



ORIGINAL

Efecto del cizallamiento y del difosfato de adenosina sobre la activación plaquetaria y la formación de microagregados en controles sanos. Valoración mediante citometría de flujo

Sandra Dolz Giménez y Marcial Martínez Silvestre*

Unidad de Citometría de Flujo, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España

Recibido el 2 de diciembre de 2008; aceptado el 18 de mayo de 2009

Disponible en Internet el 7 de julio de 2009

PALABRAS CLAVE

Activación
plaquetaria;
Citometría de flujo;
Cizallamiento

Resumen

Introducción: Diversos estudios demuestran que las velocidades de cizallamiento elevadas provocan activación plaquetaria. Sin embargo, no está descrito cómo se comportan las plaquetas activadas por cizallamiento ante estímulos posteriores. No está bien establecido si las plaquetas después de activarse por cizallamiento en el flujo sanguíneo *in vivo* responden más o menos a la subsiguiente acción de agonistas fisiológicos, como el ADP (*adenosine diphosphate* 'difosfato de adenosina'). Ésta es la cuestión abordada en el presente estudio, en el que se remedian *in vitro* las condiciones del flujo sanguíneo en las arterias no estenóticas.

Material y métodos: Se valora la activación plaquetaria mediante citometría de flujo. El cizallamiento se induce en un viscosímetro de cono y plato a una velocidad de 230 s^{-1} , que remedia el cizallamiento fisiológico del flujo sanguíneo en las arterias sanas. Como marcadores de activación se determinan el antígeno CD62, el complejo glucoproteínas IIb/IIIa en su forma activa y la formación de los microagregados plaquetarios (MAP). Se valora el porcentaje de plaquetas activadas espontáneamente y el número de los MAP. Seguidamente, se valora el porcentaje de las plaquetas activadas y los MAP tras estimular con ADP. En paralelo, se sigue el mismo procedimiento, pero se somete previamente la sangre a cizallamiento durante 5 min. En estas muestras cizalladas se valora el porcentaje de las plaquetas activadas y los MAP antes y después de estimular con ADP.

Resultados: El cizallamiento, así como el ADP, aumentan el porcentaje de las plaquetas activadas en la sangre. Cuando las plaquetas cizalladas se someten ulteriormente al ADP, el porcentaje de las plaquetas que se activan resulta significativamente menor que cuando el ADP estimula directamente las plaquetas en la sangre sin cizallar.

Conclusiones: Las plaquetas sometidas a cizallamiento resultan refractarias a activarse subsiguientemente por acción de los agonistas, mientras que las plaquetas no cizalladas

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: martinez_mar@gva.es (M. Martínez Silvestre).

responden adecuadamente a éste. Esta respuesta refractaria *in vitro* puede representar un mecanismo de defensa celular que podría evitar *in vivo* un mayor grado de activación y agregación cuando las plaquetas se enfrentan a un agonista fisiológico en zonas donde aumente el cizallamiento de la sangre circulante.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Platelet activation;
Flow cytometry;
Shearing

Effect of shear rate and adenosine diphosphate on platelet activation and microaggregate formation. Evaluation by flow cytometry

Abstract

Introduction: Several studies show that high shear rate cause platelet activation. But the behaviour of these activated platelets by shear and subsequent stimulus by, for example, ADP is not well established. This paper investigates an *in vitro* model of blood flow conditions in non-stenotic arteries.

Material and methods: Platelet activation is studied by flow cytometry. The shear is induced in a cone-plate viscometer at 230s^{-1} that mimics the blood flow conditions in healthy arteries. CD62 and GpIIb/IIIa in their active form are selected as platelet activation markers, as well as for the formation of platelet microaggregates (MAP).

The percentage of spontaneously activated platelets and the number of MAP are determined. The percentage of activated platelets and MAP after stimulating with ADP is then evaluated. In parallel, the same procedure is followed, but after previously subjecting blood samples to a shear for 5 min. In these sheared samples the percentage of activated platelets and MAP also are measured before and after stimulating with ADP.

