicas generalmente guarda correlación con los niveles de FVIII circulantes. Los niveles normales de actividad de factor FVIII son entre 50-200%, siendo el nivel medio de la población de un 100%. Sin embargo, esta relación no es tan simple, existiendo casos donde pacientes con déficit grave de factor presentan clínica hemorrágica moderada y viceversa. Este hecho, nos lleva a pensar en la existencia de otros factores asociados a la causa principal (22). Del mismo modo, la gravedad de las manifestaciones hemorrágicas de algunos hemofílicos tiende a disminuir cuando se alcanza la edad adulta (23).

En la Hemofilia grave se producen hemorragias espontáneas (sin trauma previo o trauma mínimo) o tras intervención quirúrgica. Aproximadamente el 80% de los hemofílicos graves presentan clínica hemorrágica en el primer año de su vida (24). En ausencia de historia familiar, los pacientes pueden debutar en un 2-8% como hemorragia intracraneal y extracraneal en el parto, tras la realización de una circuncisión, con la aparición de equimosis palpables a partir de los 3 meses de edad, hemorragias intrarticulares o en región muscular. En este último caso, se debe vigilar el hematoma del músculo psoas-iliaco por ser una urgencia médica (5). Dentro de las hemorragias viscerales, las más frecuentes son las hematurias, que pueden durar días o semanas. La mayoría de hemorragias en el sistema nervioso central (SNC) se producen antes de los 20 años de edad, suponiendo una mortalidad del 30% en los hemofílicos graves (24).

El aparato locomotor, en particular las articulaciones, son el territorio más afecto en esta enfermedad. Cuando suceden ≥ 3 episodios de hemartros (sangre dentro de la articulación) espontáneos en una misma articulación en un mismo periodo de 6 meses, a esa articulación se le considera articulación diana (25).

Como resultado de los hemartros de repetición, se va generar una artropatía hemofílica, que consiste en un estado de inflamación crónico de la articulación debido a la liberación de hierro en la articulación que a su vez facilitará la llegada de citoquinas y el aumento de la angiogénesis en la misma. Uno de los objetivos principales en el tratamiento de la Hemofilia es evitar la artropatía hemofílica (26,27).

En las formas moderadas los episodios hemorrágicos ocurren tras procedimientos quirúrgicos o traumatismos mínimos y suelen aparecer entre el primer y segundo año de vida (5).

Las formas leves tienen una baja incidencia de sangrados, apareciendo éstos tras

procedimientos quirúrgicos o traumatismos importantes (5).

1.1.4. Cascada de la Coagulación

Fue descrita en 1964 por dos grupos de trabajo, cuyos autores principales Davie y MacFarlane la describían como dos secuencias de reacciones lineales e independientes entre sí que culminaban en una vía final común con la activación del factor X (28).

Se trataba de una “cascada” enzimática (ver figura 2) compuesta por una serie de etapas secuenciales en las que la activación de un factor de coagulación activaba al siguiente. La vía extrínseca (iniciada por el complejo factor tisular (FT)/factor VII) se consideraba la responsable de la generación inicial del factor X activado (factor Xa), mientras que la vía intrínseca (iniciada por el factor XII) llevaba a la amplificación de la generación del factor Xa. El factor Xa desempeñaba un papel central en la cascada de coagulación debido a que ocupa un punto en el que convergen la vía intrínseca y la extrínseca. La activación de cualquiera de las dos vías resultaba en la producción de factor X, que junto con el factor V formaban el complejo protrombinasa, el cual convertía la protrombina en trombina y la posterior formación de fibrina (28).

El modelo, fue muy útil en la práctica habitual clínica y de laboratorio, ya que describía de forma organizada in vitro qué factores estaban implicados en la alteración de los tiempos de coagulación: TP (tiempo de protrombina) y TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activada), que correspondían a las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación respectivamente (28). Sin embargo, este modelo no es válido para explicar los mecanismos que llevan a la hemostasia in vivo ya que no considera entre otras cosas, la interacción del sistema con las células que participan en la coagulación y pronto se observó que in vivo la vía extrínseca sería la de mayor relevancia fisiopatológica.

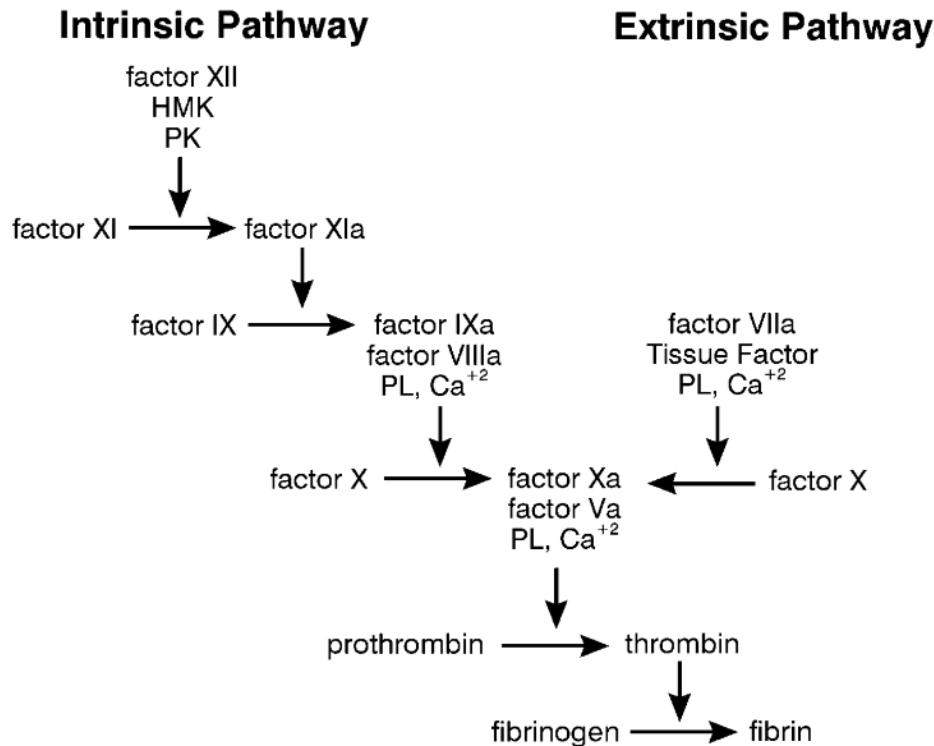


Figura 2. Modelo de la cascada de la coagulación. La vía intrínseca y la extrínseca quedan reflejadas en los test de laboratorio TTPA y TP, respectivamente. Tomado de Hoffman M. 2001 (28).

1.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de hemofilia comienza con una extensa revisión de la historia familiar. En la mayoría de los casos, el paciente tiene antecedentes familiares de diátesis hemorrágica, pero aproximadamente un tercio de los pacientes con hemofilia no tiene historia familiar de sangrado (esto último podría explicarse por la aparición de una mutación espontánea, que ocurre en aproximadamente el 25% de los casos de hemofilia A, o por mosaicismo germinal) (25).

En un paciente que presenta tendencia al sangrado de origen desconocido deben realizarse inicialmente cuatro test diagnósticos: recuento de plaquetas, TP, TTPA y fibrinógeno. Si uno de los dos tiempos de coagulación está alterado, debe estudiarse individualmente el déficit del posible factor. En un paciente con hemofilia grave y sin inhibidor, encontraremos una cifra de plaquetas normal, un TP normal y una prolongación del TTPA, que será normalizado o corregido cuando mezclemos con plasma de un sujeto sano (25).

En el caso de la Hemofilia A, existen tres métodos para medir su actividad coagulante, los métodos coagulométricos de una etapa y de dos etapas y los ensayos cromogénicos. El método cromogénico es más sensible especialmente para detectar las formas graves,

además de que es el método recomendado por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) (25).

1.1.6. Tratamiento

A lo largo de la historia se han probado diferentes tipos de tratamientos para esta enfermedad: inhalación de oxígeno, citrato de sodio, suero antidiftérica, adrenalina, hormonas femeninas, ácido oxálico, terapia vitamínica, todos ellos sin ser efectivos. En el caso de la aplicación tópica de veneno de víbora de Russell, en 1934 (29) se objetivó que el sangrado de estos pacientes cesaba rápidamente, por lo que fue muy usado. Así mismo, también se observó la mejoría transitoria tras la transfusión de sangre de personas sanas (2).

El manejo moderno de la hemofilia comenzó en 1950 con el uso de concentrados plasmáticos. Antes de la aparición de los factores como tratamiento sustitutivo, la hemorragia era responsable de casi el 100% de las muertes en pacientes hemofílicos. Tras la instauración de este tratamiento, se redujo notablemente la mortalidad secundaria a procesos hemorrágicos, sin embargo, tomaron relevancia los fallecimientos por causa infecciosa (VIH y virus hepatotropos B (VHB) y C). Así, en 1980 el 70% de los pacientes con hemofilia grave estaban infectados por VIH. Comorbilidades de estas infecciones (cirrosis, SIDA) y de sus tratamientos prevalecen aún hoy en pacientes hemofílicos (14); además estas infecciones aumentan el riesgo de padecer ciertos tipos de tumores con mayor frecuencia que la población sana (sarcoma de Káposi hasta 200 veces más frecuente, linfoma no hodgkin (30) y carcinoma hepatocelular hasta 30 veces más frecuente (31)).

La clonación de los genes que codifican el factor VIII y el IX hizo posible la búsqueda de posibles mutaciones en esos genes en pacientes con hemofilia (14). Este proceso fue posible gracias al uso de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (32), y así, en 1984 se identificó el gen que codifica al factor VIII, localizado en la porción telomérica distal del brazo largo del cromosoma X, en la banda Xq28 (33). La inversión del intron 22 es la alteración genética más frecuente descrita en la HA hasta el momento, de tal modo que, si analizáramos familias con HA, detectaríamos que el 45% de ellas presenta esta inversión (34).

Gracias a estos avances y debido a los problemas de infecciones, en 1990 se comenzaron a usar factores recombinantes como tratamiento sustitutivo para la hemofilia (14,35,36), con excelente correlación analítica tras la infusión de estos factores; describiéndose el pico máximo de factor VIII tras administración de factor entre los 10-60 minutos (37). En 2001, el 60% de pacientes con HA grave en Estados Unidos y Reino Unido usaban factores recombinantes (14).

Existen 2 tipos de tratamiento en pacientes hemofílicos: a demanda (se administra cuando paciente presenta una hemorragia) y profiláctico (cuyo objetivo es reducir el número de episodios hemorrágicos). Lógicamente, el tratamiento profiláctico está indicado a

pacientes con alto riesgo de sangrado debido a déficit importante de factor. Hay 3 tipos de tratamientos profilácticos: profilaxis primaria (pacientes ≤ 3 años y con un único episodio de sangrado importante), profilaxis secundaria (cuando han ocurrido ≥ 2 episodios de hemartros y sin daño articular establecido), profilaxis terciaria (existe daño articular establecido objetivado por prueba de imagen, sin embargo, se administra factor para disminuir la comorbilidad de la articulación y del paciente). Se han descrito 3 regímenes respecto a la dosificación y frecuencia de administración del factor VIII semanal a los pacientes: el sueco, el holandés y el canadiense, siendo el primero el que mayor dosis de FVIII administra; sin embargo, en cada país se usa un régimen diferente orientado por los anteriores. Lo ideal y la tendencia actual es prescribir una profilaxis individualizada a cada paciente, teniendo en cuenta otras comorbilidades, la farmacocinética del factor VIII y sobre todo el estilo de vida del paciente (25).

La aparición de inhibidores frente al tratamiento con factores recombinantes ocurre en un 20-30% de pacientes con HA grave y un 3% en el caso de HB severa (38). Se trata de un aloanticuerpo que aparece tras repetidas exposiciones a tratamiento con concentrado de factor deficitario en pacientes hemofílicos. Supone una complicación importante, puesto que la dosis de factor que habitualmente se administra ya no es efectiva, y son necesarios otros tratamientos mientras que el título de inhibidor desaparece. Ocurre con mayor incidencia en el caso de pacientes con inversión del intron 22, largas delecciones y mutaciones sin sentido (39). Sin embargo, la explicación de su aparición a día de hoy sigue siendo un enigma y existen así muchas teorías posibles, a parte de la genética, que explican su desarrollo (como el uso del factor VIII recombinante en edad temprana, inmunidad, infecciones, período vacunación, etc.) (38,39). Las opciones de tratamiento de los episodios hemorrágicos en pacientes con hemofilia e inhibidores incluyen el conocido como concentrado de complejo protrombínico activado que presenta los factores VII, IX y X, reduciendo un 50-60% los sangrados (40) y el factor VII recombinante activado, que reduce un 75% los sangrados (14).

Se ha demostrado la presencia de ARNm del factor VIII en diversos órganos tales como bazo, páncreas y riñón. Sin embargo, dado que las células sinusoidales hepáticas son las principales productoras de factor VIII, en 1987 se publicaron 4 casos de pacientes con HA severa que recibieron un trasplante de hígado. Estos pacientes presentaban infecciones por virus hepatotropos y algunos además VIH. Si bien los que sobrevivieron al trasplante presentaban una HA moderada, el trasplante conllevó complicaciones asociadas (41).

El futuro que se desea en la hemofilia, como en cualquier otra enfermedad, es su curación. Desde el año 2000 se están realizando ensayos de terapia génica, usando virus (42) como vectores o células (fibroblastos) (43) del propio paciente que permitan aumentar la cantidad de factor deficitario en sangre. Sin embargo, de momento, los resultados han sido transitorios y con algunos efectos adversos relacionados en el caso de la transferencia del virus. Actualmente, se está investigando el posible uso de las células mesenquimales (44).

Como hemos dicho anteriormente, la actividad residual del FVIII está relacionada de manera inversa con el fenotipo hemorrágico, es decir, paciente con mayor déficit de FVIII presentará mayor tendencia al sangrado (21). Sin embargo, existen pacientes con HA severa que expresan un fenotipo hemorrágico moderado o leve, representando éstos aproximadamente un 10% (22,45). De este modo en la práctica clínica se han usado por algunos grupos los términos ‘‘ HA grave con fenotipo grave’’, ‘‘HA grave con fenotipo moderado’’ o ‘‘HA grave con fenotipo leve’’ para identificar a estos pacientes. Ésto hace pensar en la presencia de otros factores diferentes a la cantidad de factor VIII que predispongan al fenotipo hemorrágico. Buscando esos factores protrombóticos, se han realizado diferentes estudios determinando cambios en el gen del factor V que producen la mutación factor V Leiden, el genotipo y actividad fibrinolítica y la vida media del factor VIII (46,47). Estos estudios mostraron controversias en los resultados ya que eran pequeños y con diferentes diseños. En la mayor parte de los pacientes etiquetados como ‘‘HA grave con fenotipo leve’’ no se identificaron estos factores en proporción relevante o significativa para afirmar que predispusiesen a un fenotipo menos hemorrágico (48,49), por lo que se postula que deben existir otros factores que influyan en éste. Se han estudiado **las plaquetas y micropartículas** como posibles factores moduladores del fenotipo hemorrágico y a continuación nos centraremos en ellas.

1.2. PLAQUETAS

1.2.1. Definición y fisiopatología

Las características de las plaquetas (forma, contenido de sus gránulos, alta densidad de receptores de adhesión, y su habilidad para generar trombina) están destinadas a formar un coágulo estable bajo condiciones de alto flujo (50).

La contribución de las plaquetas en la hemostasia es diferente en arterias y en venas. En las venas, al tratarse de un sistema de bajo flujo, que permite la acumulación de factores de coagulación activados y la generación local de trombina, la función plaquetar es menos prominente, de hecho el componente celular principal del trombo venoso son los eritrocitos. En el caso de las arterias, la función plaquetar es fundamental, ya que al tratarse de un sistema de alto flujo se produce un lavado continuo de factores de coagulación. Las plaquetas primero taponan la herida y proporcionan una superficie donde la trombina puede generar fibrina. Además, las células endoteliales ayudan al reclutamiento de factores de coagulación y la liberación de prostaglandina I₂, óxido nítrico (ON) y proteína C (los cuales inhiben la formación de trombina y permiten la actuación de los factores V y VIIIa de la coagulación) (50).

La formación patológica de un trombo arterial ocurre cuando existe una enfermedad ó es causa 2ª de un fármaco donde se produce una activación plaquetaria injustificada, produciendo una acumulación de plaquetas en un lugar donde no se precisa. En general,

las plaquetas se activan mediante agonistas cuyos receptores se expresan en la superficie de las plaquetas (50).

Las plaquetas son las más pequeñas y las segundas más numerosas de los elementos formes que circulan en la sangre, representando un recuento en límites de normalidad de $150-400 \times 10^9$ plaquetas/L. Estos fragmentos celulares proceden de los megacariocitos (presentes en la médula ósea), que liberan 10^{11} plaquetas al día al torrente sanguíneo (51). Las plaquetas permanecen poco tiempo (10 días) en el torrente sanguíneo debido a la inexistencia de núcleo (52).

Se han descrito defectos plaquetarios hereditarios relacionados con la alteración de determinados genes (51). Ver figura 3.

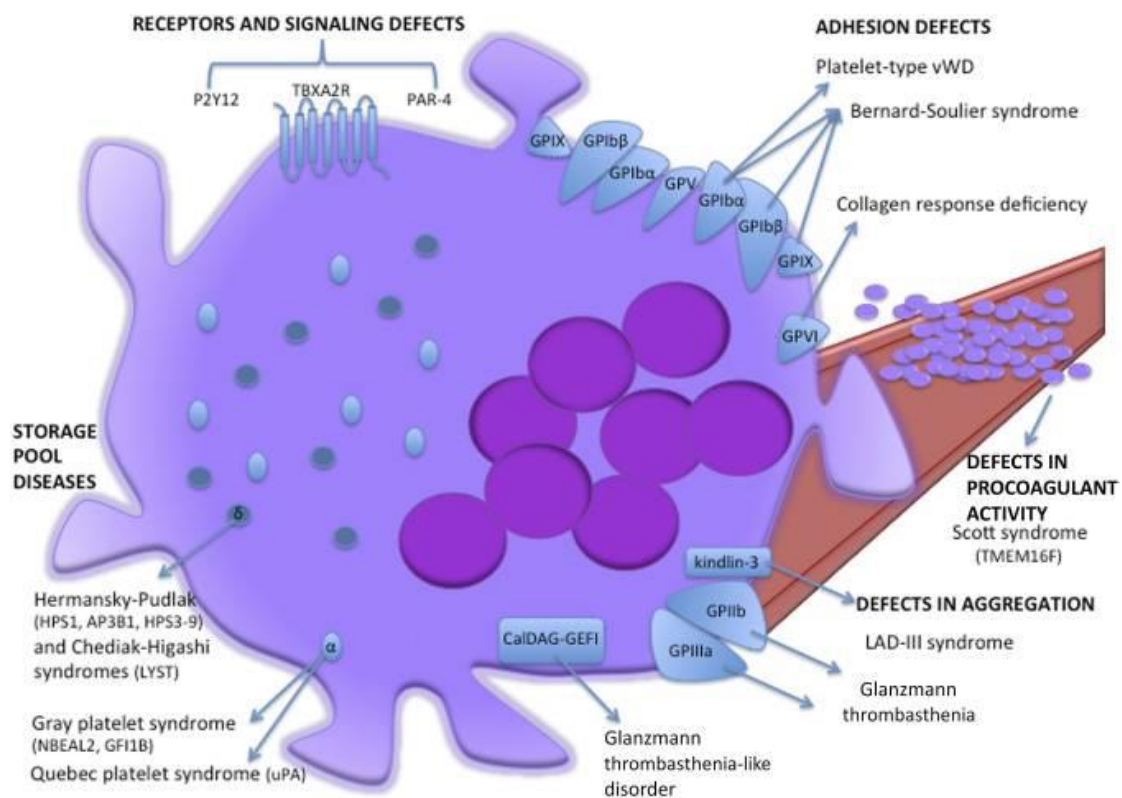


Figura 3. Esquema de proteínas mutadas en trastornos hereditarios plaquetarios. Tomado de Bianchi E. 2016 (51).

Tienen una morfología de disco aplanado ($2-4 \times 0.5 \mu\text{m}$). Ésto junto a su pequeño tamaño le proporciona la capacidad de evaluar constantemente la integridad de los vasos, ya que pueden atravesar la pared de los vasos. Cuando un vaso es dañado, las plaquetas llevan a cabo una serie de procesos que son: adhesión, activación, agregación, generación de sustancias procoagulantes y retracción del coágulo. Todo esto da lugar a un coágulo que rápidamente ocluye el sitio del vaso dañado, evitando pérdida de sangre. Posteriormente este coágulo se disolverá cuando el tejido dañado se hay restablecido, produciéndose la cicatrización de la herida (52).

Las plaquetas expresan al menos 10 diferentes proteínas G, con diferentes funciones durante su activación. Se está investigando el papel de la familia de proteínas G reguladoras de señales que inhibirían la función de éstas.

Dada la complejidad de este proceso normal de función plaquetaria, no es de extrañar que muchos defectos adquiridos o hereditarios durante este proceso produzcan disfunción plaquetaria aumentando así el riesgo de sangrado.

1.2.2. Hemostasia primaria y secundaria

Es preciso distinguir (ver figura 4):

- Hemostasia primaria: es la primera en actuar como su nombre indica y corresponde al compartimento celular donde están implicadas las plaquetas. La clínica de una alteración a este nivel correspondería a sangrados cutáneo-mucosos.
- Hemostasia secundaria: se trata del compartimento plasmático que implicaría a los factores de la coagulación. Los pacientes que presentan afectada este tipo de hemostasia presentan hematomas y hemartros.

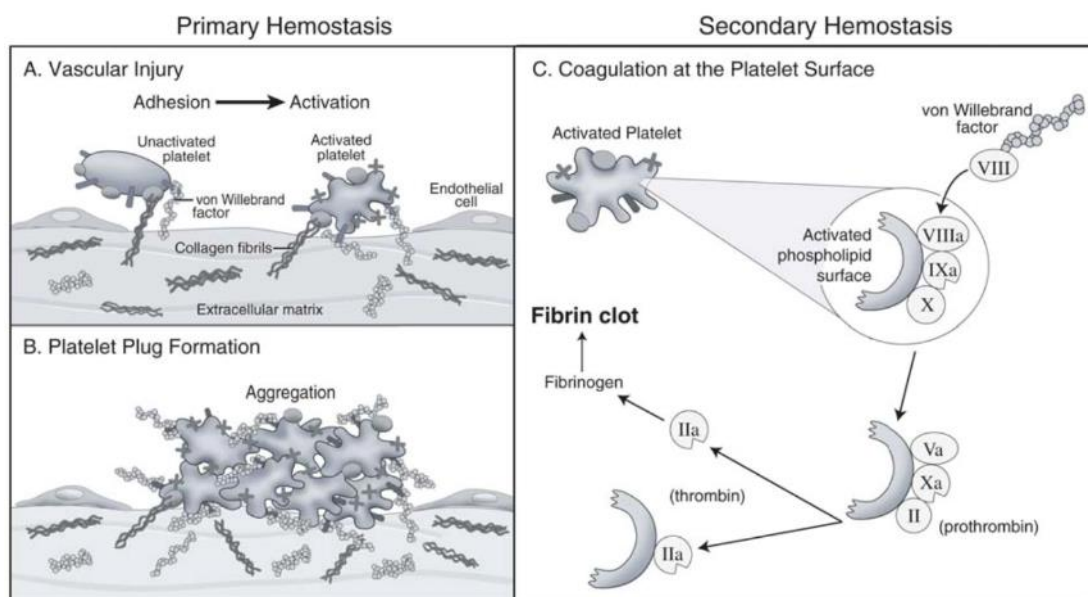


Figura 4. Hemostasia primaria y secundaria. Tomado de Yee DL., 2006 (53). A) adhesión y activación plaquetaria tras la lesión vascular. B) Formación del tapón plaquetario. C) Activación de la cascada de la coagulación, con la formación final del coágulo de fibrina.

Sin embargo, aunque estos 2 conceptos ayuden sobre todo a nivel de realizar los estudios de laboratorio, ambos procesos son muy interactivos. Las plaquetas son esenciales para dirigir el anclaje de los factores de la coagulación, ya que las plaquetas activadas y los fosfolípidos en superficie facilitan la generación de trombina, pero al mismo tiempo la trombina es uno de los más potentes estimuladores de las plaquetas (54).

Procesos que corresponde a la hemostasia 1ª tras la injuria de la pared vascular:

1. Exposición de la matriz subendotelial del vaso dañado, representada en su mayor parte por el colágeno. Ver figura 5.
2. Adhesión plaquetaria a la pared vascular. Ésta se inicia gracias al factor von Willebrand (FvW) que une o hace de puente de unión con su dominio A1 entre el colágeno y el complejo multiproteico GP Ib/IX/V (GP Ib será la encargada de la unión con dominio A1) de la superficie de la membrana plaquetaria. Este complejo multiproteico GP Ib/IX/V es ayudado por los hematíes que facilitan el contacto entre las plaquetas y la pared vascular, así como, aportando adenosin difosfato (ADP). El síndrome de Bernad-Soulier consiste en el déficit de la Gp Ib, impidiendo así la adhesión plaquetaria a la pared de los vasos. Ver figura 5.

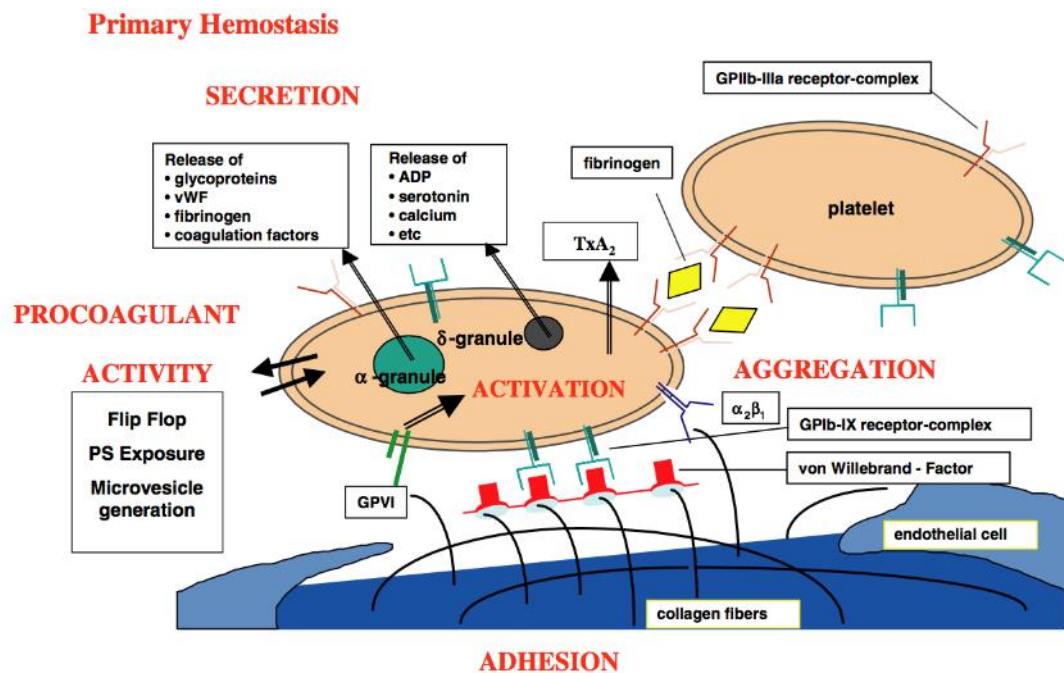


Figura 5. Papel de las plaquetas en la hemostasia primaria. Tomado de Harrisol P. and Keeling D. 2012 (52).

In vitro, se ha observado que en la activación plaquetaria este complejo está disminuido en la superficie plaquetaria, estando distribuido dentro del sistema canalicular plaquetario; podría guardar relación con la entrada de Ca^{2+} . En sentido opuesto, GPIIb/IIIa estarían aumentadas sobre la superficie plaquetaria (55).

3. Activación plaquetaria. Es un proceso complejo, donde se entremezclan los pasos. Ver figura 6.

- 3.1. Agregación plaquetaria. Se inicia cuando el colágeno contacta con la GP VI de la plaqueta, esto genera la cadena de acontecimientos de otros agonistas.

Se produce la activación de la fosfolipasa C (PLC) mediante diferentes agonistas (trombina, ADP, tromboxano A₂ (TxA₂) que activan PLC β a través de Gq como intermediario y colágeno que activa PLC γ a través de la proteína tirosinkinasa GP VI.

Los receptores de éstos en la plaqueta son PAR1 (receptor de la proteasa activada 1, para la trombina), P2Y₁₂ (receptor para el ADP), TP (receptor para el TxA₂).

Esta activación de PLC hidroliza la membrana del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, produciendo inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y segundos mensajeros necesarios para liberar calcio citosólico, llevando a la activación de integrinas con diferentes vías de actuación:

- CalDAG-GEF
- Rap1-GTP, que activa a talin.
- Proteínas que interaccionan directamente con el dominio citosólico (kindlin y talin).

La activación de talin, el cual se une al dominio α IIb β 3 de receptores GPIIb/IIIa que se encuentran en la membrana plaquetaria, produciendo un cambio conformacional en esta proteína que permite la unión de su extremo libre con el fibrinógeno. La unión bivalente con el fibrinógeno hace posible que las plaquetas puedan unirse a otras, es decir, que facilita la agregación de plaquetas (unión de plaquetas entre sí).

Mutaciones en la proteína GPIIb/IIIa provocan un déficit de agregación dando lugar a enfermedades como la trombastenia de Glanzmann, donde las plaquetas son incapaces de formar agregados estables para mantener la hemostasia.

El nivel de α IIb β 3 es superior cuando las plaquetas esta activadas (80.000/células), con respecto al estado basal (50.000/células).

3.2. Degranulación plaquetaria y liberación de sustancias como el TxA₂ y de microvesículas/gránulos. El TxA₂ procede de la acción de la enzima ciclooxygenasa (COX) sobre el ácido araquidónico (AA), el cual es liberado de la membrana fosfolipídica plaquetaria (la función de la COX está abolida en pacientes que toman aspirina u otros antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)). De los δ -gránulos se libera ADP, serotonina y calcio; y de los α -gránulos, GP (P-selectina, GMP-33, GPIIb/IIIa), FvW, fibrinógeno y factores de coagulación. Se produce la exposición de estas sustancias y también de los fosfolípidos (FL) en la superficie de la membrana plaquetaria. También se ha sugerido que los α -gránulos tienen además algunos receptores que también están presentes en la membrana plasmática (CD9, PECAM-1(CD31), GPIV (CD36) y pequeñas cantidades de GPIb/IX/V (55).

3.3. Liberación de Ca²⁺ que ocurre durante la activación plaquetaria, se piensa que sucede en 2 pasos:

- i. Liberación de gránulos de Ca²⁺ del sistema tubular intracelular provocado por el IP₃. Este proceso se realiza gracias a la proteína STIM1.
- ii. Entrada de Ca²⁺ de fuera de la célula a través de la membrana plasmática. Este proceso se realiza gracias a la proteína Orai1. Ver figura 6.

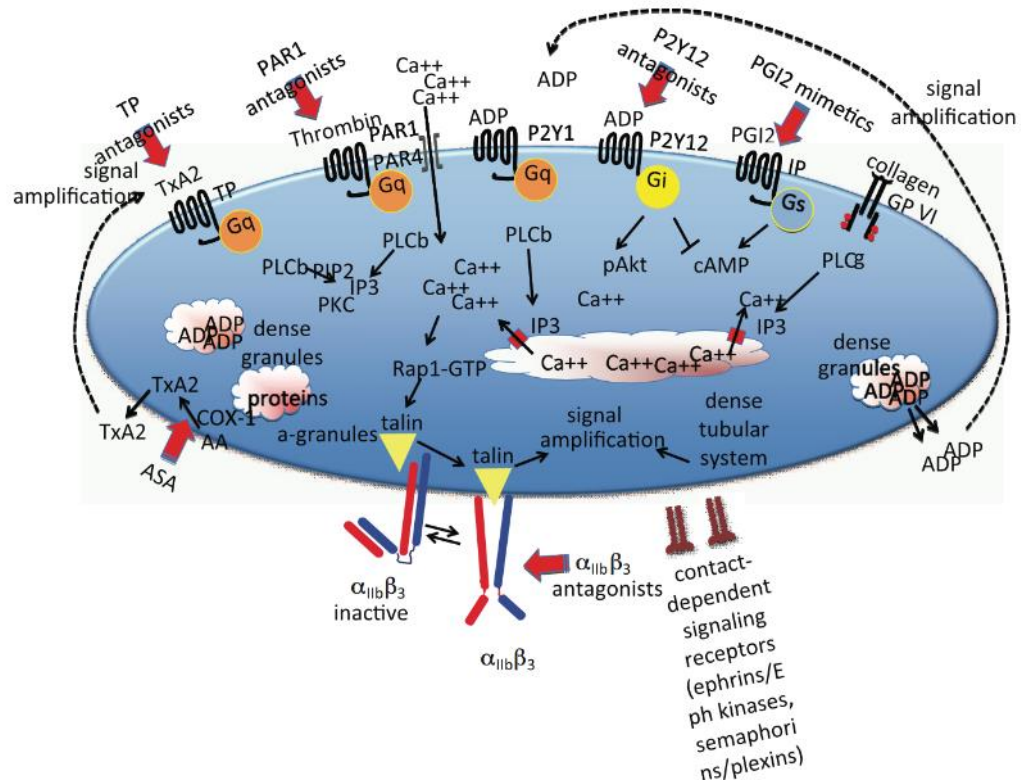


Figura 6. Dianas celulares que ayudan a la activación plaquetaria. Tomado de Brass L. 2010 (50).

4. Estabilización del coágulo. Se produce la amplificación de señales (mediante ligandos y receptores de proteínas G) que permiten un coágulo plaquetario estable. Estas señales se producen a través de integrinas y receptores cuyos ligandos están localizados en la superficie de plaquetas adyacentes. El resultado es la generación de trombina y una malla de fibrina reticulada embebida por plaquetas. La generación local de trombina secundaria a la activación plaquetaria permite una superficie plaquetaria provista ahora de FS (fosfatidilserina) sobre la cual los factores de la coagulación pueden unirse. Durante el proceso las plaquetas facilitan la emigración de leucocitos alrededor del tejido en cuestión, así como, de otros mediadores inflamatorios que ayudan a la cicatrización de la herida (50,52). Ver figura 7.

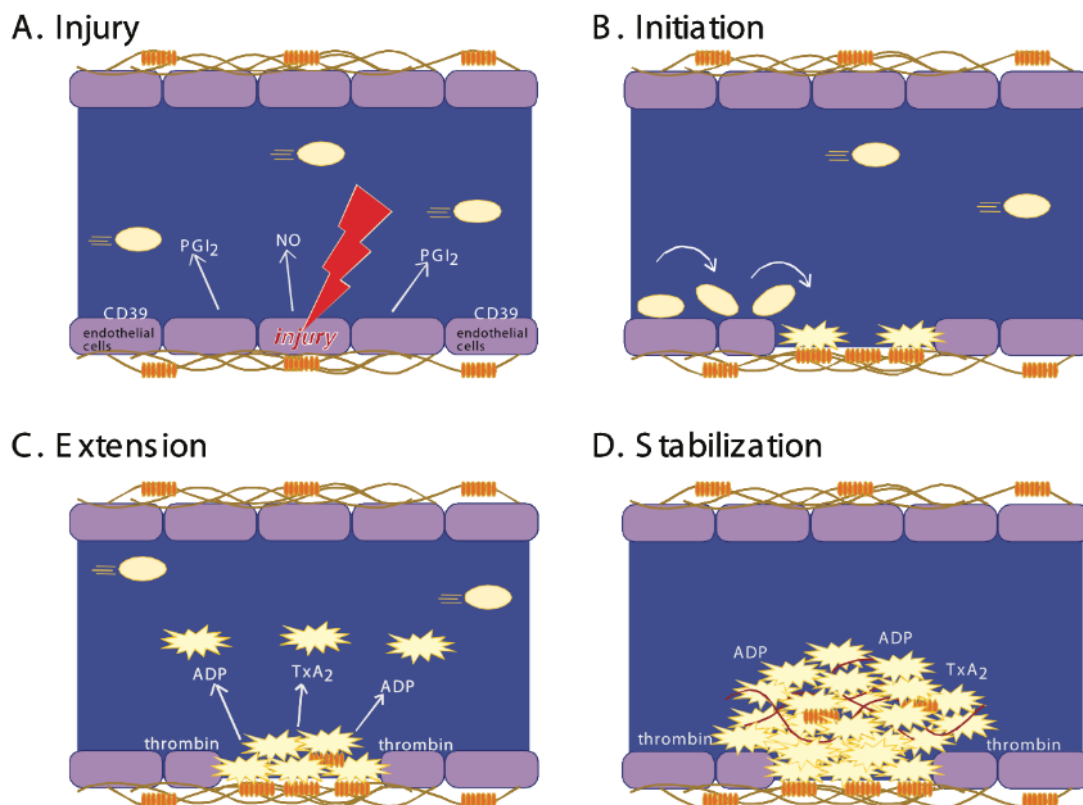


Figura 7. Fases de formación del trombo plaquetario. Tomado de Brass L. 2010 (50).

1.2.3. Plaquetas y hemofilia

Numerosos estudios han investigado la relación entre el aumento de la actividad plaquetaria y el mayor riesgo trombótico (56,57). Sin embargo, en el caso de riesgo hemorrágico, pocos estudios se han realizado al respecto (exceptuando, obviamente, los estudios relacionados con desórdenes de la hemostasia 1ª) (51). Se ha estudiado la relación entre diferencias genéticas y polimorfismos (en las subunidades del receptor de adhesión α (2), αIIb) y GPVI) con diferente grado de fenotipo hemorrágico en pacientes con enfermedad de von Willebrand tipo 1 (58), así como en la enfermedad de Glanzmann (59), pero no en el caso de la hemofilia (53). A pesar de ser escasos los artículos que relacionan hemostasia primaria con hemofilia, este interés comenzó a partir de 1936 (18,19). En 1973, Walsh et al. fue el primero en publicar que las plaquetas se encontraban en un estado activado en pacientes con HA grave y un fenotipo hemorrágico leve (20). Hasta 30 años después de este artículo no aparecieron artículos relacionados.

Entre los escasos estudios existentes sobre el estado de activación plaquetaria en pacientes con HA, unos describen un estado de activación de la hemostasia 1ª al correlacionar la mayor expresión de P-selectina en la membrana plaquetaria con niveles bajos de FVIII basales en pacientes con HA severa, así como, con menor consumo de FVIII intravenoso (60). Sin embargo, en un estudio posterior del mismo grupo holandés en 2014, estudiaron

a 33 pacientes con HA grave (muestra de periodo lavado, 72h sin factor VIII) de diferente fenotipo hemorrágico (según la frecuencia de sangrado articular, edad del primer sangrado, artropatía (score de Petterson) e intensidad de tratamiento/consumo de factor VIII) y concluyeron que no existían diferencias en la expresión de P-selectina según el fenotipo clínico de los pacientes y tampoco se relacionaba con el consumo medio de factor VIII anual de estos pacientes(61).

En un estudio pequeño (8 pacientes con HA grave) se observó el descenso de factor von Willebrand (FvW) y ADAMTS-13 a los 15 minutos de la infusión de 50 UI FVIII/Kg antes de una cirugía programada en pacientes con HA mayores de 18 años sin antecedentes de enfermedad cardiovascular (IAM, FA), sin embargo, a los 60 minutos volvían a sus niveles originales. Las plaquetas activadas (que expresan P-selectina), la media de P-selectina expresada en plaquetas y la expresión de CXCL7 (proteína liberada cuando se produce la activación plaquetaria) disminuyeron con significación estadística tras 15 y 60 minutos de FVIII respecto a sus valores basales. No se detectaron modificaciones en los marcadores inflamatorios (PCR, TNF- α , IL-6, IL-8), tampoco se observó diferencia respecto al volumen plaquetario medio (MPV). Se concluyó que una sola infusión de factor VIII en pacientes con HA modifica la hemostasia 1ª (FvW, ADAMTS-13 y activación plaquetaria), posiblemente como consecuencia de la unión del factor VIII con el FvW (como parte del mecanismo fisiológico habitual), influyendo en su aclaramiento así como en el de las plaquetas secundariamente(62). Factor VIII y plaquetas actúan como cofactores en la proteólisis del FvW a través del ADAMTS13 en condiciones fisiológicas(63).

Las plaquetas suponen el primer paso de la cadena cuyo fin es la formación de trombina. En pacientes con hemofilia grave se ha observado, en estudios con plasma rico en plaquetas, un mayor efecto plaquetario sobre la generación de trombina con niveles bajos de factor(64), lo que podría sugerir un papel modulador en pacientes con hemofilia grave (53). Por otra parte, se han observado resultados opuestos en cuanto a la correlación entre fenotipo hemorrágico grave y la generación de trombina(65,66).

Se postula, que el análisis de la generación de trombina mediante el tromboelastograma podría ser útil para valorar la tendencia al sangrado en pacientes con HA y ayudar a adaptar el tratamiento profiláctico (junto con los niveles de FVIII)(65,66).

En 2011 se realizó un estudio en 20 pacientes con HA (grave, moderada y leve) usando trombografía en PRP y PPP, se observó mayor generación de trombina en pacientes con factor VIII <5% y con presencia de plaquetas (PRP). Se concluyó que la variabilidad de la formación de la trombina está parcialmente relacionada con cantidad de FVIII en plasma y principalmente con la capacidad procoagulante plaquetaria(67). En 2013, Jensen et al (54), encuentran que la generación de trombina puede afectar a la función plaquetaria. Elabora un posible modelo de estudio con el fin de estudiar la hemostasia global con 10 pacientes con HA grave y 10 controles sanos mediante un tromboelastograma. Los experimentos mostraron que la segunda curva observada aproximadamente a los 15 minutos del inicio de la agregación plaquetaria, y que

correspondía a la formación de trombina, no se observaba en pacientes con HA. Ésto coincidía con la baja liberación de PF4. Los resultados sugerían que la cantidad de trombina existente en paciente con HA era insuficiente para llevar a cabo una hemostasia 1ª adecuada.

Con todo ello, podríamos decir, que la trombina es un potente activador de las plaquetas, pero no es el único. Tal y como he mencionado anteriormente, se trata de un proceso interactivo, donde todos los procesos están interrelacionados.

En futuros estudios de actividad plaquetaria, sería interesante estudiar el genotipo plaquetario (61).

1.2.4. Estudio de la hemostasia primaria

Es un proceso en ocasiones complejo en el que se requieren varias técnicas de laboratorio, así como una exhaustiva historia clínica.

1. Hª clínica y familiar exhaustiva.

Es preciso preguntar por la toma de fármacos y existencia de otras patologías. Así mismo, incidir en la localización y cuantía de los episodios de sangrado (68).

Se han utilizado diferentes cuestionarios (no estandarizados a nivel mundial) en varios estudios para determinar el grado de severidad hemorrágica de los pacientes (69,70).

2. Exploración física. Buscando petequias y hematomas (68).

3. Hemograma, preciso para determinar el recuento plaquetario.

4. Tiempos de protrombina (TP) y de tromboplastina parcial activada (TTPA) como primer escalón de estudio de la hemostasia 2ª (68).

5. Tiempo de sangría. Para estudiar la hemostasia 1ª. Su uso es cuestionable pues es una técnica invasiva, difícilmente reproducible (los resultados de este test son muy operador dependiente) y con una sensibilidad muy baja para diferenciar entre distintos tipos de defectos de la hemostasia 1ª, de hecho el tiempo de sangrado puede ser similar en la enfermedad de von Willebrand y en los defectos de la función plaquetaria (68).

6. PFA-100. Este método está siendo utilizado por muchos centros como primer paso del estudio de hemostasia primaria. Simula este proceso mediante una membrana capilar y biológicamente activa con los agonistas colágeno/ADP y colágeno/EPI, y lo que mide es el tiempo de obturación (TO). Éste se encontrará alargado en algunas enfermedades importantes de la hemostasia 1ª como son el síndrome de Bernard-Soulier, la trombostenia de Glanzmann y en la enfermedad de von Willebrand. En otras trombocitopatías puede dar falsos negativos (71).

Se trata de una técnica que tiene como ventajas respecto al tiempo de sangrado, que es simple, no invasiva, reproducible, no requiere de un personal especializado y es más sensible para detectar defectos de la hemostasia 1ª(68).

Según la revisión de 2006 (de todos los trabajos publicados en inglés y registrados en MEDLINE hasta la fecha) del subcomité de fisiología plaquetaria de la ISTH acerca de este test, las recomendaciones son:

- ✓ Para el diagnóstico de enfermedades plaquetarias este método es opcional, ya que debido a su baja sensibilidad y especificidad no puede considerarse como una herramienta única para realizar el cribado de pacientes con sospecha de alteración de la hemostasia 1ª.
- ✓ El resultado anómalo, es decir el tiempo de obturación alargado no es patognomónico de una enfermedad de la hemostasia 1ª en concreto, lo que indica que deben realizarse otras pruebas para afinar el diagnóstico.
- ✓ Un resultado normal puede ayudar a excluir una alteración severa plaquetaria (enfermedad de Bernard-Soulier, trombastenia de Glanzmann, enfermedad de von Willebrand moderada-severa). Sin embargo, si existe alta sospecha clínica, la normalidad de este resultado no excluye el diagnóstico.
- ✓ Su papel en la monitorización de respuesta a fármacos debe ser usado únicamente en estudios de investigación y en ensayos clínicos (71).

Para interpretar correctamente los resultados mediante este método hay que tener en cuenta que:

- Es muy sensible/dependiente del factor von Willebrand (FvW), de hecho se observa correlación inversa entre el TO y la cantidad de FvW en plasma.
- Individuos del grupo sanguíneo 0 presentan un TO más alargado que otros de diferente grupo sanguíneo, debido a la menor cantidad de FvW en plasma de personas del grupo 0.
- Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia del tiempo de obturación. El coeficiente de variación debe estar comprendido entre 6-13%.
- La muestra de sangre debe analizarse en ≤ 4 horas desde su extracción.
- El TO de COL/EPI es muy sensible:
 - Se alarga si se ha tomado aspirina o si se ha consumido coca-cola, chocolate o vino (comidas ricas en flavonoides).
 - Se acorta si la muestra es analizada por la mañana.

- TO estará prolongado si el recuento plaquetario o el hematocrito están disminuidos.
 - Con plaquetas <100.000, el TO puede estar alargado; plaquetas <50.000, el TO estará alargado; plaquetas <10.000, no detectará agregado plaquetario.
 - Con hematocrito <25%, el TO estará alargado. Si hematocrito < 10%, no se detectará agregado plaquetario. Se ha observado en pacientes con uremia y cirrosis hepática en relación probable con la anemia.
- El TO estará acortado cuando existan muchos receptores de colágeno plaquetarios ($\alpha 2\beta 1$ y GP VI).
- Edad: no hay diferencias entre niños y adultos. Sin embargo, en neonatos estará acortado (puesto que tienen un hematocrito mayor y unos mayores niveles de FvW).
- Sexo: no hay diferencias entre hombres y mujeres. Sin embargo, en el caso de varones mayores pueden tener el TO levemente acortado (71).

Hay que tener en cuenta que los datos de los resultados del TO en enfermedades de la hemostasia 1ª han sido obtenidos de estudios pequeños (con menos de 50 individuos por estudio) y con caracterizaciones fenotípicas hemorrágicas diferentes (71).

A pesar de que este test no es diagnóstico de ninguna entidad en particular, si puede ayudarnos a distinguir entre desórdenes de la hemostasia 1ª, enfermedad de von Willebrand y otros desórdenes de la hemostasia 1ª (tabla 1), pues en los dos primeros grupos el TO resulta muy alargado mientras que en el tercero suele ser normal (sobretudo el TO COL/ADP). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el caso de la enfermedad de von Willebrand leve puede tener un resultado normal (71).

Curioso es el hecho de que su resultado sea patológico (TO alargado) en el caso de la EvW y sea normal en el caso de las alteraciones más comunes de la función plaquetaria (defectos de secreción)(68).

En un estudio se observó el TO COL/EPI alargado en pacientes con déficit de factor de la coagulación (la razón en la actualidad es desconocida). También se correlacionó el mayor TO con la severidad del sangrado de los pacientes(68).

En la siguiente tabla se expone esquemáticamente el comportamiento del TO según patologías, fármacos y alimentos (tabla 1).

Tabla 1. Comportamiento del tiempo de obturación

Comportamiento del Tiempo de obturación	TO (COL/ADP)	TO (COL/EPI)
DESÓRDENES DE LA HEMOSTASIA 1ª		
Trombastenia de Glanzmann	ALARGADO	ALARGADO
Síndrome de Bernand-Soulier		
Síndrome de la plaqueta Gris		
OTROS DESÓRDENES DE LA HEMOSTASIA 1ª		
Deficiencia gránulos densos	NORMAL O ALARGADO	NORMAL O ALARGADO
Defectos de secreción primaria		
Síndrome de Hermansky-Pudlak		
Síndrome de Wiskott-Aldrich		
DESORDEN DE LA HEMOSTASIA 2ª		
Enfermedad de von Willebrand*	ALARGADO	ALARGADO
FÁRMACOS		
Aspirina (tipo AINE)	NORMAL	ALARGADO
Inhibidores de la COX-1 (ibuprofeno, ...)	NORMAL	NORMAL O
Clopidrogel	NORMAL O	NORMAL O
Inhibidores del ligado αIIβ3 (abciximab, tirofiban)	ALARGADO	ALARGADO
Inhibidores de la recaptación de la serotonina (paroxetina)	ALARGADO	ALARGADO
ALIMENTOS		
Alimentos ricos en flavonoides (coca-cola, chocolate o vino)	ALARGADO	ALARGADO

El alargamiento del COL/EPI secundario a toma de ácido acetil salicílico dura unos 6 días tras la suspensión del mismo, en cambio, en el caso del ibuprofeno su efecto dura 1 día tras su suspensión (71). Otro dato a tener en cuenta es el formato de pastilla de la aspirina, pues se ha observado que los comprimidos con cubierta prolongan menos el TO COL/EPI (71).

Existe limitada información sobre otros fármacos. Pero se ha descrito en el caso de la paroxetina, en un 30% el TO alargado (71).

