



Universidad Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado

GRADO EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Prolongación del tiempo de conservación de las
plaquetas humanas

Curso académico: 2014-2015

Convocatoria de: Junio

Autora:

Patricia Rego Hermida

Vº Dº Director:

Manuel Guerra Sánchez

ÍNDICE

Resumen	2
Introducción	3
La plaqueta y sus características	4
• Metabolismo	6
• Activación plaquetaria	7
• Regulación fisiológica de la adhesión y agregación plaquetaria	10
• Función inflamatoria e inmune de las plaquetas	11
• Conservación de las plaquetas	12
◦ Temperatura de conservación	12
◦ Sistema Inhibidor	13
• Evaluación de la actividad plaquetaria	14
• Aplicaciones terapéuticas de los concentrados de plaquetas	16
Objetivos	17
Material y Métodos	18
Resultados	22
Discusión de los resultados	29
Conclusiones	32
Referencias bibliográficas	32
Anexos	36

RESUMEN

El mantenimiento de las propiedades de las plaquetas durante su almacenamiento, depende fundamentalmente del medio de conservación y de la temperatura. Con el objetivo de prolongar su conservación sin disminuir su viabilidad, en este estudio se modificó el método de almacenamiento a través del empleo de tres preparados (XR2, XRL2 y un Inhibidor), la intervención se realizó sobre plasma rico en plaquetas (PRP) y sobre concentrado de plaquetas (CP), a temperatura ambiente y en congelación a -21°C. Para caracterizar las alteraciones ocurridas durante el almacenamiento, se realizaron análisis al 6º, 7º y 8º día de conservación a temperatura ambiente y en las primeras 24 y 48 horas tras la descongelación. Se determinaron por citometría de flujo el número, tamaño celular, mortalidad marcando con yoduro de propidio y el porcentaje de plaquetas usando anticuerpos contra el antígeno CD41, marcados con fluoresceína (FIT).

Los resultados obtenidos, apoyan el empleo de los preparados utilizados tanto a temperatura ambiente como en congelación, garantizando la calidad de los concentrados y mejorando los estándares del control.

La posibilidad de la congelación plaquetaria gracias a los preparados del estudio abre nuevas vías de investigación en la conservación de estas células.

Palabras Clave: *plaquetas, almacenamiento, supervivencia, citometría de flujo, congelación, medios de conservación.*

ABSTRACT

Maintaining the properties of platelets during storage, mainly depends on the preservation medium and temperature. In order to prolong its shelf life without reducing their viability, in this study the storage method was modified through the use of three preparations (XR2, XRL2 and a Inhibitor), the intervention was performed on platelet-rich plasma (PRP) and platelet concentrate (CP), at room temperature and frozen at -21 ° C. Analysis were carried out to 6th, 7th and 8th day of storage at room temperature and the first 24 and 48 hours after thawing, in order to characterize the alteration during storage. The number, cell size, mortality marking with propidium iodide and the percentage of platelets using antibodies against CD41 antigen, labeled with fluorescein (FIT) were determined by flow cytometry.

The obtained results support the use of preparations used both at room temperature like frozen, ensuring the quality of concentrates and improving control standards.

The possibility of frozen platelet preparations thanks to the study opens new lines of research in the conservation of these cells.

Keywords: *platelets, storage, survival, flow cytometry, freezing, preserving methods.*

INTRODUCCIÓN

De los tres elementos formes de la sangre, la plaqueta ha sido el último en ser descubierto. Giulio Bizzozero en 1882 describió la formación del tapón hemostático y lo diferenció de la coagulación, identificándolos como procesos independientes y paralelos.¹

Actualmente se conoce que las plaquetas, además de almacenar diversos mediadores químicos, también tienen la capacidad de realizar síntesis de varios tipos de proteínas a partir de ARN preformados y de interaccionar con diversos tipos de partículas, componentes de la matriz extracelular y otras células. Estas características posibilitan que las plaquetas intervengan activamente, no sólo en la hemostasis y trombosis, si no también en la inflamación, remodelación tisular y posiblemente en la defensa innata.²

El incremento en la demanda de cantidad y calidad de los concentrados de plaquetas ha revelado las importantes limitaciones en su conservación, actualmente establecida entre 3 y 5 días a 22°C y agitación continua, lo que hace imprescindible el desarrollo de nuevas técnicas que permitan aumentar el tiempo de almacenamiento manteniendo su actividad funcional.

Intentando paliar esta necesidad, ha surgido un gran interés en la creación de métodos para la conservación de las plaquetas tanto en estado líquido como congeladas, y así mantener unos depósitos suficientemente prolongados que satisfagan las demandas clínicas.

Conociendo que las plaquetas pueden almacenarse hasta 5 días, bajo condiciones controladas, se ha estudiado como los cambios en las condiciones de almacenamiento alteran la función biológica, estos cambios se denominan “lesiones de almacenamiento”.³

Por este motivo, y puesto que las condiciones de conservación influyen determinantemente en la retención de las propiedades de las plaquetas, los estudios se han centrado en las principales variables que afectan a estas propiedades, como son la solución preservativa y la temperatura de almacenamiento.

El presente trabajo aspira a prolongar el tiempo de conservación de las plaquetas “in vitro” actuando sobre estas dos variables.

La posibilidad de mantener unas plaquetas viables al 6º, 7º y 8º día de su conservación a temperatura ambiente (22°C), así como la capacidad de mantenerlas en congelación obteniendo una adecuada función plaquetaria tanto en el momento de la descongelación y transcurridas más de 24 horas de conservación a temperatura ambiente tras este proceso de descongelación, hacen de esta intervención un importante y necesario aporte a la ciencia y un avance que podría beneficiar a multitud de pacientes.

Con este estudio intentaremos dar respuesta a los requerimientos de los bancos de sangre, logrando mejorar la conservación de estas células y conseguir optimizar los recursos.

Para entender como se ha llevado a cabo el experimento es necesario explicar en profundidad la plaqueta y sus características.

LA PLAQUETA Y SUS CARACTERÍSTICAS

La plaqueta es el elemento más pequeño de la sangre, formado a partir de un fragmento citoplasmático del megacariocito, siendo una célula anucleada pero dotada de ARN mensajero y maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas. Recientemente, se ha descubierto que las plaquetas traducen ARNm y sintetizan sus proteínas en respuesta a señales de activación, ya que poseen un complejo repertorio postrascriptional.⁴

Su tamaño es de 2 a 3 μm , la concentración en sangre oscila entre 150 y 450000 plaquetas/ml y son renovadas a una velocidad de 35000/ μl /día. Las plaquetas son poco densas y emergen en plasma. En cuanto a su masa seca, el 60% es material protéico y el 15% lípidos. A pesar de tener una apariencia simple en el frotis de sangre periférica, estas células tienen una estructura compleja dividida en cuatro zonas⁵:

La **zona periférica**, incluye la membrana exterior y estructuras íntimamente relacionadas con esta. La plaqueta tiene un sistema de canales conectados a la superficie llamado sistema canalicular abierto (SCA). El SCA ofrece un acceso de las sustancias plasmáticas al interior de la plaqueta y un canal de salida para los productos plaquetarios. La liberación de productos plaquetarios a través del SCA después de la activación plaquetaria se le llama “reacción de liberación”.

La membrana de la plaqueta está llena de múltiples receptores plaquetarios, que determinan su identidad celular específica. Estos receptores se expresan de manera constitutiva en las plaquetas y requieren de cambios de conformación durante la activación celular a fin de expresar la función receptora.

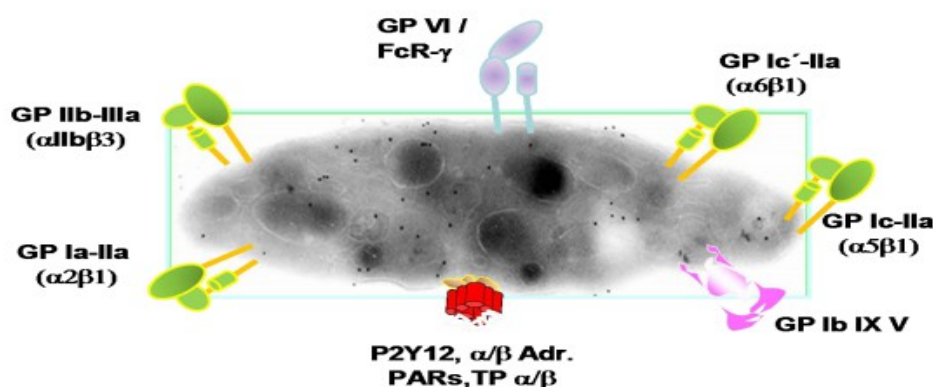
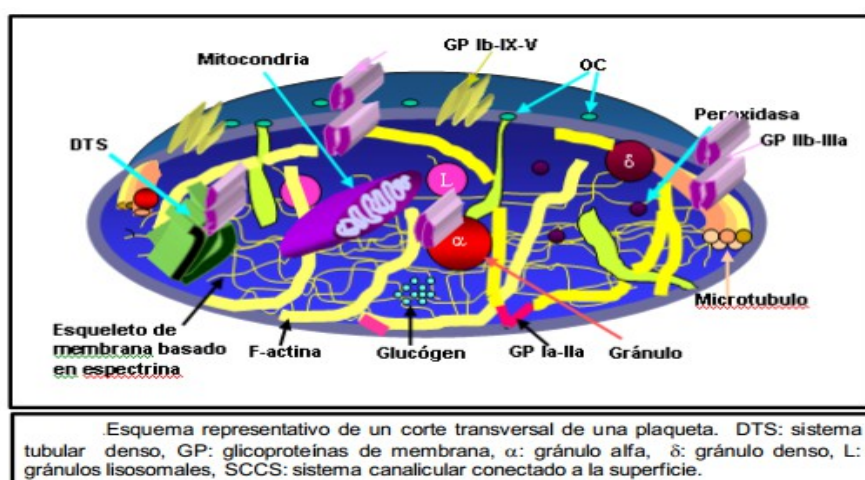
Encontramos diversos tipos de receptores de membrana: receptores de la familia de las integrinas, receptores ligados a proteínas G, receptores de tipo tirosin quinasa, ricos en leucina, etc. A continuación, detallaremos algunos de ellos:

- Receptores de la familia de las integrinas: se caracterizan por enlazarse a proteínas que tienen la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD):
 - GP Ia/IIa: receptor para colágeno.
 - GP Ib/IX/V: es una glicoproteína rica en leucina que resulta fundamental para la unión inicial de las plaquetas a la matriz extracelular y su adhesión al vaso dañado. Su ligando es el Factor de Von Willebrand (FVW).
 - GP Ic/IIa: receptor para la fibronectina.
 - GP IIb/IIIa: es el más abundante. Entre sus ligandos se encuentra el fibrinógeno, el FVW, la fibronectina, la trombina y la vitronectina. Imprescindible para que las plaquetas sean capaces de enlazarse al fibrinógeno y agregarse.
 - GP IV: receptor para la trombospondina.
 - GP VI: receptor para el colágeno.

Prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas

- Receptores acoplados a proteínas G:
 - Receptor purinérgico (P_2Y): la unión de ADP estimula la participación de este receptor en la activación plaquetaria.
 - Receptor serotoninérgico (5HT-2A): implicado en el reclutamiento de plaquetas.
 - Receptor de tromboxano A_2 ($TP\alpha$, $TP\beta$): favorece el reclutamiento y la agregación.
 - Receptor adrenérgico (α_2): suplemento del receptor ADP.
 - Receptor de trombina (PAR-1, PAR-4)

La zona periférica también incluye los fosfolípidos de la membrana y tiene función de traducir señales de la superficie en señales químicas internas.



*Ilustración 1: Esquema de la plaqueta.*⁶

La **zona sol-gel** se encuentra debajo de la zona periférica y constituye la estructura de la plaqueta, el citoesqueleto. El citoesqueleto forma el sostén para el mantenimiento de la forma discoide de la plaqueta así como del sistema contráctil actina-miosina que, tras la activación, permite cambio de forma, prolongación pseudopódica, contracción interna y liberación de constituyentes granulares. El citoesqueleto comprende entre 30%-50% de las proteínas totales de la plaqueta.

Prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas

La **zona de organelas** está formada por gránulos y componentes celulares como lisosomas, mitocondrias, peroxisomas, etc. Estas organelas sirven en los procesos metabólicos y almacenan sustancias necesarias para la función plaquetaria.

Dentro de los gránulos, encontramos:

- Los gránulos densos que contienen ATP y ADP no metabólicos, serotonina, pirofosfato y calcio.
- Los gránulos alfa que contienen proteínas adhesivas (como fibrinógeno, fibronectina, Factor Von Willebrand (FVW), trombospondina, vitronectina y P-Selectina), receptores (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX), sustancias que fomentan el crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor transformante B (TGFB), factores de coagulación (factor V, cininógeno, factor XI y activador plasminógeno inhibidor-1) y el factor plaquetario 4 (FP4). Estos gránulos, tienen una importante participación en el funcionamiento celular, al propiciar la interacción entre plaquetas, de ahí que la cantidad de gránulos alfa (como promedio 35-40) determina el valor funcional de la célula. También participan en la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido.

Los factores de crecimiento antes mencionados, presentan otras funciones que involucran a la plaqueta en actividades que van más allá de los procesos hemostáticos. Así, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), es un factor involucrado en la angiogénesis tumoral por lo que establece una relación entre las plaquetas y la formación de metástasis, y el PDGF además de ser el mitógeno más potente que hay en la sangre está involucrado en procesos tan dispares como el anidamiento o la restitución muscular.^{7 8}

Por último, la **zona de membranas**, incluye el sistema tubular denso. Es aquí donde se concentra el calcio, importante para desencadenar eventos contráctiles.

La producción de plaquetas, presenta características que le son propias respecto a otras series hematopoyéticas. Las plaquetas inmaduras, recién salidas de la médula ósea, van al bazo y constituyen el depósito esplénico no intercambiable. Dos tercios de estas, serán liberadas al torrente circulatorio formando el depósito plaquetario intercambiable y permaneciendo en equilibrio con el depósito esplénico.

Se requieren aproximadamente cinco días para que un megacarioblasto se diferencie y madure hasta plaqueta, con un promedio de vida media circulante de 7-10 días. Se destruyen en el sistema retículoendotelial por fagocitosis, principalmente en el bazo, hígado y médula ósea.

Metabolismo

Las plaquetas se caracterizan por un consumo extenso de oxígeno. Su principal fuente de energía la obtiene a través de la fosforilación oxidativa y de la glucólisis, esta última se ve favorecida por bajas concentraciones de oxígeno.³

Incorporan en su interior, por mecanismos independientes de energía, fragmentos de membrana que contienen Glicoproteína IIb/IIIa, y, por mecanismos dependientes de energía,

fragmentos de membrana que contienen GPIIb, permitiendo la regeneración de los receptores de membrana.⁹

Estas células concentran la mayoría de la serotonina de la sangre, la cuál toman unida a calcio mediante transporte activo. También toman del plasma ligandos como fibrinógeno, colágeno, fibronectina y aminas biógenas.

Activación plaquetaria

La función de las plaquetas es fundamental en los procesos que favorecen la formación de coágulos dentro del vaso sanguíneo (trombosis) y que evitan la hemorragia (hemostasis). La participación de la plaqueta en estos procesos, depende de que se lleven a cabo 3 eventos: adhesión, cambio de forma, agregación y secreción plaquetaria.¹⁰

Las plaquetas circulan en los vasos sanguíneos de forma “inactiva”, lo que desde un punto de vista molecular implica una baja afinidad del receptor del fibrinógeno (la integrina IIb/IIIa) por su ligando, resultando imposible la agregación plaquetaria.¹¹

Cuando se altera la integridad de un vaso, los productos subendoteliales quedan expuestos, y aumenta el número de ligandos que actuarán sobre la membrana plaquetaria. Existen dos tipos de ligandos:

- Agonistas de receptores acoplados a proteínas G
- Proteínas extracelulares de adhesión, que se comportan como ligandos de receptores específicos (integrinas) situados en la membrana plaquetaria

Esta unión de las plaquetas a las estructuras subendoteliales expuestas se conoce como fase de anclaje, de contacto o de adhesión. El proceso de adhesión se inicia de forma diferente en función de la fuerza de cizalla. En lugares de alto estrés de rozamiento, como por ejemplo pequeños vasos, el FVW actúa como puente entre el colágeno subendotelial y el receptor GPIIb de la membrana plaquetaria. Esta interacción permite que disminuya lo suficiente la velocidad de circulación de las plaquetas para que otros ligandos interaccionen con sus receptores, además de producir un cambio conformacional en la célula y activar a GPIIb/IIIa. La activación de la integrina IIb/IIIa hace que pueda unirse a ella el FVW y se produzca una firme adhesión de las plaquetas al endotelio vascular. También se une a ella el fibrinógeno circulante induciendo la agregación y formación del trombo.

