

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO 1: “Análisis de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y fracaso multiorgánico; relación con parámetros clínicos y evolutivos”

4.1.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL GRUPO CONTROL (GC)

Hemos definido como grupo control (GC) a un grupo constituido por 22 pacientes ingresados en nuestra UCI médico-quirúrgica, sin evidencia de infección en el momento de su inclusión, ni en las 48 horas siguientes. La edad media de este grupo control fue de 54 ± 14 años, con un rango entre 21 y 82 años. El parámetro edad sigue una distribución normal. La distribución por sexos fue la siguiente: 14 varones (64%) y 8 mujeres (36%). La puntuación del índice de gravedad APACHE II al ingreso del paciente en UCI resultó de 8 con un rango entre 1 y 35.

La enfermedad de base fue médica en 10 (44 %) pacientes y quirúrgica en los 12 (56 %) restantes. Los motivos de ingreso se describen en la tabla siguiente:

Tabla 4. Motivo de ingreso del grupo control.

	n	%
Postoperatorio de neurocirugía	5	23
Accidente vascular cerebral	4	18
Insuficiencia respiratoria aguda	4	18
Postoperatorio programado cirugía gal.	4	18
Postoperatorio cirugía máxilo-facial	2	9
Pancreatitis	2	9
Postoperatorio cirugía vascular	1	4,5

En todos los pacientes incluidos en el grupo control, los cultivos de las diferentes muestras biológicas realizados, así como los hemocultivos, resultaron negativos. Recibían tratamiento antibiótico como profilaxis de la cirugía programada, o como profilaxis de posibles complicaciones de la enfermedad de base un total de 16 pacientes (73%).

En el momento de la inclusión, 10 pacientes (44%) precisaban ventilación mecánica, aunque sólo uno (4,5%) evolucionó a SDRA durante su ingreso. Ninguno de los pacientes del grupo control se encontraba en situación de shock. La estancia media de estos pacientes fue de 14 ± 24 días, con un rango entre 2 y 123 días.

La mortalidad global del grupo control fue de 5 pacientes (23%), falleciendo 3 (60%) pacientes en situación de muerte cerebral, y 2 (40%) en situación de fracaso multiorgánico.

4.1.2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS PACIENTES SÉPTICOS (GS)

El grupo de estudio está formado por 46 pacientes con criterios de sepsis; 23 de ellos (50%) cumplían criterios de sepsis grave en el momento de su inclusión, mientras que los otros 23 pacientes (50%) pertenecen al grupo de la sepsis no grave. Estudiaremos inicialmente las características de estos pacientes en su conjunto.

La edad media de la población de pacientes sépticos fue de 59 ± 15 años, con un rango entre 22 y 79 años. En el global de pacientes sépticos predominó el sexo masculino, con una presencia de 29 varones (63%), y de 17 mujeres (37%). La puntuación APACHE II en la población de pacientes sépticos en el momento de la inclusión en el estudio resultó de 20 (3-42). La enfermedad de base fue médica en 28 pacientes (61%), siendo quirúrgica en los 18 restantes (39%).

4.1.2.1. Pacientes con sepsis no grave (SNG)

Este grupo lo constituyen 23 pacientes que han presentado una edad media de 59 ± 16 años, con un rango entre 22 y 79 años. La distribución por sexos en este grupo muestra 15 varones (65%) y 8 mujeres (35%). La puntuación APACHE II en el momento de inclusión en el estudio resultó de 18 (3-27). La enfermedad de base fue médica en 14 pacientes (61%), mientras que fue quirúrgica en los 9 restantes (39%).

4.1.2.2. Pacientes con sepsis grave (SG)

También está constituido por 23 pacientes, que presentan una edad media de 60 ± 14 años, con un rango entre 28 y 79 años. Su distribución en función del sexo es la siguiente: 14 pacientes (61%) fueron varones, mientras 9 (39%) resultaron mujeres. La puntuación del score APACHE II en este grupo en el momento de inclusión, fue de 22 (9-42). Al igual que en el grupo anterior, la enfermedad de base fue médica en 14 pacientes (61%), mientras que fue quirúrgica en los 9 restantes (39%).

4.1.2.3. Comparación entre grupos

Estudiando la variable edad, no hemos encontrado diferencias significativas entre el grupo control (GC) y el global de la población a estudiar (GS); ni entre el grupo control (GC) y cada uno de los grupos de sepsis grave (SG) y de sepsis no grave (SNG). Asimismo, tampoco se han hallado diferencias al comparar estos dos grupos (SG y SNG).

Cuando analizamos la variable sexo, no existen diferencias significativas en la proporción de un sexo sobre el otro, al comparar el grupo control (GC) con la población de pacientes sépticos (GS) o sus grupos de pacientes con sepsis grave (SG) o sepsis no grave (SNG). Tampoco se han encontrado diferencias al comparar estos grupos entre sí (SG y SNG).

Sí que hemos encontrado diferencias al realizar el análisis comparativo de la puntuación APACHE II entre el grupo control (GC) y el grupo de pacientes sépticos (GS) ($p < 0.05$). Asimismo, estas diferencias son significativas al comparar el grupo control (GC)

con cada uno de los grupos a estudio (SG y SNG) ($p < 0.05$). La diferencia en la puntuación APACHE II entre los grupos de sepsis grave y sepsis no grave, no resultaron significativas.

Al estudiar la enfermedad de base, no hemos hallado diferencias significativas en el origen médico o quirúrgico, entre el grupo control y el grupo de estudio, ni entre los grupos de sepsis grave y sepsis no grave. En la tabla 5 se detallan los motivos de ingreso en UCI de los pacientes sépticos.

Tabla 5. Motivo de ingreso

	Sepsis no grave		Sepsis grave		Total (GS)	
	n	%	n	%	N	%
Insuficiencia respiratoria	10	43	9	39	19	82
Sepsis	6	26	7	30	13	56
Postoperatorio cirugía general	3	13	4	17	7	30
Postoperatorio cir. maxilofacial	2	9	1	4.5	3	13
Postoperatorio cir. vascular	2	9	1	4.5	3	13
Pancreatitis	0	0	1	4.5	1	4.5

4.1.2.4. Estudio microbiológico

Haciendo una valoración global (GS) sobre el lugar de adquisición de la infección, observamos que la infección extrahospitalaria fue la más frecuente, con un total de 29 casos (63%), seguido de la adquisición intraUCI con 11 casos (24%), y por último la infección intrahospitalaria con 6 casos (13%). Si analizamos el lugar de adquisición por grupos, encontramos que en el grupo de pacientes con sepsis no grave (SNG), 14 casos (61%) fueron de infección extrahospitalaria, seguido de 6 casos (27%) en los que la adquisición ocurrió intraUCI, y 3 casos (13%) de infección intrahospitalaria. En el grupo de sepsis grave (SG), 15 casos (65%) fueron de origen extrahospitalario, 5 casos (22%) cuya adquisición fue intraUCI, y 3 casos (13%) de infección intrahospitalaria. No hemos encontrado diferencias significativas con respecto al lugar de adquisición de la infección entre ambos grupos.

Cuando analizamos el foco de la infección de forma global (GS), encontramos que en 19 casos (41%) el origen fue respiratorio, en 10 casos (22%) el foco de la infección fue urinario, en 7 casos (15%) la infección tuvo su origen en el abdomen, en 3 casos (6,5%) el foco fue el SNC, en otros 3 casos (6,5%) se debió a una sepsis por catéter, en 1 caso (2%) el origen fue ginecológico, y en 2 casos (4%) no se pudo determinar el foco de la infección. En la tabla 6, se representa la distribución por focos en cada grupo de estudio.

Tabla 6. Foco de infección

	Sepsis no grave		Sepsis grave	
	n	%	n	%
Respiratorio	11	48	9	39
Urinario	4	17	6	26
Abdominal	3	13	4	17
SNC	2	9	1	4.5
Cateter	2	9	1	4.5
Ginecológico	0	0	1	4.5
Desconocido	1	4.5	1	4.5

Por lo que respecta al cultivo del foco de la infección, del global de pacientes sépticos, éste resultó positivo en 26 casos (57%). Del grupo de sepsis no grave (SNG), el número de casos con cultivo positivo fue de 12 (56%), mientras que en el grupo de pacientes con sepsis grave (SG), los cultivos del foco de la infección fueron positivos en 14 casos (61%). Las diferencias entre grupos no son estadísticamente significativas.

Por lo que respecta al hallazgo de bacteriemia, los hemocultivos resultaron positivos en 5 pacientes (21%) del grupo de sepsis no grave (SNG), y en 9 pacientes (39%) del grupo de sepsis grave (SG). Esta diferencia se determinó significativa ($p < 0.05$). Se detectó bacteriemia por bacilos gram negativos (BGN) en 8 casos (17%) del total de pacientes sépticos, y la bacteriemia producida por cocos gram positivos (CGP) se detectó en 6 casos (13%). El BGN aislado en los hemocultivos con más frecuencia fue el *Escherichia coli* (5 casos), mientras que el CGP aislado en más ocasiones fue el *Streptococcus pneumoniae* (3 casos).

Cuando analizamos los microorganismos responsables de la sepsis, el cultivo resultó monomicrobiano en 19 casos (41%), y polimicrobiano en 9 pacientes (20%). Todos los microorganismos aislados fueron bacterias, no habiéndose aislado en ningún caso un agente fúngico. En las sepsis monomicrobianas se aislaron 8 especies distintas: *Escherichia coli* (31%), *Pseudomonas aeruginosa* (19%), *Streptococcus pneumoniae* (15%), *Staphylococcus aureus* (8%), *Enterobacter cloacae* (8%), *Proteus mirabilis* (8%), *Klebsiella pneumoniae* (8%) y *Stenotrophomonas maltophilia* (4%). La distribución por grupos de estos microorganismos se muestra en la tabla 7. En las sepsis polimicrobianas se aislaron en 5 casos 2 gérmenes, y en 2 casos 3 microorganismos. Las combinaciones de microorganismos aislados en cultivos polimicrobianos se muestra en la tabla 8.

Tabla 7. Microorganismos aislados en cultivos monomicrobianos

	Sepsis no grave	Sepsis grave	Total (GS)
<i>Escherichia coli</i>	3	5	8 (31%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	3	5 (18%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	2	4 (15%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2	3 (12%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	2 (8%)
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2 (8%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	2 (8%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1	1 (4%)

Tabla 8. Microorganismos aislados en cultivos polimicrobianos

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Streptococcus mitis</i>
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecium</i> + <i>Clostridium sp</i>

4.1.2.5. Datos analíticos

Los datos analíticos estudiados a continuación, se centran en parámetros hematológicos y bioquímicos, interesantes no sólo para una correcta descripción de cada grupo, sino también para realizar un análisis posterior, que nos ayude a interpretar los datos obtenidos por citometría de flujo de la población de leucocitos y de plaquetas.

De las variables analizadas, la cifra de leucocitos, plaquetas y tiempo de protrombina e INR (*international normalized ratio*), siguieron una distribución normal. Expondremos a continuación sus resultados como media y desviación estándar, así como la comparación entre grupos.

El grupo de pacientes sépticos (GS) presentó los siguientes valores: leucocitos 17.844 ± 10.126 , plaquetas 190.100 ± 94.559 , tiempo de protrombina 73.5 ± 22.73 %, e INR 1.35 ± 0.46 . Mientras del grupo control (GC) obtuvimos los siguientes valores: leucocitos 13.554 ± 3.805 , plaquetas 257.409 ± 84.989 , tiempo de protrombina de 83.23 ± 11.75 , e INR 1.20 ± 0.19 . Con respecto al grado de significación de las diferencias obtenidas, observamos que existen diferencias significativas entre las cifras de leucocitos de ambos grupos ($p < 0.05$), y entre las cifras de plaquetas de los grupos descritos ($p < 0.05$), no existiendo diferencia en lo que se refiere al tiempo de protrombina e INR.

A continuación mostraremos en la tabla 9 los valores obtenidos para las variables anteriores, pero describiendo a cada grupo de estudio por separado.

Tabla 9. Algunos datos analíticos. Comparación entre grupos.

	Leucocitos		Plaquetas		INR	
	X	ds	x	Ds	x	ds
Grupo control	13.554	3.805	257.409	84.989	1.20	0.19
Sepsis no grave	14.076	5.545	224.285	99.798	1.23	0.28
Sepsis grave*	22.070*	12.262	177.046*	89.395	1.51*	0.56

* $p < 0.05$ Existe diferencia significativa entre el grupo sepsis grave y los otros dos grupos.

Cuando estudiamos las cifras de leucocitos, el grupo de sepsis grave (SG) presentó leucocitosis en un grado significativamente ($p < 0.05$) superior que los grupos de sepsis no grave (SNG) y que el grupo control (GC); la diferencia de la cifra de leucocitos entre estos dos últimos grupos no es significativa. Con respecto a los valores referidos a las plaquetas, nos encontramos que la diferencia entre el grupo de SG y el grupo GC es significativa ($p < 0.05$), y lo mismo ocurre entre el grupo SG y SNG ($p < 0.05$) mientras no existe diferencia entre SNG y GC. Al estudiar el INR, encontramos que existen diferencias ($p < 0.05$) al comparar el grupo SG con los pacientes de los grupos SNG y GC; mientras esta diferencia no se mantiene al comparar los grupos SNG y GC entre sí. Estos resultados referidos al INR, se mantienen para el tiempo de protrombina de nuestro laboratorio.

El resto de variables biológicas determinadas (entre otras: equilibrio ácido-base, ionograma, hemograma, estudio de función hepática y renal, relación paO_2/fiO_2) han sido necesarias para el cálculo de los *scores* APACHE II y SOFA, que nos ayudan respectivamente a estudiar el grado de gravedad del paciente a su ingreso, y a cuantificar el grado de disfunción multiorgánica. Los valores del APACHE II para cada grupo, los hemos descrito previamente. A continuación estudiaremos el grado de disfunción multiorgánica.

4.1.2.6. Estudio de la disfunción multiorgánica: SOFA

Las bases teóricas y prácticas de este score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment), han sido descritas ampliamente en los apartados de *Introducción* y *Material y Métodos*. Recordaremos que se estudia el número de órganos disfuncionantes (respiratorio, hematológico, hepático, cardiovascular, SNC y renal), así como el grado de disfunción (0-4) de cada uno de ellos. A continuación describiremos el score SOFA de cada grupo de estudio, realizando posteriormente un desglose por sistemas.

Hemos encontrado que en la población de sepsis no grave, la puntuación total para el SOFA expresado es de 3.2 ± 1.6 , mientras que en la población de sepsis grave este valor asciende a 10.9 ± 4.6 , siendo la diferencia entre ambos valores significativa ($p < 0.05$). En la

tabla 10 describimos el grado de presentación de cada disfunción orgánica, así como su significación.

Tabla 10. Disfunción orgánica y score SOFA. Comparación entre grupos.

	Sepsis no grave		Sepsis grave	
	x	ds	x	ds
Respiratorio	1.33	1.35	2.41	1.60
Coagulación	0.62	0.80	2.35	1.66
Hepático	0.19	0.51	1.12	1.17
Cardiovascular	0.42	0.67	3.06	1.43
SNC	0.14	0.35	1.71	1.10
Renal	0.48	0.68	1.41	1.18
GLOBAL	3.19	1.63	10.88	4.6

Todas las diferencias entre ambos grupos han resultado significativas ($p < 0.05$)

Como podemos observar, el órgano que ha disfuncionado con mayor frecuencia y gravedad en el grupo de la sepsis grave, ha sido el sistema cardiovascular, que ha presentado diferentes grados de disfunción en los 23 pacientes del grupo. Le ha seguido el fracaso renal, que se ha presentado en 17 pacientes, con valores de disfunción habitualmente por debajo de 3, por lo que aportan poco peso a la puntuación total del SOFA. A continuación sigue el sistema respiratorio, que ha fracasado en 13 pacientes, y tras él, se sitúa la coagulación, que ha presentado disfunción en 9 pacientes. Los órganos que han disfuncionado con menor frecuencia, y a su vez en menor grado, han sido el SNC y el hígado.

4.1.2.7. Correlación APACHE II y SOFA

Hemos encontrado una correlación significativa entre el APACHE II en el momento de inclusión en el estudio, y el número de órganos disfuncionantes según el *score* SOFA ($r=0.40$, $p < 0,001$).

4.1.2.8. Datos evolutivos

La estancia media de los pacientes sépticos (GS) en UCI, fue de 19 ± 16 días, con un rango entre 1 y 112 días. Distribuyéndose del siguiente modo: el grupo de pacientes con sepsis no grave presentó una estancia media de 14 ± 12 días, con un rango entre 1 y 52 días, mientras que el grupo de la sepsis grave, presentó una estancia media de 22 ± 21 días, con un rango entre 1 y 112 días. Estas diferencias entre grupos, no resultaron significativas; tampoco lo fueron cuando se las comparó con el grupo control.

La mortalidad global de los pacientes sépticos fue del 41.3 %. Cuando realizamos el análisis de mortalidad, ésta resultó del 21.7 % en el grupo de la sepsis no grave, mientras que la mortalidad en el grupo de la sepsis grave ascendió al 60.8 %. La mortalidad en el día 28 en el grupo de sepsis no grave resultó del 26.1 %, mientras que en el grupo de la sepsis grave, fue del 69.6%. En ambos casos, la diferencia de mortalidad entre ambos grupos, resultó significativa ($P < 0.05$). La mortalidad del grupo control resultó de 23 %, sin diferencias con respecto al grupo de sepsis no grave, pero significativamente inferior a la mortalidad del grupo de la sepsis grave ($P < 0.05$).

Asimismo, hemos encontrado una correlación positiva entre los valores para los *scores* APACHE II y SOFA de los pacientes sépticos (GS), y la mortalidad ($p < 0.05$).

4.1.3. ESTUDIO DE LOS AGREGADOS PLAQUETARIOS

4.1.3.1. Valores de normalidad

Para establecer las normalidades en nuestro laboratorio para la técnica descrita en el apartado 3.1.6.3.1. de *Material y método*, hemos analizado a 20 donantes sanos. Los resultados han mostrado que la población sana presenta un “porcentaje de expresión de agregados plaquetarios” del 4.02 ± 1.44 , con un rango entre el 1.90 y el 6.32.

4.1.3.2. Grupo control

El grupo de pacientes de UCI sin sepsis, que constituyen el grupo control, han presentado un valor para la variable “porcentaje de agregados plaquetarios” expresados en forma de media \pm desviación estándar de 4.52 ± 1.76 , con un rango entre 2.58 y 9.89.

4.1.3.3. Grupo de sepsis no grave (SNG)

El grupo de SNG ha presentado los siguientes porcentajes de agregados, expresados como media \pm desviación estándar: 3.90 ± 1.43 , con un rango entre 2.37 y 7.19.

4.1.3.4. Sepsis grave (SG)

El grupo de pacientes con sepsis grave, presentó para la variable “porcentaje de agregados plaquetarios” los siguientes valores de media \pm desviación estándar: 7.85 ± 6.58 , con un rango entre 2.52 y 25.30.

4.1.3.5. Comparación entre grupos

No encontramos diferencias significativas entre la población sana que ha servido para conocer la normalidad de nuestro protocolo en nuestro laboratorio, y la población del grupo control, constituido por pacientes de UCI sin sepsis. Tampoco hemos hallado diferencia estadística entre estos grupos y el grupo de pacientes con sepsis no grave.

Si que hemos calculado una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los valores de la variable “porcentaje de agregados plaquetarios” obtenidos para el grupo de pacientes con sepsis grave, y los obtenidos para los otros grupos mencionados: normalidad, grupo control, y grupo de sepsis no grave. En la figura 6 observamos la representación gráfica de estos resultados.

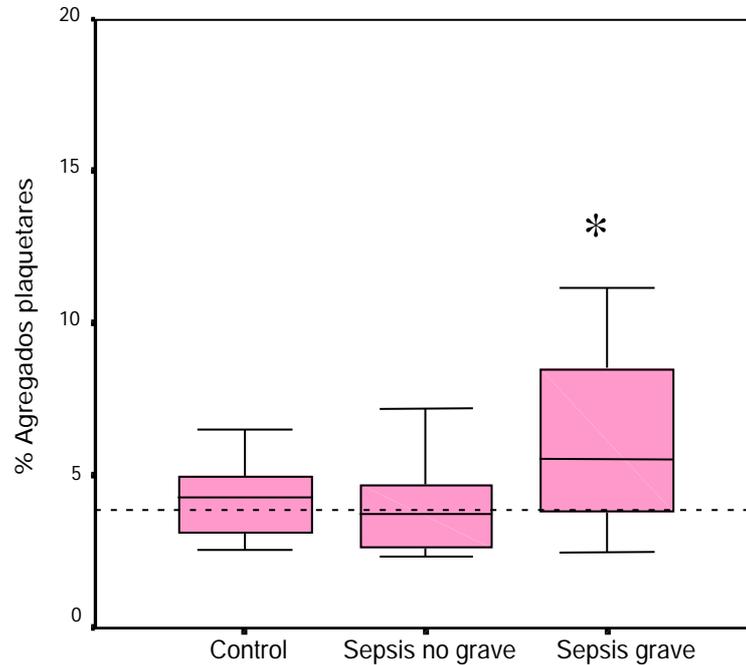


Figura 6. Agregados plaquetarios: resultados según grupos. Observamos que en el grupo de sepsis grave existe un porcentaje de agregados plaquetarios significativamente mayor ($P < 0.05$) que en el grupo de sepsis no grave o que en el grupo control. Asimismo, no encontramos diferencias en los agregados obtenidos entre la población sana, el grupo control y el grupo de sepsis no grave. La media de los valores de normalidad, se muestra como una línea discontinua.

4.1.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PAC-1

4.1.4.1. Valores de normalidad

Se exponen los resultados del análisis de la expresión del marcador PAC-1, correspondiente al receptor plaquetario para el fibrinógeno en su forma activada, en un grupo de 20 donantes sanos, según el protocolo descrito en el apartado 3.1.6.3.2. de *Material y método*. Los valores de normalidad que hemos obtenido, expresados como “porcentaje de células positivas para el anticuerpo PAC-1”, es de 1.18 ± 0.75 , con un rango

entre 0.15 y 3.40. Estos valores los podemos desglosar en dos: el porcentaje de células PAC-1 positivas que existen en el grupo de plaquetas libres, y el que aparece en el grupo de agregados plaquetares. Así, en las plaquetas libres nos encontramos con unos valores expresados como media y desviación estándar, de 0.98 ± 0.65 , con un rango entre 0.15 y 3.45, mientras que en la población de agregados plaquetares, los valores que expresan el porcentaje de células PAC-1 positivas es de 5.22 ± 3.85 , con un rango entre 1.98 y 16.33, estas diferencias resultaron significativas ($p < 0.05$).

4.1.4.2. Grupo control

El grupo de pacientes de UCI sin sepsis, que constituyen el grupo control, han presentado un valor para la variable “porcentaje de plaquetas positivas para el marcador PAC-1” expresados en forma de media \pm desviación estándar de 0.99 ± 0.77 , con un rango entre 0.36 y 3.60.

Cuando desglosamos los valores en función de la subpoblación plaquetaria, encontramos que: en el grupo de plaquetas libres, el porcentaje de células PAC-1 +, es de 0.75 ± 0.69 , con un rango entre 0.17 y 3.03, mientras que en el grupo de plaquetas agregadas, los valores de plaquetas PAC-1 + resultaron de 5.94 ± 4.51 , con un rango entre 2.02 y 19.52. La diferencia de células PAC-1 + entre dichas poblaciones resultó significativa ($P < 0.05$).

4.1.4.3. Grupo de sepsis no grave (SNG)

La población global de plaquetas de muestras obtenidas en el grupo de SNG ha presentado los siguientes porcentajes de plaquetas PAC-1 positivas, expresados como media \pm desviación estándar: 1.04 ± 0.57 , con un rango entre 0.29 y 1.90. Cuando desglosamos los resultados en función de la subpoblación de plaquetas estudiada, observamos que en el subgrupo de las plaquetas libres, el “% de células PAC-1 positivas” ha sido de 0.80 ± 0.54 , con un rango entre 0.10 y 0.68, mientras que en la población de plaquetas agregadas, la expresión de PAC-1 fue de 6.23 ± 3.93 , con un rango entre 1.69 y

18.19. La diferencia en la expresión de PAC-1 entre ambas poblaciones, resultó significativa ($P < 0.05$).

4.1.4.4. Sepsis grave (SG)

El grupo de pacientes con sepsis grave, presentó para la variable “porcentaje de plaquetas positivas para PAC-1” los siguientes valores de media \pm desviación estándar: 4.07 ± 4.49 , con un rango entre 0.46 y 14.58.

Al estudiar las dos subpoblaciones de plaquetas, encontramos que en el grupo de plaquetas libres, el porcentaje de células PAC-1 positivas, fue de 2.55 ± 3.57 , con un rango entre 0.16 y 11.69, mientras que en el grupo de agregados plaquetares las células PAC-1 positivas presentaron la siguiente frecuencia: 19.12 ± 10.31 , con un rango entre 6.87 y 48.08. La diferencia entre las plaquetas PAC-1 positivas de ambas subpoblaciones, resultó significativa ($P < 0.05$).

4.1.4.5. Comparación entre grupos

No hemos encontrado diferencias significativas entre la población sana que ha servido para conocer la normalidad de nuestro protocolo en nuestro laboratorio, y la población del grupo control, constituido por pacientes de UCI sin sepsis. Tampoco hemos hallado diferencia estadística entre estos grupos y el grupo de pacientes con sepsis no grave.

Si que hemos calculado una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los valores de la variable “porcentaje de plaquetas que expresan el marcador PAC-1” obtenidos, al estudiar la población global de plaquetas, para el grupo de pacientes con sepsis grave, y los obtenidos para los otros grupos mencionados: normalidad, grupo control, y grupo de sepsis no grave. La misma significación se mantiene cuando analizamos por separado las subpoblaciones de plaquetas libres y de plaquetas agregadas ($P < 0.05$). En la figura siguiente, observamos la representación gráfica de estos resultados.

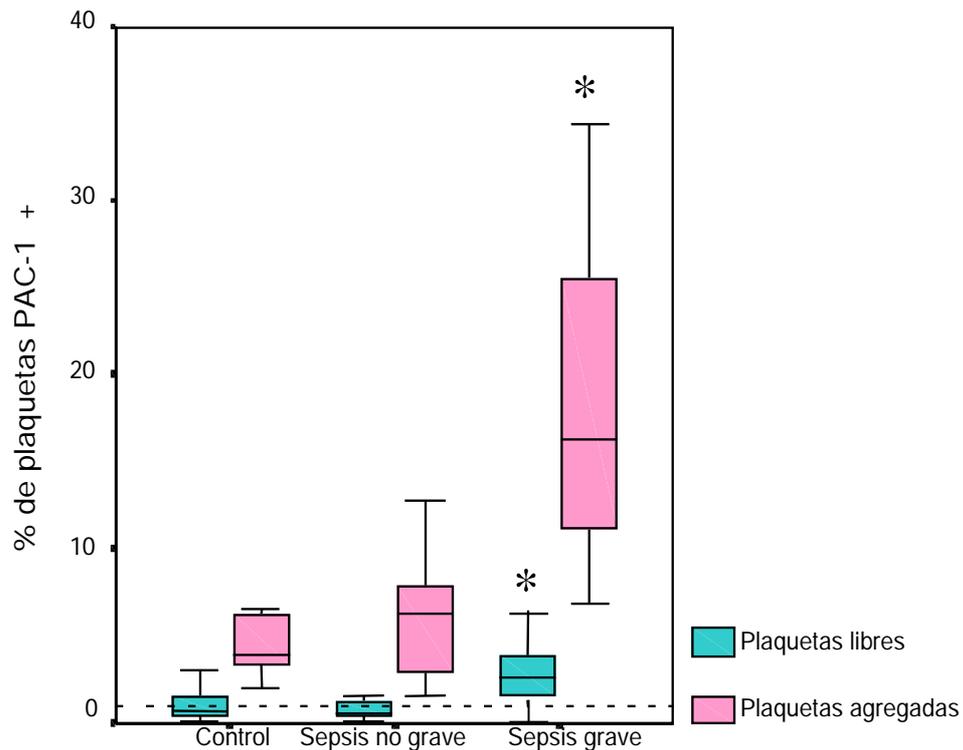


Figura 7. Expresión de PAC-1 en función de la población plaquetaria y del grupo analizado. Observamos el porcentaje de células PAC-1 positivas en la subpoblación de plaquetas libres y en la subpoblación de plaquetas agregadas, en los diferentes grupos estudiados: grupo control, grupo de sepsis no grave y grupo de sepsis grave. La línea discontinua refleja la media para la normalidad. Encontramos que los valores de células PAC-1 +, en el grupo de pacientes sépticos graves, para cada una de las subpoblaciones, es significativamente más elevado que en los grupos control y de sepsis no grave ($P < 0.05$). Asimismo, no existen diferencias entre la población control y la de pacientes con sepsis no grave, ni entre estos y la población sana.