Results: Shearing, as well as ADP, increases the percentage of activated platelets in whole blood. When the platelets are subsequently subjected to ADP, the percentage of activated platelets is significantly lower than when the ADP directly stimulates platelets without shearing.

Conclusions: Platelets subjected to shearing become refractory when they are subsequently activated by action of a physiological agonist such as ADP. However the platelets that are not sheared respond appropriately to this agonist. This refractory response *in vitro* may represent a cellular defence mechanism to prevent a greater degree of *in vivo* activation-aggregation when platelets are faced with an agonist in areas where the shear rate increases in the blood flow.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Actualmente está bien establecido el papel de las plaquetas en la patogénesis de la aterotrombosis, proceso en el que desempeñan un papel fundamental. La activación del complejo glucoproteínas (GP) IIb/IIIa interviene en la primera fase de la agregación plaquetaria por interacción con diversos ligandos solubles, principalmente fibrinógeno y factor de von Willebrand¹⁻³. La agregación de las plaquetas sometidas a baja velocidad de cizallamiento (0 a 1.000s^{-1}) depende, fundamentalmente, del fibrinógeno²; en tanto que cuando se exponen a un elevado cizallamiento (1.000 a 10.000s^{-1}) depende en mayor medida del factor von Willebrand^{4,5}, lo que demuestra que el proceso de formación de los microagregados plaquetarios (MAP) es función de las condiciones del flujo. El proceso inicial de agregación puede conducir a la formación de los MAP y microtrombos ricos en plaquetas. La exposición de CD62 en la superficie plaquetaria estabiliza este microtrombo inicial y permite su posterior crecimiento y la formación de agregados de plaqueta y leucocito^{6,7}. La acumulación de plaquetas activadas en el sitio de rotura de una placa aterosclerótica es el hecho patogénico clave que facilita la formación del

trombo arterial. En la activación de las plaquetas, necesaria para que se produzcan estos fenómenos, intervienen numerosos factores, entre los que pueden citarse la acción de agonistas fisiológicos y la velocidad de cizallamiento (*shear rate*) causada por el propio flujo sanguíneo al pasar por una arteria estenótica⁸.

Entre los agonistas fisiológicos que actúan sobre las plaquetas, el ADP (*adenosine diphosphate* 'difosfato de adenosina') desempeña un importante papel *in vivo* en la hemostasia normal y en la trombosis. Aunque el ADP se considera un agonista débil, en comparación con la trombina o el colágeno, resulta un cofactor necesario para la activación de las plaquetas por parte de otros agonistas, por lo que es de gran interés valorar su acción sobre la activación de las plaquetas. Está bien establecido que esta acción, consistente fundamentalmente en inducir la formación de agregados, se ejerce fundamentalmente a través de los 2 principales receptores plaquetarios de ADP^{9,10}.

Actualmente hay un creciente interés en la valoración de la función plaquetaria bajo diferentes condiciones de flujo. Según los diversos autores, el cizallamiento *per se* puede activar las plaquetas^{7,11,12}. La mayoría de los investigadores que trabajan en este campo someten las plaquetas a