Dados estos resultados, un grupo de trabajo italiano propuso un algoritmo diagnóstico con vistas a reducir costes y ser práctico. Puesto que el TO COL/EPI es muy sensible y está frecuentemente alargado en los trastornos de la hemostasia 1ª, se usaría como método inicial el TO COL/ADP, si éste resultaba prolongado se debía descartar en primer lugar la enfermedad de von Willebrand; si ésta resultaba negativa, se debían descartar enfermedades como la trombastenia de Glanzmann, el síndrome de la plaqueta gris y la enfermedad de Bernard-Soulier. En caso de que el TO COL/ADP fuese normal, se debían descartar las enfermedades plaquetarias más frecuentes (defectos de secreción de gránulos) puesto que son las que presentan habitualmente el TO COL/ADP normal y el TO COL/EPI alargado; en caso de ser negativas, se debería descartar la enfermedad de von Willebrand leve (68)(ver figura 8).

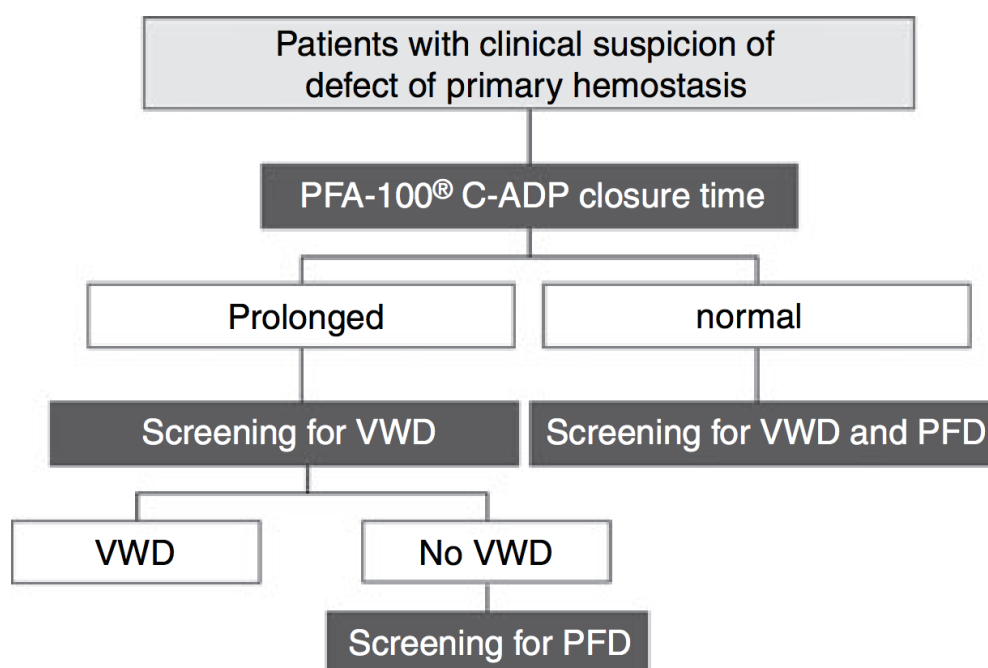


Figura 8. Algoritmo diagnóstico de la hemostasia 1ª. Tomado de Podda GM. 2007(68).

Esta herramienta se ha usado también en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) con elevación del segmento ST, donde se observó que estos pacientes tenían aumentado el FvW y un estado plaquetario activado, comportándose el tiempo de obturación COL/ADP (acortado) como un predictor independiente del grado de IAM, por lo que, PFA-100 puede ayudar para estratificar el pronóstico de pacientes con IAM (57).

Respecto a la monitorización de terapias para revertir la hemostasia utilizando PFA-100, se ha observado que en pacientes con EvW leve el TO se acorta tras la administración de desmopresina (DDVAP), del mismo modo que en personas que tomaban aspirina tras la administración de DDVAP intranasal, y también en personas que han recibido transfusión

de plaquetas. En sentido opuesto, se ha observado alargamiento del TO en pacientes que han recibido altas dosis de heparina (durante un bypass cardiopulmonar), plasmaféresis, coloides o cristaloideos (71).

7. Agregómetro eléctrico por impedancia. Fue introducido en 1980 por Cardinal y Flower (72), debido a las limitaciones del Agregómetro de turbidimétrico. Este método necesita poca muestra y no precisa centrifugación puesto que trabaja con sangre entera lo cual también elimina el factor de no estudiar completamente las plaquetas en su entorno (73). Lo que mide es el ABC (área bajo la curva) tras la adición de diferentes agonistas, que correspondería con la máxima amplitud en PRP (plasma rico en plaquetas) en el caso del Agregómetro de transmisión de luz. Inicialmente apareció el modelo Chrono-log® y posteriormente el Multiplate®, con la novedad de este último utiliza electrodos nuevos en cada toma (por lo que evita la limpieza de los electrodos en cada determinación) (74). No se ha observado influencia de los resultados respecto a la hora del día del análisis o factores del sujeto como si es fumador, la edad, el grupo sanguíneo o el sexo (73). Se ha utilizado en estudios durante el seguimiento de pacientes antiagregados (74).

8. Agregómetro de transmisión de luz ó agregometría plaquetaria turbidimétrica, técnica originada por Born (75,76), sigue siendo el Gold Standard para el diagnóstico de desórdenes de función plaquetaria. A pesar de ello, tiene varias limitaciones relacionadas principalmente con el uso de PRP (plasma rico en plaquetas) para su estudio, ya que se requiere tiempo para la centrifugación y en la separación de las plaquetas del resto de componentes celulares (hematíes y leucocitos). Además otros factores, la hora de la extracción (mayor actividad plaquetaria por la mañana) o la hiperlipidemia, pueden afectar al aumento de la densidad de óptica en el estudio del PRP mediante esta metodología. Por todo ello, el hecho de que se estudien las plaquetas de forma aislada no refleja la función plaquetaria en sus condiciones fisiológicas totalmente (73); se ha descrito aumento de la función plaquetaria en relación con hematíes y descenso en el caso de neutrófilos (77–79).

Cuando se objetiva alteración de la función plaquetaria tras uso de diferentes agonistas (ADP, colágeno, ácido araquidónico, ristocetina) son necesarios más test para afinar el diagnóstico.

La ISTH ha elaborado unas recomendaciones para limitar errores pre-analíticos, obtención de PRP y PPP y la dosis de agonista necesaria (80).

La falta de correlación entre las 3 técnicas anteriormente expuestas (PFA-100, agregómetro de luz y por impedancia) y la diferente asociación de cada una de ellas con la hora de la extracción de la muestra y con el recuento leucocitario, reflejan que cada método estudia un aspecto de la función plaquetaria (73,81).

9. Citometría de flujo. La especificidad y sensibilidad de esta técnica en la clínica es todavía desconocida, puesto que es necesario correlacionar sus resultados en una larga cohorte de pacientes, además de estandarizarla (82).

Este método mide la expresión en superficie de antígenos o ligandos en la superficie de las plaquetas (tras la adición de agonistas) utilizando anticuerpos monoclonales (82). La mayoría de los procesos que ocurren en la activación plaquetaria pueden analizarse mediante citometría de flujo (55).

Se han diseñado varios tipos de anticuerpos monoclonales. Entre ellos destacan el PAC1 (que se une al sitio de unión con el fibrinógeno, el cual se expone tras la activación de plaquetas cuando se produce el cambio conformacional de GPIIbIIIa (CD41/61)) y la P-selectina (también conocida como CD62P, GMP-140, o PADGEM)(82).

La P-selectina media la adhesión y la activación de plaquetas sobre neutrófilos y monocitos. Se expresa cuando se produce la liberación de los α -gránulos sobre la superficie plaquetaria, es decir, cuando se produce la activación plaquetaria. El anticuerpo monoclonal dirigido sobre P-selectina marcaría pues plaquetas activadas; sin embargo, en un modelo animal se observó que estas plaquetas activadas aunque siguen haciendo su función, dejan de expresar rápidamente en superficie la P-selectina, lo cual indicaría que no es el anticuerpo ideal para detectar plaquetas degranuladas (in vivo detecta alrededor del 1% de plaquetas activadas y en reposo; igual que PAC1 (55)) a menos que se realice el estudio inmediatamente tras la activación (82). Sin embargo, cuando se comparó la sensibilidad relativa respecto a los niveles plasmáticos de beta-tromboglobulina o del FP4 o de los metabolitos en orina de TxA_2 parecía ser más elevada. Por lo que, decidir cuál es el mejor marcador de activación plaquetaria está todavía a debate (55).

Existen otros anticuerpos menos usados para valorar la activación plaquetaria, como el complejo GPIb-IX-V (usado para estudiar la adhesión plaquetaria) y la GPIV(82).

Como ventajas de la citometría podemos destacar: el uso de pequeñas cantidades de muestra (muy útil en el caso de población pediátrica), mínima manipulación de la muestra (lo cual supone no perder plaquetas en el proceso y no cometer errores in vitro), estudio de sangre completa (más fisiológico al estudiar conjuntamente con leucocitos y hematíes, ya que como ya se ha mencionado influyen en la función plaquetaria), puede estudiarse pacientes con recuento plaquetario bajo (no afecta a los resultados) y no es radioactivo (a diferencia del estudio radioinmunológico en plasma de la β tromboglobulina y el FP4)(82).

Como agonistas se puede utilizar la trombina, pues es un ponente activador plaquetario. Para su medición se puede usar el sintético GPRP (glycyl-L-prolyl-L-arginy-L-proline) o el TRAP (péptido activador del receptor de trombina)(82).

Como desventajas: es una técnica cara que además requiere una persona experta para su análisis y que debe fijar la muestra en unos 45 minutos para evitar la activación exvivo plaquetaria. Además hay que tener en cuenta que la citometría detecta plaquetas activadas libres en sangre pero no aquellas que son aclaradas o están adheridas a las paredes de los vasos o a circuitos extracorpóreos (como un bypass cardiopulmonar), cosa que si ocurriría si usáramos radioinmunoestudio de plasma β laquetaria. Ade y FP4(82).

Se está utilizando en el diagnóstico de déficit hereditarios de glicoproteínas de superficie en plaquetas (E. Glanzmann, Sd. Bernard-Soulier) y en el diagnóstico de las enfermedades de liberación de gránulos (supone una técnica más sencilla que la gold standard para el diagnóstico de esta patología, microscopía de fluorescencia con mepacrina), ver tabla 2. También se están utilizando en la monitorización de tratamientos de antagonistas de la GPIIb/IIIa, en el genotipo de plaquetas en la aloinmunización feto-materna, detección de plaquetas reticuladas en el prendimiento medular tras un alotrasplante de progenitores hematopoyético, hiperreactividad de plaquetas en relación a cardiopatía isquémica y diabetes mellitus o hiporreactividad plaquetaria en recién nacido de bajo peso. Las futuras aplicaciones estarán enfocadas en la monitorización de fármacos como los agregantes plaquetarios, agentes antitrombóticos, transfusión de plaquetas, etc.(82).

En la siguiente tabla se describen las diferentes enfermedades plaquetarias hereditarias (tabla 2)(55).

Tabla 2. Enfermedades hereditarias plaquetarias

ENFERMEDADES HEREDITARIAS PLAQUETARIAS		Herencia	Gen alterado	Fenotipo	Sospechar si...
DEFECTOS DE ADHESIÓN	Síndrome de Bernard Soulier	AR/AD	GPIb/IX	•Diátesis hemorrágica •Plaquetas grandes •trombocitopenia	No agrega con FvW ni con bajas dosis de trombina
	Plaquetas de vWD	AD	GPIb	•Trombocitopenia •Trombofilia	
DEFECTOS DE AGREGACIÓN	Trombastenia de Glanzmann	AR	GP IIb/IIIa	•Diátesis hemorrágica •Retracción anormal coágulo	No agrega con ningún agonista
	ADP defecto receptor	AR	P2y1	•Diátesis hemorrágica	
	Déficit gránulos densos delta	D	Localizado en cromosoma 2	•Diátesis hemorrágica	-Baja expresión de CD63
	Enfermedad de Hermansky-Pudlak	AR	Localizado en cromosoma 10q	•Diátesis hemorrágica •Albinismo •Déficit delta gránulos	-Baja fluorescencia con mepacrina
TRASTORNOS DE SECRECIÓN	Síndrome de la plaqueta gris	AD	D	•Trombocitopenia •Plaquetas grises •Déficit alfa gránulos	Baja expresión de CD62P (P-selectina) tras usar TRAP-6
	Enfermedad de Chediak-Higashi	AR	D	•Albinismo •Grandes gránulos plaquetarios y leucocitarios	
	Síndrome de Wiskott-Aldrich	Ligada a X	Localizado en cromosoma Xp11	•Trombocitopenia •Eccema •Inmunodeficiencia	Acompañados de fenotipo anormal en otras células
	Síndrome de May-Hegglin	AD	D	•Trombocitopenia •Plaquetas grandes •Inclusiones leucocitarias	
MISCELÁNEA					

	Síndrome de Scott	AR	Traslocad or lipídico	•Diátesis hemorrágica •Descenso plaquetas •Actividad procoagulante	
--	-------------------	----	-----------------------	--	--

AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante; D: desconocido

En un estudio de 2002 se usó este método para la cuantificación de plaquetas y microagregados plaquetarios utilizando el anticuerpo CD42a y como agonista el ADP a diferentes concentraciones, realizando un conteo de 50.000 eventos (incluyendo plaquetas y leucocitos). Se observaban los eventos correspondientes a los microagregados a los 10-20 segundos de la adición del ADP independientemente de la dosis usada; pasados 1-2 minutos en el caso de ADP a dosis 1 μm se producía una agregación reversible (los microagregados permanecían aunque en menor cuantía) y cuando se usaba a dosis de 10 μm ocurría una agregación irreversible (los microagregados desaparecían porque se transformaban en macroagregados, que son muy grandes para pasar a través del citómetro). Se observó buena correlación del conteo de plaquetas entre el método habitual (ultra-Flo 100 whole blood platelet counter) y la citometría (83). Además el conteo real de plaquetas no es necesario para el estudio de agregación plaquetaria calculando el % del recuento inicial de la muestra en EDTA (% agregación = $100 \times (\text{recuento en EDTA} - \text{ADP recuento}) / \text{recuento en EDTA}$) (84).

En el caso del uso de otros agonistas diferentes al ADP, el colágeno o la trombina a altas concentraciones se han observado gran número de micropartículas, lo que hace más complicado el análisis discriminatorio entre plaquetas y micropartículas, que requiere mayor estudio en el gateo citométrico (84).

10. ELISA. Puede determinar la etiología de los gránulos (α y δ) de liberación plaquetaria y sus productos (FP4, serotonina, ADP...).

11. Tromboelastograma (TEG). Estudia la generación de trombina y se está utilizando mucho en los últimos años. A pesar de que no forme parte del proceso del diagnóstico inicial de defectos de la hemostasia 1ª, se cree que podría ser útil para entender por qué dos pacientes con misma alteración hemostática uno sangra y el otro no (85).

1.3. MICROPARTÍCULAS

1.3.1. Definición y fisiopatología

Las micropartículas (MPs) comenzaron a estudiarse en 1967 por Wolf, siendo denominadas inicialmente con el término de “polvo celular” (86). En la última década este nombre ha sido sustituido por el actual debido al gran avance en biología en este campo (87).

Las células liberan sustancias mediante vesículas originadas de su membrana plasmática,

bien durante la activación o durante la apoptosis (muerte celular programada). Para distinguir el origen de las MPs hay que fijarse en el tamaño, en su contenido, en lo que ocurre tras su liberación, etc.(88).

La mayor parte de las MPs tienen un origen plaquetario (>80%(89)), sin embargo, también pueden ser derivadas de otras células aunque en menor cuantía (granulocitos, monocitos, eritrocitos, linfocitos, células endoteliales, etc.)(90). La cantidad y contenido de MPs difiere según la situación basal de la persona (sana versus enferma)(90).

Las MPs, cuyo diámetro oscila entre 100nm-1µm, están compuestas por material proteico (membrana plasmática, citoesqueleto, mitocondria y varía según el estímulo que haya originado la MP), lipídico (poco conocido) y por ARN o ADN (88). Se trata de una bicapa fosfolipídica que presenta receptores y proteínas transmembrana y en su interior (en el citoplasma) presenta proteínas, factores de transcripción y ARNm (89).

El papel del material nuclear no está claro, sin embargo, parece que existe una transferencia horizontal hacia otras células; en el caso de las células endoteliales se promueve la angiogénesis y la activación de Akt y ON sintetasa endotelial(88). También se ha observado transferencia horizontal de receptores, factores de crecimiento e integrinas(91). De hecho, se ha observado proceso de fusión entre las MPs y la membrana de una célula diferente (92).

En condiciones normales, de reposo celular, los fosfolípidos se encuentran distribuidos asimétricamente en la membrana celular (en el extremo exterior se encuentra fosfatidilcolina y esfingomielina, y en el interior FS y fosfatidiletanolamina). Cuando se produce la activación celular o apoptosis, la FS se transloca y externaliza en la membrana. Este paso parece ser el primero en ocurrir antes de que produzca la liberación de MPs y es la consecuencia de la activación de la flopasa (enzima ATP-dependiente) y la inactivación de la flipasa (enzima que mantiene la normal distribución de fosfolípidos en la membrana) mediante la entrada intracelular de Ca^{2+} (89). La exposición de FS parece ser el hallazgo universal observado en la células activadas o en apoptosis, así como, el de las MPs derivadas de ellas (89). Sin embargo, este proceso no explicaría en principio la formación de MPs que no expresen FS (anexina V negativo en MPs de origen plaquetario y endotelial), por lo que este tema sigue siendo un punto a debatir; una posible explicación podría ser el reflejo del mantenimiento de la homeostasis celular (89).

El conocimiento del proceso de formación de MPs ha avanzado gracias al estudio del síndrome de Scott, donde se han estudiado diferentes genes relacionados con la liberación de Ca^{2+} y con la redistribución de fosfolípidos en la membrana plasmática, pero todavía no parece clara la mutación que causa este desorden (89).

Las evidencias sugieren que la modulación del Ca^{2+} libre intracelular en las plaquetas (a través de las proteínas Orail y STIM1 (ya comentadas anteriormente) y mediante la acción de la trombina a través del canal P2X_1) afecta a la formación de MPs (89). Parece clara la relación entre el Ca^{2+} y la formación de MPs (de cualquier estirpe celular), sin

embargo, podría no ser el único ion relacionado con este proceso, pues se han descrito canales de Na^+/H^+ y también de K^+ implicados en este proceso (89).

En el caso de las células apoptóticas se desconoce el mecanismo exacto de los iones de Ca^{2+} . Lo que sí se sabe es que el proceso de formación de MPs en esta situación ocurre en aproximadamente una hora, en cambio, en las células activadas ocurre en unos minutos (89).

Otro punto a tener en cuenta es que se han descrito varias vías de señalización para explicar la formación de MPs, lo cual refleja la complejidad de estas partículas. Una de estas vías es la representada por la caspasa-3 y que precisa de la actuación del Ca^{2+} . Esta proteína provocaría la proteólisis del citoesqueleto, activando la Rho-quinasa que fosforilaría la miosina, la cual provocaría la contracción de la membrana plasmática y la producción de MPs (89).

La función de la MP depende de la célula originaria, del estímulo que ‘sufran’ o reciban y finalmente del contenido de la MP (que evidentemente no será idéntico que la célula originaria). Así, las MPs derivadas de plaquetas participan en la coagulación sanguínea, las derivadas de células endoteliales participan en la angiogénesis, y las derivadas de células del esqueleto en la mineralización ósea. Por otro lado, hay que destacar que las MPs pueden actuar sobre su célula originaria o sobre otras células o señales de activación (91). En definitiva, las MPs pueden actuar en la coagulación, procesos inflamatorios, función endotelial, angiogénesis, supervivencia celular y comunicación intercelular (90).

Respecto a la angiogénesis no sólo interviene en este proceso la expresión de factor endotelial vascular (VEGF), sino que pueden contribuir a esta función el factor tisular o incluso los adipocitos, cuyas MPs derivadas contienen gran cantidad de proteínas angiogénicas (91). Las MPs juegan un importante papel en el proceso de angiogénesis, con un doble efecto: proliferación celular de una estirpe celular en concreto y también en la expansión tumoral. De hecho en las Stem cells se han observado abundantes cantidades de MPs, las cuales son capaces de reprogramar los progenitores hematopoyéticos mediante transferencia horizontal de ARNm y proteínas de sus células originarias; así también se ha observado en ratones con isquemia cerebral aumento de la neurogénesis tras tratamiento con MPs derivadas de plaquetas. En sentido opuesto, se ha observado transferencia de ARNm de las células tumorales del glioblastoma hacia células del cerebro sanas (91). En el caso de la leucemia linfática crónica se han observado cambios en la expresión de las MPs (aumento de ciclina D1 y c-myc), lo que demuestra el papel de las MPs en el microambiente tumoral y su posible uso como biomarcador de progresión de la enfermedad neoplásica (91).

Las MPs tienen un tamaño muy pequeño como para ser detectadas en contadores de rutina plaquetarios (93), por lo que su estudio está centrado en la citometría de flujo fundamentalmente; sin embargo, también se realizan en algunos centros el estudio funcional de la actividad procoagulante de las MPs. Ambas técnicas tienen sus ventajas e inconvenientes (94). Como definición de MP del grupo de trabajo de Robert S et al.

utilizando la citometría de flujo consiste en: eventos de tamaño 0,1-1 μ m que expresan FS (la cual se detecta con la Anexina V), y además otros antígenos que nos ofrecen información de la estirpe celular de la que provienen (en el caso de las células endoteliales el CD144 (es muy específico aunque menos sensible); en el caso de plaquetas el CD41, etc.) y pueden ser obtenidas mediante gran velocidad de centrifugación para deshacernos de los debris (95). La identificación de MPs endoteliales activadas puede resultar más difícil pues muchas de ellas no expresan FS (88).

Las MPs se diferencian en el tamaño de los exosomas (<100 nm; habitualmente entre 50-80 nm) y de los cuerpos apoptóticos (>1 μ m los primeros no expresan fosfatidilserina y los segundos sí (88). La mayor parte de los estudios no hacen distinción entre exosomas y MPs, haciendo referencia a ambos con el nombre de MPs (91).

En el caso de las MPs de origen endotelial, éstas pueden albergar en su interior moléculas de origen endotelial (ver figura 9): cadherina endotelial vascular, molécula de adhesión endotelial-plaquetaria-1 (CD31), molécula de adhesión intercelular (ICAM-1 (CD54)), endoglina, E-selectina (CD62E), S-endo (CD146), α n-integrina (CD51), sintetasa del ON endotelial, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R2). Sin embargo, ninguna de estas moléculas es exclusiva de expresión endotelial (pues pueden encontrarse en leucocitos, plaquetas y eritrocitos), exceptuando la E-selectina y la cadherina endotelial vascular. La E-selectina se ha observado en células endoteliales activadas y también en células apoptoicas (con expresión de TNF- α (88). Se han detectado en plasma, orina, humor vítreo y en tejidos isquémicos o con arteriosclerosis (88).

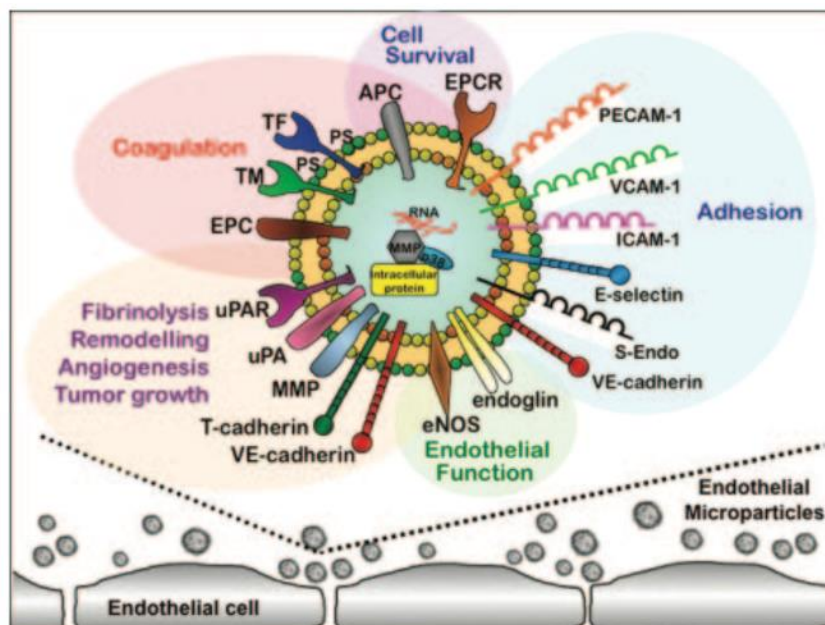


Figura 9. Representación de moléculas expresadas en microvesículas endoteliales y sus efectos biológicos. Tomado de Dignat-George F. 2011(88).

In vitro, diferentes sustancias son capaces de inducir la producción de MPs endoteliales: TNF- α lipopolisácaridos de bacterias, trombina, PCR, toxinas urémicas, campotecina,

inhibidor del plasminógeno. Existen pocos estudios que hayan analizado este mecanismo. Uno de ellos (ver figura 10), describe la generación de MPs endoteliales siendo el agonista la trombina que actúa sobre su receptor PAR-1 en 2 fases (la fase lenta que incluye la vía caspasa 2 y la rápida que incluye a TRAIL, citoquina perteneciente a la familia de TNF- α ambos precisan de la actuación del factor nuclear NF κ B. Se producirá la reorganización del citoesqueleto y la formación posterior de las MPs. El hecho de que la IL-1 se libere en este proceso al plasma y que el TNF- α pueda actuar como agonista de la liberación de MPs endoteliales hace pensar en si los mediadores de este proceso puedan estar implicados en la respuesta general inflamatoria, sin embargo éste es un tema todavía a debate (88).

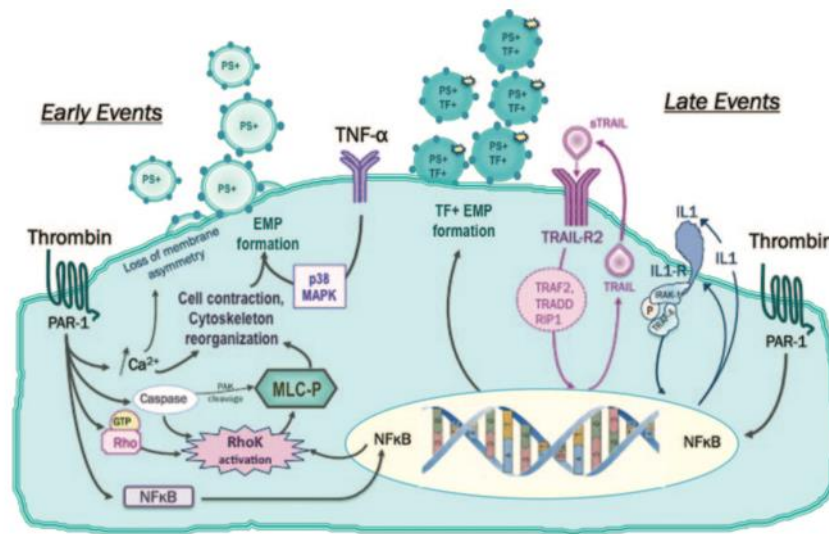


Figura 10. Generación de micropartículas endoteliales tras estímulo de la trombina. Tomado de Dignat-George F. 2011(88)

Las MPs endoteliales están implicadas en funciones como (ver figura 11): la presentación de antígenos, angiogénesis (inhibiendo la vía Notch), transferencia de material genético a otras células (células endoteliales, fagocitos,...).

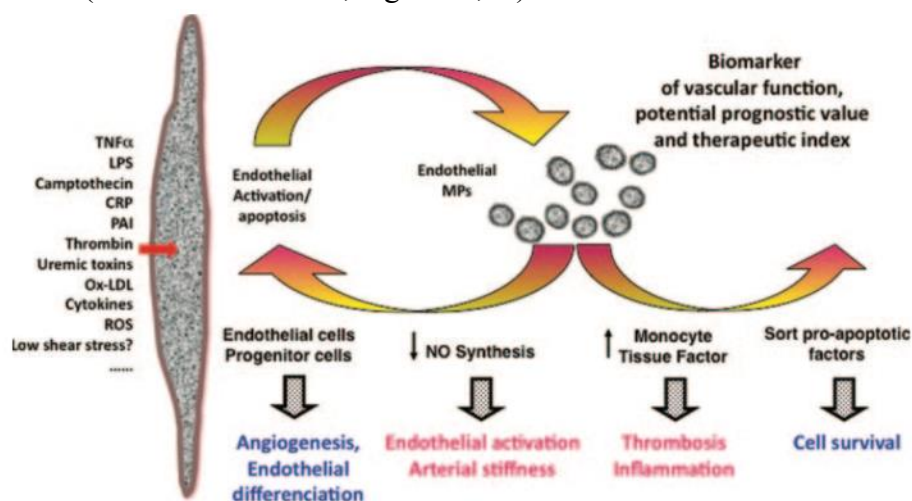


Figura 11. Representación esquemática de los agonistas que aumentan la producción de MPs endoteliales.

Tomado de Dignat-George F. 2011(88) En rojo se observan efectos indeseables (trombosis) y en azul los beneficiosos (angiogénesis). LPS: lipopolisacárido; PCR: proteína C reactiva; PAI: inhibidor del plasminógeno activado; Ox-LDL: lipoproteína oxidizada de baja densidad; ROS: especies oxígeno reactivas.

Varios estudios han postulado el uso futuro de los niveles de MPs endoteliales como biomarcador pronóstico en enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus, ya que se ha observado alteración del material genético en estas MPs (88). La expresión de FT y FS de las MPs está relacionado con el potencial trombótico de éstas, y al revés, cuando las MPs expresan proteína C. Esto sugiere que las MPs participan en un equilibrio constante coagulante y anticoagulante (88). Lo que parece estar claro, es que este proceso es complejo y que son necesarios más estudios que evalúen las funciones de estas MPs endoteliales (88).

Las MPs de origen endotelial y plaquetario son las que están relacionadas con la exposición del FT y la síntesis del trombo, ya que liberan proteína disulfido isomerasa (PDI)(90).

La FS es una aminofosfolípido cargado negativamente, que permite la unión con el complejo tenasa y protrombinasa llevando a la generación de trombina, así mismo, también funciona activando el FT (94).

El FT es una glicoproteína transmembrana que representa el papel principal para la iniciación de la coagulación (94) activando al FVII, de hecho su ausencia hace que sea incompatible con la vida (es el único factor de la coagulación del cual no se ha descrito desorden congénito asociado) (96). Se ha denominado también como factor III de la coagulación, tromboquinasa, tromboplastina o CD142 (96). El FT se encuentra en tejido cerebral, corazón, riñones, pulmones, útero y placenta. En la sangre podemos encontrarlo en microvesículas lipídicas de monocitos y células endoteliales siempre y cuando éstas estén activadas, por lo que, podemos decir que el mayor pool de FT en sangre son las MPs derivadas de los monocitos (96). Se desconoce si el FT está activo o necesita activarse para unirse al factor VII; es posible que se active tras la unión de las MPs (donde se encuentra) a fibrina o a plaquetas activadas (96) a través de un mecanismo que implica que P-selectina glicoproteína ligando-1 (PSGL-1) se unirá a la P-selectina de las plaquetas activadas (ver figura 12) (92).

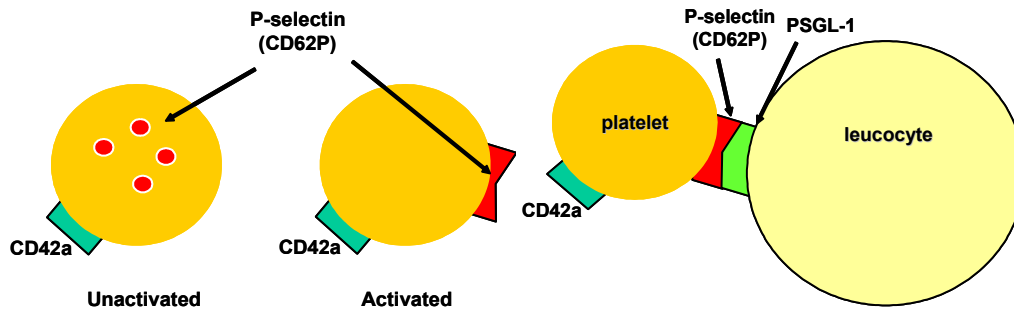


Figura 12. Mecanismo de función de la p-selectina. A la izquierda) plaqueta expresa p-selectina tras su activación; A la derecha) unión de plaqueta y leucocito a través de la p-selectina y el ligando PSGL-1 (cedido por gentileza de Sue Fox y Natasha Dovlatova, University of Nottingham).

P-selectina es el miembro mayoritario de la familia de las selectinas, cuya función es mediar en la adhesión celular (entre leucocitos, plaquetas y endotelio). P-selectina se encuentra en la membrana de los α -gránulos plaquetarios y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, sin embargo, en estos últimos el componente mayoritario es el FvW, que como ya he mencionado anteriormente, interviene en la adhesión plaquetaria y en el transporte del factor VIII en el plasma. Sea la liberación de P-selectina procedente de un gránulo u otro (ésto ocurrirá tras la activación de plaquetas o células endoteliales), se producirá la expresión de P-selectina en la superficie celular, tras lo cual su unión a su receptor permitirá iniciar el proceso de adhesión celular. El ligando más conocido de la P-selectina es el PSGL-1 y se encuentra en la mayoría de los leucocitos, sin embargo, también se han observado pequeñas cantidades de este ligando en plaquetas y en la GpIb (receptor del FvW)(96), lo que refleja la autonomía de las plaquetas. Estos pasos son los que ocurren antes del rodamiento de plaquetas y leucocitos al lugar de la lesión e indica la relación tan cercana entre ambos tipos celulares en los procesos de hemostasia e inflamación(96)(ver figura 13).

La forma de P-selectina soluble puede ser detectada en plasma; cuando está elevada puede predecir eventos cardiovasculares(96).

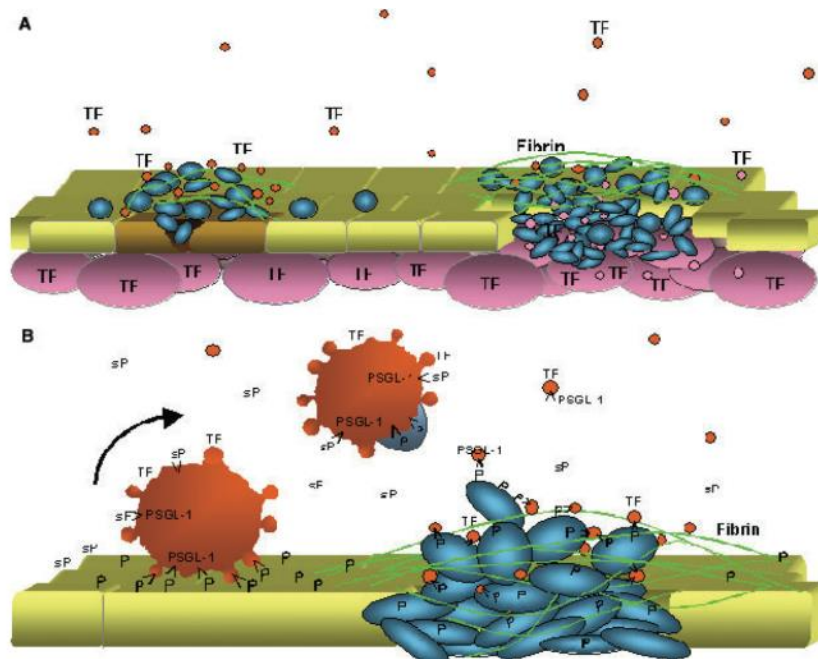


Figura 13. Modelo del FT y la P-selectina en la formación del trombo. Tomado de Polgar J. 2005(96).

A) Tras la injuria del vaso las células endoteliales y sus MPs expresan FT (bolitas rosas) de igual modo las MPs de los monocitos expresan FT (bolitas naranjas), y llegan las plaquetas (ovoide azul) con el depósito de fibrina. B) P-selectina (P) de plaquetas y de células endoteliales se une a su ligando PSGL-1 en los monocitos, liberando FT (bolitas naranjas).

De hecho, se ha observado que PSGL-1 juega un importante papel en la formación de MPs que contienen FT (96), reflejando que estos procesos son dinámicos. Así pues, la unión de P-selectina con su ligando PSGL-1 representa un importante papel en los procesos de inflamación y trombosis. Por ello, se están investigando estrategias terapéuticas en un sentido u otro según la patología en particular; en el caso de la hemofilia potenciando la P-selectina (utilizando inmunoglobulinas, P-selectina-Ig) se observó acortamiento del tiempo de sangrado en el modelo murino (97) y en las estrategias antitrombóticas inhibiendo la unión P-selectina con PSGL-1 (utilizando anticuerpos recombinantes que bloqueen/se unan a PSGL-1, como rPSGL-Ig) se han observado efectos beneficiosos (96). Además también se ha planteado el uso de P-selectina-Ig en combinación con FVIIra en el caso de pacientes con HA e inhibidor para potenciar el efecto del FVIIra (dado su corta vida media) (96).

Determinados estímulos como el colágeno son capaces de liberar MPs procoagulantes (enriquecidas de P-selectina, CD63, Gp IIb/IIIa); los megacariocitos también constituyen un recurso fisiológico de MPs (caracterizadas por FS, CD42 y CD41) (89).

Las MPs están siendo reconocidas como mediadores importantes de la hemostasis y la trombosis (96,98). Se han observado aumento del nivel de MPs plaquetarias en pacientes con diabetes tipo 1 y 2, síndrome metabólico, hiperlipidemia e hipertensión; también en el caso de las MPs endoteliales (predictor independiente en el modelo de riesgo cardiovascular de Framingham). Sin embargo, el hecho de que estén aumentadas no significa siempre que tengan un efecto deletéreo para la salud, de hecho también se han

visto aumentadas en situaciones clínicas (sepsis, disfunción orgánica, etc.) con evolución favorable, por lo que, presentan una habilidad dual para aumentar o reducir ON y especies de oxígeno reactivo (ROS) (90). De hecho, se han descrito posibles efectos anticoagulantes de las MPs en sujetos sanos donde se observó correlación inversa entre el número de MPs y la generación de trombina (99).

Las MPs se han estudiado en la púrpura trombocitopenia idiopática, donde se observó que los pacientes sangraban menos cuando existía gran cantidad de MPs derivadas de plaquetas; así mismo en el grupo de pacientes que presentaban accidentes isquémicos transitorios se observó un aumento considerable del número de MPs (93).

1.3.2. Micropartículas y hemofilia

Como se ha comentado anteriormente, altos niveles de MPs mejoraron la hemostasia en el modelo de ratón hemofílico (97), además las MPs derivadas de plaquetas expresan una alta y mantenida afinidad por el FVIII (100). Se ha observado aumento de las MPs de origen plaquetar en la enfermedad de von Willebrand tipo 1 tras la administración de desmopresina (101). Hay que destacar que existe gran variabilidad en cuanto a la cantidad de MPs entre individuos sanos y también entre pacientes con HA, lo que anima a estudiar éstas en la modulación del fenotipo hemorrágico en hemofilia (53). Se ha observado que en individuos menores de 18 años, tanto sujetos sanos como pacientes hemofílicos, existe gran variabilidad y niveles mayores de MPs respecto a sujetos de edades superiores (102). En hemofilia existen pocos estudios y además contradictorios. En el estudio de Mobarrez et al. (103) presentaban un grupo bien definido de 18 pacientes con HA en tratamiento a demanda, se observó que tras 30 minutos de la infusión de FVIII la cantidad de MPs totales, las de origen plaquetar y también las endoteliales disminuían, no así las de origen leucocitario. Además existía correlación inversa con la mayor activación hemostática mediante otros métodos de laboratorio, por lo que concluyeron que este descenso de MPs podría corresponder a su inclusión dentro del trombo (el lavado de MPs, aunque poco conocido, no parecía explicar todo el descenso). Al contrario, Proulle et al. (104) observó un aumento de las MPs con actividad procoagulante tras la administración de FVIIra en pacientes con HA. Hay que tener en cuenta el hecho de que se usasen diferentes factores (FVIIra puede activar al FT y producir MPs), que las muestras de pacientes comparados no fuesen similares (en el estudio de Proulle et al. la muestra de pacientes era heterogénea con pacientes en régimen profiláctico y otros a demanda) y que el método de medición de las MPs fuese diferente (Proulle et al usaban un método funcional y Mobarrez et al las identificaban con anticuerpos monoclonales). En 2014 y 2015 se publicaron dos comunicaciones de un grupo de trabajo chino en el Congreso Americano de Hematología (American Society of Hematology, ASH), en una de ellas se observaba mayor nivel de MPs plaquetarias en pacientes con HA leve respecto a HA severa (estando todos en régimen de tratamiento a demanda) y a sujetos sanos, además en sujetos en tratamiento profiláctico también se observaron bajo nivel de MPs (105); en el otro trabajo dividían a los pacientes con HA severa en grupos según su fenotipo hemorrágico (teniendo en cuenta que el dintel de la ratio de sangrado anual para el fenotipo severo era de 24 y de fenotipo

leve era <6) y encontraban que los pacientes con fenotipo hemorrágico más leve presentaban mayor nivel de MPs (106).

Los investigadores reconocen que existe poco consenso en el análisis de las MPs debido principalmente a la imprecisión de la medida del tamaño. Así mismo, también existen variables pre-analíticas que es necesario tener en cuenta para que los resultados sean fiables. Por ello, la ISTH ha desarrollado unas recomendaciones(107), sin embargo, son necesarias guías estandarizadas.

Parece que las MPs tienen funciones que las hace atractivas para aplicarlas en determinadas circunstancias clínicas como, biomarcadores que sugieran la presencia de una enfermedad o como diana terapéutica en diabetes, enfermedades cardiovasculares o el cáncer. Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender mejor estas implicaciones clínicas (91).

1.4. RELEVANCIA

En la hemofilia, el déficit de FVIII o IX da lugar a una disminución de la formación de FX en la superficie plaquetaria, lo que a su vez produce un déficit en la generación de trombina, por ello, se la considera un desorden de la coagulación. Pero, en el proceso hemostático normal, las plaquetas, los leucocitos, el endotelio y el sistema de la coagulación interactúan unos con otros para formar un tapón en el sitio de la lesión (53).

Dada la importante contribución de las plaquetas sobre la hemostasia en general, y sobre la generación de trombina en particular, podría especularse que diferencias en éstas pudiesen modular la predisposición de los individuos a presentar sangrados o trombosis (53).

El estudio de las MPs en hemofilia es importante por 3 motivos: identificación de MPs que mejoren el estatus hemorrágico de estos pacientes y pueda ser usado como tratamiento; estudio de la enfermedad cardiovascular, puesto que estos pacientes actualmente llegan a edad adulta y se ha observado que la hemofilia no tiene un factor protector sobre ésta; estudiar si el tratamiento actual con factor predispone a un evento trombótico (103).

La diátesis hemorrágica debida al déficit de factores en los pacientes con hemofilia, podría ser parcialmente compensada o modificada por otros factores, como la reactividad plaquetaria y/o el número y calidad de las micropartículas procoagulantes.

1.4.1. Modelo tisular de la coagulación

El modelo celular de la coagulación (ver figura 14) (28) surgió de patologías o situaciones que no podían explicarse en su totalidad con el modelo anterior, el de la cascada de la coagulación. Por ejemplo, en el caso de HA o HB, según el modelo antiguo, la vía extrínseca debería suplir mediante la síntesis de factor X este déficit de FVIII o IX respectivamente. Este modelo se centra en los receptores celulares específicos para las

proteínas de coagulación. Se divide en 3 fases que se solapan en el tiempo (al lugar de la injuria llegan factores de coagulación, plaquetas, monocitos, células endoteliales, etc.). El proceso de iniciación ocurre en las células que llevan las microvesículas de FT (monocitos, fibroblastos, células endoteliales); éstas pueden ser activadas si el estímulo es grande, por FIX, X e incluso por trombina. El FT se unirá formando un complejo con el FVII, los cuales activarán al FIX y al FX. El FX originado del complejo FT/FVII rápidamente es inhibido por TFPI y ATIII (como mecanismo de homeostasis), además el FX puede activar al FV y su combinación puede generar pequeñas cantidades de trombina, lo cual es importante en la activación plaquetaria durante la siguiente fase.

La amplificación ocurre cuando las vesículas de los monocitos contactan con la superficie de las plaquetas, además las pequeñas cantidades de trombina originadas en estas células producirá mayor activación plaquetaria. La activación plaquetaria producirá la liberación de FV de los α -gránulos (el cual será activado posteriormente por FX o trombina). Esta fase acaba cuando las plaquetas se han activado y han activado en su superficie al FV y FVIII.

En la superficie plaquetaria podemos encontrar receptores de factores de la coagulación (FXI, FX, FIX, FVIII, trombina) y de fibrinógeno. En el caso de la trombina podemos encontrar 2: el PAR1 y la GpIb/IX; sin embargo, la GpIb/IX principalmente es usada por el complejo FvW-FVIII, una vez activado el FVIII se escindiría del FvW y se uniría a la plaqueta en otro receptor de superficie.

El factor VIII es un cofactor que circula formando un complejo junto al FvW en muy bajas concentraciones (0,3-0,7 nM) comparados con otros factores. El factor VIII posee varios sitios para poder unirse tanto al FvW como a otros factores (II, IX, X, PC) y también interacciona con los fosfolípidos de la superficie plaquetaria. La versatilidad de este factor lo hace imprescindible, así como vulnerable (67).

En la fase de propagación se unen proteasas con sus cofactores en la superficie celular plaquetaria, es decir, se generan los complejos tenasa (unión de FVIII-FIX) y protrombinasa (unión de FX-FV) en la superficie plaquetaria, este último podrá generar cantidades suficientes de trombina (FII) para formar el coágulo de fibrina.

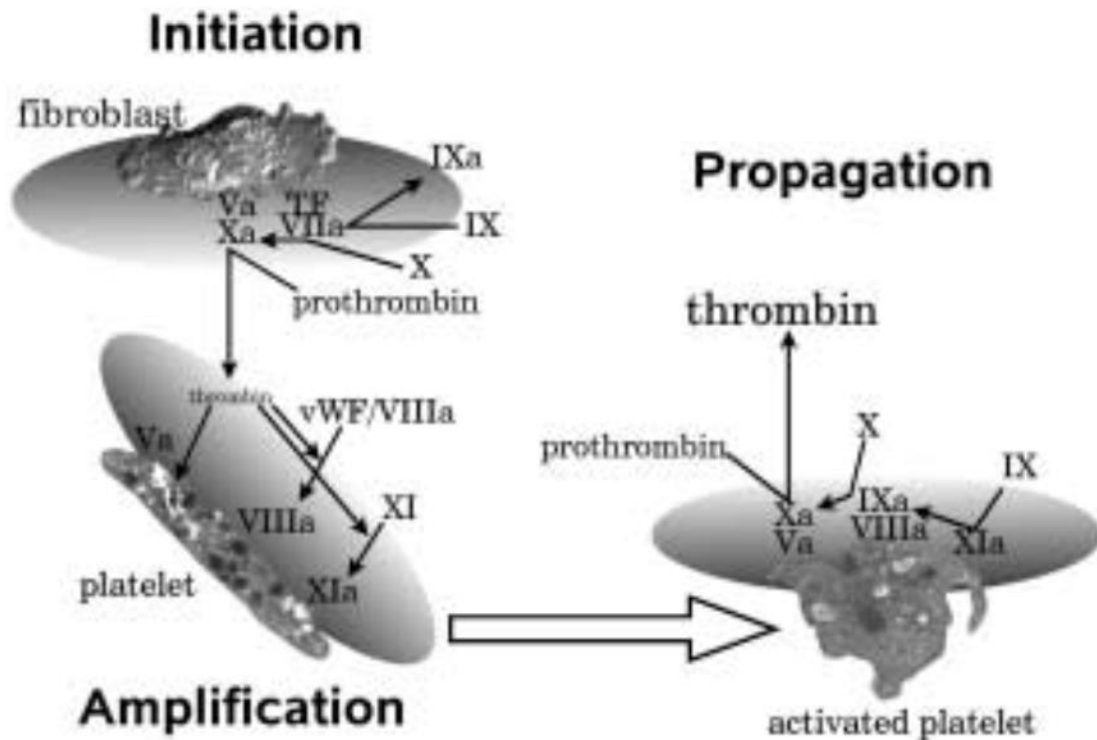


Figura 14. Modelo celular de la coagulación. Tomado de Hoffman M. 2001(28). La explicación de la hemofilia para estos autores con este modelo es que existe una alteración en la superficie de la membrana plaquetaria que dificulta la generación de suficientes cantidades de FX como para formar trombina, lo que explicaría también por qué estos pacientes responden al tratamiento con altas dosis de FVIIra (28).

Por todo ello, a diferencia del modelo clásico de la cascada del coagulación, el “modelo celular” de la coagulación debería implicar que la evaluación hemostática de los pacientes hemofílicos considere además de la actividad de los factores VIII/IX, el papel de las células (plaquetas, leucocitos, endotelio) y de las MPs. La identificación de estos factores permitirá orientar el tratamiento de estos pacientes.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

El presente trabajo está dirigido a la investigación de los factores moduladores del fenotipo hemorrágico en pacientes con hemofilia A severa tratados en régimen de profilaxis. Entre los factores moduladores que vamos a estudiar se encuentran las plaquetas y las micropartículas. Analizaremos si la administración de FVIII modifica este fenotipo hemorrágico, comparando una muestra basal (periodo de lavado/72h sin factor VIII) con respecto a una muestra 15 minutos tras administración de FVIII.

2.2. Objetivos secundarios

Comparar los resultados de la hipótesis principal con un grupo control de sujetos sanos.

Investigar la predisposición a eventos trombóticos en estos pacientes.

Investigar si el análisis de los factores moduladores de la hemostasia debe hacerse como rutina habitual en el estudio de un paciente con hemofilia A.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio de cohortes observacional, prospectivo y longitudinal realizado entre julio de 2015 y abril de 2016. El Proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) de Murcia (Anexo 1) y se han respetado en todo momento las normas de Buenas Prácticas Clínicas en Investigación. El protocolo del estudio cumple las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 (Revisión de 1983).

A todos los pacientes del presente estudio se les explicó de forma verbal y escrita el objetivo del proyecto y su derecho a consultar telefónicamente en caso de duda o a abandonarlo libremente en cualquier momento. Se explicó que dadas las características del mismo, éste no suponía ninguna modificación de su tratamiento crónico habitual ni la toma de medicación adicional. Por tanto, no se preveía ningún riesgo adicional para el paciente, puesto que no había modificación alguna en su tratamiento y revisiones (las analíticas se realizarían según la práctica habitual de su enfermedad) médicas. También se informó que los resultados obtenidos pretendían conocer mejor su enfermedad y que probablemente no tuvieran valor para ellos en el momento actual, pero quizá sí en el futuro. Todo ello se encuentra recogido en la “Hoja de información al paciente” Anexo 2.

