



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

“Santa María de los Buenos Aires”

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Tesis de doctorado

**EVALUACIÓN DE LA SOBREVIDA Y FUNCIONALIDAD *IN VITRO*
EN PLAQUETAS CRIOPRESERVADAS.**

Autor

Jhon Alexander Avila Rueda

Director (a)

Dra. Cristina Duboscq

Co-director (a)

Dra. Glenda Ernst

Fecha

13 de Octubre de 2025

Lugar de trabajo

Hospital Británico de Buenos Aires

Agradecimientos

A todos los docentes de la carrera de especialista en Hematología por su dedicación y buena disposición para compartir sus valiosos conocimientos, ya que fueron importantes durante mi formación como médico hematólogo.

Al Doctor Germán Stemmelin jefe del Servicio de Hematología del Hospital Británico, por brindar un escenario armónico de trabajo dentro de la residencia, lo cual constituyó un factor importante para mi crecimiento personal y profesional.

A los doctores José Ceresetto, Cristina Duboscq, Oscar Rabinovich y Glenda Ernst miembros del Staff de Hematología y comité científico del hospital respectivamente, por ser mi puerta de entrada al fascinante universo de la investigación, así como por su paciencia, acompañamiento constante y orientación durante la planificación y puesta en marcha de este trabajo. También a las doctoras Emilse Bermejo, Viviana Novoa y Mirta Schattner por su excelente disposición para resolver mis permanentes consultas.

A mis padres y mi familia por su apoyo permanente e incondicional, además de enseñarme que la disciplina y el esfuerzo constante son siempre la mejor alternativa para alcanzar mis objetivos.

Finalmente, a Liz, mi esposa por haber creído en mí y ser mi compañera de lucha y soporte en los momentos difíciles. Así mismo dedico este trabajo a mi hija Paula Alejandra, por ella doy infinitas gracias a Dios y a la vida.

Producción académica derivada de la tesis

Artículos publicados

1. Evaluation of survival and functionality in frozen platelets

Cita: Rueda JAA, Acosta J, Rabinovich O, Ceresetto J, Ernst G, Duboscq C.
Evaluation of survival and functionality in frozen platelets. Hematol Transfus Cell
Ther. 2023 Jan 25:S2531-1379(23)00004-4. doi: 10.1016/j.htct.2023.01.002.

2. Methods of preserving platelets: cryopreservation as a reasonable option for its implementation in Argentina

Cita: Jhon Alexander Avila Rueda et al., Cryopreservation as a reasonable option for
its implementation in Argentina. Acta Haematologica Polonica 2021; 52, 3: 163–168.
DOI: 10.5603/AHP.2021.0032

Trabajos presentados en Eventos académicos

1. Evaluación de sobrevida y funcionalidad en plaquetas criopreservadas, resultado de prueba piloto, XVIII Congreso Argentino de Medicina transfusional (2021)
2. Evaluación de sobrevida y funcionalidad en plaquetas criopreservadas, resultados a noviembre de 2021, XXIX Congreso Nacional de Medicina (2021)
3. Medium Platelet Volume as a Predictor of Plate Engraftment Time in Patients
4. with Bone Marrow Transplant, Internacional society of thrombosis and haemostasis (ISTH) 2021

Reconocimientos obtenidos

1. Trabajo ganador del subsidio en investigación modulo: hematología: fundación Florencio fiorini-academia nacional de medicina (2021)
2. Trabajo ganador del premio Luis Agote, XVIII Congreso Argentino de Medicina transfusional (2021)
3. Premio al mejor trabajo de investigación modulo hematología, XXIX Congreso Nacional de Medicina (2021)
4. Premio al mejor trabajo de investigación, asociación de médicos y odontólogos del hospital Británico de Buenos Aires – Asociación médica Argentina (2021)

Índice

	Página
Glosario.....	5
Resumen... ..	6
1. Introducción.....	8
2. Las plaquetas: su origen, características morfológicas e importancia dentro de la medicina transfusional.....	22
2.1 Las plaquetas.....	22
2.2 El proceso de formación plaquetario desde la médula ósea.....	25
2.3 Activación de las plaquetas.....	30
2.4 Procedimiento para la obtención de plaquetas	34
2.5 Indicaciones para la transfusión de plaquetas	35
2.6 Métodos para la evaluación plaquetaria... ..	38
3. Situación Problema.....,.....	51
3.1 Hipótesis	54
3.2 Objetivo principal.....,,.....	58
3.2 a Objetivos específicos	58
4. Materiales y métodos.....	60
4.1 Diseño	60
4.2 Criterios de inclusión	60
4.3 Criterios de exclusión.....	60
4.4 Clasificación de la muestra	61
4.4 a Procedimientos a realizar al grupo de donantes	61
4.4 b Técnica para la descongelación de las plaquetas criopreservadas	63

4.5 Instrumentos de medición	64
4.6 Variables en la investigación	66
4.7 Análisis estadístico.....	66
4.8 Análisis de factibilidad del estudio	67
4.8a Factibilidad operativa.....	67
4.8b Factibilidad ética y legal	68
5. Resultados.....	70
5.1 Evaluación al día 7 post congelación.....	72
5.2 Evaluación al día 14 post congelación	74
5.3 Evaluación al día 28 post congelación	75
5.4 Análisis comparativo de grupos	79
6. Discusión.....	85
7. Conclusiones.....	98
8. Bibliografía	103

GLOSARIO

CD: cluster/cúmulo de diferenciación

CPD: citrato fosfato dextrosa

dl: decilitro

DMSO: dimetilsulfóxido

Fig: figura

fl: fentolitro

FS: forward scatter- dispersion frontal

FVW: factor de von willebrand

HIV: virus de inmunodeficiencia humana

kg: kilogramo

ml: mililitro

L: litro

SS: side scatter – dispersion lateral

TG: trombastenia de Glanzmann

Resumen

Introducción: En la actualidad, las plaquetas constituyen un recurso importante debido a su amplio margen de uso en el campo de la medicina transfusional. Bajo las condiciones de conservación vigentes su vida útil oscila entre 5 a 7 días, esto ha motivado la creación de estrategias que permitan prolongar el tiempo de sobrevida para este hemocomponente.

Objetivo: Prolongar la supervivencia y funcionalidad de las plaquetas criopreservadas hasta 28 días manteniendo una viabilidad igual o mayor al 50% respecto de las plaquetas conservadas en forma convencional.

Métodos: Se evaluó una muestra de plaquetas en aféresis, distribuidas en 3 grupos según la solución criopreservante utilizada: DMSO5%+2%albúmina; DMSO5%+NaCl0,9% y DMSO5%+Dextrosa2%. Luego se congelaron a -80°C y se descongelaron a los 7, 14 y 28 días. La supervivencia y la viabilidad se evaluaron mediante el recuento de plaquetas post-descongelación y los porcentajes de tinción de CD41, CD61 y CD42a mediante citometría de flujo. La funcionalidad se determinó con el porcentaje de agregación post-estimulación con trombina 1nM utilizando el agregómetro Chromo-Log490. El grupo de control (GC) consistió en plaquetas frescas bajo agitación constante a 22°C .

Resultados: Se analizó un total de 72 alícuotas de plaquetas. El GC presentó un recuento de plaquetas de $1934 \pm 0,5 \times 10^9/\text{L}$ y una viabilidad del 100%. Los porcentajes de marcado de CD41, CD61 y CD42a fueron del 99, 98,5 y 96,5%, respectivamente. El porcentaje de agregación fue del 99%. El día 7 de la poscongelación, el recuento de plaquetas para los grupos 1, 2 y 3 fue de 1.844 ± 102 , 1.856 ± 76 y 1.752 ± 226 , con una viabilidad de 98, 96 y 95%, respectivamente. El día 14 los recuentos fueron 1.722 ± 238 , 1.649 ± 215 y 1.578 ± 223 con viabilidad de 96, 95 y 94% y, el día 28, fueron 1.602 ± 374 , $1.438,6 \pm 429$ y $1.406,6 \pm 436$, con viabilidad del 96, 94 y 93%, respectivamente. El grupo 1 presentó una mayor expresión de antígenos de membrana. Los porcentajes de agregación fueron 90, 98 y 89% el día 7, 88%, 98 y 87% el día 14 y 84%, 95 y 82% el día 28 postcongelación, respectivamente, presentando el grupo 2 los mejores resultados.

Conclusión: Los resultados respaldan la criopreservación como un método razonable para prolongar la supervivencia plaquetaria hasta 28 días, manteniendo su funcionalidad y viabilidad *In Vitro* superior al 50%.

Palabras clave: Plaquetas, Criopreservación, Hemoterapia, Inmunohematología, Medicina transfusional

Summary

Introduction: Currently, platelets constitute an important resource due to their wide range of use in the field of transfusion medicine. Under current conservation conditions, its useful life ranges between 5 to 7 days. This has motivated the creation of strategies that allow prolonging the survival time for this blood component.

Objective: Prolong the survival and functionality of cryopreserved platelets up to 28 days while maintaining viability equal to or greater than 50% compared to conventionally preserved platelets.

Methods: A sample of platelets was evaluated in apheresis, distributed into 3 groups according to the cryopreservative solution used: DMSO5%+2%albumin; DMSO5%+NaCl0.9% and DMSO5%+Dextrose2%. They were then frozen at -80°C and thawed after 7, 14 and 28 days. Survival and viability were assessed by post-thaw platelet count and percentages of CD41, CD61, and CD42a staining by flow cytometry. Functionality was determined with the percentage of aggregation post-stimulation with 1nM thrombin using the Chromo-Log490 aggregometer. The control group (CG) consisted of fresh platelets under constant agitation at 22°C.

Results: A total of 72 aliquots of platelets were analyzed. The CG had a platelet count of $1934 \pm 0.5 \times 10^9/L$ and 100% viability. The labeling percentages of CD41, CD61, and CD42a were 99, 98.5, and 96.5%, respectively. The aggregation percentage was 99%. On day 7 of post-freezing, the platelet count for groups 1, 2, and 3 was $1,844 \pm 102$, $1,856 \pm 76$, and $1,752 \pm 226$, with a viability of 98, 96, and 95%, respectively. On day 14 the counts were $1,722 \pm 238$, $1,649 \pm 215$ and $1,578 \pm 223$ with viability of 96, 95 and 94% and, on day 28, they were $1,602 \pm 374$, $1,438.6 \pm 429$ and $1,406.6 \pm 436$, with viability of 96, 94 and 93%, respectively. Group 1 presented a higher expression of membrane antigens. The aggregation percentages were 90, 98 and 89% on day 7, 88%, 98 and 87% on day 14 and 84%, 95 and 82% on day 28 post-freezing, respectively, with group 2 presenting the best results.

Conclusion: The results support cryopreservation as a reasonable method to prolong platelet survival up to 28 days, maintaining its functionality and In Vitro viability greater than 50%.

Keywords: Platelets, Cryopreservation, Hemotherapy, Immunohematology, Transfusion medicine

Capítulo 1

Introducción

Se reconoce la importancia que la transfusión de hemocomponentes representa para la puesta en marcha de diversos regímenes terapéuticos relacionados o no con enfermedades hematológicas ya sea en función de su utilidad como tratamiento de soporte o en otros casos como la primera línea de manejo durante la estabilización hemodinámica del paciente crítico.

Dentro de los componentes obtenidos y disponibles para uso en seres humanos están: sangre entera, glóbulos rojos desplasmatisados, plasma y plaquetas. La indicación de cada uno de ellos varía en función del beneficio que se quiera lograr en el paciente, son ejemplo de esto:

- Mejoría en la capacidad de transporte de oxígeno
- Mantenimiento de la volemia y hemostasia.

En este trabajo se hará referencia especial a un hemocomponente cuyo uso se ha hecho extensivo más allá de las fronteras de la hematología. Este es el caso de las plaquetas que forman hoy día parte en la rutina de manejo de patologías relacionadas a las diferentes especialidades médico quirúrgicas; razón por la cual resulta inconcebible en función de su amplio margen de uso, que los hospitales o centros de atención puedan prestar un servicio de salud integral a pacientes con patologías polivalentes ante la ausencia de este recurso.

De allí, que uno de los objetivos principales de los bancos de sangre y servicios de hemoterapia constituya el abastecimiento permanente de hemocomponentes (principalmente glóbulos rojos y plaquetas) a fin de suplir los requerimientos que demande la institución o instituciones de salud a las cuales proveen de estos productos.