elevadas velocidades de cizallamiento durante intervalos de tiempo generalmente cortos. Si los períodos de tiempo son excesivamente cortos (inferiores a 1 min), las plaquetas sólo pueden formar agregados inestables, ya que en estas condiciones no llega a expresarse el CD62 en la superficie plaquetaria¹³. Por otro lado, cuando se cizallan durante más de 20 s a velocidades de cizallamiento elevadas, las plaquetas se agregan irreversiblemente y forman microtrombos, que hacen difícil su estudio en el laboratorio. La activación y la agregación plaquetaria se intensifican cuando se mide en sangre debido a la mayor densidad celular, que facilita el contacto y el intercambio de célula a célula y a ciertos agonistas que pueden liberar los hematócitos durante el proceso de cizallamiento¹³. En concreto, el ADP liberado por las células sanguíneas cuando se someten a fuerte cizallamiento desempeña un importante papel en la activación y en la formación de agregados plaquetarios¹⁴. Las condiciones experimentales del presente trabajo tratan de soslayar los inconvenientes indicados, por lo que se ha elegido una velocidad de cizallamiento fisiológica en las arterias sanas (230 s^{-1}), un tiempo de cizallamiento suficiente (5 min) y la sangre (respuesta plaquetaria más fisiológica); en estas condiciones experimentales no se dispone de información acerca de la interacción de cizallamiento, agonista, activación y formación de los agregados plaquetarios. No está bien establecido si el cizallamiento del flujo sanguíneo actúa sinérgicamente con los agonistas fisiológicos, lo que establecería un peligroso círculo vicioso en el que en las zonas estenóticas, donde aumenta el cizallamiento del flujo, se potenciaría la activación de las plaquetas por posterior acción de un agonista. Por el contrario, si se observa que las plaquetas cizalladas en las zonas estenóticas resultaran menos activables por parte de los agonistas fisiológicos, este hecho supondría un interesante mecanismo antitrombótico fisiológico no descrito en la bibliografía científica. El objetivo del presente estudio es, pues, valorar la acción de un agonista fisiológico sobre plaquetas previamente cizalladas para comprobar si éstas se activan en mayor o en menor medida que las plaquetas sin cizallar. Esta valoración in vitro trata de remediar lo que sucede in vivo en las zonas correspondientes al flujo sanguíneo en las arterias no estenóticas.

Material y métodos

Las muestras procesadas provenían de 12 voluntarios que no recibieron ningún tipo de tratamiento farmacológico con acción antiplaquetaria o antiagregante. Todos ellos provenían de la plantilla del laboratorio y se los había expuesto previamente a los protocolos clínicos y analíticos del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Universitario La Fe, y se clasificaron como sanos. Antes de participar en el estudio, los voluntarios dieron su consentimiento por escrito, de acuerdo con la declaración de Helsinki. Las muestras de sangre anticoagulada con citrato (129 mmol/l; 9:1, por vía venosa) se obtuvieron después de un ayuno de 12 h en tubos de vidrio siliconados mediante punción venosa de la vena antecubital, se evitó al máximo la estasis y se desechó el primer tubo. Dado que las plaquetas se activan fácilmente in vitro, los análisis plaquetarios se iniciaron antes de los 30 min siguientes a su extracción, sin agitar, a temperatura ambiente y en tubos de polipropileno.

Métodos citométricos

Tanto la activación plaquetaria espontánea como la capacidad de activación debida al cizallamiento o a la acción del ADP se valoraron en un citómetro de flujo Epics XL-MCL Flow Cytometer (Beckman-Coulter, Florida, EE. UU.); éste mide la fracción de plaquetas positivas (lo que indica la activación de una subpoblación plaquetaria) de acuerdo con las recomendaciones metodológicas para los análisis citométricos¹⁵. El citómetro se preparó para registrar *forward* y *side scatter*, y para medir las intensidades de la fluorescencia de los antígenos conjugados con fluorocromo CD61-PE, CD62-FITC (Immunotech, Marseille, France) y PAC1-FITC (Becton-Dickinson, California, EE. UU.), que se recogieron como histogramas en escala logarítmica. Los anticuerpos utilizados pertenecían al mismo lote. Las muestras se analizaron por duplicado después de comprobar el alineamiento del citómetro de flujo con Immunocheck beads (Beckman-Coulter, Florida, EE. UU.).

Las micropartículas y los microagregados se distinguieron de las plaquetas en función de sus valores de *forward* y *side scatter*, que se relacionan respectivamente con el tamaño y la complejidad de la membrana celular. De acuerdo con Matzdorff¹⁶, con la utilización de muestras de voluntarios sanos, se definió arbitrariamente en función del valor *forward* una región que incluía el 90% de los episodios CD61 positivos. Esta región se definió como “región de las plaquetas”. Inmediatamente por debajo de ésta se estableció otra región, que incluía el 5% de los episodios CD61 positivos, que se definió como “región de micropartículas” y por encima se definió otra región que incluía el 5% de los episodios de mayor tamaño, que incluía los MAP. Los resultados de los microagregados se expresan como su número por 5.000 plaquetas analizadas.