4.1.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CD62P (P-SELECTINA)

4.1.5.1. Valores de normalidad

Exponemos a continuación los resultados del análisis de la expresión del marcador CD62P o P-selectina, correspondiente a parte de la membrana de los gránulos alfa plaquetarios expresados tras la activación plaquetar en la superficie de las plaquetas, en un grupo de 20 donantes sanos, según el protocolo descrito en el apartado 3.1.6.3.2. de

Material y método. Los valores de normalidad que hemos obtenido, expresados como porcentaje de células positivas para el anticuerpo CD62P, es de 3.45 ± 1.28 , con un rango entre 1.25 y 5.40. Estos valores los podemos desglosar en dos: el porcentaje de células CD62P positivas que existen en el grupo de plaquetas libres, y el que aparece en el grupo de agregados plaquetares. Así, en las plaquetas libres nos encontramos con unos valores expresados como media y desviación estándar, de 2.63 ± 1.25 , con un rango entre 0.98 y 5.87, mientras que en la población de agregados plaquetares, los valores que expresan el porcentaje de células CD62P positivas es de 7.07 ± 4.28 , con un rango entre 2.31 y 16.11, estas diferencias resultaron significativas ($p < 0.05$).

4.1.5.2. Grupo control

El grupo de pacientes de UCI sin sepsis, que constituyen el grupo control, han presentado un valor para la variable “porcentaje de plaquetas positivas para el marcador CD62P” expresados en forma de media \pm desviación estándar de 4.57 ± 2.71 , con un rango entre 0.83 y 9.39.

Cuando desglosamos los valores en función de la subpoblación plaquetaria, encontramos que: en el grupo de plaquetas libres, el porcentaje de células CD62P +, es de 4.39 ± 2.75 , con un rango entre 0.51 y 9.45, mientras que en el grupo de plaquetas agregadas, los valores de plaquetas CD62P + resultaron de 7.21 ± 3.06 , con un rango entre 1.52 y 12.90. La diferencia de células CD62P + entre dichas poblaciones resultó significativa ($P < 0.05$).

4.1.5.3. Grupo de sepsis no grave (SNG)

La población global de plaquetas de muestras obtenidas en el grupo de SNG ha presentado los siguientes porcentajes de plaquetas CD62P positivas, expresados como media \pm desviación estándar: 2.97 ± 1.28 , con un rango entre 1.40 y 6.57. Cuando desglosamos los resultados en función de la subpoblación de plaquetas estudiada, observamos que en el subgrupo de las plaquetas libres, el % de células CD62P + ha sido de

2.76 ± 1.32 , con un rango entre 1.13 y 6.47, mientras que en la población de plaquetas agregadas, la expresión de CD62P fue de 8.08 ± 4.77 , con un rango entre 2.66 y 21.22. La diferencia en la expresión de CD62P entre ambas poblaciones, resultó significativa ($P < 0.05$).

4.1.5.4. Sepsis grave (SG)

El grupo de pacientes con sepsis grave, presentó para la variable “porcentaje de plaquetas positivas para CD62P” los siguientes valores de media \pm desviación estándar: 9.94 ± 10.95 , con un rango entre 1.51 y 48.46. Al estudiar las dos subpoblaciones de plaquetas, encontramos que en el grupo de plaquetas libres, el porcentaje de células CD62P +, fue de 8.92 ± 11.28 , con un rango entre 0.62 y 47.47, mientras que en el grupo de agregados plaquetares las células CD62P positivas presentaron la siguiente frecuencia: 23.59 ± 10.79 , con un rango entre 10.67 y 61.54. La diferencia entre las plaquetas CD62P positivas de ambas subpoblaciones, resultó significativa ($P < 0.05$).

4.1.5.5. Comparación entre grupos

No hemos encontrado diferencias significativas entre la población sana que ha servido para conocer la normalidad de nuestro protocolo, y la población del grupo control, constituido por pacientes de UCI sin sepsis. Tampoco hemos hallado diferencia estadística entre estos grupos y el grupo de pacientes con sepsis no grave. Si que hemos calculado una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los valores de la variable “porcentaje de plaquetas que expresan el marcador CD62P” obtenidos, al estudiar la población global de plaquetas, para el grupo de pacientes con sepsis grave, y los obtenidos para los otros grupos mencionados: normalidad, grupo control, y grupo de sepsis no grave. La misma significación se mantiene cuando analizamos por separado las subpoblaciones de plaquetas libres y de plaquetas agregadas ($P < 0.05$). En la figura siguiente, observamos la representación gráfica de estos resultados.

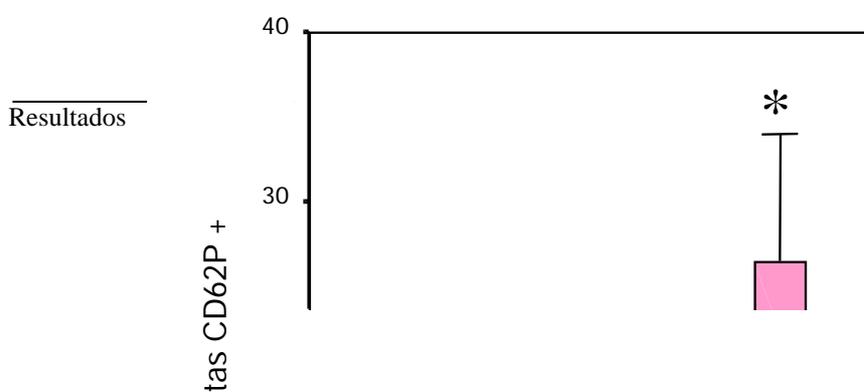


Figura 8. Expresión de CD62P en función de la población plaquetaria y del grupo analizado. Observamos el porcentaje de células CD62P positivas en la subpoblación de plaquetas libres y en la subpoblación de plaquetas agregadas, en los diferentes grupos estudiados: grupo control, grupo de sepsis no grave y grupo de sepsis grave. La línea discontinua refleja la media para la normalidad. Encontramos que los valores de células CD62P +, en el grupo de pacientes sépticos graves, para cada una de las subpoblaciones, es significativamente más elevado que en los grupos control y de sepsis no grave ($P < 0.05$). Asimismo, no existen diferencias entre la población control y la de pacientes con sepsis no grave, ni entre estos y la población sana.

4.1.6. ESTUDIO DE LOS AGREGADOS LEUCO-PLAQUETARES

4.1.6.1. Valores de normalidad

En primer lugar expondremos los valores obtenidos según el protocolo descrito en el apartado 3.1.6.3.3. de Material y método, en un grupo de 20 donantes sanos. Denominamos a la variable que analizamos “agregados leucoplaquetares –ALP–“, la cual se refiere al porcentaje de leucocitos que detectamos unidos a plaquetas, sobre el total de leucocitos.

Los valores de normalidad que hemos obtenido, expresados como “porcentaje de agregados leuco-plaquetares” es de 3.52 ± 2.78 , con un rango entre 0.75 y 8.41.

4.1.6.2. Grupo control

El grupo de pacientes de UCI sin sepsis, que forman el grupo control, han presentado un valor para la variable “porcentaje de agregados leuco-plaquetares” expresados en forma de media \pm desviación estándar de 3.73 ± 2.65 , con un rango entre 0.94 y 13.38.

4.1.6.3. Grupo de sepsis no grave (SNG)

La población global de plaquetas de muestras obtenidas en el grupo de SNG ha presentado los siguientes porcentajes de agregados leuco-plaquetares, expresados como media \pm desviación estándar: 3.63 ± 2.49 , con un rango entre 0.48 y 11.76.

4.1.6.4. Sepsis grave (SG)

El grupo de pacientes con sepsis grave, presentó para la variable “porcentaje de agregados leuco-plaquetares” los siguientes valores de media \pm desviación estándar: 10.41 ± 12.00 , con un rango entre 1.32 y 53.85.

4.1.6.5. Comparación entre grupos

No hemos encontrado diferencias significativas entre la población sana que ha servido para conocer la normalidad de nuestro protocolo, y la población del grupo control, constituido por pacientes de UCI sin sepsis. Tampoco hemos hallado diferencia estadística entre estos grupos y el grupo de pacientes con sepsis no grave. Si que hemos calculado una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los valores de la variable “porcentaje de agregados leuco-plaquetares” obtenidos, al estudiar la población global de plaquetas, para el grupo de pacientes con sepsis grave, y los obtenidos para los otros grupos mencionados: normalidad,

grupo control, y grupo de sepsis no grave. En la figura siguiente, observamos la representación gráfica de estos resultados.

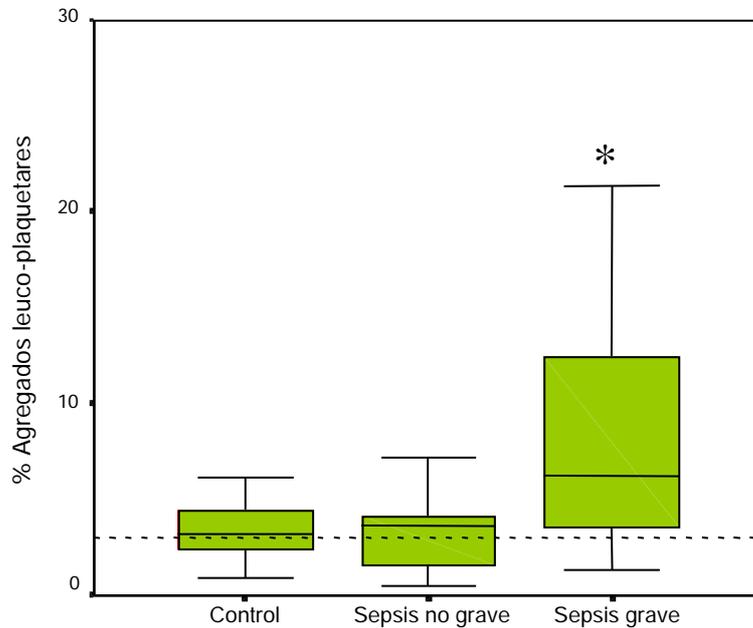


Figura 9. Expresión del porcentaje de agregados leuco-plaquetarios. Se muestra en esta gráfica, que en el análisis por grupos estudiados, el grupo de sepsis grave, presenta unos valores para la expresión de agregados leuco-plaquetarios significativamente mayor ($P < 0.05$) que la población sana (línea discontinua), el grupo control, o el grupo de sepsis no grave. Asimismo, no hemos encontrado diferencias al comparar los tres últimos grupos mencionados.

4.1.7. CORRELACIÓN ENTRE DIFERENTES PARÁMETROS DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

Cuando estudiamos si existe alguna correlación significativa entre los parámetros de activación plaquetaria descritos en los capítulos anteriores, encontramos los resultados que exponemos a continuación en la tabla 11. Dichos resultados se basan en el análisis de la población séptica, que incluye a pacientes con sepsis grave, y a pacientes con sepsis no grave.

Se describe una correlación positiva significativa, entre la variable “agregados plaquetares” y la expresión de los marcadores de activación plaquetar CD62P y PAC-1, en todas las subpoblaciones de plaquetas. Asimismo, también existe una correlación positiva al estudiar el grado de expresión de los marcadores CD62P y PAC-1 en la población global de plaquetas y en la subpoblación de plaquetas agregadas. Los agregados leuco-plaquetares sólo se correlacionan con el grado de expresión de dichos marcadores CD62P y PAC-1, en la subpoblación de agregados plaquetares.

AP	ns						
CD62P PL	ns	r=0.32 p<0.05					
CD62P AP	r=0.33 p<0.05	r=0.38 p<0.05	r=0.45 p<0.01				
CD62P T	ns	r=0.34 p<0.05	r=0.96 p<0.01	r=0.60 p<0.01			
PAC-1 PL	ns	r=0.37 p<0.05	ns	ns	ns		
PAC-1 AP	r=0.39 p<0.05	r=0.43 p<0.01	ns	r=0.83 p<0.01	r=0.39 p<0.05	ns	
PAC-1 T	ns	r=0.60 p<0.01	ns	r=0.38 p<0.05	r=0.36 p<0.05	r=0.87 p<0.01	r=0.55 p<0.01
	ALP	AP	CD62P PL	CD62P AP	CD62P T	PAC-1 PL	PAC-1 AP

Tabla 11. Correlación entre diferentes parámetros de activación plaquetar.

4.1.8. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

No encontramos diferencias significativas en las diferentes variables de activación plaquetaria, según los diferentes grupos de edad, sexo, patología de base, o factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial, dislipemia, diabetes mellitus o tabaquismo.

Cuando analizamos la correlación entre las variables de activación plaquetarias y el APACHE II, encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa, entre la variable “ % de agregados plaquetares” y el APACHE II ($r=0.56$, $p<0.01$).

Asimismo, encontramos una correlación positiva entre la variable “% de plaquetas PAC-1 positivas” y el APACHE II, tanto en la población global de plaquetas ($r=0.43$, $p<0.05$), como en la subpoblación de plaquetas libres ($r=0.35$, $p<0.05$), no así, en la subpoblación de plaquetas agregadas. Cuando la variable analizada es el “% de plaquetas CD62P positivas”, ésta presenta una correlación positiva con el APACHE II, tanto en la población plaquetaria total ($r=0.53$, $p<0.01$), como en la subpoblación de plaquetas libres ($r=0.48$, $p<0.01$), no hallándose dicha correlación al analizar la subpoblación de agregados plaquetares. El análisis de la variable “% de agregados leuco-plaquetares” tampoco se ha correlacionado con el APACHE II.

4.1.9. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y DATOS MICROBIOLÓGICOS

No existieron diferencias significativas en los diferentes marcadores de activación plaquetares estudiados, en función del lugar de adquisición de la infección: extrahospitalario, intrahospitalario e intraUCI. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias en los diferentes marcadores de activación plaquetares en función del tipo de aislamiento microbiológico: sepsis por gramnegativos, sepsis por grampositivos, sepsis polimicrobiana y sepsis sin confirmación microbiológica.

Cuando estudiamos si existen diferencias en la expresión de parámetros de activación plaquetaria en función del foco de la infección, no encontramos dichas diferencias.

Tampoco existe una diferencia significativa entre los valores obtenidos de activación plaquetaria, entre los pacientes sépticos cuyos hemocultivos resultaron positivos, y aquellos en los que las muestras sanguíneas no mostraron crecimiento bacteriano.

4.1.10. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y DATOS ANALÍTICOS

Cuando estudiamos la relación entre el número de plaquetas circulantes y los marcadores de activación analizados, encontramos una correlación negativa entre la cifra de plaquetas y los agregados plaquetares, es decir, encontramos mayor número de agregados plaquetares en los pacientes con trombocitopenia. Igualmente, hallamos una correlación negativa entre la cifra de plaquetas y el grado de expresión de P-selectina, y de PAC-1 en la población global de plaquetas.

ALP	ns							
CD62P T	r=0.34 p<0.05	ns						
PAC-1 T	r=0.60 p<0.01	ns	ns					
Leucocitos	ns	ns	ns	ns				
Plaquetas	r=-0.37 p<0.05	ns	r=-0.37 p<0.05	r=-0.34 p<0.05	r=-0.32 p=0.05			
INR	ns	ns	r=0.35 p<0.05	r=0.49 p<0.01	ns	r=-0.37 p<0.05		
Hemoglobina	ns	r=-0.38 p<0.05	ns	ns	ns	ns	Ns	
	AP	ALP	CD62P-T	PAC-1-T	Leucocitos	Plaquetas	INR	

Tabla 12. Correlación entre activación plaquetar y datos analíticos.

Encontramos una correlación positiva entre el INR y el grado de expresión de P-selectina, y de PAC-1 en la población total de plaquetas; existiendo una correlación negativa entre la cifra de plaquetas y el INR, de forma que a mayor prolongación del INR, más activación plaquetar y mayor trombocitopenia.

Encontramos también, una correlación negativa entre las cifras de la hemoglobina y los agregados leucoplaquetares; es decir, en aquellos pacientes con mayor porcentaje de agregados leucoplaquetares, los niveles de hemoglobina son menores.

4.1.11. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y DISFUNCIÓN ORGÁNICA

Cuando analizamos la correlación entre la activación de los diferentes marcadores plaquetarios y el grado de disfunción orgánica de cada uno de los 6 órganos estudiados, hallamos diferentes grados de correlación, que mostramos en la tabla 13.

	cardio-vascular	coagulación	respiratorio	renal	hígado	SNC	SOFA GLOBAL
ALP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AP	r=0.37 p<0.05	r=0.50 p<0.01	r=0.27 p<0.05	r=0.41 p<0.05	r=-0.65 p<0.01	r=0.30 p<0.05	r=0.55 p<0.01
PAC-1-PL	r=0.35 p<0.05	r=0.45 p<0.01	ns	r=0.30 p=0.05	ns	ns	r=0.42 p<0.05
PAC-1-AP	r=0.71 p<0.01	ns	ns	ns	r=0.48 p<0.01	r=0.64 p<0.01	r=0.64 p<0.01
PAC-1-T	r=0.49 p<0.01	r=0.41 p<0.05	r=0.33 p<0.05	r=0.34 p<0.05	r=0.51 p<0.01	r=0.45 p<0.01	r=0.58 p<0.01
CD62P-PL	r=0.36 p<0.05	r=0.39 p<0.01	ns	ns	ns	ns	r=0.40 p<0.05
CD62P-AP	r=0.67 p<0.01	ns	ns	ns	r=-0.36 p<0.05	r=0.64 p<0.01	r=0.63 p<0.01
CD62P-T	r=0.46 p<0.01	r=0.40 p<0.05	ns	r=0.41 p<0.05	ns	r=0.49 p<0.01	r=0.56 p<0.01

Tabla 13. Correlación entre marcadores de activación plaquetar y disfunción orgánica.

4.1.12. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y EVOLUCIÓN CLÍNICA

Si analizamos la relación existente entre los marcadores de activación plaquetaria estudiados y la evolución de los pacientes sépticos, encontramos que la mortalidad se asocia con un mayor grado de expresión del marcador PAC-1 ($p<0.05$), así como con la P-selectina ($p<0.05$) tanto en la población total de plaquetas, como en la subpoblación de plaquetas libres, no así al estudiar la subpoblación de plaquetas agregadas. Tampoco hemos encontrado una asociación entre mortalidad y agregados leucoplaquetares o agregados

plaquetares. Los resultados son los mismos cuando analizamos la mortalidad en el día 28 tras el inicio del cuadro séptico. El valor predictivo para la mortalidad obtenido con ambos marcadores tiene una potencia limitada; así la expresión de PAC-1 en la población global de plaquetas posee –para un punto de corte del 4%- una especificidad del 78% pero una sensibilidad del 50%, mientras la expresión de CD62P en la misma población global de plaquetas muestra –para un punto de corte del 6%- una especificidad del 61% y una sensibilidad del 57%.

4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO 2: “Modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes en la sepsis: análisis *in vitro* del papel regulador de las interleuquinas (IL) 1 β , 6 y 10, sobre dicha reactividad”

4.2.1. EFECTO DE LOS ERITROCITOS SOBRE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN INDIVIDUOS SANOS

Basándonos en el procedimiento experimental descrito en *Material y métodos* (3.2), estudiaremos en primer lugar cómo la función plaquetaria se puede modificar en función de los componentes celulares sanguíneos presentes en el experimento. Realizaremos el estudio, determinando el papel que tienen los hematíes sobre el reclutamiento plaquetario, y sobre la activación plaquetaria, medida ésta, cómo el porcentaje de serotonina liberada por las plaquetas del total que poseen sus gránulos. La cuantificación de serotonina liberada, la realizaremos por técnicas de radioinmunoensayo, lo que representa una modificación de la descripción inicial de la técnica que realizaba esta cuantificación por medio de marcaje isotópico de plaquetas con ^{14}C -serotonina.

4.2.1.1. Efecto de los eritrocitos sobre el reclutamiento plaquetario

Como hemos explicado previamente, en primer lugar estimulamos una muestra de plasma rico en plaquetas (PRP), con colágeno 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y posteriormente centrifugamos la muestra y recogemos el sobrenadante. Con dicho sobrenadante estimulamos el sistema de ensayo, formado por PRP, consiguiendo una respuesta proagregatoria. La intensidad máxima obtenida en los primeros 5 minutos tras la estimulación, expresada en forma de media y desviación estándar, resultó de 8.25 ± 3.34 . La estimulación con colágeno 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de una mezcla de plaquetas y glóbulos rojos, en proporciones fisiológicas, produce un incremento significativo en la capacidad proagregatoria de los sobrenadantes, obteniéndose una intensidad máxima de 26.58 ± 7.11 . Cuando la muestra estimulada es de sangre total, la capacidad proagregatoria obtenida es mayor a la obtenida con plaquetas solas, pero menor a

la obtenida exclusivamente con plaquetas y hematíes; los valores obtenidos para la intensidad máxima fueron 18.6 ± 10.24 . Los resultados proceden de 8 experimentos para cada tipo de sistema generador. Las diferencias entre los tres grupos estudiados son significativas, según se muestra en la figura 10. Además, el valor para la cuerda (*slope*) obtenida para las curvas de agregación, que se correlaciona con la velocidad de agregación, es significativamente mayor para la muestra de plaquetas y hematíes (50.5 ± 15), que para la muestra de sangre total (38.7 ± 13.5), y a su vez, ésta es mayor que la obtenida tras estimular plaquetas solas (17.5 ± 14.9).

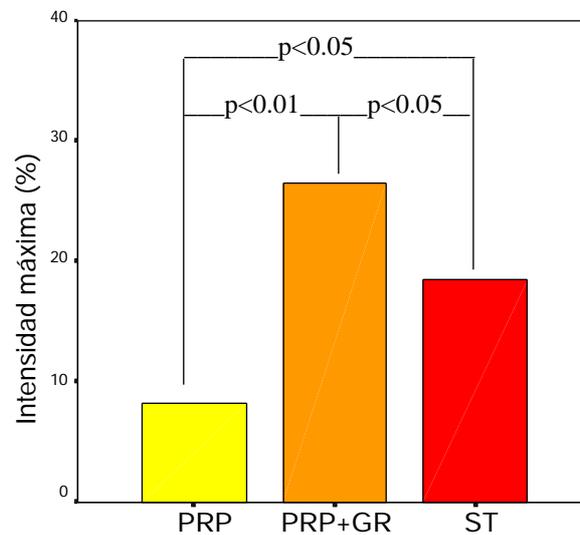


Figura 10. Estudio del reclutamiento plaquetario. Se muestra la diferente intensidad máxima de agregación obtenida tras estimular el sistema de ensayo con los sobrenadantes procedentes de los diferentes sistemas generadores. Observamos las diferentes capacidades proagregatorias de los estímulos, según procedan de una muestra compuesta sólo por plasma rico en plaquetas (PRP), por plaquetas y eritrocitos (PRP+GR), o por sangre total (ST). Los valores expresados corresponden al valor medio de la intensidad agregante máxima obtenida en la curva de agregación, expresada en porcentaje. (n=8)

Cuando se estimulan los sistemas de ensayo con plasma libre de células, o con sobrenadantes de eritrocitos, en ausencia de plaquetas, no se obtiene ninguna respuesta agregante, aunque se estimule el sistema generador con colágeno $1 \mu\text{g/ml}$. Asimismo,

cuando sustituimos el colágeno por su solvente – suero glucosado-, es decir, en ausencia de activación plaquetar, no encontramos actividad reclutadora en ningún caso.

4.2.1.2. Efecto de los eritrocitos sobre la activación plaquetaria

Para la valoración del efecto de los eritrocitos sobre la activación plaquetaria, determinamos el grado de liberación de serotonina, componente de los gránulos densos plaquetarios, descrito como un índice fiable de activación plaquetaria. Se prepararon los sistemas generadores según se describe en el apartado 3.2.3. de *Material y método*, conteniendo plaquetas solas, plaquetas y glóbulos rojos y sangre total, y se estimularon con colágeno 1 $\mu\text{g/ml}$. Una vez centrifugada la muestra, se extrajo el sobrenadante, del que se determinó la cantidad de serotonina por radioinmunoensayo. Dichos valores se compararon con el valor total de serotonina que contenían las muestras plaquetarias, obteniéndose tras lisar las plaquetas con tritón X-100. El valor de la serotonina, viene expresado en forma de porcentaje, es decir, el porcentaje de serotonina liberada del total de serotonina que poseen las plaquetas.

Los resultados obtenidos para la activación plaquetaria, son paralelos a los obtenidos para el reclutamiento plaquetario. El porcentaje de liberación de serotonina en el sobrenadante del sistema generador formado por plaquetas solas, fue de 26.44 ± 4.27 . Cuando el sistema generador lo constituía sangre total, los valores de serotonina eran significativamente superiores a los previos, resultando de 55.84 ± 9.72 . La liberación inducida por el sobrenadante de la muestra con plaquetas y glóbulos rojos resultó significativamente superior a las anteriores: 73.98 ± 5.58 . La figura 11 muestra las diferencias descritas, así como su grado de significación.

De forma adicional, los experimentos control que hemos realizado en ausencia de plaquetas, o en ausencia de colágeno, no han inducido ningún grado detectable de activación plaquetaria, lo cual pone de manifiesto que se requiere una activación plaquetar previa del sistema generador para que se produzca una modulación de la activación o reclutamiento plaquetario, por parte de los demás componentes de la sangre.

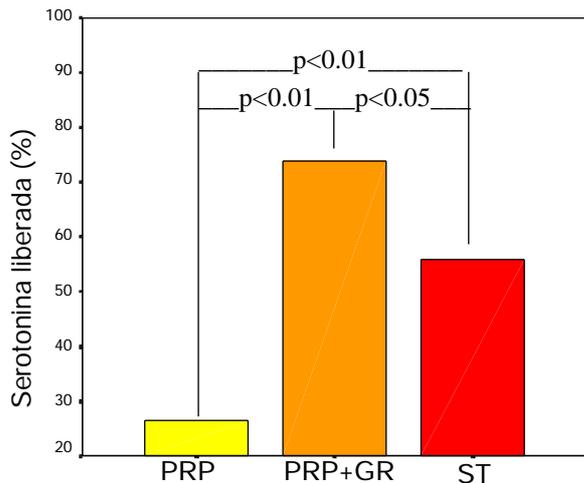


Figura 11. Estudio de la activación plaquetaria. Se muestra como la liberación de serotonina, índice de la activación plaquetaria, es significativamente mayor en el sobrenadante de sistemas generadores formados por plaquetas y eritrocitos, que en los formados por plaquetas solas o por sangre total. Por su parte, el sobrenadante de sistemas generadores formados por sangre total presenta más serotonina que los procedentes de plaquetas solas. (n=8)

Los resultados previamente expuestos indican que la interacción eritrocito-plaqueta produce un marcado incremento en la activación de las plaquetas, cuando valoramos ésta como liberación de serotonina. Por el contrario, parece que la presencia de leucocitos en reposo, inhibe la activación plaquetaria. Estos resultados demuestran que la interacción de las plaquetas con los otros elementos celulares de la sangre, modula la activación plaquetaria.

Nuestro protocolo de estudio, en el que la medición de la serotonina liberada se ha realizado mediante técnicas de radioinmunoensayo, ha obtenido valores comparables a los que se habían descrito para la medición de la serotonina marcada con ^{14}C en cámara de centelleo, lo que constituye una validación de esta aportación al sistema bifásico de estudio de la reactividad plaquetaria.

4.2.2. EFECTO DE LOS ERITROCITOS SOBRE LA REACTIVIDAD DE LAS PLAQUETAS EN INDIVIDUOS SÉPTICOS

Hemos estudiado un grupo de 7 pacientes con sepsis grave y un grupo de 7 pacientes con sepsis no grave, según se ha descrito en *Material y métodos*. Los estudios de agregación plaquetaria que se realizan previamente a los de reclutamiento para determinar

la integridad de las vías de activación plaquetarias, demostraron que en la mayoría de los pacientes estudiados existe una disminución en su capacidad de responder a los diferentes agonistas plaquetarios empleados –colágeno, ácido araquidónico, ADP-, presentando la mayor disminución en la respuesta al ácido araquidónico. Estos resultados traducen, fundamentalmente, los efectos de diferentes fármacos que los pacientes habían recibido previamente a la extracción de sangre, así el 100% habían recibido antibióticos, predominantemente -lactámicos, y un 74% habían recibido antitérmicos (AAS, AINEs o paracetamol), todos ellos fármacos que han sido descritos como inhibidores en diferentes grados del funcionalismo plaquetar. Por tanto hemos tenido que limitar el estudio a aquellos pacientes sépticos, cuya agregación frente a los agonistas descritos, se encontró dentro de los valores esperados para la normalidad.