Es así que en la actualidad han tomado relevancia estrategias que permitan la optimización de estos recursos, un claro ejemplo de esto lo constituye el creciente interés hacia propuestas encaminadas a la prolongación del tiempo de sobrevida útil para cada uno de los componentes sanguíneos antes mencionados, ya que sumado al beneficio que puede representar la disponibilidad permanente de tales productos, se suma además una importante reducción en los costos derivados de su producción y almacenamiento lo que se traduciría en un gran logro para los sistemas de salud desde el punto de vista logístico y presupuestal, al tiempo que permite garantizar una adecuada cobertura de las instituciones sanitarias a su cargo.

Una de las estrategias que ha retomado protagonismo durante los últimos 10 años consiste en la criopreservación de plaquetas. Se trata de una técnica empleada desde mediados de la década del 50 cuyo uso en investigación reportó resultados promisorios respecto al periodo de conservación y viabilidad de las plaquetas procesadas, representando un claro avance en el objetivo de prolongar la sobrevida y funcionalidad de este hemocomponente en el tiempo.¹

Aunque inicialmente no generó gran impacto dentro de la comunidad científica al tratarse de una investigación empleada con fines netamente militares, abrió la puerta para la planificación y realización, entre 20 y 30 años después, de otros ensayos similares que no solo avalaron a la criopreservación de plaquetas como una alternativa razonable, reafirmando los hallazgos informados en 1950, sino que además estimuló la creación de nuevas ideas para el perfeccionamiento de la mencionada estrategia de conservación, que van desde la optimización la técnica de congelación hasta el empleo de diferentes alternativas de solución criopreservante , algo que sigue vigente en la actualidad.^{1,2}

Durante el desarrollo del presente trabajo se hará énfasis en el estudio de las plaquetas abarcando conceptos como:

1. Su definición, origen y desarrollo a partir las células progenitoras en la médula ósea, sus características morfológicas.
2. El rol que representan dentro de la hemostasia, para luego centrarnos en aspectos técnicos relacionados con la forma de obtención, métodos de conservación y almacenamiento empleados por los centros de hemoterapia para el procesamiento del mencionado hemocomponente, constituyéndose así el punto de partida sobre el cual se centrará esta investigación.

1.1 Generalidades acerca de la sangre y sus componentes

Por definición, la sangre es un tejido compuesto por elementos que están dispuestos en 2 fases: Una fase líquida representada por el plasma y otra fase sólida donde se agrupan los elementos formes, siendo el caso de los glóbulos rojos, glóbulos blancos y las plaquetas; algunos de estos elementos serán abordados con más detalle en la sección “Hemocomponentes y hemoderivados”. El proceso por el cual se da origen a las células que conforman la sangre se denomina hematopoyesis, que se lleva a cabo a partir de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) localizadas en la médula ósea. ³

Las funciones de la sangre están definidas en relación a los elementos que la componen, algo que va a describirse en forma integral durante el desarrollo de este trabajo, sin embargo, desde una perspectiva general se pueden mencionar algunas de sus características principales, siendo estas:

1. El transporte desde y hacia los tejidos de nutrientes y oxígeno además de sustancias de desecho como el dióxido de carbono.
2. Participación en los procesos de hemostasia y cicatrización.

3. Mantenimiento de la termorregulación corporal.
4. Ser el medio de transporte de otras sustancias como: hormonas y enzimas.
5. Su rol de defensa representado en los procesos de respuesta celular e inmunológica frente a infecciones.⁴

Un ser humano adulto tiene en media 4,5 a 5 litros de sangre circulante lo que se traduce en 8 a 10% de su masa corporal. Así mismo, los glóbulos rojos constituyen en comparación con otros hemocomponentes, el elemento de mayor predominancia ya que representa aproximadamente el 40% de la sangre total.^{5,6}

Es relevante mencionar que la sangre es un tejido renovable, razón por la cual se considera de vital importancia garantizar el permanente y adecuado recambio de los elementos que la componen.

Esto viene determinado por el tiempo de vida media estimada para cada uno de los componentes; ejemplo de ellos son los glóbulos rojos, quienes tienen en media una sobrevivencia de 120 días cada uno el cual viene determinado por ciertas características inherentes a su morfología, (integridad de la membrana y el citoesqueleto) o la capacidad para suplir sus requerimientos energéticos.^{6,7}

Por otra parte, dicho tejido tiene la capacidad de adaptarse frente a determinadas situaciones como es el caso de hemorragias, hemólisis o infecciones ya sea mediante el aumento en la producción de glóbulos rojos, glóbulos blancos u otro de sus elementos.⁸

De igual manera un aspecto a considerar, sobre todo en el campo de la medicina transfusional es que la sangre se clasifica en diferentes grupos determinados por sus características genéticas e inmunológicas , gran parte de ellas se encuentran representadas en dos sistemas principales: el ABO (grupos A,B y 0) y el Rhesus (negativo o positivo) ; esto explica la necesidad de realizar estudios de compatibilidad previo al requerimiento de soporte transfusional ya sea de sangre total o alguno de sus componentes a fin de prevenir reacciones hemolíticas que puedan representar riesgo de vida para el receptor.⁹

1.2 Hemocomponentes y hemoderivados

Se denomina “hemocomponente” a los elementos obtenidos a partir de la extracción de sangre total luego de ser sometida a un proceso de centrifugación dentro de las 6 horas desde su extracción; estos productos corresponden a: glóbulos rojos, plaquetas, plasma fresco y crioprecipitados.¹⁰

Es importante mencionar que hoy día, gracias a la ayuda tecnológica pueden obtenerse mediante máquinas de aféresis hemocomponentes en forma selectiva brindando la posibilidad de devolver el resto de elementos a la circulación corporal.¹¹

Por otra parte, reciben el nombre de “hemoderivados” aquellos productos obtenidos luego de la purificación y fraccionamiento del plasma humano a escala industrial (a partir de grupos denominados pooles de plasma); dentro de los hemoderivados comúnmente conocidos están: la albúmina, concentrados de factores VII, VIII, IX y otros factores del complejo protrombínico, el fibrinógeno, la antitrombina III y las inmunoglobulinas.^{10,12}

A la finalidad de este trabajo de investigación centraremos nuestro enfoque hacia el grupo de hemocomponentes de uso común en hemoterapia, haciendo hincapié en aspectos como su forma de obtención, condiciones de almacenamiento y conservación e indicaciones para su uso en medicina (Figura 1).

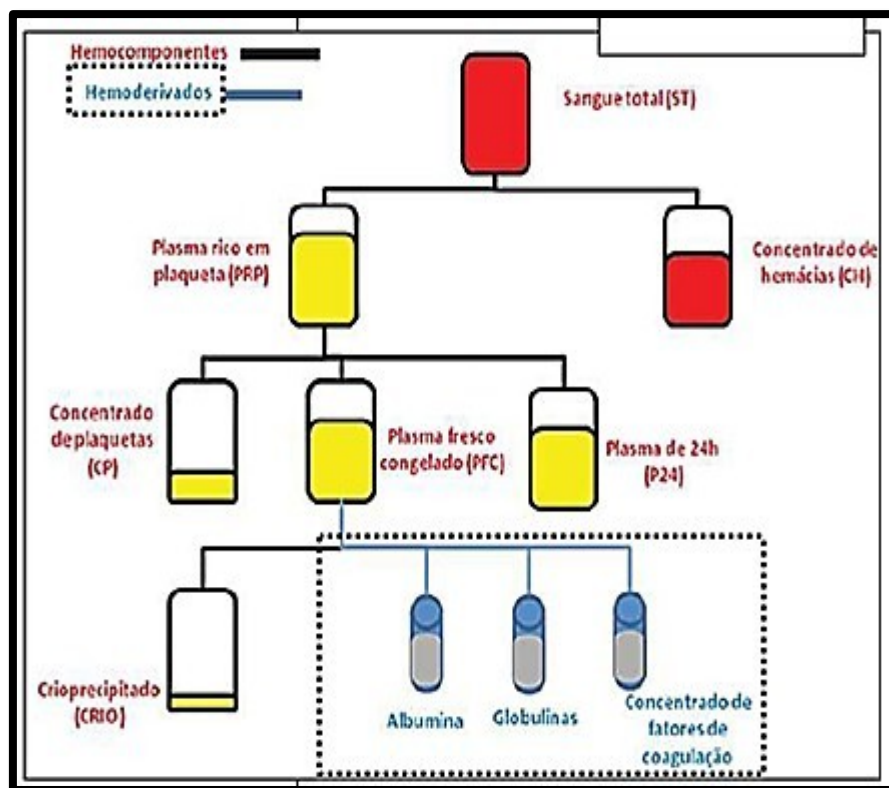


Figura 1: Obtención de hemocomponentes y hemoderivados a partir de una bolsa de sangre entera total

Tomado de: Universidad nacional autónoma de México
https://enallterm.unam.mx/es/admin/structure/webform/manage/wizard_fichatraductologica/submission/1363

1.2a Procedimientos para la obtención de Sangre y sus Hemocomponentes

I. Sangre Entera

Se obtiene por extracción en forma manual mediante punción de un acceso venoso periférico localizado por lo general en la zona del antebrazo o pliegue de ambos brazos del donante (sobre el trayecto de la vena cefálica, cubital media y basílica). ¹³

Cualquiera sea la técnica de extracción empleada, deberá realizarse bajo estrictas medidas de asepsia y antisepsia descriptas a continuación:

1. Se realiza compresión del brazo usando una banda elástica o torniquete
2. Limpiar con alcohol al 70% o solución yodada el área escogida para la colocación del acceso venoso donde se realizará la extracción.
3. Realizar la colocación de acceso venoso periférico usando preferentemente catéter (de material estéril y descartable) para venopunción número 18 o 20G; una vez colocado deberá ser liberado el torniquete.
4. Establecer una conexión cerrada entre el catéter y el set para la recolección de sangre mediante el uso de conector estéril.
5. La bolsa colectora deberá ser colocada tan abajo como sea posible del punto de inserción del catéter venoso para permitir un adecuado flujo por gravedad hasta el set de colección.

En media el volumen total de la colecta oscila entre 450 y 500 ml al cual se adicionan 60 a 70 ml de citrato fosfato dextrosa con o sin adenina (CPD o CPD-A) siendo posteriormente almacenado en bolsas de polivinil cloruro (PVC) para ser conservado a una temperatura entre 2 a 6 °C durante 35 días (en caso de emplear CPD-A) o 21 días en aquellas donde se usó CPD sin adenina.^{13,14}

II. Concentrado de glóbulos rojos

Puede obtenerse a través de la centrifugación de una unidad de sangre entera a 3600 revoluciones por minuto y luego de separar el plasma sobrenadante, dando como resultado un volumen entre 200 y 250 ml por unidad.

Otra alternativa constituye la extracción de glóbulos rojos mediante un procedimiento conocido como aféresis el cual se lleva a cabo a través de un separador celular cuya utilidad radica en la posibilidad de obtener en forma selectiva y en tiempo real el hemocomponente a procesar, devolviendo el resto de la sangre al donante. El volumen colectado usando esta metodología oscila los 300 ml por unidad.^{15,16}

Respecto a las condiciones de almacenamiento y conservación son similares a las que se emplean para la sangre entera.

En caso de concentrados de glóbulos rojos leucodepletados se requiere el uso de filtros leucorreductores (de pie de cama o pre almacenamiento) a fin de garantizar por cada unidad colectada un recuento de glóbulos blancos menor a 5×10^6 .¹⁵

II. Plasma fresco congelado

Este hemocomponente puede ser obtenido de dos maneras:

- A partir de la sangre entera colectada (dentro de las 6 horas de su obtención), luego de ser centrifugada a 3600 revoluciones por minuto durante 20 minutos logrando extraer entre 180 a 250 ml de plasma fresco por unidad.¹⁷
- En forma directa mediante el uso de máquinas de aféresis, en este caso el volumen estimado a colectar oscila entre 500 ml para donantes con peso entre 60 y 80 kg y 600 ml para aquellos con peso mayor a 80 kg.^{17,18}

Respecto a los lineamientos técnicos y recaudos a tener en cuenta durante el procedimiento de extracción son los mismos que se emplean para la obtención de sangre entera, agregando que en el caso de realizar la extracción mediante aféresis la conexión entre el área de colocación del catéter venoso se realizará directamente a la maquina mediante el uso de conector y tubuladura, siendo ambos de material estéril y descartable.

Finalmente, el total de plasma colectado deberá ser almacenado en bolsas de PVC y luego congelados a -30 °C.¹⁹

IV. Crioprecipitados

Se trata de un conjunto de proteínas de alto peso molecular obtenidas de la precipitación que se da luego de someter al plasma fresco congelado a un proceso de descongelación y posterior resuspensión.