Todos los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento informado, que garantiza que participan voluntariamente en el estudio después de haber comprendido la información anteriormente expuesta (Anexo 3 y 4). Del mismo modo se garantizó el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, para proteger el derecho a la intimidad de los pacientes; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

Toda la información de investigación biológica obtenida de las muestras fue estrictamente confidencial y no se usó para ningún otro propósito fuera de los del proyecto, accediendo únicamente a la información obtenida los investigadores responsables. Tal como recoge la Ley de Investigación Biomédica de 3 de Julio de 2007, “La donación y la utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, cualquiera que sea su origen específico, sin que en ningún caso las compensaciones que se prevén en la ley tengan un carácter lucrativo o comercial. La donación implica, así mismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas”.

En el caso de la población control sana se procedió de la misma manera que en el caso de pacientes en cuanto a la explicación del proyecto y la confidencialidad de datos (leyes nombradas previamente).

La cohorte estudiada está formada por pacientes de la Unidad de Hemofilia de la Región de Murcia con diagnóstico de Hemofilia A severa y que se encontraban en tratamiento profiláctico con FVIII recombinante en el momento del estudio. Además debían cumplir los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

❖ CRITERIOS INCLUSIÓN:

- ✓ Pacientes con edad comprendida entre 6 y 65 años con hemofilia A en tratamiento profiláctico con factor VIII recombinante.
- ✓ Pacientes sin presencia de inhibidor contra el factor VIII.
- ✓ Pacientes que no estén siendo tratados con antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en los 15 días anteriores a la donación.
- ✓ Pacientes sin episodios de infección y/o trombosis y/o hemartros en los últimos 3 meses.
- ✓ Pacientes con recuento plaquetario $>100.000/\mu\text{L}$.

❖ CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- ✓ Pacientes que no estén de acuerdo en colaborar con el estudio.
- ✓ Pacientes que por problemas clínicos/comorbilidades (hemofilia u otra enfermedad) no puedan acudir al hospital.

El tipo de muestreo que se llevó a cabo fue no probabilístico y consecutivo, ya que se seleccionó a toda la población elegible. Utilizando la base de datos informática de pacientes del HCUVA (que se encuentra codificada por diagnósticos clínicos hematológicos), se seleccionaron aquellos pacientes con HA severa. Posteriormente se realizó recolección de datos demográficos tras revisar la historia clínica presente en el hospital (informática y en papel). Así pues, de los 20 pacientes diagnosticados de HA severa en nuestro centro, 4 de ellos no cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

También analizamos un grupo control de sujetos sanos voluntarios y conformes con colaborar con el proyecto.

Tras la selección de pacientes, se contactaba con ellos telefónicamente por un Hematólogo/a, que informaban al paciente del proyecto de investigación, se acordaba el día del experimento en caso de estar conforme y se daban las siguientes recomendaciones:

- NO deberá haber realizado ejercicio la noche anterior al día de la extracción analítica (ni esa misma mañana).

- NO fumar en los 30 minutos antes de hacerse la prueba ni hasta haberse extraído la segunda determinación.
- NO haber consumido café en las 2 horas previas al estudio ni hasta haberse extraído la segunda determinación.
- NO tomar fármacos que inhiben la función plaquetaria (AINES) por lo menos 15 días antes de realizar la prueba.

AINES: Aspirina (ácido acetilsalicílico), celebrex (celecoxib), neobrufen (ibuprofeno), naproxeno, voltarén (diclofenaco), toradol (ketorolaco), indometacina, salicilatos.

✓ El paciente podrá tomar paracetamol (gelocatil).

- NO haber presentado episodio de trombosis, infección o hematomas en los 3 meses previos a la extracción analítica.
- Pasará a la consulta de Hematología que se localiza enfrente de Banco de Sangre, para la FIRMA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO. Será atendido por Hematología a las 08:00 del día citado. Posteriormente se llevará a cabo la extracción analítica.
- IMPORTANTE: No olvidar traer el factor que le corresponda administrarse ese día.

En el caso de controles voluntarios sanos se procedía informando de la misma forma que en los pacientes (telefónicamente) y con las mismas recomendaciones, exceptuando lo que respecta al factor VIII.

Los pacientes se citaban ajustando los días de profilaxis de forma que coincidiera el día citado con el período de lavado. El día del experimento se explicaba nuevamente el procedimiento, se confirmaban los datos de la historia clínica mediante una entrevista previa con el paciente y si estaba de acuerdo, firmaba el consentimiento informado.

Mencionar que estos pacientes como control de rutina asistencial se realizan analíticas anuales para determinación de hemograma, serologías y sobre todo para cuantificación del factor VIII. La dosis de factor VIII que toma semanalmente el paciente se ajusta por el Hematólogo en función de los niveles de factor VIII medidos, de la clínica hemorrágica y también de la rutina diaria (ejercicios físicos, trabajo, edad) del paciente. En los pacientes incluidos en el estudio, se ha hecho coincidir los días de revisión anuales con la obtención de las muestras sanguíneas para el proyecto de investigación.

3.2. Protocolo experimental

Según el protocolo experimental, se extraía una analítica antes (muestra basal, período de

lavado, es decir, 72h sin administrar factor VIII) y otra después de la infusión de factor VIII que paciente traía de casa (muestra tras 15 minutos de la administración de factor VIII).

La muestra era extraída siempre por la misma enfermera experta, con aguja del nº 21 y sin el uso del compresor o torniquete, todo ello para minimizar la estimulación plaquetaria. Los primeros mililitros (2,5 ml) se usaban para las determinaciones necesarias del proyecto que no fuesen el estudio directo de funcionalidad plaquetaria, como por ejemplo la realización del hemograma (Recomendaciones de la *International Society on Thrombosis and Haemostasis/ISTH*).

Se extraía en cada extracción un total de 18 mL para cada grupo experimental (figura 15), siendo los grupos experimentales los siguientes:

Grupos experimentales:

Grupo 1- muestras de sangre de los pacientes con HA y una actividad mínima de factor VIII (muestra basal).

Grupo 2- muestras de sangre de los pacientes con HA y una actividad máxima de factor VIII (tras 15 minutos de factor VIII).

Grupo 3- muestras de sangre de voluntarios sanos, con una actividad de factor VIII normal.

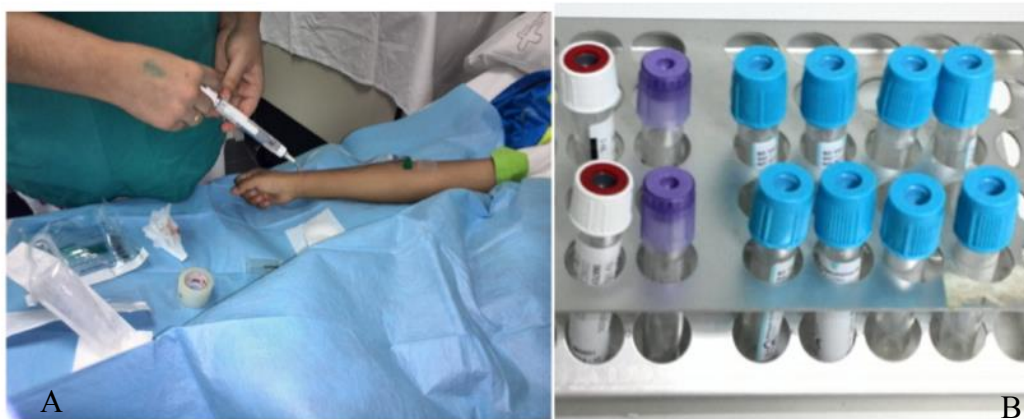


Figura 15. A) Infusión de factor VIII; B) Serie de tubos utilizados para el procesamiento de las muestras sanguíneas de los paciente hemofílicos (basal y tras infusión de factor VIII).

En todo momento es necesario procesar la muestra con cuidado para evitar la activación plaquetaria por la propia manipulación. Por ello, tras la extracción se deja reposar la sangre 15 minutos para su estabilización. Además, los estudios de función y activación plaquetaria se deben hacer lo más rápidamente posible después de la extracción de la sangre (no se debe exceder las 3 horas).

En el caso de no poder analizar inmediatamente la muestra, se puede fijar la suspensión diluida con 1 ml de paraformaldehído al 2 % en PBS y mantenerla a 4-8 °C durante 24-48 horas, pero sólo para aquellos protocolos en las se miden características basales de las plaquetas y que tras ser fijadas, pueden marcarse con anticuerpos monoclonales y estudiadas mediante citometría de flujo.

Cada muestra sanguínea de los diferentes grupos experimentales, se distribuye en diferentes tubos para su procesamiento posterior:

- 3 mL de sangre en tubo con EDTA (los primeros mL de la extracción) para realización del recuento plaquetar (hemograma) mediante el sistema Cell-dyn Sapphire System Abbott.
- 3 mL de sangre con citrato sodio 109 M, es decir, citrato al 3,2%, para determinación de % factor VIII, antígeno von Willebrand y cofactor von Willebrand (estudio cromogénico de coagulación especial) mediante el sistema Sysmex CA-1500–Hemostasis-Analyzer Siemens.
- 3 mL en tubo con hirudina para estudio plaquetar por impedancia mediante el sistema multiplate analyzer Roche, utilizando 20 microL de diferentes agonistas (ADP, ASPI, TRAP, COL, RISTO, EPI) en 300 microL sangre paciente.
- 3 mL de sangre en tubo citrato al 10% (3,2%), para estudio plaquetar mediante sistema PFA-100 System Siemens, donde se mide el tiempo de obturación al adicionar 800 µL de sangre del paciente en cada uno de los 2 pocillos donde se encuentra el kit del agonista (COL/EPI y COL/ADP).
- 3 ml de sangre con citrato al 10% (3,2%), para el estudio de función plaquetaria mediante agregometría de luz óptica.
- 3 mL de sangre en tubo citrato al 10% (3,13%), para estudio agregación (20 µl de agonista (TRAP 10 µM, concentración final) + 480 µl sangre) y activación plaquetaria (expresión de P-selectina) y calcio citosólico mediante citometría de flujo con el sistema FACSCanto™ (BD Biosciences) y el uso de anticuerpos monoclonales (BD Biosciences). Los datos de la citometría fueron procesados utilizando el programa Kaluza (Beckman Coulter). Las micropartículas se analizaron en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) en el Laboratorio de Citometría de Flujo-Centro de Citometría Coulter y Técnicas Afines en Valencia.

A continuación se muestra con más detalle los métodos utilizados en este estudio.

3.3. Parámetros analizados

3.3.1. Hemograma

El sistema CELL-DYN Sapphire (figura 16) es un analizador hematológico automático y multiparamétrico, diseñado para el estudio del hemograma y su caracterización en el diagnóstico *in vitro*.



Figura 16. Analizador hematológico CELL-DYN Sapphire

Las muestras de este estudio (en tubos con el anticoagulante EDTA) se procesaron con este sistema y se determinaron los parámetros de serie roja, plaquetas y leucocitos con su diferencial.

Este sistema utiliza el principio de impedancia para recuento de hematíes y determina el tamaño de las células (volúmenes corpusculares de eritrocitos y plaquetas). La impedancia eléctrica es la medida de la capacidad que tiene un objeto de oponerse al movimiento de una carga eléctrica. Se basa en el cambio de la resistencia eléctrica producido por una partícula suspendida en un diluyente conductor a su paso por una abertura de dimensiones conocidas. Los autoanalizadores hematológicos hacen uso del grado de impedancia generado por las células sanguíneas o partículas, para contar y determinar el tamaño de los eritrocitos y plaquetas.

La medición de la hemoglobina se realiza por espectrofotometría de absorción. Este proceso se basa en la relación lineal existente entre la cantidad de luz absorbida por una mezcla homogénea, en reposo, en una determinada banda de absorción y la concentración de la sustancia que absorbe la luz en la muestra (ley de Beer). En el sistema Cell-Dyn Sapphire se utiliza una dilución de hemoglobina como muestra y un complejo de hemoglobina como sustancia que absorbe la luz. El resto de parámetros de serie roja son cálculos deducidos (hematocrito, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media).

Por último, el sistema utiliza la dispersión óptica (citometría de flujo) para la lectura de leucocitos (WBC) y subpoblaciones leucocitarias (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos). Este principio se basa en la dispersión de la luz que tiene lugar cuando el haz del láser choca con una célula y cambia de dirección. En la citometría de flujo, los sensores detectan la luz dispersada, produciendo un pulso eléctrico medible que se envía al ordenador para ser analizado y almacenado. Estas señales ofrecen información sobre las características de las células, tales como tamaño, complejidad, granularidad citoplasmática y lobularidad nuclear, de gran utilidad en el proceso de identificación de las mismas. Estas características pueden deducirse a partir de la medición de la luz dispersada a determinados ángulos respecto al haz del láser.

Finalmente resaltar que el laboratorio donde se procesaron las muestras estaba sometido a acreditación según la norma UNE-EN ISO 15180:2013. (<https://www.enac.es/web/enac/entidades-acreditadas/>).

En la tabla 3 se exponen los rangos de normalidad en el laboratorio del HCUVA donde se han procesado las muestras.

Tabla 3. Hemograma. Rangos de normalidad obtenidos con el sistema CELL-DYN Sapphire en el laboratorio de hematología del HCUVA de Murcia.

PARÁMETROS	Rango de normalidad
Hematíes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,0-5,2
Hemoglobina (g/dL)	11,5-15,5
Hematocrito (%)	35,0-45,0
VCM (fL)	77,0-95,0
HCM (pg/célula)	25,0-33,0
CHCM (g/dL)	31,0-37,0
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	150,0-350,0
VPM (fL)	6,4-11,0
Plaquetas reticuladas (%)	0-6
Reticulocitos (%)	1-2
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4,50-13,00
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,80-6,50
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,50-6,50
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,00-0,80
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,00-0,50
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,00-0,20

3.3.2. Pruebas de coagulación especial

Mediante el sistema ACL TOP 700 CTS (Instrumentation Laboratory. Werfen Company)(figura 17) se procesaron muestras anticoaguladas con citrato sódico y se determinó el factor VIII, el Ag vW y el cofactor de la ristocetina con su diferencial.



Figura 17. Sistema ACL TOP 700.

Para la determinación de la actividad de los factores se utilizó un test de “un solo paso”. En esta prueba, la activación del factor y la formación de fibrina se producen en la misma solución de reacción (solución de prueba), que está compuesta por:

- Plasma deficiente en factor factor VIII (plasma sustrato): Kit HemosIL Núm. Cat. 0008466400.(Instrumentation Laboratory. Werfen Company)
- Plasma de control: Kit HemosIL Núm. Cat.0020003110 .(Instrumentation Laboratory. Werfen Company)
- Plasma control de técnicas especiales nivel: Kit HemosIL Núm. Cat.0020012000. (Instrumentation Laboratory. Werfen Company)
- Reactivo activador: Sílica coloidal (Synthasil) Kit HemosIL Núm. Cat. 0020006800 .(Instrumentation Laboratory. Werfen Company)
- Reactivo iniciador: Cloruro Cálcico 0,020 M. Kit HemosIL Núm. Cat. 00200069000 .(Instrumentation Laboratory. Werfen Company)

Un plasma deficiente en factor es un plasma al que le falta el factor a determinar, pero que contiene todos los demás factores necesarios para el proceso de coagulación, inclusive el fibrinógeno, con la actividad y en las concentraciones suficientes para la determinación a punto final.

Se utiliza plasma citratado pobre en plaquetas (PPP) para los ensayos de la actividad de los factores. Los ensayos sólo pueden realizarse con el material diluido con solución tampón.

Los ensayos de actividad del factor VIII sólo pueden hacerse por activación de la vía intrínseca con tromboplastina parcial (reacción del APTT) y un activador de superficie

(por ejemplo, la cefalina). Se usa una solución de cloruro cálcico como reactivo iniciador para desencadenar la coagulación. El tiempo transcurrido desde la incorporación del reactivo iniciador y la formación de fibrina se toma como medida de la actividad del factor de coagulación respectivo.

El plasma del paciente se diluye y se añade al factor plasma deficiente VIII. La corrección del tiempo de coagulación del plasma deficiente es proporcional a la concentración (% de actividad), de dicho factor en el plasma del paciente, obtenido a partir de una curva de calibración.

El factor von Willebrand antigénico (FvW: Ag) y el cofactor de la ristocetina del factor von Willebrand (FvW: Rco) se determinaron mediante inmunoensayo automatizado para la determinación cuantitativa de estos factores mediante el sistema ACL TOP 700. Se trata de una técnica de inmunturbidimetría amplificada con partículas de látex que permite cuantificar FvW: Ag y FvW: RCo en plasma citratado. En el caso de la determinación del FvW: Ag cuando se mezcla un plasma que contiene FvW: Ag con el Reactivo Látex y el Tampón de Reacción, las partículas de látex aglutinan; el grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de FvW: Ag contenida en el plasma y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causado por los agregados.

Material: Kit HemosIL von Willebrand Factor Antigénico contiene: reactivo látex (núm. Cat. 0020002310), reactivo buffer (núm. Cat. 0020002320). (Instrumentation Laboratory. Werfen Company)

En el caso de la determinación de FvW: Rco, un fragmento recombinante de la glicoproteína de las plaquetas (rGP1b α), receptor del FvW, se une a las partículas de látex por medio de un anticuerpo monoclonal específico que orienta el fragmento rGP1b α en la posición adecuada para que, en presencia de la ristocetina, pueda interactuar con el FvW del paciente. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la actividad de FvW en la muestra y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causada por los agregados.

Material: Kit HemosIL FvW: Rco contiene: reactivo latex (núm. Cat 0020300910), ristocetina (núm. Cat 00203000920), tampón (núm. Cat 00203000930), diluyente (núm. Cat 00203000930). (Instrumentation Laboratory. Werfen Company)

En la tabla 4 se exponen los rangos de normalidad obtenidos en el laboratorio del HCUVA donde se han procesado las muestras.

Tabla 4. Coagulación especial. Rangos de normalidad obtenidos el sistema ACL TOP 700 en el laboratorio de hematología del HCUVA de Murcia.

Pruebas de coagulación especial	Rangos de normalidad
FVIII	50-150 U/dL
Factor von Willebrand antigénico	66,1-176,3% <i>Grupo O: 42-140,8%</i>
Factor von Willebrand-cofactor Ristocetina	48,8-163,4% <i>Grupo O: 40,3-125,9%</i>

3.3.3. Función plaquetaria mediante PFA-100

Mediante el sistema PFA-100 (*Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL*) (figura 18) se procesaron muestras anticoaguladas con citrato sódico y se determinó el tiempo de obturación.

Se basa en la propiedad de las plaquetas de adherirse y agregarse ante situaciones de estrés o ante la presencia de un agonista. Analiza la función plaquetaria en sangre completa con reactivos que simulan la hemostasia primaria. Hay dos tipos de reactivos, uno que contiene colágeno más ADP, y otro colágeno más epinefrina. Una vez en la cubeta, la sangre completa citratada, se somete a un alto estrés a través de un capilar que finaliza en una membrana revestida de colágeno, en la cual hay una apertura microscópica de 147 μm , que se rellena con ADP o epinefrina. Un trombo rico en plaquetas rellena este orificio, debido al estrés y los agonistas. El tiempo que necesitan las plaquetas para ocluir este orificio se define como Tiempo de Obturación (TO), que representa una medida de la hemostasia global relacionada con las plaquetas. Ver figura 18.



Figura 18 Sistema PFA-100.

Materiales necesarios: Solución activadora Dade PFA (REF: B4170-50), Dade PFA cartuchos de prueba de colágeno/EPI (REF: B4170-20), Cartuchos de prueba de colágeno/ADP Dade PFA (REF: B4170-21) (*Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL*).

Procedimiento: Tras atemperar los cartuchos de los agonistas durante 15 minutos a 20°C, se colocan los cartuchos en el soporte del sistema PFA y se presiona hasta que los cartuchos de prueba se queden firmemente encajados. Se pipetea lentamente 800 μ L de sangre en la abertura más pequeña (abertura de depósito para muestras) del cartucho para que entre en contacto la sangre con los agonistas y se inicia la medida del tiempo de obturación.

En la tabla 5 se exponen los rangos de normalidad obtenidos en el laboratorio del HCUVA donde se han procesado las muestras.

Tabla 5. Función plaquetaria. Rangos de normalidad obtenidos con el sistema PFA-100 en el laboratorio de hematología del HCUVA de Murcia.

Pruebas	Media	Intervalo de referencia (5-95 percentil)
COL/EPI	110 segundos	85-155 segundos
COL/ADP	78 segundos	71-110 segundos

3.3.4. Multiplate, agregación plaquetaria por impedancia

Multiplate® Analyzer (Dynabyte medical. Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), es un analizador para el diagnóstico de funcionalidad y otros aspectos de la plaqueta que trabaja con una muestra de sangre total (ver figura 19).

La agregación por impedancia se basa en el principio que las plaquetas no son trombogénicas en sangre total, pero cuando son activadas exponen receptores que permiten la adhesión a los electrodos precalibrados. Esta adhesión requiere una plena activación de la plaqueta y reproduce los diferentes estados de la activación plaquetar.

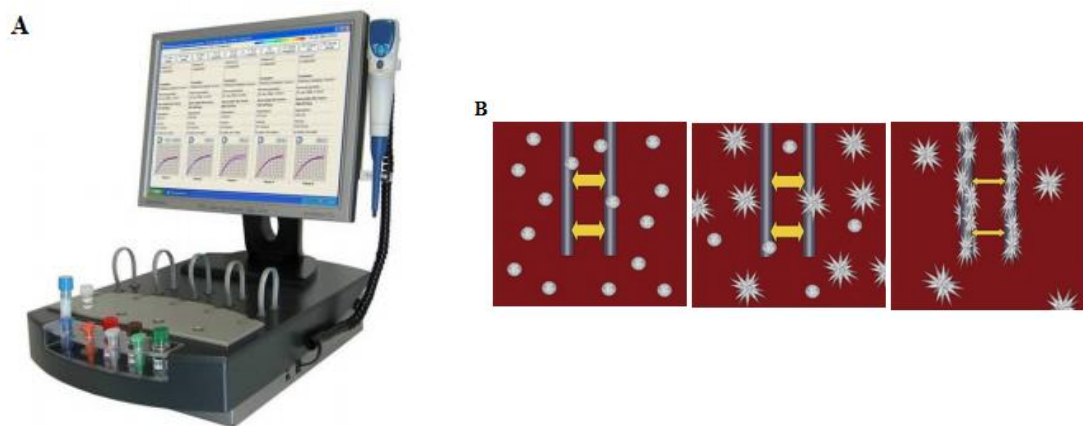


Figura 19. A) Analizador Multiplate® (Dynabyte medical). B) Agregación plaquetas a la superficie de los electrodos, tras adición del agonista.

Materiales necesarios:

- Muestra (300 μ L) a 18-25°C.
- Agonistas: ADP (ADP), colágeno (COL), epinefrina (EPI), ristocetina (RISTO), ácido araquidónico-TxA₂ (ASPI); péptido-6-PAR1-trombina (TRAP).
- Agua destilada.
- Tubo con anticoagulante hirudina.
- Solución salina (NaCl) al 0,9% (300 μ L) precalentada a 37°C.
- Sistema Multiplate, que consiste en un módulo analítico con 5 canales independientes; cada uno de estos canales dispone de un sistema de agitación magnética y regulación térmica autónomos. Cada una de las cubetas plásticas desechables presenta dos pares de electrodos precalibrados y preparados para la medición y un imán recubierto de teflón que se agita al introducir la cubeta en la zona de medición.

Procedimiento:

1. Extracción de muestra de sangre en tubo de hirudina de 3 ml (se prefiere en hirudina aunque se acepta citrato-diluyente NaCl del fabricante).
2. Reconstitución reactivos con 1 ml agua destilada y reposo 10 minutos.

- Se pueden guardar a 6° durante 7 días en frigorífico o -20° durante 4 semanas en congelador (NOTA: colágeno no se pueden congelar).
- Se aplica 300 µL de solución salina en zona habilitada de la cubeta del multiplate, se precalienta a 37°C.
 - Se aplica muestra de sangre total de 300 µL en el lugar correspondiente de la cubeta del multiplate.
 - Período de incubación 3 minutos.
 - Se conectan dos electrodos de platino a las cubetas del multiplate.
 - Se añaden a continuación los reactivos a estudio (20 microL todos los reactivos, excepto RISTO HIGH que son 50 microL y RISTO LOW que son 12 microL) a las cubetas correspondientes.
 - Puesta en marcha del analizador (multiplate—control electrónico) durante 6 minutos. Visualizaremos las curvas de agregación plaquetaria en tiempo real en la pantalla del ordenador.

La adición de un agonista estimula la agregación de las plaquetas en la superficie de los electrodos, lo que impide el flujo de la corriente eléctrica. El aumento en la resistencia al flujo de electricidad o impedancia es proporcional a la agregación.

En la tabla 6 se exponen los rangos de normalidad obtenidos en el laboratorio del HCUVA donde se han procesado las muestras.

Tabla 6. Función plaquetaria. Rangos de normalidad obtenidos con el sistema Multiplate en el laboratorio de hematología del HCUVA de Murcia.

AGONISTAS	<i>ADP</i>	<i>COL</i>	<i>TRAP</i>	<i>ASPI</i>	<i>EPI</i>	<i>RISTO HIGH</i>	<i>RISTO LOW</i>
ABC (área bajo la curva) UA/m	57-113	72-125	84-128	71-115	10-44	98-180	0-20

El aumento de la impedancia por la unión de las plaquetas al electrodo se transforma en unidades arbitrarias de agregación (UA), que se representa en la gráfica en el eje de las ordenadas frente al tiempo en el de las abscisas. Se calculan 3 parámetros: la agregación máxima (punto máximo de la curva), la velocidad (pendiente de la curva) y el área bajo la curva (ABC). Los 2 primeros parámetros son usados preferentemente en investigación, mientras que el ABC se presenta como el parámetro de mayor relevancia para el propósito clínico. El ABC se afecta simultáneamente por la agregación máxima y la velocidad, y por ello expresa más adecuadamente el funcionamiento general de la plaqueta (se expresa en unidades de agregación por minuto).

Como se puede observar en la figura 20, se realizan 2 mediciones separadas, ya que cada cubeta dispone de 1 par de electrodos. Estos parámetros son calculados por el software del sistema y representan los valores medios para los parámetros determinados en cada curva. Para cada par de curvas se determina el coeficiente de correlación y la diferencia de la media (para que sean fiables los resultados la diferencia de la media debe ser $< 20\%$ y el coeficiente de correlación debe estar comprendido entre 0,9-1).

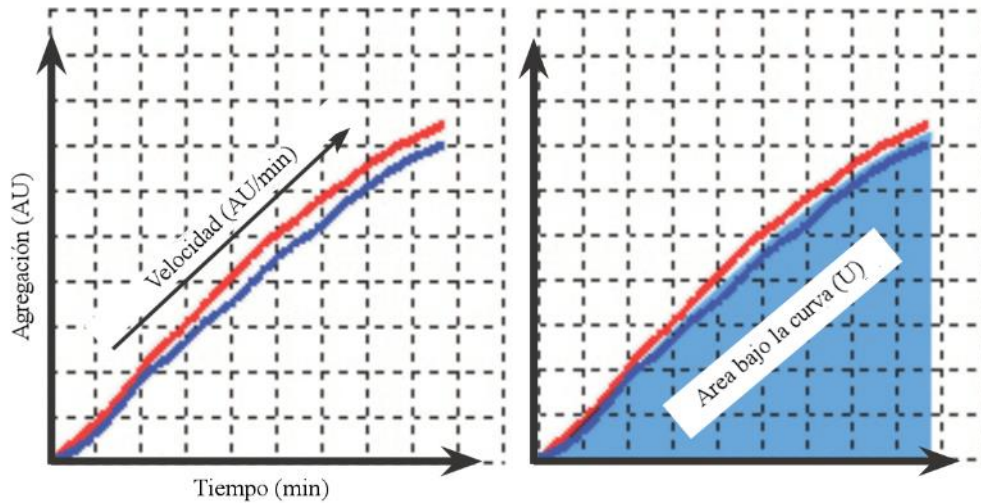


Figura 20. Representación de la agregación plaquetaria (en unidades arbitrarias, AU) en sangre entera obtenida en el sistema multiplate. Se representa a la izquierda un ejemplo de las curvas tipo obtenidas con los dos electrodos de cada cubeta (color rojo y azul) y a la derecha, el área bajo la curva (ABC).

En la figura 21 se muestra trazados representativos obtenidos en el sistema Multiplate, mediante el uso de diferentes agonistas.

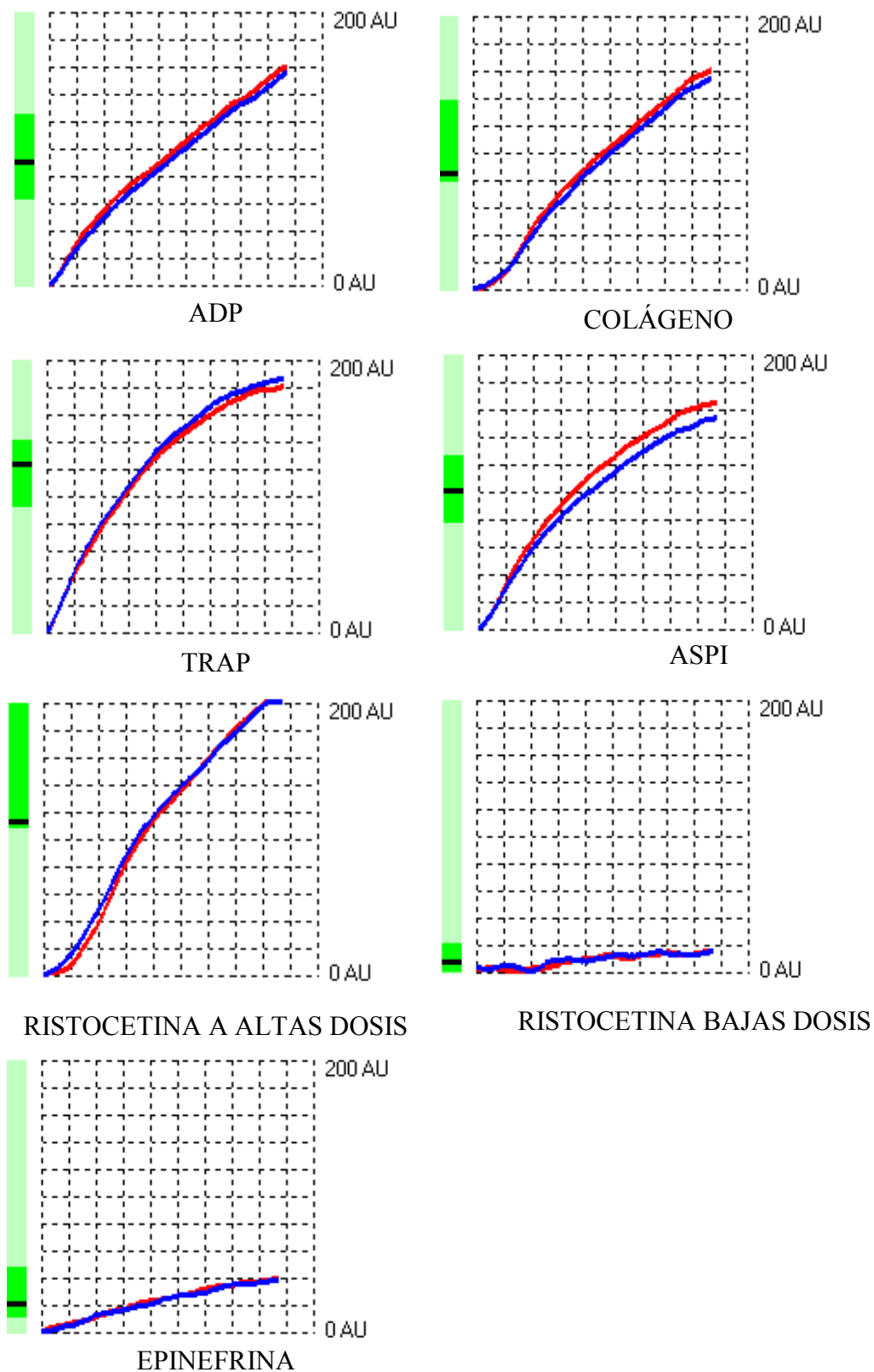


Figura 21 .Curvas de agregación plaquetaria en sangre entera obtenidas con el sistema Multiplate: respuestas tipo a los diferentes agonistas utilizados.

3.3.5. Chronolog, agregómetro óptico/espectrofotómetro con plasma rico en plaquetas

En la agregometría óptica o turbidimetría, la función plaquetaria se mide mediante cambios en la transmisión de la luz debido a la formación de agregados plaquetarios. Para la medida de la agregación en plasma rico en plaquetas mediante agregometría óptica se ha utilizado el sistema Chronolog® (Chrono-log Corporation, Havertown, USA)(figura 22).



Figura 22. Sistema de agregometría óptica CHRONO-LOG® Model 700.

En 1962, Born desarrolló una técnica para estimar la cinética de la agregación de las plaquetas por medio de la turbidimetría (medición de turbidez o densidad óptica). Este método, se modificó hasta que se desarrolló un sistema automatizado que funciona a 37°C, en el que se deposita la muestra de plasma rico en plaquetas (PRP) en un tubo siliconado, que se encuentra entre una fuente de luz y una foto-celda de medición, que calcula la densidad óptica o turbidez del PRP. Se basa en la medición por espectrofotometría del cambio turbidimétrico que se produce a medida que las plaquetas, en agitación constante, se agregan ante el estímulo de un agonista. Cuando a la muestra de PRP, se le adiciona el agonista, las plaquetas se agregan en respuesta a éste y la muestra se vuelve menos turbia, por lo cual aumenta la transmitancia (transmisión de la luz) y la señal detectada por el espectrofotómetro. A partir de este cambio gradual se obtiene la curva de agregación (76).

La preparación del PRP requiere la separación de las plaquetas del resto de las células de la sangre por medio de centrifugaciones lentas; también se requiere la preparación del plasma pobre en plaquetas (PPP) por medio de centrifugaciones rápidas, para ajustar el número de plaquetas por tubo. La calibración de la transmisión de la luz a través del PPP (plasma claro) se ajusta al 100% y la transmisión de luz a través del PRP (plasma turbio u opaco) se ajusta a 0%.

Materiales necesarios:

- Muestra de sangre en tubo de citrato al 3,13%.
- Obtención de 225 μL PRP (plasma rico en plaquetas) y PPP (plasma pobre en plaquetas) de la muestra sanguínea usando la centrifuga.
- Agonistas (25 μL) a diferentes concentraciones según las recomendaciones de la ISTH: epinefrina (5 μM), ácido araquidónico (1 mM), trombina (10 μM), ristocetina (1.2 mg/ml), ADP(2 μM) y colágeno(2 $\mu\text{g/ml}$).
- Sistema Chronolog. Consta de cubetas y analizador de las curvas de agregación en ordenador.

Procedimiento:

1. Para preparar el PRP, se centrifuga la muestra sanguínea a 1.500xg durante 15 minutos a 21°C (t° ambiente). Según las recomendaciones de la ISTH no se ajusta con PPP el número de plaquetas en el PRP.
2. Tras la obtención de PRP y PPP se dejan en reposo durante 15 minutos.
3. Se añade PRP (225 μL) en la cubeta correspondiente del sistema Chronolog.
4. Programar en el sistema Chronolog el 0% de transmisión de luz usando el PRP y el 100% usando el PPP. Antes de añadir el agonista en la cubeta, debe realizarse un trazado de la línea basal que dure al menos un minuto, asegurándonos así la estabilidad de la muestra.
5. Se agregan agonistas (25 μL) de inducción plaquetaria: epinefrina, ADP, colágeno, ácido araquidónico, trombina, ristocetina. El volumen de agonista no debe superar el 10% del volumen de la muestra.
6. Monitorización de la agregación durante al menos 6 minutos.
7. La luz pasa por la cubeta y se captura por el detector o fotocelda en el lado opuesto. Conforme las plaquetas se agregan, el PRP se aclara y se transmite mayor cantidad de luz. La transmisión de la luz se mide en tiempo real y se grafica el porcentaje del aclaramiento de la muestra (figura 23). La transmisión de la luz es directamente proporcional a la agregación plaquetaria (a mayor agregación, mayor transmisión de la luz).

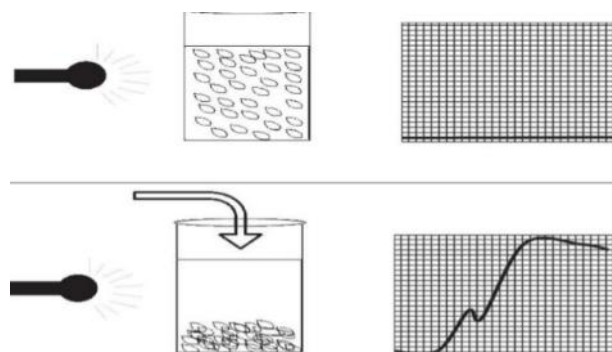


Figura 23. Ejemplo de registro de los cambios de la transmisión de la luz en dos muestras de PRP, en la superior en condiciones basales, sin agregar y en la inferior, cuando se produce la agregación plaquetaria y aumenta la transmisión de luz.

En la figura 24 se presenta una curva típica de agregación plaquetaria, en la que podemos distinguir las siguientes partes:

1. Incremento inicial de la transmisión de la luz atribuible a dilución del PRP por el agonista que añade.
2. Discreta disminución de la transmisión conforme las plaquetas cambian de forma.
3. Incremento agudo inicial de la transmisión conforme las plaquetas se agregan (agregación primaria).
4. Meseta breve o disminución de la agregación.
5. Agregación secundaria que se estimula por la secreción de gránulos plaquetarios. La onda de agregación puede ser única o bifásica, dependiendo del tipo de agonista y su concentración. La onda única se produce con agonistas fuertes, como la trombina y la bifásica con agonistas débiles como el ADP.

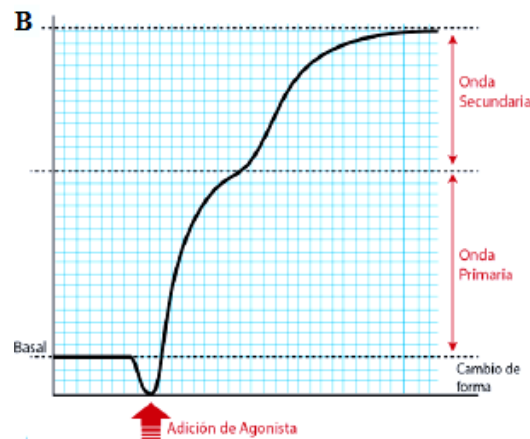


Figura 24. Evaluación de la respuesta plaquetaria por agregometría óptica: curva de agregación plaquetaria.

3.3.6. Función plaquetaria mediante citometría de flujo

El estudio del estado de activación de las plaquetas circulantes, agregados plaqueta-leucocito, reactividad plaquetaria *in vitro* (respuesta a agonistas medida como agregación en sangre entera, activación plaquetaria, agregados plaquetas-leucocitos, expresión factor tisular y cambios en el calcio intracelular) se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) (figura 25) en muestras de sangre completa. Como marcador de superficie plaquetario se usó la glicoproteína GPIIb/IIIa (CD61), como marcador leucocitario CD45 y como marcadores de activación plaquetaria la P-selectina (CD62P) y la GP53 (CD63). Tanto la P-selectina como el CD63 sólo se expresan en plaquetas activadas.



Figura 25. Citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

La citometría de flujo permite el estudio de la función plaquetaria en muestras de sangre completa (en inglés denominado: “whole blood flow cytometry”), sin necesidad de centrifugar la sangre para obtener las plaquetas. Así la citometría de sangre completa, se usa para la determinación del estado de activación de las plaquetas circulantes, mediante el uso de anticuerpos específicos que se unan a marcadores de activación plaquetaria, como P-selectina (CD62P) o CD63. Además del estudio *in vivo* de la función plaquetaria, podemos estudiar la reactividad de las plaquetas circulantes *in vitro* mediante la adición exógena de agonistas plaquetarios a la muestra sanguínea. En este último caso, tenemos un ensayo fisiológico de la función plaquetaria en el que un agonista produce un cambio en la expresión de un receptor (o de otro antígeno o ligando de unión) de la superficie plaquetaria, que es medido mediante el cambio en la unión a un anticuerpo monoclonal específico para ese receptor o ligando.

El principio básico de la citometría, consiste en hacer pasar partículas o células en una suspensión con flujo laminar por delante de una fuente de luz (láser). Posteriormente, mediante los detectores se recoge el patrón de dispersión de la luz que ha originado cada una de las células con respecto a la luz emitida por los fluorocromos estimulados por la fuente de luz. A pesar de que la luz se dispersa en todas las direcciones, los dos componentes principales son: la dispersión frontal o “forward scatter” (FSC), que detecta el tamaño celular y la dispersión lateral o “side scatter” (SSC), que detecta la complejidad o granularidad celular, es perpendicular al haz de luz del láser. Además, cuando las células han sido marcadas con un fluorocromo, para detectar una molécula celular, al ser excitadas por la fuente de luz, estas retornan a su estado basal emitiendo fluorescencia, luz de longitud de onda superior. Esta luz pasa a través de diversas lentes y se dirige hacia una serie de filtros ópticos y detectores que reconocen determinadas longitudes de onda. Varios sensores detectan las señales y transforman la intensidad lumínica en una señal digital, que posteriormente es analizada por un ordenador. Los resultados se muestran en forma de histograma o bien como gráfico de puntos o “dotplot”. Para cada célula, se analizan dos parámetros de dispersión (SSC/FSC) y como mínimo una fluorescencia.

Materiales necesarios:

- Marcadores de citometría CDs: CD61PerCP (BD347408, Beckton Dickinson), CD62P APC (MCA 796F, Serotec), CD63 FITC (BD557288), FT142 FITC (BD 550312), CD45 FITC (BD 345808).
- Fijadores: platelets solutions LTD (AggFixA y AggFixB (PSR-002/2B), PAMFix (PSR-001)).
- Agonista TRAP-6 (Sigma, T1513)
- FACSflow buffer citómetro.
- Agua destilada.
- Tubos de citrato al 3.2%
- FACS canto BD.
- MSA (Multi Sample Agitator, termobloque agitador). El MSA (figura 26) es un sistema que combina el control de temperatura mediante un termobloque y el control de agitación (mediante pequeños imanes individuales en cada tubo). En él se realizan los protocolos de activación y agregación plaquetaria en sangre entera. Las muestras son fijadas inmediatamente después de finalizar el tiempo predeterminado en el protocolo y analizadas posteriormente en el citómetro.



Figura 26. MSA (Multi Sample Agitator, University of Nottingham).

3.3.6.1. Medición de la agregación plaquetaria en sangre entera

La agregación plaquetaria en respuesta a un agonista (ADP o TRAP) se ha medido mediante citometría de flujo monitorizando el número de plaquetas en muestras de sangre entera diluida. Para ello se ha seguido el método descrito por Fox et al. en 2009. Este método permite el estudio de la agregación en sangre entera con un volumen pequeño de muestra del paciente (108).

Procedimiento

Se colocan alícuotas de sangre entera anticoagulada con citrato sódico en el termobloque MSA a 37°C y 1000 rpm. Se añade el agonista y tras 4 minutos se para la reacción. La agregación se determina como la caída en el conteo de plaquetas en la muestra de sangre comparado con una muestra de sangre que contiene EDTA. Así, la agregación se calcula como un porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ agregación} = \frac{100 \times [\text{contaje EDTA} - \text{contaje muestra}]}{[\text{contaje EDTA}]}$$

“contaje EDTA”: número de eventos plaquetarios presentes en una muestra conteniendo EDTA;

“contaje muestra”: número de eventos plaquetarios en la muestra a estudiar.

Se detalla a continuación los pasos a seguir:

1. Se colocan 20 µL de solución salina o agonista en el fondo de los tubos pequeños. Sobre esos 20 µL se añaden 480 µL de sangre desde el tubo de extracción (que está preincubado a 37°C durante 3 min). Los tubos con los agonistas deben contener un imán para permitir la agitación y precalentarse durante 2 minutos antes de añadir la sangre:
 - a. Tubo A: Basal..... 20 µl de salino + 480 µl sangre
 - b. Tubo B: Agonista.....20 µl de Agonista (TRAP 10 µM, concentración final) + 480 µl sangre.
2. Dejamos los tubos 5 minutos a 37 °C y con agitación (1000rpm).
3. Se añade a cada tubo 167 µl del fijador AggFix (A), se retiran de 37°C (del termobloque) y se pasan a temperatura ambiente, se tapan y se mezclan bien, invirtiendo el tubo 3 veces.
4. Se dejan reposar 20-30 min a temperatura ambiente.
5. Tomamos 50 µL de la muestra fijada con AggFixA y añadimos a un tubo que contiene 450 µL de AggFixB y mezclamos bien, invirtiendo el tubo 3 veces y guardamos en el frigorífico (4°C) hasta su posterior análisis de las muestras en el citómetro. La solución AggFix está optimizada para que los agregados plaquetarios y los agregados leucocito-plaqueta permanezcan estables por los menos 9 días.
6. Medimos la agregación por citometría de flujo. Para ello, a 5 µL muestra fijada se le añade 10 µL de la mezcla de marcadores-anticuerpos plaquetarios (CD61-PerCP (1:8) e incubamos 25-30 minutos a 2-8°C. A continuación añadimos 0.5 mL de FACS flow y medimos en el citómetro.

En la figura 27 se muestra el gráfico de puntos obtenido y la estrategia de selección seguida para la obtención de la población de plaquetas. Las plaquetas son marcadas con CD61-PerCP y se representan los eventos obtenidos en side-scatter frente a fluorescencia. R-3 son partículas, PLQ la población de plaquetas y R-5 los agregados plaquetarios. Se observa que los eventos en la zona de PLQ de la parte inferior del gráfico disminuyen, lo que significa que las plaquetas se han agregado (no pueden entrar en el tubo del citómetro las plaquetas agregadas). A mayor agregación, menor número de plaquetas se detectan por el citómetro.

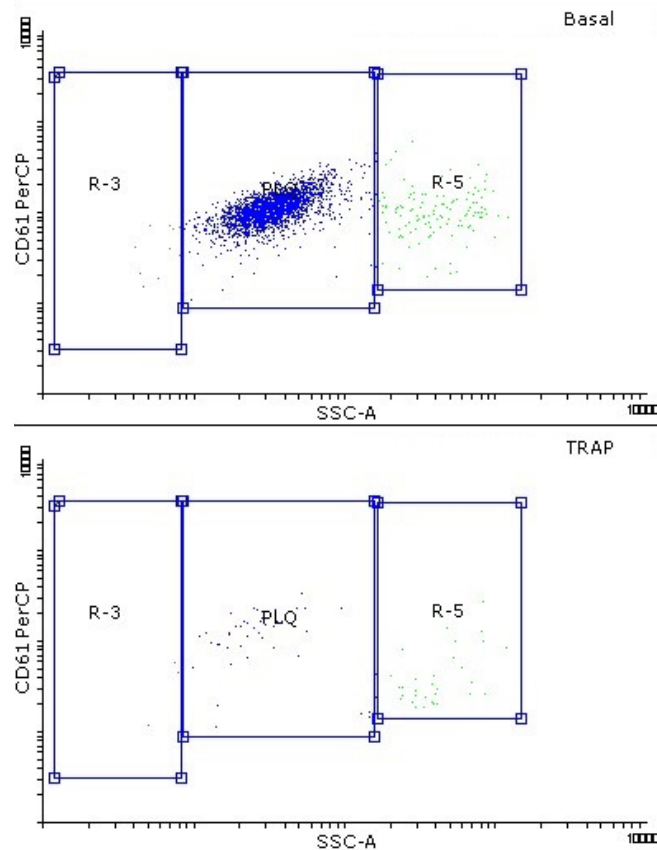


Figura 27. En la parte superior se encuentra la sangre en condiciones basales y en la parte inferior tras la activación con agonista TRAP-6. En el recuadro denominado PLQ se pueden ver el número de plaquetas.

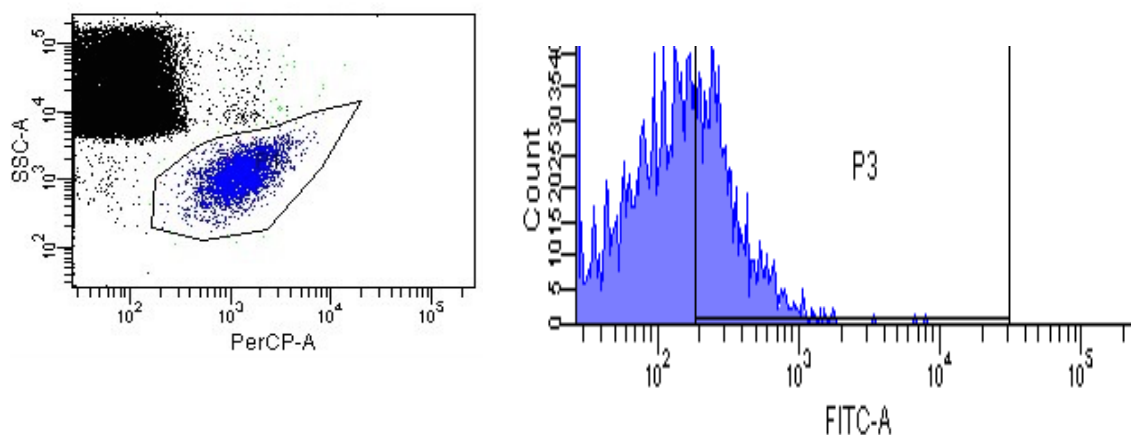
3.3.6.2 Determinación de la activación plaquetaria

El grado de activación plaquetaria en las muestras de sangre, se mide mediante citometría de flujo, como la cantidad de expresión de factores de activación plaquetaria P-selectina y CD63 (ver figura 28).