La exposición del CD62 para estimar tanto la exposición in vivo del CD62 como la capacidad de las plaquetas de responder in vitro al ADP o al cizallamiento se valoró por medio de un método citométrico de doble color descrito previamente por este grupo¹⁷. Brevemente, consiste en lo siguiente: 10 μl de sangre citratada se diluyeron en 100 μl de tampón Hepes (Hepes [10 mM], cloruro sódico [150 mM], cloruro de potasio [5 mM], sulfato de magnesio [1 mM], glucosa [10 mM] y pH [7,4 y 290 mOsm]). Se añadieron 5 μl de CD62-FITC y 5 μl de CD61-PE. Después de mezclar cuidadosamente e incubar durante 20 min en oscuridad, se añadieron 1.000 μl de Hepes a cada tubo. Las muestras se evaluaron inmediatamente en el citómetro y se adquirieron 5.000 episodios CD61 positivos (plaquetas).

Para evaluar el complejo GPIIb/IIIa en su forma activa (+) mediante la utilización de un ensayo a un solo color, 10 μl de sangre citratada se diluyeron en 100 μl de tampón Hepes. Se añadieron 4 μl del anticuerpo que reconoce el complejo GPIIb/IIIa⁺ (PAC1-FITC). Se añadieron 3 μl de tampón (para medir las plaquetas activadas espontáneamente in vivo) o 3 μl de ADP (concentración final de 2,5 μM para medir las plaquetas activadas in vitro por el agonista) y se incubó durante 30 min en oscuridad. A continuación se añadieron 1.000 μl de tampón Hepes, las muestras se analizaron inmediatamente en el citómetro y se adquirieron 5.000 plaquetas.

Para estudiar la activación plaquetaria después de someter la sangre a cizallamiento y posterior acción del

ADP, se realizaron 2 ensayos con cada muestra. En el primer ensayo se determinó el porcentaje de las plaquetas circulantes activadas espontáneamente y tras estimulación con ADP (2,5 μ M). En el segundo ensayo se sometió la sangre a un cizallamiento de 230 s^{-1} durante 5 min y se valoró la activación plaquetaria de esta sangre cizallada. Seguidamente se sometió esta sangre cizallada a la acción del ADP (2,5 μ M) y se valoró la activación plaquetaria en ésta. Con esta metodología se obtuvieron datos acerca de la expresión del CD62, del complejo GPIIb/IIIa⁺, y la formación de los MAP en la sangre circulante, estimulada con ADP, cizallada, y cizallada y estimulada.

La velocidad de cizallamiento de la sangre (5 min a 230 s^{-1} a temperatura ambiente) se indujo con un viscosímetro de cono y plato Brookfield DVII (Stoughton, England).

El análisis de datos se realizó mediante el programa System II software (Beckman-Coulter, Florida, EE. UU.). Los resultados se presentan como valor medio \pm desviación estándar. La significación estadística de las diferencias se valoró mediante el test no paramétrico de Wilcoxon y las correlaciones se establecieron mediante los coeficientes de correlación de Pearson (SPSS for Windows Statistical Software, versión 15.0, Chicago, Illinois, EE. UU.). La significación estadística se estableció para un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Los resultados obtenidos se indican en las **tablas 1 y 2**. En la tabla 1 puede observarse que el porcentaje de las plaquetas

activadas espontáneamente en la sangre circulante es del $0,32 \pm 0,24$ para la expresión del complejo GPIIb/IIIa⁺, y del $1,18 \pm 0,97$ para la exposición del CD62. El número de los microagregados formados espontáneamente en la sangre circulante es de $114 \pm 38/5.000$ plaquetas. Cuando la sangre se estimula con ADP, aumentan significativamente ($p < 0,001$) todos los marcadores de activación estudiados, que pasan a ser del $31,37 \pm 10,81$ para el complejo GPIIb/IIIa⁺, del $28,72 \pm 13,43$ para el CD62 y de $202 \pm 54/5.000$ plaquetas para los MAP.