Cada unidad contiene dentro de un volumen de 20 ml: 150 a 300 mg de fibrinógeno, 80 a 120 unidades de factor VIII, 70 unidades de factor XIII y factor de Von Willebrand.²⁰

Teniendo en cuenta que el foco de investigación del presente trabajo se centra en el estudio de las plaquetas y sus condiciones de conservación, la descripción detallada del mencionado hemocomponente será presentada de forma separada en el siguiente capítulo.

1.2b Indicaciones para la transfusión de los distintos Hemocomponentes

Sangre entera

Se usa principalmente en el tratamiento de pacientes con sangrado mayor activo en quienes se estime una pérdida mayor o igual al 30% del volumen sanguíneo total (VST). Actualmente la indicación para el uso de sangre total es controvertida pudiendo ser sustituida por el uso de componentes por separado (plasma y concentrado de glóbulos rojos) en conjunto con el uso de soluciones cristaloides para mantener la volemia.²¹

Concentrado de glóbulos rojos

Está indicado en pacientes con:

1. Niveles de hemoglobina menores a 10 gr/ dl con síndrome coronario agudo o patología cardiovascular conocida.
2. Pacientes con hemoglobina menor a 7 gr/dl o aquellos con niveles mayores pero que presentan anemia sintomática.
3. Pacientes con sangrado agudo y pérdida estimada de 30% del VST.^{21,22}

Plasma fresco congelado

Entre las indicaciones para su uso en medicina transfusional tenemos:

1. Pacientes anticoagulados o con déficit de vitamina k que por su situación clínica (principalmente sangrado activo o cirugía de urgencia con alto riesgo de sangrado) no permiten esperar la respuesta a la administración de vitamina K endovenosa.
2. Pacientes con déficit de factores vitamina k dependientes con sangrado activo cuando no se tengan concentrados específicos del factor deficitario, Púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), Púrpura fulminans (por deficiencia congénita de la proteína C o S).
3. Pacientes con insuficiencia hepática y hemorragia con riesgo vital.^{21,23}

Crioprecipitados

Como indicaciones para el uso de crioprecipitados están:

1. la hipofibrinogenemia (< 100 gr% en adultos o < 200 en embarazadas) asociado a sangrado difuso.
2. Personas con enfermedad de von willebrand conocida, sin respuesta a vasopresina o quienes tengan diagnóstico de hemofilia A, que presenten sangrado mayor o previo a procedimientos invasivos.²⁴

1.3 Reología de la sangre y el papel de los hemocomponentes para su mantenimiento

La reología se define como una disciplina, cuyo fundamento es el análisis del flujo y las deformaciones que presentan los materiales sometidos a la acción de fuerzas mecánicas.

Por su parte la reología sanguínea analiza las propiedades físicas del flujo de sangre a través de la evaluación de la viscosidad sanguínea y plasmática, la agregación eritrocitaria y la capacidad de deformabilidad del glóbulo rojo.

La importancia de lo anterior radica en que tales parámetros condicionan el compartimiento fisiopatológico de la circulación sanguínea explicado en que alteraciones del equilibrio reológico del flujo sanguíneo determinen trastornos hemostáticos (sangrado/trombosis), alteración del sistema cardiovascular y desde luego sobre las consecuencias que se derivarían sobre el funcionamiento de órganos vitales producto de mecanismos que alteren el flujo normal de sangre.

1.3a Parámetros Hemorreológicos

- La viscosidad sanguínea y la viscosidad plasmática: dependen de las condiciones del flujo (débito, gradiente de velocidades) y la concentración de proteínas plasmáticas (principalmente el fibrinógeno al considerarse una macromolécula que por su tamaño condiciona el aumento de la viscosidad plasmática aún más que las inmunoglobulinas y casi a la par con la albúmina)

- Concentración celular de la sangre (hematocrito).
- Capacidad de deformación (para el libre paso a través de capilares) y capacidad de agregación globular.
- La rigidez de los eritrocitos

1.3b Papel de los hemocomponentes en el mantenimiento de la hemorreologia

El presente apartado se explica a través de los siguientes fenómenos físicos referentes a la velocidad de flujo sanguíneo a través de los vasos venosos y arteriales.

En el primer escenario, la reducción del flujo sanguíneo permitirá una mayor interacción con el fibrinógeno, así como con el endotelio vascular gracias al proceso de estasis sanguínea. A partir de ello pueden activarse mecanismos que favorezcan la agregación de glóbulos rojos en forma de rouleaux y por tanto pueda predisponer al desarrollo de eventos trombóticos o daño vascular.

El plasma es uno de los hemocomponentes que juegan un doble papel al poder condicionar la volemia total y velocidad de flujo vascular en una persona dado que no solo denota su valor en volumen total sino también en el aporte de macromoléculas como el fibrinógeno (mediante la transfusión de productos crioprecipitados derivados del plasma).

En referencia a la pérdida de volumen asociado a la pérdida de sangre total, puede condicionar seriamente el papel de otros componentes como lo son las plaquetas, tomando en cuenta que dentro de la distribución de los componentes sanguíneos dentro del vaso los glóbulos rojos

suelen estar en el centro del flujo total mientras que las plaquetas originalmente por su tamaño se encuentran hacia la periferia lo que le permitiría, en caso de presentarse algún tipo de daño vascular obtener contacto directo con el endotelio y colágeno para activar la cascada de coagulación.

Es por ello que en individuos que por diferentes mecanismos deriven en la pérdida considerable de glóbulos rojos totales dicho evento podría condicionar la funcionalidad plaquetaria aun cuando el recuento total de plaquetas sea normal.

Por el contrario, cuando la velocidad del flujo sanguíneo aumenta los rouleaux (acúmulos de glóbulos rojos) experimentarán una tendencia a disociarse, lo que en última instancia, determinará que la viscosidad disminuya.

Capítulo 2

Las plaquetas: su origen, características morfológicas e importancia dentro de la medicina transfusional

2.1 Las Plaquetas

Corresponden a células anucleadas con forma discoide que miden entre 0.5 a 3.0 μm ; un adulto sano produce en media 1×10^{11} plaquetas diariamente, así mismo el intervalo fisiológico de las plaquetas en circulación es de 150 a 450 $\times 10^9/\text{L}$ con un tiempo de sobrevivencia entre 7 a 10 días, siendo luego destruidas en el bazo.³

Dichos fragmentos anucleados conocidos también como trombocitos fueron ilustrados por Friedrich Arnold en 1845 mediante el uso de un microscopio de baja resolución, aunque también se menciona a Alfred Donne como la primera persona que probablemente haya descubierto y descrito por primera vez a las plaquetas.

En el año 1906, Wright demostró que tales estructuras se originaban en la médula ósea a partir de la fragmentación del citoplasma de su ancestro, el megacariocito.⁴

La estructura plaquetaria se encuentra dividida en 3 componentes principales:

Una membrana celular con un espesor de 20 nanómetros (nm), formada por 2 hojas densas y compuesta por fosfolípidos, colesterol y proteínas; dicha membrana se extiende a través de las ramificaciones del sistema canalicular.

La cubierta plaquetaria, mejor conocida como glicocáliz está compuesta principalmente de proteoglicanos y glicolípidos de membrana y su principal función es impedir la interacción no intencional de las plaquetas con elementos de la pared vascular al otorgar una carga negativa sobre toda la superficie plaquetaria.^{5,6}

Sobre la superficie de la membrana encontramos las glicoproteínas (Gp), entre ellas las más importantes son: la Gp IIb/IIIa que actúa como receptor del fibrinógeno, el FVW y se identifica como el principal receptor implicado en la agregación plaquetaria. También se ha demostrado la presencia de depósitos de esta Gp en la membrana de los gránulos α que estarían relacionados con el almacenamiento de fibrinógeno en dichos gránulos.⁷

Por otro lado, se encuentra la Gp Ib/IX/V la cual ejerce como receptora del FVW y se considera el principal implicado en la adhesión de las plaquetas a través de la conexión del complejo con la malla de actina mediada por la proteína de unión a actina (Figura 2). Otras Gp son la IV y la VI que funcionan como receptores para el colágeno y están implicadas en la agregación y adhesión mediadas por el mismo.⁸

El siguiente componente es el citoplasma, en cuyo interior se pueden encontrar elementos como lisosomas, mitocondrias y peroxisomas, así mismo contiene partículas de glucógeno distribuidas en forma diseminada constituyéndose en la principal fuente energética para las plaquetas.^{9, 10} De igual manera en el citoplasma plaquetario se encuentran otros dos importantes tipos de gránulos a saber: los gránulos α y los gránulos densos.

Respecto a los gránulos α , tiene un diámetro medio de 500 nm y se pueden encontrar alrededor de 80 de estos elementos por cada plaqueta constituyéndose así en el tipo de gránulo predominantemente encontrado.¹¹

En su interior se albergan múltiples elementos, siendo los más importantes: el factor V, VIII y XI, proteína s, nexina 1 y 2, FVW, fibrinógeno, fibronectina, P- selectina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, plasminógeno, inhibidor de la activación de plasminógeno (PAI-1), α 2 antiplasmina, α 2 macroglobulina, factor plaquetario 4 la proteína ADAMTS 13 y β -tromboglobulina.¹² Por otro lado, están los gránulos densos cuyo diámetro medio es de 300 nm pudiéndose encontrar hasta 7 gránulos por cada plaqueta.¹³

Su interior contiene principalmente:

- Adenosin difosfato (ADP)
- Serotonina y calcio
- Factor XIII, factor plaquetario 4
- Glicoproteína II,
- Actina, filamina, tropomiosina y piruvato kinasa,
- Lactato deshidrogenasa
- Ciclofilina A.¹⁴

El tercer componente corresponde al citoesqueleto que desde su parte estructural se encuentra formado por una malla de filamentos de actina y un conjunto de microtúbulos situados bajo el esqueleto de membrana.¹⁵

En referencia a la malla de actina está conformada por filamentos citoplasmáticos y esqueleto submembranoso; su función comprende mantener la estabilidad del esqueleto de las plaquetas en reposo, formación de pseudópodos y reordenamiento de la Gp Ib/IX/V.¹⁶

Con respecto a los microtúbulos, se encuentran formados por moléculas de tubulina; su función es mantener la forma discoide característica de las plaquetas en su estado inactivo, así como facilitar la liberación de gránulos plaquetarios junto a su contenido mediante exocitosis cuando esta se encuentra activada.¹⁷

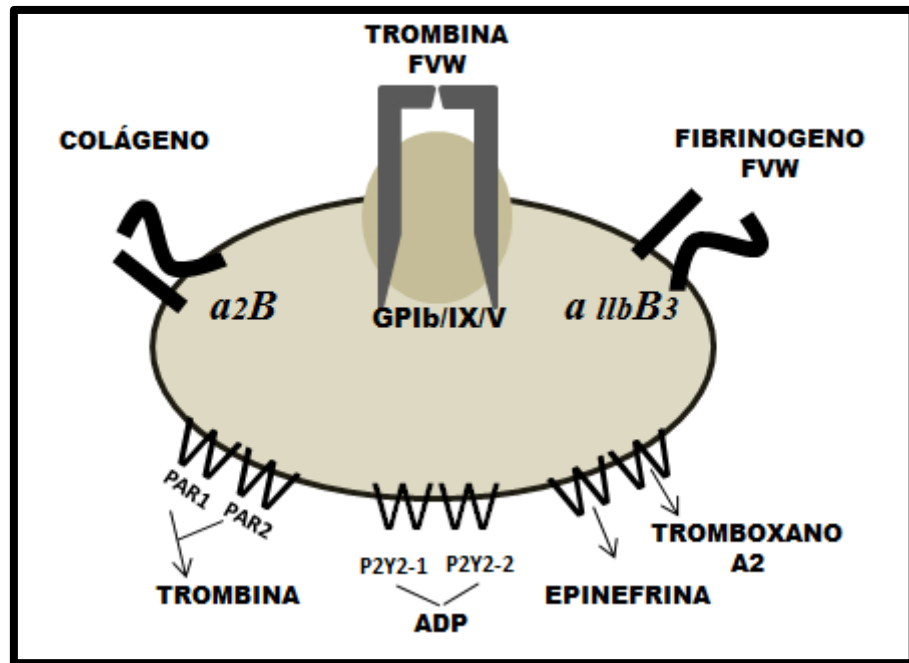


Figura 2: Esquema de una plaqueta con sus receptores y ligandos: En la figura se pueden observar los principales receptores de la membrana plaquetaria y así mismo, las sustancias determinantes en su activación.