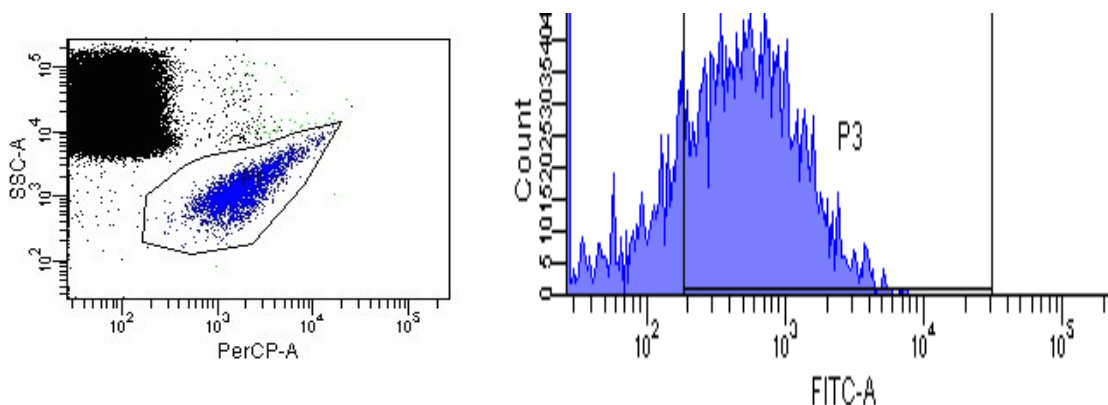
Para ello se siguen los siguientes pasos:

1. Preparar 2 tubos:
 - a. Tubo A (Basal): 20 μ L de solución salina + 20 μ L EDTA (4mM, concentración final) + 460 μ L sangre.
 - b. Tubo B (Agonista): 20 μ L de Agonista TRAP (10 μ M, concentración final) + 20 μ L EDTA (4mM, concentración final) + 460 μ L sangre.
2. Dejar los tubos 5 minutos a 37 °C, sin agitación.
3. Añadir a cada tubo 1 ml del fijador PAMFix invirtiendo el tubo 3 veces y guardar en el frigorífico (4°C), hasta su posterior análisis en el citómetro. Se tapan y se mezclan bien, invirtiendo el tubo 3 veces.
4. Añadir 5 μ L muestra fijada + marcadores-anticuerpos plaquetarios 5 μ L (CD61-PerCP (1:8) y 5 μ L CD62 P (dilución 1:20) y/o 5 μ L CD63 (1:5).
5. Incubar 25-30 minutos a 2-8°C.
6. Añadir 250 μ L FACS Flow.

7. Medir en el citómetro.



BASAL/SIN AGONISTA



TRAS TRAP

Figura 28. Selección de la población de plaquetas (a la izquierda) mediante CD61-PerCP y CD62P – FITC para medir (a la derecha) la expresión de P-selectina (intensidad media de fluorescencia, IMF). En panel superior una muestra basal sin agonista y en el inferior una muestra estimulada con TRAP. Analizado con el software Flowing.

3.3.6.3. Agregados plaqueta-leucocito

Cuando las plaquetas circulan activadas, expresan en su superficie P-selectina (CD62P), que se une a su ligando en los leucocitos PSGL-1 (del inglés, P-selectin glycoprotein ligand-1) (también conocido como CD162), formando agregados neutrófilo-plaqueta o monocito-plaqueta. El PSGL-1 se expresa de forma constitutiva en los leucocitos. Estos agregados son un marcador de activación plaquetaria, más sensible que la expresión de P-selectina (109). La detección de agregados plaqueta-leucocito se realiza por citometría de sangre completa, mediante el uso de la dispersión lateral de la luz (side scatter), de un anticuerpo específico leucocitario (monoclonal anti CD45) y de un anticuerpo plaquetario (monoclonal anti CD61). Los resultados se expresan como el porcentaje de la población

total de leucocitos que son positivos para el marcador plaquetario (ver figura 29). No se mide la cantidad de plaquetas o micropartículas plaquetarias unidas a cada leucocito.

Materiales

- Citómetro FACSCanto II (BD Biosciences).
- Sangre completa anticoagulada con citrato sódico 3,2%.
- Anticuerpos monoclonales anti CD45 y anti CD61 (GPIIIa).
- tampón de fijación.
- Sistema calefactor con agitación MSA.

Procedimiento:

Se colocan 20 μ L de solución salina o agonista en el fondo de los tubos pequeños, donde se va a realizar el experimento. Sobre esos 20 μ L se añaden 480 μ L de sangre desde el tubo de extracción que ha estado incubado a 37°C. Los tubos con los agonistas deben contener un imán para permitir la agitación y precalentarse durante 2 minutos antes de añadir la sangre.

Se detallan a continuación los pasos a seguir:

1. Se colocan:
 - Tubo A: Basal..... 20 μ l de salino + 480 μ l sangre
 - Tubo B: Agonista....20 μ l de Agonista TRAP (10 μ M, concentración final) + 480 μ l sangre.
2. Dejar los tubos 5 minutos a 37 °C y con agitación (1000rpm).
3. Añadir a cada tubo 167 μ l del fijador AggFix, se retiran de 37°C del termobloque (MSA) y se pasan a temperatura ambiente, se tapan y se mezcla bien, invirtiendo el tubo 3 veces.
4. Se dejan reposar 20-30 min a temperatura ambiente.
5. Coger 50 μ L de la muestra fijada con AggFix y añadirla a un tubo que contenga 450 μ L de AggStabiliser) y mezclar bien, invirtiendo el tubo 3 veces y guardar en el frigorífico hasta que se pueden analizar las muestras en el citómetro.
6. Citometría. 5 μ L muestra fijada + 5 μ L de anticuerpo plaquetario CD61 marcado con PerCP (1:8) + 5 μ L de anticuerpo leucocitario (CD45) marcado con FITC (dilución 1:10).
7. Incubar 25-30 minutos a 2-8°C. A continuación añadir 2 mL de agua destilada y centrifugar a 400 g durante 10 minutos a 15°C. Una vez realizada la centrifugación hay que decantar los tubos en un papel secante para eliminar el sobrenadante (restos o lisis de glóbulos rojos).
8. Añadir 0.3 mL de FACS flow (buffer) y medir en el citómetro.
9. Analizar. Tras seleccionar los leucocitos mediante el forward scatter, se enfrentan una gráfica de puntos leucocitos frente a plaquetas. El cuadrante representado en la figura 12 como R2 representa las partículas positivas para CD45 (leucocitos que además son positivas para CD61 (plaquetas). Se divide R2 por el número total

de leucocitos (todos los eventos CD45 positivos) para obtener el % de agregados plaqueta-leucocito.

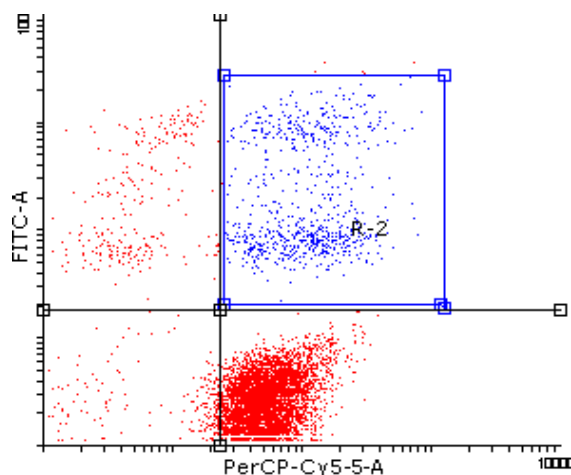


Figura 29. Análisis mediante citometría de flujo de las muestras de sangre entera para la determinación de los agregados plaqueta-leucocito. En la figura se representa fluorescencia del CD45 en PerCP-Cy5.5 frente a fluorescencia del CD61 en FITC. En el cuadrante superior derecha (R2) se encuentran los eventos positivos para ambas fluorescencias, que se consideran agregados plaqueta-leucocito.

3.3.6.4. Agregados plaqueta-Factor tisular

Los monocitos y neutrófilos forman agregados con las plaquetas activadas (agregados plaqueta-leucocito), mediante la interacción de la P-selectina plaquetaria con el receptor PSGL-1 leucocitario. Las señales intracelulares resultantes producen un aumento de expresión del FT en los leucocitos, que también puede ser transferido a las plaquetas. El aumento de FT es una medida de la actividad procoagulante de los agregados plaqueta-leucocito (figura 30).

Procedimiento:

Colocamos 20 μ L de solución salina o agonista en el fondo de los tubos pequeños, donde realizaremos los experimentos. Sobre esos 20 μ L añadimos 480 μ L de sangre desde el tubo de extracción que ha estado incubado a 37°C. Los tubos con los agonistas deben contener un imán para permitir la agitación y precalentarse durante 2 minutos antes de añadir la sangre. Se detallan a continuación los pasos a seguir:

1. Se colocan:
 - a. Tubo A: Basal.....20 μ l de salino + 480 μ l sangre
 - b. Tubo B: Agonista....20 μ l de Agonista (TRAP 10 μ M, concentración final) + 480 μ l sangre.
2. Dejar los tubos 5 minutos a 37 °C y con agitación (1000rpm).
3. Añadir a cada tubo 167 μ l del fijador AggFix, se retiran de 37°C (del termobloque) y se pasan a temperatura ambiente, se tapan y se mezcla bien, invirtiendo el tubo 3 veces.
4. Se dejan reposar 20-30 min a temperatura ambiente.

5. Coger 50 μL de la muestra fijada con AggFix y añadirla a un tubo que contenga 450 μL de AggStabiliser) y mezclar bien, invirtiendo el tubo 3 veces y guardar en el frigorífico hasta que se pueden analizar las muestras en el citómetro.
6. Medida mediante citometría de flujo. 5 μL muestra fijada + 5 μL de anticuerpo plaquetario CD61 marcado con PerCP (1:8) + 5 μL de FT (anticuerpo CD142) marcado con FITC (sin diluir, a una concentración final de 100 microgr/ml).
7. Incubar 25-30 minutos a 2-8°C. A continuación añadir 2 mL de agua destilada y centrifugar a 400 g durante 10 minutos a 15° C. Una vez realizada la centrifugación se decantan los tubos en un papel secante para eliminar el sobrenadante (restos o lisis de glóbulos rojos).
8. Añadir 0.3 mL de FACS flow (buffer) y medir en el citómetro. En la figura 30 se muestra la población seleccionada como doblemente positiva, tanto al FT, como al marcador plaquetario.

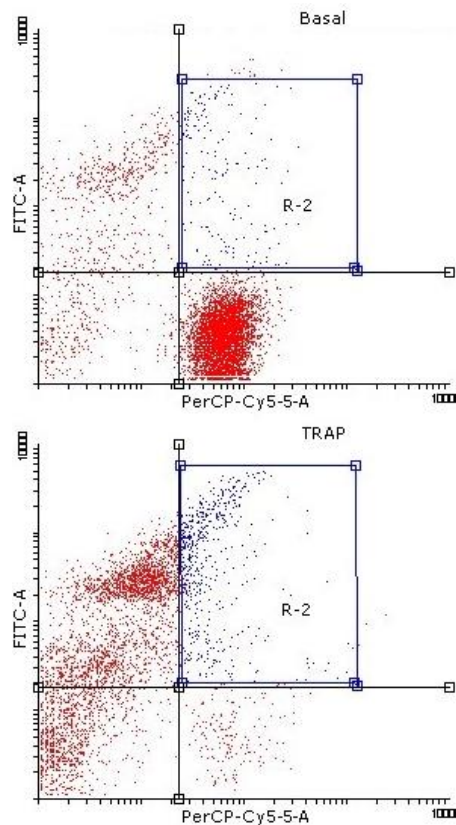


Figura 30. Análisis por citometría de sangre completa de las plaquetas positivas para FT en una muestra sanguínea en condiciones basales (arriba) y tras activación con el agonista TRAP (abajo) (concentración final 10 μM). Las plaquetas son identificadas mediante su unión al monoclonal específico para CD61 conjugado con PerCP-Cy5-5 y el FT mediante el anticuerpo específico para CD142 conjugado con FITC.

3.3.7. Análisis de micropartículas procoagulantes mediante citometría de flujo

La fosfatidil-serina (PS) es un lípido cargado negativamente de la porción interna de la bicapa de fosfolípidos de la membrana plaquetaria. Se expone en la porción externa de la bicapa lipídica tras la activación plaquetaria. La activación plaquetaria también da lugar a la formación de micropartículas plaquetarias que contienen en su superficie PS. La PS facilita la activación, en la superficie plaquetaria o de las micropartículas plaquetarias, de los complejos de la coagulación tenasa y protrombinasa, al activar el factor X y la protrombina.

La PS expuesta en las micropartículas plaquetarias se usa como una medida de la actividad procoagulante de las micropartículas y se detecta por citometría de flujo mediante la medida de la unión de anexina V. Se consideran micropartículas plaquetarias procoagulantes, aquellas micropartículas (menor de 1 μm) que unen un anticuerpo monoclonal específico plaquetario y además unen anexina V en presencia de Ca^{2+} extracelular.

La medición de micropartículas se realizó en un citómetro de flujo con características técnicas que permiten la detección de pequeñas partículas, el Gallios de Beckman Coulter (figura 31). Las medidas se realizaron en el Laboratorio de Citometría de Flujo-Centro de Citometría Coulter y Técnicas Afines del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina (Universidad de Valencia, España). Su medida fue realizada bajo la supervisión del equipo técnico de este laboratorio.



Figura 31. Citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter).

Materiales

- Citómetro Gallios (Beckman Coulter).
- Soluciones (Buffers). Las soluciones utilizadas en este protocolo experimental tienen que ser filtradas antes de su uso, con un filtro de 0,1 μm (Becton Dickinson).
 - ✓ Solución madre de CaCl_2 0.1 mol/L: Disolver 1.47 g CaCl_2 en 100 ml agua destilada (estéril). Almacenar a 2-8 $^{\circ}\text{C}$

- ✓ Solución madre de citrato sodio 3.2%: Disolver 1.6 g citrato en 50 ml agua destilada (estéril). Almacenar a 2-8 °C
- ✓ $PBS-Ca^{2+}$ (2.5 mmol/L $CaCl_2$): Mezclar 39 ml PBS (1.4 mmol/L) and 1 ml $CaCl_2$ 0.1 mol/L. Ajustar pH= 7.4. Filtrar (0.1 μ m). Preparar el mismo día del experimento
- ✓ $PBS-citrato$ (0.32%): Mezclar 9 ml PBS (1.4 mmol/l) y 1 ml citrato 3.2%. Ajustar pH=7.4. Filtrar (0.1 μ m). Preparar el mismo día del experimento.
- Anticuerpos monoclonales: CD61PerCP (BD Biosciences 347408, San Diego, CA, EEUU); CD62P-APC (MCA 796F, Serotec), CD144-PE (BD561714); Anexina V-FITC (BD550474).
- Filtros 0,1 μ m (Becton Dickinson).
- (BD Trucount Tubes - BD Biosciences)
- Megamix-Plus FSC (BioCytex). Megamix-Plus FSC contiene una mezcla de perlas fluorescentes de diámetros variados (0,1/0,3/0,5/0,9 μ m) seleccionados para cubrir el rango teórico de las MP (0,1 a 1 μ m). Está ajustado para citómetros de flujo optimizados con FSC de alta sensibilidad (por ejemplo Beckman Coulter Gallios® o Navios®). La adquisición de perlas de acuerdo con el procedimiento detallado en el manual del fabricante permite establecer en el citómetro la región donde se sitúan las MP (al poder ajustar el umbral FSC) y obtener conteos de MP reproducibles.

Procedimiento

Para limitar el ruido de fondo, se usó fluido filtrado con filtros de 0,22 μ m. Se estandarizó el protocolo de adquisición de las MP mediante el uso de perlas fluorescentes de tamaños variados en un rango de 0,1 a 1 μ m (Megamix-Plus FSC). Para seleccionar la población de MP, se hizo representó Tamaño (FSC) frente a complejidad (SSC) en una escala logarítmica. Se usaron controles con una sola fluorescencia para realizar la compensación de las fluorescencias y obtener la región positiva. MP procoagulantes se definen como fosfatidilserina positivas (PS+), a las que llamamos anexina positivas. MP plaquetarias procoagulantes son doblemente positivas, para anexina y CD61 o para anexina y CD62P. MP endoteliales procoagulantes son doblemente positivas para anexina y CD144. A cada muestra se añade una solución de partículas fluorescentes a una concentración establecida (trucount, Becton Dickinson) para expresar el conteo de MP como un valor absoluto por microL de plasma. Para el cálculo de las MP se usa la siguiente fórmula: $\text{Micropartículas/ul} = (\text{n}^\circ \text{ eventos micropartículas} / \text{n}^\circ \text{ eventos trucount beads}) * (\text{n}^\circ \text{ total de Trucount/ ul de muestra})$. (ver figura 32)

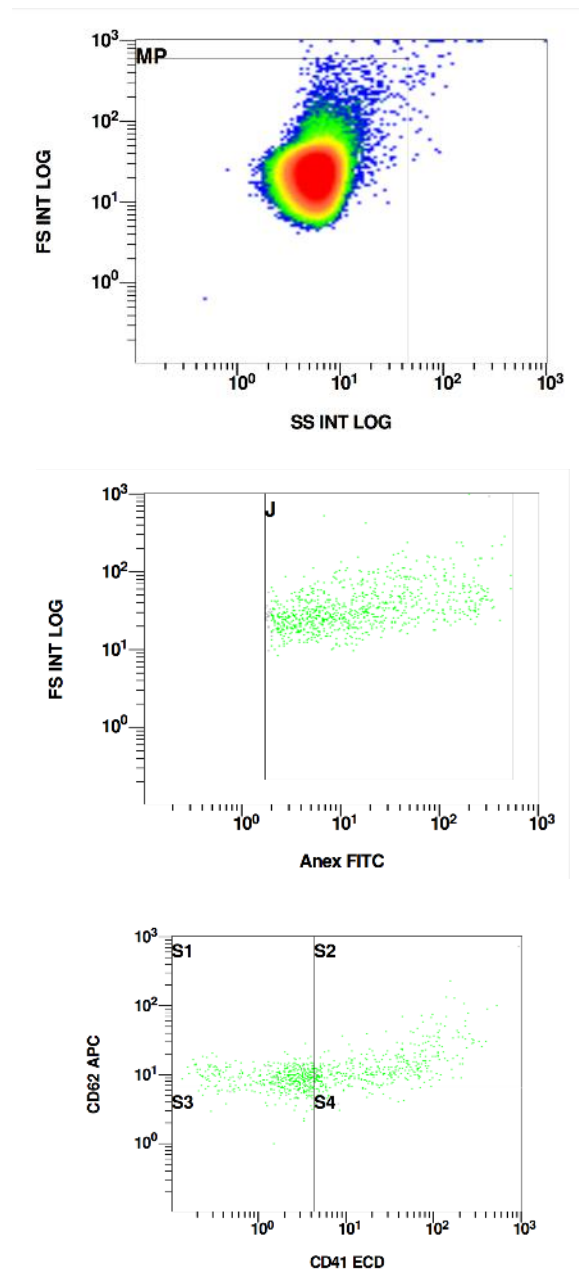


Figura 32. Análisis por citometría de PRP en una muestra sanguínea. Las MPs son Anexina+ y miden entre 0,1 a 1 μ m. Las de origen plaquetario con expresión de p-selectina son CD41+ y CD62+.

Se detallan a continuación los pasos a seguir:

- 1) Dejar reposar el tubo de sangre recién extraída durante 30 min a 37°C. Transcurrido el tiempo mezclar el tubo invirtiéndolo 3 veces.
- 2) Centrifugar las muestras a 20min/ 3000 rpm (1560 g)/ 20 °C). No usar freno.
- 3) Recolectamos el plasma en alícuotas de 250 μ l y se almacenar a -80 °C, tras realizar una congelación rápida con nitrógeno líquido.

- 4) Lavado y concentración MP plasmáticas:
 - Descongelar la muestra durante 1 hora a 4°C (en una cubeta de hielo).
 - Agitar en vortex.
 - Centrifugar 30 min/13000 rpm (18890g)/20°C. No usar freno. Verificar que haya un pequeño pellet en el fondo después de la centrifugación.
 - Preparar las siguientes soluciones: 2.5 mmol/L CaCl₂ in PBS y citrato 0.32 % en PBS.
 - Cuidadosamente extraer 225 µL del sobrenadante (2x100 µL y 1x25 µL), dejando 25 µL. Añadir 225 µL PBS-citrato al pellet y agitar usando un vórtex vigorosamente (2 x10 sec). Visualizar si el pellet esta disuelto.
 - Centrifugar por 30 min/13000 rpm/20 °C.
 - Cuidadosamente extraer 225 µL del sobrenadante (2x100 µL y 1x25 µL) del sobrenadante. Añadir 50 µL PBS-citrato al pellet y agitar en el vórtex vigorosamente (2 x 10 sec). Visualizar si el pellet está disuelto.
- 5) Distribuir las muestras en los tubos de citometría. Para la medida en el citómetro se utilizaron los siguientes tubos:
 1. Blanco. Un tubo con PBS-Ca²⁺ (0,1 µM) para comprobar que el PBS no tiene partículas: 500 µL.
 2. Control negativo: 5 µL MP +5 µL Anexina-FITC+ 40 µL PBS-citrato. La anexina no se une a las MP en ausencia de Ca²⁺. Este tubo nos sirve para comprobar que el PBS no contiene Ca²⁺ y que no hay uniones inespecíficas. Veremos MP pero sin fluorescencia.
 3. Control positivo: 5 µL MP +5 µL Anexina-FITC+ 40 µL PBS-Ca²⁺. El Ca²⁺ del PBS permite la unión de la anexina V a la fosfatidilserina de la superficie de las MP.
 4. Autofluorescencia: 5 µL MP + PBS-Ca²⁺ 45 µL
 5. Para compensar fluorescencia CD61-PerCP:

MP 5 µL +CD61-PerCP + 5 µL Anexina-FITC+ 35 µL PBS-Ca²⁺.
 6. Para compensar fluorescencia CD62-APC:

MP 5 µL +CD62P-APC + 5 µL Anexina-FITC+ 35 µL PBS-Ca²⁺
 7. Para compensar fluorescencia CD144-PE:

MP 5 µL +CD144-PE + 5 µL Anexina V-FITC+ 35 µL PBS-Ca²⁺
 8. Además se realizaron los tubos de FMO (fluorescencia minus one), combinado parejas de dos fluorocromos: PerPC-APC; PerPC-PE; APC-PE.
 9. Muestras a medir: un tubo por muestra

MP 5 µL + 5 µL CD41-PerCP + 5 µL CD62P-APC+ 5 µL CD144-PE
5 µL Anexina-FITC+ 25 µL PBS-Ca²⁺

Todos los tubos se incuban 15 min en la oscuridad y a temperatura ambiente.

El volumen final de los tubos es 500 µL, ya que tras los 15 min y sin centrifugar las muestras, se añade 450 µL de trucount (BD Trucount Tubes - BD Biosciences) disuelto

en PBS-citrato para el tubo 3 y PBS- Ca^{2+} para el resto de los tubos. Tras añadir el troucont, se agita en vortex y se lleva al citómetro para su medida.

- 1.1. Centrifugar los anticuerpos monoclonales excepto la annexin V durante 5 min a 13000 rpm. Pipetear los anticuerpos monoclonales en un tubo limpio, dejar 15 μl sin pipetear.

3.3.8. Análisis del calcio citosólico en plaquetas mediante citometría de flujo

Para determinar los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico empleamos la sonda fluorescente Fluo-3. Las plaquetas se cargan con la sonda y se marcan con anticuerpos fluorescentes específicos de CD61 plaquetario. Posteriormente, tras medir la intensidad de fluorescencia basal, se estimulan con un agonista y se mide el aumento del Ca^{2+} citosólico (figura 33).

Material

- Sangre entera anti-coagulada con citrato 3,13% (en tubo de citrato) y estabilizada durante 30 min a 37°C.
- Sonda fluorescente Fluo-4-AM (Invitrogen; F14201; Eugene, OR, EEUU): stock 500 μM en DMSO.
- Anti-C
- D61-PerCP (BD Biosciences 347408, San Diego, CA, EEUU).
- Tampón TYRODE (cloruro de calcio 0,2 g/L, cloruro de magnesio 0,1 g/L, cloruro de potasio 0,2 g/L, cloruro de sodio 8,0 g/L, fosfato sódico monobásico 0,05 g/L y D-Glucosa 1,0 g/L); (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU; T2145).
- Agonista TRAP (stock 500 μM); (Sigma-Aldrich).
- Agonista ADP (stock 500 μM); (Sigma-Aldrich).
- A23187 (stock 10 mM); (Sigma-Aldrich). Propiedades de ionóforo, ya que aumenta considerablemente la capacidad de los iones divalentes para cruzar las membranas biológicas y forma específicamente complejos 2:1 estables con cationes divalentes, haciendo que estos iones sean solubles en disolventes orgánicos ordinarios. Es altamente selectivo para Ca^{2+} , por lo que se utiliza comúnmente para aumentar los niveles intracelulares de Ca^{2+} .
- GPAP (Gly-Pro-Arg-Pro); (stock 25 mM): inhibidor de la coagulación, inhibe la polimerización de la fibrina.
- Tubos de citómetro.
- Citómetro de flujo BD FACSCanto.

Procedimiento

Para la determinación de la liberación intracelular de Ca^{2+} , la sangre entera estabilizada se diluyó previamente 1:10 en tampón salino Tyrode y se marcó con anti-CD61 humano conjugado con PerCP y con la sonda sensible a calcio Fluo-4-AM (1 μM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Antes del análisis por citometría de flujo, se diluyeron

alícuotas de cada suspensión de sangre 1:50 en tampón salino Tyrode hasta 1 ml y se preincubaron con 100 μM de péptido sintético Gly-Pro-Arg-Pro para inhibir la polimerización de fibrina. Tras el ajuste de la fluorescencia basal, se estimularon las muestras con los agonistas TRAP-6 o ADP (10 μM) y se analizaron durante 5 minutos utilizando un citómetro de flujo. El ionóforo A23187 se utilizó como control positivo para la movilización de Ca^{2+} . Posteriormente, los valores medios de intensidad de fluorescencia se analizaron con el software de análisis de citometría de flujo Kaluza (Beckman Coulter).

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Marcar 150 μl de sangre entera, estabilizada 30 min a 37°C y anticoagulada con citrato (diluida 1:10 en tampón TYRODE) con 7 μl de anti-CD61-PerCP.
2. Incubar 15 min a R/T y oscuridad.
3. Preparar 4 tubos por paciente (Tubo 1-Control basal; Tubo 2-TRAP, Tubo 3-ADP, Tubo 4- A23187) añadiendo a cada tubo:
 - 974 μl de tampón TYRODE + 2 μl Fluo-4-AM ($\text{Cf}=1$ μM) + 20 μl sangre marcada.
 - Añadir 4 μl de GPAP a todos los tubos ($\text{Cf}=100$ μM).
4. Incubar 15 min a R/T y oscuridad.
5. Introducir el tubo en el citómetro y comenzar a adquirir eventos.
6. A los 15 segundos detener la adquisición (PAUSE), extraer el tubo y añadir el agonista correspondiente:
 - Nada: ajustar las fluorescencias y la línea basal (tubo 1).
 - 20 μl TRAP ($\text{Cf}=10$ μM) (tubo 2).
 - 20 μl ADP ($\text{Cf}=10$ μM) (tubo 3).
 - 5 μl A23187 a partir de una dilución 1:10 del stock ($\text{Cf}=5$ μM) (tubo 4).
7. Volver a adquirir lo más rápidamente posible en el citómetro y pasar muestra hasta que finalice el tiempo programado (aproximadamente 300 segundos).

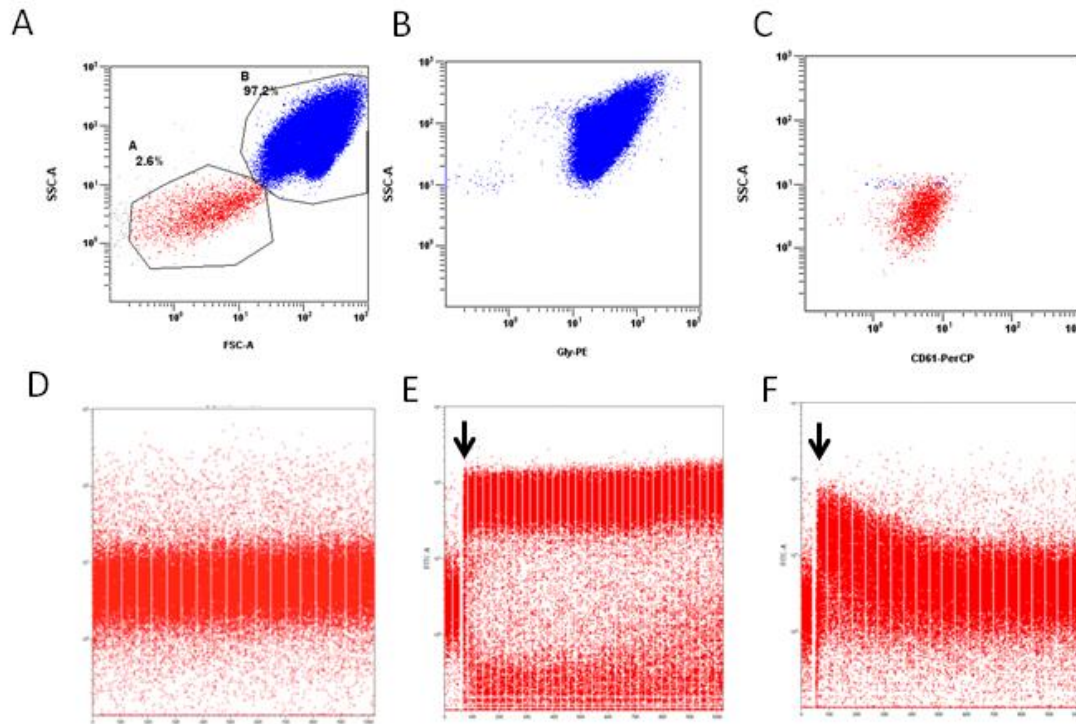


Figura 33. Análisis de la liberación de Ca^{2+} citosólico en plaquetas mediante citometría de flujo. A) Selección de la población de plaquetas (región A) y eritrocitos (región B) mediante tamaño (FSC) y complejidad (SSC). B) Expresión del marcador glicoforina-A en la población de eritrocitos. C) Expresión del marcador CD61 en la población de plaquetas. D) Nivel basal de Ca^{2+} citosólico en la población de plaquetas CD61^+ obtenido tras marcaje con la sonda sensible a calcio Fluo-3AM. E) Liberación de Ca^{2+} citosólico en las plaquetas CD61^+ tras adición del inóforo A23187 (control positivo) F) Liberación de Ca^{2+} citosólico en las plaquetas CD61^+ tras adición del agonista TRAP.

3.4 Metodología estadística

El cálculo del tamaño muestral fue realizado por el Servicio de Estadística del Hospital Virgen de la Arrixaca. Se realizó una búsqueda bibliográfica de la cual se obtuvo el valor de la desviación estándar de la variable principal (porcentaje de plaquetas que expresan P-selectina). Teniendo en cuenta nuestra población de pacientes, una desviación típica de esta variable para este grupo de pacientes de 4,5, un riesgo alfa de 0,05, una potencia estadística del 80% y una precisión de 4,5%, se necesitan 12 pacientes. Considerando un 10% de pérdidas se precisan 14 pacientes para considerar estos datos significativamente estadísticos.

El análisis estadístico se realizó con el software informático SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

Las variables cualitativas se presentan en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas, tanto para el grupo de pacientes como el grupo control. Las variables cuantitativas se describen mediante la media, mediana, rango intercuartílico, la desviación típica, el intervalo de confianza al 95% y los valores mínimo y máximo.

En primer lugar se han valorado los datos para la aplicación de los diferentes análisis estadísticos. Para comparar las variables cuantitativas (continuas) se ha utilizado la prueba de la t de *Student* en caso de normalidad. Este procedimiento compara las medias de los grupos de estudio. Al hacer la comparación de medias se ha tenido en cuenta previamente la distribución normal de ambos grupos mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* (considerándose no significativa para la hipótesis nula de distribución normal en el caso de variables con comportamiento normal) y la presencia o no de igualdad de las varianzas en cada grupo comparado mediante el test de hipótesis para la igualdad de las varianzas (test de *Levene*) en caso de valores no relacionados. En caso la no distribución normal de las variables se ha utilizado la transformación logarítmica y la prueba de U de Mann-Whitney en caso de muestras no relacionadas o la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas.

Para estudiar la correlación entre las variables diagnósticas se ha utilizado el test de correlación de Pearson.

Las variables cualitativas se han analizado mediante test de homogeneidad basado en la distribución Chi-cuadrado de Pearson o mediante tests exactos de Fisher.

El análisis estadístico del Ca^{2+} citosólico se analizó mediante un análisis de varianza unidireccional seguido por comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado ha sido $\alpha < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Descripción de la población a estudio

Se incluyeron en el estudio 16 pacientes con HA grave que cumplían los criterios de requisitos marcados.

La mediana de edad de los pacientes fue de 24,5 años (rango: 9-39 años) y su peso de $60,0 \pm 24,6$ Kg (tabla 7).

La edad del primer sangrado no presentó una distribución normal, once de ellos (68,75%) tuvieron su primer sangrado en el primer año de vida, un paciente (6,25%) en el nacimiento y los otros cuatro (25%) entre el año y los 3 años de edad. Ninguno de los 16 pacientes tuvo su primer sangrado más tarde del tercer año de edad (figura 34).

La cantidad de FVIII administrado fue de 6778 ± 3264 unidades semanales durante el tiempo que duró el estudio.

Tabla 7. Características de la población estudiada

Edad, peso, primera hemorragia, y articulaciones diana	
Edad (años) Mediana (rango)	24,5 (9-39)
Peso (Kilogramos) Media $\pm$ DS	$60,0 \pm 24,6$
Edad 1ª hemorragia (años) Mediana (rango intercuartílico)	1(1,00-1,75)
Articulación diana (nº casos (%))	
No	3 (18,7 %)
1 articulación	4 (25,0%)
2 articulaciones	6 (37,5%
≥ 3 articulaciones	3 (18,8%)

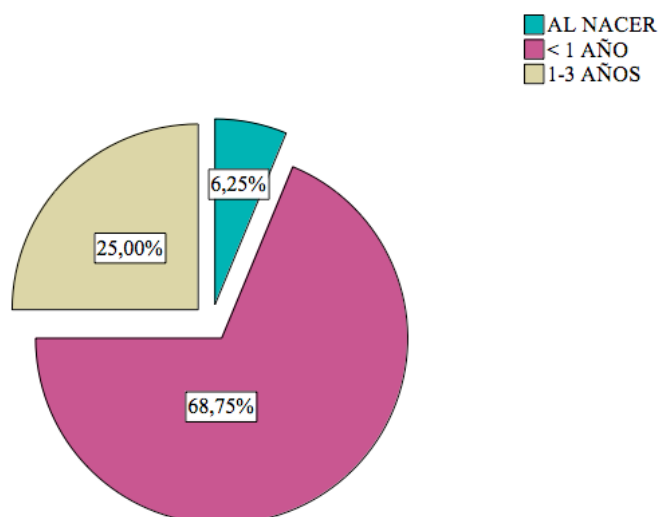


Figura 34. Edad del primer sangrado.

4.1.1. Clínica hemorrágica

Las primeras manifestaciones hemorrágicas de estos pacientes ocurrieron con menos de un año de edad en 12 de ellos (75%) (figura 34).

El primer sangrado fue (por orden de frecuencia): hematomas (6 pacientes (37,5%)), hemartros (5 pacientes (31,25%)), hemorragia cerebral (3 pacientes (18,75%)), gingivorragias (2 pacientes (12,5%)) (figura 35). Las tres hemorragias cerebrales ocurrieron: tras el parto en un paciente (6,25%) y en el postparto inmediato en los otros dos (12,5%).

En el estudio del Chi-cuadrado no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la incidencia del primer sangrado ($p=0,086$) entre estos grupos (figura 36).

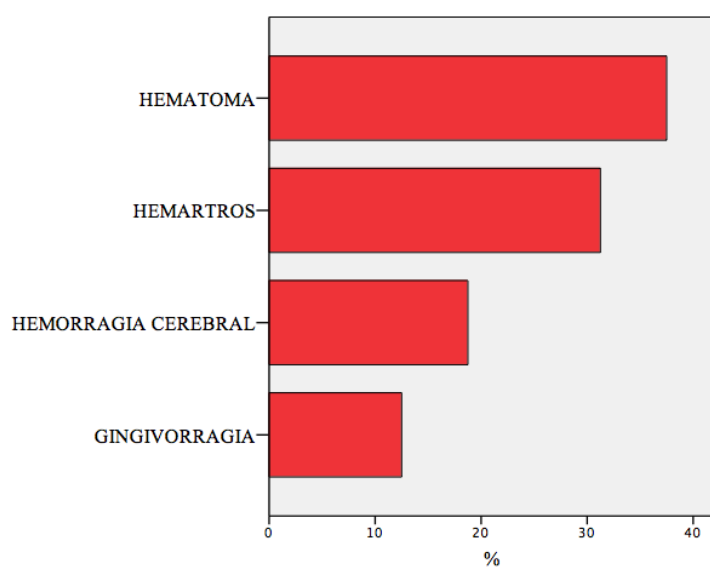


Figura 35. Forma de debut del primer sangrado.

En la figura 36 se observa cómo la mayor parte de las primeras manifestaciones hemorrágicas de estos pacientes ocurrieron con menos de 1 año de edad, siendo la mayoritaria en forma de hematomas. A partir del año de edad la primera manifestación en frecuencia corresponde a los hemartros.

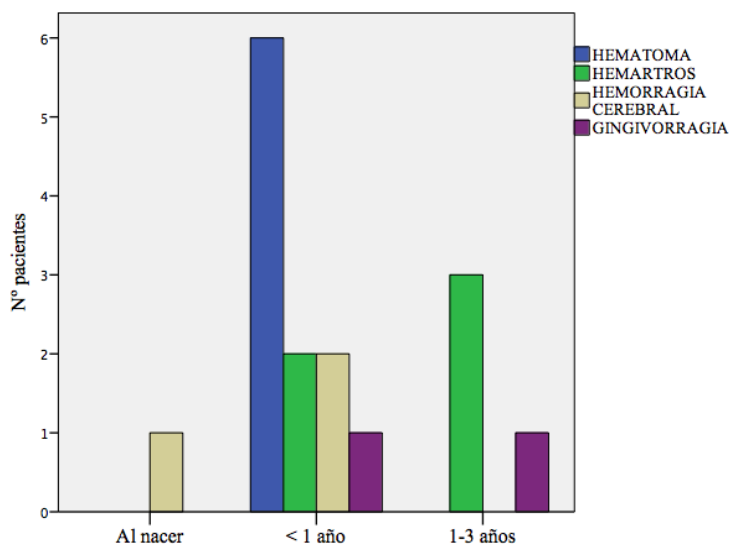


Figura 36. Edad y tipo de primer sangrado.

4.1.2. Estado mutacional

La mutación genética más frecuente fue la inversión del intrón 22, que se detectó en 9 pacientes (56,25%). La inversión del intrón 1 se detectó en un paciente, mutaciones de tipo missense en dos pacientes (uno con afectación del exón 23 del gen F8 (p.Pro2153Leu), la afectación del exón 7 (p.Phe276Leu)) en otro y finalmente una mutación nonsense en el exón 18 (p.Arg1966X) en otro paciente. En los tres pacientes (18,75%) restantes no se había realizado el estudio por diferentes motivos (tabla 9, figura 37).

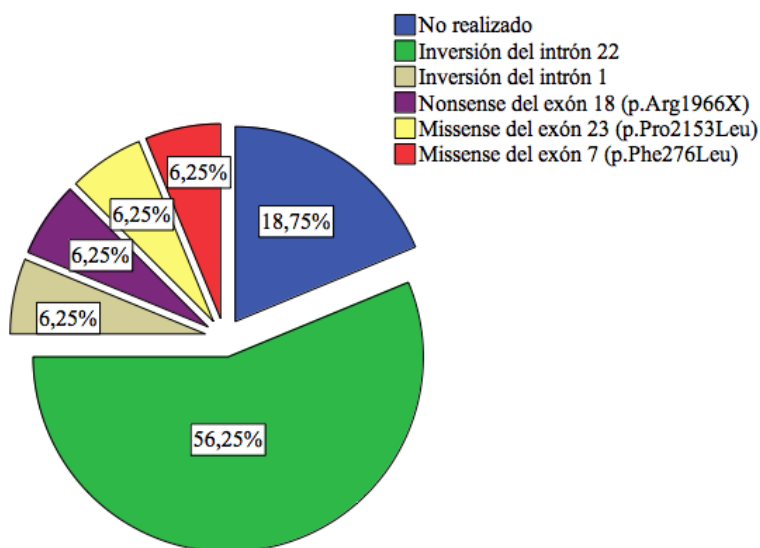


Figura 37. Tipo de mutaciones. Se observa que más de la mitad son inversión del intrón 22.

De todas las mutaciones detectadas el 93,75% eran heredadas (según el estudio genético e historia familiar). Uno de los pacientes en los que no se realizó el estudio genético tampoco tenía historia familiar, por lo que podría tratarse de una mutación de novo o mosaicismo germinal (ver figura 38).

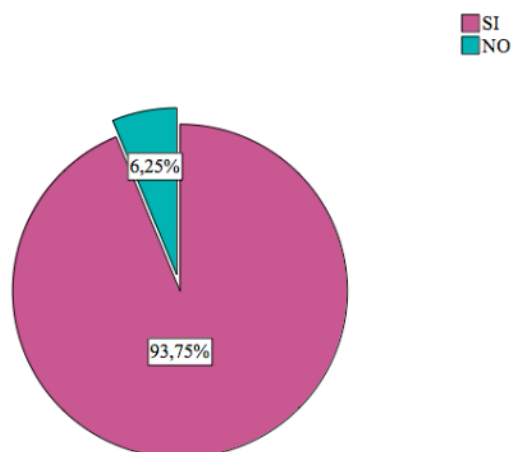


Figura 38. Tipos de mutaciones: heredadas/no heredadas.

Se analizó la relación entre el tipo de primer sangrado y el tipo de mutación, obteniéndose una Chi-cuadrado de Pearson de 0,256. Se observa que los pacientes con inversión del intrón 22 presentan sangrados más relevantes (ver figura 39).

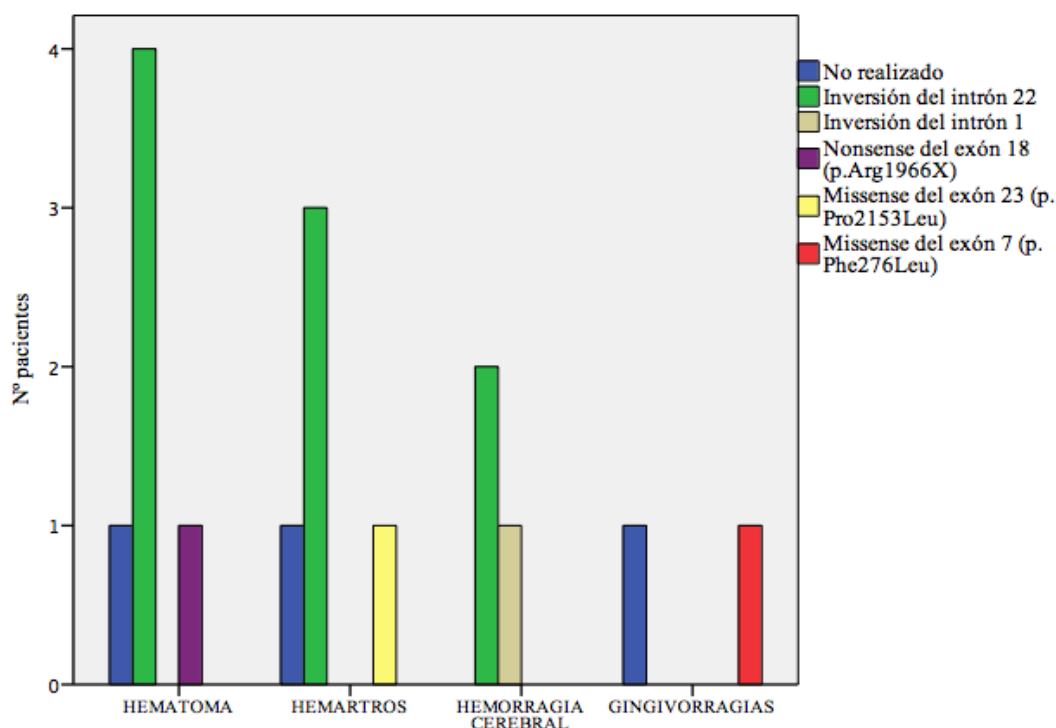


Figura 39. Tipo de mutación y tipo de primer sangrado.

La relación entre la edad del primer sangrado y el tipo de mutación fue analizada, obteniéndose una Chi-cuadrado de Pearson de 0,597. Los pacientes con mutaciones del tipo missense presentan sangrado más allá del primer año de vida (ver figura 40).

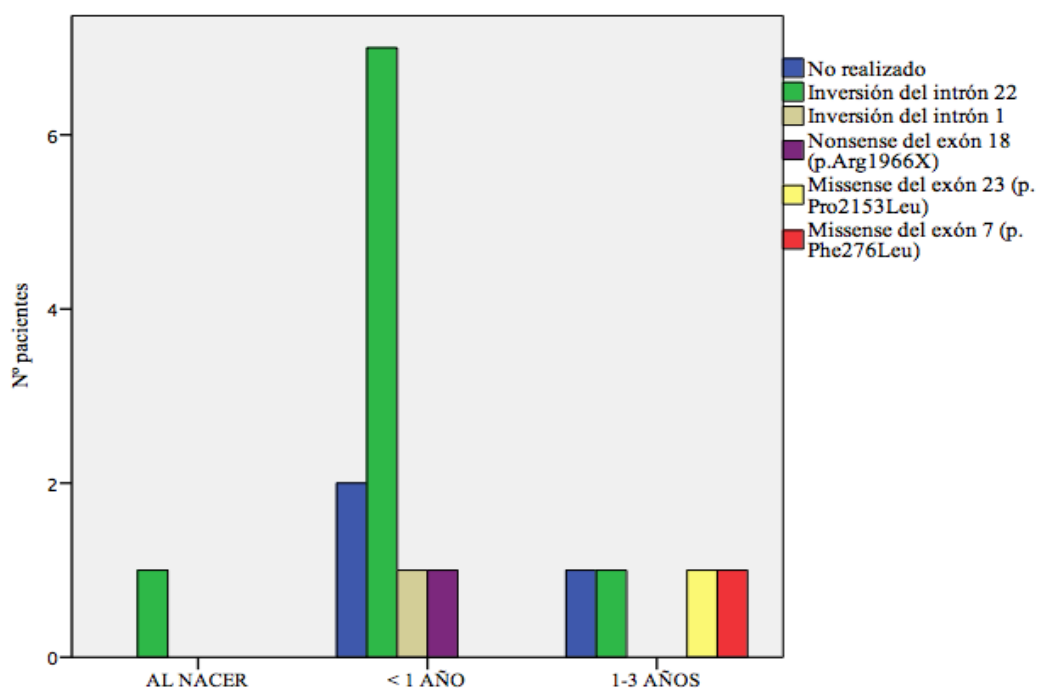


Figura 40. Tipo de mutación y edad del primer sangrado

4.1.3. Serología para hepatitis B, hepatitis C y VIH

En el estudio serológico para hepatitis y VIH encontramos que cinco pacientes (31,25%) fueron positivos para el VHC, tres de los cuales (18,75%) también presentaron serología positiva para el VIH. No se detectó ningún paciente afecto de VHB (ver figura 41 y tabla 8).

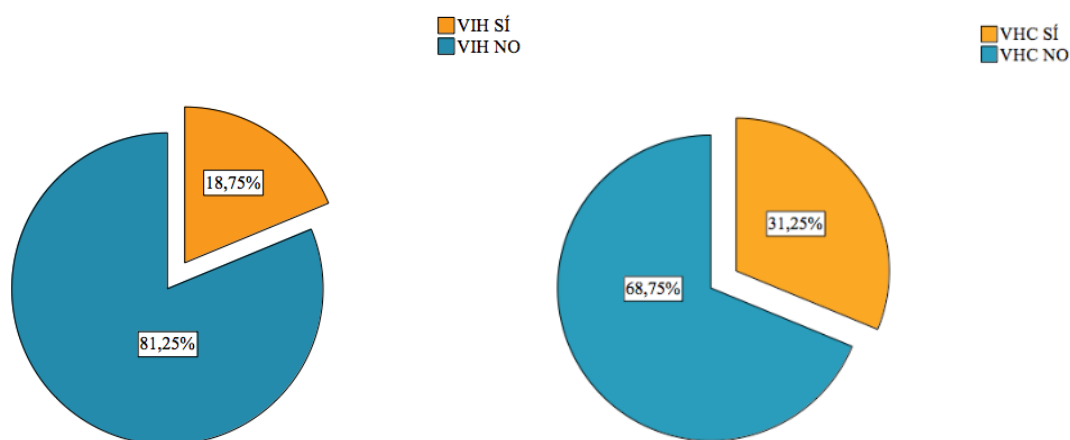


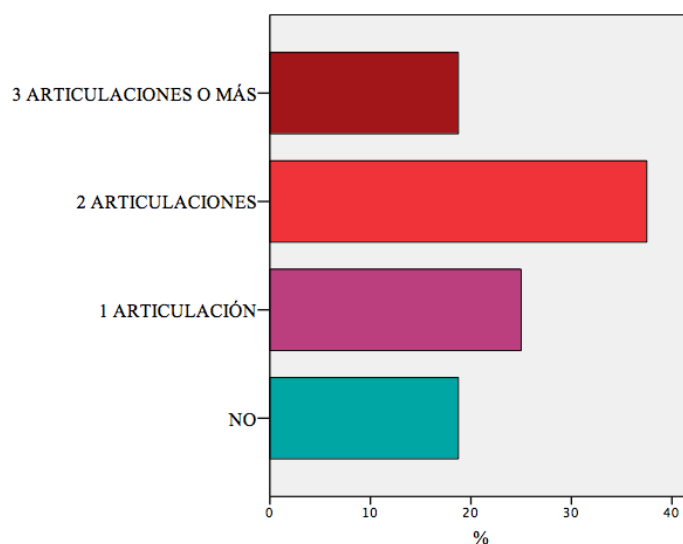
Figura 41. Pacientes con HA, afectados de VIH y VHC.

Tabla 8. Estado serológico de los pacientes y tratamiento crónico

Estado serológico de los pacientes	
Serología VHB (nº casos (%))	
Positiva	0 (0%)
Negativa	16 (100%)
Serología VHC (nº casos (%))	
Positiva	5 (31,25%)
Negativa	11 (68,75%)
Serología VIH (nº casos (%))	
Positiva	3 (18,75%)
Negativa	13 (81,25%)
Tratamiento crónico (nº casos (%))	
No	11 (68,75%)
Antiretroviral	3 (18,75%)
Antiepilépticos y antipsicóticos	2 (12,5%)

4.1.4. Afectación articular

Tres (18,75%) pacientes no presentaban articulación diana, cuatro (25%) presentaban 1 articulación diana, seis (37,5%) presentaban 2 articulaciones diana y tres (18,75%) presentaban ≥ 3 articulaciones diana. Un paciente de 35 años tenía prótesis de rodilla secundario a artropatía hemofílica (ver figura 42 y tabla 7).