En lugares en los que la fuerza de cizalla es menor, las plaquetas se adhieren a proteínas adhesivas expuestas por la matriz, a través de GPIIc/IIa a la fibronectina, de GPIIa/IIa al colágeno y de GPIIb/IIIa al fibrinógeno.

El reclutamiento de otras plaquetas ocurre por medio de una interacción plaqueta-plaqueta, mediada principalmente a través del fibrinógeno y su receptor, GPIIb/IIIa. Se forman enlaces firmes que dependen de la estructura fibrilar del colágeno y de la cantidad de subunidades RGD (arginina-glicina-aspartico).^{9 12 13}

Como hemos comentado, tras la adhesión tiene lugar el fenómeno de activación plaquetaria, y como primera manifestación física se produce un cambio de forma de discocito a esferocito, que se acompaña de un incremento en la superficie desde 8,02 μm^2 (en la plaqueta en reposo)

a $13,0 \mu\text{m}^2$ (en la plaqueta activada). Disminuye la longitud del subesqueleto submembrana, cuya evaginación aporta membranas para este proceso y se produce la redistribución de los microtúbulos, lo que le confiere la característica de deformabilidad celular y la posibilidad de emitir pseudópodos. Los microtúbulos que están en estrecho contacto con el gel contráctil, se trasladan hacia el centro de la célula. Se procede a la desintegración del citoesqueleto y se restituye a partir de la internalización de fragmentos de la membrana externa. Es un proceso independiente de calcio, cuando el estímulo es el ADP y dependiente de energía.¹⁴

Esta activación se lleva a cabo gracias a la unión de colágeno, ADP y la primera trombina en formarse en el área a sus receptores, desencadenando una hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria que seguirá dos vías:

- Vía de los fosfoinosítoles: por acción de la fosfolipasa C obtendremos DAG y IP3. Esto tiene como resultado una inducción de la secreción granular, la regulación de los receptores GP IIb/IIIa (al cuál se une fibrinógeno y otras proteínas) y un aumento de la agregación. También aumenta el calcio citosólico que dispara la secreción granular con activación de la fosfolipasa A_2 .
- Vía de los eicosanoides: la fosfolipasa A_2 hidroliza los fosfolípidos de membrana para dar lugar al ácido araquidónico, que a través de la actuación de la ciclooxigenasa resulta en prostaglandinas y tromboxano A_2 (TXA_2). El tromboxano A_2 inhibe la hidrólisis fosfodiesterásica del AMPc, por lo que favorece la agregación. Además, en el caso del TXA_2 se cree que también produce entrada a la célula del calcio extracelular a través de una intensificación del intercambio Na^+/H^+ , de lo cual depende más de la mitad del incremento del calcio citoplasmático, favoreciendo que se alcancen concentraciones de calcio suficientes como para activar a la fosfolipasa A_2 .

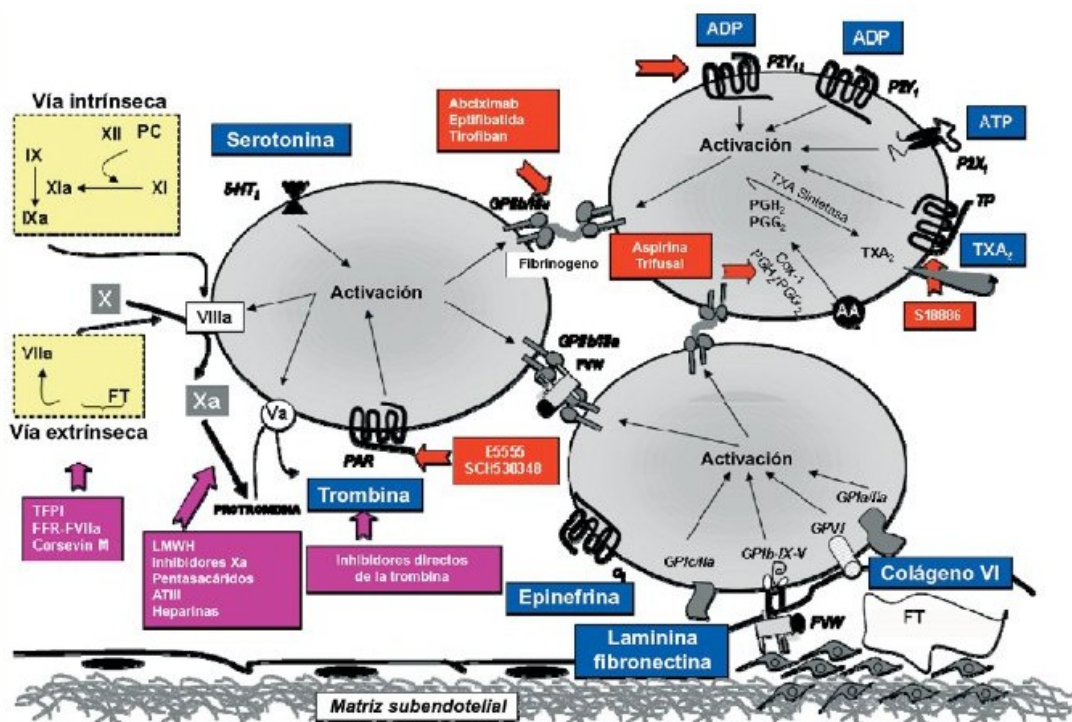


Ilustración 1: Vías de activación plaquetaria, agonistas e inhibidores.¹⁵

Otros receptores se activan de forma diferente:

- Los de ADP (P_2X_1 , P_2Y_1 y P_2T) son purinérgicos, se caracterizan por responder con activación frente al ADP e inactivación frente al ATP. Su estimulación provoca la inhibición de la adenilciclasa, un aumento del calcio citoplasmático, un cambio de forma y el reclutamiento de plaquetas para formar el tapón hemostático primario.
- El colágeno al actuar sobre GPIa/IIa y GPVI produce la liberación de ADP, TXA_2 y calcio, además de activar a GPIIb/IIIa.
- La trombina se une a sus receptores PAR-1 y PAR-4 activando a P-Selectina y CD40, y desencadenando una liberación de ADP, TXA_2 , serotonina y epinefrina.

Otro fenómeno concomitante, sería la secreción de los gránulos plaquetarios. Al igual que ocurre en otras células, la activación y secreción plaquetaria están reguladas por cambios en los nucleótidos cíclicos (ADP, ATP), el flujo de entrada de calcio, la hidrólisis de los fosfolípidos y la fosforilación de proteínas intracelulares críticas.

Alguna sustancia secretada, como el Factor V, genera un aumento de trombina, dando lugar a la formación de bandas de fibrina que refuerzan el “tapón” elaborado por las plaquetas. De esta forma, las plaquetas contribuyen al proceso de coagulación del plasma y a la conversión final del fibrinógeno, participando activamente en el remodelado y la retracción del coágulo.

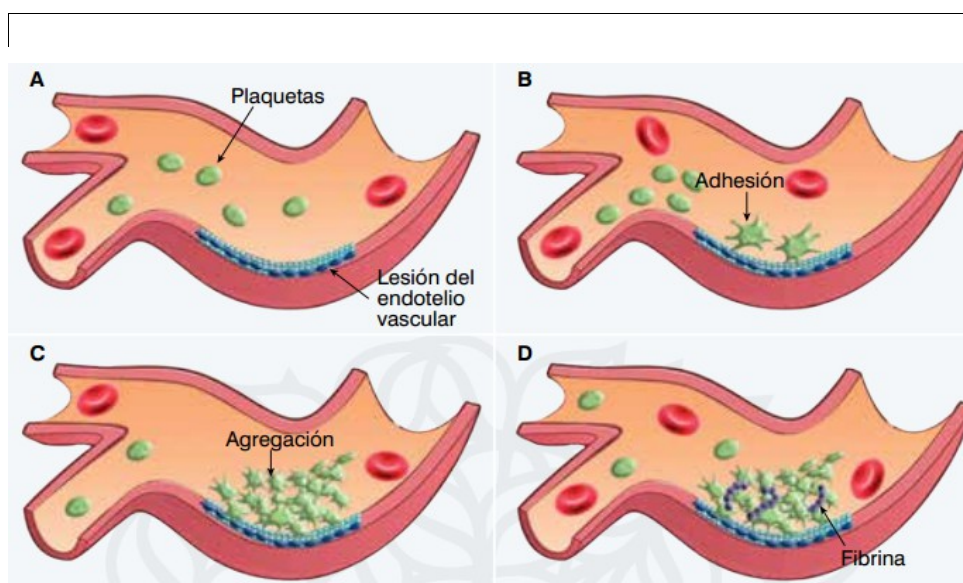


Ilustración 2: Respuesta plaquetaria al daño vascular. A: Tras el daño vascular, el colágeno y el FVW expuesto en la superficie endotelial, activa y captura las plaquetas circulantes. B: las plaquetas se adhieren al endotelio dañado y forman una monocapa. C: Secretan sustancias que inducen la unión entre plaquetas (agregación) para formar el tapón hemostático. D: Mediante la activación de la cascada de coagulación (hemostasia secundaria) se forma fibrina, que estabiliza el coágulo.¹⁶

La interacción de plaquetas activadas con leucocitos, en concreto monocitos, amplifica la cascada de coagulación en situaciones tanto fisiológicas como patológicas, lo que relaciona íntimamente la coagulación con la respuesta inflamatoria e inmune. Algunos estudios realizados en ratones, demuestran esta asociación al objetivar sangrado en animales con trombocitopenia cuando se inducía la inflamación en la piel, pulmones o cerebro.⁴

En resumen, la contribución de las plaquetas a la hemostasia estriba en la formación del tapón hemostático primario, la provisión de una superficie para que active la coagulación, la secreción de sustancias para el reclutamiento adicional de plaquetas, la liberación de promotores de reparación endotelial y la restauración de la arquitectura vascular normal.

Regulación fisiológica de la adhesión y agregación plaquetaria

Las plaquetas circulantes interactúan de forma dinámica con los componentes del plasma, elementos formes de la sangre y el endotelio vascular mediante glicoproteínas de membrana y diferentes mediadores químicos.

Entre los mecanismos que favorecen la adhesión y agregación están la liberación de ADP gracias a la lisis de los eritrocitos, la liberación del factor activador de plaquetas y TXA_2 de los leucocitos activados.

El TXA_2 aumenta la actividad de la fosfolipasa C, que estimula la activación y la secreción plaquetaria, ya mencionada en otros apartados.

Sin embargo, la vía del Factor activador de las plaquetas (PAF) tiene una modalidad de agregación independiente a la de ADP y TXA_2 , que sólo puede ser bloqueada por antagonistas específicos. De manera esquemática se puede decir que ante el estímulo del PAF se produce retracción de las células endoteliales por vacuolización de su citoplasma y adhesión de plaquetas, cuya morfología se modifica con la emisión de pseudópodos que atraen a otras plaquetas hacia la masa en formación. Se produce la degranulación de factores plaquetarios y en particular liberación de PAF que acelera el proceso y atrae a otras células, los neutrófilos afluyen y se mezclan al trombo.

También hay invasión de monocitos que fagocitan los desechos de plaquetas y fibrina y que además liberan radicales libres, leucotrienos y PAF, que atraen a más células. Alrededor de los eosinófilos se mezcla el trombo en formación, al cual se adhieren también eritrocitos, y adquiere su forma definitiva.¹⁸

La adhesión sólo es efectiva cuando se producen enlaces irreversibles. La célula endotelial libera mediadores que impiden que se produzca la adhesión plaquetaria en un endotelio sano. Estos son la prostaciclina (PGI_2), el óxido nítrico (NO) y la ecto-ADPasa o CD39.

La PGI_2 estimula la adenilciclase y aumenta los niveles intracelulares de AMPc, mientras NO estimula la síntesis de GMPc, el más potente inhibidor de la hidrólisis de AMPc. Además de inhibir la adhesión de las plaquetas, modulan su agregación disminuyendo el calcio libre intracelular.¹⁴ La ecto-ADPasa es un componente integral de la superficie del endotelio que se activa en función de la concentración de sustrato, con lo que se limita la concentración plasmática de nucleótidos ADP y ATP. De este modo, la actividad de esta enzima frena la fase crítica de reclutamiento y activación plaquetaria al ir removiendo los nucleótidos en el entorno fluido.

Junto con estas tres vías, el endotelio ofrece otros mecanismos que permiten modular la formación del trombo al actuar, principalmente, sobre la vía de la coagulación sanguínea.

Entre ellos encontramos: la vía del heparansulfato y la trombomodulina. Ambos son

componentes integrales del endotelio vascular que median la activación de la antitrombina III y la proteína C, respectivamente, y bloquean así, la síntesis de trombina.

Por último, la síntesis y liberación del activador tisular del plasminógeno, que limita la estabilización del trombo al promover la degradación de la malla de fibrina.¹⁷ Existe, por tanto, un mecanismo equilibrado que controla la velocidad y extensión de la activación plaquetaria.

Función inflamatoria e inmune de las plaquetas

Además de ser células principales en la hemostasia, la especialización de las plaquetas hace que sean efectores clave en la inflamación y respuesta inmune innata y adaptativa.

Las plaquetas humanas reconocen y responden a la invasión de patógenos, siendo unos de los mediadores de inmunidad intracelular que primero responden en la infección. Las respuestas plaquetarias son variadas, encontrándose entre ellas la activación, adhesión, agregación, y su interacción con neutrófilos, monocitos y células endoteliales que contribuyen a la captura y contención de patógenos.

La contención de los microorganismos se debe a una entrada en la plaqueta gracias al sistema canalicular abierto, así, de forma paralela, se liberarían factores antimicrobianos plaquetarios (PMPs) y se activaría una respuesta inflamatoria secundaria para llevar a cabo su eliminación. La formación de fibrina y trombina son un evento crítico para la retención y muerte de bacterias específicas y la prevención de su diseminación. Sin embargo, estos mecanismos de contención pueden contribuir a la persistencia de bacterias en patologías como la endocarditis u otras infecciones intravasculares.⁸

Como toda respuesta inmune innata y adaptativa, la actividad antibacteriana de las plaquetas puede dañar al huésped si esta es inducida de manera inapropiada o alterada. Como por ejemplo, los eventos trombóticos relacionados con la agregación plaquetaria estimulada por bacterias o productos bacterianos, o la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), que a pesar de ser un importante mecanismo en la captura y muerte bacteriana, se ha relacionado con el daño vascular, la trombosis y una amplificación patológica de la hemostasia.⁴

Aunque menos estudiado que las interacciones entre plaquetas y bacterias u hongos, existe evidencia de su función de defensa frente a protozoos, parásitos y virus. Diversos receptores plaquetarios ya mencionados por sus funciones hemostáticas, tienen además funciones inmunomoduladoras e inflamatorias.

Los receptores acoplados a proteínas G son importantes ejemplos. La familia de los receptores activados por proteasas (PARs) son unos de los más estudiados por su relevancia en la respuesta inmune, puesto que la trombina tiene un efecto estimulante de la rapamicina por lo que esta puede tener funciones inmunopatológicas en las vías dependientes de mTOR.

En cuanto a los receptores purinérgicos de ADP, forman una importante diana para la intervención terapéutica frente a eventos trombóticos. Además, un conocido antagonista como es el clopidogrel, ha demostrado experimentalmente inhibir la interacción de plaquetas-

PMN y plaquetas-monocitos en la nefropatía secundaria a lupus eritematoso sistémico (LES) y la interacción plaquetas-leucocitos en trasplantados renales.

Uno de los factores más subestimados es PAF, el cuál además de la activación sinérgica de las plaquetas, está involucrado en respuestas inflamatorias sistémicas como las que tienen lugar en la sepsis o en la anafilaxia.

La expresión del ligando CD40, la secreción del Factor Plaquetario 4 y RANTES y la liberación de IL-1 β ilustran tres mecanismos de respuestas hemostáticas e inmunes. Dichos mecanismos, promueven desde la supervivencia y diferenciación del monocito a macrófago (en el caso de la expresión de FP4) como el reclutamiento de células T (RANTES) o la actividad inmune adaptativa a distancia de los lugares dónde se liberan microvesículas por estímulos trombóticos.^{2, 4 y 19} La expresión de CD40L, se asocia con la respuesta febril a la transfusión.