2.2 El proceso de formación plaquetario desde la médula ósea

El proceso que da origen a las plaquetas se denomina “megacariocitopoyesis”, este se encuentra regulado por una serie de elementos que incluyen: la trombopoyetina (TPO), el stem cell factor (SCF), la interleuquina 3 (IL3), la 6 y la 11.¹⁸

Respecto a la TPO, se sintetiza principalmente en el hígado y su función radica en la estimulación de las distintas etapas de la megacariocitopoyesis (proliferación desde las stem cells, diferenciación, endomitosis y maduración megacariocítica) ; este mecanismo de acción viene determinado por su unión al receptor c-Mpl lo que desencadena en la activación de la tirosín kinasa “janus kinasa 2” (JAK2) así como PI3K, MAPK y STAT; luego de la unión del TPO con el receptor c-Mpl, se internaliza determinando así su regulación plasmática.¹⁹

Es importante entender el funcionamiento ejercido por esta unión TPO/Mpl, ya que existe una relación inversa entre el número de receptores c-Mpl presentes en el megacariocito y la cantidad de TPO circulante en el plasma, lo que explica que ante un incremento del número de plaquetas aumenten también la disponibilidad de sitios de unión a Mpl por parte de la TPO acelerando su depuración en el plasma y por tanto disminuyendo el estímulo para la megacariopoyesis.²⁰ Si por el contrario el número de plaquetas disminuye, el proceso explicado anteriormente se lleva a cabo, pero de manera inversa.

Cabe aclarar que la regulación de los niveles de TPO no están supeditados exclusivamente al recuento de plaquetas ya que bajo condiciones fisiológicas las plaquetas envejecidas presentan desialinización de sus glicoproteínas, una vez desialinizadas interactúan con el receptor Ashwell-Morell localizado en los hepatocitos y son removidas de la circulación, sin embargo, dicha interacción estimula la producción a nivel hepático de TPO.

Hay otros factores como la Interleuquina 6 que al verse fuertemente expresada bajo condiciones de inflamación, puede favorecer también la síntesis de TPO en el hígado.^{21, 22}

Una vez explicado esto, se centrará la atención en los precursores hematopoyéticos localizados en la médula ósea (CPH y progenitor mieloide común) desde donde se gestará el progenitor megacariocítico eritroide (MEP) cuya característica radica en su capacidad de dar origen a los linajes eritroide y megacariocítico.

Posteriormente dará lugar a la formación del “Burst forming unit” (BFU-MK) reconociéndose como el estadio más primitivo del megacariocito.²³

Continuando con el proceso encontramos las “Colony forming units of megakaryocyte progenitors” (CFU-MK) con capacidad para formar colonias de megacariocitos en cultivo, que sin embargo en comparación con las BFU-MK son de menor tamaño dada su menor capacidad proliferativa.

Es importante resaltar que a partir de este estadio los precursores iniciarán un proceso de diferenciación y poliploidización llevándolos a avanzar hacia su siguiente etapa evolutiva, el megacariocito.^{24,25}

Los megacariocitos a su vez se clasifican en 3 estadios los cuales vienen determinados por: las características citoplasmáticas, número de lóbulos y tamaño. El primer estadio corresponde al megacarioblasto, una célula de 15 a 20 μm de diámetro con núcleo bilobulado, citoplasma altamente basófilo y carente de gránulos.^{26,27}

La continuidad del proceso de transformación se mantiene durante el paso del megacarioblasto a promegacariocito el cual alcanzará un diámetro de hasta 80 μm con citoplasma menos basófilo, de bordes irregulares y alto contenido de gránulos azurófilos en su interior; así mismo posee un núcleo multilobulado con entre 4 y 8 lóbulos (4-8N).²⁷

De ahí avanzaremos al megacariocito maduro cuyas características morfológicas son:

1. Su tamaño que varía entre 80 y 150 μm .
2. Presencia de núcleo poli lobulado (entre 16 a 128N inclusive).

3. Identificación de gránulos alfa, gránulos densos y lisosomas formados a través de la vía del retículo endoplásmico-Golgi-endosomas.
4. la conformación de las líneas de demarcación citoplasmáticas que delimitarán las zonas que constituirán las plaquetas; en forma paralela cada una de estas zonas poseerá un citoesqueleto (compuesto de: tubulina, filamina, α 1 actinina, actina, y miosina) además de otras organelas citoplasmáticas como, por ejemplo, los microtúbulos.^{26,28}

La polilobulación del núcleo, se explica debido a la persistencia de puentes nucleoplásmicos durante el proceso de división celular, lo que implica que los núcleos de las células hijas se separen de forma incompleta obteniendo así células poliploides (2N, 4N, 8N o más), siendo este un rasgo característico de la formación de megacariocitos.^{27,28}

Cabe destacar que también, en la medida en que transcurren las diferentes etapas madurativas del megacariocito se dan lugar la expresión de diversos marcadores de superficie, siendo la glicoproteína IIb/IIIa (conocida como receptor del fibrinógeno) el primer marcador en expresarse seguido de Gp Ib/V/IX (receptor para el FVW).

Como dato de interés, la identificación de cada una de estas glicoproteínas puede ser realizada mediante citometría de flujo empleando los marcadores CD41 o CD61 para el caso de Gp IIb/IIIa y CD42 para la Gp Ib/V/IX; incluso se ha empleado el uso de anticuerpos con mayor especificidad, siendo el caso de PAC-1 para el reconocimiento de Gp IIb/IIIa en plaquetas activadas.²⁹

Las etapas finales del proceso de formación de plaquetas se llevan a cabo cuando el megacariocito maduro se adhiere al sinusoides, siendo este un proceso favorecido por factores quimiotácticos como la interacción entre SDF-1 (derivado de las células estromales de la médula ósea) con su receptor CXCR-4 y así mismo la intervención de otros mecanismos como: la laminina y el colágeno tipo IV que facilitan el recorrido del megacariocito maduro desde su nicho hacia los sinusoides y la adhesión del megacariocito a las células endoteliales de los sinusoides por intermedio del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-4) que favorece la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1.^{27,28}

Una vez en las sinusoides el megacariocito emite unas prolongaciones llamadas pseudópodos (causados por la erosión de uno de los polos citoplasmáticos) que se convertirán luego en proplaquetas de entre 2 a 4 μm de diámetro, la fuerza necesaria para llevar a cabo este proceso está determinada por el citoesqueleto de tubulina y actina.²⁹

Posteriormente la obtención de plaquetas podrá llevarse a cabo a partir de dos caminos: el primero, mediante la continuación del proceso de fragmentación de las proplaquetas cuyo contenido se desplaza hacia el extremo terminal, donde se acumularán para luego producir la liberación del producto final en la luz vascular o como segunda opción, la de pasar por un estadio intermedio con estructura discoide pero con un tamaño relativamente mayor que la plaqueta madura (denominado pre plaqueta) para luego dar origen a las plaquetas; se estima que cada megacariocito puede originar en media 5000 plaquetas (Figura 3).³⁰

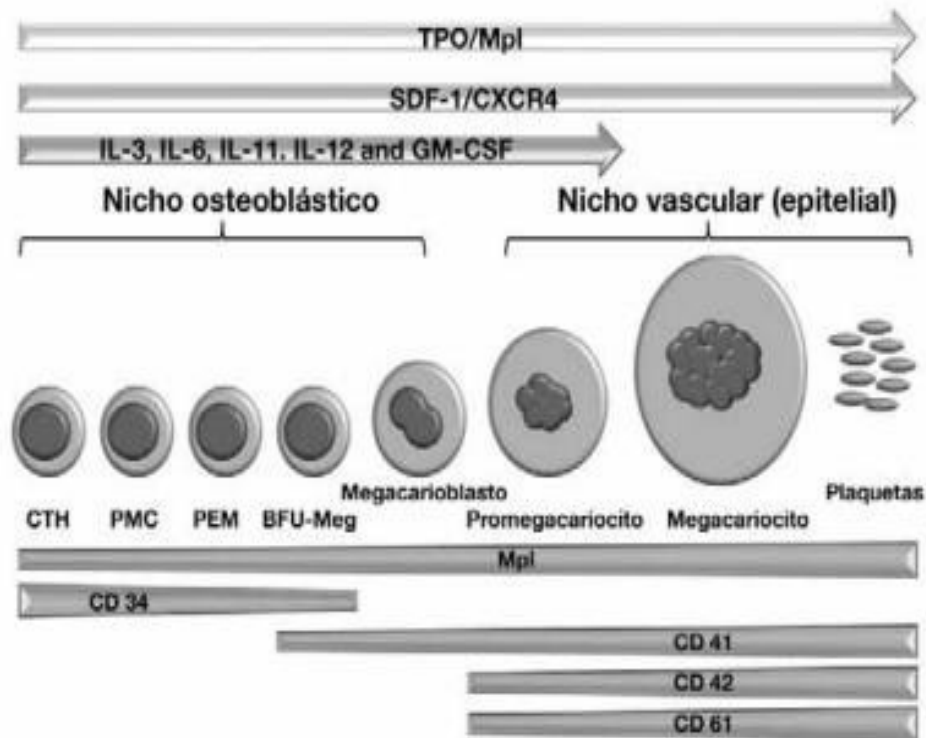


Figura 3: Proceso de maduración plaquetaria

CTH: células troncales hematopoyéticas PMC: progenitor mieloide común PEM: progenitor eritroide/megacariocítico BFU: unidad formadora de brotes de megacariocitos IL: interleucina GM-CSF: factor estimulante de granulocitos/monocitos

Tomado de: Gonzalez-villalba et al; Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis; Gaceta Médica México Vol. 146 No. 2, 2010; p:138.

2.3 Activación de las plaquetas

Una vez que las plaquetas son activadas se produce desestabilización del citoesqueleto de membrana incrementando así la capacidad de las plaquetas para extenderse sobre el subendotelio.

En síntesis, comienza como parte de una respuesta hemostática a la injuria vascular con el frenado y adhesión plaquetaria (Figura 4) determinada por la interacción entre las proteínas de la matriz extracelular endotelial como el FVW (en su dominio A1) y el colágeno (tipo I, III y VI) con las glicoproteínas Ib/IX/V y Gp VI respectivamente, generando una unión irreversible que a su vez promueve la activación de las glicoproteínas IIb/IIIa y Ia/IIa, lo que resulta en la adherencia firme a la matriz del endotelio.^{27,31}

El mecanismo de activación implica una serie de etapas que abarcan desde cambios en la morfología, pasando por la activación de mecanismos intracelulares, así como de los receptores plaquetarios. A continuación, se hará una descripción detallada de cada uno de ellos.

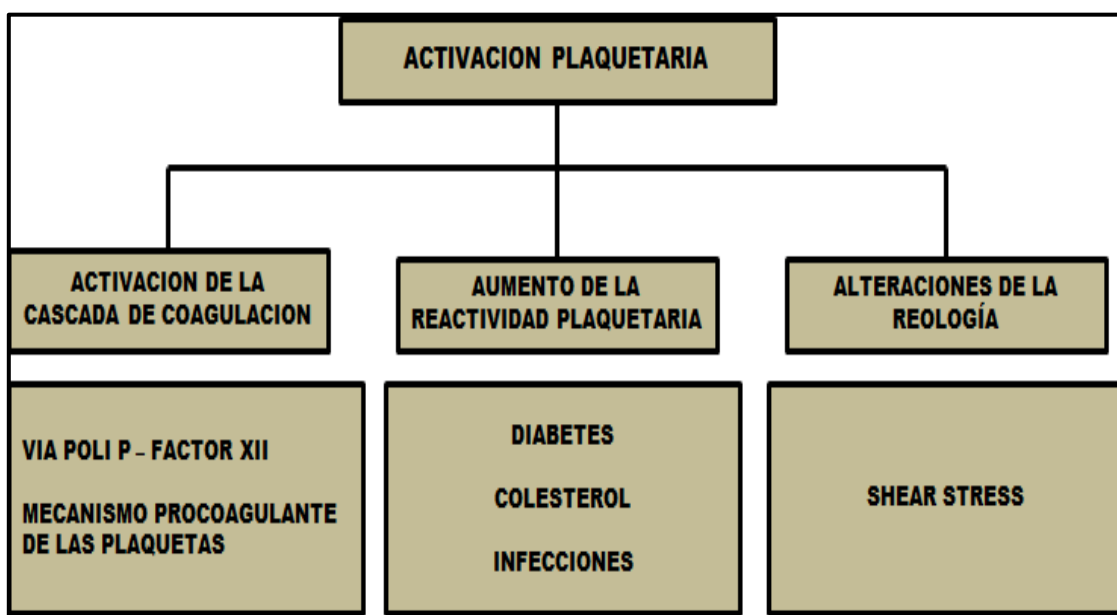


Figura 4: Mecanismos de activación plaquetaria y sus factores desencadenantes: Factores como la presencia de enfermedades que condicionen un estado pro inflamatorio, daño endotelial de causa multifactorial y shear stress pueden condicionar al proceso activación plaquetaria como mecanismo de respuesta.