Las muestras procedentes de pacientes sépticos, han mostrado unos valores para el reclutamiento plaquetario, similares a los que hemos encontrado en la población normal, de modo que el reclutamiento expresado como intensidad máxima de agregación, producido por el sobrenadante del sistema generador compuesto por plaquetas solas, ha sido de 7.33 ± 2.45 , mientras que el sobrenadante del sistema generador compuesto por plaquetas y eritrocitos ha producido una intensidad máxima de 23.83 ± 7.03 . Cuando analizamos el reclutamiento en función de que el paciente pertenezca al grupo de sepsis grave o al de sepsis no grave, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

Además, hemos estudiado el comportamiento de glóbulos rojos procedentes de pacientes sépticos, sobre sistemas generadores y de ensayo constituídos por plaquetas procedentes de donantes sanos (22.15 ± 6.35), no encontrando diferencias significativas con respecto al comportamiento de eritrocitos procedentes de donantes sanos (25.65 ± 5.89). Este subanálisis se ha realizado con hematíes procedentes de 5 pacientes sépticos.

4.2.3. EFECTO DE LAS INTERLEUQUINAS 1 β , 6 y 10 SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETAR

Hemos visto que el análisis de la función plaquetar en un proceso fisiopatológico complejo, como es la sepsis, está inmerso de múltiples dificultades metodológicas que impiden despejar múltiples variables que pueden artefactuar los resultados. En ausencia de un modelo animal de sepsis a nuestro alcance, que siempre podría ver limitados sus resultados al ámbito de especie, hemos optado por el estudio *in vitro*, para analizar el efecto de diferentes interleuquinas sobre la agregación plaquetaria, y sobre la modulación que los eritrocitos ejercen sobre el funcionalismo plaquetar.

Así, por haber sido descritas como parte del sistema de cascada inflamatoria, formando parte de un proceso evolutivo, las interleuquinas 1, 6 y 10, han sido testadas en su capacidad para modular la agregación plaquetaria. A continuación recogemos los resultados de dichos experimentos.

4.2.3.1. Interleuquina 1 β y agregación plaquetar

Tras incubar plasma rico en plaquetas (PRP) con dos concentraciones diferentes de interleuquina 1 (10, y 1000 ng/ml) durante 30 minutos, y posteriormente ser estimulados con ADP 3 μ M, realizando una agregometría clásica, no hemos observado diferencias entre la intensidad máxima de agregación de los dos grupos. Además, hemos estudiado un grupo control, de PRP incubado con el solvente de las interleuquinas –seroalbúmina humana libre de endotoxina-, que no ha presentado diferencias con los dos grupos anteriores en cuanto a su grado de agregación. Los resultados corresponden a la media y desviación estándar de 5 experimentos.

	Interleuquina 1 [ng/ml]		
	0	10	1000
I máxima de agregación (%)	58.2 \pm 3.49	58.2 \pm 3.11	59.6 \pm 3.78

Tabla 14. Interleuquina 1 β y agregación plaquetar. Se muestra que la incubación durante 30 minutos en concentraciones diferentes de IL-1, no modifica la respuesta agregante del PRP ante el agente inductor ADP. Los valores expresados de la intensidad máxima de agregación, corresponden a la media y desviación estándar; son el resultado de 5 experimentos en cada grupo.

4.2.3.2. Interleuquina 6 y agregación plaquetar

Cuando repetimos el experimento descrito previamente, pero realizando las incubaciones con interleuquina 6, hemos encontrado que ésta, si que modifica los resultados de la agregación plaquetaria. Así, las muestras de PRP incubadas con seroalbúmina humana, es decir, sin interleuquina, presentaron una agregación máxima de 61 ± 1.58 ; cuando la incubación se realizó con interleuquina 6 en una concentración de 10 ng/ml, los resultados para la intensidad máxima de agregación, fueron de 69.6 ± 4.77 , y para una concentración de IL-6 de 1000 ng/ml, se obtuvieron valores máximos de agregación, de 73.2 ± 5.97 . Las diferencias entre los tres grupos, resultaron significativas, según muestra la figura 12.

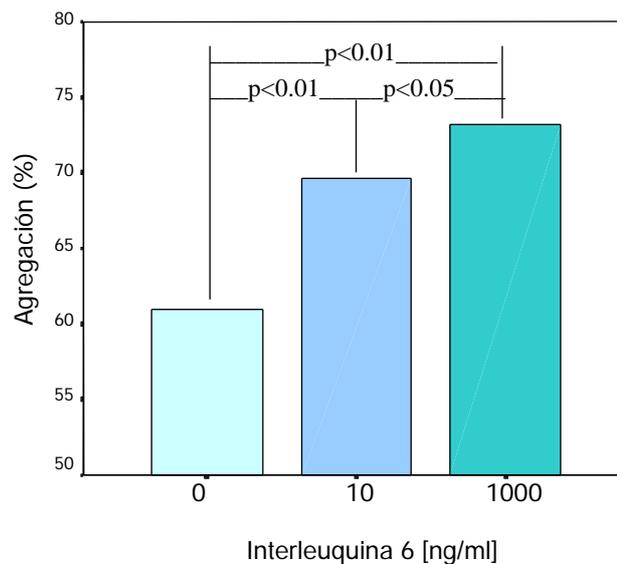


Figura 12. Interleuquina 6 y agregación plaquetar. Se muestra como la incubación previa durante 30 minutos con interleuquina 6, induce un aumento en la agregación máxima obtenida tras estimular las muestras de PRP con ADP 3 μ M. Este incremento es dosis-dependiente, aumentando con la concentración de IL-6. Los resultados se expresan en forma de media de 5 experimentos diferentes para cada concentración.

4.2.3.3. Interleuquina 10 y agregación plaquetar

También hemos valorado la capacidad de la interleuquina 10 para modificar el potencial proagregante de las plaquetas. Los resultados obtenidos han sido los siguientes: cuando se han estimulado plaquetas que no fueron incubadas con IL-10, la agregación máxima obtenida fue de 59.2 ± 2.17 ; si las plaquetas fueron incubadas con 10 ng/ml de IL-10, la intensidad máxima de agregación resultante fue de 58 ± 2.74 , y cuando la concentración de IL-10 en la incubación fue de 1000 ng/ml, el valor máximo de agregación resultó de 56.8 ± 1.92 . Se han valorado como diferencias estadísticamente significativas, aquellas existentes entre las agregaciones de las plaquetas basales sin IL-10, y aquellas obtenidas de plaquetas incubadas con una alta concentración de IL-10 (1000 ng/ml), siendo esta significación de $p < 0.01$.

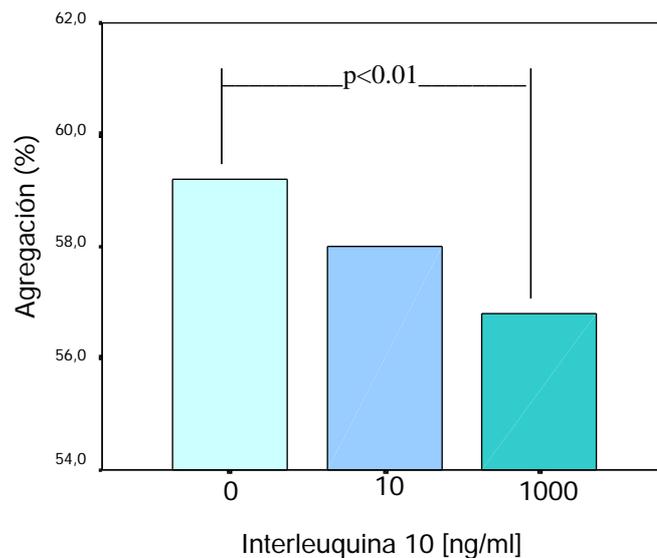


Figura 13. Interleuquina 10 y agregación. Se muestra como la incubación del PRP durante 30 minutos en una alta concentración de IL-10, genera una disminución significativa ($p < 0.01$) en la intensidad máxima de agregación obtenida, tras su estímulo con ADP 3 μ M. Los resultados expuestos corresponden a la media de 5 experimentos realizados para cada concentración de IL.

4.2.4. EFECTO DE LAS INTERLEUQUINAS 1 β , 6 y 10, SOBRE LA MODULACIÓN ERITROCITARIA DE LA REACTIVIDAD PLAQUETAR

Como hemos descrito previamente, la presencia de los eritrocitos induce un incremento en el potencial proagregatorio de las plaquetas. Este proceso se puede estudiar mediante el sistema experimental descrito en el apartado 3.2.5. de *Material y métodos*. A continuación describiremos el efecto de la incubación previa con las diferentes interleuquinas estudiadas sobre la capacidad proagregatoria de los glóbulos rojos.

4.2.4.2. Interleuquina 1 β y reactividad plaquetaria

Tras realizar la separación celular de la muestra de donantes sanos, hemos lavado los glóbulos rojos y a continuación los hemos incubado durante 30 minutos en interleuquina 1 a concentraciones de 10 ng/ml y 1000 ng/ml. Posteriormente los hemos lavado de nuevo, para eliminar la interleuquina que pudiera existir en suspensión, o adherida a la superficie celular, y que podría ejercer su efecto directo sobre las plaquetas. A continuación hemos empleado estos eritrocitos para formar los sistemas generadores, compuestos por plasma rico en plaquetas y eritrocitos. Una vez estimulados con colágeno 1 μ g/ml y centrifugados, recogemos una parte del sobrenadante para estimular el sistema de ensayo y estudiar así el reclutamiento plaquetario. No existen diferencias entre los valores obtenidos para el reclutamiento plaquetario, entre el grupo de experimentos en los que los glóbulos rojos habían sido incubados con IL-1 , y el grupo de los hematíes que no fueron incubados.

Asimismo, cuando estudiamos la serotonina liberada por el sistema generador, como índice de activación plaquetaria, tampoco encontramos diferencias entre las concentraciones de serotonina contenidas en los sobrenadantes de los sistemas generadores compuestos por PRP y eritrocitos no incubados con IL-1 , y los formados por PRP y eritrocitos incubados con IL-1 ; asimismo, tampoco existen diferencias entre los sistemas generadores compuestos por eritrocitos incubados con diferentes concentraciones de IL-1 . Los resultados son producto de 5 experimentos, y se exponen en la figura siguiente:

	Interleuquina 1 [ng/ml]		
	0	10	1000
Reclutamiento (I_{\max}) %	21.40 \pm 2.97	25.00 \pm 3.93	22.2 \pm 3.27
Activación (5-HT) %	75.12 \pm 15.68	78.65 \pm 13.24	77.71 \pm 11.28

Tabla 15. Interleuquina 1 β y modulación de la actividad protrombótica del hematíe. Se muestra como la incubación de los hematíes con IL-1, no modifica de forma significativa la modulación positiva que ejercen dichos hematíes sobre la reactividad plaquetaria, tanto en el análisis del reclutamiento, como en el de la activación plaquetaria medida como el porcentaje de liberación de serotonina. Los valores no mostrados para reclutamiento y activación promovidos por el PRP, sin la presencia de hematíes, son para el reclutamiento 9.6 \pm 3.44 %, y para la activación de 49.23 \pm 11.37 %. Los resultados expuestos, corresponden a la media y desviación estándar para 5 experimentos.

4.2.4.2. Interleuquina 6 y reactividad plaquetaria

Cuando procedemos a valorar la capacidad de la interleuquina 6 para modular el potencial proagregante de los eritrocitos, observamos que la incubación previa de los eritrocitos durante 30 minutos con IL-6, induce una inhibición de su capacidad protrombótica, para cualquiera de las concentraciones de IL-6 estudiadas (10 y 1000 ng/ml), tanto para los estudios de reclutamiento como para los de activación plaquetaria.

Así, cuando el sistema generador está formado sólo por PRP, obtenemos un reclutamiento (%) de 8 \pm 2.5; cuando está formado por PRP + glóbulos rojos que no fueron incubados, el reclutamiento fue de 20.4 \pm 2.3; cuando los hematíes estuvieron incubados con IL-6 a una concentración 10 ng/ml, el reclutamiento resultó de 10 \pm 3.5; y para concentraciones de IL-6 de 1000 ng/ml, los valores para el reclutamiento fueron de 10.5 \pm 4.6.

Las diferencias resultaron significativas según se muestra en la figura 14.

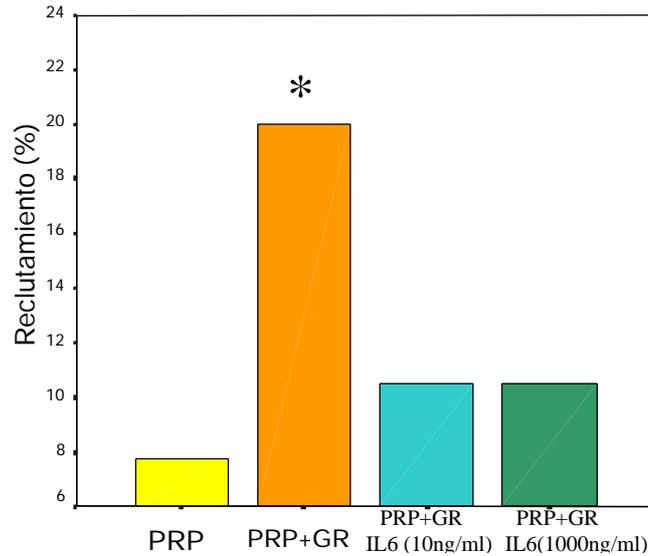


Figura 14. Interleuquina 6 y reclutamiento plaquetario. Se puede observar como la presencia de la IL-6 en sus diferentes concentraciones (10 y 1000 ng/ml), induce una inhibición del potencial proagregante de los eritrocitos. En la primera barra se muestra el reclutamiento inducido tras estimular un sistema generador compuesto sólo pro plaquetas. Al agregar hematíes, se dispara de forma significativa ($p < 0.05$) el reclutamiento plaquetario, traduciendo el potencial proagregante de los eritrocitos, como se puede ver en la segunda barra. En la tercera y cuarta barras, se muestra como la presencia de eritrocitos que habían sido incubados en IL-6, en los sistemas generadores, induce una respuesta significativamente menor a la de los eritrocitos sin incubados. Los resultados expresan la media de 5 experimentos.

Cuando analizamos el efecto de los eritrocitos incubados con IL-6, sobre la activación plaquetaria, valorada en función de la liberación de serotonina por parte de las plaquetas, observamos un efecto paralelo al detectado en el reclutamiento. Así, cuando el sistema generador está formado sólo por PRP, obtenemos un porcentaje de liberación de serotonina de 50.48 ± 9.27 %; cuando está formado por glóbulos rojos que no fueron incubados, la activación plaquetaria fue de 77.6 ± 13 %; cuando los hematíes estuvieron incubados con IL-6 a una concentración 10 ng/ml, la activación resultó de 50.86 ± 16.77 %; y para concentraciones de IL-6 de 1000 ng/ml, los valores para la activación fueron de 51.66 ± 13.57 %. Las diferencias resultaron significativas según se muestra en la figura siguiente.

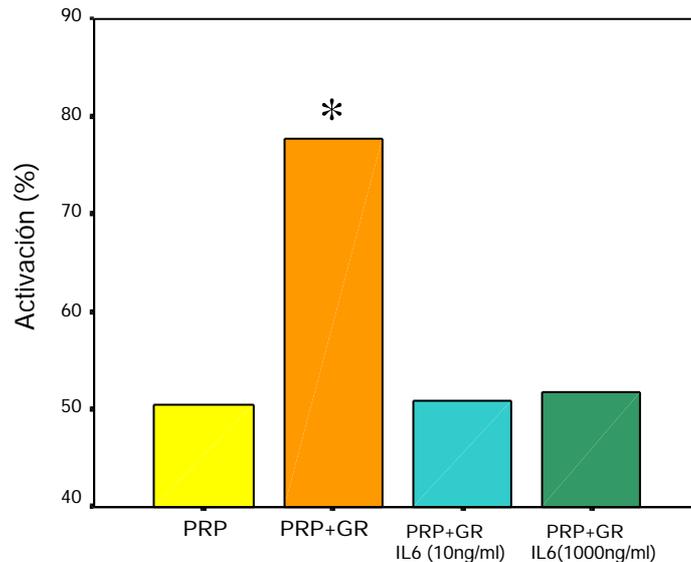


Figura 15. Interleuquina 6 y activación plaquetaria. Se puede observar como la presencia de la IL-6 en sus diferentes concentraciones (10 y 1000 ng/ml), induce una inhibición del potencial proagregante de los eritrocitos. En la primera barra se muestra la activación inducida tras estimular un sistema generador compuesto sólo por plaquetas. Al añadir hematíes, se dispara de forma significativa la activación plaquetaria, traduciendo el potencial proagregante de los eritrocitos, como se puede ver en la segunda barra. En la tercera y cuarta barras, se muestra la inhibición que la IL-6 ejerce sobre la capacidad proagregatoria de los hematíes, obteniendo valores similares a los del PRP. La diferencia entre la activación inducida por PRP+GR sin incubación, en comparación con los otros tres grupos, resultó significativa ($p < 0.05$). Los resultados expresan la media de 5 experimentos.

Como acabamos de describir, la interleuquina 6, interfiere en la agregación plaquetaria por dos mecanismos: ejerce una acción directa sobre las plaquetas, modulando positivamente su agregación ante un estímulo inductor (ADP), y por otra vía, ejerce un papel inhibitorio, al modular negativamente la capacidad proagregante de los hematíes, como pudimos determinar analizando la activación y el reclutamiento plaquetarios.

4.2.4.3. Interleuquina 10 y reactividad plaquetaria

Hemos descrito previamente como la interleuquina 10, a altas dosis (1000 ng/ml), ejerce un papel inhibitorio de la agregación plaquetaria. A continuación referiremos los

resultados obtenidos tras estudiar el efecto que esta interleuquina tiene sobre la capacidad proagregatoria de los eritrocitos. Analizando el reclutamiento (%) obtenido por el sistema generador formado exclusivamente por PRP, éste fue de $8,6 \pm 3.56$; cuando añadimos eritrocitos al sistema generador, éste reclutamiento aumenta al 22.56 ± 3.67 ; si los eritrocitos empleados fueron incubados previamente en IL-10, el reclutamiento obtenido fue de 24.8 ± 4.93 si la concentración de IL-10 era 10 ng/ml, y de 21.34 ± 3.95 si la concentración de IL-10 era de 1000 ng/ml. Las diferencias entre las muestras incubadas con IL-10, y las no incubadas, no resultaron significativas.

	Interleuquina 10 [ng/ml]		
	0	10	1000
Reclutamiento (I_{\max}) %	22.56 ± 3.67	24.80 ± 4.93	21.34 ± 3.95
Activación (5-HT) %	76.22 ± 12.68	70.35 ± 11.45	74.81 ± 9.22

Tabla 16. Interleuquina 10 y modulación de la actividad protrombótica del eritrocito. Se muestra como la incubación de los hematíes con IL-10, no modifica de forma significativa la modulación positiva que ejercen dichos hematíes sobre la reactividad plaquetaria, tanto en el análisis del reclutamiento, como en el de la activación plaquetaria medida como el porcentaje de liberación de serotonina. Los valores no mostrados para reclutamiento y activación promovidos por el PRP, sin la presencia de hematíes, son para el reclutamiento 8.6 ± 3.56 %, y para la activación de 47.33 ± 12.87 %. Los resultados expuestos, corresponden a la media y desviación estándar para 5 experimentos.

Similares resultados se han obtenido al determinar la activación plaquetaria en función de la serotonina liberada en los sistemas generadores. Cuando éstos estaban formados por PRP exclusivamente, la activación (%) fue del 47.33 ± 12.87 ; si añadimos eritrocitos al sistema generador, la activación aumenta a 76.22 ± 12.68 ; si los eritrocitos empleados fueron previamente incubados en IL-10 con concentraciones 10 y 1000 ng/ml, los resultados obtenidos para la activación, fueron de 70.35 ± 11.45 , y 74.81 ± 9.22 respectivamente. Las diferencias entre las muestras de PRP con eritrocitos incubados o no incubados con IL-10, no fueron significativas. Los resultados expresan la media y desviación estándar de 5 experimentos.

Por tanto, así como hemos descrito que la IL-10 a altas concentraciones (1000 ng/ml) ejerce un efecto inhibitor de la agregación plaquetaria, no hemos podido describir un mecanismo indirecto de modulación de la reactividad plaquetaria a través de los eritrocitos, por parte de la IL-10.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. MARCADORES DE SUPERFICIE DE ACTIVACIÓN PLAQUETAR EN LA SEPSIS GRAVE: EXPRESIÓN DE PAC-1 Y DE P-SELECTINA

Uno de los objetivos de nuestro estudio ha sido evaluar el grado de expresión del marcador de activación de la superficie plaquetar, receptor del fibrinógeno GP IIb-IIIa activado (PAC-1), y del marcador de secreción plaquetar perteneciente a la membrana de los gránulos- α , P-selectina (CD62p), en pacientes con sepsis grave y síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), así como su relación con parámetros clínicos, analíticos y evolutivos.

Nuestros resultados demuestran que las plaquetas de los pacientes con sepsis grave expresan el marcador de activación plaquetar PAC-1 en una proporción 4 veces superior al mostrado por los pacientes con sepsis no grave, los cuales presentaban un grado de expresión de PAC-1 similar al grupo de pacientes control. Al valorar las subpoblaciones de plaquetas, observamos que en la subpoblación de agregados plaquetares, el grado de expresión del receptor del fibrinógeno resultó 3 veces superior al que presentan la plaquetas de la subpoblación de plaquetas libres.

Tanto el grado de expresión de PAC-1 de la población global de plaquetas como el de las subpoblaciones de plaquetas libres y de plaquetas agregadas se correlacionó con el grado de disfunción multiorgánico medido según el *score* SOFA.

Hemos detectado una correlación positiva entre la expresión de PAC-1 y el porcentaje de agregados plaquetares, tanto al analizar la expresión de PAC-1 en la población global de plaquetas, como sus subpoblaciones de plaquetas libres y de plaquetas agregadas. También se encontró una correlación positiva entre la expresión del receptor del fibrinógeno y el porcentaje de agregados leucoplaquetares, pero sólo al analizar la subpoblación de plaquetas agregadas.

Hemos encontrado una correlación positiva entre el grado de expresión de plaquetas PAC-1 positivas y el índice de gravedad APACHE II, y como hemos descrito, con el grado de disfunción multiorgánica determinado por el *score* SOFA. Si realizamos el análisis según los órganos disfuncionantes, la expresión de PAC-1 en la población total de plaquetas, se ha correlacionado con el fracaso de cada uno de los órganos analizados. También esta correlación positiva se ha encontrado entre el grado de expresión de PAC-1 en la población global de plaquetas y en la subpoblación de plaquetas libres, y la mortalidad.

Con respecto al marcador de activación P-selectina, nuestro estudio ha encontrado que las plaquetas de los pacientes con sepsis grave expresan dicho antígeno en una proporción 2.5-3.5 veces superior al expresado por los pacientes con sepsis no grave, los cuales presentan un grado de expresión similar a los pacientes del grupo control. Al valorar la subpoblación de agregados plaquetares, el grado de expresión de P-selectina resultó 3 veces superior al mostrado por la subpoblación de plaquetas libres.

Tanto el grado de expresión de P-selectina de la población global de plaquetas como el de las subpoblaciones de plaquetas libres y de plaquetas agregadas se correlacionó con el grado de disfunción multiorgánico medido según el *score* SOFA.

Existe una correlación positiva entre el grado de expresión de P-selectina y el grado de expresión del receptor activado del fibrinógeno (PAC-1) en nuestra serie, cuando estudiamos la población global de plaquetas y la población de plaquetas agregadas. Hemos detectado una correlación positiva entre la expresión de P-selectina y el porcentaje de agregados plaquetares, tanto al analizar la población global de plaquetas, como sus subpoblaciones de plaquetas libres y de plaquetas agregadas. La misma correlación positiva se encontró entre el porcentaje de agregados leucoplaquetares y el PAC-1, pero sólo al analizar la subpoblación de plaquetas agregadas.

Hemos detectado una correlación positiva entre el grado de expresión de plaquetas CD62P positivas y el índice de gravedad APACHE II, así como respecto al grado de

disfunción multiorgánica determinado por el *score* SOFA. Analizado por órganos disfuncionantes, encontramos que el marcador CD62P, se asocia con la disfunción cardiovascular, de la coagulación, renal, hepática y del SNC.

Con respecto a la cifra de plaquetas, describimos una correlación negativa entre ésta y el porcentaje de plaquetas P-selectina positivas, ocurriendo lo mismo con el PAC-1. Es decir, los pacientes con mayor porcentaje de plaquetas P-selectina positivas o PAC-1 positivas, son aquellos con una trombocitopenia más acusada.

Los métodos de citometría de flujo actualmente disponibles, como el utilizado en nuestro estudio, nos informan de porcentajes de células positivas para un marcador, o lo que es lo mismo, nos aportan un recuento relativo de células positivas. De forma interesante, Matzdoff *et al.* describieron un método para determinar recuentos absolutos de células positivas para un marcador. Estudiaron como en experimentos *in vitro* sobre muestras de sangre total activada con trombina, ocurrió un descenso en la cifra de plaquetas de un 20 % sobre el valor inicial, con un aumento en el número relativo de plaquetas CD62P positivas, mientras se detectó un descenso del recuento absoluto de plaquetas CD62P positivas. El método empleado para determinar los números absolutos de plaquetas se basa en el empleo de esferas fluorescentes en la citometría de flujo, aplicando el ratio esfera-plaqueta para cuantificar las plaquetas libres, las plaquetas activadas y los agregados plaquetares. La explicación de este autor, es que a mayor grado de activación plaquetar, determinado en su experimento por la P-selectina, mayor tendencia existe a la formación de agregados plaquetares, y las plaquetas libres disminuirán en la circulación sanguínea (271).

Si asumimos estos hallazgos para interpretar nuestros resultados, observamos que en nuestra serie ocurre un aumento de las plaquetas P-selectina positivas, que posiblemente traduce un descenso en el número absoluto de las mismas, debido a que estas plaquetas activadas que dejamos de detectar pasarían a formar parte de agregados plaquetares cuya expresión, como hemos descrito, se encuentra aumentada.

Aunque, tras los hallazgos descritos previamente, pudiera parecer que el comportamiento de ambos marcadores (PAC-1 y P-selectina) pudiera solaparse, existen diferencias en la expresión de dichos antígenos. Si bien de forma global hemos detectado una correlación positiva entre los niveles de plaquetas PAC-1 positivas y las plaquetas P-selectina positivas, en algunos casos ha ocurrido una activación predominante de la P-selectina, mientras que en otros casos ha sido el PAC-1 el marcador mayoritariamente activado.

La interpretación para estos hallazgos es multifactorial, pero principalmente creemos que es un resultado de la especificidad de estímulo que ha sido reportada para diferentes marcadores de activación plaquetar. Así, la variable combinación de agonistas/inhibidores plaquetares que se presentan en una situación fisiopatológica determinada, modulará la expresión de determinados antígenos de superficie plaquetar.

Entre otros ejemplos bien documentados de la especificidad de estímulo, Alberio y Dale estudiaron el análisis de la activación plaquetaria por CMF tras el estímulo con diferentes tipos de colágeno presentes en la pared vascular, encontrando lo siguiente: los colágenos tipo I, III, V y VI, indujeron la secreción de los gránulos alfa e incrementaron la expresión de la GP IIb-IIIa, en contraste, el colágeno tipo IV no indujo esta respuesta en las mismas concentraciones. La curva dosis-respuesta para la secreción de gránulos alfa indicó que los colágenos I y III eran menos efectivos que los V y VI, y además, la capacidad de dichos colágenos para activar al GP IIb-IIIa fue aún más heterogénea, siendo inducida únicamente por los colágenos I y VI. Estos datos demuestran que la secreción de los gránulos alfa en las plaquetas humanas, es un proceso diferente de la activación del GP IIb-IIIa, y fuertemente dependiente del estímulo empleado (272).

Aunque existe una correlación positiva entre PAC-1 y P-selectina, los porcentajes de expresión de la P-selectina son frecuentemente superiores a los de PAC-1 en nuestra serie. En cualquier caso, aunque inicialmente los valores son menores para el PAC-1, cuando se produce una activación plaquetar, el incremento de la expresión de PAC-1, es mayor que el de la P-selectina, pudiendo asumir que el PAC-1 es un marcador más

sensible, pues a similares grado de estímulo, presenta un mayor aumento en su grado de activación.