Por último, mencionar el reconocimiento de un nuevo rol de las plaquetas participando en el desarrollo linfático y contribuyendo a la anatomía funcional y a la topografía del sistema inmune adaptativo.

Conservación de las plaquetas

La utilización creciente de transfusiones de plaquetas aumenta los requerimientos, tanto de calidad como de cantidad, de los concentrados de plaquetas (CP) por lo que, los bancos de sangre se han visto en la obligación de mejorar los procedimientos de obtención, preparación y almacenamiento de estas células.²⁰

De entre todos los parámetros que están involucrados en la conservación de los CP, nos centraremos en la Tª de conservación y el uso de un sistema inhibidor reversible.

Temperatura de conservación

Actualmente los concentrados de plaquetas se almacenan hasta 5 días en agitación continua a una temperatura media de 22°C, por normativa del BOE-A-2005-15514. Este tiempo de conservación se ve limitado por una disminución de pH, debido al aumento del lactato resultado de una actividad metabólica anaerobia. La caída del pH por debajo de 6 se asocia con cambios morfológicos irreversibles y disminución de la viabilidad postransfusional. Además, otra de las limitaciones que ofrece la conservación a 22°C es el crecimiento bacteriano potencial.

Frente a este modelo de almacenamiento, se encuentra la refrigeración. Este método defiende que la conservación de las plaquetas a 4°C disminuye su función metabólica, el número de contaminantes y mantiene más estable el pH (al inhibirse prácticamente la glicolisis). Sin embargo, el almacenamiento refrigerado tiene como consecuencia múltiples problemas inherentes:

- En primer lugar, en las primeras 24h el trombocito pasa de su forma discoidal habitual a una forma esférica irregular, lo que ocasionará una disfunción biológica de la célula.
- En segundo lugar, tras 24-48h, aumenta la agregación espontánea, que se ha relacionado con tiempos de supervivencia cortos en circulación.
- En tercer lugar, las plaquetas almacenadas a esta temperatura no consiguen recuperar

su actividad funcional después del periodo de almacén.^{20 21}

- Finalmente, las plaquetas almacenas a una temperatura de entre 2-6°C, aunque conserven su función, son eliminadas al ser transfundidas debido a modificaciones irreversibles de la glicoproteína plaquetaria GPIb α en el ambiente frío, que provoca una destrucción mediada por el receptor del complemento CR3 presente en los macrófagos hepáticos.⁷

Existen modelos experimentales que plantean bloquear las vías esenciales para la activación, con objetivo de disminuir la susceptibilidad de la plaqueta a los daños que ocasiona una temperatura de 4°C.²¹

Sistema inhibidor

Con el fin de que se eviten pérdidas de viabilidad y la actividad funcional durante el almacenamiento, se usan sistemas inhibidores, cuya actividad afecta a las vías de segundos mensajeros de las plaquetas, porque se ha demostrado que inhiben la agregación inducida por agonistas, tanto por separado como en combinación con los otros. Y lo que es más importante, la inhibición es reversible, pudiéndose separar el sistema inhibidor de las plaquetas mediante lavado mecánico (in vitro) o mediante efecto de dilución de transfusión directa.

A continuación, se describen algunos de los compuestos químicos que han demostrado utilidad como inhibidores de lesiones de plaquetas:

- Como efectores de la vía del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) se emplean adenosina, Iloprost, ticlopidina, clopidogrel, prostaciclina o PGE2.
- Sobre el intercambiador Na/H⁺ actúan Amilorida y análogos de la amilorida.
- Como efectores del Guanosín monofosfato cíclico (GMPc) se encuentran el nitroprusiato de sodio y la L-arginina.
- La inhibición de la vía de la ciclooxigenasa es producida gracias a la aspirina, dipyridamol, flurbiprofeno, ticlopidina, sulfinpirazona, indobufeno, trifusal o al OPC29030.²²
- La aspirina y la ticlopidina inhiben la vía de la lipooxigenasa.
- La ruta de la fosfolipasa es inhibida por la quinacrina.
- Para evitar la cascada de calcio se emplean proteínas quinasa C, efectores de calmodulina, ionóforos de calcio o estimuladores de la ATPasa.
- Los inhibidores de proteasa/proteinasa actúan, para inhibir la agregación plaquetaria, a través de la inhibición de cambios en los receptores de superficie.
- Para modificar la membrana se utiliza heparina, amantadina, ajoeno, ticlopidina y/o pentoxifilina.
- Por último, la lidocaína inhibe la segunda fase de la agregación plaquetaria inducida por ADP o por epinefrina y parcialmente la agregación inducida por colágeno, en concentraciones empleadas en la anestesia local. Esta inhibición se lleva a cabo gracias a que potencia el efecto antiagregante de dibutilil-AMPc (dB-AMPc) y del estimulador de la adenilato ciclasa, PGE1.

Si la temperatura de conservación de los concentrados se encuentra por debajo de 2-8°C es necesario añadir crioprotectores como dimetil sulfoxido, maltodextrinas, hidroxietil, dextrano, almidón o glucosa.

La adicción de tres o más inhibidores, cada uno de los cuáles que inhiba una ruta diferente de

activación plaquetaria, es fundamental para la conservación de los concentrados, reactivación y viabilidad funcional a largo plazo.²¹

A pesar de numerosos intentos para optimizar el almacenamiento de plaquetas, los cambios progresivos en la forma de las células y el deterioro permanente del potencial de activación subsiguiente continúan limitando el almacenamiento. Con el uso de un sistema inhibidor reversible y el almacenamiento a temperatura de refrigeración se recuperan numéricamente un 80-90% de las plaquetas, dentro de estas las no modificadas por lesión se encuentran en torno al 65%.²¹

La viabilidad de las plaquetas transfundidas al término de su periodo de conservación, dependen en gran parte del mantenimiento de un pH por encima de 6.0, puesto que se evitarían los cambios de forma irreversibles.

Los estudios que se centran en la criopreservación, recogen resultados con disminución significativa en el recuento de plaquetas durante periodos de conservación de 72 horas a 4°C. También notificaron una disminución de la respuesta al estrés hipotónico a partir de las 24 horas. Sin embargo, el pH se mantuvo en un rango adecuado.²⁰

Evaluación de la actividad plaquetaria

Igual de importante que una buena conservación es que la plaqueta retenga su capacidad funcional después del almacenamiento.

La funcionalidad plaquetaria puede ser evaluada por variadas metodologías que detectan alteraciones morfológicas, bioquímicas y de la composición de la membrana, asociadas a la activación celular. Entre los principales métodos utilizados para analizar la función plaquetaria se encuentran los métodos basados en agregación plaquetaria, en la liberación de productos plaquetarios, en el análisis microscópico o por citometría de flujo.²³ También se emplean métodos indirectos como la medición de pH.

La citometría de flujo proporciona un análisis multiparamétrico de células individuales, constituyendo por ello la técnica más empleada y útil en el estudio de las plaquetas. Básicamente el citómetro de flujo mide propiedades de absorción y dispersión de luz por la célula o partícula subcelular, y la fluorescencia emitida por fluorocromos unidos a componentes celulares de interés, inducidas por una iluminación apropiada. Entre los parámetros susceptibles de ser analizados por un citómetro de flujo encontramos la morfología plaquetaria, sus antígenos y los procesos de activación.^{23 24}

Como hemos comentado, el análisis de la actividad plaquetaria se puede realizar mediante el marcaje de anticuerpos unidos a fluorocromos frente a las siguientes moléculas:

- CD 41: Antígeno de membrana de plaquetas, megacariocitos y células embrionarias hematopoyéticas. Se denomina integrina $\alpha 2b$ y se relaciona con la integrina β del CD61.²⁵
- CD61: se expresa de forma normal en la superficie de las plaquetas y permite definir la población plaquetaria.
- CD62 (P Selectina): molécula presente en los gránulos de las plaquetas, se expresa en

la superficie cuando estas están activadas.

- Otras moléculas susceptibles de ser marcadas son el CD41, el CD42, CD51, CD63 y el CD107.²⁶

Se han observado buenos resultados con la utilización de concentrados en los que se describen la presencia de hasta un 20-30% de plaquetas activadas.²⁷

El antígeno CD41 se encuentra en todas las plaquetas humanas normales. El anticuerpo se conjuga con 5isotiocianato de fluoresceína (FITC), el láser del sistema excita a las plaquetas marcadas y se mide la dispersión lumínica y la fluorescencia resultantes. Estos datos, permiten diferenciar las plaquetas de los eritrocitos, leucocitos, desecho celular y otras partículas.

La exactitud en el recuento de plaquetas que proporciona el citómetro, ha ido adquiriendo una importancia cada vez mayor debido a la presión que existe para disminuir el uso de transfusiones de plaquetas y mejorar el control del inventario de plaquetas en los bancos de sangre.

Otros parámetros empleados para medir la actividad plaquetaria son: la respuesta al estrés hipotónico y la agregación inducida por colágeno o ADP. Además, la medida de liberación de sustancias de los gránulos proporciona información importante sobre la integridad de las plaquetas durante el almacenamiento.²¹

La respuesta al estrés hipotónico se emplea para ver si las plaquetas han retenido la viabilidad metabólica. Consiste en añadir una disolución hipotónica y medir la capacidad de las plaquetas de superar ese estrés, lo que refleja una buena recuperación tras el almacenamiento y es un importante indicador de supervivencia en el torrente circulatorio.

Otra de las características que muestra si las plaquetas han mantenido su integridad funcional es el potencial de agregación. Mediante el empleo de agonistas como colágeno o ADP se evalúa si las plaquetas son capaces o no de agregarse. De manera fisiológica, en la curva de agregación aparecerá un descenso seguido por una rápida subida. Este descenso se debe a los cambios que produce en las plaquetas la activación de las mismas y que originan un aumento momentáneo de la densidad óptica. Al comparar los resultados con el control se establece como valores normales un 75% de agregación.¹⁶ También se determina si existe agregación espontánea, es decir, si estas se agregan sin la presencia de agonistas. La existencia de agregación espontánea se ha relacionado con la remoción de plaquetas en la circulación y por esa razón tienen tiempos de supervivencia cortos.

Dentro de las pruebas que evalúan la secreción plaquetaria, destacan dos principalmente. La primera, una lumiagregometría, mide simultáneamente la agregación y la luminiscencia de la luciferasa. La liberación de ATP que secretan los gránulos densos al ser estimulados por agonistas sería empleado como energía necesaria para la oxidación del pigmento y producción de luz. La agregación se mediría gracias al incremento en la transmisión de luz de las plaquetas agregadas en comparación con las que no lo están.¹⁶ La secreción también puede medirse permitiendo que las plaquetas absorban serotonina etiquetada con ¹⁴C y luego midiendo su liberación en respuesta a agonistas. Esta prueba tiene un componente considerablemente técnico y se realiza sólo en laboratorios selectos. Las anomalías en

estas pruebas de secreción podrían ser indicadores de defectos de liberación y almacenamiento.⁵

La prueba del torbellino óptico (nefelometría) tiene la ventaja de ser un método no invasivo de comprobación de la viabilidad plaquetaria. La forma discoide de las plaquetas refleja un resplandor opalescente (torbellino óptico) cuando se observan en contra de una luz. Este resplandor se correlaciona bien con los valores de pH y, en consiguiente, con una buena viabilidad de las plaquetas. Por lo tanto, se comprobaría que los concentrados reflejasen el torbellino y se evaluaría el pH de los productos en los que esté ausente este fenómeno. A pesar de requerir más estudios para investigar si la viabilidad de las plaquetas está alterada cuando el resplandor está ausente y el pH es el adecuado, este método podría reemplazar a pruebas sistemáticas de control de la calidad de los concentrados.²⁰

Para evaluar la capacidad de adherirse de las plaquetas, normalmente se utilizan los métodos de Hellem y Salzman, una variante del primero. La prueba consiste en hacer pasar las plaquetas a través de un tubo lleno de bolas de cristal y medir la capacidad de adhesión que presentan, comprobando cuantas quedan retenidas. Se comparan los resultados con la sangre control, resultando un valor normal el 50% de agregación.⁷

Por último, podemos controlar la viabilidad de las plaquetas asegurando que mantienen un pH adecuado.

Aplicaciones terapéuticas de los concentrados de plaquetas

De los componentes sanguíneos, son los componentes plaquetarios los que más aplicaciones tienen en la medicina actual. Inicialmente indicados para la transfusión en varias condiciones clínicas (como en quimioterapia, miocarditis hemorrágica o en enfermedades que producen una supresión funcional de la médula ósea), se utilizan además en medicina regenerativa y para enriquecer los medios en el cultivo de células.

El desarrollo de una buena terapia de transfusión plaquetaria ha sido crucial para la aparición de nuevos agentes quimioterápicos, ya que la trombocitopenia que ocasionaba su uso era una de las mayores causas de muerte que provocaban.⁷

A continuación, citaremos las principales aplicaciones terapéuticas de las transfusiones de plaquetas:

- Profilaxis de hemorragias
- Hemorragia activa
- Trombopenia central aguda: leucemias, linfomas, tratamientos quimioterápicos o de radioterapia, anemia megaloblástica...
- Trombopenias periféricas: PTI, CID, trasplante hepático, sepsis, hiperesplenismo, CEC...

Actualmente, cada vez es mayor el número de especialidades que se unen al empleo de concentrados de plaquetas debido al descubrimientos de nuevas propiedades terapéuticas de estas células.

Inicialmente empleados en cirugía maxilofacial y dental como compactante y sellante de implantes óseos, sus propiedades osteointegradoras los han convertido en un perfecto

adyuvante para acortar el tiempo de recuperación de ciertas cirugías.

Esto se debe a las cualidades regenerativas de los factores de crecimiento que poseen, que han supuesto una revolución en la cirugía ortopédica y medicina deportiva debido a que aceleran la restauración de los tejidos consiguiendo recuperar la lesión incluso en la mitad de tiempo.^{28 29}

Además, gracias a su efecto estimulador del fibroblasto cutáneo, biopotenciador de tratamiento de relleno de tejido adiposo o ayudando a luchar contra la involución celular que tiene lugar en el envejecimiento, su utilidad es creciente en la estética.^{30 y 31}

Una de las más importantes aplicaciones es como adhesivo biológico, empleado para cohesionar injertos óseos, aumentar la adhesividad de colgajos cutáneos o mucosas al lecho receptor. Sus ventajas en relación al resto de adhesivos son la hemostasia, una menor necesidad de drenajes y vendajes compresivos, la disminución de edemas postoperatorios o la mayor curación de heridas.

Por otro lado, se ha empleado en Neurocirugía para mejorar el proceso de fusión espinal y regeneración de nervios periféricos y se trabaja para futuras aplicaciones en el tejido dañado por isquemia cerebral.¹⁰

Cabe destacar, el importante número de estudios de investigación y artículos al respecto en el campo de la ingeniería tisular.³²

OBJETIVOS

Para dar respuesta a la investigación se formulan los siguientes objetivos que han sido catalogados en generales y específicos.

General: prolongar el tiempo de conservación “in vitro” de las plaquetas sanguíneas humanas manteniendo su estructura y función.

Específicos:

- Definir el medio de conservación más óptimo para las plaquetas.
- Evaluar la actividad plaquetaria tras 6, 7 y 8 días de conservación a 22°C y en las primeras 24 y 48 horas de descongelación.
- Comparar la conservación a temperatura ambiente frente a temperatura de congelación.
- Conseguir una adecuada conservación de los concentrados de plaquetas mediante congelación tras cinco días de almacenamiento a temperatura ambiente (22°C) y agitación continua.
- Valorar que los niveles de pH son adecuados para la conservación de las plaquetas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En busca de cumplir con los objetivos de esta intervención, se actuó sobre dos variables principales en la conservación de las plaquetas:

- Medio de conservación: empleamos tres preparados:
 - Preparado xr2: aporta nutrientes suficientes para la obtención de energía y a su vez neutraliza los efectos del ácido láctico producido en la glucólisis, así como su incremento debido a la actividad metabólica de los glóbulos blancos que contaminan el concentrado de plaquetas.
 - Preparado xrl2: además de lo citado contiene un inhibidor que permite el bloqueo de las vías esenciales de activación plaquetaria, ya que no se desea que haya ninguna activación durante el almacenamiento.
 - El tercer preparado contiene únicamente un protector de membrana que igualmente evita la activación plaquetaria.
- Temperatura de conservación: es uno de los factores que más incide negativamente en la calidad de los concentrados, actualmente se realiza a una temperatura de 22° y con agitación. Esta intervención pretende desarrollar la conservación a una temperatura de -21°C y comparar sus resultados con los de la temperatura ambiente (22°C), con el fin de establecer el mejor medio de conservación para las plaquetas y deducir si existe superioridad de una conservación frente a la otra.