En referencia a los cambios morfológicos de las plaquetas durante la activación destacan: adaptación hacia una forma esférica, adhesión por filopodios superficiales y lamelopodios; esta última facilitada por el reordenamiento citoesquelético, así como la fragmentación de la malla de actina.

La principal característica de los filopódios consiste en facilitar la formación del coágulo de plaquetas y fibrina mientras que los lamelopódios detienen el drenaje vascular permitiendo la adherencia de la plaqueta a la superficie dañada; este escenario favorece el reclutamiento de otras plaquetas conformando una especie de monocapa en la cual las plaquetas previamente activadas juegan un rol primordial en la activación de Gp IIb/IIIa permitiendo su unión a fibrinógeno y la polimerización de los filamentos de actina.^{27,31,32}

Una vez formado el coágulo, las plaquetas empiezan a contraerse usando para tal fin las fibras de tensión conformadas por cordones de actina las cuales tiene la propiedad de contraerse y expandirse facilitando así la secreción de elementos procoagulantes y factores de crecimiento con reconocida utilidad durante la reparación del daño vascular.³³

Finalmente es la P- Selectina, una proteína contenida en los gránulos alfa y llevada a la superficie durante la activación plaquetaria, interactúa con células granulocíticas, así como macrófagos y monocitos los cuales se encargan de fagocitar tanto resto de fibrina como de plaquetas derivados de la formación del coagulo y reparación de la injuria vascular.³⁴

Continuando con los mecanismos intracelulares implicados en el proceso de activación de las plaquetas, el primer paso corresponde a la activación de la enzima fosfolipasa C beta la cual activa a través de la producción de diacilglicerol una protein kinasa responsable de la expresión del fibrinógeno y la secreción de gránulos plaquetarios. Por otra parte, cataliza la producción de inositol fosfato que estimulara la liberación de calcio al exterior de la plaqueta.

Otro mecanismo comprende la vía de los eicosanoides en la cual, la activación de la fosfolipasa A2 contribuye a la síntesis de leucotrienos y prostanoides.³³

La activación a nivel del receptor GP IIb-IIIa es llevada a cabo por agonistas, muchos de ellos contenidos dentro de la misma plaqueta y que durante el proceso migran al exterior de la misma, ejemplo de esto es el ADP contenido en los gránulos densos que una vez liberado se une a los receptores P2Y1 y P2Y12 inhibiendo la adenilatociclasa.

También es el caso del tromboxano A₂, un producto del metabolismo del ácido araquidónico que se une a sus receptores específicos (TP1 y 2) y en conjunto con el ADP se encargará de reclutar nuevas plaquetas durante la agregación plaquetaria.^{27, 28,34}

Otros agonistas comprenden a la serotonina, que amplifica la activación de plaquetas, al tiempo que ejerce un efecto vasoconstrictor sobre la zona donde se lleva a cabo el proceso mediante la acción sobre su receptor (5 HT-2), y así mismo la adrenalina mediante su unión a receptores adrenérgicos de tipo α_2 plaquetarios.³⁵

También la activación de las plaquetas será determinante en la generación y promoción de la producción de trombina, mediada en este caso por la actividad protrombinasa de la fosfatidilserina expresada en la membrana plaquetaria.

Una vez entre en escena la trombina, estimulará la agregación y la secreción plaquetarias a través de su acción sobre los receptores activados por proteasa, PAR-1 y PAR-4.³⁶

2.4 Procedimiento para la obtención de plaquetas

Para la adquisición de plaquetas se requiere inicialmente la extracción de sangre total de un donante. Dicha persona debe cumplir con una serie de requisitos (que para nuestra investigación están basados en la ley Nacional de Sangre número 22990) a fin de garantizar que el producto obtenido pueda ser usado de manera segura en pacientes que requieran la transfusión del mismo.

Luego de verificar los requisitos del donante, se obtienen los diferentes hemocomponentes, siguiendo los lineamientos descriptos en la sección “Procedimientos para la obtención de Sangre y sus Hemocomponentes”, entre ellos las plaquetas.

En función de la metodología empleada para su obtención (centrifugación de sangre entera o uso de máquina de aféresis) se pueden describir dos presentaciones del producto:

Unidades de plaquetas

Formadas a partir de la centrifugación de una unidad de sangre total para producir plasma rico en plaquetas el cual se centrifugará posteriormente conformando un agregado plaquetario cuya unidad debe contener al menos $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas en un volumen de plasma entre 40 a 70 ml.

Concentrado de plaquetas por aféresis de donante único

Se originan mediante el procesamiento de 4 a 5 litros de sangre n lo cual se espera obtener por cada unidad un mínimo de 3×10^{11} plaquetas en 150 a 200 ml de plasma.^{37, 38, 39}

2.5 Indicaciones para la transfusión de plaquetas

La transfusión de plaquetas se realiza para:

1. El tratamiento de hemorragias asociadas a trombocitopenia o a disfunción plaquetaria.
2. Prevención de hemorragias en pacientes con trombocitopenia severa.
3. Profilaxis de complicaciones hemorrágicas para pacientes con trombocitopenia en plan de someterse a procedimientos invasivos.

En la tabla 1 se mencionarán los criterios que definen la indicación de transfusión plaquetaria.⁴⁰

Criterios para la transfusión de plaquetas
Terapéuticos
Personas con recuento plaquetario menor a 20,000 / mm ³ , con evidencia de sangrado, fiebre, sepsis, hipertensión arterial sostenida o tratamiento con anfotericina B
Personas con recuento plaquetario menor a 50.000 / mm ³ y sangrado mayor debido a trombocitopenia o en fase aguda activa leucémica (Leucemia Promielocítica asociada a coagulopatía)
Personas con recuento plaquetario menor a 100.000 / mm ³ con evidencia de sangrado de sistema nervioso central (SNC).

Profilácticos
Personas con recuento plaquetario menor a 5,000 / mm ³ , sin sangrado
Personas con recuento plaquetario menor a 50.000 / mm ³ , previo a cirugía mayor, procedimiento invasivo en paciente cirrótico o en punción lumbar.
Personas con recuento plaquetario menor a 100.000 mm ³ previo a neurocirugía o procedimiento de la cámara posterior del globo ocular

Tabla 1: Indicaciones para la transfusión de plaquetas

Situaciones Especiales

Trombastenia de Glanzman

La trombastenia de Glanzmann (TG) es definida como un trastorno autosómico recesivo que afecta la función plaquetaria y se caracteriza clínicamente por manifestaciones de sangrado de diversa intensidad a lo largo de la vida del paciente; esta condición es el resultado de alteraciones en la integrina plaquetaria GPIIb/IIIa.⁴¹

La TG se clasifica en tres tipos, definidos por la cantidad y funcionalidad de la GPIIb/IIIa: el tipo 1, caracterizado por niveles mínimos del receptor (0 a 5%); el tipo 2, con niveles moderadamente reducidos (5 a 20%); y el tipo 3, en el cual, a pesar de contar con la presencia de GPIIb/IIIa, su funcionalidad es deficiente.⁴²

La TG afecta a todas las etnias en el mundo, con una incidencia global de 1 en 1,000,000. Desde un punto de vista patogénico, la GPIIb/IIIa es un receptor transmembrana compuesto por dos subunidades que permiten la señalización entre la célula y su entorno.⁴¹

Esta integrina juega un papel fundamental en la agregación plaquetaria y la formación de coágulos; por otra parte, su funcionalidad depende de la unión a diversos ligandos. Las mutaciones que causan TG se localizan en los genes ITGA2B e ITGB3, ambos situados en el cromosoma 17 y afectan a ambos alelos en la mayoría de los casos.⁴²

Terapia con soporte transfusional de plaquetas en trombostenia de glanzmann

Durante años, el tratamiento con plaquetas ha sido considerado la terapia estándar para pacientes con trombostenia de Glanzmann (TG) con sangrado no controlado, cuando otras estrategias hemostáticas no han sido efectivas. No obstante, el uso de productos plaquetarios no está exento de riesgos significativos, razón por la cual se ha preferido inclusive el empleo de terapias puente con factor VII (plasmático o recombinante) dejando cada vez más relegado el papel de la transfusión de plaquetas como último recurso en centros que cuentan con otras alternativas de tratamiento disponibles.

Entre los problemas asociados se encuentran aquellos comunes a todos los productos sanguíneos, como reacciones alérgicas y sobrecarga de líquidos. Además, existe el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, estimándose el riesgo de complicaciones de 1 en 12,000 para los concentrados plaquetarios obtenidos de múltiples donantes y de 1 en 60,000 para las plaquetas obtenidas por aféresis de donante único.^{41,43}

El temor más significativo al utilizar productos plaquetarios en pacientes con TG radica en la formación de aloanticuerpos antiplaquetarios. Para minimizar este riesgo, una alternativa recomendable es considerar el uso de concentrados de plaquetas de un solo donante, asegurando la compatibilidad en antígenos leucocitarios humanos (HLA) y empleando la metodología de plaquetas obtenidas mediante aféresis y sometidas a leucorreducción.⁴³

2.6 Métodos para la evaluación plaquetaria

Evaluación de plaquetas por citometría de flujo

La citometría de flujo supone un método ideal para el análisis de plaquetas, a partir de su identificación mediante el principio de inmunomarcación con anticuerpos monoclonales fluorescentes. El proceso consiste básicamente en el pasaje de la suspensión celular a través de una cámara de flujo equipada con un láser enfocado, quien a su vez se encargará de activar los fluoróforos. Bajo este principio, la fluorescencia emitida estará determinada por la intensidad de la luz emitida, que es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos que se unen a los antígenos plaquetarios (Figura 5).⁴⁴

Componentes del citómetro de flujo:

1. Fuente de luz

Se trata de un haz de luz de alta intensidad en forma de rayo láser el cual se direcciona en forma concentrada a través de un proyector estrecho. Para la mayoría de los citómetros que se emplean en la actualidad dicho láser contiene ion argón.

2. Cámara de flujo

En dicho componente se orienta el flujo celular de la muestra a analizar logrando que cada una de estas células pueda pasar en forma individual para posteriormente ser clasificadas en función de su reacción y/o caracterización obtenida una vez que se exponga al haz de luz laser.

3. Sistema de lentes / sistema óptico

Está constituido por lentes, filtros y espejos cuya función consiste en enfocar el haz de luz que posteriormente entrara en contacto con la muestra, descomponiendo la emisión de fluorescencia en sus componentes individuales.

4. Convertidores de información analógica digitales

Se trata de un sistema encargado de detectar y convertir en impulsos eléctricos, las señales luminosas obtenidas a través de la reacción del láser con los componentes celulares. Estos impulsos eléctricos se traducirán posteriormente en señales digitales.

5. Ordenador/Procesador

Constituye un elemento fundamental para la adquisición, almacenamiento y análisis de los datos obtenidos principalmente del convertidor analógico digital. Dicha información puede ser analizada en dos escenarios (tiempo real o en el modo matriz de datos).^{44,45}

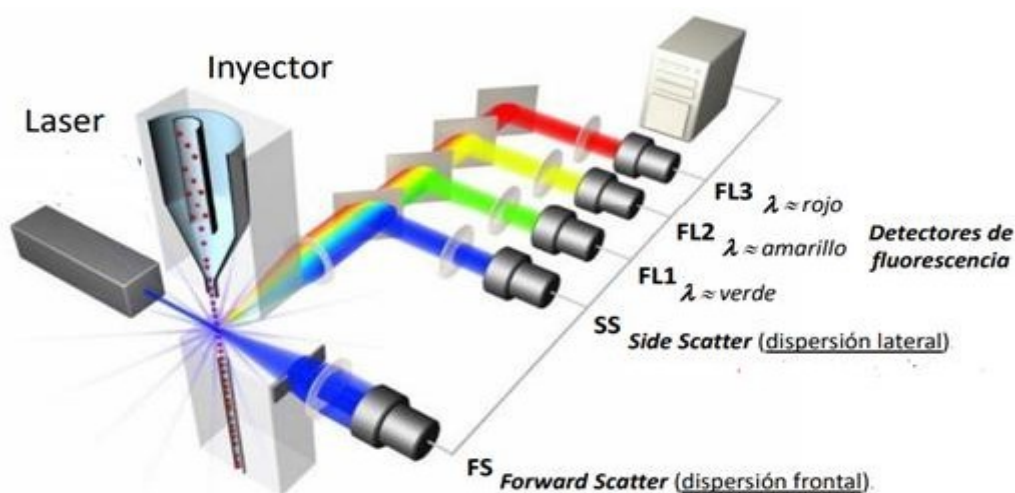


Figura 5: Esquema de la disposición habitual de elementos de un citómetro de flujo
Tomado de: <https://cscmetabolism.com/2022/01/19/cuanto-sabes-acerca-de-la-citometria-de-flujo/>

Procesamiento de la muestra de plaquetas previo a la citometría

Elección del tubo y anticoagulante para el almacenamiento de plaquetas

Normalmente el tubo/recipiente que contiene la muestra de análisis (plaquetas) debe contar en su interior con solución anticoagulante, dada la tendencia natural de las plaquetas a agruparse y con la finalidad de prevenir la formación de tales agregados que puedan comprometer la realización correcta del análisis por citometría.