La acción del cizallamiento aumenta significativamente ($p < 0,01$) la expresión del complejo GPIIb/IIIa⁺ y del CD62, que alcanzan valores del $0,43 \pm 0,25$ y del $1,67 \pm 1,34$, respectivamente. El aumento en el número de los MAP por acción del cizallamiento no alcanza significación estadística respecto a la sangre nativa. La acción del ADP sobre las plaquetas previamente cizalladas induce una menor activación que cuando este agonista actúa directamente sobre la sangre nativa (el $19,01 \pm 10,44$ frente al $31,37 \pm 10,81$ para la expresión del complejo GPIIb/IIIa⁺, y el $16,41 \pm 9,14$ frente al $28,72 \pm 13,43$ en el caso del CD62). No se observan cambios significativos en relación con la formación de los MAP.

En la **tabla 2** se aprecia una correlación altamente significativa entre el número de los MAP formados espontáneamente y los formados *in vitro* por cizallamiento o por acción del agonista. La formación de los MAP por estimulación con el ADP no parece tener correlación con la expresión del complejo GPIIb/IIIa⁺, pero sí con la exposición del CD62 en la plaqueta activada ($r = 0,871$; $p = 0,000$).

Tabla 1 Porcentaje de plaquetas activadas (antígenos glucoproteína IIb/IIIa o CD62 positivos) y número de agregados plaquetarios formados espontáneamente, por acción del difosfato de adenosina, por cizallamiento y por cizallamiento más difosfato de adenosina

	Circulantes espontáneas	ADP (2,5 μ M)	Cizalladas (230 s^{-1})	Cizallada + ADP
% de GPIIb/IIIa ⁺ positivas	$0,32 \pm 0,24$	$31,37 \pm 10,81^a$	$0,43 \pm 0,25^b$	$19,01 \pm 10,44^c$
% de CD62 positivos	$1,18 \pm 0,97$	$28,72 \pm 13,43^a$	$1,67 \pm 1,34^b$	$16,41 \pm 9,14^c$
MAP/5.000 plaquetas	114 ± 38	202 ± 54^a	119 ± 43 NS	181 ± 37 NS

NS frente a circulantes.

ADP: difosfato de adenosina; GPIIb/IIIa⁺: glucoproteínas IIb/IIIa en su forma activa; MAP: microagregados plaquetarios; NS: no significativo.

NS frente a ADP.

^a $p < 0,001$ frente a circulantes.

^b $p < 0,01$ frente a circulantes.

^c $p < 0,01$ frente a ADP.

Tabla 2 Estudio de correlaciones (test de Pearson) entre los parámetros indicados

	r de correlación	p de significación
MAP circulantes/MAP cizallados	0,913	0,000
MAP circulantes/MAP con ADP	0,987	0,000
MAP con ADP/GPIIb/IIIa ⁺ y ADP	0,202	0,631
MAP con ADP/CD62 y ADP	0,871	0,000

ADP: difosfato de adenosina; GPIIb/IIIa⁺: glucoproteínas IIb/IIIa en su forma activa; MAP: microagregados plaquetarios.

Discusión

Actualmente está bien establecido que la valoración de las plaquetas activas y de su reactividad puede ser de gran interés clínico, ya que desempeñan un papel clave en la patofisiología del trombo arterial oclusivo¹⁸⁻²⁰ y pueden disminuir el riesgo de hemorragia en diversas enfermedades mediante la estimulación de la hemostasia primaria y secundaria²¹. Entre los marcadores de activación plaquetaria más estudiados figuran la expresión del complejo GPIIb/IIIa⁺ y la exposición del CD62 en la superficie plaquetaria. Debido a la presencia de plaquetas activadas, se forman los MAP circulantes que pueden considerarse marcadores de activación y que son un importante factor de riesgo de trombosis^{22,23}, por lo que su estudio puede ser de gran interés clínico. La técnica más adecuada para su valoración es la citometría de flujo de sangre, que es la utilizada para la realización del presente estudio.