Diversos estudios apuestan por el desarrollo de técnicas de congelación de las plaquetas, ya que dotaría de flexibilidad en el tiempo de empleo, además de disminuir el número de contaminantes, su función metabólica y mantener estable el pH. Las intervenciones hasta ahora realizadas plantean problemas con la recuperación de la función plaquetaria tras su refrigeración.²⁰

Por estas razones, el empleo de los preparados que defiende este trabajo supondría una mejora en el proceso de congelación de las plaquetas, haciéndolas viables pasadas las 24 horas tras su descongelación.

Para realizar el experimento se emplearon 9 bolsas de sangre de 500 ml que contienen una solución anticoagulante CPD-A450 (citrato, fosfato, dextrosa y adenina), cedidas por el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, de pacientes sometidos a sangrías terapéuticas por padecer poliglobulia. Las bolsas de sangre se mantuvieron a una temperatura media de 22°C hasta el momento de la centrifugación.

Se repartió la sangre en tubos de plástico de aproximadamente 50 ml, fueron centrifugados a 900 rpm durante 30 minutos a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en una centrífuga Beckman, para aislar de la sangre el plasma rico en plaquetas.

Una vez que la sangre estaba centrifugada, se obtuvieron 60 muestras de plasma rico en plaquetas (PRP) a los cuales se les añadió el preparado de disolución XR2, XRL2 o únicamente un Inhibidor, resultando 8 tipos de muestras con las siguientes concentraciones, en las que los tipos 1 y 2 corresponden al control:

Prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas

- Muestra 1 y 2: 9 ml PRP
- Muestra 3 y 4: 6 ml PRP + 3ml XR2
- Muestra 5 y 6: 9 ml PRP + 0,6ml del Inhibidor
- Muestra 7 y 8: 6 ml PRP + 3,4ml de XRL2

Las muestras de los tubos impares (1, 3, 5 y 7), se mantuvieron en agitación continua a temperatura ambiente (22°C).

Cuando se usan temperaturas por debajo de cero grados es beneficioso introducir un agente crioprotector como el dimetil sulfóxido (DMSO) en el medio de conservación. Por lo tanto, fue añadido a las muestras pares (2, 4, 6 y 8), un 10% de DMSO, esta concentración evita el daño ocasionado por las bajas temperaturas sin llegar a producir toxicidad.³³

Tras 2 minutos en agitación para la mezcla los componentes, se almacenaron en un congelador a 21°C bajo cero.

Previamente se había estudiado la conservación de estas muestras usando al menos tres concentraciones diferentes de cada uno de los preparados. También se había evaluado la posibilidad de una conservación sin DMSO, quedando descartada después del análisis de los resultados.

Por otro lado, se trataron concentrados de plaquetas (CP) cedidos por el Banco de Sangre del Hospital Universitario Lozano Blesa al quinto día de su almacenamiento, momento en el que dejaron de ser aptos para ser aplicados a pacientes. Se baraja la posibilidad de congelar o mantener estos concentrados a temperatura ambiente y así reducir el número de bolsas que se desechan, dotando de una alternativa viable para su conservación y posterior uso en enfermos.

En la terminología se llamará concentrado de plaquetas (CP) a las muestras cedidas por el banco de sangre y plasma rico en plaquetas (PRP) a las obtenidas en el laboratorio de bolsas con sangre completa.

En la realización del estudio experimental se han empleado 6 bolsas de concentrados de plaquetas, obteniendo un total de 42 muestras analizables, que se han dividido en los mismos 8 tipos que las de PRP, resultando dos muestras de cada preparado y dos controles y, manteniéndose los números impares a temperatura ambiente y agitación continua, y los números pares en congelación.

Transcurridos 6, 7 y 8 días de conservación en las condiciones detalladas, se evaluaron las muestras por el citómetro CELL-DYN Sapphire, realizando la medición tanto por su sistema óptico como por bioimpedancia, en el Hospital Universitario Miguel Servet.

La elección del día sexto, séptimo y octavo día para realizar el análisis de viabilidad, se debe a que en la práctica actual en los Bancos de Sangre las plaquetas dejan de ser viables a partir del quinto día de conservación, lo que hace necesario que se realicen las determinaciones en dichos días de conservación y no antes.

Por motivos de accesibilidad al citómetro, se ha reducido el análisis de las muestras de CP mantenidas a temperatura ambiente a los días 7º y 8º. Se empleó la citometría de flujo, puesto

que se necesitan técnicas objetivas y fiables para determinar las variaciones de calidad durante el periodo de conservación. La citometría de flujo permite obtener un gran número de parámetros celulares, entre ellos son de interés para el presente estudio el número, el tamaño y la mortalidad de las plaquetas.

Además de las medidas citométricas se incluye una medición del pH del medio de conservación ya que es un estupendo marcador de viabilidad de la muestra. También se observaron las muestras por microscopía para visualizar la marcación por fluorescencia.

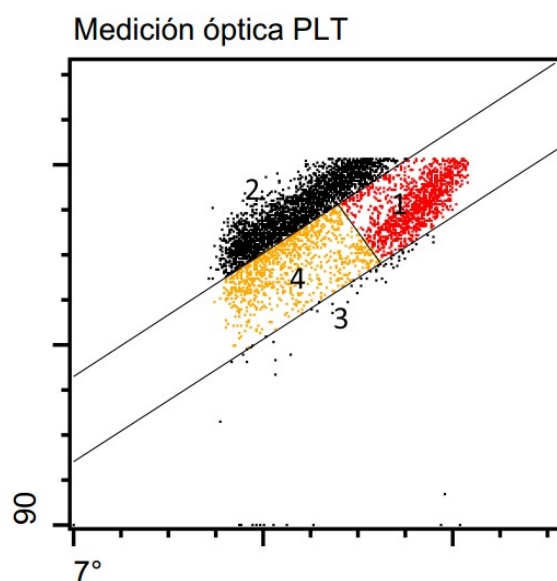
De esta manera, se determina si las muestras mantienen un número suficiente de plaquetas y si estas son viables.

Valoración del número de plaquetas:

La medición del **número de plaquetas** se puede realizar de dos formas, por bioimpedancia y por medición óptica. En el caso de la bioimpedancia vemos como se interrumpe el paso de la corriente eléctrica por partículas de un determinado tamaño, lo cual genera un voltaje cuya altura o amplitud será proporcional al tamaño o volumen celular, y el número de pulsos generados se relaciona con la cantidad celular. Es menos preciso que el sistema óptico ya que puede incluir mediciones de restos de otras células.³⁴

La medición óptica consiste en hacer incidir la luz sobre las células, esta se dispersa en dos direcciones: horizontal y vertical. La dispersión da información sobre el tamaño, volumen y complejidad (granulosidad), mientras que la cantidad de interacciones del haz de luz nos determina el número de células. De esta forma, asegura que sean plaquetas y puede revelar si la muestra se encuentra en condiciones de ser empleada o si por el contrario debe ser desechada.^{23 24}

Se obtiene un gráfico, como el que se muestra a continuación, en el que se discriminan plaquetas granuladas, eritrocitos o plaquetas gigantes, agregados de proteínas, fragmentos celulares y plaquetas :



*Ilustración 4: 1: Eritrocitos o plaquetas gigantes,
2: agregados de proteínas, 3: fragmentos celulares,
4: plaquetas granuladas*

Evaluación de la viabilidad celular:

La medida de la viabilidad nos informa de si nuestras plaquetas son funcionales. Se evalúa la viabilidad de las plaquetas por tres parámetros:

- **El volumen plaquetario** nos indica si las plaquetas tienen el tamaño adecuado para ser empleadas. Una reducción de volumen es indicativo de envejecimiento plaquetario.²³

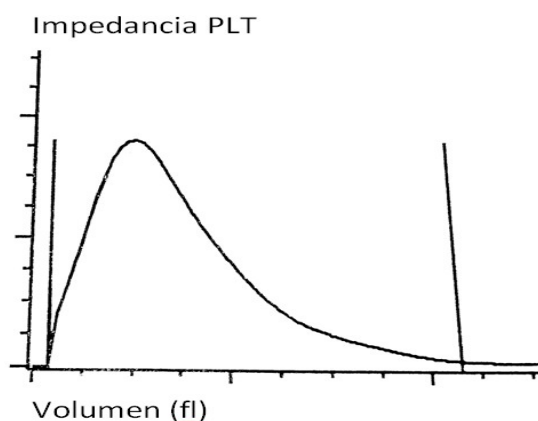


Ilustración 5: volumen plaquetario medio: 10,2 fl (7,5-12.5 fl)

- **La mortalidad plaquetaria** se calcula marcando con yoduro de propidio las muestras. El yoduro de propidio es un agente de intercalación y también una molécula fluorescente que se emplea para teñir células. Se liga a los ácidos nucleicos aprovechando la pérdida de la integridad de las membranas lo que nos permite el marcaje de su ARN con un color rojo fluorescente y así distinguir las plaquetas vivas de las muertas.^{35 36} Se realizó una marcación de las muestras de CP con yoduro de propidio en las primeras 24 horas de la descongelación, y el análisis de mortalidad plaquetaria se llevó a cabo con un citómetro AMIS en Facultad de Medicina de Zaragoza.
- Como parámetro de control de calidad también se determinó **el pH plaquetario**, ya que con valores por debajo de 6 dejarían de ser viables las muestras.²¹ Se realizó la medición con un pHmetro en la Facultad de Medicina de Zaragoza.

En un grupo de CP se estudió la proporción de plaquetas y su viabilidad en un citómetro AMIS. Para determinar la proporción de plaquetas se usaron anticuerpos contra el receptor CD41 marcados con el fluoróforo 5tioisocianato de fluoresceína (FIT). La viabilidad se determinó usando Yoduro de propidio, con el siguiente protocolo de análisis:

Se incubaron 5ml de anticuerpo CD41 con 100 ml de concentrado de plaquetas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos, pasados los cuales se añadió una concentración de yoduro de propidio 220 micromolar y se continuó la incubación durante 3 minutos más.

Prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas

Se observaron dichas muestras en un microscopio Omnic, apreciándose de color verde fluorescente las plaquetas marcadas con el anticuerpo CD41-FIT y de color rojo fluorescente las marcadas con yoduro de propidio, como se puede ver a continuación:

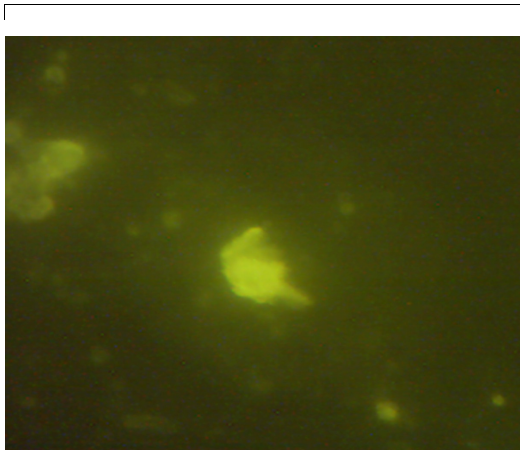


Ilustración 6: plaquetas marcadas con CD41-FIT

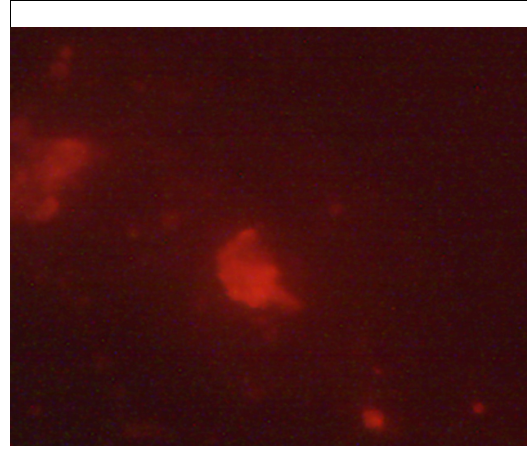
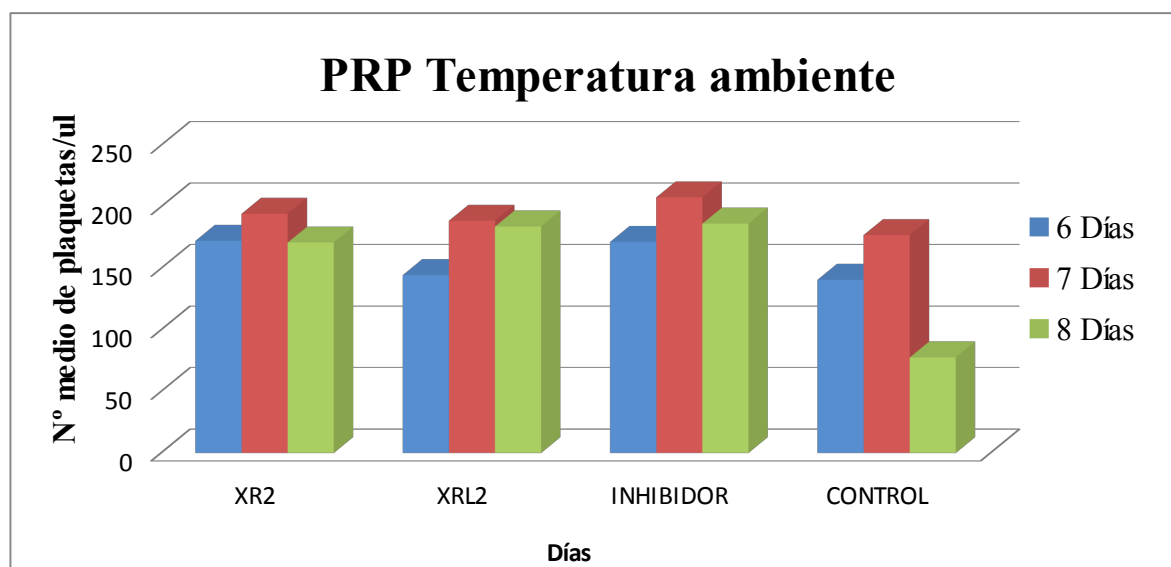


Ilustración 7: plaquetas marcadas con yoduro de propidio

RESULTADOS

A continuación, se presenta mediante diagramas de barras los resultados de número y tamaño celular, obtenidos tras analizar cada una de las muestras por citometría. Para facilitar su comprensión, se han estratificado dichos diagramas según la temperatura de conservación. En primer lugar, se detalla un análisis de los datos obtenidos en las muestras de plasma rico en plaquetas (PRP); continuando, a su finalización, con las muestras de concentrado de plaquetas (CP).

GRÁFICO 1: Número medio de plaquetas conservadas a Tª Ambiente (PRP)



Prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas

Como se muestra en el gráfico anterior, los tres preparados (XR2, XRL2 e Inhibidor) han alcanzado un adecuado número de plaquetas a lo largo de los tres días de análisis. Por tanto, han cumplido con los requisitos exigidos a la hora de transfundir una unidad de concentrado de plaquetas, que contengan al menos $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas en 50 ml, además de un recuento leucocitario $< 0,5 \times 10^8$, y un pH entre 6,2 y 7,4 que también han cumplido.^{37 38 39}

Es importante recalcar, que la medición óptica del número celular está realizada a 7°, de esta forma se contabilizan las plaquetas en función de su complejidad, por lo que el número resultante representa las plaquetas granuladas o, lo que es lo mismo, las plaquetas funcionales.

Posteriormente, se han sometido los datos a un análisis estadístico, con el objetivo de comprobar si los preparados empleados en el estudio presentan algún tipo de relación con el número de células encontrado en las muestras. Para saber que tipo de análisis estadístico se debe utilizar, se ha comprobado, a través del test de Saphiro-Wilk, que las muestras se distribuyen normalmente y, utilizando el test de Levene, que las varianzas de dichas muestras son homogéneas. Ambas características permiten concluir que es posible emplear el test de ANOVA, el cual indicará si existe relación entre los preparados y el número celular. (Ver tablas 1-9 en anexo).