Entre los anticoagulantes más usados se da especial preferencia al citrato de sodio, dado que otras opciones como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la heparina pueden afectar la estructura plaquetaria (puntualmente de las glicoproteínas) y causar paradójicamente la formación de agregados de plaquetas en el tubo.

Por otra parte, en referencia al EDTA, se conoce que puede afectar la morfología plaquetaria, lo que se traduce en la obtención de una cantidad significativamente menor de plaquetas positivas para antiCD41a (mediante inmunofluorescencia) en contraparte de las recolectadas en tubos con citrato de sodio.⁴⁵

Análisis de parámetros plaquetarios por citometría de flujo

Caracterización Morfológica

En la práctica de la citometría de flujo las señales de dispersión lateral (SS) y frontal (FS) de

luz guardan estrecha relación con la morfología celular, siendo FS aquella que se relaciona con el tamaño y para el caso de SS la que guarda un vínculo ligado a la complejidad de la estructura celular.

En el caso de la activación plaquetaria uno de los cambios característicos de este proceso es la reorganización del citoesqueleto lo que en consecuencia genera la pérdida de su forma discoide tornándose hacia una segunda conformación de tipo esfera, posteriormente esta plaqueta activada procederá a la emisión de pseudopodos y finalmente a la degranulación cuyo contenido (intragranular) será responsable de otros procesos subsecuentes como señalización para la adhesión de otras plaquetas, activación de la cascada de coagulación entre otros.

Tales cambios morfológicos pueden traducirse a través del resultado de la emisión de señal de luz emitido por su interacción con las señales de FS y SS.⁴⁶

Antígenos plaquetarios

Para llevar a cabo este proceso se toma como base el uso de anticuerpos asociados en su conformación con moléculas fluorescentes; gracias a lo anterior permite un adecuado nivel de detección y cuantificación de los diferentes antígenos plaquetarios empleando la citometría de flujo.

Una de las ventajas con que contamos actualmente es la disposición de anticuerpos monoclonales además de colorantes fluorescentes para la gran mayoría de las glicoproteínas y otros componentes de la membrana plaquetaria lo que deriva en la obtención de resultados de análisis inmunofenotípicos con alta sensibilidad y especificidad.

Es de aclarar que a través de la inmunotipificación por citometría de flujo se puede obtener tanto la cuantificación de antígenos propios de las plaquetas en su estado activo o en estado de reposo lo cual permitiría distinguir adecuadamente entre una u otra conformación para efectos prácticos en estudios paraclínicos con finalidad clínico asistencial o con propósito de investigación.

Marcadores como CD61, CD41 y CD42 son específicos para glicoproteínas de la membrana plaquetaria, permitiendo con ello distinguir a la población plaquetaria de la imagen de “debris” o ruido de fondo y en consecuencia logrando la adecuada identificación de las plaquetas (Figura 6).^{45,46}

Por otra parte, mediante la identificación de dichos antígenos es posible la detección y caracterización de anomalías en la expresión de glicoproteínas de la membrana, lo cual representa utilidad en el diagnóstico de enfermedades como la trombastenia de glanzmann y el síndrome de Bernard Soulier.

Como parte del proceso de activación plaquetaria ocurren diferentes cambios, principalmente a nivel de su membrana dentro de los cuales se hace mención de:

- Una mayor expresión de componentes de membrana (en este caso glicoproteínas) que son comunes en el estatus activo de las plaquetas.
- Exposición del contenido de gránulos plaquetarios que salen al exterior de la membrana.
- Unión de proteínas solubles a la membrana plaquetaria.
- La puesta en marcha de procesos con finalidad procoagulante.

Se ha demostrado como al aumento de la unión de anticuerpos para el complejo GPIIb/IIIa como es el caso de: LJ-CP3, AP-3 y 7E3 (que pueden unirse a la plaqueta tanto en reposo como en activación) denotan de forma indirecta el cambio conformacional de la plaqueta hacia su estado de activación.⁴⁷

En contraparte la unión a la superficie de la plaqueta de anticuerpos monoclonales para elementos del complejo GPIb/IX/V disminuye.^{46, 47}

Otros anticuerpos como el PAC-1 se unen de manera específica al complejo GPIIb/IIIa solo en el estado de conformación activo de la plaqueta (y no se encuentra condicionado por la cantidad de sitios de activación disponibles) sin embargo su desventaja radica en que su función se limitaría solo a describir el estatus de conformación pero no mostraría una verdadera utilidad para describir la presencia de trastornos de las glicoproteínas plaquetarias (que en caso de presentarse) alterarían de manera importante el proceso de activación; es por ello que se han desarrollado opciones complementarias como los anticuerpos "LIBS" (Ligand-Induced Binding Site), siendo el anticuerpo PMI-1, de unión a una región molecular de GPIIb/IIIa, que es expuesta tras la unión del fibrinógeno al complejo.

Este anticuerpo sirve para detectar alteraciones conformacionales de GPIIb/IIIa (y por tanto de la agregación plaquetaria) tomando en cuenta que la unión del fibrinógeno no bloquea ni constituye inconveniente para el enlace de este anticuerpo a su lugar de unión.

Otro de los cambios que pueden caracterizarse durante el proceso de activación plaquetaria es la fusión de las membranas de los gránulos con la membrana plasmática. Para ello se ha demostrado la utilidad de S12 y KC4, quienes pueden reconocer y adherirse a P- selectina (CD62P).^{45,47}

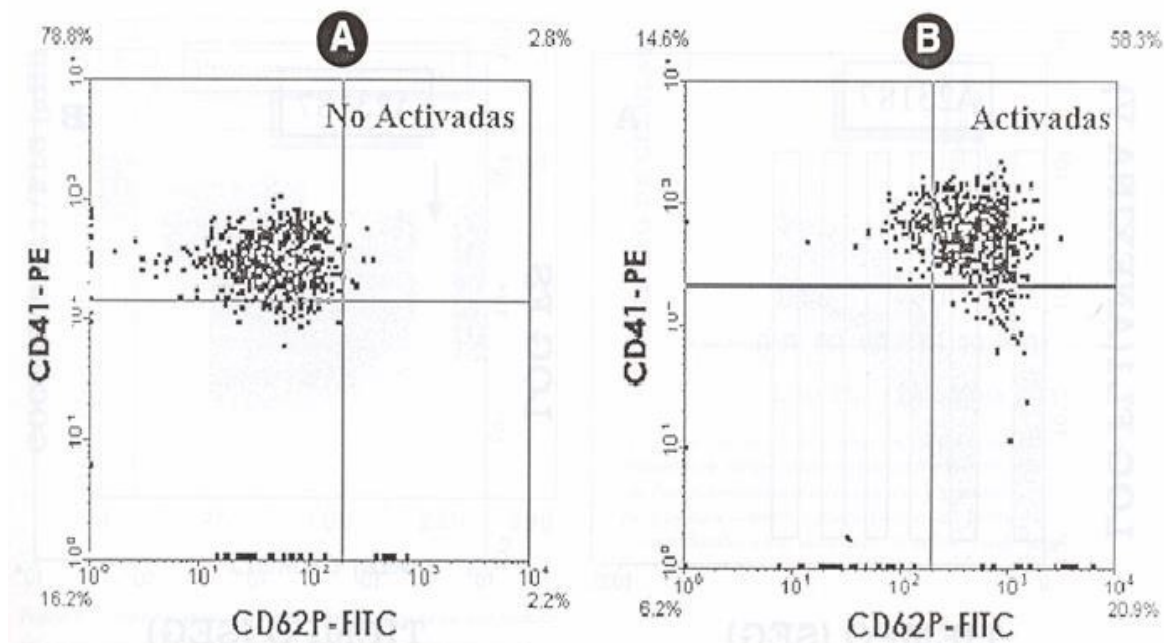


Figura 6 Marcación de plaquetas por citometría de flujo: Obsérvese como las plaquetas son marcadas a partir de anticuerpos para el antígeno CD41 (para ambos estados imágenes A y B) sin embargo en el estado conformacional activo (parte B) cuenta además con una marcada expresión de anticuerpos para CD62P (p-selectina).

Tomado de: Monteiro María-do-Céu, Martínez Marcial, O'Connor José Enrique. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. Rev Diagn Biol [Internet]. 2002 Sep; 51(3): 87-99. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732002000300001&lng=es.

Ventajas de la evaluación plaquetaria por citometría de flujo

1. Determinar de manera rápida características específicas de un gran total de células para luego clasificarlas de forma individual.

2. Permitir el análisis de la población plaquetaria (activa o en reposo) de manera individual dado que la gran mayoría de métodos están diseñados para analizar tasas de activación y/o actividad plaquetaria media.
3. Evitar los sesgos derivados de la posible detección de plaquetas activas ex vivo al realizar una fijación inmediata de la muestra plaquetaria antes de su manipulación.
4. El requerimiento de pequeñas cantidades de muestra que pueden comprender: suspensión de plaquetas lavadas, sangre entera o plaquetas filtradas en gel.

Desventajas de la evaluación plaquetaria por citometría de flujo

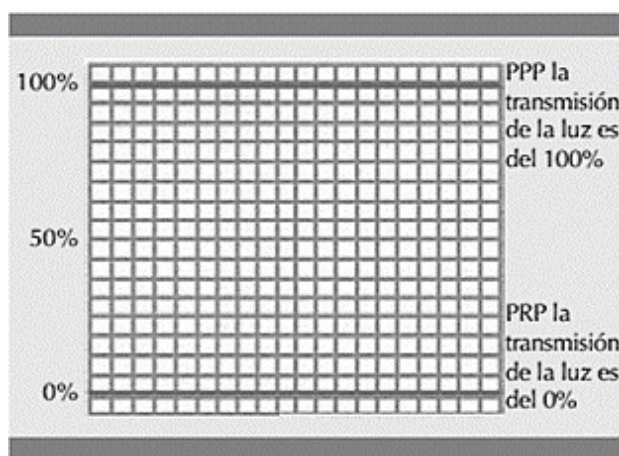
1. Costo del equipo (citómetro de flujo).
2. Baja disponibilidad de equipos en laboratorios de investigación básica o centros de baja complejidad.
3. Imposibilidad de cuantificar de manera absoluta la totalidad de antígenos detectados por citometría de flujo.
4. La dificultad en la detección de plaquetas y su distinción de la zona de ruido de fondo o “debris” esta es una dificultad que ha podido sortearse con equipos más actualizados cuya resolución y amplificación logarítmica es superior en comparación a los equipos más antiguos.⁴⁸

Agregometría plaquetaria

Históricamente se conoce que la técnica para evaluación de la agregación o agregometría plaquetaria inició en la década de 1960 cuando Born y O'Brien describieron lo que se consideró un proceso revolucionario para la época y consistente en una técnica para la estimación cinética de la agregación de las plaquetas a través de la turbidometría (entendiéndose esta como la medición de la densidad óptica del plasma) empleando un haz de luz.