Los resultados del presente trabajo indican que el cizallamiento utilizado, a pesar de su escasa entidad (230s^{-1}), es capaz de activar las plaquetas *in vitro*. Otros grupos de trabajo han observado este hecho, pero cuando la velocidad de cizallamiento aplicada es elevada (1.000 a 10.000s^{-1}), remedia la situación reológica en las arterias estenóticas^{7,24,25}. Sin embargo, otros autores han comunicado que las plaquetas reaccionan tanto a las elevadas condiciones de cizallamiento características del flujo arterial como a las bajas condiciones propias del flujo venoso²⁶, lo que sería congruente con lo descrito en el presente estudio.

Parece bien establecido que cuando la sangre se somete a cizallamiento, los hematíes ejercen efectos físicos y químicos sobre las plaquetas e inducen su activación y la formación de agregados²⁷. Este efecto podría atribuirse a la hemólisis, que liberaría sustancias activadoras. Sin embargo, en estas condiciones experimentales se descartó la presencia de hemólisis, al comprobar que la concentración de lactatodeshidrogenasa en el plasma sobrenadante de la sangre cizallada no era mayor que en la sangre nativa. La activación plaquetaria observada tras el cizallamiento tampoco podría atribuirse al contacto de ésta con la superficie metálica del viscosímetro de cono y plato, potencialmente trombogénica. En efecto, al mantener las muestras de sangre durante 5 min dentro del viscosímetro en reposo, no se apreció ningún cambio en la función plaquetaria ni en la formación de los MAP.

Dado que cuando la sangre se somete a cizallamiento se liberan pequeñas concentraciones de ADP²⁸, es posible que los resultados observados se deban más bien a estas pequeñas cantidades de ADP que al propio proceso de cizallamiento. Sin embargo, esta especulación resulta discutible, ya que la concentración de ADP liberada en estas condiciones resulta demasiado pequeña como para activar las plaquetas y formar los MAP observados en este estudio.

En relación con la activación plaquetaria y con la formación de los MAP por acción del ADP, los resultados obtenidos son coherentes con los comunicados por este grupo en trabajos anteriores²⁹ y confirman el hecho de que una misma concentración de ADP estimula en mayor medida la expresión del complejo GPIIb/IIIa⁺ que la del CD62¹⁷.

En el presente estudio se describe por primera vez en la literatura médica consultada que las plaquetas activadas por cizallamiento son refractarias a una posterior activación por un agonista fisiológico como el ADP. Esta observación es congruente con lo comunicado por otros autores²⁵; según éstos, las plaquetas estimuladas previamente por un alto cizallamiento se vuelven refractarias al activarse nuevamente mediante un cizallamiento posterior.

Como conclusión, los resultados del presente estudio indican que el cizallamiento ejerce un efecto dual sobre las plaquetas. Por un lado las activa, lo que facilitaría la formación de agregados y, por otro lado, parece actuar como agente antiactivante y antiagregante al prevenir la subsiguiente activación plaquetaria por agonistas. Este mecanismo, por el que la plaqueta activada mediante cizallamiento del flujo sanguíneo resulta refractaria a su posterior estimulación por agonistas fisiológicos, puede significar un importante mecanismo de defensa contra la formación de agregados y trombos en zonas arteriales estenóticas, donde aumenta significativamente el cizallamiento.

Bibliografía

- Peterson DM, Stathopoulos NA, Giorgio TD, Hellums JD, Moake JL. Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood*. 1987;69:625-8.
- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998;94:657-66.
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: The platelet paradigm. *Blood*. 1998;91:2645-57.
- Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289-97.
- Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest*. 1998;101:479-86.
- Schmidtke DW, Diamond SL. Direct observation of membrane tethers formed during neutrophil attachment to platelets or P-selectin under physiologic flow. *J Cell Biol*. 2000;149:719-30.
- Hu H, Varon D, Hjemdahl P, Savion N, Schulman S, Li N. Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: Differential involvement of selectins and integrins. *Thromb Haemost*. 2003;90:679-87.
- Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schaefer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88:1525-41.
- Turner NA, Moake JL, McIntire LV. Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y12 and P2Y1 is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. *Blood*. 2001;98:3340-5.
- Matsuno H, Tokuda H, Ishisaki A, Zhou Y, Kitajima Y, Kozawa O. P2Y12 receptors play a significant role in the development of platelet microaggregation in patients with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:920-7.
- Dunkley S, Harrison P. Platelet activation can occur by shear stress alone in the PFA-100 platelet analyser. *Platelets*. 2005;16:81-4.
- Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Guiral V, Aznar J. Effect of doxazosin gastrointestinal therapeutic system on platelet degranulation and platelet-leukocyte microaggregate formation induced by physiologic shear stress in hypertension. *Thromb Res*. 2006;118:47-53.