Holmes *et al.* estudiaron la diferencia entre los umbrales de activación para la P-selectina y para la expresión de PAC-1 por CMF en sangre total, estimulada con ADP y con TRAP, encontrando que la inducción de la unión del fibrinógeno por el ADP, se encontró que es un evento de activación con bajo umbral (40% de plaquetas se unían al fibrinógeno marcado con FITC en respuesta a ADP 0.2 μM), mientras que la degranulación es un evento con un umbral mayor (33% de plaquetas expresan la P-selectina tras ADP 1 μM). El tipo de patología presente y el efecto de diferentes fármacos interfiere en los resultados, así, en pacientes con síndromes coronarios agudos y en tratamiento con AAS, encontraron un aumento de la expresión de P-selectina en respuesta al ADP, comparado con individuos sanos que recibieron AAS (273).

En otro estudio, Ruf *et al.* comparan el cambio de forma plaquetar, la unión al fibrinógeno (PAC-1) y la expresión de P-selectina, tras la estimulación con ADP y U-46619, encontrando que la EC_{50} para el cambio de forma es 4 veces menor que la EC_{50} para la unión al fibrinógeno, y 29 veces menor que para la expresión de P-selectina. Estos datos demuestran que el cambio de forma es un indicador de activación plaquetar más sensible que la unión al fibrinógeno, y éste es más sensible que la expresión de P-selectina. Además tanto la unión al fibrinógeno como el cambio de forma son procesos reversibles, siendo la expresión de PAC-1 el proceso que revierte de forma más precoz. Por otra parte, se ha descrito que la expresión de P-selectina tras la estimulación con U 46619 y con trombina, es irreversible, por lo que ha sido llamado el *marcador memoria*, y se ha propuesto como el de mayor utilidad en los estudios clínicos (176).

Esta precoz reversibilidad del PAC-1, con respecto a la irreversibilidad en la expresión de la P-selectina, podría en parte explicar nuestros hallazgos. El descenso de la presencia de células PAC-1 positivas a medida que se produce un retraso en el análisis de la muestra, podría estar en relación también con la ausencia de fijación. Desde el momento en el que hemos decidido no aplicar un fijador a la muestra, hemos optado por un análisis

citométrico precoz para evitar una activación plaquetar espúrea. En cualquier caso, asumimos que al no aplicar fijación, seguramente perdemos al menos parte de la expresión del receptor del fibrinógeno.

Hay que tener en cuenta, que el tiempo de expresión que diferentes antígenos plaquetarios pueden permanecer en la superficie de la membrana plaquetar *in vivo*, aún no ha sido adecuadamente determinado, y la sensibilidad para determinar la activación plaquetar en los diferentes cuadros clínicos, es materia de debate, asumiéndose que los diferentes marcadores tienen diferentes potenciales para monitorizar la activación plaquetar.

Como han revisado recientemente Escolar *et al.* hay que tener en cuenta además, que la presencia de anticoagulante, así como las condiciones de ausencia de flujo o agitación en que se ha desarrollado el experimento, hacen difícil la extrapolación a determinados contextos clínicos de los estudios plaquetarios *in vitro* (274).

Otro aspecto a considerar que podría artefactuar los resultados, es la elección de los fluorocromos. Así, el solapamiento de espectros de emisión entre pares de fluorocromos tales como FITC y PE, sólo es parcialmente compensado por el software empleado. Esto podría llevar a que se produjeran artefactos significativos en la cuantificación de antígenos expresados en bajo número por plaqueta, especialmente cuando se miden simultáneamente con antígenos presentes en alta densidad. En la mayoría de los citómetros, relativamente más cantidad de emisión FITC caerá en el canal PE que lo contrario. Por tanto, el canal FITC debe ser elegido para la cuantificación de antígenos expresados muy débilmente (238;246). En nuestro estudio hemos seguido estas recomendaciones, al combinar el PAC-1-FITC con el CD62P-PE, por lo que no creemos que los resultados obtenidos pudieran ser parcialmente artefactuados por la elección de fluorocromos.

En nuestra serie existe una correlación positiva entre la expresión de P-selectina y de PAC-1 en las plaquetas de la población global, así como en la subpoblación de plaquetas agregadas. Asimismo, se mantiene la correlación positiva entre ambos antígenos de

activación y la variable agregados plaquetares. La interacción plaqueta-plaqueta es dependiente de las glicoproteínas expuestas en la membrana plasmática plaquetaria; el receptor del fibrinógeno forma parte fundamental en la coagregación plaqueta-plaqueta, mientras que la P-selectina se ha descrito como un pivote de la unión plaqueta-leucocito. Por lo que respecta a los agregados leuco-plaquetares, éstos solo se correlacionan con los marcadores PAC-1 y CD62P expresados en la subpoblación de plaquetas agregadas, traduciendo que sólo cuando existe una elevada expresión de dichos marcadores, ocurrirá una formación de agregados leuco-plaquetares.

Los mecanismos inflamatorios sistémicos en la sepsis son consecuencia de una infección severa y contribuyen al desarrollo del síndrome de disfunción multiorgánica. Las plaquetas están involucradas en la defensa inflamatoria inespecífica, y la activación del sistema plaquetario puede jugar un papel en la patogénesis del SDMO. La función plaquetaria y su interacción con otras células inflamatorias es fuertemente dependiente de las glicoproteínas expuestas en la superficie de las plaquetas activadas. El receptor inducible del fibrinógeno juega un papel central en la agregación plaquetaria. Durante la agregación, las plaquetas se degranulan y expresan múltiples glicoproteínas almacenadas en sus gránulos en su superficie, que van a mediar la interacción plaquetaria con otras células. Se ha sugerido que las GP de membrana plaquetarias pueden jugar un papel importante en el desarrollo del SDMO en la sepsis.

Gawaz *et al.* se han interesado por la aplicación de la citometría al estudio de las plaquetas en la sepsis, analizando cambios en las GP de membrana de las plaquetas circulantes, así como la adhesión de las plaquetas a los neutrófilos, y a células endoteliales cultivadas, en los pacientes sépticos. Los resultados sugieren mecanismos de alteración de la microcirculación, mediado por plaquetas, en el SDMO de pacientes sépticos que podrían apuntar a futuras terapias antiinflamatorias específicas (275).

Evaluaron estos autores la función adhesiva de plaquetas en pacientes con SDMO y su relación con el pronóstico clínico. Los mayores hallazgos fueron los siguientes: 1. las plaquetas se encuentran activadas en los pacientes sépticos pero una degranulación

significativa, detectada por la trombospondina (TSP), sólo fue encontrada cuando existía SDMO. 2. La adhesión plaqueta-neutrófilo se encuentra aumentada en pacientes con septicemia, pero disminuye dependiendo de la severidad del SDMO. 3. El plasma de los pacientes con SDMO séptico, sensibiliza a las plaquetas normales a hiperagregar y a adherirse a las células endoteliales cultivadas. 4. La inmunofluorescencia-CD41 específica de las plaquetas en los neutrófilos, es un factor independiente predictor de mala evolución clínica, en los pacientes sépticos. Estos datos implican que las plaquetas se encuentran activadas en el curso de la sepsis. Los resultados que involucran a los leucocitos, los analizaremos en su apartado correspondiente, limitándonos aquí a analizar los resultados sobre marcadores de superficie (275).

Describieron también, que el receptor activado para el fibrinógeno se encontraba significativamente aumentado en los pacientes sépticos. Ya que el receptor para el fibrinógeno está presente exclusivamente en la superficie de la plaqueta activada, estos hallazgos significan que las plaquetas se activan en el curso de la sepsis y circulan en un estado hiperagregable. Además, encontraron que los pacientes sépticos con SDMO mostraron un aumento en la expresión de superficie de TSP, lo cual implica que junto con la TSP, las plaquetas liberan productos vasoactivos tales como metabolitos del ácido araquidónico, agentes quimiotácticos o factores relacionados con las citoquinas, los cuales, han mostrado jugar un papel en los mecanismos de defensa inflamatoria (275).

Nosotros hemos detectado una activación plaquetar (PAC-1) y una secreción plaquetar (P-selectina) en pacientes con sepsis grave, correlacionándose ambos marcadores con el grado de SDMO según el *score* SOFA. Como hemos explicado, aunque inicialmente los valores son menores para el PAC-1, cuando se produce una activación plaquetar, el incremento de la expresión de PAC-1, es mayor que el de la P-selectina, pudiendo asumir que ésta es el PAC-1, es más sensible, pues a similares niveles de estímulo, presenta un mayor aumento en su grado de activación.

Por otro lado nuestros resultados sobre la secreción plaquetar no son comparables a los de Gawaz *et al.* ya que la trombospondina que emplean como marcador de secreción de

los gránulos- , no presenta siempre un comportamiento paralelo a la P-selectina empleado por nosotros.

El método descrito por estos autores empleando la citometría de flujo sobre muestras de PRP, puede haber infraestimado la activación plaquetaria en pacientes sépticos. Como sabemos la trombosis es un fenómeno multicelular en el que la interacción entre células sanguíneas modula el potencial proagregatorio final de las plaquetas. Por tanto el método de citometría de flujo en sangre total que hemos aplicado en nuestro estudio, ofrece unos resultados más reales, por que tiene en cuenta el diálogo intercelular en el proceso trombótico. Aún traduciendo de forma más exacta la situación *in vivo*, a la citometría de flujo en sangre total para el estudio del proceso trombótico podríamos criticarle el no tener en cuenta la presencia de un elemento celular indispensable en la trombosis, que es la célula endotelial.

Los sujetos controles del trabajo de Gawaz *et al.* son individuos sanos, a los que se le extrae una muestra de sangre venosa, mientras que a los sujetos de estudio, se les ha obtenido una muestra arterial para su análisis citométrico, comparándose ambos resultados (275). Se ha descrito recientemente, que la citometría de flujo detecta en individuos sanos un mayor grado de activación plaquetar en muestras arteriales que en muestras venosas, en relación a las condiciones de *shear* inducidas por los flujos de los diferentes sistemas circulatorios, arterial y venoso, por lo que no se deben asumir los resultados de muestras obtenidas de diferentes orígenes (276). Nuestro estudio ha valorado en todos los casos muestras procedentes de sangre venosa; no se han descrito diferencias en la activación plaquetar en las muestras venosas procedentes de catéteres periféricos o de vías venosas centrales.

En el presente estudio, al igual que en el nuestro, sólo se realizó una determinación en el día del ingreso para estudiar la función plaquetaria. Determinaciones seriadas en diferentes momentos, podría ayudar a detectar cambios precoces en la función plaquetaria cuando se sospeche sepsis.

De acuerdo con lo escrito en la literatura, en nuestro estudio hemos observado que obtenemos una mayor sensibilidad de la CMF cuando empleamos el análisis de porcentajes de células positivas. Cuando determinamos la intensidad de fluorescencia media (IFM) para cada subpoblación –no se muestran los datos- la sensibilidad del ensayo disminuye, adquiriendo la diferencia entre grupos una menor significación.

Los resultados de nuestro estudio han encontrado una correlación positiva entre la presencia de los marcadores de activación descritos previamente - PAC-1 y P-selectina-, con el índice de gravedad de los pacientes medido con la escala APACHE II, y con el grado de disfunción multiorgánica medido con el *score* SOFA. Una de las variables analíticas medidas, el INR, que se encuentra prolongado en la coagulación intravascular diseminada, también se ha relacionado con el grado de activación plaquetar. El alargamiento del INR en pacientes sépticos con CID, se debe fundamentalmente a un consumo de factores de la coagulación, secundario a una activación excesiva inicialmente de la vía extrínseca, mediada por el factor tisular (TF) y el factor XII de Hageman, que se amplifica posteriormente con la activación de la vía intrínseca a través de los sistemas de contacto, activados a su vez por la endotoxina. Nuestros resultados apoyan que la activación de la coagulación se correlaciona con la activación plaquetar, siendo los pacientes con mayor grado de CID, los que han presentado una mayor expresión de marcadores de activación de superficie plaquetar.

La disfunción cardiovascular y la renal, se han asociado con una mayor expresión de los marcadores: agregados plaquetares, PAC-1 y CD62P, mientras que la disfunción respiratoria se ha correlacionado con un incremento en la expresión de agregados plaquetares y PAC-1. De forma interesante, la expresión de P-selectina y de PAC-1 se han correlacionado con la mortalidad, otorgándoles un valor predictivo moderado.

Especulamos con otros autores, que el atrapamiento de microagregados celulares puede alterar severamente la perfusión orgánica, siendo un importante paso en el desarrollo del SDMO. Esta especulación está sostenida por la observación morfológica de agregación

plaquetaria masiva, y presencia de leucocitos en la microcirculación en el tejido pulmonar de pacientes con SDRA, el órgano más afectado en el SDMO (4).

Recientes estudios sugieren que la liberación de gránulos alfa se asocia con un aumento en la formación de agregados plaquetares irreversibles y con un aumento del aclaramiento plaquetar, indicando que las plaquetas activadas no permanecen en la circulación sino que algunas son aclaradas de forma activa (277). Es más, las subpoblaciones plaquetarias que expresan un alto número de P-selectina en su superficie pueden ser aclaradas más fácilmente de la circulación. Así, durante el curso de la sepsis se produce una activación plaquetaria y una degranulación que puede alterar la microcirculación y la perfusión orgánica a través de la formación de microagregados plaquetares que quedarían atrapados en la microvasculatura (277).

La degranulación plaquetar, incluye la liberación de sustancias vasoactivas de origen plaquetar (metabolitos del ácido araquidónico, serotonina, ATP...) que pueden agravar aún más la disfunción microcirculatoria y el desarrollo de la disfunción orgánica.

La P-selectina puede liberarse de la superficie plaquetar y transformarse en P-selectina soluble, detectable en plasma. La P-selectina no sólo se encuentra en las plaquetas, sino que también es producida por el endotelio. Un estudio reciente, indica que la P-selectina soluble procede fundamentalmente de las plaquetas, por lo que podría emplearse como un marcador de activación plaquetar. Se ha propuesto un papel para esta P-selectina soluble como molécula de adhesión intercelular (88;89).

Matzdorff *et al.* ha comparado diferentes métodos de análisis de la función plaquetar, la agregometría óptica convencional, con el análisis de la β -TG empleado con fines de investigación, y el más reciente de la citometría de flujo. El análisis de la β -TG depende esencialmente de la calidad de la colección de la muestra, y estas muestras deben ser manipuladas con extremo cuidado para evitar la activación plaquetar *ex vivo*. Esto ha limitado su aplicación universal en la práctica clínica de rutina. Aún más, los niveles plasmáticos de β -TG representan únicamente una respuesta intermedia de todas las

plaquetas y no provee información sobre las subpoblaciones plaquetarias. Igualmente la agregometría sólo detecta una respuesta media de la población total de plaquetas. La citometría de flujo presenta la ventaja de que nos da datos a nivel de plaquetas individuales. Los resultados de este estudio, en el que se valoraba el marcador de superficie P-selectina, sugieren que el porcentaje de plaquetas con fluorescencia sobre un dintel determinado, se correlacionan mejor con la activación plaquetaria, que con la intensidad de fluorescencia media. Encontró que la liberación de β -TG es más rápida y más sensible a la estimulación con dosis bajas de trombina, que la expresión de P-selectina (278). Estos resultados son sorprendentes desde el momento en que la P-selectina está contenida en los gránulos alfa de las plaquetas. Esto puede ser explicado por un mecanismo de degranulación que no implica la fusión inmediata de los gránulos alfa con la membrana exterior de las plaquetas. Se ha demostrado que el sistema canalicular conectado a la superficie sufre cambios después de la estimulación de las plaquetas con la trombina. Estudios de secciones congeladas de plaquetas estimuladas sugieren que los gránulos alfa se funden con el sistema canalicular conectado con la superficie y liberan sus contenidos por esta vía (277).

Por tanto, la β -TG es un marcador más sensible de activación plaquetar que la expresión de P-selectina, pero la recolección de la muestra es muy compleja y la sangre debe ser manipulada con extremo cuidado. La CMF no es tan sensible como la β -TG pero la técnica parece menos susceptible a los artefactos *ex vivo*. La CMF hace posible estudiar subpoblaciones plaquetarias y correlacionar diferentes parámetros con los niveles de activación. Estas ventajas promueven su aplicación en la práctica clínica (278).

Aunque la agregometría óptica es un método bien establecido para valorar la función plaquetar, la expresión de P-selectina por citometría de flujo es un método más sensible para detectar niveles bajos de activación que la agregometría (278).

La técnica de citometría de flujo ha sido empleada para el estudio de la función plaquetar en múltiples patologías en las que interesa valorar el estado funcional de las plaquetas circulantes. Entre los marcadores de activación estudiados, han sido empleados

de forma predominante la P-selectina y el receptor del fibrinógeno activado o sus LIBS (*ligand induced binding sites*).

Existen diferentes circunstancias clínicas en las que existe un acuerdo en que los niveles de Gp IIbIIIa se encuentran elevados. Así, la exposición de individuos sanos a un ejercicio intenso, induce una presencia elevada de los niveles de Gp IIbIIIa según se detecta con citometría de flujo y el anticuerpo PAC-1 (279). Los estudios de plaquetas de pacientes urémicos indican que la presencia y distribución del Gp IIbIIIa en sus membranas plasmáticas bajo condiciones basales (antes de la hemodiálisis) no difiere de sujetos normales controles (280). A pesar de niveles normales, parece existir una alteración funcional a nivel de los receptores Gp IIbIIIa en estos pacientes urémicos, según se confirma por estudios de unión al ligando y estudios de perfusión (281). Una unión aumentada al fibrinógeno ha sido descrita en plaquetas de pacientes con fallo renal. La infusión de DDAVP a pacientes urémicos parece aumentar la presencia de formas activadas de Gp IIbIIIa en las plaquetas (282).

Diferentes estudios clínicos han reportado niveles basales normales o elevados de Gp IIb, Gp IIIa o del complejo Gp IIbIIIa durante el *bypass* cardiopulmonar (283). Abrams *et al.* empleando el PAC-1, encontraron una presencia elevada en las formas activadas de Gp IIbIIIa en pacientes que sufrieron circulación extracorporea tras 60 minutos de exposición (194). Una presencia elevada de receptor del fibrinógeno activado (LIBS) se puede observar empleando anticuerpos apropiados. En contraste a publicaciones previas, dos grupos diferentes reportaron una presencia reducida de Gp IIbIIIa durante el *bypass* cardiopulmonar (284). Estos últimos estudios no midieron la presencia de posibles ligandos unidos al Gp IIbIIIa. Una presencia elevada de fibrinógeno unido a las plaquetas ha sido sugerido que detecta estadíos tempranos de activación plaquetar en pacientes bajo diferentes condiciones clínicas, sin embargo, en pacientes con enfermedad coronaria no se detectó ningún cambio en los niveles basales de Gp IIbIIIa o unión al fibrinógeno (285).

Han sido descritos niveles normales o elevados de GpIIbIIIa en pacientes expuestos a la angioplastia coronaria, o después de la implantación de un *stent*. Sharf *et al.* (260)

detectaron una presencia aumentada de anticuerpos dependientes de activación en plaquetas circulantes a través de coronarias dañadas por la angioplastia. Resultados similares se encontraron en pacientes que sufrieron la implantación de un *stent* coronario (286). En este estudio se demostró una unión incrementada del factor de von Willebrand en adición a la presencia aumentada de formas activadas de Gp IIbIIIa en las plaquetas. Niveles elevados o normales de Gp IIbIIIa, o formas activadas de este complejo, fueron detectadas en sangre emergente de heridas sangrantes (261).

En variadas circunstancias clínicas ha sido descrito un aumento de la expresión de P-selectina. La exposición de sangre a los circuitos y membranas de hemodiálisis causa activación plaquetar; los estudios de citometría de flujo en las plaquetas de pacientes urémicos expuestos a hemodiálisis indicaron que la expresión de P-selectina ocurre desde los primeros momentos en que la sangre atraviesa el sistema. Sin embargo, los números de plaquetas activadas no aumentaron progresivamente con el resto de la diálisis. La activación de las plaquetas durante los ciclos iniciales se relaciona con la biocompatibilidad de las membranas empleadas, y puede ser monitorizado mediante la medida de P-selectina por citometría de flujo. Se ha hipotizado que las plaquetas más activadas, expresando P-selectina, serían reclutadas en agregados heterotípicos. Un estudio reciente ha confirmado dicha hipótesis, y sugiere que una monitorización de la activación leucocitaria (CD11b) sería más útil que la de las Gp plaquetares. El empleo de selectinas solubles también ha sido aplicado con éxito en la monitorización de la activación celular durante la hemodiálisis (274).

Existe una controversia sobre la activación de la P-selectina tras el *bypass* cardiopulmonar. Los estudios iniciales fueron incapaces de detectar la expresión de una cantidad importante de P-selectina (194), mientras otros encontraban una ligera expresión de la misma (287). Estudios más recientes han encontrado una expresión claramente elevada de CD62P y CD63 durante el *bypass* cardiopulmonar (288). El porcentaje de plaquetas P-selectina positivas también se encuentra elevado en las muestras obtenidas de sangre emergente de una herida. Existe un creciente número de publicaciones que detectan una presencia elevada de P-selectina en relación con diferentes condiciones clínicas. Se

emplea frecuentemente la P-selectina como índice de activación, por su ya descrita estabilidad frente a otros marcadores. Así, se ha detectado su presencia elevada en pacientes con síndrome coronario agudo, accidente vascular cerebral, púrpura trombótica trombocitopénica, trombocitopenia inducida por heparina, SDRA, fibrilación auricular, fallo cardíaco congestivo, artritis reumatoide, hipercolesterolemia, diabetes mellitus insulín-dependiente, lipemia postprandial, shock traumático, en plaquetas de concentrados de banco de sangre, y en respuesta a diferentes fármacos como trombolíticos, contrastes radiológicos y anestésicos volátiles (261;289-292). Existen también resultados contradictorios en algunas de las patologías descritas, dependientes frecuentemente del método empleado.

En ocasiones, parte de la dificultad en la detección viene dada por que una vez activadas, las plaquetas puede ser inmediatamente eliminadas de la circulación y por tanto no detectadas. Además, la demostración directa de las plaquetas activadas por CMF requiere la presencia de al menos un 0.8% de plaquetas activadas en la muestra de sangre total (260). Así, subpoblaciones de plaquetas activadas que continúan circulando después de la expresión de epitopos dependientes de activación no serían detectables en muestras de sangre periférica por su dilución en la circulación sistémica.

El papel de las determinaciones de diferentes glicoproteínas de membrana en el diagnóstico, pronóstico, monitorización de tratamientos, o para alcanzar una mayor profundidad en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad, es un cuerpo de conocimiento en continuo crecimiento. Asimismo están adquiriendo un mayor protagonismo los estudios genéticos aplicados a la hemostasia, de forma que diferentes polimorfismos de las subunidades que conforman las GP de membrana plaquetar, se han asociado como factor de riesgo de patología cardiovascular (293). En nuestro interés por la sepsis grave, este nuevo campo de estudio genético de alteraciones de la hemostasia, abre un campo de investigación en una patología que no ha conseguido disminuir su mortalidad en los últimos lustros.

5.2. AGREGADOS PLAQUETARES Y SEPSIS

La función plaquetar es fuertemente dependiente de las glicoproteínas expuestas en la superficie de las plaquetas activadas. La citometría de flujo nos permite detectar no sólo estas glicoproteínas expuestas, sino también, cuantas de estas plaquetas se encuentran libres en la circulación, y cuantas se encuentran formando parte de agregados plaquetares.

Hemos intentado evaluar la presencia de plaquetas agregadas, como marcador de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), así como su correlación con parámetros clínicos, analíticos y evolutivos.

Nuestro estudio demuestra que los pacientes con sepsis grave y SDMO, presentan unos niveles de agregados plaquetares significativamente superiores al de los pacientes con sepsis no grave. Además, este valor se correlaciona de forma positiva con el grado de disfunción multiorgánica medida según el *score* SOFA. Los pacientes con sepsis no grave han presentado un grado de agregación similar al grupo control.

Hemos encontrado una correlación positiva significativa entre el porcentaje de agregados plaquetares y el porcentaje de células PAC-1 positivas, tanto al analizar la población global de plaquetas, como al analizar las subpoblaciones de plaquetas libres y plaquetas agregadas. Igualmente ocurre con las células CD62p positivas, que previamente hemos visto que se correlacionaban con la expresión de PAC-1 en nuestra serie. El hecho de que exista una correlación positiva entre los agregados plaquetares y las plaquetas que expresen el receptor del fibrinógeno activado, es congruente, desde el momento en que la adhesión plaqueta-plaqueta, está mediada fundamentalmente por los receptores del fibrinógeno. Así, a mayor grado de expresión de PAC-1, más fácilmente se formarán agregados plaquetares.

Hemos encontrado una correlación positiva entre el porcentaje de plaquetas agregadas y el índice de gravedad APACHE II. También hemos detectado esta correlación positiva entre el porcentaje de AP, y el grado de disfunción multiorgánico según el *score* SOFA, así como con cada uno de los órganos disfuncionantes. No hemos observado una correlación entre agregados plaquetares y mortalidad.

No hemos encontrado otros estudios que investigen los agregados plaquetares en pacientes con sepsis, aunque sí que se ha descrito su presencia en múltiples otras patologías.

Existe una correlación negativa entre los recuentos de plaquetas de cada paciente y la cifra de agregados plaquetares, es decir, existe un mayor número de agregados plaquetares en los pacientes que presentan trombocitopenia. Matzdorff *et al.* describen en experimentos *in vitro* en muestras de sangre total estimuladas con trombina, que tras la aplicación del agonista ocurre una caída del 20% en el valor inicial de plaquetas, acompañada de un incremento en el valor relativo de plaquetas CD62P positivas; las muestras no agitadas, en las que no se formaron agregados mostraron un aumento del número absoluto de plaquetas CD62P positivas, mientras que las muestras agitadas, intentan remedar el *shear stress* que ocurre *in vivo* y en las que se formaron agregados, presentaron un descenso del número absoluto de plaquetas CD62P positivas. Estos datos sugieren que las plaquetas activadas pasan a formar parte de los agregados plaquetares, disminuyendo el número absoluto de plaquetas activadas presentes en la circulación como plaquetas libres, aunque se detecte un aumento del porcentaje de células CD62P positivas (271).

De hecho, como hemos comentado en el apartado anterior, el grado de expresión de P-selectina y de PAC-1, resultó significativamente mayor en la subpoblación de plaquetas agregadas con respecto a la de plaquetas libres, siendo para ambos 3 veces superior en la subpoblación de plaquetas agregadas. Además, en esta subpoblación, el grado de detección de dichos antígenos, con los anticuerpos marcados, pudiera estar disminuído ya que parte

de los receptores están ocupados en la cohesión plaqueta-plaqueta, o plaqueta-leucocito, no siendo susceptibles de su unión por los anticuerpos fluorescentes.

Para dilucidar en parte esta hipótesis, Matzdorff *et al.* repitieron el experimento con plasma rico en plaquetas y con colágeno. Emplearon una dosis de colágeno que indujo una agregación irreversible, obteniendo una respuesta similar a la trombina. En el momento en que aumentó la transmisión de la luz –por agregometría óptica- disminuyó el recuento de plaquetas, y el número absoluto de plaquetas CD62p positivas, mientras que el número de agregados aumentó. De esta forma, se demuestra que aunque la unión a otras células podría jugar un papel, la disminución fundamental en el número de plaquetas CD62p positivas se debe a su interacción para formar agregados plaquetares (271).

Desde el punto de vista metodológico, hemos basado nuestro protocolo, en los estudios publicados por Jy *et al.* (259) y por Matzdorff *et al.* (294). Ambos grupos han estudiado profusamente el empleo de la citometría de flujo y de los anticuerpos monoclonales, aplicados a la detección de agregados plaquetares. Así, la citometría de flujo se va introduciendo en la práctica clínica, empleándose en ensayos clínicos sobre enfermedad coronaria, y en otras situaciones clínicas asociadas con la activación plaquetar como son la hemoglobinuria paroxística nocturna, la preeclampsia, la angioplastia transluminal percutánea, el síndrome hemolítico urémico y la púrpura trombótica trombocitopénica (295); sin embargo no hemos detectado estudios que apliquen la investigación de agregados plaquetares por citometría de flujo en el contexto clínico de la sepsis. Por lo que consideramos interesante nuestra aportación.