De manera más detallada el procedimiento consiste en la centrifugación inicial de sangre total a una velocidad de 100 revoluciones por minuto durante 15 minutos, obteniendo posteriormente plasma rico en plaquetas; una vez obtenido este producto, se coloca en un contenedor o recipiente a temperatura de 37°C en medio de una fuente de luz y una celda solar la cual se encargará de medir la luminiscencia del plasma. Adicionalmente se preparará en otro recipiente, una muestra de plasma pobre en plaquetas obtenida mediante centrifugación rápida a 3000 revoluciones por minuto. Con esta segunda muestra se establecerá la calibración de la trasmisión de la luz a través del plasma claro (este último se ajusta al 100% mientras que en el caso del plasma rico en plaquetas se ajusta a 0% (Figura 7).⁴⁹

A



B

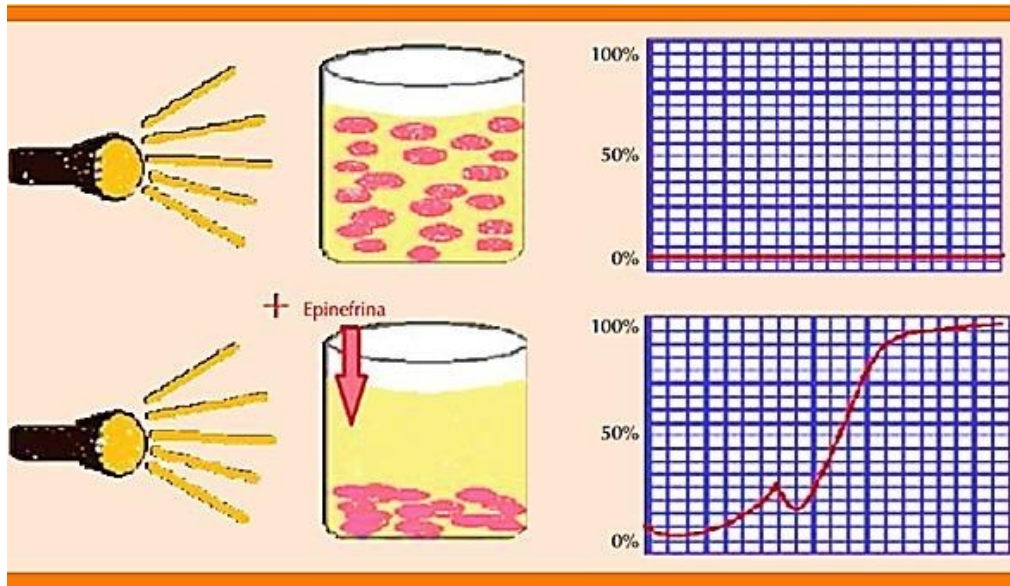


Figura 7: Sección A: Calibración del agregómetro plaquetario con plasma pobre en plaquetas (100% de transmisión de luz) y rico en plaquetas (0%), Sección B: porcentaje de agregación plaquetaria en función de la transmisión de luz a través del recipiente.

Tomado de: Gómez-Gómez Brenda, Rodríguez-Weber Federico Leopoldo, Díaz-Greene Enrique Juan. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. Med. interna Méx. [revista en la Internet]. 2018 Abr; 34(2): 244-263. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662018000200007&lng=es.

Una vez se cuenta con las preparaciones de plasma y habiendo realizado el proceso de calibración, se deberá agregar en la muestra a analizar un agonista plaquetario (colágeno, epinefrina, ácido araquidónico, trombina, ristocetina o ADP) con el cual se buscará obtener un efecto agregante sobre las plaquetas lo que al final resultará en una disminución de la turbidez del plasma aumentando con ello la transmisión de luz.

Dicha transmisión es detectada y registrada en relación al tiempo transcurrido entre la adición del agonista plaquetario y el porcentaje de agregación obtenido; Se debería obtener (en el caso de plaquetas normales) una relación directamente proporcional entre el nivel de agregación con una mayor transmisión de luz.

Para efecto de estudios en la práctica clínica diaria se emplean diferentes concentraciones de los agonistas plaquetarios antes mencionados con la finalidad de evaluar la respuesta plaquetaria clásica (cambio inicial de la conformación plaquetaria previo a la formación de agregados) así como la agregación primaria y secundaria. Esto permitiría la detección de trastornos plaquetarios (así como presencia de posibles inhibidores) en función de la evaluación y resultados obtenidos del patrón de agregación de las plaquetas (Figura 8).^{49,50}

CONDICION	RISTOCETINA	COLÁGENO	ADP primario	ADP secundario
Trombastenia de Glanzmann	N	SR	SR	SR
Síndrome de Bernard-Soulier	SR	N	N	N
Enfermedad de Von willebrand	V	N	N	N
Síndrome de plaquetas grises	N	N	N	D O SR

N: normal, D: disminuida, V: variable, SR: sin respuesta

Figura 8: Parámetros de la Agregometría plaquetaria para identificar enfermedades relacionadas con la agregación plaquetaria.

Conteo plaquetario por coulter

El contador coulter es un dispositivo desarrollado por Wallace H Coulter en 1947, cuyo principio de acción es el paso de la muestra a analizar a través de microcanales que conectan 2 cámaras (las cuales contienen en su interior una solución electrolítica) y sobre las cuales hay aplicada una diferencia de potencial (Figura 9).⁵¹

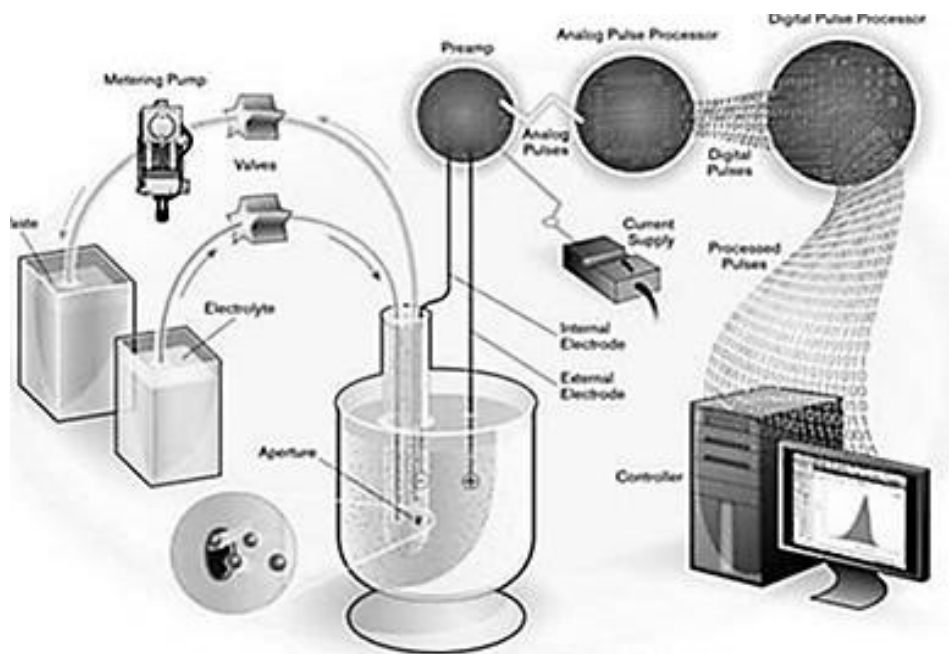


Figura 9: Principio de funcionamiento de un coulter de partículas.

Tomado de: <https://www.beckman.mx/resources/technologies/flow-cytometry/history/coulter-principle>

Una vez que la muestra pasa de una cámara a la otra arrastra con ella partículas en suspensión que una vez que atraviesan el microcanal generan cambio en la resistencia del líquido; estos cambios en la resistencia eléctrica son detectados por el dispositivo (coulter) y en función de tales registros se puede realizar un conteo del número y clasificación por tamaño de partículas presentes en un volumen determinado de muestra líquida.

De esta manera se puede determinar la importancia de su aplicación clínica en el conteo de células sanguíneas (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) además de otros componentes celulares como partículas virales y bacterias.⁵²

.

Capítulo 3

Situación Problema

A partir de informes establecidos por la organización Panamericana de la salud (OPS) se estima que en el año 2014 en Latinoamérica se transfundieron un total de 7.3 millones de unidades de hemocomponentes de los cuales 1.4 millones (19%) correspondió a unidades de plaquetas.⁴¹

En referencia al mencionado hemocomponente, al tratarse de un producto biológico requiere el cumplimiento de ciertos protocolos que aseguren su adecuada manipulación y conservación a fin de evitar situaciones adversas que puedan comprometer la integridad de los concentrados siendo el caso más común, la contaminación bacteriana.

Sin embargo, es conocido que bajo las condiciones de almacenamiento y conservación estándar (requerimiento de agitación constante a temperatura entre 22 y 24°C), el tiempo medio de sobrevida de un concentrado plaquetario es de 5 a 7 días, lo que constituye una limitante ya que tales procedimientos no pueden garantizar una duración significativa en el tiempo para el producto obtenido.⁵³

Esto significa que los concentrados plaquetarios que no sean usados durante el lapso de sobrevida descripto anteriormente y por tanto deban ser descartados terminaran representando grandes pérdidas en términos de índole presupuestal como consecuencia de la forma subóptima en que este recurso es aprovechado.

Lo anterior representaría desde el punto de vista monetario un coste considerable si tenemos en cuenta que un gran porcentaje del presupuesto destinado a gastos sanitarios debe derivarse

al funcionamiento de los servicios de hemoterapia o bancos de hemoderivados para la fabricación mantenimiento y frecuente recambio de sus productos como consecuencia de su poca vida útil (para el caso particular de los concentrados de plaquetas).

Según datos aportados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), para la obtención de hemoderivados se debe tener presente los costos generados de su producción, los cuales varían según cada país teniendo como base algunas condiciones entre las cuales se mencionan: la planta física, nómina de personal capacitado, recursos tecnológicos y afluencia de donantes.

Es así que por ejemplo mientras en República Dominicana el costo medio de una unidad de hemocomponentes (siendo los principales Glóbulos Rojos y Plaquetas) ronda los 37 dólares, en países como Colombia, Paraguay y Chile cuestan en media 32, 25 y 20 dólares respectivamente.⁵⁴

Desde el contexto nacional se han tomado en consideración las dificultades que supone el transporte de este hemocomponente bajo las condiciones de conservación descritas anteriormente hacia instituciones de salud ubicadas en regiones apartadas de la capital federal o capitales provinciales con lo cual el acceso a este recurso terapéutico permanece en la actualidad fuera del alcance de la población residente en localidades distantes de los cascos urbanos.

Ahora bien, bajo la perspectiva local en el hospital Británico de Buenos Aires (Año 2022) se producen en media 96 concentrados mensuales de plaquetas entre unidades de plaquetas convencionales y obtenidas por aféresis, si tomamos en cuenta que por cada unidad se estima un presupuesto de \$ 8170 pesos argentinos (AR) y por cada concentrado de aféresis \$ AR 28000, el coste mensual para la obtención de plaquetas oscila entre \$AR 784320 y \$ 2688000; esto sin tomar en cuenta otros factores como: el requerimiento de donantes en forma continua, logística y costes de mano de obra.

Esta situación permitiría deducir que de lograr prolongar la sobrevivencia de los concentrados de plaquetas a 14 o 21 días se estimaría por una parte la reducción del presupuesto de producción entre 25 y 50%, así como también garantizar una mayor disponibilidad del hemocomponente en la institución con lo cual el beneficio es extensible a los usuarios que por su condición clínica requieran acceder a este recurso en forma oportuna.

Impacto de la Pandemia por COVID-19 en la obtención de hemocomponentes

Uno de los factores que motivó el diseño y puesta en marcha de esta investigación fue el déficit global de hemocomponentes a consecuencia de la pandemia asociado a al virus Sarscov2 o COVID-19.

Lo anterior se fundamentó en el temor colectivo generado por la gran cantidad de contagios y decesos derivados de tal enfermedad, lo que condicionó de manera importante la disponibilidad de donantes que decidían acudir a los distintos centros de hemoterapia en el mundo; muchos de ellos lejos de obedecer a una iniciativa propia o altruista se enfrentaban al dilema de ser la única alternativa disponible por cuanto para ese momento familiares o personas cercanas a ellos fungían como pacientes en alguna unidad hospitalaria y requerían con urgencia algún hemocomponente en particular.⁵⁵

También es conveniente agregar que la situación de confinamiento y las limitaciones al libre desplazamiento constituyeron inconvenientes para las personas que habitualmente servían como donantes voluntarios.

Por otro lado, las condiciones reinantes durante el periodo de pandemia derivaron en la cancelación de eventos públicos y campañas de donación que en cierto modo influían regularmente en la concientización de las personas y con ello en la afluencia de futuros donantes.

Es de público conocimiento que el adecuado abastecimiento de los distintos servicios de hemoterapia y/o bancos de sangre influyen potencialmente en la calidad de atención en salud brindada por las diferentes instituciones tomando en cuenta que el tratamiento con hemocomponente (como ya se había anunciado anteriormente) no está supeditado exclusivamente a pacientes del servicio de hematología y oncología, sino que su utilidad varía entre las distintas especialidades en salud.

Sumado a lo anterior y como ya se ha abordado de manera parcial en este trabajo, los diferentes componentes sanguíneos (entre ellos glóbulos rojos y plasma fresco congelado) cuentan con una vida media de conservación de 3 meses para el primero y hasta un año (bajo congelación) para el segundo.

En el caso de las plaquetas la situación suele ser más alarmante, tomando en cuenta que la vida media de conservación bajo las condiciones estándar de un banco de sangre es significativamente más corta que el plasma y los glóbulos rojos, lo que en definitiva ha determinado que este estudio haya enfocado sus esfuerzos a buscar alternativas para prolongar el tiempo de conservación de este componente, siendo esta una forma de aportar en su momento a paliar las consecuencias establecidas por la emergencia sanitaria.