13. Zhang JN, Bergeron AL, Yu Q, Sun C, McBride L, Bray PF, et al. Duration of exposure to high fluid shear stress is critical in shear-induced platelet activation-aggregation. *Thromb Haemost*. 2003;90:672–8.
14. Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Mannucci PM. Role of ADP in platelet aggregation at high shear: Studies in a patient with congenital defect of platelet responses to ADP. *Br J Haematol*. 1994;88:826–9.
15. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European working group on Clinical Cell Analysis. Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost*. 1998;79:885–96.
16. Matdorff 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;79:885–96.
17. Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Gómez-Biedma S, Guiral V, Vivó M, et al. Flow cytometric analysis of platelet activation in hypertensive patients. Effect of doxazosin. *Thromb Res*. 2003;110:203–8.
18. Kabbani SS, Watkins MW, Ashikaga T, Terrien EF, Sobel BE, Schneider DJ. Usefulness of platelet reactivity before percutaneous coronary intervention in determining cardiac risk one year later. *Am J Cardiol*. 2003;91:876–8.
19. Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, Wu KK, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients. *Thromb Haemost*. 1995;74:1329–34.
20. Vanschoonbeek K, Feijge MA, Keuren JF, Coenraad Hemker H, Lodder JJ, Hamulyák K, et al. Thrombin-induced hyperactivity of platelets of young stroke patients: Involvement of thrombin receptors in the subject-dependent variability in Ca^{2+} signal generation. *Thromb Haemost*. 2002;88:931–7.
21. Kunicki TJ, Federici AB, Salomon DR, Koziol JA, Head SR, Mondala TS, et al. An association of candidate gene haplotypes and bleeding severity in von Willebrand disease (WD) type 1 pedigrees. *Blood*. 2004;104:2359–67.
22. Matsuno H, Kozawa O, Nagashima S, Kanamaru M, Uematsu T. Comparative antiplatelet effects of aspirin, vapiprost and GR44053, a GPIIb/IIIa antagonist, with a special reference to the role of platelet microaggregates. *Br J Pharmacol*. 1999;127:1129–34.
23. Miyamoto S, Kawano H, Sakamoto T, Soejima H, Kajiwara I, Shimomura, et al. Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemo St*. 2003;89:681–6.
24. Dunkley S, Harrison P. Platelet activation can occur by shear stress alone in the PFA-100 platelet analyzer. *Platelets*. 2005;16:81–4.
25. Francis JL. Platelet dysfunction detected at high shear in patients with heart valve disease. *Platelets*. 2000;11:133–6.
26. Viisoreanu D, Gear A. Effect of physiologic shear stresses and calcium on agonist-induced platelet aggregation, secretion, and thromboxane A2 formation. *Thromb Res*. 2007;120:885–92.
27. Goldsmith HL, Bell DN, Braovac S, Steinberg A, McIntosh F. Physical and chemical effects of red cells in the shear-induced aggregation of human platelets. *Biophys J*. 1995;69:1584–95.
28. Hall MW, Goodman PD, Solen KA, Mohammad SF. Formation of occlusive platelet aggregates in whole blood caused by low concentrations of ADP. *ASAIO J*. 2000;46:693–5.
29. Martínez M, Romero E, Peñarrocha F, Beltrán H, Sánchez I, Salvador A. Utilidad de la citometría de flujo en la determinación de microagregados plaquetarios en pacientes con stent tratados con clopidogrel. *Lab Clin*. 2008;1:42–7.