**Figura 42.** Articulaciones diana.

Al análisis de la relación entre el número de articulaciones diana y el tipo de mutación, se obtuvo una Chi-cuadrado de Pearson de 0,487. Se observa una distribución homogénea de los tipos de mutación respecto a las diferentes mutaciones detectadas (ver figura 43).

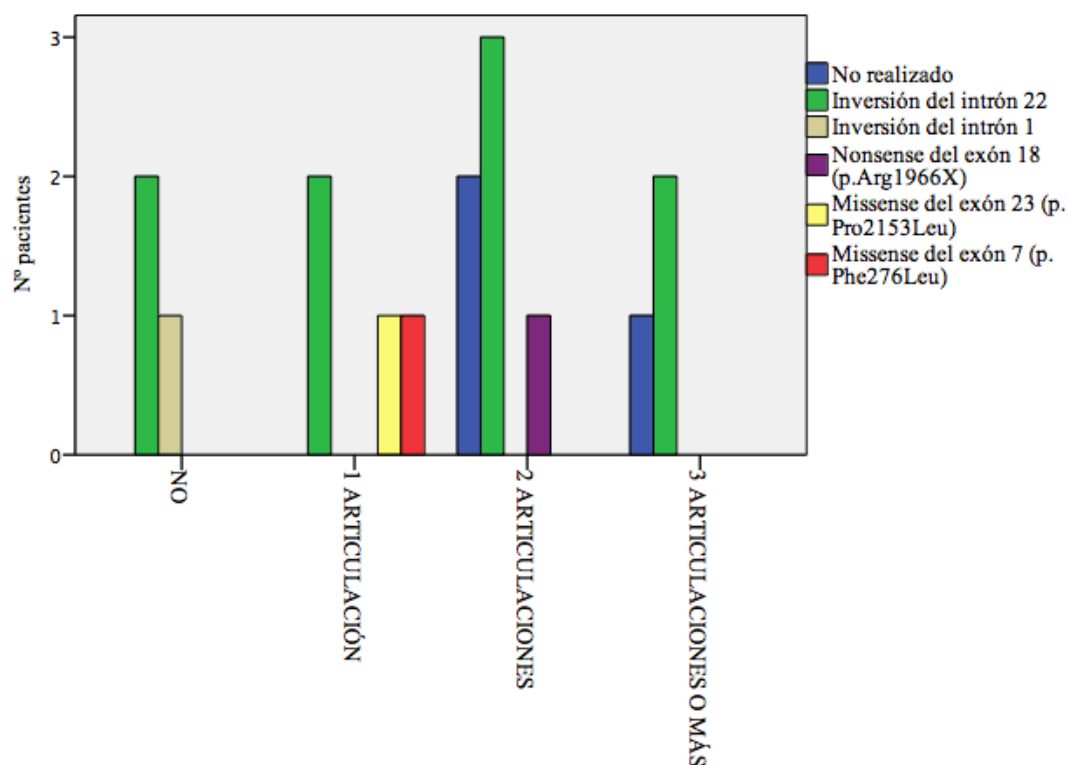


Figura 43. Tipo de mutación y número de articulaciones diana.

4.1.5 Profilaxis

En la tabla 9 se muestra el consumo de factor VIII, el tipo de tratamiento profiláctico y las mutaciones, así como la historia de inhibidores.

Tabla 9. Consumo de FVIII, mutaciones e inhibidores.

Consumo de FVIII, mutaciones e inhibidores	
Consumo semanal actual de FVIII (UI)	
Media $\pm$ DS	6778 $\pm$ 3264
Régimen semanal de profilaxis (nº casos (%))	
3 veces a la semana	9 (56,25%)
Cada 48 horas	6 (37,50%)
2 veces a la semana	1 (6,25%)
Mutación (nº casos (%))	
Inversión intrón 22	9 (56,25%)
Otras	4 (25,00%)
No realizado	3 (18,75%)
Historia de inhibidor (nº casos (%))	

No	11 (68,75%)
Baja respuesta	3 (18,75%)
Alta respuesta	2 (12,50%)

En cuanto a la profilaxis, es difícil etiquetar en grupos a estos pacientes, puesto que se trata de un grupo con dos claras poblaciones de sujetos, un grupo de 11 jóvenes (68,75%) en tratamiento de profilaxis 1ª sin discontinuación y otro grupo de 5 pacientes (31,25%) con edad ≥ 33 años, que recibió tratamiento según las recomendaciones establecidas en ese momento, es decir, iniciaron profilaxis 1ª en la infancia hasta los 18 años, posteriormente tratamiento a demanda (momento en el que muchos de ellos desarrollaron articulaciones diana) y finalmente profilaxis nuevamente.

Según esto, podríamos decir que 11 pacientes (68,8%) reciben profilaxis primaria y 5 pacientes (31,3%) reciben profilaxis terciaria (figura 44).

En un paciente del grupo de profilaxis terciaria, procedente de otra comunidad, se comenzó profilaxis a los 19 años, previamente sólo había recibido tratamiento a demanda. Dos pacientes del grupo de profilaxis primaria continua, no presentaron adherencia al tratamiento durante la adolescencia.

El grupo de edad menor presentaba al inicio del tratamiento profiláctico primario una mediana de edad de 1 año, con un rango entre 1-3 años. El grupo de edad superior presentaba al inicio de la profilaxis terciaria una mediana de 28 años, con un rango entre 19-35 años.

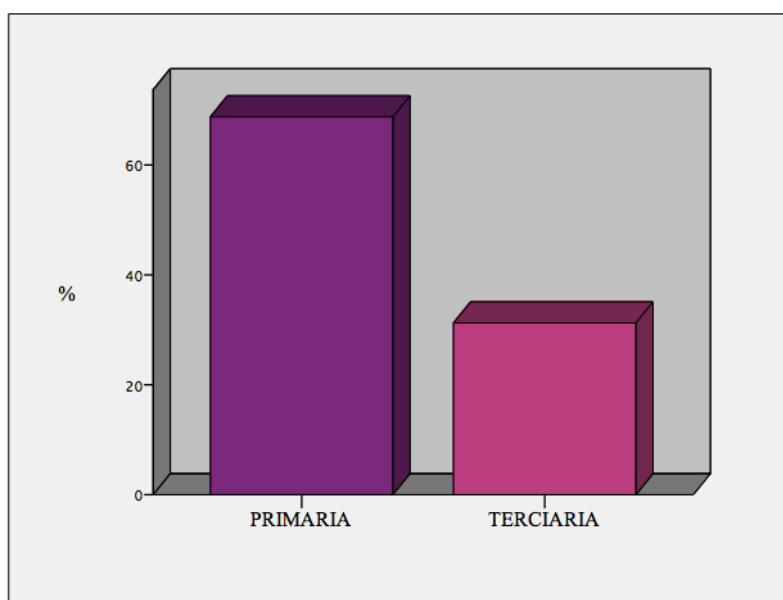


Figura 44. Tipo de régimen de profilaxis.

El régimen de profilaxis que recibían fue: 9 pacientes (56,25%) con concentrado de factor

VIII 3 veces/semana, 6 pacientes (37,5%) cada 48h y un paciente (6,25%) 2 veces/semana (tabla 8 y figura 45).

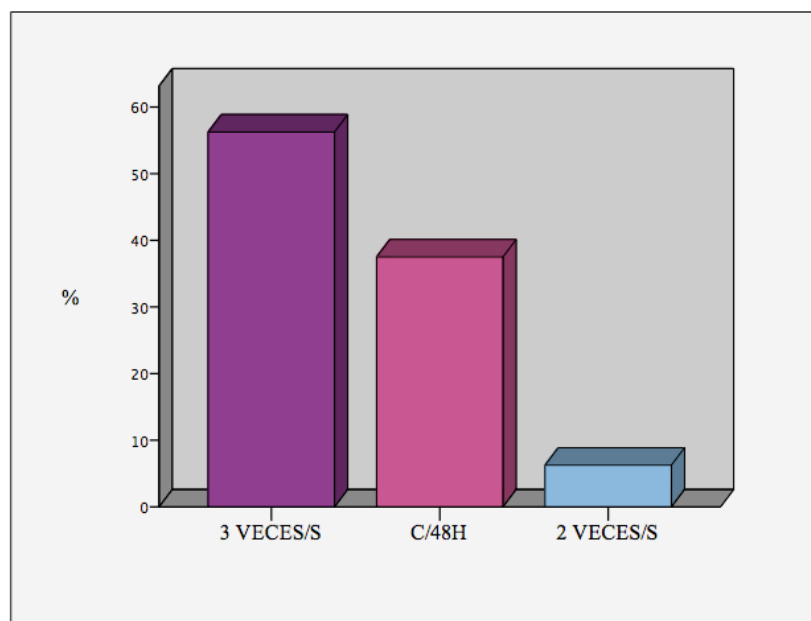


Figura 45. Régimen de profilaxis semanal

Respecto a la relación entre el tipo de régimen semanal de tratamiento profiláctico y el número de articulaciones diana, fue analizada obteniéndose una Chi-cuadrado de Pearson de 0,291. Se observa que los pacientes que tienen más articulaciones diana reciben un régimen de tratamiento profiláctico más intenso en el momento de este estudio (tabla 46).

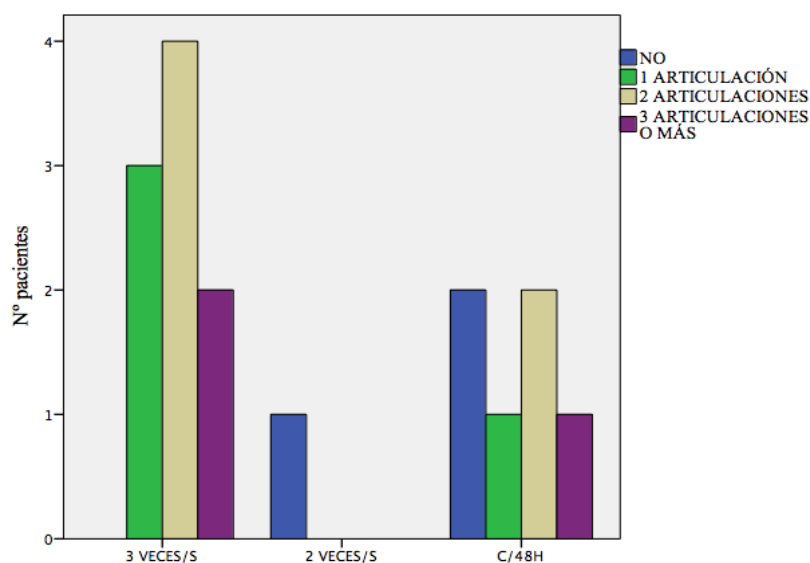


Figura 46. Régimen de profilaxis semanal y número de articulaciones diana.

4.1.6 Inhibidor

En cuanto a la historia de inhibidor, once (68,75%) pacientes nunca habían presentado inhibidor, 5 pacientes (31,25%) habían presentado en algún momento de su vida inhibidor: 2 (12,5%) de ellos de alta respuesta y 3 (18,75%) de baja respuesta (tabla 9 y figura 47). En cuatro de estos cinco pacientes el inhibidor apareció antes de los tres años y en el quinto paciente apareció a los 12 años de edad y se borró espontáneamente. Los dos pacientes con inhibidor de alta respuesta tardaron de 2-3 años en borrarlo y precisaron terapia inmunosupresora para ello. En ningún paciente se detectó inhibidor en el último año previo al estudio.

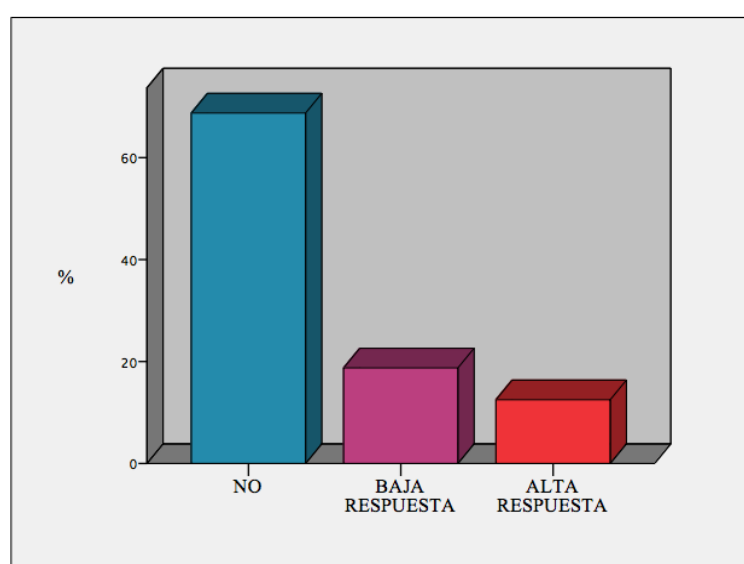


Figura 47. Historia de inhibidor de los pacientes.

La relación entre el tipo de régimen semanal de tratamiento profiláctico y la historia de inhibidor de estos pacientes, fue analizada obteniéndose una Chi-cuadrado de Pearson de 0,386. Se observa que los pacientes que presentaron inhibidor de alta respuesta llevan un régimen de profilaxis más intenso (cada 48 horas) (figura 48).

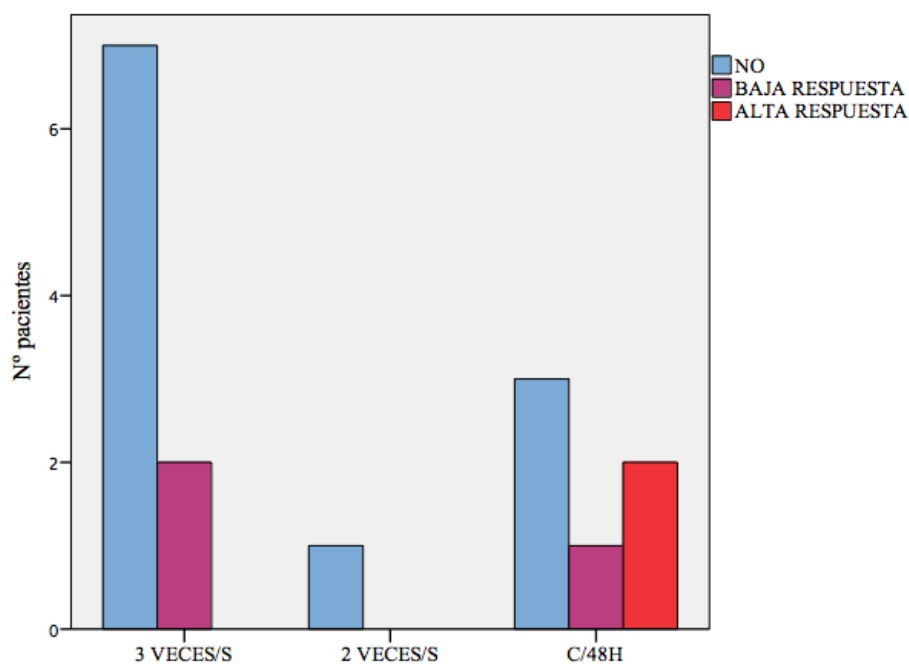


Figura 48. Régimen de profilaxis semanal e historia de inhibidor. Los pacientes con inhibidor precisaron una profilaxis más intensa.

La relación entre el tipo de mutación y el desarrollo de inhibidor fue analizada, obteniéndose una Chi-cuadrado de Pearson de 0,689 (figura 49). Los pacientes que presentaron un inhibidor de alta respuesta presentaban una inversión del intrón 22, sin embargo, esta mutación es la más frecuente en estos pacientes (como exponemos en el apartado 1.3).

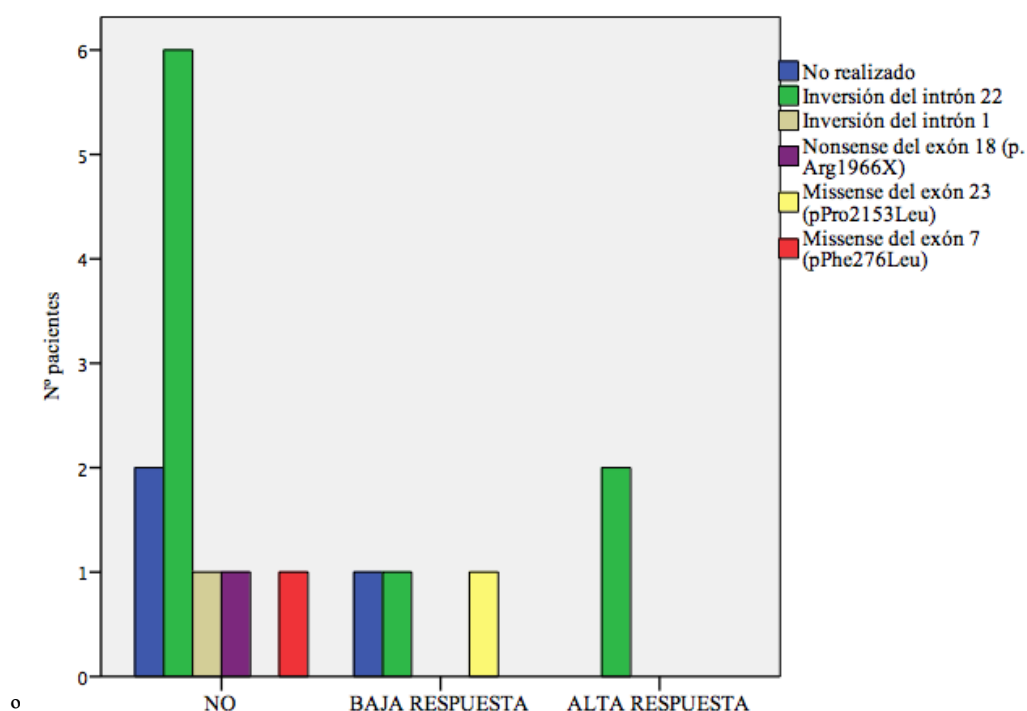


Figura 49. Tipo de mutación y desarrollo de inhibidor. Los pacientes con inversión del intrón 22 presentaron un inhibidor de alta respuesta.

Se analizó la relación entre el tipo de mutación y el régimen de profilaxis semanal, obteniéndose una Chi-cuadrado de Pearson de 0,038 (figura 50). Los pacientes que estaban en régimen de tratamiento profiláctico más intenso (cada 48 horas) presentaban inversión del intrón 22 y en el resto de estos pacientes no se había estudiado la mutación.

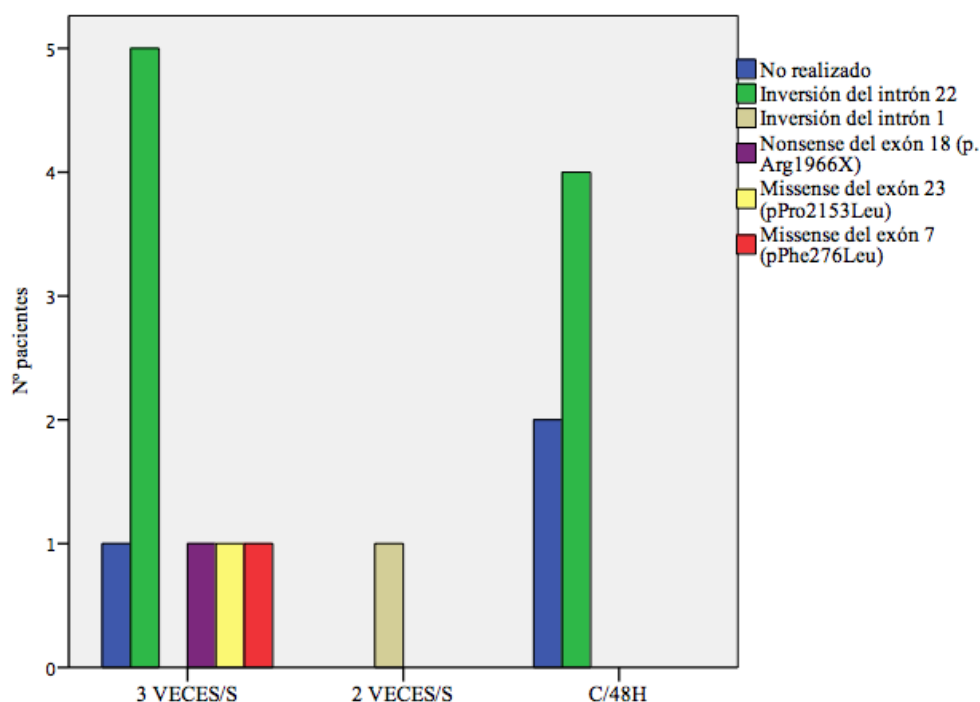


Figura 50. Tipo de mutación y régimen de profilaxis semanal.

4.1.7. Otras patologías

Más de la mitad de los pacientes (10 pacientes (62,5%)) no presentaban una patología crónica diferente a su HA grave; el resto presentaban: 3 pacientes VIH en tratamiento con Atripla® (triple terapia antirretroviral) con buenos controles analíticos y diferentes estadios de la enfermedad (estadio A1, estadio B3 y en el tercero no disponemos de este dato), 1 paciente con autismo, 1 paciente con epilepsia (ambos en tratamiento con Risperdal®, Abifily® y/o Depakine®) y otro presentaba asma con tratamiento ocasional con antihistamínicos (figura 51 y tabla 8).

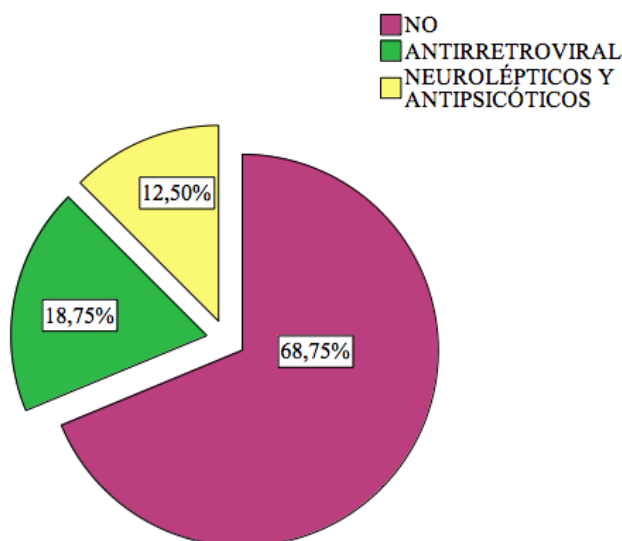


Figura 51. Tratamiento crónico.

Los pacientes VHC positivos habían sido todos tratados hace años con interferón; actualmente ninguno llevaba tratamiento por diferentes motivos: copias indetectables de ARN (en dos pacientes), mala tolerancia al fármaco y no presentar fibrosis hepática ≥ 2 (en dos pacientes, uno presentaba fibrosis grado 1 en la biopsia hepática y el otro no presentaba fibrosis hepática), en otro paciente desconocemos el motivo.

Dos de los 16 pacientes eran fumadores. Un solo paciente de 9 años con retraso mental era portador de porth-a-Cath.

En cuanto a los controles, disponíamos de 15 controles de edades comprendidas entre los 26 y 48 años con una mediana de 36 años. Tres eran fumadores.

4.2. Variables analíticas estudiadas

4.2.1. Datos del hemograma

Los datos obtenidos en el estudio del hemograma, tanto de pacientes como del grupo control, y la comparación entre ellos se muestran en la tabla 10 y figuras 52, y 53.

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de pacientes (tanto antes como después de la administración de factor). En el grupo de pacientes sí encontramos diferencias estadísticamente significativa en el volumen plaquetario medio (VPM) y el nº de linfocitos antes y después del tratamiento. El VPM basal fue de $9,02 \pm 1,52$ y tras el tratamiento de $8,77 \pm 1,59$ fL ($p=0,031$). El nº de leucocitos totales basales fue mayor antes ($6,06 \pm 1,1 \times 10^3/\mu\text{L}$) que después del tratamiento ($5,77 \pm 1,03 \times 10^3/\mu\text{L}$) ($p=0,009$); del mismo modo, el nº de linfocitos previos ($2,24 \pm 0,48 \times 10^3/\mu\text{L}$) fueron mayores que los posteriores al tratamiento ($2,05 \pm 0,36 \times 10^3/\mu\text{L}$) ($p=0,005$).

Tabla 10. Hemograma en pacientes con HA (antes y después del tratamiento con FVIII) y en controles.

HEMOGRAMA	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
Hematíes($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,13 $\pm$ 0,49	5,07 $\pm$ 0,45	0,175	5,29 $\pm$ 0,27	0,288	0,112
Hemoglobina (g/dL)	14,98 $\pm$ 2,01	14,83 $\pm$ 2,01	0,178	15,94 $\pm$ 0,67	0,086	0,050
Hematocrito (%)	44,23 $\pm$ 5,37	43,64 $\pm$ 5,43	0,137	46,65 $\pm$ 2,19	0,113	0,054
VCM (fL)	85,93 $\pm$ 5,87	85,72 $\pm$ 6,03	0,079	88,23 $\pm$ 2,93	0,178	0,152
HCM (pg/célula)	29,08 $\pm$ 2,5	29,14 $\pm$ 2,5	0,734	30,18 $\pm$ 1,2	0,132	0,157
CHCM (g/dL)	33,82 $\pm$ 1,04	33,97 $\pm$ 1,26	0,426	34,23 $\pm$ 1,38	0,361	0,592
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	231,37 $\pm$ 48,45	230,37 $\pm$ 42,76	0,826	233,93 $\pm$ 40,8	0,875	0,815
VPM (fL)	9,02 $\pm$ 1,52	8,77 $\pm$ 1,59	0,031	8,31 $\pm$ 1,36	0,184	0,395
Plaquetas reticuladas (%)	2,43 $\pm$ 1,07 ¹	3,16 $\pm$ 2,27 ¹	0,345	2,9 $\pm$ 1,52 ¹	0,432	0,762
Reticulocitos (%)	1,52 $\pm$ 0,37 ¹	1,52 $\pm$ 0,37 ¹	0,968	1,54 $\pm$ 0,4 ¹	0,878	0,883
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,06 $\pm$ 1,1	5,77 $\pm$ 1,03	0,009	6,12 $\pm$ 1,48	0,912	0,453
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,97 $\pm$ 0,85	2,88 $\pm$ 0,85	0,061	3,33 $\pm$ 1	0,292	0,183
Linfocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2,24 $\pm$ 0,48	2,05 $\pm$ 0,36	0,005	2,09 $\pm$ 0,53	0,421	0,849
Monocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,52 $\pm$ 0,18	0,51 $\pm$ 0,18	0,641	0,52 $\pm$ 0,13	0,865	0,995
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,28 $\pm$ 0,26	0,27 $\pm$ 0,26	0,216	0,14 $\pm$ 0,08	0,056	0,075
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,036 $\pm$ 0,018	0,039 $\pm$ 0,017	0,594	0,06 $\pm$ 0,112	0,77	0,446

media $\pm$ desviación típica; p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control. VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media; VPM: volumen plaquetario medio.(1): en 6 pacientes y en 5 controles no se analizó este parámetro por problemas logísticos.

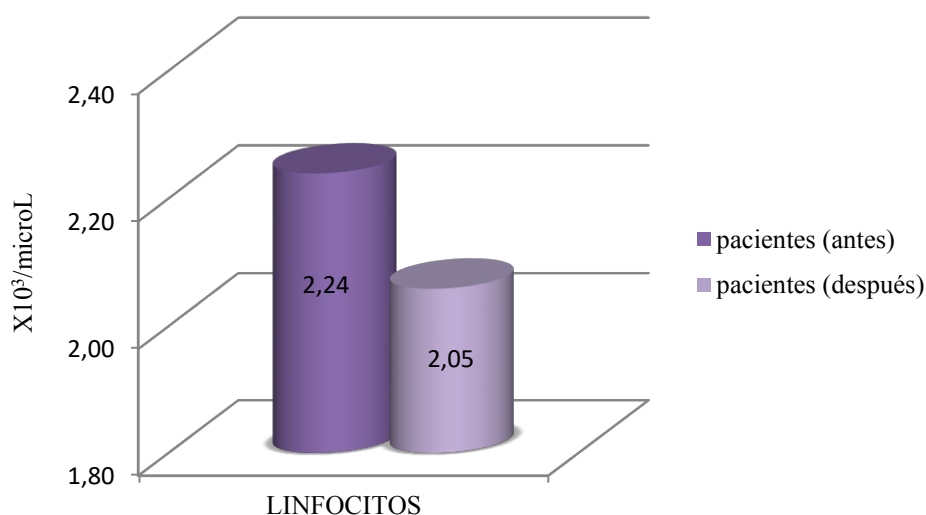


Figura 52. Representación gráfica de la cantidad de linfocitos ($X10^3/\text{microL}$) antes y después de la administración de factor.

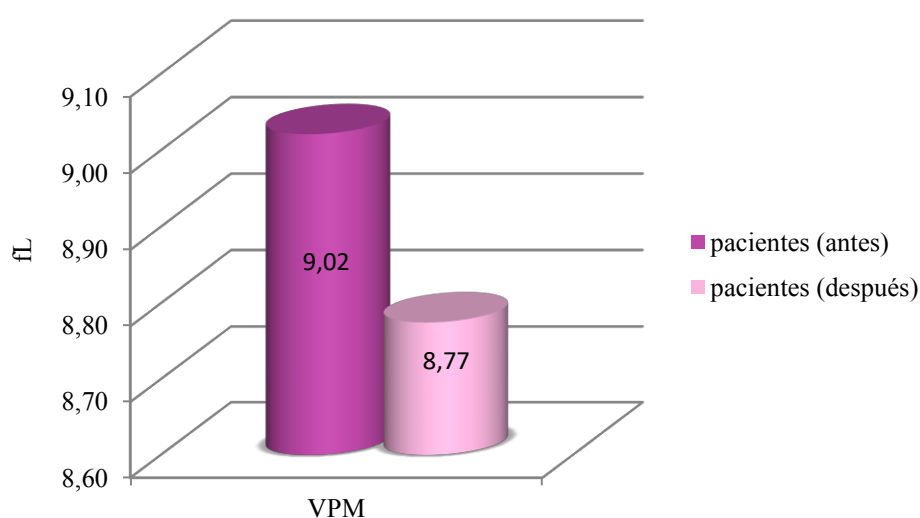


Figura 53. Representación gráfica del volumen plaquetario medio (fL) antes y después de la administración de factor.

4.2.2. Coagulación especial

Los datos obtenidos en el estudio de coagulación especial, tanto de pacientes como del grupo control, y la comparación entre ellos se muestra en la tabla 11 y figura 54.

En caso de resultados de FVIII >150 U/dL ó de VWF: Ag $>176\%$, se escogieron estos datos límite, dado que los aparatos utilizados para su determinación no pueden asegurarnos la fiabilidad de resultados por encima de este dintel.

Por otro lado, en un paciente se observaron resultados por debajo de la normalidad, presentando un VWF: Ag de 50 % y un VWF: CoR de 40 %, datos ya conocidos de este paciente, en el cual se había descartado con anterioridad al inicio del estudio la enfermedad de von Willebrand tipo 2N.

Lógicamente observamos diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de FVIII cuando comparamos la muestra basal de los pacientes con la muestra tras infusión del factor ($p<0,001$), así como con sujetos controles ($p<0,001$); sin embargo, la determinación de FVIII de los pacientes tras la infusión no mostró diferencia estadística con la de los controles ($p=0,229$). En el resto de parámetros no se observaron diferencias entre los grupos.

Tabla 11. Datos de las pruebas de coagulación especial.

DATOS DE COAGULACIÓN ESPECIAL	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
FVIII (U/dL)	3,23±4,18	89,05±34,82	<0,001	102,5±24,94	<0,001	0,229
VWF: Ag (%)	113,15±42,52	114,64±44,04	0,448	104,26±30,37	0,511	0,449
VWF: Rco (%)	97,85±25,34 ¹	97,16±27,15 ¹	0,651	93,54±21,32	0,618	0,688

media ±desviación típica; p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control. FVIII: Factor VIII; VWF: Ag: Factor von Willebrand antigénico; VWF: Rco: Factor von Willebrand-cofactor de la ristocetina. (1): no se pudo determinar esta variable en uno de los pacientes por problemas logísticos.

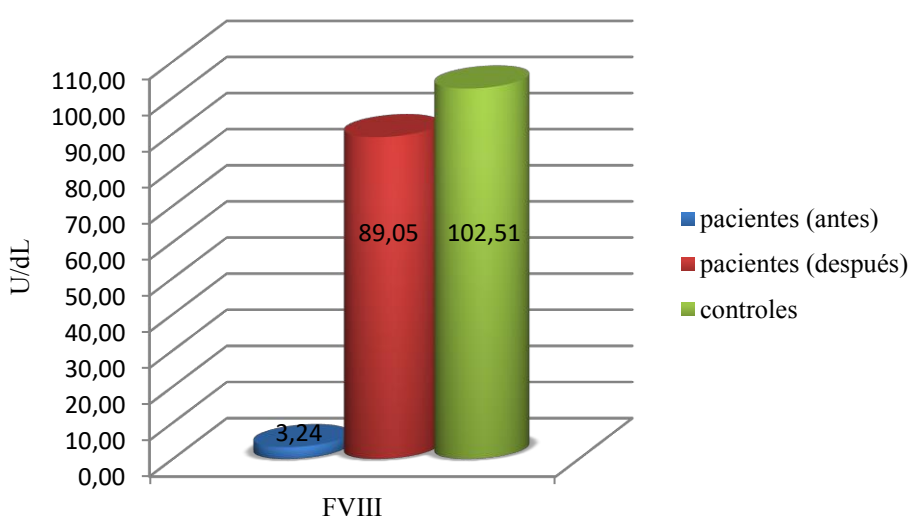


Figura 54. Representación de la cantidad de FVIII (U/dL) en los 3 grupos de estudio.

4.2.3. Función plaquetaria mediante PFA-100®

Los datos obtenidos en el estudio de PFA-100®, tanto de pacientes como del grupo control, y la comparación entre ellos se muestran en la tabla 12 y figuras 55-58.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Comparando estos resultados con los rangos de normalidad de nuestro laboratorio, tanto las medias como los extremos se encuentran dentro de estos parámetros, exceptuando el tiempo de obturación (TO) COL/ADP de los controles cuyo extremo inferior es menor que el rango inferior de normalidad (4 controles tuvieron acortado este tiempo de obturación por debajo del rango inferior de la normalidad, además de que la tendencia era situarse hacia este extremo).

En el caso de los pacientes, tanto las medias como los extremos del análisis estadístico resultaron dentro de los límites de normalidad de nuestro laboratorio, a pesar de presentar también 3 pacientes con TO COL/ADP acortado en la muestra basal, la tendencia del resto era presentar un TO más próximo al extremo superior de la normalidad (ya que de hecho, hubieron 2 pacientes con TO COL/ADP alargado).

Además, puede observarse una tendencia al alargamiento en los tiempos de obturación en los pacientes, pero que no fue significativo, con ambos grupos de agonistas (COL/EPI y COL/ADP) tras la administración de FVIII.

Tabla 12. Datos de las pruebas de PFA-100.

PFA-100	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
COL/EPI (seg)	119,12±30	124,33±27,04 ¹	0,607	118,6±22,14	0,956	0,530
COL/ADP (seg)	85,68±14,39	89,2±16,67 ¹	0,115	83,93±17,61	0,763	0,408

media ±desviación típica; p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control; COL/EPI: agonistas colágeno y epinefrina; COL/ADP: agonistas colágeno y adenosin-difosfato. (1): no se pudo determinar esta variable en un paciente por muestra en mal estado.

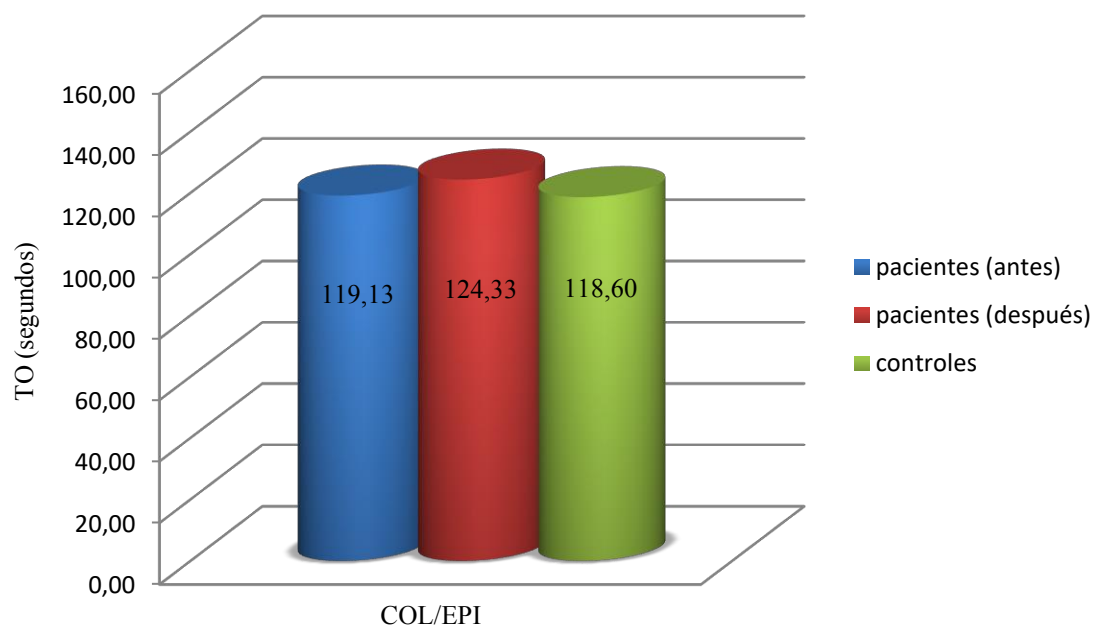


Figura 55. Representación del tiempo de obturación con COL/EPI (segundos) en los 3 grupos de estudio.

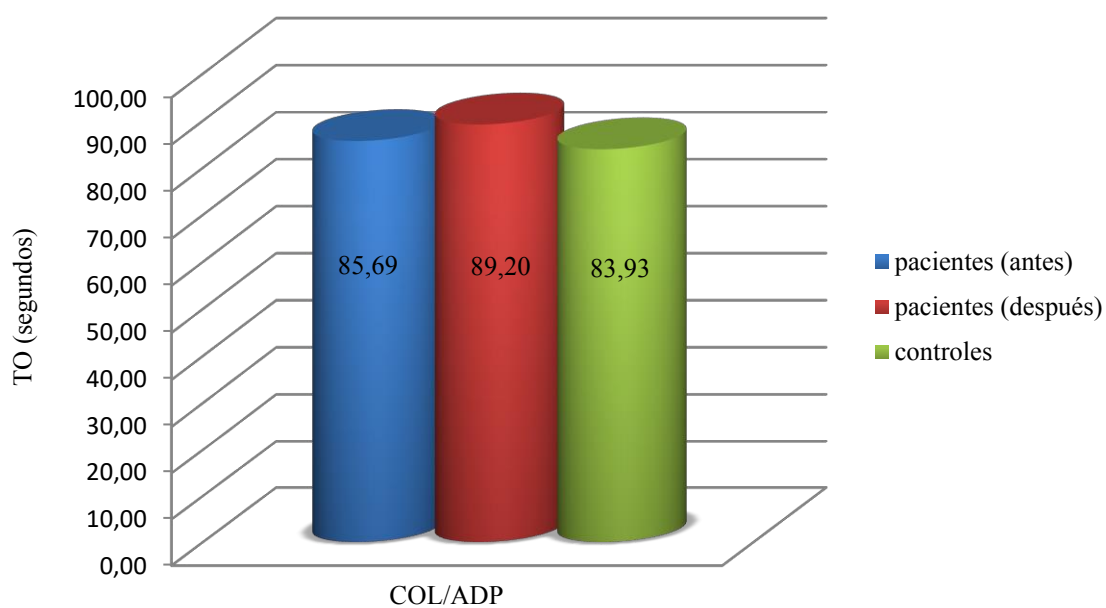


Figura 56 Representación del tiempo de obturación con COL/ADP (segundos) en los 3 grupos de estudio.

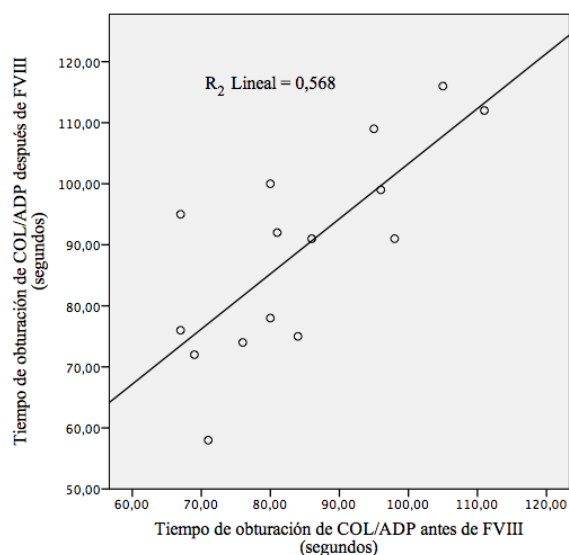


Figura 57. La correlación de Pearson entre COL/ADP antes y después de la administración de factor fue de 0,753 ($p=0,001$).

Con el TO COL/EPI no se observó correlación entre la muestra antes y después de factor.

Se observó también relación, pero inversa, entre la hemoglobina y el TO COL/ADP (correlación de Pearson -0,530, $p=0,035$) y entre el hematocrito y el TO COL/ADP (correlación de Pearson -0,503, $p=0,047$), es decir, a mayor nivel de hemoglobina o hematocrito menor tiempo de obturación de COL/ADP.

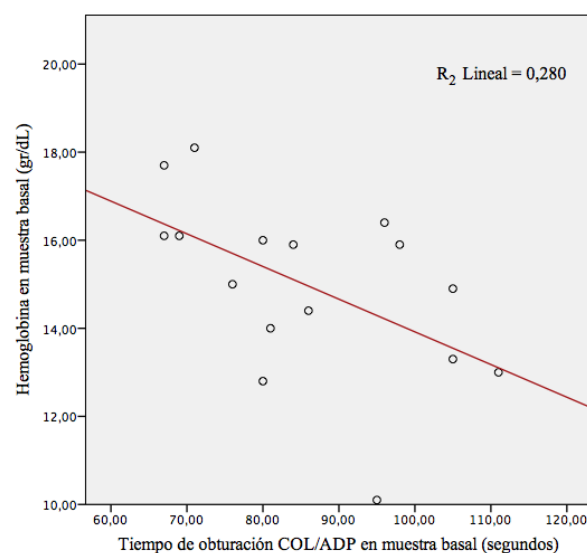


Figura 58. La correlación de Pearson entre el tiempo de obturación COL/ADP y hemoglobina en muestra basal de pacientes fue de -0,530 ($p=0,035$).

4.2.4. Función plaquetaria mediante agregación óptica con plasma rico en plaquetas , Chronolog®

Los datos obtenidos en el estudio de agregación óptica, tanto de pacientes como del grupo control, y la comparación entre ellos, se muestra en la siguiente tabla 13 y figura 59.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados respecto a los agonistas ADP, EPI, TRAP y ASPI.

Se observaron diferencias en la pendiente o velocidad de la agregación con ristocetina en el grupo de pacientes. La pendiente de la ristocetina basal fue de $88,06 \pm 16,95$ y tras el tratamiento de $78,13 \pm 19,96$ ($p=0,027$). Sin embargo, la agregación y el área bajo la curva de la ristocetina no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

También se observaron diferencias entre el grupo control y la muestra de los pacientes tras el factor en el caso del colágeno. La pendiente del colágeno en pacientes tras factor fue de $98,26 \pm 13,9$ y la de los controles de $83,6 \pm 20,15$ ($p=0,028$); el área bajo la curva del colágeno en pacientes tras factor fue de $442,56 \pm 128,66$ y la de los controles de $344,52 \pm 109,82$ ($p=0,033$).

En los pacientes se observaba una menor agregación tras la infusión de factor en el caso de los agonistas TRAP, ASPI y RISTO.

Los agonistas TRAP y ADP fueron los que presentaron una menor respuesta de agregación en todos los grupos.

Tabla 13. Agregación óptica en respuesta a diferentes agonistas plaquetarios en pacientes con HA (antes y después del tratamiento con FVIII) y controles.

AGREGACIÓN ÓPTICA	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
Agregación ADP(%)	57,75±24,28	59,06±22,04	0,756	58,66±29,15	0,925	0,966
Pendiente ADP (%/min)	71,68±14,17	75,33±11,50	0,289	67,93±15,80	0,491	0,154
ABC ADP (%)	329,77±196,60	299,13±175,68	0,887	262,52±159,33	0,306	0,555
Agregación COL(%)	81,12±9,45	85,62±7,95	0,055	75,66±17,79	0,291	0,051
Pendiente COL(%/min)	93,68±18,70	98,26±13,90	0,286	83,60±20,15	0,159	0,028
ABC COL(%)	441,35±166,78	442,56±128,66	0,883	344,52±109,82	0,068	0,033
Agregación EPI (%)	65,87±25,86	67,66±25,98 ¹	0,651	69,64±29,08 ¹	0,710	0,848
Pendiente EPI(%/min)	43,56±15,87	40,8±8,26 ¹	0,177	42,14±16,19 ¹	0,811	0,784
ABC EPI(%)	318,08±159,01	669,25±1261,70 ¹	0,335	316,17±151,38 ¹	0,973	0,308
Agregación TRAP(%)	64,93±29,94 ¹	60,6±27,95 ¹	0,477	55,4±36,46	0,440	0,665
Pendiente TRAP (%/min)	87,33±30,95 ¹	77,53±24,52 ¹	0,060	73±40,89	0,288	0,716
ABC TRAP(%)	349,09±244,58 ¹	342,95±267,61 ¹	0,887	281,26±215	0,427	0,492
Agregación ASPI(%)	85,00±6,49	84,33±5,43	0,752	83,73±8,43	0,648	0,818
Pendiente ASPI(%/min)	91,68±31,07	89,06±29,09	0,571	92,06±24,64	0,970	0,759
ABC ASPI(%)	438,19±150,34	457,99±193	0,553	407,11±77,18	0,479	0,349
Agregación RISTO(%)	90,06±6,87 ¹	88,86±7,3 ¹	0,475	89±4,67	0,623	0,953
Pendiente RISTO(%/min)	88,06±16,95 ¹	78,13±19,96 ¹	0,027	90,60±25,13	0,749	0,144
ABC RISTO(%)	480,24±103,98 ¹	503,98±128,8 ¹	0,440	473,78±84,39	0,853	0,454

media ±desviación típica; p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control; TRAP: péptido 6 que estimula el receptor de trombina PAR-1; ADP: adenosin-difosfato; COL: colágeno tipo I; EPI: epinefrina; ASPI: ácido araquidónico; RISTO: ristocetina; %/min: tanto por ciento por minuto.(1): en una muestra no se pudo determinar este parámetro por problema con el reactivo

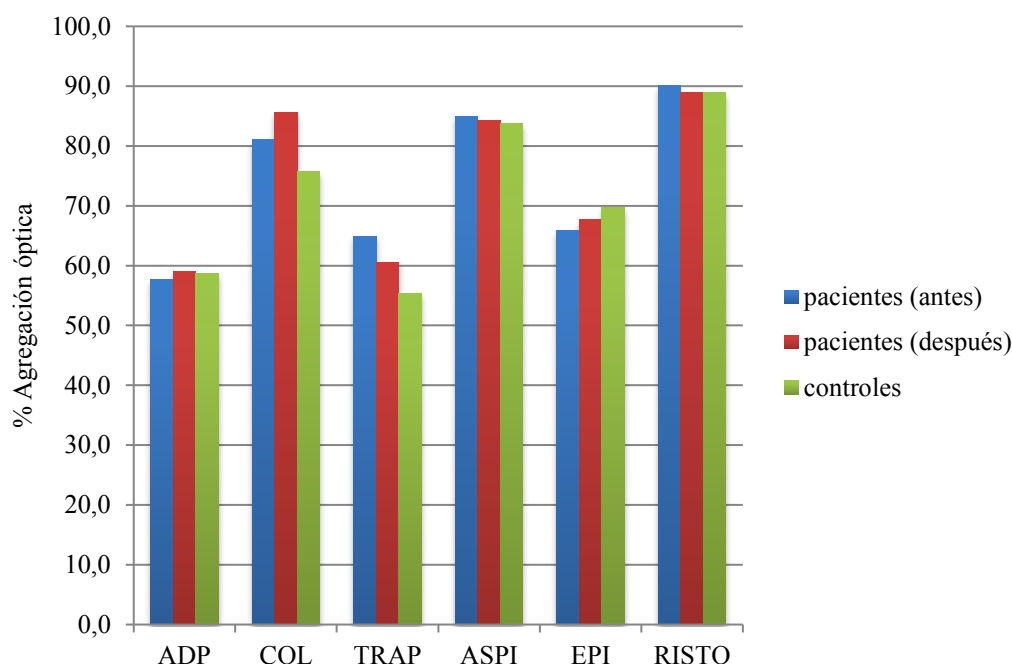


Figura 59. Agregación (%) mediante agregación óptica tras diferentes agonistas en los 3 grupos de estudio.

4.2.5. Función plaquetaria mediante impedancia con sangre total, Multiplate®

Los datos obtenidos en el estudio de agregación por impedancia, tanto en pacientes como controles, y la comparación entre ellos, se muestran en la tabla 14 y figura 60.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados respecto a los agonistas ADP, COL, EPI, ASPI y RISTO.

En el caso del agonista TRAP, se observaron diferencias entre el grupo control y los pacientes tras la infusión de factor. El porcentaje de agregación con TRAP de los pacientes tras factor fue de $147,62 \pm 38,09$ y de $173,16 \pm 26,7$ del grupo control ($p=0,040$). De los 5 pacientes en los que se observó una agregación disminuida al TRAP, 4 de ellos eran VHC+ (dos de estos cuatro eran además VIH+) y el quinto paciente presentaba una serología negativa. Un paciente VHC+ y VIH+ presentó una agregación de TRAP dentro de los valores normales.

Se compararon la media de las ABC de los 3 grupos de estudio con el rango de normalidad establecido en nuestro laboratorio y se observó que los controles tenían una ABC mayor respecto a ambos grupos de pacientes con todos los agonistas estudiados excepto con la ristocetina y se situaban dentro de estos rangos de normalidad. En el caso de los pacientes, presentaban una ABC menor a la normalidad, de manera sutil, en el caso de los agonistas ADP y colágeno. Sin embargo, cuando comparábamos los valores extremos de nuestros resultados, los pacientes no estaban dentro del rango de normalidad con todos los agonistas excepto con la ristocetina a bajas dosis; en el caso de los controles ocurría lo mismo con el ADP, colágeno, epinefrina y ristocetina a altas dosis.