Entre otros problemas metodológicos se encuentra el de cómo la dilución de la muestra sanguínea afecta a los resultados finales. Matzdorff *et al.* realizaron diluciones progresivas de las muestras de sangre total antes de su análisis citométrico de los agregados plaquetares, diluyéndolas en el *buffer* PBS al 100 % (sin dilución), 90 %, 80 %, 50 % y 10 %, encontrando que el número absoluto de agregados plaquetares, medidos simultáneamente con fluorosferas, disminuyeron, mientras que los porcentajes o valores

relativos de agregados plaquetares se mantuvieron estables a todos los niveles de dilución (271).

Es interesante comentar que sobre los valores de los agregados plaquetares también influye la velocidad de adquisición de las células, de forma que si esta velocidad es alta (> 2000 eventos por segundo), se ha descrito un posible artefacto con disminución en los agregados (260). En nuestra serie hemos procesado las muestras adquiriendo alrededor de 1000 eventos por segundo.

Ha sido postulado también como una posible fuente de errores en la determinación de los agregados plaquetares, el hecho de que los agregados plaquetares de mayor tamaño obstruyan las luces del citómetro, dificultando su medición y falseando los datos, aunque no se han aportado mayores evidencias.

El método descrito por Jy *et al.* (259), basado a su vez en los descritos previamente por Ault *et al.* (258) y por Galt *et al.* (296) ha sido aplicado al seguimiento de los cursos clínicos de la PTT, y fue encontrado útil para la monitorización de los tratamientos, así como para valorar la remisión de la enfermedad y sus exacerbaciones. Ault *et al.* (258) describieron un método para estudiar los agregados plaquetares por citometría de flujo siguiendo la incubación de sangre total o plasma rico en plaquetas con un agonista, observando la formación de microagregados y de macroagregados plaquetares. Galt *et al.* (296) estudiaron los agregados plaquetares en pacientes con enfermedad vascular periférica, pero no encontraron diferencias significativas con respecto a los sujetos sanos. El método descrito por Jy *et al.* (259) es 20-50 veces más sensible que la agregometría convencional para detectar estados tempranos de activación plaquetar; esto se demuestra por las mucho más bajas concentraciones de agonistas requeridos para producir un efecto medible. Así, describieron cómo la DDAVP, que no tiene un efecto detectable por agregometría óptica, activa a las plaquetas *in vitro*, igualmente el efecto del plasma de pacientes con PTT sobre las plaquetas se detecta bien por citometría de flujo y raramente por agregometría óptica. El método descrito por estos investigadores ha sido aplicado como una ayuda para monitorizar la evolución de la PTT, encontrando que los agregados

plaquetares CD62P positivos se elevaron durante las fases activas de la enfermedad y descendieron tras la plasmaféresis, normalizándose en la remisión. Estos cambios fueron detectados de forma precoz, antes de que aparecieran cambios en la LDH o en el recuento de plaquetas, métodos convencionales de control de la enfermedad. Este método ha descrito también una activación plaquetar en la enfermedad de Alzheimer y en la esclerosis múltiple. Estos hallazgos apoyan el potencial clínico de la citometría de flujo para estudios de función plaquetar.

Han sido Jy *et al.* (259) quienes también han combinado el método descrito por Rinder *et al.* (297) con los descritos previamente, para detectar simultáneamente los agregados leuco-plaquetares. Observaron, en estudios *in vitro* en muestras de sangre total, que una mayor concentración de agonista se correlacionó con mayores porcentajes de agregados leuco-plaquetares en una forma dosis dependiente, indicando que la formación de agregados leuco-plaquetares es dependiente del grado de activación plaquetar. *In vivo*, el papel de los agregados leuco-plaquetares en la trombosis permanece bajo estudio. Sin embargo, resultados preliminares demostraron que los agregados leuco-plaquetares se encontraban francamente incrementados (2x-5x) sobre los agregados plaquetares (1.5x-2x) en los estados trombóticos de la PTT y de la trombocitopenia inducida por heparina, mostrando que los agregados leuco-plaquetares están asociados a estos procesos trombóticos de forma más prominente que los agregados plaquetares (259).

Estos estudios coinciden con nuestros hallazgos en la sepsis grave, habiendo determinado unos incrementos de agregados plaquetares en el grupo de sepsis grave de 2 veces su valor en los pacientes con sepsis no grave o en los controles, mientras que los agregados leucoplaquetares en el mismo grupo se encontraron aumentados 3.5 veces sobre el valor de los pacientes con sepsis no grave o del grupo control.

Los niveles de agregados plaquetares circulantes elevados, han sido observados en pacientes con alteraciones trombóticas. El método que se describió inicialmente para la detección de agregados plaquetares, consistía en que la muestra de sangre se extraía en dos tubos, uno con EDTA -asumido que liberaba a las plaquetas de los agregados-, y otro con

un fijador -asumiendo que preservaba los agregados-: el ratio del recuento plaquetar en los dos tubos se tomaba como un índice de los agregados plaquetares en la circulación. Por esta técnica se detectaron agregados plaquetares elevados en pacientes con insuficiencia arterial, hipoxemia, enfermedad inflamatoria intestinal e isquemia cerebral (169). Un aumento de los agregados plaquetares se detectó también, en otros trastornos con alto riesgo de trombosis. En estudios recientes, durante la realización de ecografías cardíacas se detectó un contraste espontáneo debido a la presencia de agregados plaquetares en las cámaras cardíacas, y estos pacientes presentaron un mayor riesgo de complicaciones tromboembólicas (298).

La mayoría de citómetros de flujo nos permiten conocer el número relativo de plaquetas, plaquetas activadas o agregados plaquetares, y no están equipados para recuentos absolutos de los mismos, pero los métodos para estos estudios han sido bien establecidos aunque suponen una sobrecarga difícilmente introdurible en el análisis citométrico rápido que se pretende en el ámbito clínico. Por tanto, como consideramos que el recuento absoluto de plaquetas, plaquetas activadas, agregados plaquetares o micropartículas, puede ofrecer luz sobre aproximaciones diagnósticas y seguimientos terapéuticos en determinadas patologías con afectación de la función plaquetar, entre ellas la sepsis grave, esperamos que los nuevos citómetros aporten esta tecnología.

Como hemos descrito previamente, hemos encontrado una correlación negativa entre las cifras de plaquetas y el porcentaje de agregados plaquetares, de forma que cuando encontramos mayor porcentaje de agregados, existe una mayor trombocitopenia. En pacientes pediátricos que han sufrido quemaduras graves, y que además padecen sepsis, se ha descrito el valor de un recuento de plaquetas disminuído, como predictor independiente de la evolución fatal de la sepsis (299). Más recientemente Vanderschueren *et al.* han descrito en pacientes críticos -con y sin sepsis- ingresados en UCI, que la trombocitopenia es un marcador de riesgo de mortalidad, independiente de, y complementario a los índices de severidad establecidos. Describen que tanto un nadir bajo en el recuento de plaquetas, como una importante caída en dicho recuento, predicen un mal pronóstico (300). En nuestra serie, no hemos podido encontrar una asociación entre cifra de plaquetas y mortalidad.

El incremento en los agregados plaquetares se correlaciona con los diferentes grados de disfunción multiorgánica, como hemos descrito. El atrapamiento de microagregados plaquetares, puede alterar la perfusión orgánica, considerándose un proceso responsable del SDMO. Un cuerpo de conocimiento creciente, apoya la hipótesis del paro circulatorio en la microvasculatura como sustrato del SDMO. Nuestros hallazgos suponen una colaboración en este sentido.

5.3. SEPSIS Y AGREGADOS LEUCOPLAQUETARES

Entre los objetivos de nuestro estudio, se encuentra el de profundizar en el papel fisiopatológico de las interacciones entre los diferentes componentes celulares de la sangre en el ámbito de la sepsis. Así, en este apartado pasaremos a valorar los resultados del estudio de la interacción leucocito-plaqueta en los pacientes sépticos.

Hemos encontrado que la población de pacientes con sepsis grave presenta un porcentaje de agregados leuco-plaquetares significativamente más elevado que los pacientes con sepsis no grave, los cuales han presentado un grado de presentación de agregados leuco-plaquetares similar al grupo control, y similar también a la población sana.

Detectamos una correlación positiva significativa, entre el porcentaje de agregados leuco-plaquetares y el marcador de activación plaquetar PAC-1, únicamente al estudiar la subpoblación de plaquetas agregadas.

La misma correlación positiva se mantiene cuando relacionamos los agregados leuco-plaquetares con el porcentaje de plaquetas que expresan el marcador de secreción plaquetar CD62P o P-selectina, al analizar la población de plaquetas agregadas. No hemos encontrado una correlación significativa al analizar las variables agregados leuco-plaquetares y agregados plaquetares.

No hemos encontrado una correlación positiva entre agregados leuco-plaquetares y grado de disfunción multiorgánica según la escala SOFA, ni hemos encontrado correlación entre los agregados leuco-plaquetares y el índice de gravedad APACHE II. No hemos observado una correlación entre los agregados leuco-plaquetares y la evolución/mortalidad de los pacientes.

Se han descrito una variedad de métodos para identificar a los agregados leuco-plaquetares, pero existen diferentes problemas metodológicos. Los estudios con microscopía óptica son no cuantitativos, poco sensibles y no informan sobre las funciones de los receptores. La citometría de flujo ofrece considerables ventajas en tales análisis, pero el diferente procesado de las muestras, puede influir en el resultado final obtenido. Los procesos de lavado y centrifugación, producen pérdida celular, facilitando la formación de agregados por activar plaquetas de forma artefactual, así como por aumentar los contactos célula-célula. En ocasiones la lisis de eritrocitos es empleada para facilitar el análisis citométrico, pero puede liberar grandes cantidades de ADP que active las plaquetas e induzca una gran cantidad de agregados leucoplaquetares. La manipulación celular y la lisis eritrocitaria podrían incrementar la expresión de integrinas por parte de los leucocitos, y aumentar los agregados leuco-plaquetares. Finalmente, y de forma importante, la fijación de las muestras se ha descrito también como origen de una activación artefactual de las plaquetas. Por todo esto, parece deseable estudiar las interacciones plaqueta-leucocito en muestras de sangre total que emplean una mínima manipulación de la muestra.

Para el análisis de los agregados leuco-plaquetares hemos empleado el método descrito por Li *et al.* que utiliza una técnica bicolor, sin fijación, en la cual la preparación de la muestra se inicia precozmente para minimizar la activación plaquetaria *in vitro*. Este ensayo, parece reflejar la situación *in vivo* de forma cercana, ya que se ha intentado minimizar los artefactos *in vitro* ocasionados por el manejo y procesado de la muestra; asimismo el empleo por estos autores de anticuerpos bloqueantes no tuvo influencia en el porcentaje de agregados leucoplaquetares en las muestras en reposo, por lo que lo hemos considerado un método interesante para el estudio de pacientes sépticos (247).

La evaluación metodológica realizada por dichos autores, demostró que las manipulaciones *in vitro* de la muestra, tales como la simple fijación, tanto con formaldehído como con paraformaldehído, y tanto pre como postincubación, la lisis eritrocitaria, y especialmente la centrifugación repetida, indujeron la formación de agregados leucoplaquetares artefactuales. La fijación puede revertir la unión del fibrinógeno a la plaqueta, y aumentar la expresión de P-selectina, pudiendo ambos efectos, aumentar la formación de agregados leuco-plaquetares. La unión de ciertas proteínas de membrana a los fijadores aldehídos puede inducir la unión entre células, llevando a un aumento en los agregados leuco-plaquetares. La lisis eritrocitaria, como sabemos, libera ADP que activa las plaquetas e induce un aumento de los agregados leuco-plaquetares. Sin embargo, es digno de destacar que el más importante aumento en el porcentaje de agregados leuco-plaquetares fue inducido por los procesos de lavado y centrifugación. Estos procesos podrían inducir una activación de plaquetas y leucocitos, con aumento de la expresión de selectinas e integrinas en la membrana celular, lo que conllevaría un importante incremento de los agregados leuco-plaquetares *in vitro*, así como a una significativa y quizás selectiva pérdida de células (247).

Las muestras sin fijación se demostraron estables durante las primeras 3 horas después de su preparación, igual que las muestras fijadas con formaldehído al 0.2 %. Sin embargo, si las muestras fueron almacenadas durante 6 horas o más, se detectaron incrementos en el porcentaje de agregados leuco-plaquetares, a pesar de la fijación, y ninguno de los métodos empleados mostró resultados aceptables. Así que los retrasos en el análisis de la muestra, deben ser evitados, o estandarizados. El análisis dentro de las 3 primeras horas parece que provee de mediciones aceptables de los agregados plaquetares en muestras de sangre total (247).

Nosotros hemos realizado un experimento paralelo en el que analizamos los agregados leuco-plaquetares con un retraso de 1, 2 y 3 horas –datos no mostrados-, encontrando que no existen diferencias significativas entre estas muestras y las analizadas inmediatamente tras la extracción de la sangre. En cualquier caso, en nuestro estudio

ninguna muestra se ha analizado con un retraso superior a los 10 minutos tras la extracción.

Se ha descrito que el ADP, la trombina y el PAF, activan a las plaquetas por diferentes vías mediadas por receptores. Su capacidad para inducir la formación de agregados leucoplaquetares varía de forma paralela a su capacidad como agonistas plaquetares. El PAF es además un potente estimulador de la activación leucocitaria, mientras la trombina puede activar a algunas poblaciones leucocitarias. Estos dos agonistas tienen efectos aditivos sobre la formación de ALP, mientras que el ADP posee poco efecto adicional en presencia del PAF. El fMLP activa los neutrófilos pero no tiene un efecto directo sobre las plaquetas. Sin embargo puede aumentar la formación de agregados heterotípicos vía la liberación del PAF y de la catepsina G desde los leucocitos. La trombina tiene un más claro efecto aditivo que el ADP sobre la formación de ALP inducida por fMLP. Estos datos sugieren que la estimulación de cualquier tipo celular, plaquetas o leucocitos, puede incrementar la formación de ALP, y que la estimulación de ambos tipos celulares es requerida para obtener un número máximo de ALP (247).

En nuestro estudio hemos empleado un marcador panplaquetario antiCD42a, que detecta la GP IX. La identificación de las plaquetas con anticuerpos anti-GpIb/IX tiene ventajas sobre el empleo de anticuerpos anti GpIIb/IIIa, debido a la posible involucración del GpIIb/IIIa en la interacción plaqueta-leucocito, ya que alguno de los epitopos de este complejo, se pueden ver enmascarados por los agregados.

Diferentes autores han estudiado las interacciones entre plaquetas y leucocitos en el contexto de la sepsis. Gawaz *et al.* estudiaron un grupo de pacientes con sepsis, encontrando que la expresión de antígenos específicos plaquetarios en la superficie de los leucocitos, se encuentra aumentada en la sepsis, pero disminuye cuando existe un síndrome de disfunción multiorgánica. Los resultados indican un papel fisiopatológico de la activación plaquetar y de la formación de agregados leuco-plaquetares en el curso de la sepsis y en el desarrollo del SDMO. En otro estudio, el mismo autor determina que la adhesión plaqueta-neutrófilo se encuentra aumentada en pacientes con sepsis, pero que disminuye dependiendo de la severidad del SDMO, describiendo además como la

inmunofluorescencia CD41 específica de las plaquetas en los neutrófilos, es un factor independiente predictor de mala evolución clínica, en los pacientes sépticos. Los autores especulan que un aumento en la adhesión plaqueta-leucocito *in vivo* podría inducir un aumento del secuestro de estos agregados mixtos en el lecho capilar, produciendo cambios locales vasoactivos e inflamación (301).

Estos autores encuentran una reducción significativa de los agregados leuco-plaquetares que podría reflejar un aumento en el consumo periférico en la microvasculatura. Ya que el SDMO está asociado con una alteración de la microcirculación, se puede hipotizar que un incremento de la adhesión leuco-plaquetaria y de su secuestro en la sepsis, puede alterar la microcirculación y contribuir al desarrollo del SDMO. Los mismos autores han descrito que la interacción leuco-plaquetar está incrementada en la fase temprana de la hemodiálisis, y disminuye al finalizar la sesión de diálisis. Ya que los leucocitos son secuestrados en la vasculatura pulmonar durante la diálisis, sugieren que la formación y secuestro de ALP es un fenómeno que ocurre realmente *in vivo*. El hecho de que no se detecte una caída concomitante en el recuento de leucocitos periférico, podría estar enmascarado por una liberación reactiva de leucocitos desde la médula ósea (302).

Este estudio no aclara el proceso fisiopatológico que subyace, ni la naturaleza de los mediadores involucrados en la isquemia y paro microcirculatorio en la sepsis y SDMO. Sin embargo, el aumento en la activación plaquetaria y en la adhesión leucoplaquetaria sugiere que en la sepsis y en el SDMO ocurre un significativo dialogo intercelular. La interacción celular aumentada entre plaquetas y leucocitos puede ser importante para el desarrollo del SDMO, al facilitar la interacción plaqueta-endotelio por intermedio de los leucocitos activados. La producción de óxido nítrico está aumentada en los pacientes sépticos, y se ha demostrado que afecta a la adherencia entre plaquetas y neutrófilos (303). Es más, los neutrófilos utilizan el ácido araquidónico que liberan las plaquetas para aumentar la síntesis de leucotrienos y de otros eicosanoides, y la catepsina G derivada de los neutrófilos, puede inducir una mayor agregación y secreción plaquetaria (304). Además, las plaquetas y los neutrófilos pueden cooperar para aumentar la formación de factor activador plaquetario

(PAF) que actúa sobre ambos tipos celulares y ofrece el potencial para amplificar la activación (305).

Vickers *et al.* han estudiado también las interacciones entre leucocitos y plaquetas en la sepsis. Emplearon la citometría de flujo para determinar los marcadores de activación celular: CD62P en las plaquetas, y CD11b en los neutrófilos y monocitos. Además midieron la exposición de factor tisular (TF) en la superficie de los monocitos, y la formación de conjugados heterotípicos entre plaquetas y neutrófilos o monocitos. Realizaron su estudio en 47 pacientes, 27 de los cuales eran sépticos, y evaluaron su grado de disfunción orgánica según la escala SOFA. Cuando compararon los pacientes sépticos con el grupo control, encontraron que los sépticos presentaban valores significativamente más altos de P-selectina, CD11b, sobre monocitos y neutrófilos, y de factor tisular sobre los monocitos. Pero cuando compararon la formación de conjugados plaqueta-neutrófilo o plaqueta-monocito, no encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, sépticos y control. Sin embargo, los agregados plaqueta-neutrófilo fueron significativamente más elevados en los pacientes sépticos que no evolucionaron a shock séptico que en aquellos que sí lo presentaron, o que en el grupo control. Considerando todos los pacientes, el grado de disfunción SOFA se correlacionó de forma positiva con el marcador P-selectina, factor tisular en monocitos, y CD11b, pero no con la formación de conjugados leuco-plaquetares. La P-selectina fue dos veces mayor en los pacientes que fallecieron. Estos datos proveen de más evidencias de que las plaquetas y los leucocitos participan en las alteraciones hemostáticas y en la evolución a SDMO. El papel de los agregados leuco-plaquetares permanece bajo estudio, pero Vickers *et al.* asumen que pueden contribuir al fallo orgánico por participar en los procesos de trombosis microvascular y paro microcirculatorio (306).

En nuestra serie, los agregados leucoplaquetares sí que se encuentran elevados en los pacientes con sepsis grave, mientras no lo están en los pacientes con sepsis no grave; al igual que en el estudio anterior, no se correlacionan los ALP con el grado de disfunción orgánica, medido por el SOFA. También expusimos los hallazgos de Gawaz *et al.* que encontraban cómo a mayor grado de SDMO, menor era la aparición de agregados leuco-plaquetares (301). Una posible explicación para esta discrepancia puede venir dada por el

análisis puntual que realizamos de la puntuación SOFA y del análisis de los agregados, que podría ser subsanado con determinaciones seriadas que nos tradujeran de forma más fehaciente la correlación entre la evolución clínica y los parámetros analíticos. Además, nos encontramos con el problema más habitual en todos los estudios sobre la sepsis, que es la estratificación de los pacientes. Aunque la conferencia de consenso sobre definiciones de sepsis ha homogeneizado los conceptos fundamentales, los diferentes estudios sobre sepsis, y aún los ensayos clínicos, introducen pacientes con sepsis de distintos orígenes –abdominal, respiratorio, renal...-, con distinta bacteriología, y con diferentes respuestas inflamatorias, que dificulta frecuentemente la comprensión de los hallazgos.

Como comentamos anteriormente, hemos encontrado una correlación positiva entre los agregados leuco-plaquetares y la presencia de plaquetas P-selectina positivas, y PAC-1 positivas, en la población de plaquetas agregadas, es decir, en las que presentan un mayor grado de activación. Aunque de forma tradicional se ha venido implicando a la P-selectina como principal nexo de unión entre plaquetas y leucocitos, el receptor Gp IIb-IIIa también juega un papel (307). Sanderson *et al.* empleando antagonistas anti-GpIIb-IIIa encuentran que éstos pueden llevar a la inhibición de la formación de agregados plaquetares, y también a la inhibición o potenciación de los agregados leuco-plaquetares en función de la dosis y tipo de agonista empleado para inducir la activación plaquetar. La inhibición de los agregados leuco-plaquetares implica que el Gp IIb-IIIa juega un papel en la formación de los agregados leuco-plaquetares bajo ciertas circunstancias, mientras que la potenciación de los agregados, implica que las plaquetas activadas, son aún capaces de adherirse a los leucocitos incluso cuando la agregación plaquetar está alterada. Esto ocurre posiblemente a través de la P-selectina de las plaquetas activadas, unidas al receptor PSGL-1 de los leucocitos (308).

La determinación de agregados leuco-plaquetares se ha empleado para el estudio de otras patologías que, como la sepsis, su fisiopatología se basa en los procesos de hemostasia/trombosis. Fundamentalmente se ha investigado su presencia para profundizar en los mecanismos de la enfermedad, y su valor como marcador diagnóstico, de control terapéutico o pronóstico. Así, han sido estudiados con especial interés por su elevada

incidencia en la enfermedad coronaria y su tratamiento –angioplastia y/o stent-, en la que se han encontrado niveles elevados; su empleo como marcador de infarto de miocardio está bajo estudio, ya que aunque presenta una elevada sensibilidad, su especificidad es baja, y muchos pacientes con enfermedades infecciosas y/o inflamatorias también mostrarán niveles altos de agregados leuco-plaquetares. Sin embargo, su alto valor predictivo negativo, hace necesarios más estudios que valoren dicha variable como útil en la valoración inicial de los dolores torácicos. Otras situaciones patológicas valoradas son: la preeclampsia; la influencia de la hemodiálisis y del tipo de membrana/filtro empleado sobre la formación de agregados leuco-plaquetares; el efecto de la circulación extracorpórea; la formación de agregados en los concentrados de plaquetas y en la plaquetaféresis; o la influencia de fármacos como la aprotinina (309-312).

La asociación de leucocitos y plaquetas ha sido detectada en diferentes modelos de lesión tisular. Los neutrófilos se acumulan alrededor de los trombos ricos en plaquetas en los sitios de hemorragia. Las plaquetas pueden además ser reclutadas por los neutrófilos hacia los tejidos inflamados durante la migración de los neutrófilos a través del endotelio, y las plaquetas se asocian a los fagocitos mononucleares durante las fases tempranas de la aterosclerosis experimental. La interacción de las plaquetas con los leucocitos puede facilitar las funciones de ambos tipos celulares en las vías inflamatoria y hemostática. Por ejemplo, los neutrófilos y las plaquetas pueden emplear intermediarios lipídicos derivados del otro tipo celular para sintetizar nuevos leucotrienos (86).

Aunque las plaquetas liberan proteínas que son quimiotácticas para los leucocitos, existen evidencias de la existencia de interacciones basadas en un contacto directo entre ambos tipos de células. Empleando un ensayo tipo roseta, Jungi *et al.* demostraron que plaquetas estimuladas con trombina, y fijadas, se pueden unir a neutrófilos y monocitos en una manera dependiente del calcio. Las plaquetas no estimuladas no se unieron a ningún tipo leucocitario. La asociación de plaquetas activadas con monocitos está mediada por la unión de la trombospondina al receptor CD36 (GpIV), que se encuentra en la superficie de ambas células. Sin embargo, la naturaleza molecular de la interacción entre plaquetas activadas y los neutrófilos, ha permanecido poco claro (313).

La P-selectina ó GMP-140, es una glicoproteína de membrana encontrada en los gránulos secretores de ambos tipos celulares, plaquetas y células endoteliales. Tras la activación plaquetaria por agonistas, tales como la trombina, la P-selectina es rápidamente redistribuída por la superficie celular durante la degranulación. El GMP-140 pertenece a la familia de selectinas de los receptores de la pared vascular que comparten una similitud en su secuencia y en la organización de sus dominios. Las otras selectinas conocidas son la ELAM-1, un receptor de las células endoteliales para neutrófilos inducible por citoquinas, y una estructura de la superficie leucocitaria estudiada por su papel en dirigir el movimiento de los linfocitos a grandes vénulas endoteliales de nódulos linfáticos periféricos. El hecho de que estas dos moléculas dirijan la adhesión de los leucocitos a otras paredes vasculares, sugiere que la P-selectina pueda tener una acción similar (86).

Hamburger *et al.* demostraron como los neutrófilos humanos se unen de manera calcio-dependiente a la P-selectina purificada, e inmovilizada en plástico. Posteriormente describieron que la adhesión de los neutrófilos al endotelio estimulado con activadores rápidos tales como la histamina, está mediado al menos en parte por la P-selectina, y demuestran que la P-selectina está involucrada en la unión entre plaquetas activadas y neutrófilos (86).

La P-selectina es un mediador de la adhesión del neutrófilo a la superficie del endotelio activado, y se ha demostrado que también promueve la adherencia de los neutrófilos a la superficie de las plaquetas activadas (86).

La capacidad de las plaquetas fijadas para adherirse a los neutrófilos, de forma P-selectina-dependiente, indica que las plaquetas una vez activadas no requieren una actividad metabólica adicional para su unión. Los neutrófilos no necesitan estar metabólicamente activos, por que las plaquetas activadas interaccionan con neutrófilos fijados. Además, los neutrófilos no requieren una activación previa para adherirse a la P-selectina purificada, o a la P-selectina unida a plaquetas o a células endoteliales activadas (314).

Diferentes estudios indican que los productos liberados desde las plaquetas activadas pueden promover la activación, adherencia, agregación y fagocitosis de los neutrófilos. Otros productos pudieran inhibir ciertas funciones de los neutrófilos tales como la producción de superóxidos. El metabolismo transcelular de los intermediarios lipídicos de un tipo celular al otro ha sido también bien documentado. Se desconoce si el contacto directo entre plaquetas y neutrófilos facilita el papel modulador de los productos solubles (315-318).

Los monocitos también se unen a plaquetas y al endotelio, sugiriendo que la P-selectina promueve la adhesión monocitaria a estas células. En estudios preliminares, encontramos que la línea monocitoide U937 se une a plaquetas estimuladas de una manera Ca-dependiente y que esta interacción adhesiva es inhibida por anticuerpos anti-P-selectina (313;319).

Larsen *et al.* también reportaron que la P-selectina media la unión entre plaquetas activadas y neutrófilos o monocitos. Promoviendo la unión rápida entre leucocitos y plaquetas activadas y entre leucocitos y endotelio activado, la P-selectina puede facilitar la comunicación entre las respuestas hemostásica e inflamatoria ante la lesión tisular (320).

Vallés *et al.*, realizaron un estudio de las interacciones plaqueta-neutrófilo como parte de su interés en los eventos celulares y bioquímicos iniciales en el proceso trombótico. El sistema experimental empleado les permite realizar una evaluación independiente de la activación y del reclutamiento plaquetario, así como la influencia que ejercen sobre este proceso, los neutrófilos sin estimular bajo condiciones de estrecho contacto durante un breve intervalo de tiempo. Demostraron que los neutrófilos humanos disminuyen de forma marcada la activación plaquetaria, determinada por la serotonina liberada, y el reclutamiento plaquetario, inducidos por el colágeno o la trombina (321).

Los neutrófilos humanos no estimulados, van a regular a la baja la reactividad plaquetaria durante el primer minuto tras la estimulación con agonistas plaquetarios. Esto fue demostrado en un sistema *in vitro*, que evaluó de forma independiente la activación

plaquetaria y el reclutamiento. Este método puede ser válido como un modelo *in vitro* para el estudio de los eventos trombóticos y hemostáticos más tempranos. Una vez que el agonista es añadido, las plaquetas y los neutrófilos se aproximan y posteriormente se separan. El fluido sobrenadante que contiene los productos liberados de las células es entonces empleado para estudiar el reclutamiento plaquetario y la activación plaquetaria. Así, este sistema evalúa los eventos más tempranos, que ocurren durante el primer minuto tras su estimulación (321).