Este análisis lo hemos replicado en el resto de métodos de conservación. Asimismo, para todos los métodos de conservación también se han calculado unos porcentajes de mejora, utilizando para su obtención las medias recogidas en las tablas 35, 36, 37 y 38 (anexo). En dicho anexo, se detallan las desviaciones típicas correspondientes a cada una de las medias calculadas. En general, se observa que las desviaciones típicas de las medias de nuestro estudio, presentan valores reducidos, lo que se traduce en una mayor representatividad de las medias utilizadas; puesto que los valores empleados para su cálculo se encuentran poco dispersos frente a las mismas.

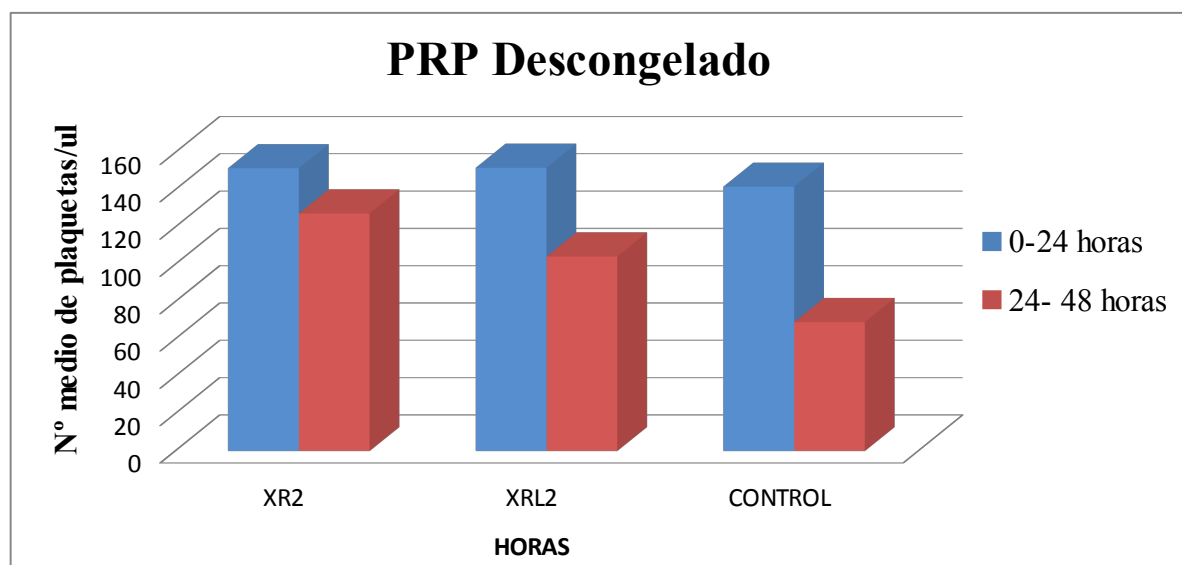
Atendiendo al gráfico, pese a que el sexto y séptimo día de análisis no se objetivan diferencias significativas entre los preparados y el control, es posible observar un ligero incremento del número celular. Las variaciones en el conteo celular dentro de un mismo preparado en el 6° y 7° día, incrementándose en este último, se deben al análisis de diferentes alícuotas, puesto que existían limitaciones en la accesibilidad al citómetro.

Si bien, el preparado XR2 logra mejorar el control al sexto y séptimo día en un 21,98% y 9,6%, respectivamente; como también lo hace el preparado XRL2 (2,8% y 6,7%) y el Inhibidor (21,9% y 17,5%). Por ello, aunque estadísticamente no se puede establecer una relación positiva entre los preparados y el número celular; el estudio revela ligeras mejoras utilizando el preparado XR2 en el sexto día y el Inhibidor al séptimo día. (Ver tabla 11 en anexo).

Centrando el análisis en el octavo día de conservación, el test ANOVA demuestra la existencia de diferencias significativas en el número de células, dependiendo si se utilizan los preparados descritos o el control. A fin de establecer que preparados son los responsables de esas diferencias y si existen diferencias entre los tres preparados, recurrimos al test de Scheffé.

Dicho test, muestra que dos de los preparados, concretamente XRL2 y el Inhibidor, mejoran significativamente el número de plaquetas con una confianza del 95% ($p < 0.016$), disminuyendo de este modo, la pérdida plaquetaria inherente a la conservación. (Ver tabla 10 en anexo).

GRÁFICO 2: Número medio de plaquetas conservadas en congelación (PRP)



La conservación de las plaquetas mediante congelación plantea el problema de la formación de agregados plaquetarios tras la descongelación, hecho que ha obligado a reducir el número de preparados estudiados a dos: XR2 y XRL2. Esta reducción se debe, a que prácticamente la totalidad de muestras descongeladas tratadas con el Inhibidor presentaban este fenómeno. Asimismo, se han retirado muestras del control por el mismo motivo.

Atendiendo al gráfico anterior, existe un incremento del número de plaquetas en las muestras conservadas con los preparados, con respecto a las conservadas con el control. Además, esta diferencia se hace más notable, una vez transcurridas 24 horas de la descongelación, ya que el número celular disminuye más lentamente en las muestras tratadas.

De esta forma, la mejoría proporcionada por el preparado XR2 con respecto al control es de un 7% en las primeras 24 horas de la descongelación y asciende significativamente a un 84% en el segundo día. En cuanto al preparado XRL2, consigue mejorar el control un 7% el primer día y, transcurrido el mismo, un 43,4%. Pese a ello, es preciso un análisis de un mayor número de muestras para objetivar diferencias estadísticamente significativas.

GRÁFICO 3: Tamaño plaquetario medio del PRP conservado a Tª ambiente

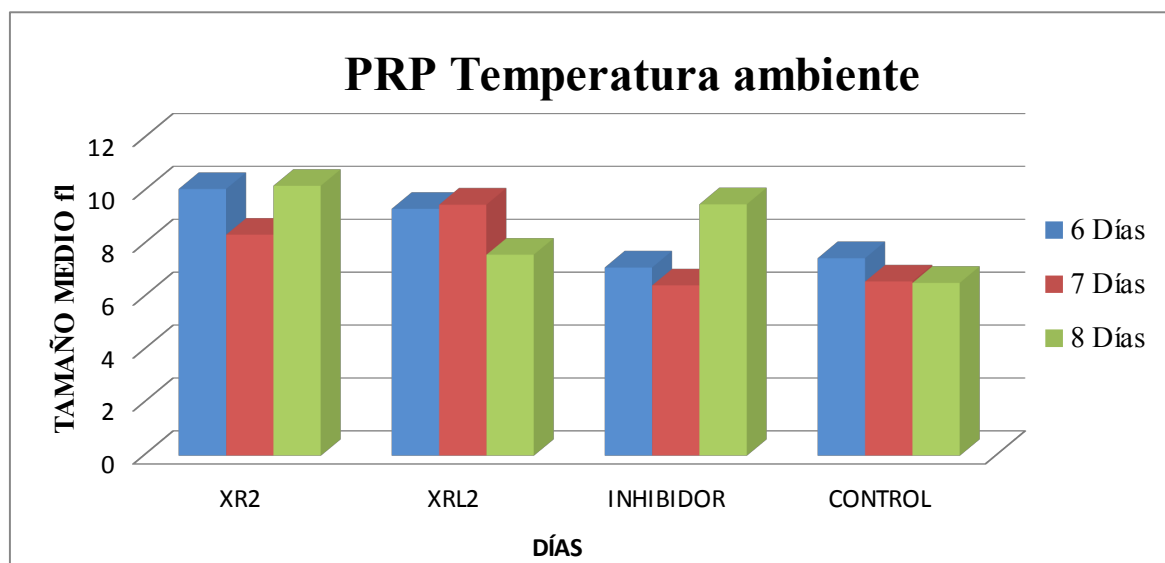
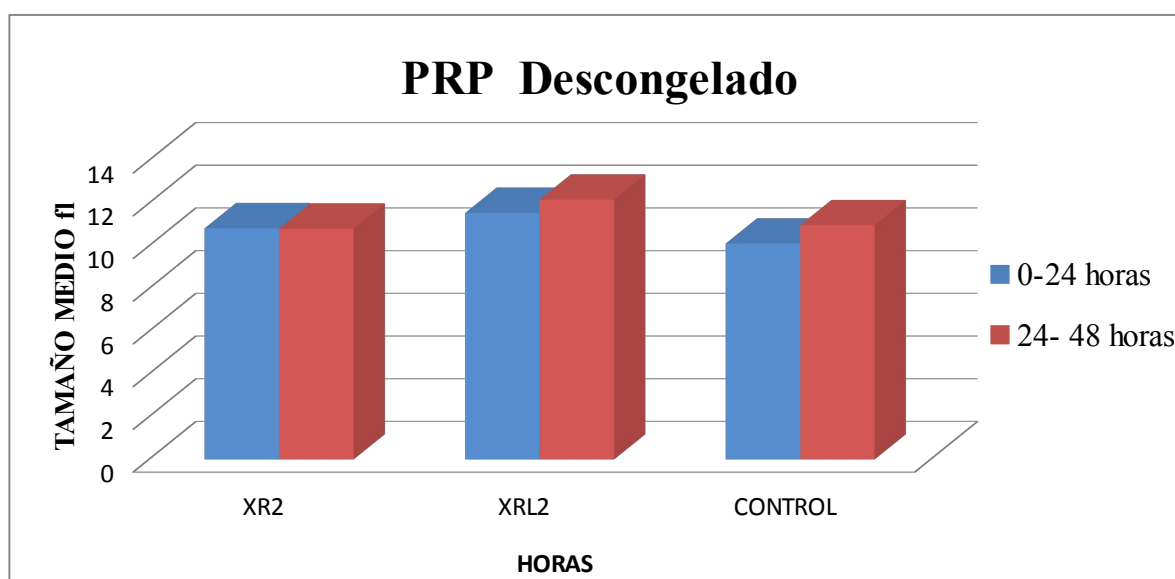


GRÁFICO 4: Tamaño plaquetario medio del PRP conservado en congelación



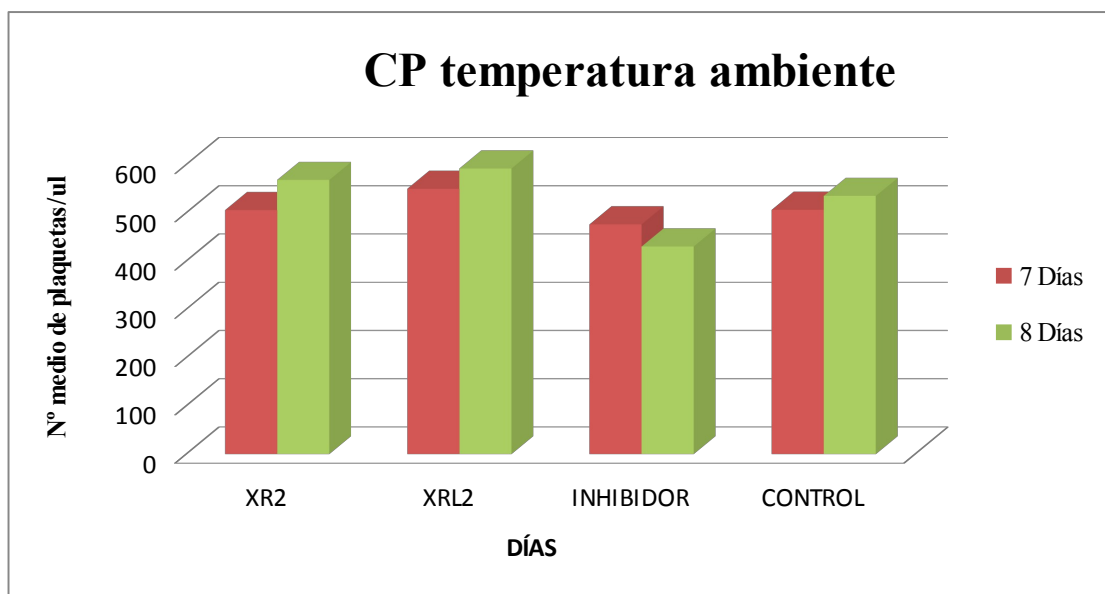
La determinación del volumen plaquetario es importante como parámetro de viabilidad celular, siendo aceptable un valor entre 7,5 y 12,5 fl.

De acuerdo con los gráficos anteriores, el tamaño plaquetario de las muestras conservadas con el preparado XR2 y con el preparado XRL2, mantienen un valor adecuado a los rangos establecidos, tanto a temperatura ambiente como en congelación.

En cuanto al Inhibidor, éste mantiene unos volúmenes plaquetarios más reducidos, situándose algún parámetro por debajo de 7,5. No obstante, es necesario un análisis mayor para comprobar que la disminución de volumen al séptimo día no se ha visto influenciada por el pipeteo de la muestra.

Con respecto al control, también objetivamos una disminución del volumen, siendo ésta de forma progresiva como ocurre en el envejecimiento celular.

GRÁFICO 5: Número medio de plaquetas conservadas a Tª Ambiente (CP)

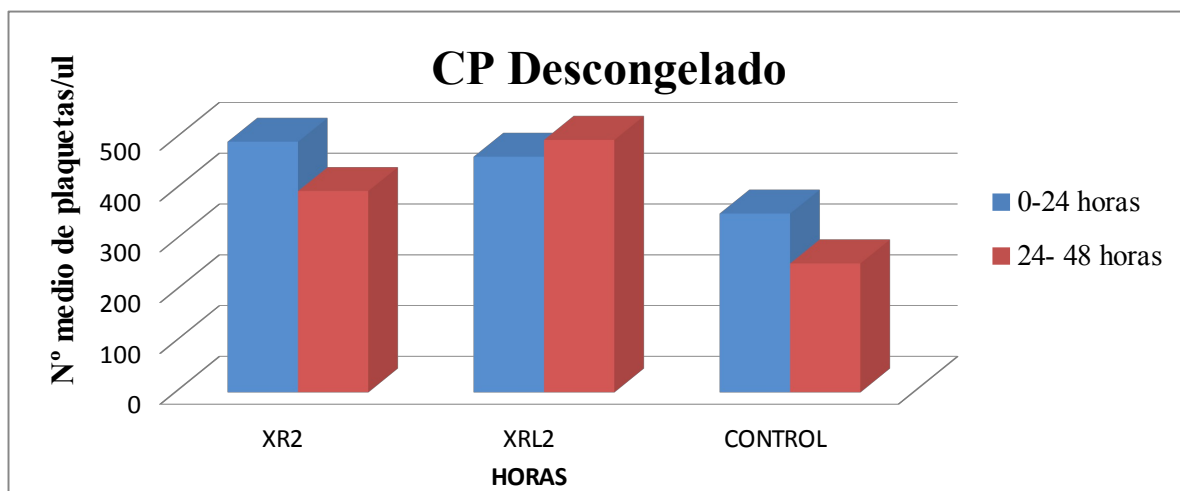


De acuerdo con el gráfico anterior, los concentrados de plaquetas tratados con los diferentes tipos de preparados consiguen mantener un número de plaquetas adecuado para ser empleados en la práctica clínica. Con respecto al número de plaquetas alcanzado en ambas poblaciones, PRP y CP, este es notablemente mayor cuando se trabaja con concentrado de plaquetas.

Por otra parte, pese a que no se aprecian diferencias significativas entre los preparados y el control; es posible establecer comparaciones entre el preparado XR2 y el Inhibidor al octavo día, demostrando la mejoría de XRL2 en la conservación plaquetaria ($P < 0,024$). (Ver 21, 22, 23 y 24 en anexo).

A excepción del Inhibidor, los preparados XR2 y XRL2 mejoran la concentración plaquetaria de las muestras en un 6,62% y un 10,6% al 8º día, respectivamente. En el séptimo día, tan sólo el preparado XRL2 consigue mejorar el control en un 8,7%. (Ver tabla 17 en anexo).