Los valores representados de los agonistas epinefrina y ristocetina a bajas dosis suponen menor cantidad de sujetos en todos los grupos (tal y como se muestra en pie de la tabla) atendiendo a las normas metodológicas del sistema utilizado.

Los agonistas TRAP, ASPI y RISTO HIGH fueron los que presentaron una mayor respuesta de agregación en todos los grupos.

Se observó correlación inversa entre el hematocrito y el área bajo la curva (ABC) en la agregación con TRAP (correlación de Pearson -0,539, $p=0,038$) en muestras tanto antes como después de factor.

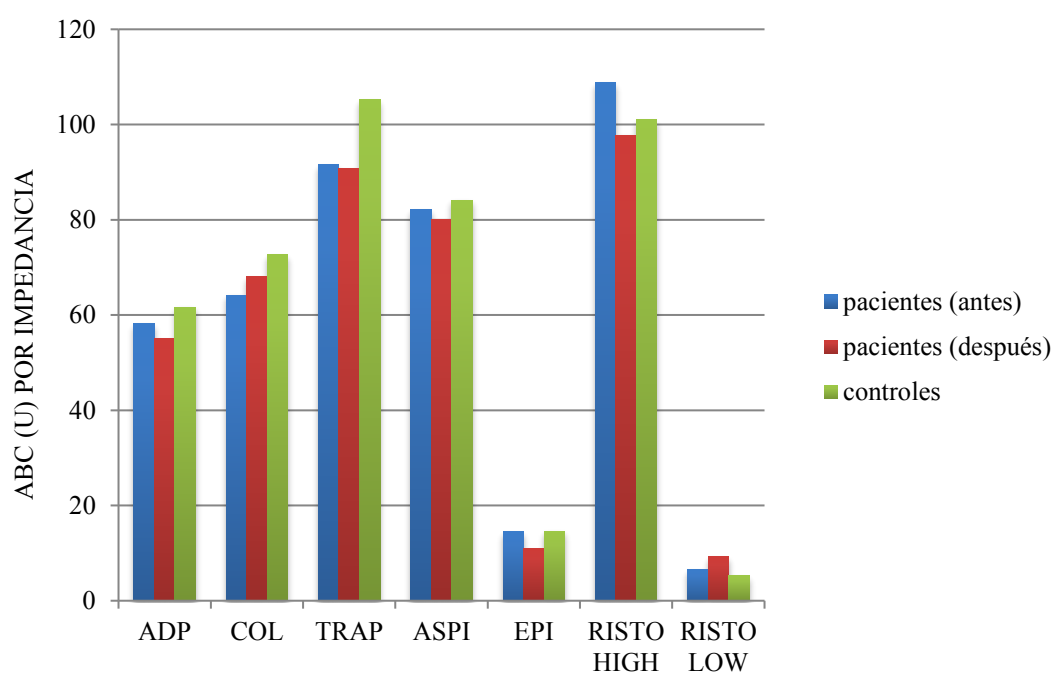


Figura 60. Área bajo la curva (ABC) mediante agregación por impedancia tras diferentes agonistas en los 3 grupos de estudio.

Tabla 14. Agregación por impedancia (Multiplate) en respuesta a diferentes agonistas plaquetarios en pacientes con HA (antes y después del tratamiento con FVIII) y controles.

AGREGACIÓN POR IMPEDANCIA	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
ABC ADP (U)	58,14±19,57 ²	55,06±21,87	0,699	61,66±21,47	0,649	0,404
Agregación ADP (UA)	104,34±35,73 ²	96,02±38,22	0,397	115,78±41,76	0,436	0,180
Velocidad ADP (UA/min)	14,48±4,36 ²	13,82±4,58	0,763	13,96±4,19	0,743	0,929
ABC COL (U)	64,2±18,59 ¹	68,12±16,15	0,221	72,73±13,22	0,159	0,394
Agregación COL (UA)	137,48±26,45 ¹	138,75±27,21	0,400	157,06±26,87	0,054	0,070
Velocidad COL (UA/min)	18,39±5,54 ¹	18,12±4,88	0,945	18,91±3,91	0,769	0,623
ABC TRAP (U)	91,53±33 ²	90,75±23,74	0,813	105,26±17,58	0,167	0,064
Agregación TRAP (UA)	150,66±49,41 ²	147,62±38,09	0,958	173,16±26,7	0,132	0,040
Velocidad TRAP (UA/min)	23,96±7,29 ²	23,73±6,85	0,678	26,56±5,97	0,294	0,231
ABC ASPI (U)	82,21±21,8 ²	80,12±24,92	0,581	84,14±13,67 ¹	0,781	0,596
Agregación ASPI (UA)	134,98±33,09 ²	130,14±38,23	0,912	141,3±20,87 ¹	0,551	0,340
Velocidad ASPI (UA/min)	21,99±7,01 ²	21,64±7,7	0,505	21,24±3,36 ¹	0,721	0,855
ABC EPI (U)	14,44±6,69 ³	10,92±6,46 ²	0,868	14,63±6,62 ⁵	0,95	0,172
Agregación EPI (UA)	30,51±11,96 ³	24,15±12,66 ²	0,921	32,83±17 ⁵	0,735	0,157
Velocidad EPI (UA/min)	4,86±1,29 ³	4,21±1,06 ²	0,604	4,83±1,42 ⁵	0,961	0,224
ABC RISTO H (U)	108,78±37,5 ²	97,8±41,12 ¹	0,137	101±29,33 ¹	0,546	0,812
Agregación RISTO H (UA)	215,9±66,4 ²	195,91±65,91 ¹	0,193	210,59±51,9 ¹	0,815	0,513
Velocidad RISTO H (UA/min)	31,96±11,3 ²	29,46±12,75 ¹	0,439	30,15±7,8 ¹	0,627	0,861
ABC RISTO L (U)	6,57±6,53 ⁴	9,28±5,7 ⁴	0,585	5,25±3,41 ³	0,625	0,115
Agregación RISTO L (UA)	15,87±10,93 ⁴	20,5±10,67 ⁴	0,376	13±4,77 ³	0,54	0,096
Velocidad RISTO L (UA/min)	3,07±1,02 ⁴	3,67±0,97 ⁴	0,972	3,62±0,83 ³	0,27	0,922

media ±desviación típica; p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control; TRAP: péptido 6 que estimula el receptor de trombina PAR-1; ADP: adenosin-difosfato; COL: colágeno tipo I; EPI: epinefrina; ASPI: ácido araquidónico; RISTO H (high): ristocetina a altas dosis; RISTO L (low): ristocetina a bajas dosis; U: unidades; UA: unidades arbitrarias; UA/min: unidades arbitrarias por minuto. (1): una muestra; (2): dos muestras; (3): 7 muestras; (4): 9 muestras; (5): 4 muestras insuficientes o no fueron valorables según el índice de correlación y la diferencia de medias del sistema analizador.

4.2.6. Función plaquetaria mediante citometría de flujo

Los datos obtenidos en el estudio de agregación por citometría de flujo y la expresión de marcadores de activación plaquetaria, tanto de pacientes como del grupo control, y la comparación entre ellos, se muestran en la siguiente tabla 15 y figuras 61-65.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 15. Agregación y activación plaquetaria medida mediante citometría de flujo en respuesta a diferentes agonistas plaquetarios, en pacientes con HA (antes y después del tratamiento con FVIII) y controles.

AGREGACIÓN Y ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR CITOMETRÍA	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
Agregación (%)	93,04±8,05	92,55±6,61	0,792	89,87±14,22	0,448	0,504
CD62 BASAL (IMF)	1,37±0,28	1,37±0,27	0,942	1,39±0,31 ¹	0,790	0,797
CD62 TRAP (IMF)	28,05±10,43	25,22±9,16	0,052	24,9±14,55 ¹	0,498	0,944
CD63 BASAL (IMF)	1±0,017	1,01±0,047	0,317	1±0,016 ¹	0,900	0,900
CD63 TRAP (IMF)	3,93±3,08	3,67±2,95	0,136	3,90±2,69 ¹	0,982	0,827
PLAQ-LEUCO BASAL(IMF)	20,35±6,61	20,42±5,36	0,977	23,22±21,0	0,470	0,358
PLAQ-LEUCO TRAP (IMF)	206,06±157,36	172,08±110,98	0,235	181,12±151,55	0,657	0,850
FT BASAL (IMF)	23,22±5,59 ²	24,11±5,60 ²	0,442	22,74±8,40 ³	0,865	0,625
FT TRAP (IMF)	351,77±215,49 ²	387,42±203,47 ²	0,481	370,33±23 ³	0,833	0,841

media ±desviación típica; p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control; IMF: intensidad media de fluorescencia; PLAQ-LEUCO: agregados plaqueta-leucocito; FT: factor tisular; TRAP: péptido 6 que estimula el receptor de trombina PAR-1; (1): una muestra no se pudo determinar por problemas con la muestra; (2) dos muestras no se pudieron determinar por problemas con la muestra y el reactivo; (3) tres muestras no se pudieron determinar por problemas con la muestra y el reactivo.

A pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, si observamos en la gráfica siguiente de agregación por citometría de flujo que en los controles existe, de forma sutil, menor agregación, este dato puede explicarse porque en uno de los controles la agregación fue de 43,85% sin que exista ninguna enfermedad conocida y estando la muestra en buenas condiciones.

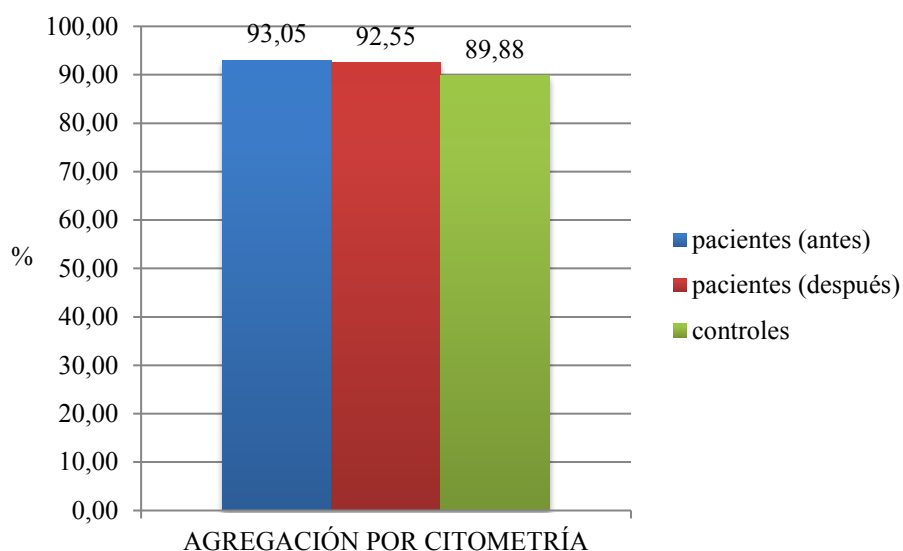


Figura 61. Agregación en sangre entera en respuesta a TRAP, medido mediante citometría de flujo en los 3 grupos de estudio.

En el caso de los pacientes, el aumento de la expresión de CD62 y CD63 y la formación de agregados plaqueta-leucocito, en respuesta al agonista TRAP y agregado plaqueta-leucocito, fue menor después del factor FVIII. En el caso del factor tisular, se observó mayor expresión del mismo en respuesta a TRAP, tras la administración del factor.

De hecho, la expresión de CD62 tras TRAP en la muestra basal de los pacientes fue superior tanto a la muestra posterior al factor (con una p cerca de la significancia estadística, $p=0,052$) como a los controles. Lo mismo ocurría con los agregados plaqueta-leucocito, donde la muestra basal de los pacientes reflejaba mayor expresión de los mismos que la muestra posterior y los controles.

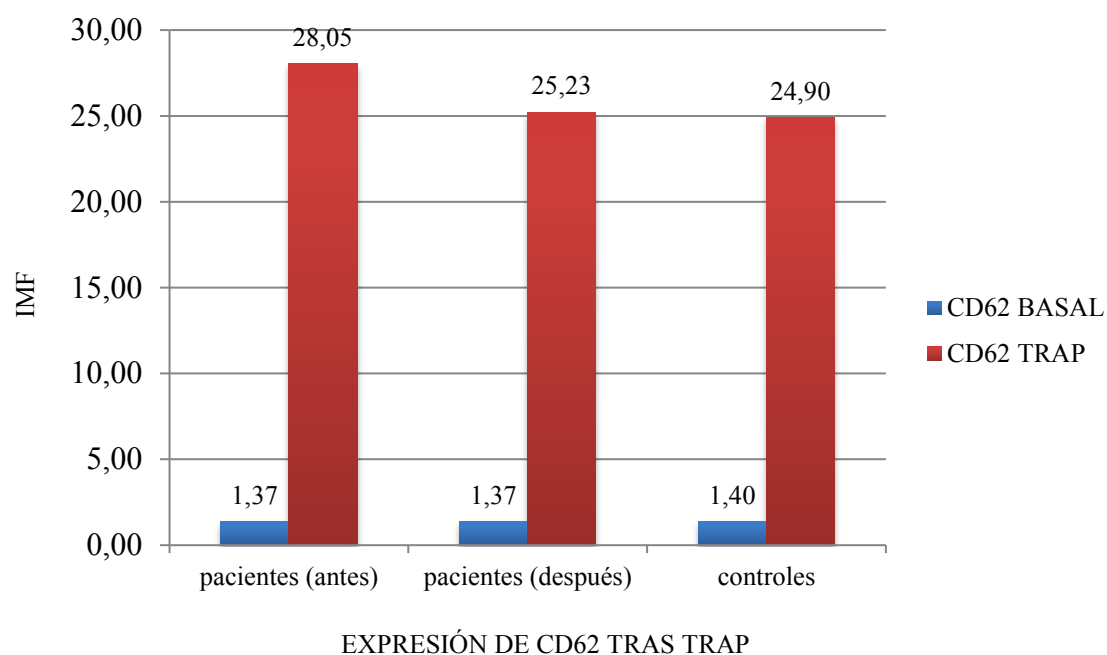


Figura 62. Expresión de P-selectina (CD62) tras el agonista TRAP en los 3 grupos de estudio.

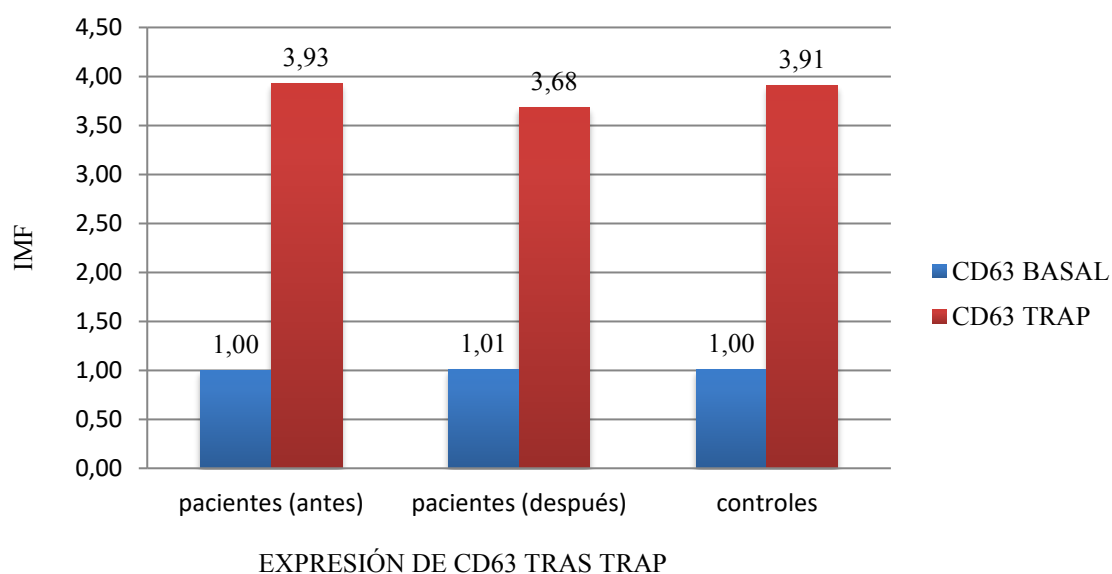


Figura 63. Expresión de CD63 tras TRAP en los 3 grupos de estudio.

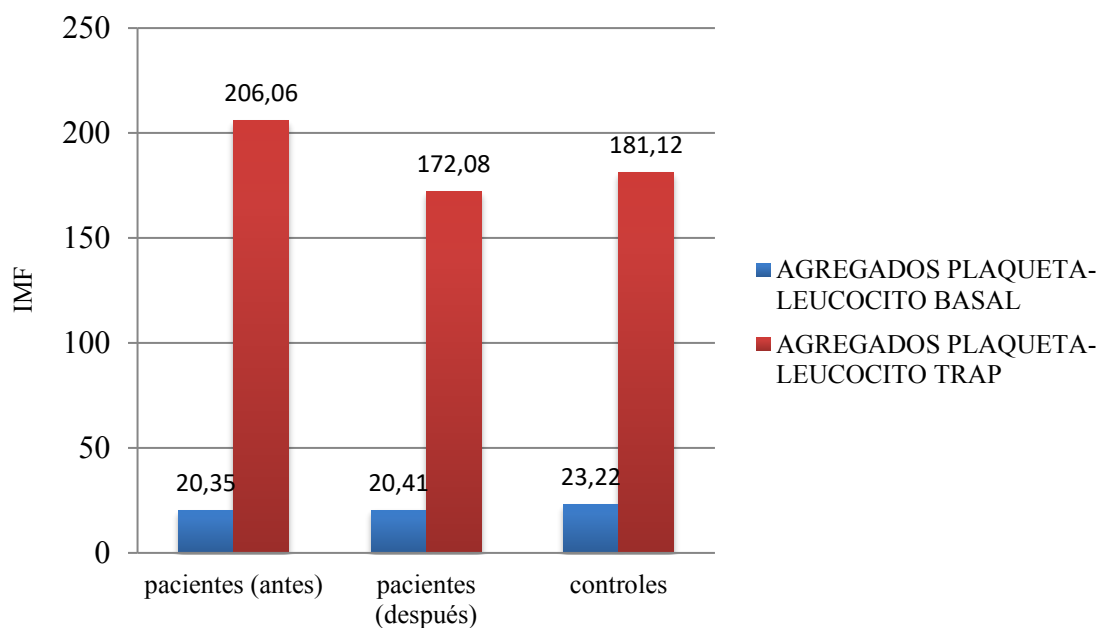


Figura 64. Agregados plaqueta-leucocito tras TRAP en los 3 grupos de estudio.

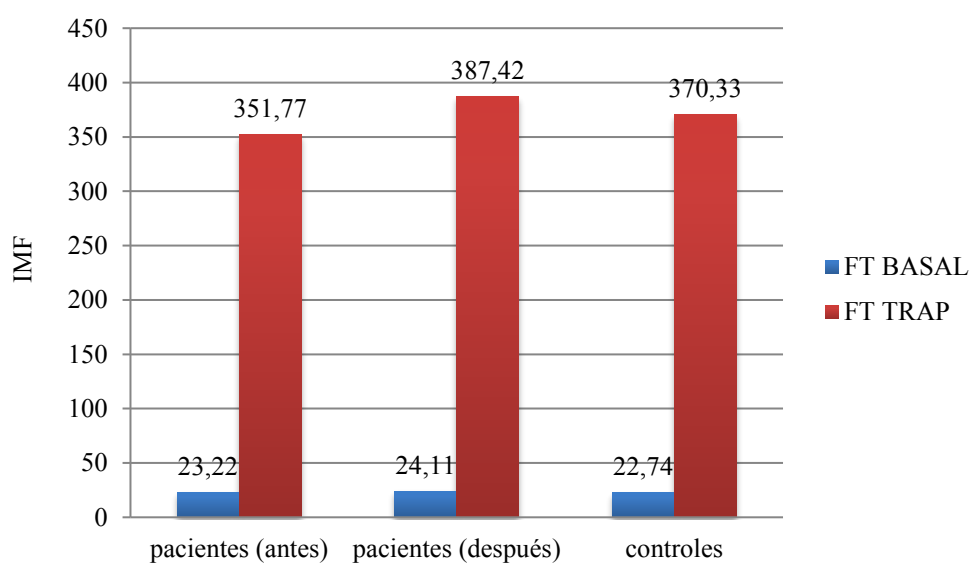


Figura 65. Expresión de Factor tisular (FT) tras el agonista TRAP en los 3 grupos de estudio.

No se observó correlación entre la cantidad de FVIII semanal consumido y la p-selectina basal tanto antes (IC=0,416; $p=0,109$) como después de factor (IC= 0,391, $p=0,134$).

Tampoco observamos correlación entre la p-selectina basal y el % FVIII, tanto en condiciones basales (IC=-0,06; $p=0,824$) como después de la administración de FVIII (IC=-0,298; $p=0,262$).

4.2.7. Estudio de las micropartículas plasmáticas

Los datos obtenidos en el estudio de micropartículas plasmáticas (MPs), tanto de pacientes como del grupo control, y la comparación entre ellos, se muestran en las siguiente tablas 16 y 17 y figuras 66-69.

Se observaron diferencias significativas entre los pacientes (muestra basal) y los controles: los pacientes antes del factor presentaron menor cantidad de MPs totales ($434,06 \pm 245,13/\mu\text{L}$) que los controles ($633,42 \pm 258,28/\mu\text{L}$) ($p=0,042$). Tras la administración de FVIII, no se observaron estas diferencias.

El número de MPs CD62+ fue mayor en los controles ($483,35 \pm 200,63/\mu\text{L}$) que en muestra basal de pacientes ($323,8 \pm 46,57/\mu\text{L}$) y que en la muestra tras factor ($336,86 \pm 34,48/\mu\text{L}$) ($p=0,032$ y $p=0,028$ respectivamente).

Entre los pacientes, tras la infusión de factor VIII, se observó disminución del número de MPs de origen endotelial (CD144+) (basal: $2,13 \pm 0,54/\mu\text{L}$; tras factor: $1 \pm 0,32/\mu\text{L}$) ($p=0,013$).

Tabla 16. Número de micropartículas (MPs), totales, de origen plaquetario (CD41, CD62), de origen endotelial (CD144). Las MPs se seleccionaron de partículas menores de 1 micra y que expresaban fosfatidilserina (anexinaV+). Resultados obtenidos en muestras de plasma de pacientes con HA (antes y después del tratamiento con FVIII) y controles.

Micropartículas	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
MPs (n°/ μL)	$434,06 \pm 245,13^1$	$479,71 \pm 148,46^1$	0,402	$633,42 \pm 258,28^1$	0,042	0,067
CD41 (n°/ μL)	$277,66 \pm 44,98^1$	$325,13 \pm 35,83^1$	0,388	$399,71 \pm 185,70$	0,079	0,229
CD62 (n°/ μL)	$323,8 \pm 46,57^1$	$336,86 \pm 34,48^1$	0,826	$483,35 \pm 200,63$	0,032	0,028
CD41CD62 (n°/ μL)	$227,46 \pm 35,23^1$	$267,73 \pm 29,55^1$	0,386	$337,71 \pm 159,82$	0,055	0,184
CD144 (n°/ μL)	$2,13 \pm 0,54^1$	$1 \pm 0,32^1$	0,013	$4,428 \pm 7,28$	0,274	0,105

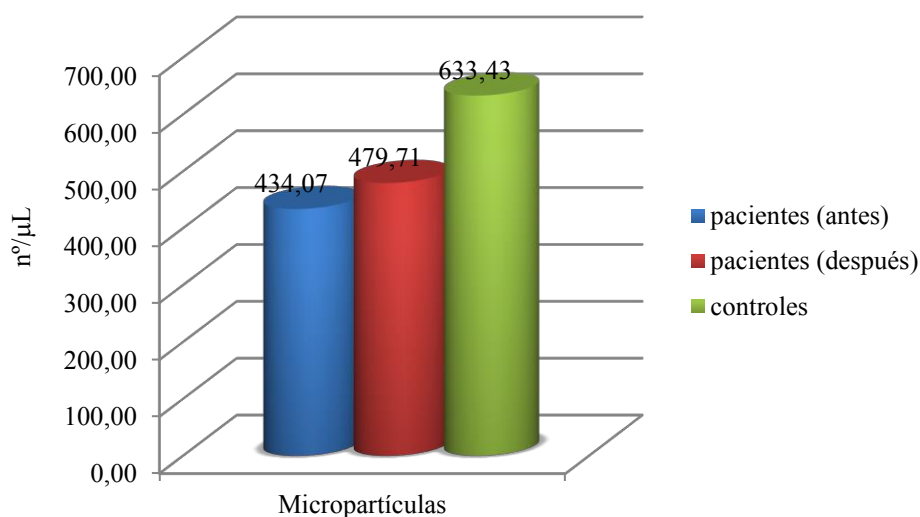
media $\pm$ desviación típica; p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control. MPs: micropartículas. (1): una muestra no se pudo determinar por problemas con la muestra.

En relación con la edad, en los pacientes no se observaron diferencias significativas en el número total de MPs, ni tampoco en las MPs de origen plaquetario. Sin embargo, se observó disminución de las MPs de origen endotelial (CD144+) tras la infusión de FVIII (basal fue $3,33 \pm 1,87/\mu\text{L}$ y tras factor de $0,33 \pm 0,516/\mu\text{L}$) ($p=0,001$) .

Tabla 17. Relación entre el número de micropartículas plasmáticas (MPs) y la edad de los pacientes.

Micropartículas y edad	>18 años	<18 años	P
MPS ^A (n°/μL)	488,22 ± 281,81 ¹	352±167,28 ²	0,312
CD41 ^A (n°/μL)	288,44±203,68 ¹	261,5±134,47 ²	0,781
CD62 ^A (n°/μL)	358,44±209,95 ¹	271,83±123,1 ²	0,382
CD41CD62 ^A (n°/μL)	233,44±160,09 ¹	218,5±104,73 ²	0,844
CD144 ^A (n°/μL)	3,33±1,87 ¹	0,33±0,516 ²	0,001
MPS ^B (n°/μL)	540,625±150,46 ¹	398,5±108,448 ²	0,074
CD41 ^B (n°/μL)	339,44±163,93 ¹	303,66±100,04 ²	0,642
CD62 ^B (n°/μL)	353,22±160,71 ¹	312,33±86,13 ²	0,581
CD41CD62 ^B (n°/μL)	237,33±134,55 ¹	259,33±87,01 ²	0,826
CD144 ^B (n°/μL)	1,33±1,5 ¹	0,5±0,547 ²	0,219

media ±desviación típica; p significativa < 0,05; MPs: micropartículas; (1): 9 pacientes; (2): 6 pacientes; A) muestra basal; B) muestra tras factor.

**Figura 66.** Número de micropartículas plasmáticas (MPs) en los 3 grupos de estudio.

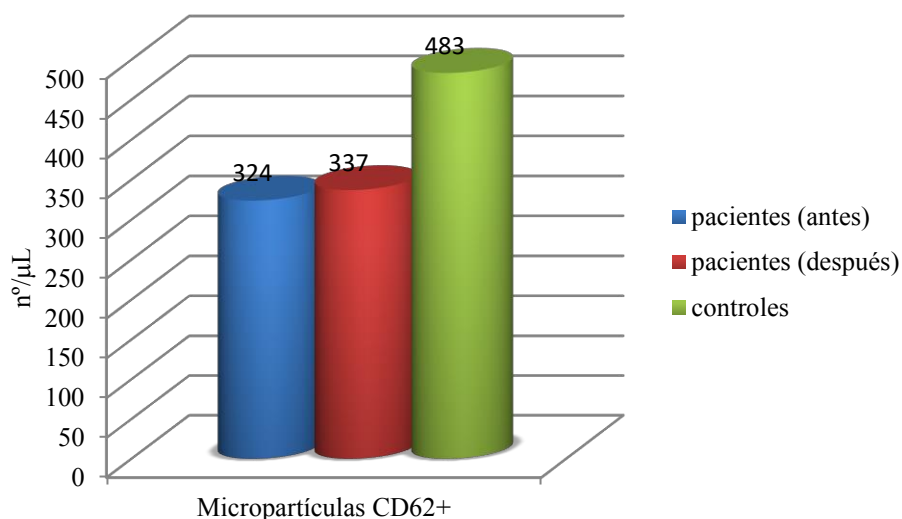


Figura 67. Número de micropartículas CD62+ en los 3 grupos de estudio.

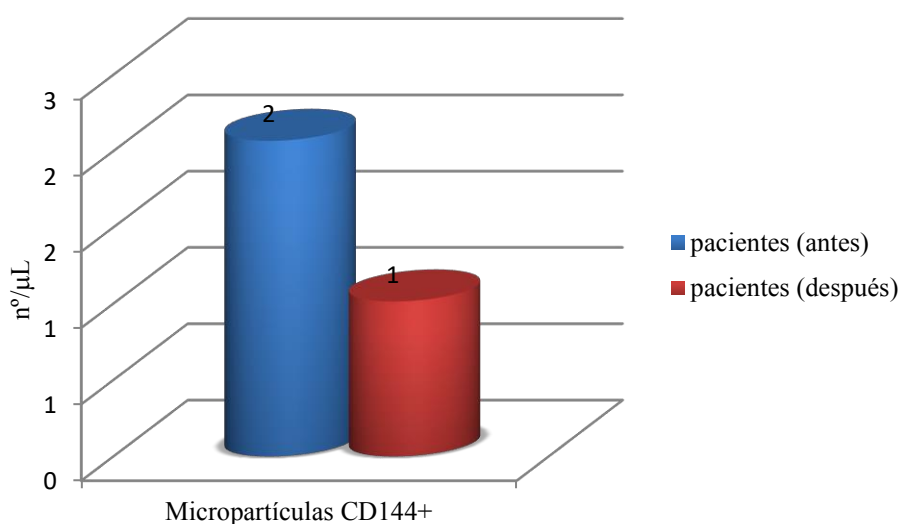


Figura 68. Número de micropartículas plasmáticas (MPs) CD144+ en los pacientes con hemofilia A.

No se observó correlación entre la cantidad de FVIII semanal consumido y las MPs totales tanto antes (IC=0,217; p=0,437) como después de factor VIII (IC= 0,323, p=0,259).

Tampoco observamos correlación entre las MPs totales y el % de FVIII ni en condiciones basales (IC=-0,06; p=0,832) ni después de la administración de FVIII (IC=-0,034; p=0,908).

Se encontró correlación entre las plaquetas y las MPs que expresan p-selectina (IC=0,573; p=0,025).

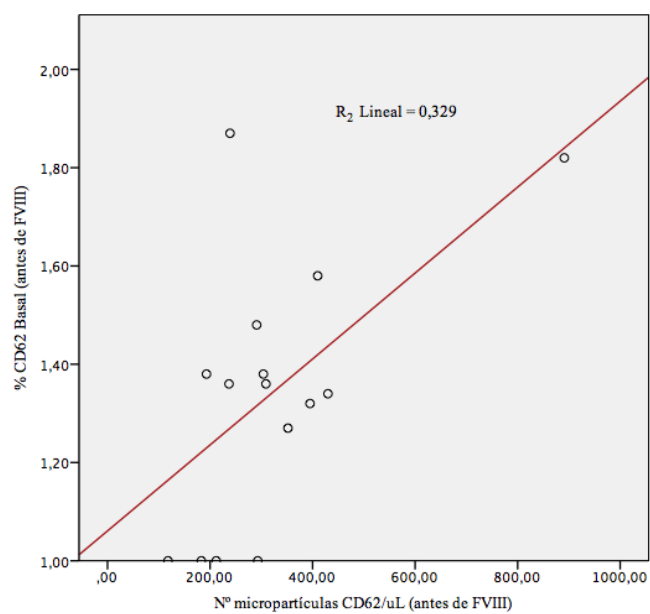


Figura 69. Correlación entre el número de micropartículas plasmáticas CD62+ y la expresión de CD62+ plaquetario (muestra basal).

4.2.8. Liberación de calcio citoplasmático plaquetario

En la tabla 18 aparecen los datos obtenidos en el estudio de la liberación de Ca^{2+} citoplasmático plaquetario, tanto de pacientes como del grupo control, y la comparación entre ellos. Destacar que la tabla muestra el punto inicial y el final de la medición, sin embargo, en las 2 gráficas siguientes aparece representado la evolución del Ca^{2+} intracelular durante los 5 minutos de registro.

Tabla 18. Liberación de calcio citoplasmático plaquetario

LIBERACIÓN DE CALCIO	HA BASAL	HA FVIII	p*	CONTROL	p**	p***
IMF tras ADP (30 seg).	8,669±1,996 ¹	8,88±1,92	0,890	8,38±2,14 ¹	0,53	0,496
IMF tras ADP (300 seg)	3,34±0,7 ¹	3,6±0,71	0,710	3,64±1,049 ¹	0,75	0,950
IMF tras TRAP (30 seg)	6,15±2,05 ²	5,48±2,46 ¹	0,360	5,83±2,3 ¹	0,99	0,230
IMF tras TRAP (300 seg)	1,56±0,23 ²	1,63±0,32 ¹	0,790	1,87±0,71 ¹	0,23	0,315

media ±desviación típica (IMF: intensidad media de fluorescencia); p significativa < 0,05; *significación estadística entre HA basal y HA tras infusión de FVIII; **significación estadística entre HA basal y grupo control; ***significación estadística entre HA tras infusión de FVIII y grupo control; TRAP: péptido 6 que estimula el receptor de trombina PAR-1; ADP: adenosin-difosfato. (1): una muestra no se pudo determinar por problemas con la muestra; (2): dos muestras no se pudieron determinar por problemas con la muestra

En ambas figuras (70 y 71) lo que se observa es un aumento inicial, llegándose al pico máximo durante los primeros 30 segundos para luego decrecer progresivamente, sin alcanzar los niveles basales.

Tras comparar los tres grupos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

A pesar de que no encontrar diferencias significativas entre los grupos, cuando usábamos TRAP como agonista, se observa que los niveles de Ca^{2+} intracelular se mantienen más elevados en el grupo control que en el de los pacientes con HA, tanto antes como después del FVIII (figura 71).

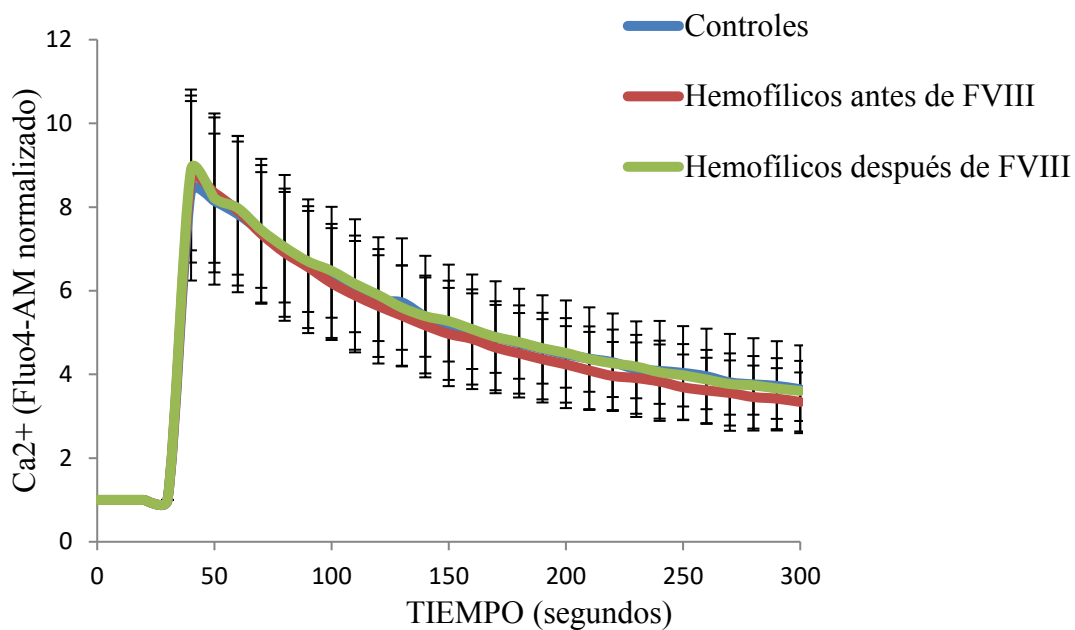


Figura 70. Liberación de calcio citoplasmático plaquetario tras agonista ADP. Se observa una superposición de la curva de los controles (color azul) y la de los pacientes (color verde) tras la administración del factor.

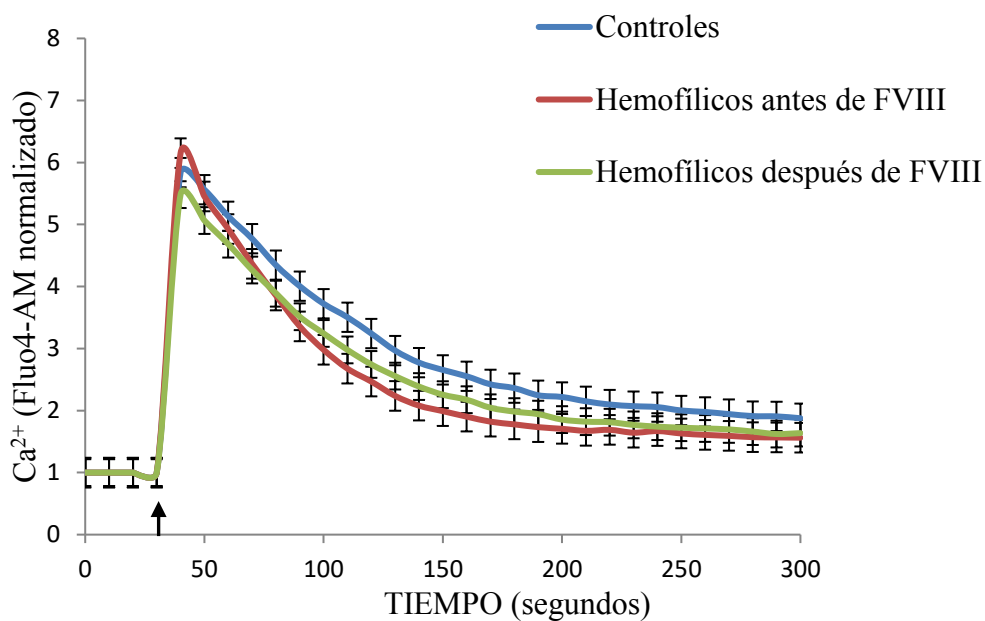


Figura 71. Liberación de calcio citoplasmático plaquetario tras agonista TRAP.

4.2.9. Comparación entre las técnicas de agregación plaquetaria utilizadas en nuestro estudio

Estudiamos la correlación existente entre las técnicas de agregación utilizadas con los diferentes agonistas mediante el test de correlación de Pearson.

4.2.9.1. Agregación con trombina. Impedancia versus citometría de flujo

En la tabla 19 observamos que no existía correlación en los resultados obtenidos en nuestro estudio entre el método de agregación por impedancia y la citometría de flujo.

Tabla 19. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a trombina (TRAP) medida mediante citometría de flujo (CMF) y la medida mediante impedancia (multiplate).

Correlación entre agregación en respuesta a trombina, por citometría de flujo (CMF) y por impedancia				Impedancia					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
CMF	MUESTRA BASAL	Agregación	IC	-0,011	-0,010	0,023	0,128	0,141	0,046
			p	0,970	0,971	0,934	0,637	0,603	0,865
	TRAS FVIII	Agregación	IC	0,161	0,173	0,094	0,216	0,173	0,208
			p	0,566	0,538	0,74	0,421	0,521	0,439

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva

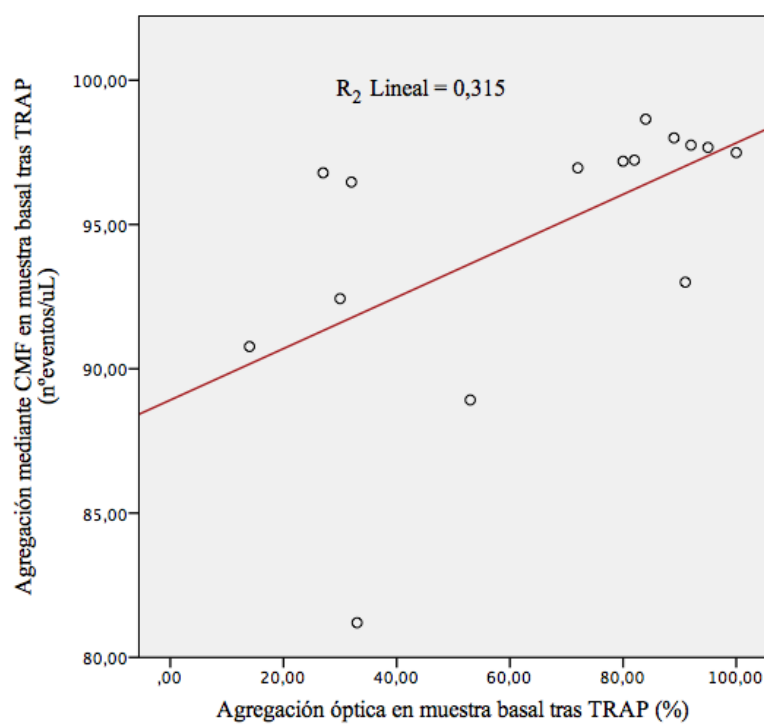
4.2.9.2. Agregación con trombina. Agregación óptica versus citometría de flujo

En la tabla 20 y en la figura 72 observamos que existía correlación en nuestro estudio entre el método de agregación óptica y la citometría de flujo en la muestra basal de nuestros pacientes.

Tabla 20. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a trombina (TRAP) medida mediante citometría de flujo (CMF) y la medida con agregometría óptica

Correlación entre CMF y agregación óptica con trombina				Agregación óptica					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
Citometria de flujo	MUESTRA BASAL	Agregación	IC	0,569	0,561	0,513	0,48	0,502	0,476
			p	0,027	0,03	0,051	0,07	0,057	0,073
	TRAS FACTOR	Agregación	IC	0,557	0,488	0,425	0,483	0,443	0,418
			p	0,031	0,065	0,115	0,068	0,098	0,121

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva



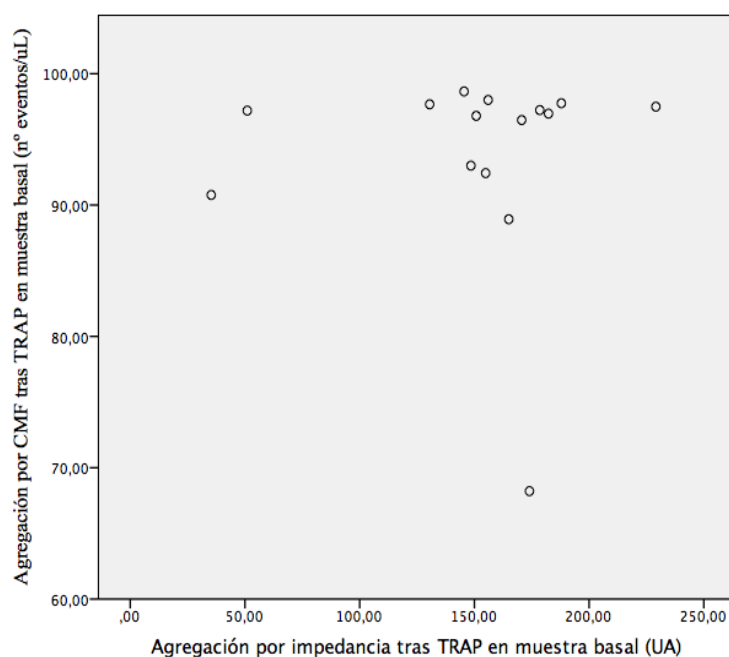


Figura 72. En la figura superior observamos como existe correlación lineal entre los métodos de medición agregación óptica y la citometría de flujo (CMF) cuando utilizamos el agonista TRAP en la muestra basal de los pacientes. En la figura inferior, no se observa correlación entre los métodos de impedancia y la CMF.

4.2.9.3. Agregación con trombina. Agregación óptica versus impedancia.

Se observó correlación entre la velocidad y el área bajo la curva (ABC) de agregación medida por impedancia (muestra sanguínea tras factor) y la velocidad de agregación medida por agregación óptica (muestra basal) tras la adición de TRAP, también entre la velocidad de agregación medida por impedancia (muestra tras factor) y la agregación medida por agregación óptica (muestra tras factor) (tabla 21 y figura 73).

Tabla 21. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a trombina medida mediante impedancia o medida mediante el método óptico.

Correlación entre agregación por impedancia y agregación óptica con trombina				Agregación por impedancia					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
Agregación óptica	MUESTRA BASAL	ABC	IC	0,334	0,341	0,327	0,409	0,345	0,456
			p	0,243	0,233	0,254	0,13	0,208	0,087
		Agregación	IC	0,354	0,37	0,379	0,465	0,394	0,520
			p	0,215	0,192	0,182	0,081	0,146	0,047
		Velocidad	IC	0,404	0,415	0,463	0,521	0,448	0,596
			p	0,152	0,14	0,096	0,047	0,094	0,019
	TRAS FACTOR	ABC	IC	0,395	0,391	0,367	0,333	0,3	0,386
			p	0,163	0,167	0,196	0,225	0,278	0,155
		Agregación	IC	0,514	0,515	0,492	0,479	0,445	0,532
			p	0,06	0,059	0,074	0,071	0,096	0,041
		Velocidad	IC	0,185	0,164	0,253	0,296	0,223	0,475
			p	0,526	0,576	0,383	0,284	0,424	0,073

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva

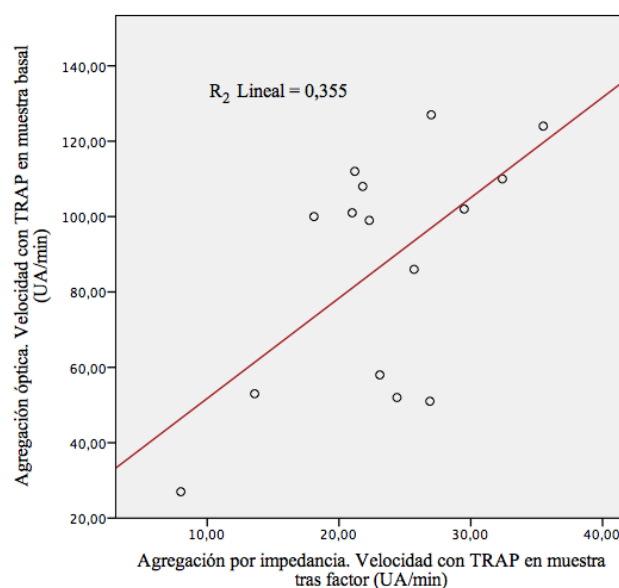


Figura 73: Se observa correlación entre la velocidad de agregación medida por impedancia (tras FVIII) y la velocidad de agregación medida por agregación óptica (muestra basal) tras la adición de TRAP.

4.2.9.4. Agregación con colágeno. Agregación óptica versus impedancia

Se observó correlación entre el ABC (muestra basal) mediante agregación por impedancia y la velocidad de agregación (muestra tras factor) con agregación óptica. En el resto de parámetros no se observó relación (tabla 22).

Tabla 22. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a colágeno medida mediante impedancia o medida mediante el método óptico.

Correlación entre agregación por impedancia y agregación óptica con colágeno				Agregación por impedancia					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
Agregación óptica	MUESTRA BASAL	ABC	IC p	0,302	0,239	0,271	0,262	0,248	0,359
				0,274	0,39	0,329	0,326	0,353	0,173
		Agregación	IC	0,436	0,286	0,342	0,392	0,309	0,394
				0,104	0,301	0,213	0,133	0,245	0,131
		Velocidad	p	0,259	0,2	0,285	0,426	0,332	0,416
				0,352	0,475	0,304	0,099	0,209	0,109
	TRAS FACTOR	ABC	IC	0,323	0,268	0,189	0,162	0,196	0,11
				0,261	0,354	0,518	0,562	0,485	0,696
		Agregación	p	0,172	-0,006	0,018	-	-0,299	-0,161
0,541	0,983			0,948	0,301 0,257	0,261	0,551		
	Velocidad	IC	0,565	0,402	0,274	0,233	0,205	0,168	
			0,035	0,155	0,344	0,403	0,464	0,55	

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva

4.2.9.5 Agregación con ADP. Agregación óptica versus impedancia

Se observó relación directa entre ambos métodos de agregación tanto antes como después de factor utilizando como agonista el ADP (tabla 23 y figura 74).

Tabla 23. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a ADP medida mediante impedancia o medida mediante el método óptico.

Correlación entre agregación por impedancia y agregación óptica con ADP				Agregación por impedancia					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
Agregación óptica	MUESTRA BASAL	ABC	IC	0,541	0,570	0,581	0,427	0,414	0,456
			p	0,046	0,033	0,029	0,099	0,111	0,076
		Agregación	IC	0,568	0,645	0,465	0,451	0,448	0,453
			p	0,034	0,013	0,093	0,079	0,082	0,078
		Velocidad	IC	0,495	0,471	0,618	0,47	0,451	0,438
			p	0,072	0,089	0,019	0,066	0,079	0,09
	TRAS FACTOR	ABC	IC	0,477	0,452	0,292	0,414	0,445	0,431
			p	0,099	0,121	0,333	0,125	0,097	0,109
		Agregación	IC	0,533	0,552	0,359	0,511	0,546	0,489
p	0,05		0,041	0,207	0,043	0,029	0,055		
Velocidad	IC	0,477	0,452	0,363	0,614	0,653	0,573		
	p	0,099	0,121	0,223	0,015	0,008	0,026		

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva

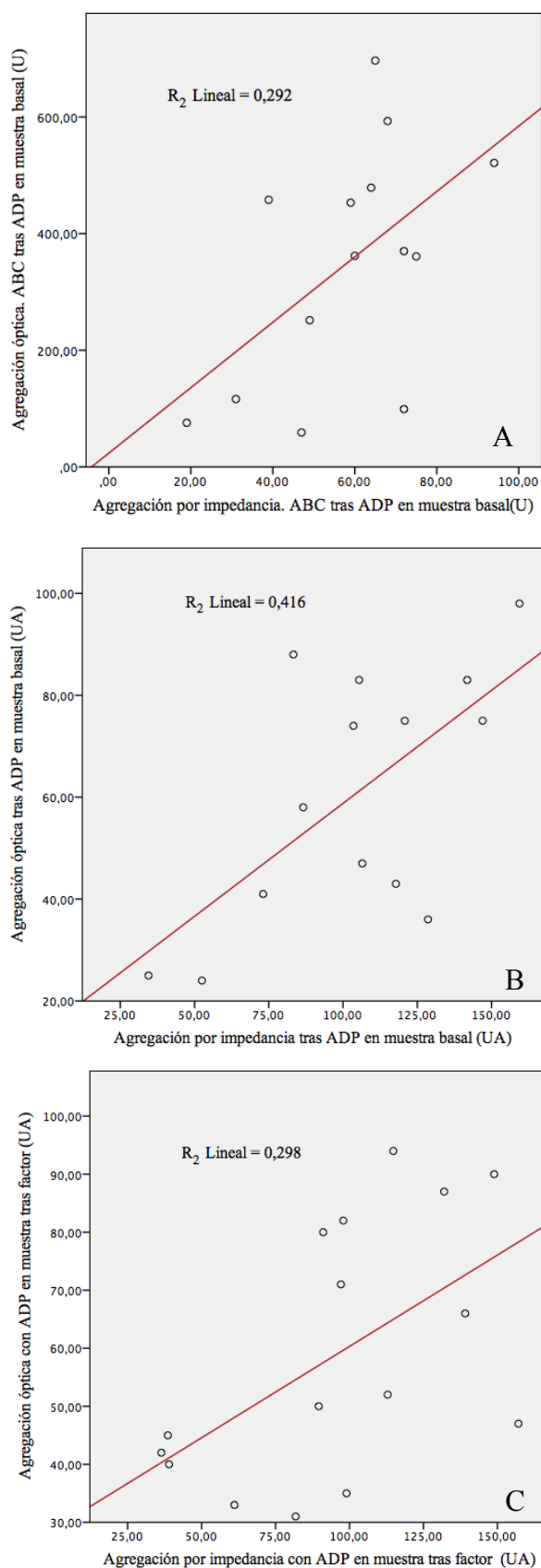


Figura 74. A) relación entre ABC (impedancia) y ABC (óptica) en muestra basal. B) relación entre % agregación (impedancia) y % agregación (óptica) en muestra basal. C) relación entre % agregación (impedancia) y % agregación (óptica) en muestra tras factor.