Se eligieron trombina y colágeno para estos estudios como inductores de la agregación plaquetaria. El resultado experimental conseguido por estas autoras indica que la inhibición que ejerce el neutrófilo sobre la reactividad plaquetaria inducida por el colágeno o la trombina, fue específica del estímulo empleado. A niveles similares de activación de plaquetas solas, la inhibición de los neutrófilos sobre la liberación de serotonina fue mayor en muestras estimuladas con trombina, que en muestras estimuladas con colágeno. Aún más, a bajas concentraciones de neutrófilos, la inhibición resultó más eficiente con colágeno que con trombina. Se realizaron nuevas observaciones sobre la participación de los metabolitos de los eicosanoides en estas interacciones célula-célula. Los productos plaquetarios de la lipooxigenasa, 12S-HETE o su derivado 12S,20-DiHETE, originados en el metabolismo transcelular entre plaquetas y neutrófilos no estimulados, redujeron el efecto inhibitorio de los neutrófilos cuando el sistema era estimulado con trombina (321).

La inhibición que ejercen los neutrófilos sobre la reactividad plaquetaria según se estudia en este sistema *in vitro*, podría tener implicaciones para la comprensión de los eventos tempranos en la trombosis y en la hemostasia. Los datos sugieren que los neutrófilos poseen la capacidad de modular el inicio y la propagación del trombo plaquetario en desarrollo.

Los resultados descritos son probablemente un reflejo de lo siguiente: los neutrófilos que se emplearon estaban sin estimular, las plaquetas estaban altamente estimuladas con agonistas específicos, se facilitó un contacto máximo entre células, y la

duración del contacto plaqueta-neutrófilo fue breve, de forma que simulase los eventos trombóticos más tempranos.

Dos circunstancias bajo las que la eficacia de los neutrófilos en bloquear la reactividad plaquetaria resultó aumentada, fueron las siguientes: cuando el metabolismo de la lipooxigenasa fue bloqueada por ETYA, y cuando la adhesión plaqueta-neutrófilo se bloqueó por los anticuerpos anti-P-selectina. Sugieren estas autoras, que la inhibición neutrofílica de la reactividad plaquetaria, podría operar de forma máxima vía fase fluída entre células (321).

Los estudios de cardiopatía isquémica evidencian que existe una correlación positiva entre el número de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y el riesgo de enfermedad vascular (322). Un elevado recuento de PMN se asoció con un mayor riesgo de infarto agudo de miocardio, así como de su recurrencia (323). Posteriores estudios, mostraron una respuesta funcional incrementada tanto *ex vivo* como *in vivo* a la activación de PMN en diferentes manifestaciones clínicas de enfermedad cardíaca isquémica y sugirieron un papel activo para estas células en la progresión de la oclusión vascular (324). En modelos animales de infarto de miocardio, la deplección de PMN, la supresión farmacológica de PMN o la inhibición de la adhesión de células endoteliales y leucocitos PMN, redujeron la extensión de la lesión tisular aguda, así como la mortalidad siguiendo a la isquemia-reperfusión (325). Aunque han sido reportadas diferentes interacciones entre plaquetas y PMN en estudios *in vitro*, la observación de que PMN activados inducen activación plaquetaria, puede dotar de cierta plausibilidad al papel de los PMN en la trombogénesis.

De forma particular, los PMN activados producen y liberan reactivos oxidantes, leucotrienos inflamatorios, y enzimas lisosómicas proteolíticas, que pueden inducir directamente un daño vascular e influenciar el estado de activación de las plaquetas y de las células endoteliales (326;327).

En estudios *in vitro*, la catepsina G purificada, en concentraciones comparables a aquellas determinadas en supernatantes de 5×10^6 PMN activados por $1 \mu\text{M}$ de fMLP (20-500 nM), ha demostrado que induce la agregación plaquetaria, formación de tromboxano, liberación del contenido de los gránulos, elevación del calcio intraplaquetario y activación de la proteínquinasa C (328).

De forma similar a otras enzimas proteolíticas, la catepsina G modifica las glicoproteínas de superficie de la plaqueta (Gp): induce un clivaje de la GpIb, a nivel de los aminoácidos Leu275-Tyr276. De esta forma, el sitio de unión del factor de von Willebrand a la glicoproteína GpIb desaparece, pero el sitio de unión a la trombina permanece. Además, la catepsina G induce un aumento en la exposición del GpIIbIIIa en su forma activada, que permita la unión del fibrinógeno. La catepsina G se demostró además que induce el clivaje del extremo amino-terminal del receptor de la trombina, al menos en dos puntos diferentes: Phe55-Trp56, y después del Arg41, activando de esta forma al receptor de la trombina (329).

La activación plaquetaria inducida por los PMN a través de la catepsina G, ha sido propuesta como el mecanismo por el que, por un lado, los PMN contribuyen en los eventos trombóticos, y por otro lado, las plaquetas están involucradas en los fenómenos inflamatorios (330).

Sin embargo, como una actividad proteolítica intacta de la catepsina G es esencial para su actividad activadora plaquetaria, la amplia presencia de antiproteinasas en plasma, podría virtualmente abolir la actividad de la catepsina G. De hecho, diferentes antiproteinasas como la alfa-1 antitripsina, o la egliina-C, previenen la activación plaquetaria inducida *in vitro* por la catepsina G purificada, o por supernatantes de PMN activados. Las antiproteasas resultaron, sin embargo, mucho menos efectivas, cuando los PMN fueron estimulados después de que hubieran interactuado con las plaquetas en poblaciones celulares mixtas. Se ha propuesto, que en estas condiciones, se crea un microambiente cercano entre PMN y plaquetas, de forma que los enzimas son protegidos contra los inhibidores de proteasas (328).

La microscopía electrónica evidenció múltiples puentes establecidos entre PMN y plaquetas, lo cual apoya la sugerencia de que un contacto célula-célula sería el responsable para la reducida eficacia de las antiproteasas. De hecho, la adhesión plaqueta-PMN, resultó fuertemente inhibida por un anticuerpo anti-P-selectina, con un concomitante efecto inhibitorio aumentado de las antiproteinasas sobre la activación plaquetaria inducida por los PMN (331). Así, la adhesión plaqueta-PMN mediada por la P-selectina, puede resultar en la formación de un microambiente “secuestrado” entre membranas celulares adyacentes, requiriéndose grandes cantidades de antiproteinasas para prevenir la actividad de la catepsina G liberada a nivel local (330).

Como hemos mencionado con anterioridad, la interacción PMN-plaqueta incluye una cooperación bioquímica que consiste en parte de las reacciones de la secuencia denominada metabolismo transcelular del ácido araquidónico. Las plaquetas activadas aumentan la síntesis del leucotrieno B₄ por parte de los PMN activados, al proveer ácido araquidónico. Las plaquetas, pueden además contribuir a la producción de leucotrieno C₄ y de lipoxina, al metabolizar el leucotrieno A₄ derivado de los PMN. Los PMN, por otro lado, pueden proveer de ácido araquidónico libre a las plaquetas activadas, para aumentar la síntesis de productos de las vías de la ciclooxigenasa y de la 12-lipooxigenasa (330-331).

La adhesión directa célula-célula juega un papel esencial en la interacción funcional plaqueta-PMN. Incluso, este fenómeno pudiera tener una relevancia fisiopatológica, desde el momento en que las plaquetas activadas en el lugar de daño vascular pudieran jugar un importante papel en el reclutamiento de leucocitos en el lugar del trombo en formación, en el cual, los leucocitos acumulados pueden contribuir a una mayor activación plaquetaria y en último lugar al depósito de fibrina (332).

Las plaquetas activadas se adhieren a la superficie vascular dañada, pudiendo incluso reemplazar a las células endoteliales al controlar los procesos de reclutamiento y migración de los leucocitos a través de la pared vascular. Estos eventos pueden contribuir al mantenimiento de la integridad del vaso y del tejido, pero podrían además jugar un rol desconocido en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria y trombótica.

La P-selectina expresada en la superficie de las plaquetas activadas conforma un mecanismo adhesivo de primer orden entre las plaquetas y los PMN, reconociendo diferentes ligandos en la membrana de los PMN. Sin embargo, la interacción entre PMN y la P-selectina a rangos de flujo fisiológicos, como se puede estudiar en modelos *in vitro* formados por bicapas fosfolípídicas conteniendo P-selectina, se ha demostrado que tienen un alto ritmo de asociación-disociación. De acuerdo a este modelo experimental, este tipo de interacción llevaría a una adhesión célula-célula inestable, visualizada de forma clásica por el proceso de “*rolling*” de los PMN sobre las células que expresan P-selectina (333).

Diferentes estudios realizados en condiciones dinámicas, mostraron un “*rolling*” de los PMN sobre plaquetas inmovilizadas, dependiente de la P-selectina (334). Además, Yeo *et al.* sugirieron por primera vez que un mecanismo desconocido, pero dependiente de la activación de los PMN, es necesario además de la P-selectina, para que ocurra una adhesión estable, y se cuestionaron sobre la identidad de los receptores involucrados en dicho mecanismo desconocido (335).

Muy recientemente, diferentes grupos de investigadores mostraron que bajo condiciones de flujo, la adhesión firme de los PMN a las plaquetas adherentes, ocurría a grandes niveles de *shear*: en estas condiciones la adhesión de los PMN a la superficie plaquetaria, se caracteriza por una interacción de tipo “*rolling*” dependiente de la P-selectina, mientras la adhesión estática, es mediada por la beta-2-integrina Mac-1 (CD11b/CD18). De hecho, la P-selectina no es el único receptor de los PMN en las plaquetas. El fibrinógeno expresado en la superficie plaquetaria, puede funcionar además como un receptor que une a los PMN. De forma reciente, la molécula de adhesión ICAM-2 ha sido descrita en la superficie plaquetaria (336-340).

De forma similar a lo que se ha descrito bajo condiciones de flujo, la adhesión de PMN a plaquetas activadas en mezclas de células en suspensión sujetas a una rotación a alta velocidad, puede ser modelada como una adhesión en cascada en el que intervengan un primer paso dependiente del reconocimiento de la P-selectina, seguido de un refuerzo en la adhesión mediado por el CD11b/CD18 (341).

Además, de acuerdo con la observación de que la adhesión PMN-plaqueta resulta prevenida por inhibidores de las tirosin-quinasa, se ha postulado que una señal intermediaria dependiente de las tirosin-quinasa pudiera ejercer una actividad reguladora de la adhesividad de la beta-2-integrina (341).

Una cascada de adhesión en múltiples pasos fué caracterizada en primer lugar en la adhesión de los PMN al endotelio. En este modelo, el proceso de “*rolling*” mediado por la P-selectina culmina en la adhesión firme dependiente de las moléculas de adhesión ICAM expresadas en la superficie del endotelio a las beta-2-integrinas de los PMN (342).

De forma diferente a lo que ocurre con las moléculas de adhesión involucradas en los pasos de “*rolling*”, que no requieren una señal de activación para reconocer el ligando, las beta-2-integrinas requieren una regulación funcional para resultar competentes para unirse a su contra-receptor. Esto implica que una señal intermediaria de activación de las beta-2-integrinas es realizada desde la superficie de las células endoteliales hacia los PMN en los pocos segundos entre el movimiento de “*rolling*” y la fijación firme. Para explicar este proceso de señalamiento existen dos hipótesis que no se excluyen entre ellas: la primera es que la unión a las P-selectinas induce una señal de activación yuxtacrina a través de lípidos autacoides y quimioattractantes unidos a la membrana de las células endoteliales. La segunda posibilidad es que la unión de la E-selectina a los PMN, podría per se inducir la señal responsable para la activación del Mac-1 (330).

De hecho, las plaquetas activadas expresan no sólo P-selectina, sino también diferentes ligandos de las beta-2-integrinas, incluyendo el fibrinógeno y la ICAM-2. Además, liberan factor activador plaquetario, nucleótidos de adenina y las quimioquinas ENA-78, GRO-alfa y el péptido activador de los neutrófilos-2. Todos estos productos liberados por las plaquetas son potentes agonistas de los PMN, y algunos de ellos han sido recientemente descritos como participantes en el proceso de parada dependiente de las beta-2-integrinas, de los PMN sobre la superficie adherente de las plaquetas (330).

La evidencia de experimentos previos demuestra que la P-selectina en ocasiones sólo, y otras veces en combinación con quimioquinas, es capaz de generar diferentes respuestas por parte de los PMN, sugiriéndose que estas respuestas son disparadas directamente por moléculas de adhesión, mientras otras, requieren la integración con señales adicionales dependientes de las quimioquinas. Esta evidencia experimental incluye la observación de que la P-selectina *per se* puede estimular la fagocitosis dependiente del CD11b/CD18 en los PMN (343).

Hemos revisado los avances que se han ido realizando en el conocimiento de los mecanismos íntimos de la interacción entre leucocitos y plaquetas, lo cual nos puede ayudar a comprender cada vez mejor los fenómenos de la respuesta inflamatoria y de la trombosis. Nuestro estudio intenta ser una aportación a la comprensión de estos fenómenos en el ámbito de la sepsis.

5.4. TROMBOSIS COMO FENÓMENO MULTICELULAR: SEPSIS, PLAQUETAS Y ERITROCITOS. PAPEL DE LAS INTERLEUQUINAS 1 β , 6 Y 10

La patogénesis de la microtrombosis vascular, estudiada de forma tradicional en la patología coronaria y cerebrovascular, pero también en la microtrombosis que acompaña a la sepsis grave, se ha interpretado como una forma anómala de hemostasia, en la cual las plaquetas interactúan con el subendotelio, llevando a una adhesión, activación, agregación y reclutamiento plaquetar, acompañado de una formación de fibrina, por activación simultánea de la cascada de la coagulación.

Los estudios sobre la evolución del trombo muestran siempre la participación de diferentes estirpes celulares, que se adhieren al endotelio. Las plaquetas forman el corazón del trombo, aglutinándose con eritrocitos, neutrófilos y finalmente, monocitos. La participación física de múltiples células se pensó en un principio que era un fenómeno pasivo. Sin embargo, diferentes estudios *in vitro* que estudiaron por separado las interrelaciones entre células endoteliales, eritrocitos y neutrófilos, con plaquetas, llevaron a

considerar al fenómeno trombótico, como un grupo de eventos multicelulares. El contacto celular y diferentes niveles de estímulos patológicos, dirigen el desarrollo y la reversibilidad de la trombosis. Marcus ha planteado la hipótesis de que las respuestas tromboticas e inflamatorias están ligadas bioquímicamente como partes de un mecanismo global de defensa del huésped. El comportamiento físico y biológico de una célula, puede verse alterada de forma importante por la presencia de otra célula. Esta alteración puede deberse al contacto directo entre células, o al efecto de los productos secretados por uno o más tipos celulares, especialmente tras su activación por un agonista específico (344).

Diferentes autores, han estudiado de forma profunda el metabolismo transcelular de los eicosanoides. En estas reacciones, una célula utiliza precursores e intermediarios de otra estirpe celular, para producir un nuevo metabolito con funciones completamente nuevas. Estos metabolitos incluyen compuestos que no pueden ser formados por ninguna de éstas células por si mismas. Así, la biosíntesis transcelular de los eicosanoides a través de precursores e intermediarios es una forma importante de la comunicación célula-célula. Este fenómeno ha sido mostrado recientemente en eritrocitos, neutrófilos, plaquetas, células endoteliales y células de músculo liso. El concepto de metabolismo transcelular, ayuda a explicar cuestiones clínicas de la enfermedad trombotica, hasta ahora inexplicadas (345-347).

La existencia de interacciones plaqueta-eritrocito que modulen las funciones de ambos, están descritas en la literatura y las hemos comentado en la introducción. Recordemos que el tiempo de sangría está prolongado en pacientes anémicos, y la corrección de la anemia resulta en una normalización del tiempo de sangría. Tradicionalmente esto se ha atribuido únicamente al ADP liberado desde los eritrocitos dañados; ahora sabemos que la corrección es debida a las propiedades metabólicas de los eritrocitos, que estimulan la activación y el reclutamiento plaquetario. Esta actividad metabólica está provocada por la proximidad del eritrocito a una plaqueta activada.

El sistema desarrollado por las Dras. Santos y Vallés, que nosotros describimos en el apartado de *material y método*, permite una evaluación por separado de la activación y

del reclutamiento plaquetario; esta capacidad es particularmente ventajosa pues el reclutamiento puede ser el componente más importante de la reactividad plaquetaria, especialmente en la trombosis. Los experimentos con suspensiones combinadas de plaquetas y eritrocitos estimuladas con colágeno, trombina o el ionóforo A23187, mostraron que los eritrocitos intactos incrementaron la liberación de serotonina por parte de las plaquetas. Estos resultados ocurrieron incluso cuando el ADP eritrocitario fue eliminado por procedimientos enzimáticos, cuando el sistema fue tratado con aspirina, o cuando se aplicaron simultáneamente los dos procesos previos. Además, los eritrocitos aumentaron la hidrólisis del ácido araquidónico de los fosfolípidos plaquetarios. Esto resultó en un aumento en la liberación de eicosanoides y ácido araquidónico libre, por parte de la plaqueta a la fase fluída. De forma importante, este efecto eritrocitario sobre la liberación de ácido araquidónico provee de un sustrato para el metabolismo transcelular. Un ejemplo de este metabolismo transcelular sería la capacidad de un neutrófilo estimulado en un trombo en formación para generar leucotrieno B4 a partir de este ácido araquidónico liberado. Esta reacción representa una vía por la cual los eritrocitos y/o las plaquetas pueden jugar un papel en la respuesta inflamatoria. Los componentes celulares de un trombo, pueden ser conceptuados como integradores de un “puente metabólico”, el cual, convenientemente estudiado y comprendido, favorecería la obtención de metodologías para el control farmacológico del trombo y de su propagación. De todo lo apuntado previamente, consideraremos a los eritrocitos como células prohemostáticas y protrombóticas (123;234;265;268;297).

Nosotros hemos aplicado el sistema experimental descrito por las Dras. Vallés y Santos, para estudiar la interacción eritrocito-plaqueta en el contexto de la sepsis. Dicho sistema se desarrolla en dos fases, y evalúa el efecto de los eritrocitos sobre la liberación de gránulos densos plaquetares (activación), y sobre la capacidad proagregante de los liberados celulares (reclutamiento).

En primer lugar hemos desarrollado dicho sistema experimental en nuestro laboratorio, para lo cual hemos analizado muestras de donantes sanos, encontrando los mismos resultados descritos en la literatura. Así, cuando la muestra de plaquetas es

estimulada por el sobrenadante procedente de la estimulación con colágeno 1 $\mu\text{g/ml}$ de una mezcla de plaquetas y glóbulos rojos, la agregación plaquetaria, que nos da una medida del reclutamiento plaquetar, es significativamente mayor que cuando el sobrenadante procede de la estimulación de una muestra de plaquetas solas. Asimismo, cuando la muestra estimulada es de sangre total, la capacidad proagregatoria obtenida es mayor a la obtenida con plaquetas solas, pero menor a la obtenida exclusivamente con plaquetas y hematíes.

Estos resultados confirman que los eritrocitos incrementan la actividad agregatoria de las plaquetas. Al mismo tiempo, parece que la presencia de los leucocitos, al menos en estado de reposo, ejerce un papel inhibitorio sobre dicha agregación. Este tema fue estudiado por las Dras. Vallés y Santos, encontrando que la inhibición que ejerce el neutrófilo sobre la reactividad plaquetaria inducida por el colágeno o la trombina, fue específica del estímulo empleado. Las diferencias inducidas por los distintos agonistas se pudieron observar también en la regulación de los eicosanoides que participan en las interacciones plaqueta-neutrófilo. La inhibición que ejercen los neutrófilos sobre la reactividad plaquetaria según estudia este sistema *in vitro*, podría tener implicaciones para la comprensión de los eventos tempranos en la trombosis y en la hemostasia. Los datos aportados por estas autoras sugieren que los neutrófilos poseen la capacidad para modular el inicio y la propagación del trombo plaquetario en desarrollo (321).

Siguiendo con los resultados de nuestro estudio, hemos analizado la activación plaquetaria, a través de la determinación de la liberación de serotonina, componente de los gránulos densos plaquetarios, descrito como un índice fiable de activación plaquetaria. Los resultados obtenidos son paralelos a los obtenidos para el reclutamiento plaquetar. El porcentaje de liberación de serotonina en el sobrenadante del sistema generador formado por plaquetas y glóbulos rojos, fue significativamente superior a la serotonina detectada en el sobrenadante de los sistema generador formado sólo por plaquetas. Las muestras procedentes de los sistemas con sangre total han mostrado un grado de liberación de serotonina significativamente mayor que el de las plaquetas, pero menor que el sistema formado por eritrocitos y plaquetas.

Nuestros resultados se corresponden con lo publicado en la literatura, pero destacamos que la descripción inicial de la técnica, realizaba la cuantificación de la serotonina liberada por medio del marcaje isotópico de las plaquetas con ^{14}C -serotonina, mientras que nosotros hemos realizado la cuantificación de la serotonina por técnicas de radioinmunoensayo (RIA). Por tanto, nuestro estudio representa una aportación interesante por lo que supone una validación de dicha técnica de radioinmunoensayo aplicada a la determinación de la serotonina liberada en análisis de activación plaquetar.

Hemos tenido que limitar el estudio que pretendíamos inicialmente, pues la mayoría de los pacientes recibieron fármacos inhibidores de la función plaquetar. En los pacientes que pudimos analizar, hemos encontrado que tanto la actividad reclutadora como de activación plaquetar, no presenta diferencias significativas con la población sana. Asimismo, los glóbulos rojos procedentes de pacientes sépticos, no presentaron diferencias significativas en su capacidad proagregatoria, al compararlos con los eritrocitos procedentes de la población sana.

La situación metabólica de los eritrocitos, viene modulada en cada contexto clínico, y en el caso de la sepsis, por la presencia de otras células sanguíneas y vasculares, al mismo tiempo que por mediadores humorales, procedentes en su mayoría de dichas células. Las células sanguíneas y endoteliales ejercen por tanto un efecto debido al contacto íntimo célula-célula, y además los gradientes de mediadores humorales que constituyen el microambiente de los eritrocitos, colaboran en la modulación de dicho efecto. El resultado de esta combinación de estímulos, potenciadores e inhibidores, parece que no afecta de forma significativa a la capacidad proagregatoria de los eritrocitos, al menos en la población que nosotros hemos estudiado.

Empleando el mismo procedimiento experimental, se ha descrito que en determinadas circunstancias fisiopatológicas, los eritrocitos presentan una capacidad proagregatoria incrementada, generando *per se* una situación de riesgo protrombótico. Así en los pacientes con hipercolesterolemia, los eritrocitos presentan una capacidad incrementada para estimular la síntesis de tromboxano A_2 (TXA_2) de las plaquetas;

sabemos que esta sustancia tiene propiedades vasoconstrictoras, pudiendo favorecer los procesos isquémicos. El mismo incremento de la síntesis de TXA₂ en presencia de eritrocitos, se detectó en pacientes hipertensos y en los fumadores, siendo este aumento en el caso de los fumadores, dependiente del número de cigarrillos/día consumidos. Cuando se estudian los pacientes diabéticos, encontraron que los eritrocitos incrementan significativamente el reclutamiento plaquetario y la síntesis de TXA₂ por las plaquetas, comprobándose que estos efectos eran debidos a la especial susceptibilidad de las plaquetas diabéticas al efecto protrombótico de los eritrocitos, y a la mayor respuesta de las plaquetas de los pacientes a su propio liberado celular. Los pacientes con mal control metabólico y tiempos largos de evolución de la enfermedad presentan una mayor tendencia a la hiperfunción trombocitaria. Teniendo en cuenta que el reclutamiento plaquetario es una etapa esencial en el crecimiento del trombo, su aumento podría favorecer las complicaciones trombóticas en estos pacientes; de ahí nuestro interés en profundizar en este aspecto de la interacción plaqueta-eritrocito en el contexto protrombótico que es la sepsis (123; 135; 264-269).

Con ánimo de profundizar en los mecanismos reguladores del proceso trombótico en el contexto de la sepsis, estudiamos en el mismo sistema experimental, el papel de las interleuquinas (IL) 1 , 6 y 10 sobre la agregación plaquetaria, y sobre la capacidad proagregatoria de los eritrocitos.

Hemos detectado que la incubación de plasma rico en plaquetas con dosis crecientes de interleuquina-6, durante 30 minutos, indujo un aumento en la agregación plaquetar, dosis-depediente, según pudimos determinar por agregometría óptica. Por su parte, la incubación de plasma rico en plaquetas con dosis de 10 ng/ml de interleuquina-10, produjo un descenso en la agregación plaquetar, que se hizo significativo con dosis de 1000 ng/ml. No hemos observado, por técnicas de agregometría óptica, un efecto de la interleuquina-1 sobre la agregación plaquetar.

Se ha descrito en la sepsis, una respuesta inflamatoria, en la que diferentes mediadores son liberados desde múltiples estirpes celulares, actuando finalmente sobre

células diana, entre ellas las plaquetas. Nuestros resultados sugieren que las plaquetas en la sepsis reciben una serie de estímulos potenciadores e inhibidores, entre los cuales se encuentran la interleuquina-6 y la interleuquina-10, respectivamente. El *status* funcional de las plaquetas vendrá mediado por el balance entre estímulos potenciadores e inhibidores de la función plaquetar. Los pacientes con sepsis no son homogéneos desde el punto de vista inflamatorio, es decir, ha sido descrita una respuesta inflamatoria diferente según el germen causante de la sepsis, o según el foco de la infección, de forma que el *timing* en la liberación de los diferentes mediadores se modificará sustancialmente. Nuestros resultados que no encuentran variaciones entre la población séptica y los controles, hay que entenderlos como limitados a la población estudiada. De forma que en otras presentaciones clínicas de la sepsis, podría existir una respuesta inicial diferente a la hallada por nosotros, en función de que predominara un estímulo potenciador u otro inhibidor de la función plaquetar.

La interleuquina-6 es una citoquina fundamentalmente proinflamatoria, que se ha correlacionado con la mortalidad en diferentes estudios, así Hack *et al.* y Goldie *et al.* han descrito como niveles de IL-6 en los sueros de pacientes sépticos superiores a 1000 ng/ml y 3000 ng/ml respectivamente, se asociaron a un incremento de la mortalidad. Sólo en aquellos pacientes con valores extremadamente elevados de IL-6, esta citoquina alcanza una correlación con la mortalidad (348;349).

La interleuquina-10 ha sido descrita de forma tradicional como una citoquina antiinflamatoria, aunque también posee algún efecto inmunoestimulador. La IL-10 inhibe la expresión del factor tisular en las células mononucleares; el factor tisular es el principal responsable de la activación de la vía extrínseca de la coagulación. De forma interesante, recientemente se ha realizado un estudio acerca del mejor pronóstico de la sepsis en las mujeres, encontrando, entre otros múltiples mecanismos fisiopatológicos posibles, que las mujeres presentan una mayor producción de IL-10 que los hombres, en presencia de un estímulo inflamatorio similar (350-352).

No ha sido el objetivo de nuestro estudio, pero se nos presenta interesante el análisis de la asociación en los pacientes sépticos entre los niveles de interleuquinas y los marcadores de activación plaquetar, aunque en un proceso multifactorial, como es la sepsis, un mediador forma parte de un complejo entramado, difícilmente justificando por sí mismo los eventos finales del proceso séptico. Este es el origen del fracaso de los ensayos clínicos en sepsis, que se centran en el aporte de una molécula consumida, o en la inhibición de un factor proinflamatorio.

Siguiendo con los resultados obtenidos en nuestros experimentos, hemos determinado el efecto que la incubación con las interleuquinas 1, 6 y 10 produce sobre la capacidad proagregatoria de los eritrocitos, determinando que la incubación de eritrocitos durante 30 minutos con la interleuquina-6, ha resultado en una inhibición significativa de la capacidad protrombótica de los eritrocitos, medida tanto por una disminución del reclutamiento plaquetar, como por una disminución de la activación plaquetar determinada a través de la liberación de serotonina. Dicha inhibición ha sido independiente de las dosis de interleuquina-6 empleadas. Tanto la incubación con interleuquina-1 como con interleuquina-10, no ha producido ningún efecto detectable sobre la capacidad protrombótica de los eritrocitos.