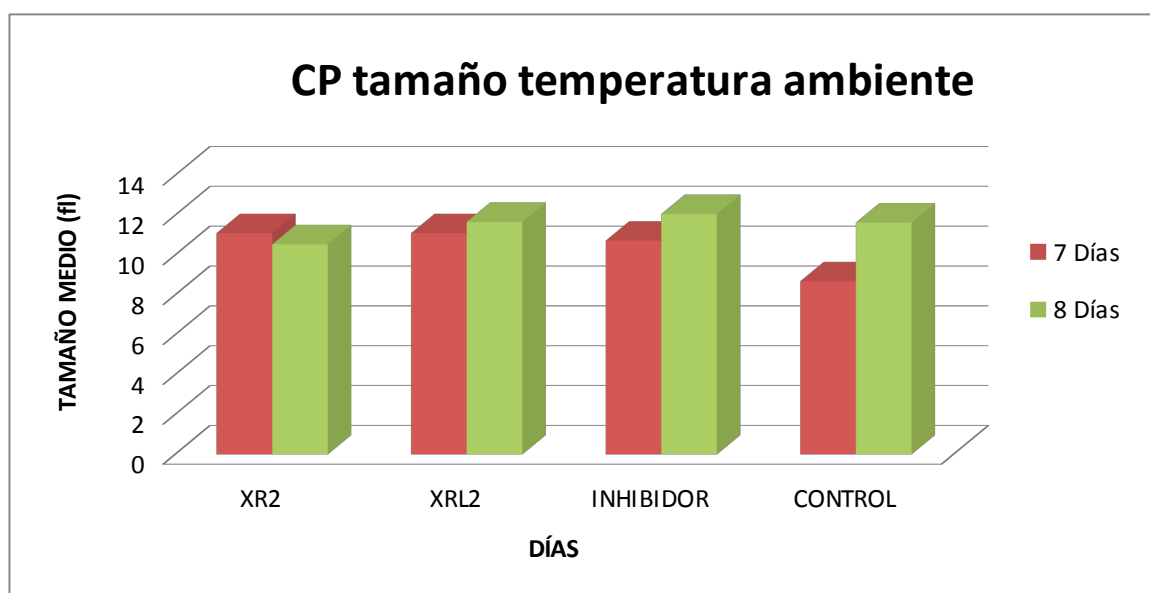
GRÁFICO 6: Número medio de plaquetas conservadas en congelación (CP)



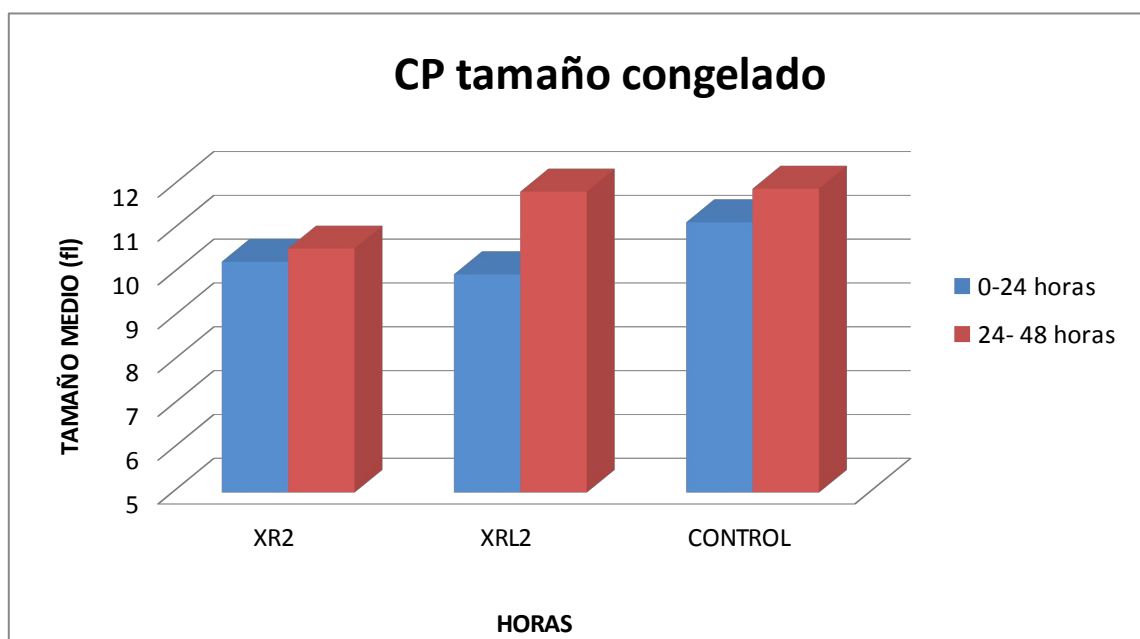
Como se ha mencionado anteriormente, la formación de agregados plaquetarios ha obligado a retirar al Inhibidor del estudio de la conservación mediante congelación plaquetaria.

El diagrama de barras, muestra mayores concentraciones plaquetarias con el uso de ambos preparados, de forma que que pasadas las 24 horas de descongelación, se encuentran diferencias significativas entre XR2 y XRL2, en comparación con el control. De este modo, se puede afirmar con una confianza del 95% que se mejora la conservación con el uso de los preparados. (Ver tabla 28, 29, 30 y 31 en anexo).

GRÁFICO 7: Tamaño plaquetario medio del CP conservado a Tª ambiente y en Congelación



Por último, se puede apreciar en las gráficas, que los concentrados de plaquetas mantienen un tamaño celular adecuado con el uso de los preparados, tanto a temperatura ambiente como en congelación.



Continuando con el análisis de la viabilidad plaquetaria, otro de los parámetros empleados fue el marcaje con yoduro de propidio, como agente de intercalación, que permite determinar la mortalidad plaquetaria.

Una vez determinada la mortalidad en los concentrados de plaquetas en las primeras 24 horas de su descongelación, se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de plaquetas muertas en las muestras con preparados y con el control. De esta forma, se puede afirmar con una confianza del 95% que la conservación de las plaquetas con los preparados a la temperatura de 21°C bajo cero, disminuye la mortalidad plaquetaria con respecto a la conservación en congelación sin los preparados. (Ver tablas 32 y 33 e ilustraciones 9 y 10 en anexo).

Como control de calidad de las muestras, se ha determinado el pH, situándose este entre 6,42 y 6,8; coincidiendo los pHs más alcalinos con las muestras conservadas con los preparados. Si bien, la totalidad de las muestras se mantuvieron dentro del rango establecido para los preparados plaquetarios (6,2-7,4).^{20 39}

Finalmente, otro de los parámetros de control de las muestras que se ha determinado, fue la marcación con el anticuerpo CD41-FIT, consiguiendo establecer la proporción de plaquetas que contenían las muestras. El análisis se ha realizado sobre los concentrados de plaquetas, obteniendo concentraciones por encima del 90%. (Ver ilustraciones 11, 12 y 13 en anexo).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la medida en que se ha conocido en profundidad la estructura de las plaquetas y las condiciones que inducen a cambios en su morfología, viabilidad y función; ha sido posible desarrollar procedimientos de conservación y definir los parámetros que interfieren en el mantenimiento de las características vitales de las plaquetas durante su almacenamiento.

Las lesiones de almacenamiento no sólo afectan a la morfología de las células, sino a la función biológica a la que están destinadas, interrumpiendo las señales de comunicación, lo que conlleva a preguntarse ¿Qué tan efectiva es una transfusión?³

La manipulación adicional de las plaquetas antes de la transfusión, para reducir volumen o filtrar, comporta un aumento de la lesión de conservación que reduce su viabilidad, además de la ya mencionada pérdida de plaquetas que conllevan estos procedimientos.⁴⁰

Conociendo que son diversos los factores que afectan a la calidad del producto plaquetario y, por tanto, al tiempo de vida de este, el presente estudio se ha centrado en dos variables principales: la temperatura de conservación y la solución preservativa.

Según los datos expuestos, se plantea la hipótesis de si el empleo de alguno de los tres preparados descritos consigue prolongar el tiempo de conservación plaquetaria manteniendo una estructura y función similar a valores in vivo. Se pretende demostrar dicha hipótesis en las dos poblaciones de estudio (PRP, CP), y en la conservación a temperatura ambiente y en congelación.

De esta forma, se toma $n=60$ en la población de PRP, y una $n=42$ en la población de CP dividiéndola en 4 grupos a los que se le añaden los preparados XR2, XRL2, el Inhibidor y manteniendo una de ellas como control.

Actualmente, la conservación a temperatura ambiente se ve limitada por una disminución del pH por debajo de 6, resultado de una actividad metabólica anaerobia. Los preparados XR2 y XRL2 que defiende el estudio, dotan de nutrientes y neutralizadores del ácido láctico, garantizando la viabilidad celular durante la conservación. Este último, junto con el Inhibidor, pretenden además, bloquear la activación plaquetaria durante el almacenamiento, con el fin de que puedan realizar su función una vez transfundidas.^{3 21}

Con el apoyo de los resultados obtenidos de la conservación a temperatura ambiente, se afirma que los preparados mantienen las células viables al 6º, 7º y 8º día de almacenamiento, encontrándose diferencias significativas, en cuanto al número, con el control al octavo día.

De esta forma, pese a la necesidad de ampliar el tamaño muestral del análisis para obtener conclusiones dotadas de significación estadística, podemos afirmar que la idea de la intervención mejora la concentración plaquetaria, manteniendo un tamaño plaquetario y un pH adecuado. Por lo que se recomienda seguir esta línea de investigación para un avance en la conservación a temperatura ambiente y una disminución de las lesiones de almacenamiento.

Si bien es cierto que no todos los preparados mejoran los parámetros analizados de la misma forma, ya que en el caso del plasma rico en plaquetas el preparado con Inhibidor consigue resultados más óptimos en cuanto al número plaquetario, así como el preparado XRL2 en los

concentrados de plaquetas, lo que obligaría a analizar en futuras intervenciones a que se deben estas diferencias.

En cuanto al análisis del volumen, éste se ha empleado como control de calidad de las muestras, debiendo encontrarse entre 7,5-12,5 fl, ya que para establecer una comparación entre preparados y días de conservación, es aconsejable haber anulado las diferencias de pipeteo de las muestras.

Por último, cabe mencionar que de las dos principales limitaciones de la conservación a temperatura ambiente de los preparados plaquetarios, el pH y el crecimiento bacteriano potencial, el estudio ha conseguido anular una de ellas tras mantener niveles adecuados de pH. En las próximas fases del estudio se emplearán determinadas concentraciones de antibacterianos para eliminar el segundo inconveniente.^{20 21}

La presente invención demuestra un avance importante en cuanto a resultados beneficiosos de conservación mediante congelación, en comparación a métodos precedentes.

Esta modalidad de almacenamiento, a pesar de ser objeto de muchos estudios, no ha conseguido determinar el mecanismo que garantice una adecuada supervivencia plaquetaria y evite problemas en la recuperación funcional de las plaquetas.²⁰

Barajando la posibilidad de una conservación a 21°C bajo cero, se añadió al medio de conservación, los diferentes preparados y el crioprotector DMSO. Mediante este método, las plaquetas mantienen su forma discoidal y retienen su actividad funcional durante almacenamientos prolongados, lo que ofrece una alternativa viable a la conservación actual.

El número de preparados a estudio se ve reducido a dos, en dependencia a la aparición de agregados plaquetarios en las muestras conservadas con el Inhibidor, lo que obliga a retirar dicho preparado ya que esta activación no es deseada, además de que la agregación espontánea durante el almacenamiento se asocia con un menor tiempo de supervivencia en circulación.²¹

Como objetivo de futuros estudios, habría que determinar si esta agregación es consecuencia de un preparado no válido o de una concentración insuficiente de éste en el medio de conservación.

Con respecto a los otros dos preparados, sí se obtienen mejoras en la concentración de plaquetas de las muestras conservadas con ellos, además de niveles adecuados en los demás parámetros de calidad.

Pese a las diferencias en la composición de ambos, ya que el preparado XRL2 realiza de forma adicional la inhibición de la función plaquetaria, lo que ayuda a la preservación de la activación biológica durante el almacenamiento, XR2 y XRL2 consiguen disminuir el número de problemas inherente a este tipo de almacenamiento como son el cambio de su forma habitual que va ligado a una disfunción celular, la pérdida de actividad o la agregación espontánea.²¹

De esta forma, la conservación plaquetaria gracias a los preparados que se presentan, puede beneficiarse de las ventajas de la congelación como forma de almacenamiento. Estas ventajas consisten en una disminución de la actividad metabólica que garantice un pH más estable y la disminución de contaminantes del medio.

Prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas

Los resultados obtenidos, tanto en las primeras 24 horas de la descongelación como transcurrido el primer día, respaldan la viabilidad de las muestras del estudio, demostrando superioridad en el número de células y una disminución significativa de la mortalidad en los concentrados de plaquetas que se mantienen con los preparados trascurridas más de 24 horas de la descongelación.

De este modo, se dota de flexibilidad en el empleo de concentrados de plaquetas, ya que podrían congelarse cuando se aproximen al quinto día de su almacenamiento a temperatura ambiente o mantenerlos en congelación y realizar la descongelación en el momento que un paciente requiera una transfusión. Además, en el caso de haber realizado la descongelación y haberse anulado la indicación terapéutica, ese preparado podría mantenerse viable más de 24 horas, llegando a ser empleado en otro paciente. La multitud de posibilidades viables en el almacenamiento plaquetario con estos preparados dotan de importancia la contribución de esta intervención.

Además, el aprovechamiento de los recursos optimiza el empleo de las transfusiones plaquetarias.

Por tanto, aunque se trate de fases iniciales del estudio experimental y se requiera una ampliación del tamaño muestral, el periodo de validez se puede prolongar con éxito mediante el almacenamiento con los preparados, tanto a temperatura ambiente como en congelación.

En conclusión, debemos resaltar la necesidad de más estudios para determinar la superioridad del almacenamiento a temperatura ambiente frente a congelación o viceversa. En la presente intervención podemos afirmar la efectividad de los preparados en ambos medios. No obstante, las ventajas de la congelación en cuanto a la menor contaminación y a la flexibilidad de manipulación de preparados e indicación de transfusiones, hacen que resulte más atractivo el desarrollo de este tipo de conservación.

CONCLUSIONES

- El empleo de los preparados de conservación (XR2, XRL2 e Inhibidor) mejoran la viabilidad plaquetaria del Plasma rico en plaquetas y de los Concentrados de plaquetas, tras su almacenamiento a temperatura ambiente. Por tanto, cumple la hipótesis que defiende este estudio, ya que consigue la prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas in vitro.
- El empleo de los preparados de conservación (XR2, XRL2) mejoran la viabilidad plaquetaria del Plasma rico en plaquetas y de los Concentrados de plaquetas, tras su almacenamiento en congelación. Por tanto, cumple la hipótesis que defiende este estudio, ya que consigue la prolongación del tiempo de conservación de las plaquetas humanas in vitro.
- Todas las muestras mantenidas con los métodos de conservación descritos cumplen los estándares de pH y volumen requeridos para un correcto almacenamiento, referenciados en la literatura, independientemente de si demuestran superioridad respecto al control.
- El empleo de XR2 y el Inhibidor con Plasma rico en plaquetas consiguen un número mayor de plaquetas viables al octavo día, conservándolos a temperatura ambiente.
- La mortalidad plaquetaria de los Concentrados de plaquetas, en las primeras 24 horas de la descongelación se ve significativamente disminuida con el empleo de los preparados XR2 y XRL2 respecto al control.
- El proceso de conservación de las plaquetas mediante congelación permite unos niveles recuperación vital hasta ahora no referenciados en la literatura.
- Se requiere continuar con el estudio con el fin de determinar si existe superioridad de la conservación mediante congelación con respecto a la conservación a temperatura ambiente.
- Se necesita intervenciones futuras que avalen el empleo de estos preparados y que determinen la actividad plaquetaria postransfusional, si bien, se concluye que la vía de investigación es la adecuada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Izaguirre Ávila R. El descubrimiento de las plaquetas. Rev Biomed 1997; 8 (3): 197-208.
2. Guzmán Grenfell AM, Maldonado Noriega L, Mendoza Atencio R, Hicks Gómez J. La función plaquetaria más allá de la hemostasis: participación en las enfermedades respiratorias. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2005 Jul-Sep; 18 (3): 240-246.