4.2.9.6 Agregación con epinefrina. Agregación óptica versus impedancia

No se observó relación entre ambos métodos de agregación tanto antes como después de factor utilizando como agonista la epinefrina (tabla 24).

Tabla 24. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a epinefrina medida mediante impedancia o medida mediante el método óptico.

Correlación entre agregación por impedancia y agregación óptica con epinefrina				Agregación por impedancia					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
Agregación óptica	MUESTRA BASAL	ABC	IC p	-0,043 0,913	0,026 0,948	-0,103 0,792	-0,012 0,968	-0,01 0,972	-0,153 0,601
		Agregación	IC p	0 0,999	0,031 0,936	-0,101 0,796	-0,053 0,858	-0,033 0,911	-0,268 0,355
		Velocidad	IC p	0,251 0,514	0,245 0,525	0,096 0,806	0,163 0,577	0,155 0,596	0,11 0,708
	TRAS FACTOR	ABC	IC p	0,235 0,575	0,128 0,763	0,048 0,909	0,316 0,293	0,211 0,488	0,095 0,757
		Agregación	IC p	0,653 0,079	0,656 0,077	0,487 0,221	0,546 0,054	0,53 0,063	0,254 0,402
		Velocidad	IC p	-0,071 0,867	0,017 0,969	0,017 0,967	0,35 0,24	0,451 0,122	0,258 0,395

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva

4.2.9.7. Agregación con ASPI. Agregación óptica versus impedancia

No se observó relación entre ambos métodos de agregación tanto antes como después de factor utilizando como agonista ASPI (tabla 25).

Tabla 25. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a ASPI medida mediante impedancia o medida mediante el método óptico.

Correlación entre agregación por impedancia y agregación óptica con ASPI				Agregación por impedancia					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
Agregación óptica	MUESTRA BASAL	ABC	IC p	0,099 0,736	0,066 0,823	0,014 0,963	0,094 0,729	0,079 0,771	0 0,999
		Agregación	IC p	0,013 0,965	0,067 0,827	-0,119 0,698	0,153 0,587	0,201 0,474	-0,007 0,98
		Velocidad	IC p	0,168 0,567	0,088 0,764	0,149 0,61	0,296 0,265	0,287 0,282	0,201 0,456
	TRAS FACTOR	ABC	IC p	0,136 0,642	0,135 0,646	0,001 0,998	0,239 0,373	0,226 0,4	0,191 0,478
		Agregación	IC p	0,31 0,302	0,378 0,203	0,246 0,418	0,327 0,233	0,314 0,254	0,335 0,223
		Velocidad	IC p	- 0,027 0,928	-0,053 0,856	-0,096 0,744	0,187 0,488	0,174 0,518	0,13 0,63

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva

4.2.9.8. Agregación con ristocetina. Agregación óptica versus impedancia

Se observó relación entre los parámetros de agregación por impedancia (muestra tras factor) en respuesta a la ristocetina y los parámetros de agregación óptica (muestra basal y tras factor) (tabla 26 y figura 75).

Tabla 26. Correlación entre la agregación plaquetaria en respuesta a ristocetina medida mediante impedancia o medida mediante el método óptico.

Correlación entre agregación por impedancia y agregación óptica con ristocetina				Agregación por impedancia					
				MUESTRA BASAL			TRAS FACTOR		
				ABC	Agregación	Velocidad	ABC	Agregación	Velocidad
Agregación óptica	MUESTRA BASAL	ABC	IC	0,538	0,502	0,393	0,605	0,616	0,544
			p	0,058	0,082	0,184	0,022	0,019	0,044
		Agregación	IC	-	-0,23	-0,408	-0,082	-0,165	-0,203
	TRAS FACTOR		p	0,239	0,45	0,167	0,781	0,572	0,487
		Velocidad	IC	0,112	0,145	0,114	0,458	0,321	0,287
			p	0,715	0,636	0,711	0,099	0,263	0,32
	MUESTRA BASAL	ABC	IC	0,504	0,504	0,505	0,45	0,623	0,554
			p	0,079	0,079	0,078	0,106	0,017	0,04
		Agregación	IC	0,131	0,158	0,016	0,263	0,312	0,21
	TRAS FACTOR		p	0,67	0,606	0,958	0,364	0,278	0,471
		Velocidad	IC	0,221	0,296	0,309	0,493	0,497	0,539
			p	0,468	0,327	0,304	0,073	0,071	0,047

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva

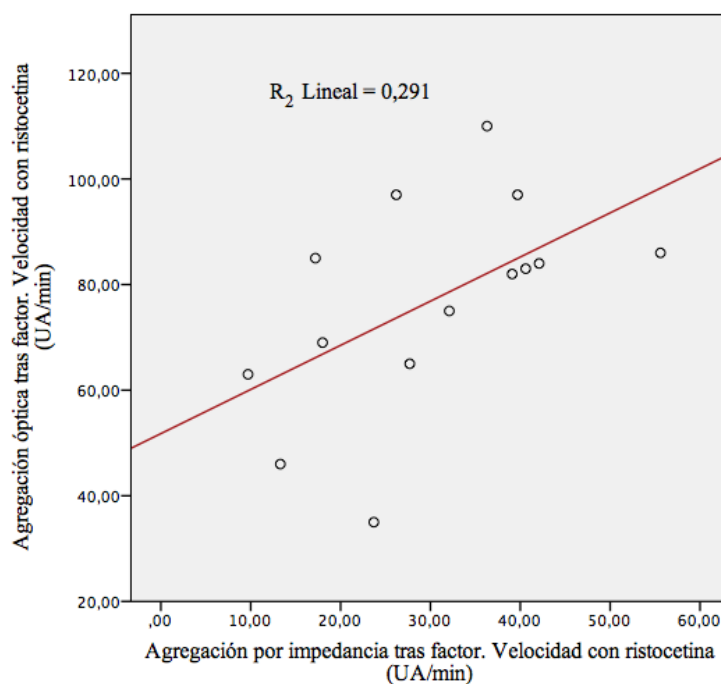


Figura 75. Se observó relación lineal entre la velocidad de agregación en respuesta a la ristocetina por ambos métodos de agregación (por impedancia y óptico) en la muestra tras infusión de factor.

4.2.9.9. Tiempo de obturación versus citometría de flujo

No se observó correlación entre el TO y la agregación por citometría de flujo en ninguna de las determinaciones (antes y después de factor) (tabla 27).

Tabla 27. Correlación entre la agregación plaquetaria medida mediante citometría de flujo (CMF) y la medida mediante el tiempo de obturación (TO) en el PFA-100.

Correlación entre agregación por CMF y el tiempo de obturación				TO (tiempo de obturación)			
				MUESTRA BASAL		TRAS FACTOR	
				COL/EPI	COL/ADP	COL/EPI	COL/ADP
CMF	MUESTRA BASAL	Agregación	IC P	0,074	0,447	-0,32	0,375
				0,787	0,083	0,244	0,169
	TRAS FACTOR	Agregación	IC p	0,1	0,245	-0,149	0,265
				0,714	0,36	0,595	0,341

4.2.9.10. Tiempo de obturación versus impedancia

Existía correlación lineal entre el TO COL/ADP (muestra tras factor) y el ABC con los agonistas ADP, TRAP, ASPI y/o RISTO (muestra basal y muestra tras factor) (tabla 28 y figura 76).

Tabla 28. Correlación entre la agregación plaquetaria medida mediante impedancia y la medida mediante el tiempo de obturación (TO) en el PFA-100.

Correlación entre agregación por impedancia y el tiempo de obturación				TO (Tiempo de obturación)			
				MUESTRA BASAL		TRAS FACTOR	
				COL/EPI	COL/ADP	COL/EPI	COL/ADP
Agregación por impedancia(ABC)	MUESTRA BASAL	ADP	IC	-0,038	0,313	0,483	0,560
			P	0,897	0,276	0,095	0,047
		COL	IC	0,061	0,32	0,133	0,51
			P	0,828	0,245	0,65	0,062
		EPI	IC	-0,229	0,2	-0,385	0,092
			P	0,554	0,605	0,306	0,814
		TRAP	IC	0,24	0,203	0,338	0,678
			P	0,389	0,467	0,238	0,008
		ASPI	IC	0,226	0,412	0,422	0,591
			P	0,437	0,144	0,133	0,026
		RISTO H	IC	0,074	0,559	0,077	0,676
			P	0,8	0,192	0,794	0,008
	MUESTRA TRAS FACTOR	ADP	IC	0,316	0,31	0,216	0,678
			P	0,234	0,242	0,439	0,005
		COL	IC	0,143	0,417	0,397	0,298
			P	0,597	0,108	0,143	0,28
		EPI	IC	-0,306	0,133	-0,002	-0,105
			P	0,287	0,65	0,996	0,721
		TRAP	IC	0,259	0,356	0,221	0,680
			P	0,333	0,175	0,428	0,005
		ASPI	IC	0,196	0,258	0,461	0,529
			P	0,466	0,335	0,084	0,042
		RISTO H	IC	-0,091	0,209	-0,451	0,433
			P	0,748	0,455	0,105	0,122

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva; ns: no significativo ($p > 0,05$)

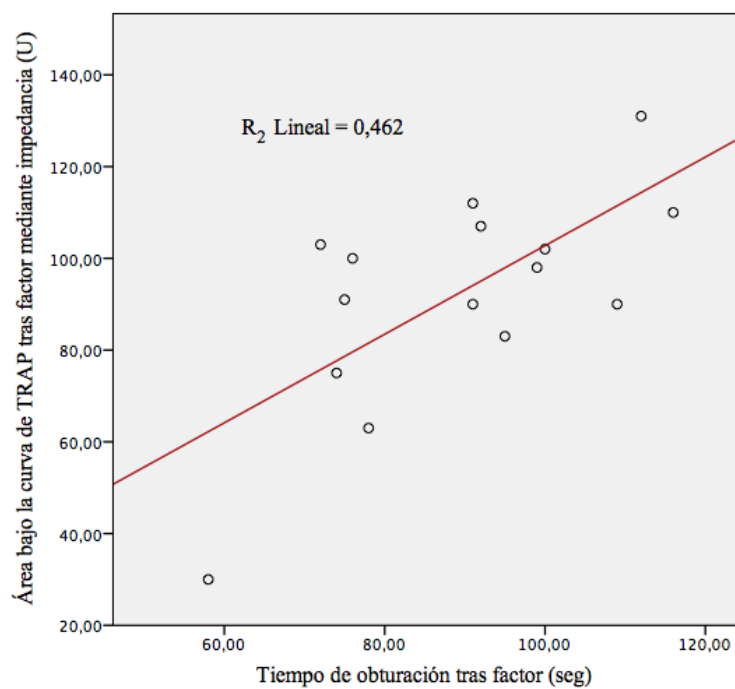


Figura 76. Relación lineal entre el TO COL/ADP y el ABC (agregación por impedancia) tras la adición de TRAP en muestra sanguínea tras factor.

4.2.9.11. Tiempo de obturación versus agregación óptica

Se observó correlación lineal entre el TO COL/ADP (tanto basal como tras factor) y la agregación óptica con los agonistas ADP y EPI (muestra basal). En el caso del TO COL/EPI se observó correlación con ASPI entre muestras basales (tabla 29).

Tabla 29. Correlación entre la agregación plaquetaria medida mediante el método óptico y la medida mediante el tiempo de obturación (TO) en PFA-100.

Correlación entre agregación óptica y el tiempo de obturación				TO (Tiempo de obturación)			
				MUESTRA BASAL		TRAS FACTOR	
				COL/EPI	COL/ADP	COL/EPI	COL/ADP
Agregación Óptica (ABC)	MUESTRA BASAL	ADP	IC	0,003	0,616	0,198	0,548
			P	0,992	0,011	0,478	0,034
		COL	IC	0,228	0,227	-0,192	0,462
			P	0,395	0,398	0,493	0,083
		EPI	IC	0,207	0,540	-0,238	0,618
			P	0,442	0,031	0,392	0,014
	MUESTRA TRAS FACTOR	TRAP	IC	0,215	0,404	-0,147	0,497
			P	0,441	0,136	0,617	0,071
		ASPI	IC	0,502	0,35	-0,022	0,137
			P	0,048	0,183	0,939	0,626
		RISTO	IC	0,384	0,32	-0,219	0,528
			P	0,158	0,244	0,452	0,053
		ADP	IC	-0,198	0,169	-0,127	0,046
			P	0,48	0,546	0,665	0,875
		COL	IC	0,318	0,318	-0,025	0,28
			P	0,248	0,249	0,931	0,332
		EPI	IC	-0,023	0,51	0,214	0,438
			P	0,934	0,052	0,463	0,117
		TRAP	IC	0,397	0,356	-0,036	0,211
			P	0,143	0,193	0,902	0,469
		ASPI	IC	0,433	0,346	0,247	0,194
			P	0,094	0,189	0,374	0,488
		RISTO	IC	0,379	0,299	0,048	0,269
			P	0,163	0,279	0,872	0,353

p: significación estadística (significativa si $p < 0,05$); IC: índice de correlación de Pearson; ABC: área bajo la curva; ns: no significativo ($p > 0,05$)

A modo de resumen de esta sección, podemos decir que con la metodología utilizada en nuestro estudio existe escasa correlación entre los diferentes analizadores. Se observó correlación parcial entre la citometría de flujo y la agregación óptica (utilizando TRAP como agonista) y entre agregación óptica e impedancia (con agonistas TRAP y ristocetina). Se observó buena correlación entre la agregación óptica y por impedancia cuando utilizábamos ADP. Curiosamente, los valores del tiempo de obturación (TO COL/ADP) en las muestras después de la administración de FVIII presentaban correlación con la mayor parte de los agonistas utilizados con el sistema multiplate.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Población de estudio

La cohorte de este estudio observacional prospectivo longitudinal, estaba representada por pacientes de la Unidad de Hemofilia de la Región de Murcia con diagnóstico de Hemofilia A severa que se encontraban en tratamiento profiláctico con FVIII recombinante.

Nuestro servicio es centro de referencia para el tratamiento de la población con Hemofilia A en nuestra región, por lo que la población incluida en el estudio se corresponde con la realidad de esta enfermedad en nuestro medio. Además, existe una estrecha colaboración con la Asociación Murciana de Hemofilia, con realización de frecuentes cursos de formación para pacientes y familiares, lo cual nos permite una buena comunicación con esta población.

5.2. Dificultades del proyecto

El hecho de que el estudio se tratase de una enfermedad rara como la Hemofilia A hizo inicialmente difícil el proyecto, ya que teníamos que tener pocas pérdidas para que el resultado fuese significativo. Afortunadamente, tuvimos pocas pérdidas fundamentalmente porque tanto los pacientes como los familiares de éstos fueron muy colaboradores. Las pérdidas fundamentalmente se debieron a comorbilidades de los pacientes en relación a esta enfermedad, por la cual no podían acudir al hospital y en menor proporción a la vida laboral de los pacientes.

La disponibilidad de los analizadores a utilizar también supuso una dificultad adicional puesto que 4 de los aparatos (CELL DYN, ACL TOP 700, PFA-100 y Multiplate) formaban parte de la rutina diaria asistencial y uno de ellos (FACS CANTO II) era usado por más grupos de investigación. Además, durante todo el tiempo que duró el proyecto hubo averías en 3 ocasiones con 3 aparatos distintos.

La citación de los pacientes de forma que el día del experimento coincidiese con el período de lavado de 72h sin FVIII y que a su vez hubiese disponibilidad del cronograma del equipo resultaba a veces especialmente complicado.

En el caso de los controles, no disponíamos de suficientes voluntarios sanos para el proyecto, por lo que no pudimos ser estrictos en que la edad fuese similar al grupo de estudio principal.

5.3. Variables clínicas

Nuestra cohorte de pacientes con Hemofilia A grave (mediana de edad de 24,5 años y rango de 9-39 años) en tratamiento profiláctico, presentaba características similares a las descritas en la bibliografía, pues aproximadamente el 80% de los hemofílicos graves presentaron clínica hemorrágica en el primer año de su vida (24), la historia de inhibidores

frente al tratamiento supuso aproximadamente el 30% (38,110,111). En torno al 30% de los pacientes fueron VHC positivo y el 20% VIH positivo, cifras similares al primer estudio epidemiológico transversal multicéntrico realizado en España en 2009 (7). Más de la mitad de nuestros pacientes presentaron inversión del intrón 22, que es la alteración genética más frecuente descrita en la HA hasta el momento (34).

Aproximadamente el 80% de estos pacientes tenían ≥ 1 articulación diana, este elevado porcentaje probablemente se deba a que se trata de un grupo con dos claras poblaciones de sujetos, un grupo de pacientes jóvenes (68,75%) que iniciaron profilaxis primaria sin discontinuación y otro grupo de pacientes (31,25%) con edad ≥ 33 años, que recibió tratamiento según las recomendaciones establecidas en ese momento, es decir, iniciaron profilaxis primaria en la infancia hasta los 18 años, posteriormente tratamiento a demanda (momento en el que muchos de ellos desarrollaron articulaciones diana) y finalmente profilaxis nuevamente, es decir, recibiendo profilaxis terciaria actualmente (25). Además, en el grupo de jóvenes, 2 de ellos tuvieron una mala adherencia al tratamiento durante la adolescencia.

El papel de la profilaxis en HA en sujetos jóvenes ha sido ampliamente demostrado en diferentes estudios, el más destacado fue el ensayo clínico multicéntrico randomizado cuyos datos fueron publicados por Manco-Johnson et al. en 2007, donde se realizaba el seguimiento a pacientes incluidos en el mismo con edad menor a 3 años (112). La misma autora publicaba en 2013 el primer estudio randomizado en adultos, el estudio SPINART, con una media de edad de 30,6 años y rango de edad 15-50 años, que habían estado ≥ 1 año sin tratamiento profiláctico durante los 5 años previos a la inclusión al estudio, demostrando la superioridad del tratamiento profiláctico sobre el estado articular de los pacientes adultos (113). Estos pacientes presentaban un estado articular parecido al de nuestra cohorte, puesto que el 70% de ellos tenían ≥ 1 articulación diana al inicio del estudio.

Los pacientes que habían presentado un inhibidor de alta respuesta presentaban inversión del intrón 22, relación descrita en la bibliografía, aunque nosotros no observamos significancia estadística en nuestro estudio, esto es posible ya que el desarrollo de inhibidor depende de otros factores, como los ambientales (38,39). Tampoco obtuvimos significación estadística en aquéllos que tenían más articulaciones diana y recibían un régimen de tratamiento profiláctico más intenso en el momento de este estudio, ni entre el número de articulaciones diana, la edad del primer sangrado, el tipo de primer sangrado y el tipo de mutación. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos relación significativa entre el tipo de mutación y la clase de régimen de profilaxis semanal (Chi-cuadrado de Pearson de 0,038), donde los pacientes que estaban en régimen de tratamiento profiláctico más intenso (cada 48 horas) presentaban inversión del intrón 22. No hemos encontrado en la bibliografía datos a este respecto, sin embargo, parece lógica la asociación que ante mutaciones que supongan formas de fenotipo hemorrágico grave (114) se precise de esquemas de profilaxis más intensivos.

5.4. Variables analíticas

5.4.1. Datos del hemograma

En nuestro estudio encontramos diferencias estadísticamente significativa en el volumen plaquetario medio (VPM) y los linfocitos antes y después del tratamiento. El VPM tras factor fue menor ($8,77 \pm 1,59$ fL) que el VPM basal ($9,02 \pm 1,52$ fL), así como, el recuento de linfocitos posteriores al tratamiento también fue menor ($2,05 \pm 0,36 \times 10^3/\mu\text{L}$) que el anterior a éste ($2,24 \pm 0,48 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Existen muchos artículos y meta-análisis publicados en la bibliografía que relacionan el mayor VPM con el síndrome metabólico (diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión) y con el mayor riesgo de eventos trombóticos (ictus, infartos agudos de miocardio, reestenosis de stents cardíacos,...), es decir, con una mayor activación plaquetaria (115).

El VPM está relacionado directamente con el microambiente medular, las células estromales de la médula ósea liberan trombopoyetina la cual es la encargada de activar a los megacariocitos. Este mecanismo está modulado por citoquinas y por el ambiente externo del individuo (un descenso en la cifra de plaquetas provocará un mayor VPM). Se ha observado un mayor VPM en el caso de trombocitopenias inmunes, síndrome metabólico (como ya hemos comentado), preeclampsia; un VPM menor se ha relacionado con situaciones de hiperesplenismo, trombocitosis reactivas, aplasias medulares por citotóxicos, infiltración medular por tumores sólidos (116) y con la enfermedad de Wiskott-Aldrich (cuyo VPM muy inferior a los rangos de normalidad establecidos, fue normalizado tras la realización de esplenectomía, independientemente de la mejora o no de la cifra plaquetaria, por lo que concluían que la cifra plaquetaria podría estar disminuida por otros motivos, pero el VPM estaba determinado por la presencia o no del bazo) (117).

Existen escasos estudios sobre este aspecto en el caso de la hemofilia. En el estudio de van Bladel et al. de 2011, no observaron diferencias significativas ($p=0,517$) entre los 13 pacientes con HA severa y 21 controles, resultado similar a nuestro estudio. Sin embargo, no se estudió la influencia del FVIII sobre el VPM en los pacientes, ya que de hecho, el objetivo principal de este estudio no era observar la influencia del FVIII (60). En el estudio de van Bladel et al. de 2014, tampoco se observaron diferencias (muestra basal tras 72 horas sin factor) entre los 3 diferentes fenotipos hemorrágicos de 33 pacientes con HA severa; sin embargo, tampoco se estudió la influencia del FVIII sobre el VPM (61). El segundo estudio de 2014 de este grupo, van Bladel et al., incluyeron a 8 pacientes, todos mayores de edad (media 40 años) con HA grave (y sin enfermedad cardiovascular) en tratamiento profiláctico que estaban ingresados para recibir una cirugía electiva. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el VPM en pacientes tras administración de FVIII a los 15 y a los 60 minutos (62). Este resultado es diferente al nuestro, sin embargo, nuestra cohorte de pacientes es el doble a la estudiada por ellos y tampoco se había realizado periodo de lavado de 72 horas en el caso de la muestra basal (aunque presentaba similar media basal de FVIII % que nuestra cohorte).

Una posible explicación de que el VPM esté disminuido tras la administración de FVIII en los pacientes con HA grave podría ser una estimulación negativa de la trombopoyesis medular o bien un aumento de la función depurativa del bazo; o dicho de otra forma, en situación basal estos pacientes presentan un VPM mayor para compensar el déficit de FVIII que presentan. Sin embargo, lo cierto es que desconocemos el motivo exacto de esta discrepancia de resultados, serían necesarios más estudios para dilucidar este aspecto.

En el estudio de Wartiovaara-Kautto et al. de 2011, no detectaron anormalidad en el recuento leucocitario (respecto a los rangos de referencia) en una cohorte de pacientes con HA (tanto grave, moderada como leve), al igual que en nuestro caso, sin embargo en este estudio no se observaba la influencia del FVIII sobre sus parámetros de análisis (67). No hemos encontrado ningún artículo en la bibliografía que haya descrito la disminución del recuento de linfocitos tras la administración de FVIII, desconocemos el motivo y la relevancia que pueda tener este hallazgo.

5.4.2. Coagulación especial

Lógicamente observamos diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de FVIII cuando comparamos la muestra basal ($3,23 \pm 4,18$ U/dL) de los pacientes con la muestra tras factor ($89,05 \pm 34,82$ U/dL), así como con sujetos controles ($102,5 \pm 24,94$ U/dL). No observamos diferencias entre los grupos respecto al VWF: Ag ni al VWF: Rco.

En el estudio de van Bladel et al. de 2011, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes con HA grave, presentando estos últimos mayores niveles de VWF: Ag (mediante técnicas de ELISA), atribuyendo este hallazgo a una activación de la hemostasia 1ª en los pacientes con HA grave (60). No se observaron diferencias en los niveles de VWF: Ag (mediante técnicas de ELISA) en el siguiente estudio de este mismo grupo (van Bladel et al. de 2014), donde estudiaban solo a pacientes con HA grave con diferente fenotipo hemorrágico (61). En nuestro estudio tampoco observamos diferencias en los niveles de VWF: Ag, teniendo en cuenta además que la determinación de este parámetro se realizó con diferente metodología (técnica de inmunturbidimetría amplificada con partículas de látex).

El tercer estudio de este grupo (van Bladel et al. de 2014), se realizó con 8 pacientes todos mayores de edad (con una media de 40 años) con HA grave (y sin enfermedad cardiovascular) en tratamiento profiláctico que estaban ingresados para recibir una cirugía electiva. El nivel de FvW y ADAMTS-13 (mediante técnicas de ELISA) disminuía tras 15 minutos de la administración de factor, no ocurría lo mismo a los 60 minutos. Se concluía que una sola infusión de FVIII en pacientes con HA modificaba la hemostasia 1ª (FvW, ADAMTS-13 y activación plaquetaria), posiblemente como consecuencia de la unión del FVIII con el FvW (como parte del mecanismo fisiológico habitual), influyendo en su aclaramiento así como en el de las plaquetas secundariamente (62).

5.4.3. Función plaquetaria mediante PFA-100®

En los datos obtenidos en nuestro estudio con PFA-100®, tanto de pacientes como del grupo control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. A pesar de que no se observaron diferencias, la tendencia del grupo de controles era el situarse cerca del extremo acortado del TO COL/ADP (se observó en 4 controles, si bien también se observó en 3 pacientes) y la tendencia de los pacientes era la de situarse hacia el extremo alargado del TO COL/ADP (de hecho 2 pacientes presentaron este tiempo alargado). El tiempo acortado COL/ADP se ha relacionado con mayor riesgo trombótico (57).

Lo más destacable de nuestros resultados es que podía observarse una tendencia al alargamiento de los tiempos de obturación (con ambos grupos de agonistas, tanto con COL/EPI como con COL/ADP) tras la administración de FVIII en los pacientes, aunque sin llegar a la significación estadística. Sin embargo, sí se observó correlación entre COL/ADP antes y después de la administración de factor, siendo el valor de la correlación de Pearson de 0,753 ($p=0,001$), por lo que a pesar de esta buena correlación, parece que esta variable es más dispersa de lo que cabría esperar. Este resultado podría indicar un mecanismo fisiológico de unión del FvW al FVIII o bien una menor activación plaquetaria tras la infusión de FVIII; aunque este postulado tendría que demostrarse estadísticamente, quizás estudiando una muestra de pacientes mayor a la nuestra. En la bibliografía no hemos encontrado datos al respecto.

Otro hallazgo de nuestros resultados, fue la correlación inversa entre el TO COL/ADP y el nivel de hemoglobina (correlación de Pearson -0,530, $p=0,035$) y el valor del hematocrito (correlación de Pearson -0,503, $p=0,047$), es decir, a mayor nivel de hemoglobina y hematocrito, el TO COL/ADP estará acortado; hallazgo ya descrito en la bibliografía (71).

Esta metodología sencilla se ha utilizado en numerosos estudios de la hemostasia ^{1ª} y en la enfermedad de von Willebrand, donde se ha observado alargamiento de ambos tiempos de obturación (68,71). También ha sido utilizado en estudios de enfermedad cardiovascular (57). Existen escasos estudios en hemofilia, (Wartiovara-Kautto et al. en 2011) en los que no detectaban anormalidad en los resultados (respecto a los rangos de referencia) en una cohorte de pacientes con HA (tanto grave, moderada como leve) (67); Favaloro et al. en 1999 tampoco encontraron diferencias en un paciente con HA y otro con Hemofilia C (118); Carcao et al. en 1998 tampoco encontraron anormalidad en los resultados en 11 pacientes con hemofilia (8 HA y 3 tipo B de diferente fenotipo hemorrágico) y sin administración de factor en los 6 meses previos al estudio (119); Fressinaud et al. 1998 tampoco encontraron cambios relevantes en una cohorte de 14 pacientes con hemofilia, 12 tipo A y 2 tipo B, de diferentes fenotipo hemorrágico (120); Grünwald et al., 2002, observaban un alargamiento significativo de ambos tiempos de obturación (COL/EPI ($p=0,026$) y COL/ADP ($p=0,049$)) en pacientes con hemofilia severa, tanto A como B, respecto a una cohorte de sujetos sanos (121). En ninguno de ellos estudiaron la influencia del factor VIII o IX sobre estos parámetros. Con respecto

al estudio de Grünewald et al. 2002, sus resultados distan de del resto de estudios y de nuestros resultados, sin embargo, hay que tener en cuenta que en el caso de COL/ADP, la significancia encontrada está muy cercana a la normalidad, y en el caso de COL/EPI, como hemos mencionado con anterioridad, sus resultados son lábiles y sensibles a múltiples factores (como la dieta rica en flavonoides, que lleva a un alargamiento de este TO (71)).

En el caso de pacientes con EvW se ha utilizado esta metodología para monitorizar la respuesta a la administración de desmopresina o a la combinación de factores FVIII/FvW en las formas graves (tipo 3), como en el estudio de Cattaneo et al. de 1999, donde objetivaban un acortamiento de estos tiempos de obturación (122), pues son sensibles/dependientes del FvW (71). Sin embargo, no hemos encontrado en la bibliografía estudios donde se observe la influencia de la infusión de FVIII (sin la adición de FvW) sobre esta medida de adhesión y agregación plaquetaria.

En definitiva, con esta metodología no hemos encontrado diferencias significativas entre nuestros pacientes y los controles, tampoco hemos observado diferencias en relación a la administración de FVIII, por lo que, la función plaquetaria sería similar en todos ellos con nuestros datos. Sin embargo, es posible que realizando este estudio con una muestra de pacientes mayor pudiesen observarse diferencias significativas en pacientes con HA severa tras la infusión de FVIII, lo cual podría suponer un mecanismo fisiológico de unión del FvW al FVIII o bien una menor funcionalidad plaquetaria tras éste.

5.4.4. Función plaquetaria mediante Multiplate®

En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados respecto a los agonistas ADP, COL, EPI, ASPI y RISTO. En el caso del agonista TRAP, se observaron diferencias entre el grupo control y los pacientes tras la infusión de factor. El porcentaje de agregación con TRAP de los pacientes tras factor fue de $147,62 \pm 38,09$ U y de $173,16 \pm 26,7$ U del grupo control ($p=0,040$). Tras una exhaustiva revisión bibliográfica, no obtuvimos datos de estudios de función plaquetaria utilizando este sistema en pacientes hemofílicos.

De los 5 pacientes en los que se observó una agregación disminuida al TRAP, 4 de ellos eran VHC+ (dos de estos cuatro eran además VIH+) y el quinto paciente presentaba una serología negativa. Si bien, un paciente VHC+ y VIH+ presentó una agregación de TRAP dentro de los valores normales.

En varios estudios se ha analizado la relación del VIH con la función plaquetaria (alteración en la expresión de los gránulos, la forma y la agregación plaquetaria). En la mayor parte de estos estudios se describe una función plaquetaria disminuida, como en el caso del estudio de Haugaard et al. de 2013, donde se observaba disminución en la agregación plaquetaria con sangre total mediante impedancia (y también con otros métodos como el tromboelastograma) con los agonistas ADP, TRAP, ASPI y COL. En el caso de TRAP la agregación era significativamente más baja en pacientes que no recibían

tratamiento antirretroviral (123). En la infección por virus C está descrita en la bibliografía una función plaquetaria disminuida, asociada a veces con una disminución en su número. Sin embargo, existen datos contradictorios al respecto, debido al número limitado de pacientes en los estudios, a la heterogeneidad clínica de los pacientes y al uso de diferentes metodologías para su estudio (124). Por todo ello, podríamos decir que con esta metodología el hecho de presentar una serología positiva a VIH y/o VHC puede llevar a una respuesta disminuida a TRAP y que la administración de FVIII (tras 15 minutos) incrementa esa baja respuesta a TRAP.

Los agonistas TRAP, ASPI y RISTO HIGH fueron los que presentaron una mayor respuesta de agregación en todos los grupos, comportándose como agonistas potentes a la agregación plaquetaria.

Los valores representados por los agonistas epinefrina y ristocetina a bajas dosis supusieron menor cantidad de sujetos en todos los grupos atendiendo a las normas metodológicas del sistema utilizado (la diferencia de la media para que el resultado obtenido sea fiable debe ser $<20\%$, CV, coeficiente de variación). Una posible explicación a este alto CV en el caso de la ristocetina, es que al utilizar dosis bajas de agonista, el sistema analizador le resulte difícil su determinación. La ristocetina a dosis bajas se utiliza para diagnosticar pacientes con EvW tipo 2B, ya que estos pacientes presentan una elevada respuesta a dosis bajas de ristocetina. Sin embargo, para el resto de individuos estas bajas concentraciones de ristocetina provocan una limitada respuesta de agregación plaquetaria, lo que explicaría la inestabilidad de estos resultados (125). En el caso de la epinefrina o adrenalina debido a que ha sido un agonista más tardío en incorporarse a esta metodología (74).

En nuestro estudio, observamos correlación inversa entre el hematocrito y el ABC en la agregación con TRAP (correlación de Pearson $-0,539$, $p=0,038$) en muestras tanto antes como después de factor. Los estudios realizados que correlacionan el hematocrito con la función plaquetaria mediante Multiplate® no han encontrado asociación (126,127), excepto en el estudio de Kuiper et al. en 2017, donde se observó correlación débil positiva cuando se utilizaba como agonista ASPI (128). Sin embargo, en el caso del sistema de impedancia VerifyNow® se ha descrito en varios estudios la correlación inversa entre ambos (126,127).

5.4.5. Función plaquetaria mediante Chronolog®

El agregómetro de transmisión de luz ó agregometría plaquetaria turbidimétrica sigue siendo el Gold Standard para el diagnóstico de desórdenes de función plaquetaria. Sin embargo, presenta muchas dificultades técnicas que hace que sea difícil su estandarización (73). La ISTH elaboró unas recomendaciones para limitar errores pre-analíticos, obtención de PRP y PPP y la dosis de agonista necesaria, el cual podía ser modificado según la casa comercial del producto, el sistema analizador utilizado y la respuesta obtenida (80). En nuestro estudio el agonista TRAP presentó menor agregación (en todos los grupos estudiados por igual) respecto a otros agonistas considerados menos

potentes (a pesar de haber utilizado las dosis recomendadas por la ISTH); posiblemente deberíamos haber utilizado mayor dosis de este reactivo.

Se observaron diferencias significativas en la pendiente o velocidad de la agregación con ristocetina en el grupo de pacientes. La pendiente de la ristocetina basal fue de $88,06 \pm 16,95$ y tras el tratamiento de $78,13 \pm 19,96$ ($p=0,027$). Sin embargo, la agregación y el área bajo la curva de la ristocetina no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En el estudio de Grünewald et al. de 2002, no encontraron diferencias entre hemofílicos graves (A y B) y controles respecto a los agonistas ADP y epinefrina, sin embargo, encontraron diferencias significativas cuando utilizaban ristocetina (dosis 1 mg/ml) y colágeno (dosis 1-2 μ g/ml) como agonistas, siendo menor tanto la pendiente como el % agregación en los pacientes con hemofilia severa respecto a los controles sanos (121). En nuestro estudio observamos resultados contrarios, puesto que los pacientes presentaron mayor agregación con el colágeno que los controles. La pendiente del colágeno en pacientes tras factor fue de $98,26 \pm 13,9$ y la de los controles de $83,6 \pm 20,15$ ($p=0,028$); el área bajo la curva del colágeno en pacientes tras factor fue de $442,56 \pm 128,66$ y la de los controles de $344,52 \pm 109,82$ ($p=0,033$). Sin embargo, la muestra de los pacientes fue tras la administración de factor. No hemos encontrado estudios que evalúen la influencia del FVIII sobre la agregación plaquetaria de pacientes hemofílicos con este sistema de agregación óptica.

5.4.6. Agregación y activación plaquetaria mediante citometría de flujo

No existe una definición homogénea del concepto de plaqueta activada, sin embargo, la expresión de P-selectina y CD63 se han relacionado con una variedad de patologías con aumentado riesgo tromboembólico (121). Además la P-selectina es considerada por muchos el marcador gold standard de activación plaquetaria (82), es por ello, que incluimos su determinación en nuestro estudio, en el cual no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (pacientes antes, pacientes después de FVIII y controles). A pesar de que no se observaron diferencias significativas, sí se observó gráficamente que la expresión de CD62p tras TRAP en la muestra basal de los pacientes era superior tanto a la muestra posterior al factor (con una p cerca de la significancia estadística, $p=0,052$) como a los controles. Lo mismo ocurría con los agregados plaqueta-leucocito, donde la muestra basal de los pacientes reflejaba gráficamente mayor expresión de los mismos que la muestra posterior y los controles, sin embargo, nuevamente sin significación estadística.

En el estudio de van Bladel et al. de 2011, se estudiaron 34 pacientes con HA, 13 de ellos grave (3 de los cuales presentaban inhibidor) y 21 con HA moderada-leve, que fueron caracterizados según su cantidad residual de FVIII y el consumo de FVIII anual (no se tuvo en cuenta la historia clínica hemorrágica); no se especificaba la hora de la última infusión de FVIII. También disponían de 21 controles sanos, y todos los grupos eran mayores de edad. Observaron mayor expresión de P-selectina basal en hemofílicos graves

(IMF 6.5) que en moderados-leves (IMF 4.2) y grupo control (IMF 3.8), lo cual relacionaban como una situación de actividad plaquetaria compensatoria al déficit de FVIII de estos pacientes. Además se obtuvo correlación inversa entre el FVIII anual consumido y el nivel de P-selectina en HA graves. Estudiaron, también mediante CMF, la respuesta a los agonistas ADP y colágeno, observando mayor de expresión de P-selectina tras la adición de ADP en el caso de los pacientes con HA grave respecto al grupo control (con diferencias significativas) (60). En nuestro estudio, los valores obtenidos de IMF se situaron en torno a 1.4, esta discrepancia de valores en ambos estudios podría explicarse porque en nuestro estudio utilizamos menor dosis y diferente casa comercial del reactivo de p-selectina. Estos resultados distan de los nuestros, pues no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se trata de grupos de estudio diferentes, pues en nuestro grupo 7 pacientes eran menores de edad, ninguno presentaba inhibidor y las muestras eran extraídas tras 72 horas de la última administración de FVIII. No existen publicaciones que estudien en particular el efecto del inhibidor de FVIII sobre la expresión de p-selectina, sin embargo, es posible que esta alteración en la inmunidad supusiese una mayor expresión de p-selectina. En cuanto a la respuesta al agonista, en nuestro estudio utilizamos TRAP, por lo que no podemos comparar estos resultados. Tampoco observamos diferencias significativas en la correlación entre la expresión de P-selectina y el consumo de FVIII (si bien en nuestro estudio se analizó el consumo de FVIII semanal, en lugar del anual). El estudio de van Bladel et al. de 2011 finalizó analizando el efecto del FVIII (100 U/dL) tras 15 y 60 minutos de su administración a 5 de los 13 pacientes con HA severa. A pesar de que los datos numéricos no aparecen reflejados en el artículo, concluyen que no encontraron diferencias significativas entre ellos (60). El hecho de que realizaran este estudio en 5 pacientes y nosotros en 16, de las diferencias clínicas existentes entre ambos grupos de pacientes, y hallamos obtenido el mismo resultado, avala más la conclusión de que el FVIII (15 minutos tras su administración) no influye en la expresión de p-selectina.

Este estudio fue continuado por el mismo grupo holandés, van Bladel et al. de 2014, donde estudiaron a 33 pacientes con HA grave sin inhibidor y los dividía en 3 grupos según el fenotipo hemorrágico (según edad de primer sangrado, score Petterson, nº hemartros/año): 13 leve, 12 moderada y 8 grave. Las muestras eran analizadas en el periodo basal de lavado de 72 horas (en caso de los pacientes en profilaxis o que habían recibido tratamiento a demanda recientemente) utilizando diferentes agonistas, entre ellos la trombina. A pesar de que los reactivos, las concentraciones utilizadas de los mismos (utilizaban dosis de trombina superiores a nuestro estudio), la identificación plaquetaria (mediante CD41/61, o lo que es lo mismo, Gp IIbIIIa) y las unidades de expresión de la IMF (IMF máxima, ABC, EC₅₀) eran diferentes a las utilizadas en nuestro estudio, no observaron, al igual que nosotros, diferencias significativas en la expresión de P-selectina con todos los agonistas utilizados. Tampoco se observó correlación entre ésta y el consumo anual de FVIII, por lo que, concluían que no existía modulación de la hemostasia 1ª en función del fenotipo hemorrágico de los pacientes con HA grave (61).

En 2014 este mismo grupo, van Bladel et al., realizó un segundo estudio en 8 pacientes mayores de edad con HA grave en tratamiento profiláctico y sin enfermedad cardiovascular, que iban a ser intervenidos de forma electiva. Se estudió la muestra basal (pero no del periodo de lavado) y la muestra tras 15 y 60 minutos de la infusión de 50 UI FVIII/Kg. A pesar de que no se realizó tiempo de lavado, los valores de FVIII fueron parecidos (0,7 (0,0-3,9)) a los de nuestro estudio. Se observó menor expresión basal de plaquetas p-selectina positivas tras 15 y 60 minutos de FVIII, sin embargo no se observaron diferencias tras la adición de TRAP. El nivel de FvW y ADAMTS-13 disminuyó tras 15 minutos de la administración de factor. Se concluía que una sola infusión de FVIII en pacientes con HA modifica la hemostasia 1ª (FvW, ADAMTS-13 y activación plaquetaria) tras su infusión, posiblemente como consecuencia de la unión del FVIII con el FvW (como parte del mecanismo fisiológico habitual), influyendo en su aclaramiento así como en el de las plaquetas secundariamente (62).

En 2002, Grünewald et al., no observó diferencias significativas en la expresión de p-selectina y CD63 plaquetarios (tanto basal como tras la adición de TRAP-6) entre 21 pacientes con hemofilia severa, tanto A (13 pacientes) como B (8 pacientes), con mediana de edad de 33 años, en los cuales solo 3 pacientes estaban en régimen profiláctico, y 21 controles con mediana de 30 años. En este estudio no se especificaba el momento tras la última dosis de factor VIII o IX. Al igual que en nuestro estudio se observaba un relevante aumento de la expresión de CD62p y CD63 tras la adición de TRAP-6 (de hecho utilizaban la misma dosis de TRAP que nosotros) en ambos casos, sin embargo, este aumento era similar en ambos grupos de estudio, no observando diferencias significativas (121).

El grupo de Wartiovaara et al. de 2011, no detectó diferencias en la expresión de p-selectina (basal y tras adición de colágeno) en una cohorte de 20 pacientes con HA (17 graves, 1 moderada y 2 leves), donde 7 pacientes se encontraban en profilaxis y no todos cumplían el objetivo inicial de analizar la muestra en el periodo de lavado de 72 horas (los niveles basales de FVIII estuvieron comprendidos entre 1-37%). A pesar de utilizar otro agonista, dosis diferente de p-selectina, presentar una cohorte de pacientes heterogénea y un nivel de FVIII basal superior al de nuestro estudio, tampoco encontraron diferencias significativas en la expresión de p-selectina (67).

En el modelo de ratón hemofílico, estudiado por Teyssandier et al. en 2012, no se observaron diferencias en la expresión de p-selectina tanto en muestra basal como tras adición de TRAP-4, respecto al modelo ratón sano (129).

Los agregados plaqueta-leucocito suponen otro marcador de activación plaquetaria, más sensible que la expresión de P-selectina según Michelson et al. en 2001, ya que pueden detectarse en sangre hasta 30 minutos después de la activación plaquetaria, en cambio, la p-selectina rápidamente desaparece de la superficie plaquetaria (109). Se han realizado numerosas publicaciones en relación a la enfermedad cardiovascular, como el estudio de Furman et al. de 1998, donde observaban mayor expresión de agregados plaqueta-leucocito en pacientes con enfermedad arterial coronaria estable respecto a un grupo

control (130), o el caso de Michelson et al de 2001, donde presentaban mayor expresión en el caso de pacientes con IAM (109). Los agregados plaqueta-FT suponen una medida indirecta de los agregados plaqueta-leucocito, puesto que son los leucocitos los que expresan el FT (131). Tras una revisión bibliográfica exhaustiva, no encontramos referencias que relacionaran estos agregados con la Hemofilia.

Con los datos obtenidos en este apartado de nuestro estudio, no observamos defectos en la secreción de los gránulos α (CD62/p-selectina) y δ (CD63), ni en la formación de agregados plaqueta-leucocito ni plaqueta-FT, por lo que a este respecto no parece existir una activación plaquetaria compensatoria en pacientes con HA severa en régimen profiláctico.

5.4.7. Correlación entre los analizadores utilizados para el análisis de función plaquetaria

Con la metodología utilizada en nuestro estudio existe escasa correlación entre los diferentes analizadores. La falta de correlación de resultados entre los diferentes sistemas analizadores es conocida y refleja que cada método estudia un aspecto de la función plaquetaria (73,81). Sin embargo, existe algún estudio, como el de Meen et al. de 2012, donde se observa correlación entre la agregación óptica y la impedancia utilizando ADP como agonista (132), como en nuestro estudio, donde sólo observamos una buena correlación entre la agregación óptica e impedancia cuando utilizábamos ADP como agonista.

Curiosamente, los valores del TO COL/ADP en las muestras después de la administración de FVIII presentaban correlación con la mayor parte de los agonistas utilizados con el sistema multiplate. No hemos encontrado datos a este respecto.

5.4.8. Estudio de micropartículas plasmáticas

La dificultad de la medición de las micropartículas es conocida y ha sido reflejada en muchas publicaciones, por lo que algunos grupos de trabajo y la ISTH han aportado recomendaciones al respecto, a pesar de ello, en la actualidad sigue siendo necesaria una estandarización mundial de la técnica para su correcta interpretación. Procesos que pueden influir en las misma varían desde la extracción de la muestra, el tipo de muestra que utilicemos (sangre total, PPP, PRP) su manipulación u agitación, el tipo de anticoagulante utilizado, la centrifugación, el tipo de aparato de medida utilizado, su calibración y limpieza del mismo, el tamaño de los beads utilizados, etc. Todo ello ha supuesto variaciones de 190 a 90.000 MPs/uL si analizamos la bibliografía más reciente con los primeros estudios (133) y de micropartículas de origen plaquetario (PMPs), de 100 a 4.000/uL. En el estudio de Robert et al. de 2009, se estandarizó el método de medida utilizando el citómetro tipo Cytomics FC500 Beckman-Coulter en diferentes laboratorios observando un valor medio de 656 PMPs/uL en hombres y 1.775 MPs/uL en mujeres, diferencias significativas entre ambos grupos que fueron explicadas por la influencia de los estrógenos (fase lútea del ciclo ovárico) en la formación de plaquetas (95).

A pesar de que la ISTH desarrolló unas recomendaciones para el análisis de las MPs (107), en la actualidad no existen guías estandarizadas a nivel mundial, por lo que, cada laboratorio utiliza su metodología y sus rangos de normalidad. Los datos publicados indican que existe gran variabilidad en la cantidad de MPs que debe tener un individuo, independientemente de que esté sano o enfermo (53).

Los datos obtenidos en nuestro estudio objetivaron diferencias significativas entre los pacientes y los controles, los pacientes antes del factor presentaron menor cantidad de micropartículas totales ($434,06 \pm 245,13/\mu\text{L}$) que los controles ($633,42 \pm 258,28/\mu\text{L}$) ($p=0,042$). Se observó también menor cantidad de MPs CD62+ en los pacientes, tanto en muestra basal ($323,8 \pm 46,57/\mu\text{L}$) como tras factor ($336,86 \pm 34,48/\mu\text{L}$), que los controles ($483,35 \pm 200,63/\mu\text{L}$) ($p=0,032$; $p=0,028$ respectivamente). Ésto supone que los pacientes con hemofilia A tienen menor cantidad de MPs, independientemente de la infusión de factor, que los controles. Resultado similar al del estudio de Mobarrez et al. en 2013, que se comentará más adelante.

También se ha descrito gran variabilidad en la cantidad de MPs respecto a la edad, aunque se ha publicado que individuos más jóvenes (<18 años), sanos o con hemofilia (grave, moderada o leve), presentaban mayor nivel de MPs y también en aquellos pacientes con HA que presentaban un episodio agudo de sangrado (102). En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cantidad de MPs en cuanto a la edad tanto antes (mayores de 18 años presentaron $488,22 \pm 281,81$ y menores de 18 años $352 \pm 167,28$, con una $p=0,312$) como después de la administración de factor (mayores de 18 años presentaron $540,625 \pm 150,46/\mu\text{L}$ y menores de 18 años $398,5 \pm 108,448/\mu\text{L}$, con un $p=0,074$), y tampoco en cuanto a las MPs de origen plaquetario (tanto antes como después de factor), ya fuesen CD41+ o CD62+. Sólo observamos diferencias en la muestra basal de los pacientes, donde aquellos pacientes mayores de 18 años presentaban mayor cantidad de MPs CD144+ ($3,33 \pm 1,87$) respecto a los menores ($0,33 \pm 0,516$), ($p=0,001$), hallazgo que no se observó tras la administración de factor. No podemos comparar los valores absolutos de los resultados de Proulle et al. de 2005 con los de nuestro estudio, puesto que su sistema de análisis y la cantidad de MPs expresada es diferente a la nuestra (la que utilizamos en nuestro estudio está más estandarizada) y además tampoco estudiaron las MPs de origen endotelial. Quizá el hecho de la gran heterogeneidad clínica pueda ser una explicación a la discrepancia de los resultados respecto a los nuestros (102).