Los resultados mostrados son especialmente interesantes, pues así como previamente hemos descrito el papel modulador que ejercen la interleuquina 6 y la interleuquina 10 sobre la función plaquetar, que son potenciador e inhibidor respectivamente, ahora describimos cómo una misma citoquina, la interleuquina 6 puede ejercer ambos papeles. Es decir, la interleuquina-6 directamente sobre la plaqueta, induce una activación de la misma, pero a través de su efecto sobre los eritrocitos, observamos que ejerce una modulación negativa de la capacidad proagregante de los mismos.

Ante los resultados obtenidos, en los que se detecta una interacción entre una citoquina y la capacidad proagregatoria del eritrocito, sería interesante conocer el mecanismo molecular a través del cual se produce este proceso. En la literatura reciente, diferentes autores han investigado la existencia de receptores eritrocitarios para las

citoquinas, describiendo el Human Erythrocyte Chemokine Receptor (HECR), que se ha identificado como el antígeno del grupo sanguíneo Duffy –Duffy Antigen Receptor for Chemokins (DARC)-, que constituye el receptor de superficie para el parásito de la malaria *Plasmodium vivax*, y progresivamente se ha ido describiendo como receptor de un grupo de proteínas: el Melanoma Growth Stimulating Activity (MGSA), el Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), el RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), y la Interleuquina 8 (353;354). Nuestros resultados suscitan el estudio que profundice en el mecanismo de acción de la IL-6 sobre la función proagregante de la plaqueta, y dilucide si está implicado dicho receptor .

Estos hallazgos, nos ayudan a profundizar en los diálogos intercelulares que ocurren en una situación fisiopatológica compleja como es la sepsis, en la que ya el contacto célula-célula, o los mecanismos de comunicación humoral entre células, regulan una respuesta final de la que podría depender la evolución del paciente. Nuestros estudios experimentales, dan algo más de luz a las interacciones eritrocito-plaqueta en el contexto clínico de la sepsis, pero no introduce este sistema experimental a neutrófilos ni monocitos, células pivotes del sistema inmunológico, que juegan un papel fundamental en la respuesta inmunológica de la sepsis. Asimismo, tampoco se está teniendo en cuenta a la célula endotelial, cuya lesión/activación ha demostrado que puede iniciar todo el proceso que desencadena en la trombosis microvascular y en el paro circulatorio, que serían el sustrato anatomopatológico de la disfunción multiorgánica (355;356).

Por otro lado, los resultados obtenidos en nuestros experimentos presentan las limitaciones de las técnicas empleadas. Así, se ha descrito que en los concentrados de plaquetas conservados en bancos de sangre, a medida que pasan los días los leucocitos van liberando citoquinas, detectándose niveles elevados de las siguientes citoquinas, factor de necrosis tumoral- α , interleuquinas 1 α , IL-6, e IL-8, demostrándose un aumento paralelo en los marcadores de activación plaquetar (P-selectina) determinado por % de células positivas y por intensidad de fluorescencia media. Aplicando técnicas de citometría de flujo se ha detectado en experimentos *in vitro* sobre plasma rico en plaquetas, que la interleuquina 1 induce la expresión de P-selectina en plaquetas no activadas y potencia tanto la expresión

de P-selectina como la internalización del Gp Ib en las plaquetas activadas con trombina, y sugiere que la interleuquina-1 puede provocar la activación plaquetar en concentrados de plaquetas (357).

La sepsis se asocia con alteraciones hemodinámicas y de la microcirculación. Estos cambios son en parte debidos a la respuesta inflamatoria sistémica generada por la infección. Diferentes estudios han aportado que los glóbulos rojos de los pacientes sépticos presentan una disminución de su deformabilidad, que puede contribuir a las alteraciones descritas. La deformabilidad de los eritrocitos se refiere a su capacidad para cambiar su forma en respuesta a las fuerzas aplicadas sobre él, y puede ser determinada por varios métodos, entre otros: aspiración por micropipeta, filtración por microporo, observación de eritrocitos sometidos al fuerzas de cizallamiento, estando aceptado que la deformabilidad es un determinante importante del flujo sanguíneo, especialmente en la microcirculación. El comportamiento bioquímico y biomecánico de los glóbulos blancos también está alterado en la sepsis, pudiendo influir en los resultados de los estudios de la deformabilidad de los eritrocitos.

Kirschenbaum *et al.* en un estudio reciente, han examinado los efectos en la filtración celular, lo cual es una medida de la reología celular a nivel microvascular, de los cambios de la agregación de eritrocitos y su deformabilidad, la deformabilidad de los leucocitos y las interacciones leucocito-plaqueta durante la sepsis. La viscometría confirmó que los glóbulos rojos de los pacientes sépticos presentan una deformabilidad disminuída y una agregación eritrocitaria incrementada; igualmente detectaron un descenso en la deformabilidad de los leucocitos. Las interacciones plaqueta-leucocito, determinadas por CMF emplando los marcadores plaquetarios CD41 y CD63, y el marcador leucocitario CD66b, detectó una elevación de los marcadores de activación plaquetar y de los agregados leuco-plaquetares en los pacientes sépticos. Todos estos hallazgos justifican que se hubiera detectado una mayor viscosidad en la sangre total de los pacientes sépticos; dicha alteración reológica puede contribuir a la presencia de un flujo sanguíneo alterado en la microvasculatura de los pacientes con sepsis (358).

A las anomalías reológicas que se detectan en el experimento descrito, habrá que añadir la unión entre los componentes de la membrana de las células sanguíneas, con sus correspondientes receptores en la membrana del endotelio. Recientemente, se ha publicado además, que la endotoxina *per se* promueve la adhesión de los glóbulos rojos al endotelio (359). Todos estos datos apoyan la hipótesis del paro circulatorio en la microvasculatura, como sustrato de la disfunción multiorgánica en la sepsis.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En los pacientes con sepsis grave, hemos encontrado una elevación significativa en los marcadores de activación plaquetaria estudiados, con respecto a la sepsis no grave. Dichos marcadores de activación son: el receptor para el fibrinógeno (GP IIb/IIIa activado o PAC-1), el marcador de secreción plaquetar P-selectina, el índice de agregados plaquetares y el índice de agregados leucoplaquetares. Esto supone que las plaquetas en la sepsis grave circulan en un estado de mayor activación, induciendo una situación protrombótica en la vasculatura. Además, de forma interesante, la P-selectina, el PAC-1 y el índice de agregados plaquetares, se han correlacionado con el grado de disfunción multiorgánica medido con la escala SOFA. También la expresión de PAC-1 y P-selectina, se han asociado con la mortalidad de los pacientes sépticos, con un valor predictivo limitado. Los resultados de nuestro estudio otorgan un papel a la activación plaquetar en el complejo proceso de la disfunción multiorgánica, apoyando la hipótesis de la trombosis microvascular y el paro circulatorio como sustrato del síndrome de disfunción multiorgánica.
2. Los eritrocitos incrementan la reactividad plaquetaria, determinada tanto por un aumento en la activación, como en el reclutamiento plaquetario; es decir, confirmando los datos de la literatura, el eritrocito es una célula con potencial protrombótico. Mientras la interleuquina 1 no ha presentado efectos sobre la agregación plaquetar, hemos encontrado que la interleuquina-6 indujo un aumento dosis-dependiente en la agregación plaquetar, demostrando una acción estimuladora de la función plaquetar. Por su parte, la incubación de plaquetas con dosis altas de interleuquina-10, produjo un descenso en la agregación plaquetar, es decir, posee una acción inhibidora de la función plaquetar. Estudiando el papel de dichas interleuquinas sobre la capacidad protrombótica de los hematíes, encontramos que mientras las IL-1 e IL-10, no han producido ningún efecto detectable sobre dicha capacidad, de forma interesante, la

incubación de eritrocitos con interleuquina-6, ha resultado en una inhibición significativa de la capacidad proagregante de estos eritrocitos, medida tanto por un descenso en la activación, como en el reclutamiento plaquetar. Nuestros resultados, ponen de manifiesto la complejidad del coloquio intercelular en la sepsis, y en particular nos muestran cómo mediadores derivados del leucocito activado, van a modular no sólo la función plaquetar, sino también la comunicación entre eritrocitos y plaquetas.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

1. Livingstone DH, Mosenthal AC, Deith EA. Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horizons* 1995(3):257-66.
2. Members of the American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-74.
3. Gómez-Jimenez J, Martín MC, Sauri R, Segura RM, Esteban F, Ruiz JC et al. Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J Infect Dis* 1995(171):472-5.
4. Saba et al. Microaggregation hypothesis of multiple organ failure. In: Mosby, editor. *Multiple system organ failure-pathogenesis and management*-. St Louis: 1992. p. 115-22.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Increase in national hospital discharge survey rates for septicemia -United States 1979-1989. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1990;39:31-4.
6. Vincent JL. Definition and pathogenesis of septic shock. *Chest* 1987;91:883-7.
7. Wiles JB, Cerra FB, Siegel JH, Border JR. The systemic septic response: does the organism matter? *Crit Care Med* 1980;8:55-60.
8. Wong dt, Wagner DP, Knaus WA. Lower ICU mortality in septic shock due to urosepsis compared to non-urosepsis. *Anesthesiology* 1992;77.
9. Bone RC, Fischer CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, et al. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989;17:389-93.
10. Bone RC, Fischer CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, et al. The methylprednisolone severe sepsis study group: a controlled clinical trial of high dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Eng J Med* 1987;317-53.
11. Vincent JL. Sepsis and septic shock: update on definitions. In: Reinhart K, Eyrich K, Sprung C, editors. *Sepsis. Current perspectives in pathophysiology and therapy*. Berlin: Springer -Verlag; 1994. p. 3-15.
12. Pittet D, Rangel-Frausto S, Li N, Tarara D, et al. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med* 1995;21:302-9.

13. Salvo I, de Cian W, Musicco M, et al. The Italian sepsis study group: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 1995;21S:244-9.
14. Rangel-Frausto S, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995;273:117-23.
15. Neame D. Thrombocytopenia in septicemia: the role of disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1980;56:88-92.
16. Kelton J. Elevated platelet-associated IgG in the thrombocytopenia of septicemia. *N Engl J Med* 1979;300:760-4.
17. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, et al. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995;23:1638-52.
18. Bernard GR, Doig G, Hudson G, et al. Quantification of organ dysfunction for clinical trials in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151.
19. Le Gall JR, Klar J, Lemeshow S, et al. The Logistic Organ Dysfunction System. A new way to assess organ dysfunction in the Intensive Care Unit. *JAMA* 1996;276:802-10.
20. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996;22:707-10.
21. Thijs LG, Groeneveld AB, Hack CE. Multiple organ failure in septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;216:209-37.
22. Zimmerman JE, Knaus WA, Wagner DP, et al. A comparison of risks and outcomes for patients with organ system failure: 1982-1990. *Crit Care Med* 1990; 24: 1633-41.
23. Vincent JL. The immune response in critical illness: Excessive, Inadequate or Dysregulated. In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 12-21.
24. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. The pro-inflammatory cytokine cascade. In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 37-66.
25. Bruin KF, von der Möhlen MAM, van Deventer SJH. Endotoxemia and sepsis: important roles for lipopolysaccharide binding protein and CD14 in endotoxin signal transduction. In: Reinhart K, Eyrich K, Sprung C, editors. *Sepsis: current perspectives in pathophysiology and therapy*. Berlin: Springer-Verlag; 1994. p. 53-60.

26. Gray PW, Corcorran AE, Eddy RL, Byers MG, Shows TB. The genes for lipopolysaccharide binding protein (LPS) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics* 1993;15:188-90.
27. Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, Ulevitch RJ. Plasma lipopolysaccharide binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol* 1992;149:200-6.
28. Danner RL, Elin BL, Hosseini JM. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-175.
29. Martín MC. Estudio de los mediadores de la respuesta inflamatoria sistémica en los pacientes con sepsis grave [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona; 1998.
30. McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, et al. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1994;121:1-5.
31. Beutler B. Tumor necrosis factor and other cytokines in septic syndrome. In: Reinhart K, Eyrich K, Sprung C, editors. *Sepsis: current perspectives in pathophysiology and therapy*. Berlin: Springer-Verlag; 1994. p. 53-60.
32. Jansen MJJM, Hendriks H, Hermsen R, van der Meer JWM, Goris RJA. A monoclonal antibody against tumor necrosis factor improves survival in experimental multiple organ dysfunction syndrome. *Cytokine* 1998;10:904-10.
33. Amiot F, Fitting C, Tracey KJ, Cavaillon JM, Dautry F. LPS-induced cytokine cascade and lethality in LT -TNF- deficient mice. *Mol Med* 1997;3:864-75.
34. Noursadeghi M, Cohen J. The acute phase response and enhancing resistance to bacterial infection. In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 116-39.
35. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-18: two cytokine precursors for interleukin-1 converting enzyme (Caspase-1). In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 84-96.
36. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol today* 1990;11(12):443-53???
37. Heinzl FP. The role of interferon-gamma in the pathology of experimental endotoxemia. *J Immunol* 1990;145:2920-4.
38. Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Evidence for IFN-gamma as a mediator of lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992;149:1666-70.

39. Ryffel B. Interleukin-12: role of interferon-gamma in IL-12 adverse effects. *Clin Immunol Immunopath* 1997;83:18-20.
40. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993;365:756-9.
41. Waring P, Wycherley K, Cary D, Nicola N, Metcalf D. Leukemia inhibitor factor levels are elevated in septic shock and various inflammatory body fluids. *J Clin Invest* 1992;90:2031-7.
42. Guillet C, Fourcin M, Chevalier S, Pouplard A, Gascan H. ELISA detection of circulating levels of LIF, OSM and CNTF in septic shock. *Ann NY Acad Sci* 1995;762:407-12.
43. Bone RC. Why sepsis trials fail. *JAMA* 1998;276:565-6.
44. Muñoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991;88:1747-54.
45. Calandra T, Heumann D. Inhibitory cytokines. In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 67-83.
46. Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* 1997;17:1-32.
47. Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopath* 1997;85:16-20.
48. Manna SK, Aggarwal BB. IL-13 suppresses TNF-induced activation of nuclear factor- κ B, activation protein-1, and apoptosis. *J Immunol* 1998;161:2863-72.
49. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Intern Rev Immunol* 1998;16:457-99.
50. Krakauer T, Vilcek J, Oppenheim JJ. Proinflammatory cytokines. TNF and IL-1 families, chemokines, TGF- β , and others. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p. 775-811.
51. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Tumor necrosis factor receptors in systemic inflammation. In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 365-84.
52. Barber AE, Coyle SM, Marano MA, et al. Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J Immunol* 1993;150:1999-2006.
53. Villavicencio RT, Billiar TR. The role of the nitric oxide in the initiation of inflammation in shock. In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 182-9.

54. Anderson BO, Bensard DD, Harken AH. The role of platelet activating factor and its antagonists in shock, sepsis and multiple organ failure. *Surgery* 1991;172:415-24.
55. Fink MP. Therapeutic options directed against platelet activating factor, eicosanoids and bradykinin in sepsis. *J Antimicrobial Chem* 1998;41(suppl.A):S81-S94.
56. Dhainaut JF, Mira JP, Fiérobe L. Platelet-activating factor: pathophysiological changes and therapeutic implications in sepsis. In: Reinhart K, Eyrich K, Sprung C, editors. *Sepsis: current perspectives in pathophysiology and therapy*. Berlin: Springer-Verlag; 1994. p. 53-60.
57. Gando S, Kamene T, Nanzaki S, Nakanishi Y. Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 1996;75:224-8.
58. Hinshaw LB. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 1996;24:61-9.
59. Opal SM. The interaction between the coagulation system and the systemic inflammatory mediators. In: Marshall JC, Cohen J, editors. *Immune response in the critically ill*. Heidelberg: Springer; 2000. p. 280-91.
60. Gando S, Smanzaki S, Sasaki S, Aoi K, Kemmotsu O. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 1998;26:2005-9.
61. Vervloet NG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemostasis* 1998;24:33-4.
62. Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 1993;270:975-9.
63. Nuijens JH, Huijbregts CE, Erenberg-Belmer AJ, et al. Quantification of plasma factor XIIa C1-inhibitor and kallikrein-C1-inhibitor complexes in sepsis. *Blood* 1988;72:1841-8.
64. Coughlan AF, Hau H, Dunlop LC, Berndt MC, Hancock WW. P-selectin and platelet-activating factor mediate initial endotoxin-induced neutropenia. *J Exp Med* 1994;179:329-34.
65. Lim YC, Snapp K, Kansas GS, Camphaysen R, Ding H, Luscinskas FW. Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1 mediated secondary capture of human monocyte adhesin to P-selectin, E-selectin, and TNF-alpha-activated endothelium under flow in vitro. *J Immunol* 1998;161:2501-8.

66. Borges E, Eytner R, Moll T, et al. The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood* 1997;90:1934-42.
67. Uchida M, Okajima K, Murakami K. of various doses of antithrombin III and endotoxin induced endothelial cell injury and coagulation abnormalities in rats. *Thromb Res* 1998;89:233-41.
68. Fourrier F, Chopin C, Goudemad J, et al. Septic shock, multi-organ failure, and disseminated intravascular coagulation: compared to patterns of antithrombin III, protein C and protein S deficiencies. *Chest* 1992;101:816-23.
69. Yan SB, Grinnell BW. Recombinant human protein C, protein S and thrombomodulin as antithrombotics. *Prosp Drug Disc Design* 1993;1:503-20.
70. Bajaj MS, Bajaj SP. Tissue factor pathway inhibitor: potential therapeutic applications. *Thromb Haemost* 1997;78:471-7.
71. Spaet TH. Platelets: the blood dust. In: Wintrobe MM, editor. *Blood, pure and eloquent*. New York: McGraw-Hill; 1980.
72. Bizzozzero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *Osservatore* 1881;17:785-7.
73. Oxholm P, Wintherk K. Thrombocyte involvement in immune inflammatory reactions. *Allergy* 1986;41:1-10.
74. Honn KV, Tang DG, Chen YQ. Platelets and cancer metastasis -more than an epiphenomenon. *Semin Thromb Hemostasis* 1992;18:392-415.
75. Díaz-Ricart M, Escolar G, Ordinas A. Composición química y funciones de las plaquetas. In: Pujol-Moix N, editor. *Trombocitopenias*. Barcelona: Mosby/Doyma; 1995. p. 11-44.
76. Frojmovic M, Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J* 1976;16:1071-89.
77. White JG. Platelet ultrastructure. In: Bloom AL, Thomas DP, editors. *Haemostasis and thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987. p. 20-46.
78. Pujol-Moix N. Anatomía de las plaquetas. Interrelaciones estructura-función. In: Pujol-Moix N, editor. *Trombocitopenias*. Barcelona: Mosby/Doyma; 1995. p. 3-10.
79. Bennett JS. The molecular biology of platelet membrane proteins. *Blood* 1991;27:186-204.

80. Peerschke EI. Platelet membrane glycoproteins: Functional characterization and clinical applications. *Am j Clin Pathol* 1992;98:455-63.
81. Hynes RO. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb Haemost* 1991;66:40-3.
82. Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins and their clinical aspects. In: Verstraete M, Vermeylen J, Kijnen R, Arnout J, editors. *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven (Belgium): Leuven University Press; 1987. p. 93-125.
83. Newman PJ. Platelet GPIIb-IIIa: molecular variations and alloantigens. *Thromb Haemost* 1991;66:111-8.
84. McEver RP. Novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thromb Haemost* 1991;65:223-8.
85. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, et al. PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989;59:305-12.
86. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990;3:550-4.
87. *Leucocyte Typing V: white cell differentiation antigens*. Oxford: Oxford University Press; 1995.
88. Blann AD, Lip GYH. Hypothesis: is soluble p-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* 1997;128:135-8.
89. Blann AD, Lip GYH, Beevers DG, McCollum CN. Soluble p-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb Haemost* 1997;77:1077-80.
90. Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985;318:470-2.
91. Okita T, Pidar D, Newman PJ, Montgomery RG, Kunicki TJ. On the association of glycoprotein Ib and actin-binding protein in human platelets. *J Cell Biol* 1985;100:317-21.
92. Jandrot-Perrus M, Huisse MG, Ternisen C, Bexaud A, Guillin MC. Thrombin binding to platelet membrane glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 1992;18:261-6.
93. Solum NO, Olsen TM. Effects of diamide and dibucaine on platelet glycoprotein Ib, actin-binding protein and cytoskeleton. *Biochem Biophys Act* 1985;817:249-60.

94. Hindriks G, Ijsseldijk MJ, Sonnenberg A, Sixma JJ, De-Groot PG. Platelet adhesion to laminin: role of Ca^{+2} and Mg^{+2} ions; shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 1992;79:928-35.
95. Willette RN, Storer BL, Clark RK, Ohstein EH. Human laminin produces human platelet aggregation in vitro. *Life Sci* 1994;55:379-88.
96. Peerschke EI, Zucker MB, Grant RA, Egan JJ, Johnson MM. Correlation between fibrinogen binding to human platelets and aggregability. *Blood* 1980:841-7.
97. Fujimura K, Fujimoto T, Takemoto M, et al. Analysis of plateletcytoeskeleton assembly during platelet activation in Hermansky-Pudlak syndrome and thrombasthenia. *Thromb Haemost* 1990;63:103-11.
98. Peerschke EI. The platelet fibrinogen receptor. *Semin Hematol* 1985;22:241-59.
99. Shattil SJ. Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin alpha-IIIb-beta-3. *Thromb Haemost* 1993;70:47-60.
100. Gartner TK, Amrani DL, Derrick JM, Kirschbaum NE, Matsueda GR, Taylor DB. Characterization of adhesion of resting and stimulated platelets to fibrinogen and its fragments. *Thromb Haemost* 1993;71:47-60.
101. Banga HS, Simons ER, Brass LF, Rittenhouse SE. Activation of phospholipases A and C in human platelets exposed to epinephrine: role of glycoproteins IIb/IIIa and dual role of epinephrine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9197-201.
102. Sultan C, Plantavid M, Bachelot C, et al. Involvement of platelet glycoprotein IIb-IIIa in thrombin-induced synthesis of phosphatidylinositol 3',4'-biphosphate. *J Biol Chem* 1991;266:23554-7.
103. Daniel JL, Dangelmaier C, Strouse R, Smith JB. Collagen induces normal signal transduction in platelets deficient in CD36 (platelet glycoprotein-IV). *Thromb Haemost* 1994;71:353-6.
104. Bennet JS, Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 1979;64:1393-406.
105. Colman RW. Surface mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J Clin Invest* 1984;73:1249-56.
106. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin, endoperoxides, tromboxan A_2 , and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979;30:293-331.
107. Furman MI, Gardner TM, Goldschmidtclermont PJ. Mechanisms of cytoeskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993;70:229-32.

108. Hathaway DR, Adelstein RS. Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1653-7.
109. Holmsen H. Platelet secretion. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Company; 1994. p. 390-2.
110. Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor. *J Biol Chem* 1994;269:13874-9.
111. Breton-Gorius J, Vainchenker W. Expression of platelet proteins during the in vitro and in vivo differentiation of megakaryocytes and morphological aspects of their maturation. *Semin Hematol* 1986;23:43-67.
112. Niewiarowski S, Walz DA, James P, Rucinski B, Kueppers F. Identification and separation of secreted platelet proteins by isoelectric focusing. Evidence that low affinity platelet factor 4 is converted to α -thromboglobulin by limited proteolysis. *Blood* 1980;55:453-6.
113. Niewiarowski S. Secreted platelet proteins. In: Bloom AL, Thomas DP, editors. *Haemostasis and thrombosis*. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1987. p. 90-100.
114. Packham MA, Mustard JF. Normal and abnormal platelet activity. In: Lasslo A, editor. *Blood platelet function and medicinal chemistry*. New York: Elsevier Biomedical; 1984. p. 61-128.
115. Regañon E, Aznar J, Vila V. Interacción del fibrinógeno con las plaquetas. *Sangre* 1985;30:449-57.
116. Adams JC, Lawler J. Diverse mechanisms for cell attachment to platelet thrombospondin. *J Cell Sci* 1993;104:1061-71.
117. Kennedy SD, Igarashi Y, Kickler TS. Measurement of in vitro p-selectin expression by flow cytometry. *Am j Clin Pathol* 1997;107:99-104.
118. Hillis LD, Lange RA. Serotonin and ischemic heart disease. *N Eng J Med* 1991;324:688-90.
119. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993;7:516-22.
120. Botting R, Vane JR. Mediators and the anti-thrombotic properties of the vascular endothelium. *Ann Med* 1989;21:31-8.

121. Zimmerman GA, McIntire TM, Prescott SM. Production of platelet-activating factor by human vascular endothelium cells: evidence for a requirement for specific agonists and modulation by prostacyclin. *Circulation* 1985;72:718-27.
122. Díaz-Ricart M, Escolar G, Ordinas A. Composición química y funciones de las plaquetas. In: Pujol-Moix N, editor. *Trombocitopenias*. Barcelona: Mosby/Doyma; 1995. p. 11-44.
123. Santos MT. Modulación de la reactividad plaquetaria por los eritrocitos. Nuevos aspectos del papel de los hematíes en la fisiopatología de la hemostasia y la trombosis [Tesis doctoral]. Universidad de Valencia; 1995.
124. Collier BS. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: Frozzard HA, et al, editors. *The heart and cardiovascular system*. New York: Raven Press; 1992. p. 219-73.
125. Pujol-Moix N. *Trombocitopenias*. Barcelona: Mosby/Doyma; 1995.
126. Kessler CM, Floyd CM, Rick ME, Krizer DM, Lee SL, Gralnick HR. Collagen-factor VIII/von Willebrand factor protein interaction. *Blood* 1984;63:1291-8.
127. Leung L, Nachman R. Molecular mechanisms of platelet aggregation. *Annu Rev Med* 1986;37:179-86.
128. White JG. Shape change. *Thromb Diath Haemorrh* 1974;60:159-71.
129. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927-9.
130. Ingerman-Wojenski CM, Smith JB, Silver MJ. Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP and accumulation of radiolabeled platelets. *J Lab Clin Med* 1983;101:44-52.
131. Holmsen H. Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Inv* 1994;24:3-8.
132. Marcus AJ. Multicellular control mechanisms of platelet reactivity: new concepts in thromboregulation. *Coron Artery Dis* 1991;2:152-6.
133. Vermylen J, Verstraete M, Fuster V. Role of platelet activation and fibrin formation in thrombogenesis. *J Am Coll Cardiol* 1986;8(2B):9B.
134. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Biochem Biophys Act* 1983;736:57-66.
135. Vallés J, Santos MT, Villa P, Fernández MA. Platelet function in patients with chronic coronary disease on long-term anticoagulant therapy: effect of anticoagulant stopping. *Haemostasis* 1993;23:212-8.

136. Brass LF, Hoxie JA, Manning DR. Signalling through G-proteins and G-protein coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993;70:217-23.
137. Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989;74:1181-95.
138. Feinstein MB, Zavoico GB, Halenda SP. Calcium and cyclic AMP: antagonistic modulators of platelet function. In: Longenecker GL, editor. *The platelets. Physiology and pharmacology*. San Diego: Academic; 1985. p. 237-62.
139. Pumiglia KM, Huang CK, Feinstein MB. Elevation of cAMP, but not cGMP, inhibits thrombin-stimulated tyrosine phosphorylation in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:738-45.
140. Shattil SJ. Signalling through platelet integrin IIb 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost* 1999;82(2):318-25.
141. Lapetina E. Activación plaquetaria: mecanismos de transmisión. In: López-Borrascá A, Arocha-Piñango CL, Campos-Guerra CC, et al, editors. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. 1 ed. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992. p. 122-31.
142. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *TIBS* 1992;17:383-7.
143. Sternweis PC, Smrcka AV. Regulation of phospholipase C by G proteins. *TIBS* 1992;17:502-6.
144. Banno Y, Nakashima S, Tohmatsu T, Nozawa Y, Lapetina EG. GTP and GDP will stimulate platelet cytosolic phospholipase C independently of Ca²⁺. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140:728-34.
145. Baldassare JJ, Fisher GJ. Regulation on membrane-associated and cytosolic phospholipase C activities in human platelets by guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 1986;261:11942-4.
146. Broekman MJ. Endogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidylinositol, and phosphatidic acid in stimulated human platelets. *Methods Enzymol* 1989;169A:415-30.
147. Guinebault C, Payrastre B, Mauco G, Breton M, Plantavid M, Chap H. Rapid and transient translocation of PLC-gamma 1 to the cytoskeleton of thrombin-stimulated platelets. Evidence for a role of tyrosin kinases. *Cell Mol Biol* 1994;40:687-93.
148. Ware JA, Smith M, Salzman EW. Synergism of platelet-aggregating agents. Role of elevation cytoplasmic calcium. *J Clin Invest* 1987;80:267-71.
149. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984;308:693-8.