3. Escamilla Guerrero G. Lesiones de almacenamiento. Revista Mexicana Medicina Transfusional 2010 Ago; 3 Supl.1: 48-54.
4. Vieira de Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. Semin Immunopathol 2012; 34: 5-30.
5. Sharathkumar AA, Shapiro AD. Trastornos de la función plaquetaria. Federación Mundial de Hemofilia 2008 Abr; (19): 1-22.
6. Arcuri, AM. Plasma Rico en Plaquetas. Recuperación de tejidos con factores estimulantes de crecimiento autólogos. 1 ed. España: AMOLCA 2013; p. 7-10.
7. Barry S, Collier MD. Platelets. 3ªed. USA: Elsevier 2012. Foreword, A brief history of ideas about platelets in health and disease in platelet; p. 19-34.
8. Mitch L. La multifuncionalidad de las plaquetas. Science 2010 Abr; 238: 562.
9. Leónida Martínez M. Función de las plaquetas en tratamientos médicos-odontológicos. Ciencia Odontológica 2010 Dic; 7(2): 150-162.
10. Fernandez Delgado N, Hernández Ramírez P, Forrellat Barrios M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. Rev Cub de Hematol Inmunol Hemoter 2012; 28 (3): 200-216.
11. Pabón Realpe D. Papel del complejo GPIb-IX en la activación plaquetaria dependiente de trombina y en la diferenciación megacariocítica (tesis doctoral). Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2008.
12. Shatill SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. The Journal of Biological Chemistry 1985 Ene; 260 (20): 11107-11114.
13. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW. Role of fibrinogen ALFA and GANMA chain sites in platelet aggregation. Seattle: Dep. Of Biochemistry and Medicine; 1992.
14. García Mesa M, Coma Alfonso C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. Rev Cub Angio Cir Vasc 2000; 1 (2): 132-141.
15. Badimon L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. Rev Esp Cardiol 2009; 62 (10): 1161-1178.
16. Guevara Arismendy NM, Escobar Gallo GE, Campuzano Maya G. Utilidad clínica de la agregometría plaquetaria. Medicina & Laboratorio 2012 Ago; 18 (7-8): 311-332.
17. Badimon L, Vilahur G. Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetarios. Rev Esp Cardiol 2013; 13 (B): 8-15.

18. Díez Gómez N, Macías Betancourt R, Pedroso Ibáñez I. El factor de activación plaquetaria y su relación con el daño oxidativo. *Rev Cub Invest Biomed* 2001 Feb; 20 (1): 64-69.
19. Amable PR, Vieira Carias RB, Telles Teixeira MV, Cruz Pacheco I, Farrias Correa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Preparación de Plasma Rico en Plaquetas para Medicina Regenerativa: optimización y cuantificación de citocinas y factores de crecimiento. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4 (3): 67.
20. Rivera Ramos O, Díaz Valdivia SB, Aparicio Suárez JL, Carrillo Reyes L. Variaciones de la calidad de los preparados plaquetarios conservados a 4°C durante 72 horas. *Medicentro* [Internet] 2003 [citado 2015 Jun 1]; 7(1). Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/87609510/articulo-de-plaquetas#scribd>.
21. Livesey SA, Connor J, Currie LM, inventors; Lifecell corporation, titular. Conservación prolongada de plaquetas sanguíneas. ES patent 22 214 656. 2004 Sep 16.
22. Clutton P, Folts JD, Freedman JE. Pharmacological control of platelet function. *Pharmacological research* 2001 Jun; 44 (4): 255-264.
23. Monteiro MC, O'Connor JE, Martínez M. La citometría de flujo en el análisis de las plaquetas. Aspectos estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Diagn Biol* [Internet] 2001 Jul-Sep [citado 2015 Jun 1]; 50 (3). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0034-79732002000300001&script=sci_arttext.
24. Cao CP. Análisis plaquetario por citometría de flujo. *Rev Med* 2001 Oct; 12 (4).
25. Yuana Y, Osanto S, Bertina RM. Use of immuno-magnetic beads for direct capture of nanosized microparticles from plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012 Apr; 23(3): 244-50.
26. Macías Abraham C. Moléculas de adhesión. Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet] 2006 [citado 2015 Jun 1]; 22(2). Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol22_2_06/hih03206.html
27. Sáez-Torres Barroso C, Calvo Benito J, Gayà Puig A. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac* 2007 Jul-Ago; 29 (4): 240-248.
28. Anitua E, Alkhraisat MH, Orive G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using Plasma Rich in Growth Factors. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11(4): 509-518.
29. De La Mata J. Plasma rico en plaquetas: ¿un nuevo tratamiento para el reumatólogo? *Reumatol Clin* 2013; 9 (3): 166-171.

30. Carrillo-Mora P, González-Villalva A, Macías-Hernández SI, Pineda-Villaseñor C. Plasma Rico en Plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa? Rev Cir 2012; 81: 74-82.
31. Arquero P. Plasma Rico en Plaquetas en Cirugía Estética. Rev AECEP 2013; 42-48.
32. Rodríguez Flores J, Palomar Gallego MA, Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. Rev Esp Cir Oral Maxilofac 2012; 34 (1): 8-17.
33. Morris C, de Wreede L, Scholten M, Brand R, van Biezen A, Sureda A, et al. Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced? Result of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventonal study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide. Transfusion 2014 Oct; 54 (10): 2514-2522.
34. Caunedo Almagro P. La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet] 2004 [citado 2015 Jun 1]; 20(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-02892004000100004&script=sci_arttext.
35. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. J.Vis.Exp. 2011; (50): e2597.
36. Martínez Salazar M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. Rev Col Biotec 2009 Dic; 11 (2): 152-166.
37. Figueredo Ruíz M, Hidalgo-Gato Fernández R, Fundora Sarraff T. Estimación del tiempo promedio de supervivencia de las plaquetas por el modelo del hit-múltiple. Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter [Internet] 1995 Ene-Jun [citado 2015 Jun 1]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol11_1_95/hih05195.htm.
38. Salazar M. Guías para la transfusión de sangre y sus componentes. Rev Panam Salud Pública 2003; 13 (2-3): 183-190.
39. Ortiz P, Mingo A, Lozano M, Vesga MA, Grifols JR, Castrillo A. Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos. Med Clin (Barc). 2005; 125 (10): 389-396.
40. Muñoz Díaz E, Martínez C, Madoz P. Refractariedad a las transfusiones de plaquetas. Med Clin 2003 (Barc) Abr; 120 (14): 544-549.

ANEXOS

Tabla 1: Prueba de normalidad en muestra PRP a temperatura ambiente al sexto día

Pruebas de normalidad							
Preparado de conservación		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de plaquetas/ul	Control	,319	3	.	,885	3	,339
	xr2	,213	3	.	,990	3	,809
	xrl2	,180	4	.	,983	4	,919
	Inhibidor	,378	4	.	,801	4	,105

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 2: Prueba de homogeneidad de varianzas en muestra PRP a temperatura ambiente al sexto día

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Número de plaquetas/ul			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,393	3	10	,129

Tabla 3: Test ANOVA de un factor en muestra PRP a temperatura ambiente al sexto día

ANOVA de un factor					
Número de plaquetas/ul					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3003523809,524	3	1001174603,175	,714	,566
Intra-grupos	14021333333,333	10	1402133333,333		
Total	17024857142,857	13			

Tabla 4: Prueba de normalidad en muestra PRP a temperatura ambiente al séptimo día

Pruebas de normalidad							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Preparado de conservación		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número plaquetas/ul	Control	,337	3	.	,855	3	,253
	xr2	,310	3	.	,898	3	,380
	xr12	,345	3	.	,839	3	,210
	Inhibidor	,289	3	.	,927	3	,479

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 5: Prueba de homogeneidad de varianzas en muestra PRP a temperatura ambiente al séptimo día

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Número plaquetas/ul			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,267	3	8	,848

Tabla 6: Test ANOVA de un factor en muestra PRP a temperatura ambiente al séptimo día

ANOVA de un factor					
Número plaquetas/ul					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1460916666,667	3	486972222,222	,523	,678
Intra-grupos	7444000000,000	8	930500000,000		
Total	8904916666,667	11			

Tabla 7: Prueba de normalidad en muestra PRP a temperatura ambiente al octavo día

Pruebas de normalidad							
Preparado de conservación		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de plaquetas/ul	Control	,334	3	.	,860	3	,266
	xr2	,236	3	.	,977	3	,708
	xrl2	,306	3	.	,905	3	,400
	Inhibidor	,319	3	.	,885	3	,339

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 8: Prueba homogeneidad de varianzas en muestra PRP a temperatura ambiente al octavo día

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Número de plaquetas/ul			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,814	3	8	,108

Tabla 9: Test ANOVA de un factor en muestra PRP a temperatura ambiente al octavo día

ANOVA de un factor					
Número de plaquetas/ul					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	24176916666,667	3	8058972222,222	6,414	,016
Intra-grupos	10051333333,333	8	1256416666,667		
Total	34228250000,000	11			

Tabla 10: Determinación del preparado responsable de la mejoría de la concentración plaquetaria, mediante el almacenamiento a temperatura ambiente de muestra PRP al 8° día

Comparaciones múltiples
Variable dependiente: Número de plaquetas/ul
Scheffé

(I) Preparado de conservación	(J) Preparado de conservación	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	xr2	-93333,333	28941,512	,071	-194415,65	7748,98
	xrl2	-106333,333*	28941,512	,040	-207415,65	-5251,02
xr2	Inhibidor	-108666,667*	28941,512	,036	-209748,98	-7584,35
	Control	93333,333	28941,512	,071	-7748,98	194415,65
	xrl2	-13000,000	28941,512	,976	-114082,31	88082,31
	Inhibidor	-15333,333	28941,512	,961	-116415,65	85748,98
xrl2	Control	106333,333*	28941,512	,040	5251,02	207415,65
	xr2	13000,000	28941,512	,976	-88082,31	114082,31
	Inhibidor	-2333,333	28941,512	1,000	-103415,65	98748,98
	Control	108666,667*	28941,512	,036	7584,35	209748,98
Inhibidor	xr2	15333,333	28941,512	,961	-85748,98	116415,65
	xrl2	2333,333	28941,512	1,000	-98748,98	103415,65

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

Tabla 11: Porcentajes de mejora según el preparado utilizado en muestra PRP, con respecto al control

% MEJORA PRP	Control TA 6 días	Control TA 7 días	ControlTA 8 días	Control Descongelación en el día	Control Descongelación + 1 día
XR2	21,98%	9,60%	119,00%	7,00%	84,00%
XRL2	2,80%	6,70%	135,80%	7,00%	43,40%
Inhibidor	21,90%	17,50%	138,40%		

Tabla 12: Prueba de normalidad en muestra PRP descongelada en el día

Pruebas de normalidad							
	Preparado de conservación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número plaquetas/ul	Control	,357	3	.	,815	3	,150
	xr2	,161	5	,200*	,992	5	,987
	xrl2	,320	5	,105	,820	5	,117

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 13: Prueba de homogeneidad de varianzas en muestra PRP descongelada en el día

Prueba de homogeneidad de varianzas

Número plaquetas/ul			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,838	2	10	0,21

Tabla 14: Test ANOVA de un factor en muestra PRP descongelada en el día

ANOVA de un factor

Número plaquetas/ul

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	232410256,410	2	116205128,205	,160	,854
Intra-grupos	7258666666,667	10	725866666,667		
Total	7491076923,077	12			

Tabla 15: Prueba de normalidad en muestra PRP descongeladas más de 24 horas

Pruebas de normalidad							
	Preparado de conservación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de plaquetas/ul	Control	,223	3	.	,985	3	,767
	xr2	,368	3	.	,791	3	,094
	xr 2	,347	3	.	,835	3	,200

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 16: Test ANOVA de un factor en muestras PRP descongeladas más de 24 horas

ANOVA de un factor

Número de plaquetas/ul

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5159886666,667	2	2579943333,333	1,935	,225
Intra-grupos	8001753333,333	6	1333625555,556		
Total	13161640000,000	8			

Tabla 17: Porcentajes de mejora según el preparado utilizado en muestra CP, con respecto al control

%MEJORA CP	Control TA 7 días	Control TA 8 días	Control Descongelación en el día	Control Descongelación + 1 día
XR2	0,00%	6,16%	40,00%	55,90%
XRL2	8,70%	10,60%	32,00%	95,00%
Inhibidor	-5,90%	-19,62%		

Tabla 18: Prueba de normalidad en muestra CP a temperatura ambiente al séptimo día

Pruebas de normalidad

	Preparado de Conservación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de plaquetas/ul	Control	,184	3	.	,999	3	,929
	xr2	,238	3	.	,976	3	,703
	xrl2	,218	3	.	,988	3	,788
	Inhibidor	,236	3	.	,977	3	,711

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 19: Prueba de homogeneidad de varianzas en muestra CP a temperatura ambiente al séptimo día

Prueba de homogeneidad de varianzas

Número de plaquetas/ul

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,486	3	8	,701

Tabla 20: Test ANOVA de un factor en muestra CP a temperatura ambiente al séptimo día

ANOVA de un factor					
Número de plaquetas/ul					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8280916666,667	3	2760305555,556	,245	,863
Intra-grupos	90124000000,000	8	11265500000,000		
Total	98404916666,667	11			

Tabla 21: Prueba de normalidad en muestra CP a temperatura ambiente al octavo día

Pruebas de normalidad							
	Preparado de conservación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de plaquetas/ul	Control	,333	3	.	,862	3	,274
	xr2	,233	3	.	,979	3	,723
	xr12	,211	3	.	,991	3	,815
	Inhibidor	,329	3	.	,868	3	,291

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 22: Prueba homogeneidad de varianzas en muestra CP a temperatura ambiente al octavo día

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Número de plaquetas/ul			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,315	3	8	,815

Tabla 23: Test ANOVA de un factor en muestra CP a temperatura ambiente al octavo día

ANOVA de un factor

Número de plaquetas/ul

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	45596916666,667	3	15198972222,222	5,514	,024
Intra-grupos	22051333333,333	8	2756416666,667		
Total	67648250000,000	11			

Tabla 24: Determinación del preparado responsable de la mejoría de la concentración plaquetaria, mediante el almacenamiento a temperatura ambiente de muestra CP al octavo día

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Número de plaquetas/ul

Scheffé

(I) Preparado de conservación	(J) Preparado de conservación	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	xr2	-33000,000	42867,367	,895	-182720,32	116720,32
	xrl2	-56666,667	42867,367	,643	-206386,99	93053,66
	Inhibidor	104666,667	42867,367	,195	-45053,66	254386,99
xr2	Control	33000,000	42867,367	,895	-116720,32	182720,32
	xrl2	-23666,667	42867,367	,957	-173386,99	126053,66
	Inhibidor	137666,667	42867,367	,072	-12053,66	287386,99
xrl2	Control	56666,667	42867,367	,643	-93053,66	206386,99
	xr2	23666,667	42867,367	,957	-126053,66	173386,99
	Inhibidor	161333,333*	42867,367	,035	11613,01	311053,66
Inhibidor	Control	-104666,667	42867,367	,195	-254386,99	45053,66
	xr2	-137666,667	42867,367	,072	-287386,99	12053,66
	xrl2	-161333,333*	42867,367	,035	-311053,66	-11613,01

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 25: Prueba de normalidad en muestra CP descongelada en el día

Pruebas de normalidad							
	Preparado de Conservación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de plaquetas/ul	Control	,219	3	.	,987	3	,780
	xr2	,251	3	.	,966	3	,646
	xr12	,313	4	.	,869	4	,295

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 26: Prueba de homogeneidad de varianzas en muestra CP descongelada en el día

Prueba de homogeneidad de varianzas

Número de plaquetas/ul

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,693	2	7	,136

Tabla 27: Test ANOVA de un factor en muestra CP descongelada en el día

ANOVA de un factor

Número de plaquetas/ul

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	34029933333,333	2	17014966666,667	3,355	,095
Intra-grupos	35499666666,667	7	5071380952,381		
Total	69529600000,000	9			

Tabla 28: Prueba de normalidad en muestra CP descongelada más de 24 horas

Pruebas de normalidad							
	Preparado de Conservación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Número de plaquetas/ul	Control	,280	3	.	,938	3	,520
	xr2	,297	3	.	,917	3	,441
	xr12	,337	3	.	,855	3	,253

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 29: Prueba de homogeneidad de varianzas en muestra CP descongelada más de 24 horas

Prueba de homogeneidad de varianzas

Número de plaquetas/ul

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,786	2	6	,086

Tabla 30: Test ANOVA de un factor en muestra CP descongelada más de 24 horas

ANOVA de un factor

Número de plaquetas/ul

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8892866666,667	2	4446433333,333	63,621	,000
Intra-grupos	419333333,333	6	69888888,889		
Total	9312200000,000	8			

Tabla 31: Determinación del preparado responsable de la mejoría de la concentración plaquetaria, mediante el almacenamiento en congelación de muestras de CP descongeladas más de 24 horas

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Número de plaquetas/ul

Scheffé

(I) Preparado de Conservación	(J) Preparado de Conservación	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	xr2	-141666,667*	21585,317	,002	-210896,35	-72436,98
	xrl2	-242333,333*	21585,317	,000	-311563,02	-173103,65
xr2	Control	141666,667*	21585,317	,002	72436,98	210896,35
	xrl2	-100666,667*	21585,317	,010	-169896,35	-31436,98
xrl2	Control	242333,333*	21585,317	,000	173103,65	311563,02
	xr2	100666,667*	21585,317	,010	31436,98	169896,35