En nuestro estudio no observamos diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de MPs totales y las de origen plaquetario entre los pacientes (antes y después del factor). El grupo de pacientes de nuestro estudio era un grupo homogéneo respecto a su enfermedad de base, es decir, todos presentan Hemofilia A severa. Este motivo podría ser la explicación de por qué no observamos diferencias en la cantidad de MPs totales y de origen plaquetario observadas entre los pacientes. En el abstract publicado en el congreso de ASH de Qin et al. de 2014, observaron mayor nivel de MPs plaquetarias en 10 pacientes con HA grave con expresión de fenotipo leve respecto a 21 pacientes con

fenotipo grave (los 31 pacientes tratados a demanda) y a 17 controles; además observaron menor cantidad de MPs a los 3 meses de inicio de tratamiento profiláctico en 11 pacientes (105). En el siguiente abstract de este mismo grupo, Zhou et al. en 2015, observaron mayor nivel de MPs plaquetarias en 12 pacientes con HA grave con fenotipo hemorrágico leve respecto a 197 con pacientes con fenotipo grave; no encontraron diferencias respecto a los controles (106). En estos dos trabajos no se estudiaron MPs de origen diferente al plaquetario. En el abstract de Artoni et al. del ASH de 2007, observaron mayor cantidad de MPs de origen plaquetario y MPs que expresaban FT en 50 pacientes con HA grave (muestra extraída en periodo de lavado 72h) respecto a 37 con HA leve y a 20 controles (134). En estos 3 trabajos no se especificaba la medida de las MPs ni el citómetro utilizado por el cual no podemos compararlo con nuestros resultados.

Nuestros pacientes presentaron menor cantidad de micropartículas CD144+ tras factor ($1 \pm 0,321$) que en la muestra basal ($2,13 \pm 0,54$) ($p=0,013$). La disminución de micropartículas endoteliales tras el tratamiento también se observó en el estudio de Mobarrez et al. en 2013. En este estudio se determinaba la variación de las MPs 30 minutos después de la infusión de FVIII (tras ≥ 20 horas de la última infusión de factor) en 18 pacientes con HA severa (edad media 29.5 años) que estaban en tratamiento a demanda y no presentaron episodios de sangrados internos graves. Además de la disminución (tras la infusión de factor) de MPs endoteliales (CD144+) también se observaba disminución de las MPs totales y de origen plaquetario (CD42+), que se interpretaban como inclusión de estas MPs en el trombo plaquetario. Se detectó menor cantidad de micropartículas en los pacientes respecto al grupo control (aunque este dato no aparecía reflejado en el artículo), al igual que en nuestro artículo. El citómetro utilizado en este estudio (Beckmann Coulter Gallios) era de similares características al nuestro (Beckmann Coulter Navios) y el procedimiento también (utilizaban PPP y 2 centrifugaciones 2000xg x20 minutos para su almacenado), aunque utilizaban un anticuerpo monoclonal diferente para la identificación de las MPs de origen plaquetario (CD42+) y no se determinó la P-selectina (103). Respecto a nuestro estudio, la población era diferente en cuanto a la gravedad de la hemofilia y por tanto, el tratamiento recibido; sin embargo, la edad era parecida (mediana 29,5 versus 24,5 años en nuestro estudio). A pesar de que la metodología fuese similar, el hecho de que en estos pacientes se recogiesen las muestras tras un episodio hemorrágico y el que se analizasen tras un año de almacenado podría ser la explicación de por qué el recuento de MPs/uL en este estudio fue superior al observado en nuestra población (ver tabla 30).

Tabla 30. Comparación del estudio de Mobarrez et al. y el nuestro.

Comparación estudio de Mobarrez y el nuestro	MPs totales ¹ (n°/μL)	MPs totales ² (n°/μL)	MPs plaquetarias ¹ (n°/μL)	MPs plaquetarias ² (n°/μL)	MPs endoteliales ¹ (n°/μL)	MPs endoteliales ² (n°/μL)
BASAL	2373±618	434,06±245,13	1316±331	277,66±44,98	107±13	2,13±0,54
FVIII	1015±221	479,71±148,46	602±134	325,13±35,83	78±12	1±0,32
p*	<0,01	0,402	<0,01	0,388	<0,05	0,013

(1) Mobarrez et al. (2) estudio actual. MPs plaquetarias: Mobarrez et al. CD42+ ; nuestro estudio CD41+; p: grado de significancia.

Cuando revisamos en la bibliografía la respuesta a diferentes tratamientos, tras la infusión de inmunoglobulinas que potencian la P-selectina aumentaron la cantidad de las MPs y mejoró la clínica hemorrágica en el caso del modelo murino hemofílico (97), tras la administración de desmopresina en la enfermedad de von Willebrand tipo 1 (101) y en pacientes con HA leve en el abstract del ASH en 2007 (134), tras la administración de FVIIra en pacientes con HA (en régimen profiláctico y otros a demanda) en el estudio de Proulle et al. de 2004 (104). Si bien, en nuestro estudio no observamos aumento del número de MPs tras la administración de FVIII en pacientes con HA en tratamiento profiláctico.

Hasta el momento no existe ningún estudio publicado en pacientes con HA grave en tratamiento profiláctico sin clínica hemorrágica en el momento del estudio que estudie las micropartículas plasmáticas.

5.4.9. Análisis de la movilización de calcio citosólico en plaquetas mediante citometría de flujo

El Ca^{2+} libre intraplaquetario se ha utilizado en el estudio funcional de plaquetas y en la monitorización de terapias con antagonistas plaquetarios (135).

Las concentraciones de Ca^{2+} en una plaqueta en reposo son aproximadamente $0,1 \mu\text{mol/L}$. Tras la estimulación plaquetaria con agonistas como ADP o trombina, se produce un aumento rápido de estas concentraciones llegando a niveles 10 veces superior a su concentración en situación de reposo, relacionándolo con procesos plaquetarios como el cambio de forma, la adhesión y la agregación (135). De hecho, constituye uno de los primeros pasos de su activación, pudiendo observarse una máxima respuesta alrededor de los 30 segundos, con la consiguiente alcalinización del citoplasma plaquetario y la despolarización de la membrana (136), como ocurre en nuestro estudio donde observamos en todos los grupos un rápido aumento del calcio intracelular y un descenso posterior de la señal a partir de los 30 segundos, aunque sin volver a la situación previa de la adición del agonista.

El tipo de agonista utilizado y la concentración del mismo determinarán el porcentaje, la intensidad de la respuesta plaquetaria (si la dosis del agonista es elevada la respuesta de las plaquetas es homogénea y elevada en todas ellas) y la vuelta a la situación basal de la

misma (78,135). En nuestro estudio, utilizamos los agonistas trombina (agonista plaquetario fisiológico más potente) y ADP (agonista plaquetario fisiológico más débil), que son los más utilizados para medir este parámetro (135,136), sin observar diferencias significativas entre los grupos estudiados.

En el caso de la trombina se han utilizado previamente dosis variables según el estudio, entre 0,01 y 1 U/ml, mientras que en el caso del ADP oscila entre 10^{-4} y 10^{-6} mol/L, utilizando la ratio de IMF como expresión de los resultados (135,136). En nuestro estudio se utilizó una concentración de 10 mM tanto de TRAP como de ADP, utilizando un solo fluorocromo, por lo que no podemos comparar los valores numéricos de nuestros resultados con estos estudios.

Como hemos comentado anteriormente, la modulación del Ca^{2+} libre intracelular en las plaquetas se realiza a través de las proteínas Orai1 (que regula la entrada de Ca^{2+} de fuera de la célula a través de la membrana plasmática) y STIM1 (que regula la liberación de gránulos de Ca^{2+} del sistema tubular intracelular provocado por el IP3 (inositol-1,4,5-trifosfato)(50).

La liberación transitoria de calcio probablemente corresponde a la originada del sistema tubular intracelular provocado por el IP3. La respuesta elevada de calcio con dosis bajas de agonistas se ha relacionado con la presencia de calcio en el exterior de la célula y en el caso de agonistas a dosis altas esta respuesta puede suceder sin la necesidad del calcio fuera de la célula (135).

A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados, en el caso del uso de ADP como agonista pudo observarse , que el nivel de liberación de calcio fue similar entre el grupo control y los pacientes hemofílicos tras la infusión de factor VIII, aunque sin embargo, fue inferior en la muestra basal de los pacientes. Cuando se utilizó TRAP como agonista, se encontró que los controles presentaron una mayor respuesta a la liberación de calcio que los pacientes (tanto antes como después de la administración de factor VIII). Quizá estos resultados indiquen que los pacientes presentan menor nivel de Ca^{2+} extracelular disponible para poder utilizar cuando el agonista actúa a concentraciones no muy elevadas, si bien, en nuestro estudio las diferencias reflejadas en la gráfica no presentaron significación estadística.

Tras una exhaustiva revisión bibliográfica, no hemos encontrado trabajos que analicen el calcio intraplaquetario en pacientes con hemofilia. Éste sería el primer estudio en el que se analiza el calcio intraplaquetario en pacientes con hemofilia. No hemos observado diferencias significativas en la respuesta de Ca^{2+} intraplaquetario a ADP y trombina en relación con la infusión de FVIII ni en comparación con una cohorte de sujetos sanos.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio no hemos encontrado alteración de la función plaquetaria en pacientes con Hemofilia A grave en tratamiento profiláctico. No se ha observado tampoco afectación de la misma en relación a la infusión de FVIII.
2. Los pacientes presentaron tras la administración de FVIII, menor cantidad de micropartículas de origen endotelial, por lo que este tratamiento no aumenta uno de los posibles marcadores de riesgo trombótico en estos pacientes.
3. La cantidad de micropartículas plasmáticas totales y las de origen plaquetario estuvieron disminuidas en pacientes con Hemofilia A respecto a sujetos sanos.
4. No consideramos indicado en la práctica clínica habitual la realización de estudios de agregación plaquetaria en pacientes con Hemofilia A grave en régimen profiláctico.

7. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

7. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- Melero-Amor A, García-Candel F, García D, Romecín P, Iyu D, Cabañas-Perianes V, Pérez R, O'Connor JE, Moraleda JM, Marín N, Blanquer M. Platelet Reactivity in Hemophilia A. Flow Cytometry Study to Detect the Hemorrhagic Phenotype. *Blood*. 2016;128(22):4965.
- Study of platelet function in Hemophilia A in the región of Murcia. Melero-Amor A, García-Candel F, Marín N, Romecín P, Bernal M, Iyu D, Millán JE, Moraleda JM. Hematology, University Clinical Hospital Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Spain. XXV Congress of The International Society on Thrombosis and Haemostasis. June 20, 2015. Abstract PO-497.
- Estudio de la función plaquetar en hemofilia A en la Región de Murcia. Melero-Amor A, García-Candel F, Marín N, Romecín P, Millán JE, García D, Iyu D, Bernal-Cascales M, Moraleda JM. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. I Jornadas Doctorales, Escuela Internacional de Doctorado, Universidad de Murcia. Murcia, 28 al 29 de Abril de 2015.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hopff F. First series: Haemophilia. United States Surg Gen Cat. 1828;
2. Ingram GIC. The history of haemophilia. *J clin Path.* 1976;29:469–79.
3. Hoyer LW. Hemophilia A. *N Engl J Med.* 1994;330(1):38–47.
4. Rosendaal FR, Smit C, Briët E. Hemophilia treatment in historical perspective: a review of medical and social developments. *Ann Hematol.* 1991;62(1):5–15.
5. Kessler CM, Mariani G. Clinical manifestations and therapy of the hemophilias. In: Collman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 887–904.
6. Tuddenham EGD, Cooper DN. Oxford monographs in medical genetics n°25. The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders. Oxford: Oxford medical publication; 1994.
7. Aznar JA, Lucía F, Abad-Franch L, Jiménez-Yuste V, Pérez R, Batlle J, et al. Haemophilia in Spain. *Haemophilia.* 2009;15(3):665–75.
8. Nossel HL, Archer RK, Macfarlane RG. Equine haemophilia: report of a case and its response to multiple infusions of heterospecific AHG. *Br J Haematol.* 1962;8:335–42.
9. Field RA, Rickard CG, Hutt FB. Hemophilia in a family of dogs. *Cornell Vet.* 1946;36(4):285–300.
10. Strauss HS. The perpetuation of Hemophilia by mutation. *Pediatrics.* 1967;39(2):186–93.
11. Vogel F. A probable sex difference in some mutation rates. *Am J Hum Genet.* 1977;29(3):312–9.
12. Rosner F. Hemophilia in the Talmud and Rabbinic writings. *Ann Intern Med.* 1969;70(4):833–7.
13. Bulloch W, Fildes P. Haemophilia. Parts V and VI. Section XIVa. In: Pearson KF, editor. *Treasury of human inheritance.* London: Dulau & Co; 1911. p. 169–349.
14. Mannucci PM, Tuddenhan EG. The hemophilias: from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med.* 2001;344(23):1773–9.
15. Rubio A, Lucía JF. Hemofilia: historia y realeza. 1st ed. Asociación de Hemofilia de Aragón, editor. Zaragoza: INO Reproducciones S.A.; 1999. 65 p.
16. Massie RK. Nicholas and Alexandra. 1st ed. New York: Atheneum; 1967. 584 p.
17. Lannoy N, Hermans C. The “royal disease”--haemophilia A or B? A haematological mystery is finally solved. *Haemophilia.* 2010;16(6):843–7.

18. Quick AJ. A classification of hemorrhagic diseases due to defects in the coagulation mechanism of the blood. *Amer J med Sci*. 1940;199:118.
19. Patek AJ, Stetson RP. Hemophilia. I. The abnormal coagulation of the blood and its relation to the blood platelets. *J Clin Invest*. 1936;15(5):531–42.
20. Walsh PN, Rainsford SG, Biggs R. Platelet coagulant activities and clinical severity in haemophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1973;29(3):722–9.
21. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in hemophilia: recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(3):560.
22. Jones P. Pasado, presente y futuro. In: Jones P, editor. *Hemofilia*. 2ª ed. Asociación Española de Hemofilia: Instituto de hemoderivados; 1979. p. 249–61.
23. Rozman C, Monserrat E. Hematología. In: Farreras-Rozman, editor. *Medicina Interna*. 11ª ed. Barcelona: Doyma; 1989. p. 1458–625.
24. Vicente V, Rivera J, Moraleda JM. Hemofilia y otras coagulopatías congénitas. In: *Medicine*. 6th ed. Madrid: Idepsa; 1992. p. 695–704.
25. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013;19(1):e1–47.
26. Acharya SS. Exploration of the pathogenesis of haemophilic joint arthropathy: understanding implications for optimal clinical management. *Br J Haematol*. 2012;156(1):13–23.
27. Raffini L, Manno C. Modern management of haemophilic arthropathy. *Br J Haematol*. 2007;136(6):777–87.
28. Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958–65.
29. Macfarlane RG, Barnett B. The haemostatic possibilities of snake venom. *Lancet*. 1934;2(5801):985–7.
30. Rabkin CS, Hilgartner MW, Herdberg KW, Aledort LM, Hatzakis A, Eichinger S, et al. Incidence of lymphomas and other cancers in HIV-infected and HIV-uninfected patients with hemophilia. *JAMA*. 1992;267(8):1090–4.
31. Colombo M, Mannucci PM, Brettler DB, Girolami A, Lian EC, Rodeghiero F, et al. Hepatocellular carcinoma in hemophilia. *Am J Hematol*. 1991;37(4):243–6.
32. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. 1990;262(4):56–61, 64–5.
33. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984;312(5992):326–30.

34. Lakich D, Kazazian HHJ, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993;5(3):236–41.
35. Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS. Recombinant Factor VIII for the treatment of previously untreated patients with Hemophilia A. Safety, Efficacy and Development of Inhibitors. *N Engl J Med.* 1993;328(7):453–9.
36. Schwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM, Arkin S, Bloom AL, Brackmann HH, et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. Recombinant factor VIII Study Group. *N Engl J Med.* 1990;323(26):1800–5.
37. Berntorp E, Björkman S. The pharmacokinetics of clotting factor therapy. *Haemophilia.* 2003;9:353–9.
38. Oldenburg J, Schröder J, Brackmann HH, Müller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Semin Hematol.* 2004;41(1 Suppl 1):82–8.
39. Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost.* 1995;74(6):1402–6.
40. Lusher JM, Shapiro SS, Palascak JE, Rao AV, Levine PH, Blatt PM, et al. Efficacy of prothrombin complex concentrates in hemophiliacs with antibodies to factor VIII: a multicenter therapeutic trial. *N Engl J Med.* 1980;303(8):421–5.
41. Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, Spero JA, Ragni M V, Scott JP, et al. Liver transplantation in hemophilia A. *Blood.* 1987;69(6):1721–4.
42. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.* 2000;24(3):257–61.
43. Roth DA, Tawa NEJR, O'Brien JM, Treco DA, Selden RF, Group FVTTS. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med.* 2001;344(23):1735–42.
44. Sokal EM, Lombard C, Mazza G. Mesenchymal stem cell treatment for hemophilia: a review of current knowledge. *J Thromb Haemost.* 2015;13(Suppl 1):S161-6.
45. Rainsford SG, Hall A. A three-year study of adolescent boys suffering from haemophilia and allied disorders. *Br J Haematol.* 1973;24(5):539–51.
46. van Dijk K, van der Bom JG, Fischer K, de Groot PG, van den Berg HM. Phenotype of severe hemophilia A and plasma levels of risk factors for thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2007;5(5):1062–4.
47. van Dijk K, van der Bom JG, Lenting PJ, de Groot PG, Mauser-Bunschoten EP, Roosendall G, et al. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A. *Haematologica.* 2005;90(4):494–8.

48. Arbini AA, Mannucci PM, Bauer KA. Low prevalence of the factor V Leiden mutation among “severe” hemophiliacs with a “milder” bleeding diathesis. *Thromb Haemost.* 1995;74(5):1255–8.
49. Lee DH, Walker IR, Teitel J, Poon MC, Ritchie B, Akabutu J, et al. Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A. *Thromb Haemost.* 2000;83(3):387–91.
50. Brass L. Understanding and evaluating platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010(1):387–96.
51. Bianchi E, Norfo R, Pennucci V, Zini R, Manfredini R. Genomic landscape of megakaryopoiesis and platelet function defects. *Blood.* 2016;127(10):1249–59.
52. Harrison P, Keeling D. Platelet Assays and platelet dysfunction. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, editors. *Laboratory Hematology Practice.* 1st ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2012. p. 480–91.
53. Yee DL. Platelets as modifiers of clinical phenotype in hemophilia. *ScientificWorldJournal.* 2006;14(6):661–8.
54. Jensen MS, Larsen OH, Christiansen K, Fenger-Eriksen C, Ingerslev J, Sorensen B. Platelet activation and aggregation: the importance of thrombin activity--a laboratory model. *Haemophilia.* 2013;19(3):403–8.
55. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost.* 1998;79:885–96.
56. Trip MD, Cats VM, van Capelle FJ, Vreeken J. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1990;322(22):1549–54.
57. Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, et al. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;110(11):1392–7.
58. Kunicki TJ, Federici AB, Salomon DR, Koziol JA, Head SR, Mondala TS, et al. An association of candidate gene haplotypes and bleeding severity in von Willebrand disease (VWD) type 1 pedigrees. *Blood.* 2004;104(8):2359–67.
59. Ghosh K, Kulkarni B, Nair S, Shetty S, Mohanty D. Human platelet alloantigen polymorphism in Glanzmann’s thrombasthenia and its impact on the severity of the disease. *Br J Haematol.* 2002;119(2):348–53.
60. van Bladel ER, Roest M, de Groot PG, Schutgens REG. Up-regulation of platelet activation in hemophilia A. *Haematologica.* 2011;96(6):888–95.
61. van Bladel ER, Schutgens REG, Fischer K, de Groot PG, Roest M. Platelet degranulation and glycoprotein IIb/IIIa opening are not related to bleeding phenotype in severe haemophilia A patients. *Thromb Haemost.* 2014;111(6):1022–30.
62. van Bladel ER, Tuinenburg A, Roest M, de Groot PG, Schutgens REG. Factor VIII

- concentrate infusion in patients with haemophilia results in decreased von Willebrand factor and ADAMTS-13 activity. *Haemophilia*. 2014;20(1):92–8.
63. Skipwith CG, Cao W, Zheng XL. Factor VIII and platelets synergistically accelerate cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 under fluid shear stress. *J Biol Chem*. 2010;285(37):28596–603.
 64. Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*. 2003;90(5):781–6.
 65. Beltrán-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. 2005;11(4):326–34.
 66. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost*. 2005;93(3):475–80.
 67. Wartiovaara-Kautto U, Joutsu-Korhonen L, Ilveskero S, Armstrong E, Lassila R. Platelets significantly modify procoagulant activities in haemophilia A. *Haemophilia*. 2011;17(5):743–51.
 68. Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, Cattaneo M. Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. *J Thromb Haemost*. 2007;5(12):2393–8.
 69. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Batlle J, Baudo F, Cappelletti A, et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost*. 2005;3(12):2619–26.
 70. Srámek A, Eikenboom JC, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Usefulness of patient interview in bleeding disorders. *Arch Intern Med*. 1995;155(13):1409–15.
 71. Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):312–9.
 72. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods*. 1980;3(2):135–58.
 73. Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Variables influencing Multiplate (TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets*. 2007;18(3):199–206.
 74. Lee KR, Verheyden VJ, Mumford AD. Evaluation of multiple electrode aggregometry in whole blood using Multiplate mini test cells. *Thromb Res*. 2012;129(4):59–64.
 75. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 1963;168(1):178–95.
 76. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927–9.

77. Vallés J, Santos MT, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1357–65.
78. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Piñón M, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood*. 2002;99(11):3978–84.
79. Koda M, Banno Y, Naganawa T. Effect of neutrophil adhesion on the size of aggregates formed by agonist-activated platelets. *Platelets*. 2005;16(8):482–91.
80. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1183–9.
81. Salat A, Kroess S, Felferning-Boehm D, Felferning M, Fleck T, Schmidt D, et al. Comparison of in vitro closure time (PFA-100) with whole blood electrical aggregometry and platelet surface antigen expression in healthy volunteers. *Thromb Res*. 2002;105(3):205–8.
82. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*. 1996;87(12):4925–36.
83. Guthrie DL, Lam KT, Priest CJ. The Ultra-Flo 100 platelet counter: a new approach to platelet counting. *Clin Lab Haematol*. 1980;2(3):231–42.
84. Fox SC, Sasae R, Janson S, May JA, Heptinstall S. Quantitation of platelet aggregation and microaggregate formation in whole blood by flow cytometry. *Platelets*. 2004;15(2):85–93.
85. Kirchmaier CM, Pillitteri D. Diagnosis and management of inherited platelet disorders. *Transfus Med Hemotherapy*. 2010;37(5):237–46.
86. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269–88.
87. Boulanger CM, Dignant-George F. Microparticles: an introduction. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2–3.
88. Dignant-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2011;31:27–33.
89. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2011;31:15–26.
90. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? *Arter Thromb Vasc Biol*. 2011;31:4–9.
91. Shai E, Varon D. Development, cell differentiation, angiogenesis--microparticles and their

- roles in angiogenesis. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2011;31:10–4.
92. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005;106(5):1604–11.
 93. Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med.* 1992;119(4):334–45.
 94. Costache A, Avram SI, Cernucan A, Barbu D, Angelescu S, Popescu DM, et al. What about microparticles? Perspectives and practical aspects. *Rev Rom Medicina Lab.* 2013;21(1/4):9–15.
 95. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):190–7.
 96. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1590–6.
 97. Hrachovinová I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, et al. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med.* 2003;9(8):1020–5.
 98. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36(2):104–7.
 99. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001;85(4):639–46.
 100. Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem.* 1991;266(26):17261–8.
 101. Trummer A, Haarmeijer B, Werwitzke S, Wermes C, Ganser A, Budde U, et al. Increased amounts of von Willebrand factor are bound to microparticles after infusion of desmopressin. *Haemophilia.* 2013;19(2):236–41.
 102. Proulle V, Hugel B, Guillet B, Grunebaum L, Lambert T, Freyssinet JM, et al. Circulating microparticles are elevated in haemophiliacs and non-haemophilic individuals aged <18 years. *Br J Haematol.* 2005;131(4):487–9.
 103. Mobarrez F, Mikovic D, Antovic A, Antovic JP. Is a decrease of microparticles related to improvement of hemostasis after FVIII injection in hemophilia A patients treated on demand? *J Thromb Haemost.* 2013;11:697–703.
 104. Proulle V, Hugel B, Guillet B, Trichet C, Rafowicz A, Lambert T, et al. Injection of recombinant activated factor VII can induce transient increase in circulating procoagulant microparticles. *Thromb Haemost.* 2004;91:873–8.

105. Qin F, Huang S, Li Z, Ye J, Sun J. The Platelet-Derived Microparticles Related to the Clinical Phenotype Heterogeneity of Hemophilia a. *Blood*. 2014;124(21):2828.
106. Zhou X, Qin F, Li H, Li Z, Liu Y, Yi Z, et al. Platelet-Derived Microparticles May Influence Phenotypic Heterogeneity in Patients with Severe Hemophilia. *Blood*. 2015;126(23):4673.
107. Mullier F, Bailly N, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Pre-analytical issues in the measurement of circulating microparticles: current recommendations and pending questions. *J Thromb Haemost*. 2013;11(4):693–6.
108. Fox SC, May JA, Shah A, Neubert U, Heptinstall S. Measurement of platelet P-selectin for remote testing of platelet function during treatment with clopidogrel and/or aspirin. *Platelets*. 2009;20(4):250–9.
109. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: Studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;104(13):1533–7.
110. Astermark J, Altisent C, Batorova A, Diniz MJ, Gringeri A, Holme PA, et al. Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report. *Haemophilia*. 2010;16(5):747–66.
111. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, Claeysens-Donadel S, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med*. 2013;368(3):231–9.
112. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe Hemophilia. *N Engl J Med*. 2007;357(6):535–44.
113. Manco-Johnson MJ, Kempton CL, Reding MT, Lissitchkov T, Goranov S, Gercheva L, et al. Randomized, controlled, parallel-group trial of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII in adults with severe hemophilia A (SPINART). *J Thromb Haemost*. 2013;11(6):1119–27.
114. Margaglione M, Castaman G, Morfini M, Rocino A, Santagostino E, Tagariello G, et al. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica*. 2008;93(5):722–8.
115. Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2010;8(1):148–56.
116. Aksoy S, Kilickap S, Hayran M, Harputluoglu H, Koca E, Dede DS, et al. Platelet size has diagnostic predictive value for bone marrow metastasis in patients with solid tumors. *Int J Lab Hematol*. 2008;30(3):214–9.
117. Corash L, Shafer B, Blaese RM. Platelet-associated immunoglobulin, platelet size, and the effect of splenectomy in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*. 1985;65(6):1439–43.

118. Favaloro EJ, Facey D, Henniker A. Use of a novel platelet function analyzer (PFA-100) with high sensitivity to disturbances in von Willebrand factor to screen for von Willebrand's disease and other disorders. *Am J Hematol*. 1999;62(3):165–74.
119. Carcao MD, Blanchette VS, Dean JA, He L, Kern MA, Stain AM, et al. The Platelet Function Analyzer (PFA-100): a novel in-vitro system for evaluation of primary haemostasis in children. *Br J Haematol*. 1998;101(1):70–3.
120. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, et al. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood*. 1998;91(4):1325–31.
121. Grünewald M, Siegemund A, Grünewald A, Konegen A, Koksche M, Griesshammer M. Absence of compensatory platelet activation in patients with severe haemophilia, but evidence for a platelet collagen-activation defect. *Platelets*. 2002;13(8):451–8.
122. Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Stabile F, et al. Evaluation of the PFA-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 1999;82(1):35–9.
123. Haugeard AK, Lund TT, Birch C, Rønsholt F, Trøseid M, Ullum H, et al. Discrepant coagulation profile in HIV infection: elevated D-dimer but impaired platelet aggregation and clot initiation. *AIDS*. 2013;27(17):2749–58.
124. Writters P, Freson K, Verslype C, Peerlinck K, Hoylaerts M, Nevens F, et al. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(11):1017–29.
125. Rubak P, Villadsen K, Hvas AM. Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thromb Res*. 2012;130(3):420–3.
126. Kim YG, Suh JW, Park JJ, Oh IY, Yoon CH, Cho YS, et al. Different influences of hematocrit on the results of two Point-Of-Care platelet function tests, the VerifyNow assay and multiple electrode platelet aggregometry. *PLoS One*. 2014;9(11):e114053.
127. Ferreira JL, Sibbing D, Angiolillo DJ. Platelet function testing and risk of bleeding complications. *Thromb Haemost*. 2010;103(6):1128–35.
128. Kuiper GJ, Houben R, Wetzels RJ, Verhezen PW, van Oerle R, Ten Cate H, et al. The use of regression analysis in determining reference intervals for low hematocrit and thrombocyte count in multiple electrode aggregometry and platelet function analyzer 100 testing of platelet function. *Platelets*. 2017;1–8.doi: 10.1080/09537104.2016.1257782.
129. Teyssandier M, Delignat S, Rayes J, Bryckaert M, Jandrot-Perrus M, Kaveri S V, et al. Activation state of platelets in experimental severe hemophilia A. *Haematologica*. 2012;97(7):1115–6.
130. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(2):352–8.
131. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, et al.

- Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*. 2000;96(1):170–5.
132. Meen O, Brosstad F, Liestøl K, Kunszt G, Bendz B, Wettergreen M, et al. Sequential ADP-stimulated light transmission and multiple electrode aggregometry in patients taking aspirin and clopidogrel after non ST-elevation myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;72(4):318–25.
 133. Chandler WL. Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry. *Cytom B Clin Cytom*. 2016;90(4):326–36.
 134. Artoni A, Santagostino E, Mancuso ME, Lecchi A, Mannuci PM. Microparticle levels are high in patients with Hemophilia A and can be further increased by DDAVP administration. *Blood*. 2007;110(11):3139.
 135. Jennings LK, Dockter ME, Wall CD, Fox CF, Kennedy DM. Calcium mobilization in human platelets using indo-1 and flow cytometry. *Blood*. 1989;74(8):2674–80.
 136. Davies TA, Drotts D, Weil GJ, Simons ER. Flow cytometric measurements of cytoplasmic calcium changes in human platelets. *Cytometry*. 1988;9(2):138–42.

9. ANEXOS

9.1.ANEXO 1. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica

Considera que el ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio de 2015, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Por todo lo anterior, **este CEIC emite un DICTAMEN FAVORABLE.**

9.2.ANEXO 2. Hoja de recogida de datos clínicos

DATOS DEMOGRÁFICOS			
Sexo	Edad (fecha nacimiento)	Peso (Kg)	Tensión arterial (mmHg)
H ☐	_ _ - _ _ - _ _ _ _	_ _ _ _	Sistólica _ _ _ Diastólica _ _ _
M ☐			
DIAGNÓSTICO HEMOFILIA A SEVERA			
Edad al diagnóstico	% FVIII	Tipo mutación	Heredada o de novo
			H ☐ Novo ☐
CLÍNICA HEMORRÁGICA			
Edad 1º sangrado y severidad	Nº hematomas en su vida	¿Articulación diana?	Nº hematomas < 3 meses
Edad		SI ☐	
Severidad		NO ☐	
CLÍNICA INFECCIOSA			
¿VIH / TRATAMIENTO?	¿VHB / TRATAMIENTO?	¿VHC/TRATAMIENTO?	¿Algún tipo infección < 3 meses?
SI / SI ☐ / ☐	SI / SI ☐ / ☐	SI / SI ☐ / ☐	SI ☐
NO / NO ☐ / ☐	NO / NO ☐ / ☐	NO / NO ☐ / ☐	NO ☐
SI / NO ☐ / ☐	SI / NO ☐ / ☐	SI / NO ☐ / ☐	
CLÍNICA TROMBÓTICA			
¿Episodio trombótico alguna vez?		¿Episodio trombótico <3 meses?	
SI ☐		SI ☐	
NO ☐		NO ☐	
ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES RELEVANTES. CUÁLES			
SI ☐			
NO ☐			
TRATAMIENTO			
¿Tratamiento crónico habitual (exceptuando el FVIII)? ¿Cuál?		¿Ha tomado AINEs < 15 días?	
SI ☐		SI ☐	
NO ☐		NO ☐	
PROFILAXIS FVIII			
¿Fecha inicio?	Dosis y frecuencia	¿Ha presentado inhibidor alguna vez? ¿Alta o baja respuesta?	¿Cuándo apareció y desapareció el inhibidor?
_ _ - _ _ - _ _ _ _	2/semana ☐	SI ☐ NO ☐	_ _ - _ _ - _ _ _ _
	3/semana ☐	Alta R ☐ Baja R ☐	_ _ - _ _ - _ _ _ _
	c/48 H ☐		

9.3.ANEXO 3. Hoja de información y consentimiento informado

HOJA DE INFORMACIÓN PARA PACIENTES

INVITACIÓN A PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Su médico ha confirmado que padece una enfermedad llamada Hemofilia A que le está siendo controlada regularmente. Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado: *“Estudio de la función plaquetaria y micropartículas plasmáticas en hemofilia A”* que está siendo realizado por el **Dr. Faustino García Candel** del **Servicio de Hematología y Hemoterapia** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

Las regulaciones locales requieren el consentimiento informado antes de que usted participe en este proyecto de investigación para que pueda comprender la naturaleza, los beneficios y los riesgos de la participación. Entonces usted puede decidir si participa o no de una manera voluntaria e informada. La firma del formulario de consentimiento indicará que usted ha sido informado y que otorga su consentimiento.

Este formulario de consentimiento puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, pídale al médico que participa en el proyecto de investigación o a su personal que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara. Su decisión de participar en este proyecto de investigación es voluntaria. Esto significa que usted puede decidir libremente si participa o no en el mismo.

Usted puede abandonar este proyecto de investigación en cualquier momento y sin tener que informar del motivo. Usted puede llevarse a casa una copia sin firmar de este formulario de consentimiento para pensar sobre el mismo o comentarlo con familiares o amigos antes de tomar su decisión.

ANTECEDENTES

La hemofilia es considerada una enfermedad rara. La incidencia anual es de 1 entre 5.000 nacimientos en varones y la prevalencia en la población se estima en 1 entre 12.000.

Se trata de una enfermedad genética recesiva ligada al cromosoma X. La hemofilia afecta a los varones, pero las mujeres portadoras de la mutación también pueden presentar una forma minoritaria de la enfermedad. Esta alteración genética provoca un defecto en la hemostasia, debido al déficit de factor VIII en el caso de la hemofilia A o de factor IX si hablamos de la hemofilia B.

Actualmente, según la actividad del FVIII, se clasifica la hemofilia A en 3 tipos: severa (actividad del FVIII <1%), moderada (1-5%) y leve (6-40%). El aparato locomotor, en particular, las articulaciones son el territorio más afecto en esta enfermedad. Cuando la clínica

es grave (hemorragias importantes), los pacientes reciben régimen de profilaxis; en este caso, podría generarse un inhibidor que complicaría la respuesta a este régimen.

Parece ser que además de la actividad de los factores VIII y IX, en la hemostasia de los pacientes hemofílicos el papel de las células (plaquetas, leucocitos, endotelio) y de las micropartículas es importante.

¿CUÁL ES EL OBJETIVO DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN?

En este estudio intentamos estudiar el perfil de la micropartículas plasmáticas y analizar la reactividad plaquetaria en la Hemofilia A.

¿POR QUÉ SE LE HA PEDIDO QUE PARTICIPE?

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de Hemofilia A.

¿EN QUÉ CONSISTE SU PARTICIPACIÓN? ¿QUÉ TIPO DE PRUEBAS O PROCEDIMIENTOS SE LE REALIZARÁN?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos 36 ml de sangre en 2 extracciones (18 ml + 18 ml). Así mismo, se recogerán los datos de la historia clínica pertinentes para la extrapolación de los resultados.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

Esto significa que usted no será visitado con más frecuencia de lo normal ni tomará ninguna otra medicación/tratamiento que la que tomaría normalmente. La participación en este proyecto de investigación no influirá en la elección del médico de su tratamiento.

En el proceso de donación de muestras biológicas será de aplicación la Ley 14/2007 de 3 Julio de Investigación Biomédica y conforme a la cual, previa a la firma del consentimiento para la utilización de una muestra biológica con fines de investigación biomédica recibirá la información que se detalla en el capítulo III de la ley citada referente a la finalidad, beneficios esperados, posibles inconvenientes, identidad del responsable, derecho de revocación del consentimiento, lugar de realización de los análisis y destino de las muestras, derecho a conocer los datos genéticos, garantías de confidencialidad, conservación de los datos y muestras, acceso a datos y derecho a no ser informado. Para ello se le entregará una hoja de información sobre la donación de muestras biológicas que podrá leer detenidamente así como preguntar las dudas que le surjan previo a la firma del consentimiento específico para dicha donación.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS GENERALES DE SU PARTICIPACIÓN EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN?

No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que realizaremos la extracción de muestras de sangre señaladas aprovechando alguna de las extracciones de muestras que se realizan como práctica clínica habitual en este tipo de enfermedad.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS DE SU PARTICIPACIÓN EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿QUÉ PASARÁ SI DECIDE NO PARTICIPAR EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

COSTES Y COMPENSACIÓN POR SU PARTICIPACIÓN EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

A usted no le supondrá ningún coste la participación en el proyecto de investigación, tampoco recibirá compensación económica alguna por su participación en el mismo.

¿A QUIÉN PUEDO PREGUNTAR EN CASO DE DUDA?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del proyecto de investigación y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. Faustino García Candel en el teléfono 968 369532.

CONFIDENCIALIDAD

Los investigadores responsables de la investigación se comprometen a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos que participen en el estudio, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

Todas las muestras biológicas y todos los resultados analíticos se anonimizarán utilizando etiquetas con un número de código único. Toda la información de investigación biológica obtenida de sus muestras será estrictamente confidencial y no se usará para ningún otro

propósito fuera de los del proyecto, accediendo únicamente a la información obtenida los investigadores responsables.

¿QUÉ PASARÁ CON LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS OBTENIDAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN?

Tal como recoge la Ley de Investigación Biomédica de 3 de Julio de 2007, “La donación y la utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, cualquiera que sea su origen específico, sin que en ningún caso las compensaciones que se prevén en la ley tengan un carácter lucrativo o comercial. La donación implica, así mismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas”. Los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pretenden ayudar al avance médico.

La titularidad de los resultados de la investigación realizada con las muestras corresponderá a los investigadores responsables.

Las muestras para uso de investigación serán recogidas y procesadas de acuerdo con el Capítulo 3 del Título 5 de la Ley 14/2007 de 3 de Julio de Investigación Biomédica.

Los productos biológicos que se generen en este estudio, se podrán mantener en el Biobanco de la Región de Murcia para ser utilizadas para cualquier otra investigación futura y para ello, se le entrega junto con esta información Hoja de información y autorización específica del Biobanco (Anexo I).

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES ADULTOS

Título del Proyecto: Estudio de la función plaquetaria y micropartículas plasmáticas en hemofilia A.

Investigador principal: Dr. Faustino García Candel

Servicio: Hematología y Hemoterapia

Yo, _____ he sido informado

por el Dr. _____, investigador del proyecto de investigación arriba

mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

.....
.....

.....

Paciente

Firma

Fecha

(Nombre completo en
mayúsculas del paciente)

.....		
.....		
Representante legal	Firma	Fecha
(si el paciente es un menor o		
legalmente autorizado para		
actuar como representante		
personal para firmar por		
nombre del paciente)		
.....		
.....		
Testigo	Firma	Fecha
(si el paciente otorga		
consentimiento oral, no firmado)		
.....		
.....		
Investigador	Firma	Fecha
(persona que conduce la		
obtención del Consentimiento		
Informado)		
.....		
.....		
Nombre de la persona	Firma	Fecha
que presenta/ explica el		
documento.		

(Rellenar sólo en caso de que
aplique. Si es la misma persona
que quién obtiene el CI, no es
necesario rellenar este campo)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES PEDIÁTRICOS (EDADES
12-17 AÑOS)**

Título del Proyecto: Estudio de la función plaquetaria y micropartículas plasmáticas en hemofilia A.

Investigador principal: Dr. Faustino García Candel

Servicio: Hematología y Hemoterapia

Yo, _____ he sido informado

por el Dr. _____, investigador del proyecto de investigación arriba

mencionado, y declaro que:

- He leído o me han leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

.....

Paciente	Firma	Fecha
(Nombre completo en mayúsculas del paciente)		

.....

Representante legal	Firma	Fecha
(legalmente autorizado para actuar como representante personal para firmar por nombre del paciente)		

.....

Testigo	Firma	Fecha
(si el paciente otorga consentimiento oral, no firmado)		

.....

Investigador	Firma	Fecha
(persona que conduce la obtención del Consentimiento Informado)		

Fecha

(Rellenar sólo en caso de que
aplique. Si es la misma persona
que quién obtiene el CI, no es
necesario rellenar este campo)

Servicio: Hematología y Hemoterapia

por el Dr. _____, investigador del proyecto de investigación arriba

165

Comprendo que la participación de mi hijo/a es voluntaria

Comprendo que todos los datos de mi hijo/a serán tratados confidencialmente

Comprendo que mi hijo/a puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos

Con esto doy mi conformidad para que mi hijo/a participe en este estudio,

.....

Representante legal	Firma	Fecha
(si el paciente es un menor o		
legalmente autorizado para		
actuar como representante		
personal para firmar por		
nombre del paciente)		

.....

Investigador	Firma	Fecha
(persona que conduce la		
obtención del Consentimiento		
Informado)		

.....

Nombre de la persona	Firma	Fecha
----------------------	-------	-------

que presenta/ explica el
documento.

(Rellenar sólo en caso de que
aplique. Si es la misma persona
que quién obtiene el CI, no es
necesario rellenar este campo)

Si sólo un progenitor/tutor firma este documento, por favor complete la siguiente casilla:

☐ SI Confirmando que el otro progenitor ha sido informado de la participación de nuestro hijo y no se opone

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (SANGRE) PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN PACIENTES ADULTOS

IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestras biológicas (sangre) sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa un correcto diagnóstico y tratamiento para usted. La principal vía de obtener dichas muestras es la utilización de las muestras sobrantes de las extracciones que se hacen con fines diagnósticos. Parte de la muestra no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida. Dichas muestras biológicas (sangre) serán utilizadas en el proyecto de investigación biomédica titulado: ***“Estudio de la función plaquetaria y micropartículas plasmáticas en hemofilia A”*** que está siendo realizado por el **Dr. Faustino García Candel del Servicio de Hematología y Hemoterapia** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.

Así mismo, se recogerán los datos de la historia clínica pertinentes para la extrapolación de los resultados.

Las regulaciones locales requieren el consentimiento informado antes de que usted done voluntariamente muestras biológicas para que pueda comprender la naturaleza, los beneficios y los riesgos de la donación. Entonces usted puede decidir si dona o no de una manera voluntaria e informada. La firma del formulario de consentimiento indicará que usted ha sido informado y que otorga su consentimiento.

Es importante que lea detenidamente esta hoja de información al paciente, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

OBJETIVO

El avance de la ciencia y de la medicina exige la realización de investigación sobre muestras humanas, ya sea de donantes sanos o de enfermos.

La finalidad de esta donación de muestras biológicas (sangre) es el estudio de las células y micropartículas sanguíneas, importantes en la hemostasia de los pacientes hemofílicos, con el fin de que los avances obtenidos puedan trasladarse lo antes posible a la práctica clínica.

¿EN QUÉ CONSISTE LA DONACIÓN?

Le solicitamos permiso para la donación con fines científicos de 18 ml de sangre.

En el proceso de donación de muestras biológicas será de aplicación la Ley 14/2007 de 3 Julio de Investigación Biomédica y conforme a la cual, previa a la firma del consentimiento para la utilización de una muestra biológica con fines de investigación biomédica recibirá la información que se detalla en el capítulo III de la ley citada referente a la finalidad, beneficios esperados, posibles inconvenientes, identidad del responsable, derecho de revocación del consentimiento, lugar de realización de los análisis y destino de las muestras, derecho a conocer los datos genéticos, garantías de confidencialidad, conservación de los datos y muestras, acceso a datos y derecho a no ser informado. Para ello se le entrega una hoja de información sobre la donación de muestras biológicas que podrá leer detenidamente así como preguntar las dudas que le surjan previo a la firma del consentimiento específico para dicha donación.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS GENERALES DE LA DONACIÓN?

No se prevé ningún riesgo o molestia adicional para usted ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras biológicas (sangre) sobrantes, que de otra forma se desecharían. Para la obtención de este material, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra biológica (sangre) para su estudio.

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

BENEFICIOS ESPERADOS

Tal como recoge la Ley de Investigación Biomédica de 3 de Julio de 2007, “La donación y la utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, cualquiera que sea su origen específico, sin que en ningún caso las compensaciones que se prevén en la ley tengan un carácter lucrativo o comercial. La donación implica, así mismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas”. Los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a

partir de su muestra y de muchas otras pretenden ayudar al avance médico y a mejorar el conocimiento de las causas por las que se produce la enfermedad.

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. Sin embargo, si las investigaciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que padecen Hemofilia A.

La donación implica, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras biológicas.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

La titularidad de los resultados de la investigación realizada con las muestras corresponderá a los investigadores responsables.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico/tratamiento y/o seguimiento.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se haya utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de la investigación que ya se haya llevado a cabo con anterioridad.

¿A QUIÉN PUEDO PREGUNTAR EN CASO DE DUDA?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para donación de muestras biológicas (sangre).

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto de la donación y sus implicaciones contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. Faustino García Candel en el teléfono 968 369532.

CONFIDENCIALIDAD

Los investigadores responsables de la investigación se comprometen a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos que participen en el estudio, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento

de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

Todas las muestras biológicas y todos los resultados analíticos se enmascararán utilizando etiquetas con un número de código único, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial. Toda la información de investigación biológica obtenida de su muestra de sangre será estrictamente confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los del proyecto, accediendo únicamente a la información obtenida los investigadores responsables.

Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE LA DONACIÓN

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio referido. Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted.

A estos efectos, se entenderá que no desea recibir tal información, tanto en relación con su persona como con su familia, salvo que manifieste lo contrario.

En el caso de que el médico responsable considere que usted debe recibir dicha información para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta del comité asistencial si lo hubiera. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.

Los productos biológicos que se generen en este estudio, se podrán mantener en el Biobanco de la Región de Murcia para ser utilizadas para cualquier otra investigación futura y para ello, se le entrega junto con esta información Hoja de información y autorización específica del Biobanco (Anexo I).

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (SANGRE) PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN PACIENTES ADULTOS

Título del Proyecto: Estudio de la función plaquetaria y micropartículas plasmáticas en hemofilia A.

Investigador principal: Dr. Faustino García Candel

Servicio: Hematología y Hemoterapia

Yo, _____ he sido informado

por el Dr. _____, investigador del proyecto de investigación arriba

mencionado, y declaro que:

- Entiendo que la muestra biológica (sangre) será utilizada con fines de investigación biomédica.
- Entiendo que la muestra biológica (sangre) va a ser recogida siguiendo el protocolo habitual de actuación médica para mi diagnóstico, tratamiento y seguimiento.
- Entiendo que la identidad de mi persona será tratada de forma confidencial y codificada, de forma que quede protegida, de acuerdo a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.
- Entiendo que cualquier resultado patológico detectado en los estudios realizados me será comunicado por el médico responsable.
- Entiendo que mi consentimiento no obliga a recoger ni guardar la muestra biológica (sangre) si se considera que las circunstancias no son idóneas.
- Conservo la posibilidad de renunciar a este consentimiento.
- Entiendo que no recibiré compensación económica alguna por autorizar el uso de las muestras biológicas.

- He comprendido la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído convenientes y me han aclarado todas las dudas planteadas, y en consecuencia, doy mi consentimiento.

.....

Donante	Firma	Fecha
(Nombre completo en mayúsculas del donante)		

.....

Representante legal	Firma	Fecha
(si el donante es un menor o legalmente autorizado para actuar como representante personal para firmar por nombre del donante)		

.....

Testigo	Firma	Fecha
(si el donante otorga consentimiento oral, no firmado)		

.....

Investigador	Firma	Fecha
--------------	-------	-------

(persona que conduce la
obtención del Consentimiento
Informado)

.....
.....

.....

Nombre de la persona

Firma

Fecha

que presenta/ explica el
documento.

(Rellenar sólo en caso de que
aplique. Si es la misma persona
que quién obtiene el CI, no es
necesario rellenar este campo)

9.4. ANEXO 4. Biobanco



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

En el **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca**, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios

Solicitamos su autorización para incorporar al *Biobanc-Mur Nodo Área I* del hospital el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I** del **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** hasta su extinción. Este Biobanco forma parte como nodo de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III con la referencia **RD09/0076/00065**, y está en proceso de Registro con el desarrollo de la normativa regional de Biobancos que aplica la normativa nacional.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el comité científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Protección de datos y confidencialidad: Las muestras se conservarán codificadas.

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizadas, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

*Responsable del fichero : Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.
 Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia*

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
 Responsable del nodo Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia
 Tel.: 968359757 E-mail: juanp.serna@carm.es

Carácter altruista de la donación. La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca es gratuita.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.



2

Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento: si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

Información sobre los resultados de la investigación: se le proporcionará información si usted desea recibirla

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del tutor legal que firma..... DNI.....

Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

El abajo firmante confirma que:

1. Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.

☐ SI ☐ NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia ☐ SI ☐ NO Teléfono o E-mail de contacto:.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales

☐ SI ☐ NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma



6

Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



En....., a..... de..... de.....

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI anulo el consentimiento
prestado en fecha..... de..... de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**, que doy por finalizada al día de hoy.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI, Como representante legal de
D/Dña....., con DNI....., anulo el consentimiento prestado en
fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**,
que doy por finalizada al día de hoy.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

☐ SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012

9.5.ANEXO 5. Participantes del proyecto

Han colaborado en este proyecto miembros del equipo de investigación del Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.