150. Rana RS, Hokin LE. Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol Rev* 1990;70:115-64.
151. Radomski M, Palmer R, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:1482-9.
152. Marcus AJ, Hajjar DP. Vascular transcellular signaling. *J Lipid Res* 1993;34:2017-31.
153. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanism of actions. *Biochem J* 1989;259:315-24.
154. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 1993;263:F181-F191.
155. Vane JR, Flower RJ, Botting R. History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke* 1990;21:12-23.
156. Serhan CN. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochem Biophys Act* 1994;1212:1-25.
157. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochem Biophys Act* 1992;1128:117-31.
158. Hill E, Fitzpatrick F, Murphy RC. Biological activity and metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in the human platelet. *Br J Pharmacol* 1992;106:267-74.
159. Chester AH, Allen SP, Tadjkarimi S, Yacoub MH. Interaction between thromboxane-A₂ and 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human coronary arteries. *Circulation* 1993;87:874-80.
160. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Eng J Med* 1994;330:1287-94.
161. Patrono C, Ciabattoni G, Davi G. Thromboxane biosynthesis in cardiovascular diseases. *Stroke* 1990;21:130-3.
162. Moncada S, López P. Función de la pared vascular. El endotelio vascular: prostaciclina y óxido nítrico. In: López-Borrasca A, Arocha-Piñango CL, Campos-Guerra CC, editors. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. 1st ed. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992. p. 587-618.
163. Marcus AJ. Eicosanoids: transcellular metabolism. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1988. p. 129-37.

164. Schafer AI, Crawford DD, Gimbrone MA Jr. Unidirectional transfer of prostaglandin endoperoxides between platelets and endothelial cells. *J Clin Invest* 1984;73:1105-12.
165. Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB. Formation of leukotrienes and other acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biophys Res Commun* 1982;109:130-7.
166. Hadjagapiou C, Spector AA. 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid reduces prostacyclin production by endothelial cells. *Prostaglandins* 1986;31:1135-44.
167. Bizzozzero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *Osservatore* 1881;17:785-7.
168. George JN, Shattil SJ. The clinical importance of the bleeding time. *N Eng J Med* 1991;324:27-9.
169. Wu KK, Hoak JC. Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. *Stroke* 1975;6:521-6.
170. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987;70:307-11.
171. Givan AL. *Flow cytometry. First principles*. New York: Wiley-Liss; 1992.
172. Ejim OS, Powling MJ, Dandona P, Kernoff PB, Goodall AH. A flow cytometric analysis of fibronectin binding to platelets from patients with peripheral vascular disease. *Thromb Res* 1990;58:519-24.
173. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87(12):4925-36.
174. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tshcope 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.
175. George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N et al. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during Adult Respiratory Distress Syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986;78:340-8.
176. Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and p-selectin expression. *Semin Thromb Hemostasis* 1995;21:146-51.

177. Michelson AD, Benoit SE, Kroll MH, Li JM, Rohrer MJ, Kestin AS et al. The activation-induced decrease in the platelet surface expression of the glycoprotein Ib-IX complex is reversible. *Blood* 1994;83:3562-73.
178. Woods VL Jr, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986;261:15242-51.
179. Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Coagulation factor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flow cytometric study. *Thromb Haemost* 1992;68:2554-65.
180. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometric study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood* 1993;81:2554-65.
181. Frojmovic M. Flow cytometric analysis of platelet activation and fibrinogen binding. *Platelets* 1996;7:9-21.
182. Ugarova TP, Budzynski AZ, Shattil SJ, Ruggeri ZM, Ginsberg MH. Conformational changes in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein GpIIb/IIIa. *J Biol Chem* 1993;268:21080-7.
183. Metzelaar MJ, Clevers HC. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* 1992;68:378-82.
184. Febbraio M, Silverstein R. Identification and characterisation of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem* 1990;265:18531-7.
185. Silverstein R, Febbraio M. Identification of lysosome-associated membrane protein-2 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *Blood* 1992;80:1470-5.
186. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood* 1994;80:143-52.
187. Wall JE, Buijs Wilt M, Arnold JT, Wang W, White MM, Jennings LK et al. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995;89:380-5.
188. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface p-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(21):11877-82.

189. Janes SL, Wilson DJ, Cox AD, Chronos NA, Goodall AH. ADP causes partial degranulation of platelets in the absence of aggregation. *Br J Haematol* 1994;86(3):568-73.
190. Andrioli G, Ortolani R, Fontana L, Gaino S, Bellavite P, Lechi C et al. Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension. *J Hypertens* 1996;14:1215-21.
191. Polley MJ, Phillips ML, Wayner E, Nudelman E, Singhal AK, Hakomori SI et al. CD62P and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognise the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6224-8.
192. Ruf A, Patscheke H. Platelet induced neutrophil activation: platelet expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11c/CD18. *Br J Haematol* 1995;90:791-6.
193. Diacovo TG, de Fourgerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994;94:1243-51.
194. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990;75(1):128-38.
195. Yano Y, Kambayashi JI, Kawasaki T, Sakon M. Quantitative determination of circulating platelet microparticles by flow cytometry. *Intern J Cardiol* 1994;47(supl 1):S13-S19.
196. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP et al. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994;84:3691-9.
197. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. *JAMA* 1910;60:1183-92.
198. Hellem AJ, Borchgrevink CF, Ames SH. The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Haematol* 1961;7:42-50.
199. Livio M, Gotti E, Marchesi D, Mecca G, Remuzzi G, Gaetano DG. Uraemic bleeding: role of anemia and beneficial effect of red cell transfusions. *Lancet* 1982;2(1113):1115.
200. Fernández F, Goudable C, Sie P, et al. Low hematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusions. *Br J Haematol* 1985;59:139-48.
201. Small M, Lowe GDO, Cameron E, Forbes CD. Contribution of the haematocrit to the bleeding time. *Haemostasis* 1983;13:379-84.

202. Gerrard JM, Docherty JC, Israels SJ, et al. Reassessment of the bleeding time: association of age, hematocrit, platelet function, von Willebrand factor, and bleeding time, thromboxane B2 with the length of the bleeding time. *Clin Invest Med* 1989;12:165-71.
203. Lowe GDO, Drummond MM, Lorimer AR. Relation between extent of coronary artery disease and blood viscosity. *Br Med J* 1980;673-4.
204. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythemia. *Lancet* 1978;2:1219-22.
205. Tohgi H, Yamanousi H, Murakami M, Kameyama M. Importance of the hematocrit as a risk factor in cerebral infarction. *Stroke* 1978;9:369-74.
206. Harrison MJ, Pollock SS, Kendell BE, Marshall J. Effects of haematocrit on carotid stenosis and cerebral infarction. *Lancet* 1981;2:114-5.
207. Cirillo M, Capasso G, Desanto NG. Relationship between hematocrit and blood-pressure- implicatiosn for primary hypertension. *Nephron* 1993;65:505-10.
208. Lowe GDO, Forbes CD. Platelet aggregation, haematocrit, and fibrinogen. *Lancet* 1985;1:395-6.
209. Duff TA, Louie J, Feilbach JA, Scott G. Erythrocytes are essential for development of cerebral vasculopathy resulting from subarachnoid hemorrhage in cats. *Stroke* 1988;19:68-72.
210. Born GVR, Bergqvist D, Arfors KE. Evidence for inhibition of platelet aggeration in blood by a drug effect on erythrocytes. *Nature* 1976;259:233-5.
211. Turitto VT, Weiss HJ. Platelet and red cell involvement in mural thrombogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1983;373:363-76.
212. Bergqvist D, Arfors KE. Hemostatic platelet plug formation in the isolated rabbit mesenteric preparation. An analysis of red blood cell participation. *Thromb Haemost* 1980;44:6-8.
213. Cadroy Y, Hanson SR. Effects of red blood cell concentration on hemostasis and thrombus formation in a primate model. *Blood* 1990;75:2185-93.
214. Chesebro JH, Zoldhelyi P, Fuster V. Pathogenesis of thrombosis in unstable angina. *Am J Cardiol* 1991;68:2B-10B.
215. Vayá D, Aznar J. Hemorreología. In: López-Borrasca A, Arocha-Piñango CL, Campos-Guerra CC, editors. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. 1st ed. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992. p. 193-203.

216. Collier BS. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: Frozzard HA, et al, editors. The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press; 1992. p. 219-73.
217. Goldsmith HL. Red cell motions and wall interactions in tube flow. *Fed Proc* 1971;30:1578-88.
218. Reimers RC, Sutera SP, Joist JH. Potentiation by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanisms. *Blood* 1984;64:1200-6.
219. Aarts PA, Heethaar RM, Sixma JJ. Red blood deformability influences platelets-vessel wall interactions in flowing blood. *Blood* 1984;64:1228-33.
220. Ernst E, Koenig W. Hemorrheology, thrombogenesis, and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemostasis* 1993;19:99-103.
221. Bell DN, Spain S, Goldsmith HL. The effect of red blood cells on the ADP-induced aggregation of human platelets in flow through tubes. *Thromb Haemost* 1990;63:112-21.
222. Saniabadi AR, Tomiak RHH, Lowe GDO, Barbenel JC, Forbes CD. Dipyridamole inhibits red cell-induced platelet activation. *Atherosclerosis* 1989;76:149-54.
223. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993;7:516-22.
224. Jakubowski JA, Thompsom CB, Deykin D. Inactivation of prostacyclin by human erythrocytes. *Br J Haematol* 1983;54:658-60.
225. Evans HG, Ryley HC, Hallet I, Lewis MJ. Human red blood cells inhibit endothelium-derived relaxing factor activity. *Eur J Pharmacol* 1989;163:361-4.
226. Houston DS, Robinson P, Gerrard JM. Inhibition of intravascular platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor: reversal by red blood cells. *Blood* 1990;76:953-8.
227. Santos MT, Aznar J. Interacción plaquetas-hematíes en la patogenia de la trombosis. In: López-Borrasca A, Arocha-Piñango CL, Campos-Guerra CC, editors. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. 1st ed. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 1992.
228. Turitto VT, Weiss HJ. Red blood cells; their dual role in thrombus formation. *Science* 1980;207:541-3.
229. Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR. Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. *Ind Eng Chem Fund* 1972;11:216-23.

230. Machi J, Sigel B, Ramos JR. Role of red cells in preventing the growth of platelet aggregation. *Thromb Res* 1984;36:53-66.
231. Gordge MP, Dodd NJ, Rylance PB, Weston A. An assesment of whole blood impedance aggregometry using blood from normal subjects and haemodialysis patients. *Thromb Res* 1984;36:17-27.
232. Saniabadi AR, Lowe GDO, Barbenel JC, Forbes CD. Further studies on the role of red blood cells in spontaneous platelet agregation. *Thromb Res* 1985;38:225-32.
233. Schrader J, Berne RM, Rubio R. Uptake and metabolism of adenosine by human erythrocyte ghosts. *Am J Physiol* 1972;223:159-66.
234. Santos MT, Vallés J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erytrovytes. *J Clin Invest* 1991;87:571-80.
235. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818-24.
236. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assesment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996;22:707-10.
237. Blann AD, Lip GYH. Hypothesis: is soluble p-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* 1997;128:135-8.
238. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tshcope D, Clemetson KJ et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Citometric Characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998;79:885-96.
239. Rubens FD, Labow RS, Waghay G, Robblee J. The importance of sampling site in the measurement of whole-blood platelet flow citometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1998;12(3):309-13.
240. Cantero M, Conejo JR, Parra T, Jimenez A, Carballo F, de Arriba G. Interference of chilomicrons in analysis of platelets by flow citometry. *Thromb Res* 1998;91:49-52.
241. Brøijersen A, Karpe F, Hamsten A, Goodall AH, Hjemdahl P. Alimentary lipemia enhances the membrane expression of platelet p-selectin without affecting other markers of platelet activation. *Atherosclerosis* 1998;137:107-13.
242. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow citometry. *Blood* 1987;70:307-11.

243. Kestin AS, Valeri CR, Khuri SF, Loscalzo J, Ellis PA, MacGregor H et al. The platelet function defect of cardiopulmonary bypass. *Blood* 1993;82:107-11.
244. Bath PMW. The routine measurement of platelet size using sodium citrate alone as the anticoagulant. *Thromb Haemost* 1993;70:687-90.
245. McEver RP, Bennet JS, Martin MN. Identification of two structurally and functionally distinct sites on human platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1983;258:5269-75.
246. Michelson AD, Shattil SJ. The use of flow cytometry to study platelet activation. In: Watson SP, Authi KS, editors. *Platelets. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1996. p. 111-29.
247. Li N, Goodall AH, Hjerdahl P. A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates. *British Journal of Haematology* 1997;99:808-16.
248. Janes S, Wilson DJ, Chronos NA, Goodall AH. Evaluation of blood flow cytometric detection of platelet bound fibrinogen on normal subjects and patients with activated platelets. *Thromb Haemost* 1993;70:659-66.
249. Cahil MR, Macey MG, Newland AC. Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins CD62 and CD63. *Br J Haematol* 1993;84:527-9.
250. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87(12):4925-36.
251. Becton Dickinson. Monoclonal antibodies detecting human antigens: CD61 (Anti-gpIIIa, Anti-integrin α 3). 1997. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.
252. Becton Dickinson. Monoclonal antibodies detecting human antigens: CD42a (Anti-gpIX). 1997. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.
253. Becton Dickinson. Monoclonal antibodies detecting human antigens: CD62P. 1997. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.
254. Becton Dickinson. Monoclonal antibodies detecting human antigens: PAC-1. 1997. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.
255. Becton Dickinson. Monoclonal antibodies detecting human antigens: CD45 (Anti-HLe-1). 1997. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.

256. Rinderknecht H. Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins. *Nature* 1995;193:167-71.
257. Andrews NP, Gralnick HR, Merryman P, Vail M, Quyyumi AA. Mechanisms underlying the morning increase in platelet aggregation: a flow cytometric study. *J Am Coll Cardiol* 1996;28(7):735-1097.
258. Ault K, Rinder HM, Mitchell JG, Rinder C, Lambrew CT, Hillman RS. Correlated measurement of platelet release and aggregation in whole blood. *Cytometry* 1989;10(4):448-55.
259. Jy W, Horstman LL, Park H, Mao WW, Valant P, Ahn YS. Platelet aggregates as markers of platelet activation: characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications. *Am J Hematol* 1998;57:33-42.
260. Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1992;12:1475-87.
261. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990;75(1):128-38.
262. Aznar J, Santos MT, Vallés J. Effect of postprandial lipaemia on platelet function in man evaluated in whole blood. *Thromb Res* 1987;48:567-76.
263. McCabe White M, Jennings LK. *Platelet Protocols. Research and clinical laboratory procedures.* San Diego: Academic Press; 1999.
264. Pérez-Requejo JL, Aznar J, Santos MT, Vallés J. Early platelet-collagen interactions in whole blood and their modifications by aspirin and dipyridamole evaluated by a new method (basic wave). *Thromb Haemost* 1985;54(4):799-803.
265. Santos MT, Vallés J, Aznar J, Pérez-Requejo JL. Role of red blood cells in the early stages of platelet activation by collagen. *Thromb Haemost* 1986;56(3):376-81.
266. Santos MT, Vallés J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest* 1991;87:571-80.
267. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosín J et al. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality. *Circulation* 1998;97:350-5.
268. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martinez-Sales V, Portoles M et al. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood* 1991;78(1):154-62.

269. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Velert M, Barberá G, Carmena R. Modulatory effect of erythrocytes on the platelet reactivity to collagen in IDDM patients. *Diabetes* 1997;46:1047-53.
270. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927-9.
271. Matzdorff AC, Berchner D, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H, Voss R. Relative and absolute changes of activated platelets, microparticles and platelet aggregates after activation in vitro. *Haemostasis* 1998;28:277-88.
272. Alberio L, Dale GL. Flow cytometric analysis of platelet activation by different collagen types present in the vessel wall. *Br J Haematol* 1998;102(5):1212-8.
273. Holmes MB, Sobel BE, Howard DB, Schneider DJ. Differences between activation thresholds for platelet P-selectin glycoprotein IIb/IIIa expression and their clinical implications. *Thromb Res* 1999;95(2):75-82.
274. Escolar G, White JM. Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between in vitro and in vivo studies. *Thromb Haemost* 2000;83:371-86.
275. Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 1997;23:379-85.
276. Rubens FD, Labow RS, Waghay G, Robblee J. The importance of sampling site in the measurement of whole-blood platelet flow cytometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1998;12(3):309-13.
277. Rinder HM, Murphy M, Mitchell J, Stocks J, Ault K, Hillman RS. Progressive platelet activation with storage. Evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion* 1991;31:409-14.
278. Matzdorff AC, Kemkes-Matthes B, Voss R, Pralle H. Comparison of beta-thromboglobulin, flow cytometry, and platelet aggrerometry to study platelet activation. *Haemostasis* 1996;26(2):98-106.
279. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BE, Michelson AD. Effect of strenous exercise on platelet activation state reactivity. *Circulation* 1993;88(4):1502-11.
280. Escolar G, Monteagudo J, Castillo R, Cases A, Garrido M, Ordinas A. Ultrastructural immunolocalization and morphometric quantification of platelet membrane GPIb and GPIIb/IIIa in uremic patients. *Prog Clin Biol Res* 1988;283:197-201.

281. Escolar G, Cases A, Bastida E, Garrido M, López J, Revert L et al. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb/IIIa. *Blood* 1990;76:1336-40.
282. Tsakiris DA, Haefeli WE, Linder L, Steiner B, Marbet GA. Platelet surface activation markers after DDAVP infusion in healthy subjects. *Thromb Haemost* 1995;74:991-3.
283. Bona RD, Sivjee KY, Hickey AD, Wallace DM, Wajcs SB. The efficacy and safety of oral anticoagulation in patients with cancer. *Thromb Haemost* 1995;74:1055-8.
284. Wahba A, Black G, Koksich M, Rothe G, Preuner J, Smithz G et al. Aprotinin has no effect on platelet activation and adhesion during cardiopulmonary bypass. *Thromb Haemost* 1996;75:844-88.
285. Knight BT, Panesar M, Wright C, Clarke D, Butowski PS, Patel D et al. Altered platelet function detected by flow cytometry. Effects of coronary artery disease and age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2044-53.
286. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart* 1996;76(2):166-72.
287. Rinder C, Bonhert J, Rinder HM, Mitchell J, Ault K, Hillman RS. Platelet activation and aggregation during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 1995;75:388-93.
288. Mazer CD, Hornstein A, Freedman JE. Platelet activation in warm and cold heart surgery. *Ann Thorac Surg* 1995;59:1481-6.
289. Frijns JM, Kappelle LJ, Vangijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke* 1997;28:2214-8.
290. Kirk G, McLaren M, Muir AH, Stonebridge PA, Belch JJ. Decrease in P-selectin levels in patients with hypercholesterolemia and peripheral arterial occlusive disease after lipid-lowering treatment. *Vasc Med* 1999;4(1):23-6.
291. White A, Pascoe J, Meakin F, Heptinstall S. Effects of omnipaque on platelet function. *Thromb Haemost* 1999;82(1):167.
292. Rauch U, Ziegler D, Piolot R, Schwippert B, Benthake H, Tschoepe D. Platelet activation in diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabet Med* 1999;16(10):848-52.
293. Undas A, Sanak M, Musial J, Szczeklik A. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism affects the antithrombotic action of aspirin. *Thromb Haemost* 1999;82(1):356.

294. Matzdorff AC, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H. Quantitative assessment of platelets, platelet microparticles, and platelet aggregates with flow cytometry. *J Lab Clin Med* 1998;131:507-17.
295. Ahn YS, Jy W, Kolodny L, Horstman LL, Mao WW, Valant P et al. Activated platelet aggregates in thrombotic thrombocytopenic purpura: decrease with plasma infusions and normalization in remission. *British Journal of Haematology* 1996;95:408-15.
296. Galt SW, McDaniel MD, Ault KA, Mitchell, Cronenwett JL. Flow cytometric assesment of platelet function in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg* 1991;14:747-56.
297. Rinder HM, Bonan J, Rinder C, Ault K, Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 1991;78:1760-9.
298. Daniel WG, Nellesen U, Schroder E. Left atrial spontaneous echo contrast in mitral valve disease: an indicator for an increased thromboembolic risk. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:1204-11.
299. Housinger TA, Brinkerhoff C, Warden GD. The relationship between platelet count, sepsis, and survival in pediatric burn patients. *Arch Surg* 1993;128:65-7.
300. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A et al. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 2000;28(6):1871-6.
301. Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Inv* 1995;25:843-51.
302. Gawaz M, Bogner C. Changes in platelet membrane glycoproteins and platelet leukocyte interaction during hemodialysis. *Clin Invest* 1994;72:424-9.
303. Dembinska KA, Zmuda A, Wenhryniewicz O, Stachgura J, Peskar BA, Gryglewski RJ. Selectin-P-mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide. *Int J Tissue React* 1993;15(55):64.
304. Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Manarini S, Mironov A, de Gaetano G et al. Platelet contribution to leukotriene production in inflammation: in vivo evidence in the rabbit. *Thromb Haemost* 1999;81:442-8.
305. Faint RW. Platelet-neutrophil interactions: their significance. *Blood Rev* 1992;6:83-91.
306. Vickers J, Russwurm S, Dohn B, Reinhart K, Spangerbergen P, Losche W. Platelet and leukocyte activation in septic patients. *Thromb Haemost* 1999;82(1):458.

307. Collier BS. Binding of abciximab to α IIb β 3 and activated α IIb β 3 receptors: with a review of platelet-leukocyte interactions. *Thromb Haemost* 1999;82(2):326-36.
308. Sanderson HM, Storey RF, Heptinstall S. Administration of a GPIIb/IIIa antagonist to patients with unstable angina: effects on platelet aggregation and platelet-leukocyte conjugate formation. *Thromb Haemost* 1999;82(2):357.
309. Valant PA, Jy W, Horstman LL, Mao WW, Ahn YS. Thrombotic thrombocytopenic purpura plasma enhances platelet-leukocyte interaction *in vitro*. *Br J Haematol* 1998;100:24-32.
310. Clatch RJ, Taylor JR, Wheeler BM. Platelet activation as measured by a laser scanning cytometric assay of monocyte-platelet conjugates is a sensitive indicator of myocardial infarction and other thrombotic events. *Thromb Haemost* 1999;82(1):378-9.
311. Dore M. Platelet-leukocyte interactions. *Am Heart J* 1998;135(5 Pt 2 Su):146S-51S.
312. Stuard S, Bonomini M, Settefrati N, Albertazzi A. Platelet-neutrophil interactions during hemodialysis: a proposed biocompatibility approach. *Int J Artif Organs* 1998;21(2):75-82.
313. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood* 1986;67:629-35.
314. Geng JG, Moore KL, McEver RP. Purified GMP-140 is a receptor for neutrophils. *Blood* 1989;74:65a.
315. Redl H, Hammerschmidt DE, Schlag G. Augmentation by platelets of granulocyte aggregation in response to chemotaxins: studies utilizing an improved cell preparation technique. *Blood* 1983;61:125-9.
316. Boogaerts MA, Vercelotti G, Roelant C, Malbrain S, Verwilghen RL, Jacob HS. Platelets augment granulocyte aggregation and cytotoxicity: uncovering of their effects by improved cell separation techniques using Percoll gradients. *Scand J Haematol* 1986;37:229-34.
317. Wilson E, Laster SM, Gooding LR, Lambeth JD. Platelet-derived growth factor stimulates phagocytosis and blocks agonist-induced activation of the neutrophil oxidative burst: a possible cellular mechanism to protect against oxygen radical damage. *Natl Acad Sci USA* 1987;84:2213-7.
318. Wright GG, Read PW, Mandell GL. Lipopolysaccharide releases a priming substance from platelets that augments the oxidative response of polymorphonuclear neutrophils to chemotactic peptide. *J Infect Dis* 1988;157:690-3.

319. Munro JM, Cotran RS. Biology of disease: the pathogenesis of atherosclerosis. Atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988;58:249.
320. Larsen E, Ceii A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989;59:305-10.
321. Vallés J, Santos T, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N et al. Down regulation of human platelet reactivity by neutrophils. *J Clin Invest* 1993;92:1357-65.
322. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leokocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA* 1987;257:2318-24.
323. Lowe GDO, Machado SG, Krol WF, Barton BE, Forbes CD. White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1985;54:700-3.
324. Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, Mazzuchelli I, Fossati G, Pasoti T et al. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1993;88:358-63.
325. Simpson PJ, Todd RF III, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Luchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988;81:624-9.
326. Harlan JM. Neutrophil-mediated vascular injury. *Acta Med Scand* 1987;715(suppl):123-9.
327. Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost* 1995;74:218-23.
328. Evangelista V, Rajtar G, de Gaetano G, White JG, Cerletti C. Platelet activation byfMLP-stimulated polymorphonuclear leuocytes: the activity of cathepsin G is not prvented by antiproteinases. *Blood* 1991;77:2379-88.
329. Molino M, Blanchard N, Belmonte E, Tarver AP, Abrams CS, Hoxie JA et al. Proteolysis of the human platelet and endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G. *J Biol Chem* 1995;270:11168-75.
330. de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* 1999;29:41-9.
331. Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P et al. Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selectin in thromboxane B2 and leukotriene C4 cooperative synthesis. *Thromb Haemost* 1994;72:450-6.

332. Palabrica YT, Lobb R, Furie B, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-51.
333. Alon R, Hammer DA, Springer TA. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* 1995;374:539-42.
334. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 1993;82:1165-74.
335. Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions. *Blood* 1994;83:2498-507.
336. Sheikh S, Nash GB. Continuous activation and deactivation of integrin CD11b/CD18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize on platelets. *Blood* 1996;87:5040-50.
337. Kuijpers TW, Gallardo Torres HI, van der Linden JA, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L et al. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin and integrin mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood* 1996;87:3271-81.
338. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M, Leeuwenberg JFM, Roos D. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet activating factor in neutrophil adherence to IL-1 prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J Immunol* 1991;147:1369-76.
339. Weber C, Springer T. Neutrophil accumulation on activated, surface adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to IIb/3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997;100:2085-93.
340. Diacovo TG, de Fourgerolles AR, Bainton DF, Springer T. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 1994;94:1243-51.
341. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuck R, McGregor JL et al. Platelet/PMN leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta-2 integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88:4183-94.
342. Konstantopoulos K, McIntire LV. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest* 1996;98:2661-5.
343. Cooper D, Butcher CM, Berndt MC, Vadas MA. P-selectin interacts with a beta-2 integrin to enhance phagocytosis. *J Immunol* 1994;153:3199-209.

344. Marcus AJ. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: pathophysiologic significance of transcellular metabolism. *Blood* 1990;76(10):1903-7.
345. Marcus AJ. Eicosanoids: transcellular metabolism. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1988. p. 129-37.
346. Maclouf J, Fitzpatrick FA, Murphy M. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacol Res* 1989;21(1):12-4.
347. Maclouf J, Murphy M, Henson PM. Transcellular sulfidopeptide leukotriene biosynthetic capacity of vascular cells. *Blood* 1989;74:703-7.
348. Hack CE, De-Groot PG, Felt RJ. Increased plasma levels of IL-6 in sepsis. *Blood* 1989;74:1704-10.
349. Goldie AS, Fedran K, Ross J. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. *JAMA* 1995;274:172-7.
350. Opal SM, Huber C. The role of interleukin-10 in critical illness. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:221-6.
351. Gogos CA, Drosou E, Bassaris H, Skoutelis A. Pro versus antiinflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000;181:176-80.
352. Svhröder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998;133:1200-5.
353. Chaudhuri A, Zbrzna V, Poliakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994;269(11):7835-8.
354. Ahuja SK, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptors and molecular mimicry. *Immunol today* 1994;15(6):281-7.
355. Furie B, Furie BC. Leukocyte crosstalk at the vascular wall. *Thromb Haemost* 1997;78(1):306-9.
356. Topham MK, Carveth HJ, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Human endothelial cells regulate polymorphonuclear leukocyte degranulation. *FASEB J* 1998;12:733-46.
357. Leytin V, Shapiro H, Novikov I, Radnay J. Flow cytometry analysis of the platelet surface area and surface density of glycoprotein IIb-IIIa of unactivated human platelets of various sizes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(1):94-100.

358. Kirschenbaum LA, Aziz M, Astiz ME, Saha DC, Rackow EC. Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions on cell filtration in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1602-7.
359. Eichelbronner O, Sielenkämper A, Cepinskas G, Sibbald WJ, Chin-yee IH. Endotoxin promotes adhesion of human erythrocytes to human vascular endothelial cells under conditions of flow. *Crit Care Med* 2000;28:1865-70.