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 32: Prueba homogeneidad de varianzas en muestra CP descongelado en el día para el análisis de la mortalidad plaquetaria en las mismas

Prueba de homogeneidad de varianzas

Mortalidad en % (yoduro de propidio)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,930	2	7	,072

Tabla 33: Test ANOVA de un factor en muestra CP descongelado en el día para el análisis de la mortalidad plaquetaria en las mismas

ANOVA de un factor

Mortalidad en % (yoduro de propidio)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2036,678	2	1018,339	208,903	,000
Intra-grupos	34,123	7	4,875		
Total	2070,801	9			

Ilustración 8: Marcación con Yoduro de Propidio

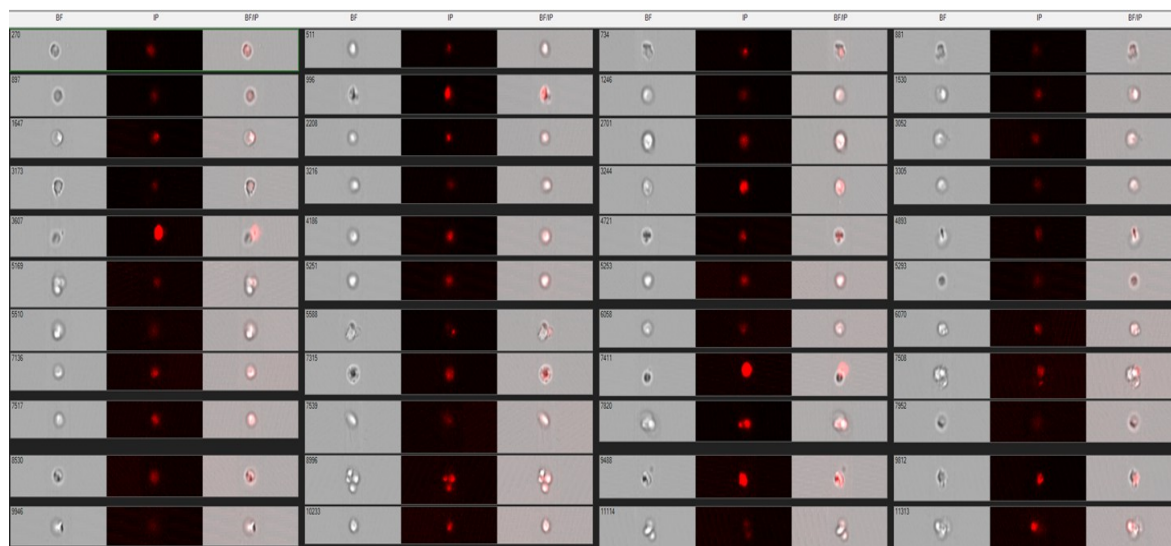
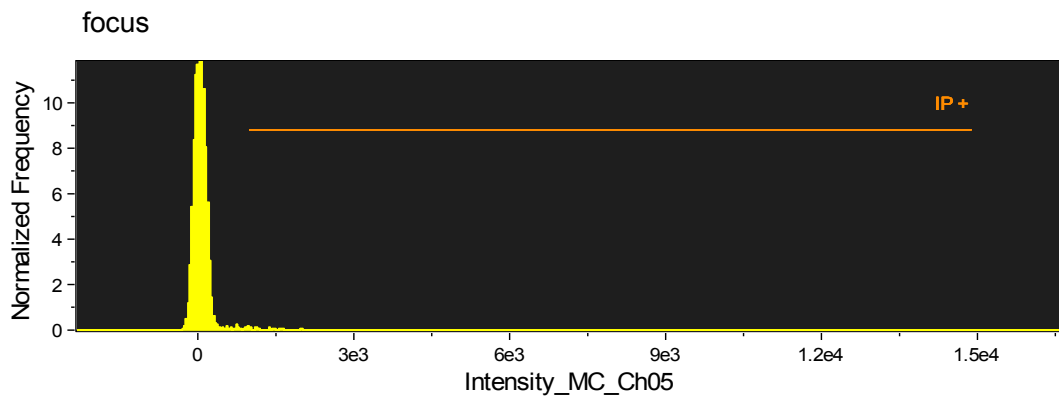


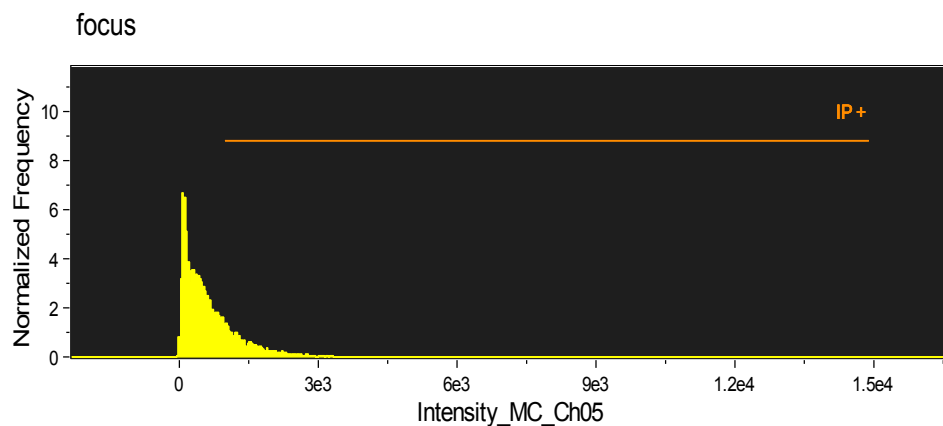
Ilustración 9: Representación de la mortalidad de los CP conservados con XRL2 en las primeras 24 horas de descongelación mediante la marcación con Yoduro de Propidio



Intensity_MC_Ch05

Population	Count	%Gated	Mean	CV
focus & Single & Cells	3789	100	65.55	477.69
IP + & focus & Single & Cells	53	1.4	1967.91	73.58

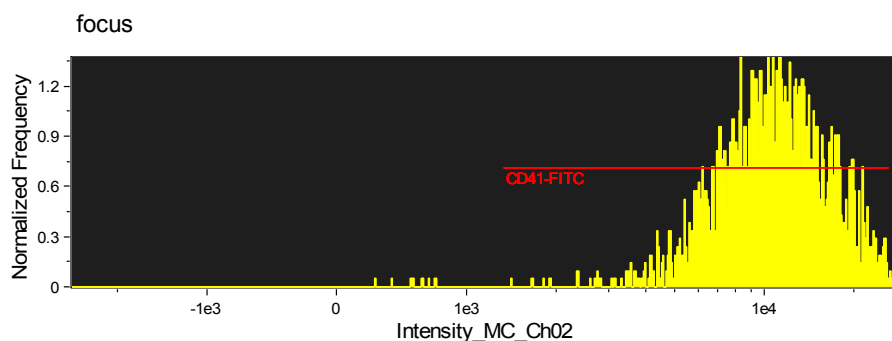
Ilustración 10: Representación de la mortalidad de los CP Control en las primeras 24 horas de descongelación mediante la marcación con Yoduro de Propidio



Intensity_MC_Ch05

Population	Count	%Gated	Mean	CV
focus & Single & Cells	10822	100	644.04	111.99
IP + & focus & Single & Cells	2328	21.5	1599.18	42.23

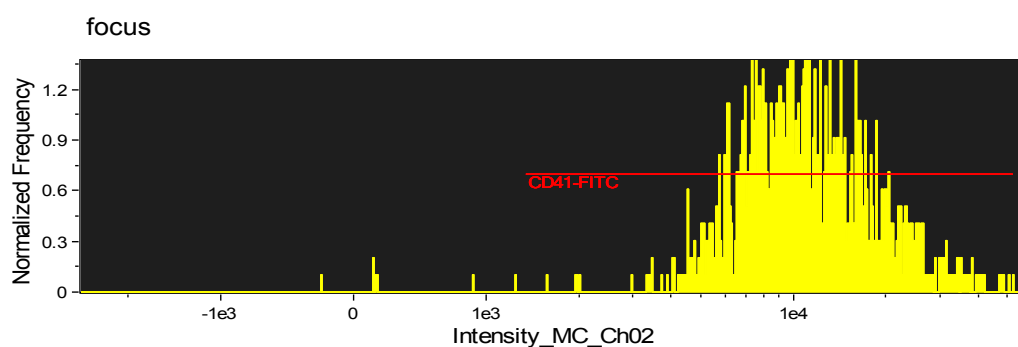
Ilustración 11: Determinación del porcentaje plaquetario del CP conservado con XRL2 en las primeras 24 horas de su descongelación mediante la marcación con CD41- FIT



Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated	Mean	CV
focus & Single & Cells	2089	100	12088.17	48.96
CD41-FITC & focus & Single & Cells	2033	97.3	11601.9	40.61

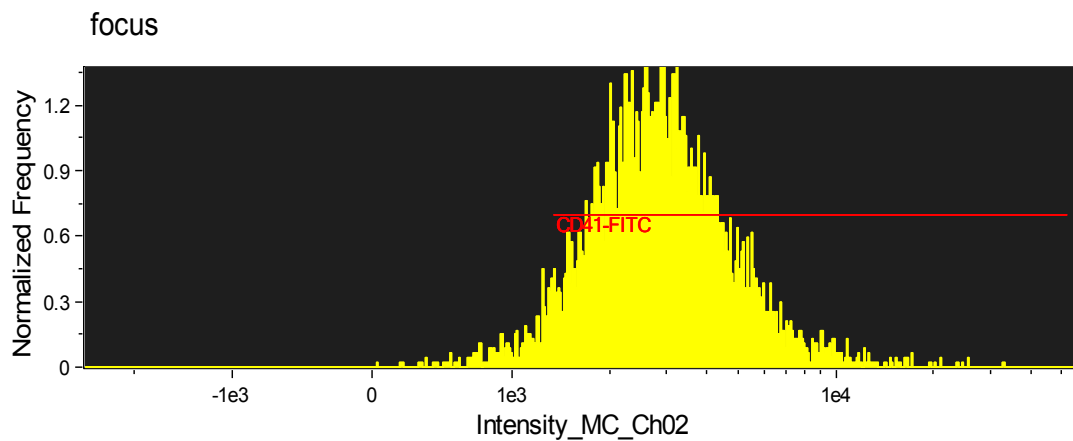
Ilustración 12: Determinación del porcentaje plaquetario del CP Control en las primeras 24 horas de su descongelación mediante la marcación con CD41- FIT



Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated	Mean	CV
focus & Single & Cells	985	100	12736.5	61.19
CD41-FITC & focus & Single & Cells	974	98.9	12564.04	55.22

Ilustración 13: Determinación del porcentaje plaquetario del CP conservado con XR2 en las primeras 24 horas de su descongelación mediante la marcación con CD41- FIT



Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated	Mean	CV
focus & Single & Cells	4699	100	3267.1	64.96
CD41-FITC & focus & Single & Cells	4421	94.1	3405.32	62.02

Tabla 34: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra PRP en conservación con el preparado XR2

Estadísticos				
Conservación PRP con xr2			Número plaquetas/ul	Tamaño de plaquetas en fl
TA 6 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	172333,33	10,0800
		Desv. típ.	23115,651	1,33300
		Varianza	53433333,333	1,777
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	194333,33	8,3567
		Desv. típ.	25324,560	1,70940
		Varianza	64133333,333	2,922
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	171000,00	10,2000
		Desv. típ.	45530,210	,70000
		Varianza	207300000,000	,490
Descongelación en el día	N	Válidos	5	5
		Perdidos	0	0
		Media	151600,00	10,8180
		Desv. típ.	29988,331	1,29330
		Varianza	899300000,000	1,673
Descongelación + 1 día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	127333,33	10,8000
		Desv. típ.	61272,615	1,30000
		Varianza	375433333,333	1,690

Tabla 35: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra PRP en conservación con el preparado XRL2

Estadísticos				
Conservación PRP con xrl2			Número plaquetas/ul	Tamaño de plaquetas en fl
TA 6 días	N	Válidos	4	4
		Perdidos	0	0
		Media	144500,00	9,3300
		Desv. típ.	26751,947	1,48092
		Varianza	715666666,667	2,193
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	188666,67	9,4900
		Desv. típ.	27300,794	,95974
		Varianza	745333333,333	,921
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	184000,00	7,6000
		Desv. típ.	50467,812	,19157
		Varianza	2547000000,000	,037
Descongelación en el día	N	Válidos	5	5
		Perdidos	0	0
		Media	151800,00	11,5400
		Desv. típ.	28882,521	1,36308
		Varianza	834200000,000	1,858
Descongelación +1 día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	104266,67	12,1667
		Desv. típ.	14339,224	,72342
		Varianza	205613333,333	,523

Tabla 36: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra PRP en conservación con el inhibidor

Estadísticos				
Conservación PRP con Inhibidor			Número de plaquetas/ul	Tamaño en fl
TA 6 días	N	Válidos	4	4
		Perdidos	0	0
		Media	171500,00	7,1125
		Desv. típ.	59612,638	,22867
		Varianza	3553666666,66	,052
			7	
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	207666,67	6,4367
		Desv. típ.	34268,547	2,25482
		Varianza	1174333333,33	5,084
			3	
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	186333,33	9,5033
		Desv. típ.	17009,801	,54857
		Varianza	289333333,333	,301

Tabla 37: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra PRP Control

Estadísticos				
Conservación PRP control			Número plaquetas/ul	Tamaño plaquetas en fl
TA 6 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	140666,67	7,4667
		Desv. típ.	8144,528	,15275
		Varianza	66333333,333	,023
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	177000,00	6,5867
		Desv. típ.	34073,450	1,19224
		Varianza	1161000000,000	1,421
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	77666,67	6,5333
		Desv. típ.	10785,793	,41633
		Varianza	116333333,333	,173
Descongelación en el día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	141666,67	10,1033
		Desv. típ.	12741,010	1,20708
		Varianza	162333333,333	1,457
Descongelación +1 día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	69100,00	10,9667
		Desv. típ.	6397,656	,96090
		Varianza	40930000,000	,

Tabla 38: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra CP en conservación con el preparado XR2

Estadísticos				
Conservación CP con xr2			Número de plaquetas/ul	Tamaño plaquetas en fl
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	505666,67	11,1000
		Desv. típ.	120964,182	1,22882
		Varianza	14632333333,33	1,510
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	568000,00	10,5467
		Desv. típ.	41940,434	1,28083
		Varianza	1759000000,000	1,641
Descongelación en el día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	493000,00	10,2667
		Desv. típ.	37643,060	,75719
		Varianza	1417000000,000	,573
Descongelación + 1 día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	396000,00	10,5667
		Desv. típ.	24020,824	,92916
		Varianza	577000000,000	,863

Tabla 39: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra CP en conservación con el preparado XRL2

Estadísticos				
Conservación CP con xrl2			Número plaquetas/ul	Tamaño plaquetas en fl
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	549666,67	11,1000
		Desv. típ.	59869,302	,79373
		Varianza	3584333333,333	,630
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	591666,67	11,6667
		Desv. típ.	68821,024	,55076
		Varianza	4736333333,333	,303
Descongelación en el día	N	Válidos	4	4
		Perdidos	0	0
		Media	463500,00	9,9800
		Desv. típ.	103841,225	,58103
		Varianza	10783000000,00	,338
Descongelación + 1 día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	496666,67	11,8667
		Desv. típ.	37859,389	,25166
		Varianza	1433333333,333	,063

Tabla 40: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra CP en conservación con inhibidor

Estadísticos				
Conservación CP con Inhibidor			Número plaquetas/ul	Tamaño plaquetas en fl
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	476000,00	10,7233
		Desv. típ.	97616,597	1,06519
		Varianza	9529000000,000	1,135
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	430333,33	12,0667
		Desv. típ.	46144,700	,65064
		Varianza	2129333333,333	,423

Tabla 41: Análisis del tamaño y número de plaquetas de la muestra CP Control

Estadísticos				
Conservación CP control			Número plaquetas/ul	Tamaño plaquetas en fl
TA 7 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	506333,33	8,6900
		Desv. típ.	131591,540	1,51205
		Varianza	1731633333,333	2,286
TA 8 días	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	535000,00	11,6333
		Desv. típ.	49000,000	,83865
		Varianza	2401000000,000	,703
Descongelación en el día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	351666,67	11,2000
		Desv. típ.	12583,057	,40000
		Varianza	15833333,333	,160
Descongelación + 1 día	N	Válidos	3	3
		Perdidos	0	0
		Media	254333,33	11,9333
		Desv. típ.	9291,573	,15275
		Varianza	8633333,333	0,02