3.1 Principio de Criopreservación y la probabilidad de su aplicación en la conservación plaquetaria

Ámbito Histórico

En esencia, la criopreservación se define como la capacidad de conservar a través de técnicas de congelación la viabilidad y en lo posible la funcionalidad del componente sometido a tal procedimiento: para ello requiere conjuntamente del uso de compuestos que eviten el daño potencial que pueda generar la acumulación de depósitos de hielo (esencialmente en

membranas y/o organelas celulares vitales) y así no comprometer la sobrevivencia y funcionalidad del producto criopreservado.

Aunque de manera accidental, el primer proceso de criopreservación exitosa fue llevado a cabo en 1949 por Christopher Polge y colaboradores al haber agregado accidentalmente nitrógeno líquido a muestras de espermatozoides de gallo tratadas con glicerol (descubriendo que al calentarlas a 37°C recuperaban su movilidad), históricamente las primeras investigaciones evocadas al empleo de esta revolucionaria técnica para su aplicación en medicina se remontan a la década de los 50's.⁵⁶

Audrey Smith implementó el uso de sustancias crioprotectoras, como el glicerol para la conservación de glóbulos rojos al explicar que el efecto protector de este derivado del alcohol se debía a la posibilidad de conservar la integridad de la membrana del glóbulo impidiendo así que la misma sufriese algún tipo de ruptura por la entrada de depósitos de hielo o por efecto de los cambios de presión una vez que los glóbulos congelados se sometieran al proceso de descongelación a temperatura ambiente para evaluar su viabilidad.

En 1959, Lovelock y Bishop describieron el uso de dimetilsulfóxido como criopreservante al demostrar que poseía mayor permeabilidad frente al glicerol para muchos tipos de células.

Por su parte Mazur y colaboradores presentaron en 1972 la "hipótesis de dos factores" para describir la relación entre las tasas de enfriamiento (principalmente en función de los tiempos y velocidad empleados para la congelación) y la supervivencia, explicando una mayor proporción de componentes inviables al ser sometidos a procesos de enfriamiento lentos, o en otros casos la presencia de hielo intracelular letal presente a altas velocidades de enfriamiento (sobre todo cuando se empleaban sustancias criopreservantes diferentes del DMSO).⁵⁷

En 1980 Fahy y colaboradores documentaron una novedosa estrategia de vitrificación para la preservación celular en la que concentraciones cercanas a 8 molares de una mezcla crioprotectora podían titularse sobre un gradiente de concentración para crear un medio carente en su totalidad de hielo logrando así mantener intacta la membrana celular de los organismos o de los componentes sometidos a criopreservación.^{56,57}

Aplicación en la preservación de plaquetas

Se han desarrollado diferentes estrategias a fin de aumentar la vida útil de las plaquetas. Por ejemplo, métodos de criopreservación utilizando diferentes tipos de soluciones durante la técnica de conservación.

Si bien los primeros trabajos con plaquetas criopreservadas fueron realizados en la década de 1950 por Klein y colaboradores; fue en 1963 cuando Djerassi y Pfisterer mediante sus investigaciones plantearon el uso de soluciones aditivas a base de azúcares (dextrosa, lactosa y maltosa) así como dimetilacetamida y Dimetilsulfoxido (DMSO) ⁵⁸.

Respecto de este último componente, si bien se conoció que tanto el recuento de plaquetas criopreservadas, así como su funcionalidad representaban en media 50% de los valores reportados en comparación con las plaquetas almacenadas en la forma convencional Valeri y colaboradores demostraron que las plaquetas preservadas con solución de DMSO al 6% y congeladas a -80°C tenían mejor efecto en la reducción del sangrado respecto de su contraparte conservadas convencionalmente. ¹

En detalle la técnica considera los siguientes pasos:

- Obtener un concentrado con plaquetas de aféresis contenidas en un volumen total de solución de 200 ml al cual se añadirán 75 ml de solución de DMSO al 25% en NaCl

al 0.9%, mediante conector estéril dando como resultado una concentración final de DMSO al 6% por cada concentrado de plaquetas.

- Centrifugar el total obtenido durante 20 min, mediante centrifugado suave.
- Eliminar el sobrenadante obteniendo un producto final entre 13-15 ml que contiene las plaquetas que serán criopreservadas.
- Llevar el producto obtenido a un congelador para ser preservado a -80 ° C.

Revisiones de la literatura, recientemente han descripto que el almacenamiento en frío y la criopreservación de las plaquetas podría facilitar la extensión de la vida útil a semanas y años, y también pueden proporcionar el beneficio de ser más eficaces desde el punto de vista hemostático que las plaquetas almacenadas convencionalmente.

Eker I, Yilmaz S y col demostró que los concentrados plaquetarios de aféresis (APC) de 20 donantes almacenados durante 1 día y criopreservados con un 6% de dimetilsulfóxido a -80 °C al ser descongelados presentaron mejor actividad sin embargo disminuyó su viabilidad. Otro protocolo donde se evaluaron diferentes tiempos y temperaturas de criopreservación, demostró que la funcionalidad de las plaquetas mejora luego de ser criopreservadas.⁵⁹

A raíz lo expuesto anteriormente nos hemos dado a la tarea de investigar más a fondo esta situación problema llevándonos a plantear como probable solución a estas circunstancias la creación de un protocolo de conservación de concentrados de plaquetas fundamentado en el principio de la criopreservación asociado a un modelo de solución criopreservante (tomando como referencia las diferentes soluciones propuestas para criopreservación) para evaluar si el mismo permite prolongar en el tiempo la sobrevida útil del producto sometido a esta técnica de conservación tomando como punto importante la disponibilidad de los recursos necesarios para su aplicación en nuestra institución.

Justificación y acción posterior: Comunicar los resultados en revistas de difusión médica mostrando los resultados *in vitro* como un aporte a futuros y posibles trabajos *in vivo*.

3.2 Hipótesis

Mediante la criopreservación es posible prolongar hasta 4 veces el tiempo de sobrevida de las plaquetas, en comparación a aquellas conservadas bajo el método convencional, manteniendo una viabilidad igual o mayor al 50%.

Existe una relación directa entre el tiempo de sobrevida, viabilidad y funcionalidad de las plaquetas criopreservadas en función del modelo de solución crioprotectora empleada.

3.3 Objetivo principal

- Evaluar la efectividad de la criopreservación para prolongar la sobrevida y conservar la viabilidad y funcionalidad plaquetaria, tomando como comparador a las plaquetas conservadas en forma convencional.

3.3a Objetivos específicos

- Calcular el recuento de plaquetas obtenido de las alícuotas preservadas según el modelo de conservación asignado a los 7, 14 y 28 días post congelación.

- Identificar la viabilidad *in vitro* de las plaquetas dentro del lapso de tiempo antes mencionado, en función del modelo de criopreservación asignado.
- Evaluar la funcionalidad de las plaquetas criopreservadas durante el periodo preestablecido en el estudio de acuerdo al modelo de conservación empleado.
- Identificar entre modelos de criopreservación propuestos en esta investigación, cual se relacionó con mayor sobrevivencia, viabilidad y funcionalidad de este hemocomponente.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1 Diseño

Se realizó un estudio prospectivo ciego (quienes evalúen viabilidad y funcionalidad de las plaquetas no sabrán los tiempos de criopreservación ni la concentración del criopreservante).

Se incluyeron alícuotas de plaquetas con grupo y factor A+, A-, B+, B-, AB+, AB-, O+ y O- obtenidas de aquellas personas que asistieron al centro de hemoterapia en calidad de donantes voluntarios y que a su vez manifestaron su decisión de participar de este protocolo mediante la firma de un consentimiento informado diseñado a tal fin.

Para formar parte del estudio, las muestras colectadas debieron cumplir además con la totalidad de los criterios de selección mencionados a continuación:

4.2 Criterios de inclusión

Fueron incluidos en este estudio, concentrados provenientes de donantes mayores de 18 años que cumplan con los requisitos establecidos por la ley 22990 para la donación de sangre y hemocomponentes, en quienes se pudo colectar un número de plaquetas mayor o igual a $3,3 \times 10^{11}$ en un volumen de 200 ml (equivalente a 1650×10^9 por litro).

4.3 Criterios de exclusión

Fueron excluidos de la investigación aquellos concentrados de plaquetas que presentaron alguna de las siguientes características:

Concentrados que no hayan cumplido la totalidad de estándares exigidos para su uso en seres humanos o que para el momento del estudio haya pasado más de 24 horas desde su obtención.

4.4 Clasificación de la muestra

Una vez seleccionados los participantes del estudio, el total de las plaquetas colectadas por cada uno de ellos fue obtenido tomando en cuenta la guía de procedimientos que se mencionará a continuación:

4.4a Procedimientos a realizar al grupo de donantes

El proceso de entrevista, toma de consentimiento informado y obtención de plaquetas para cada potencial donante estuvo a cargo de un colaborador de la investigación acreditado como técnico en hemoterapia.

Para el procedimiento debió contar previamente con todos los elementos de protección personal (EPP) estipulados por la institución para la obtención y manipulación de hemocomponentes. A todos los donantes le fueron realizados los siguientes exámenes serológicos y de laboratorio:

- Serología para HIV (anticuerpos para HIV 1 y 2, Antígeno p24)
- Antígeno de superficie y anticore para Hepatitis B
- Anticuerpos totales para Hepatitis C
- VDRL
- Serología para HTLV I/II por ELISA
- Serología para Chagas por hemaglutinación y ELISA
- Serología para Brucelosis IGG e IGM por ELISA

También se realizó determinación de grupo y factor.

La obtención de plaquetas se realizó mediante aféresis usando el separador de células Trima ACCEL, versión 7,0 marca TERUMO BCT.

Se obtuvo un total mínimo de plaquetas de $3,3 \times 10^{11}$ en un volumen de 200 ml, (o su equivalente $1650 \times 10^9/L$) para cada donante.

El ingreso y egreso del producto se realizó según el protocolo de colecta y transfusión de hemocomponentes del Hospital Británico de Buenos Aires disponible en sistema informático y será consignado en la historia clínica del hospital.

De cada bolsa, se tomaron 3 ml los cuales serán almacenados en criotubos de plástico estériles una vez les sea añadida la solución criopreservante. Dichas alícuotas serán distribuidas de manera aleatoria en cada uno de los 4 grupos descritos a continuación:

I. Grupo 1 (S1)

Estuvo conformado por alícuotas de 3 ml cada una, a los cuales se agregó una solución compuesta por: 0.4 ml de albúmina al 20% marca UNC y 0,6 ml obtenidos de la siguiente mezcla (1,4 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% y 4 ml de Dextrosa al 5%). Posteriormente se sometieron a congelación rápida a -80°C .

II. Grupo 2 (S2)

Estuvo conformado por alícuotas de 3 ml cada una, a los cuales se agregó una solución compuesta por: 1ml obtenido de la siguiente mezcla (0.8 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) al

100% y 4 ml de cloruro de sodio al 0,9%). Posteriormente fueron sometidos a congelación rápida a -80°C.

III. Grupo 3 (S3)

Estuvo conformado por alícuotas de 3 ml cada una, a las cuales se agregó una solución compuesta por: 1ml obtenido de la siguiente mezcla (0.8 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% y 4 ml de Dextrosa al 5%). Posteriormente fueron sometidos a congelación rápida a -80°C.

Para todos los grupos anteriores una vez sometidos a congelación, se seleccionaron al azar tres alícuotas de plaquetas de cada grupo para ser descongeladas y analizadas a los 7, 15 y 28 días respectivamente.

Se usó como referente para la comparación de resultados un grupo de alícuotas de 3ml cada una, conservados a 22°C bajo agitación constante durante 5 días denominado ahora **(Grupo Control)**

4.4b Técnica para la descongelación de las plaquetas criopreservadas

1. Retirar del congelador la alícuota criopreservada.
2. Introducir el concentrado criopreservado en un baño térmico a 37 °C durante 15 minutos.
3. Una vez descongeladas el tiempo máximo estipulado para su utilización en las evaluaciones de viabilidad y funcionalidad fue de 1 hora.

4.5 Instrumentos de medición

I. Sobrevida y Viabilidad

Se evaluó mediante el recuento plaquetario efectuado por cámara de Neubauer, procesando 50 microlitros de cada muestra de plaquetas en dilución de 1/100 con solución fisiológica; dicho recuento fue corroborado además mediante un contador hematológico automático (Sysmex XN-550 Toa Medical) (Figura 10).

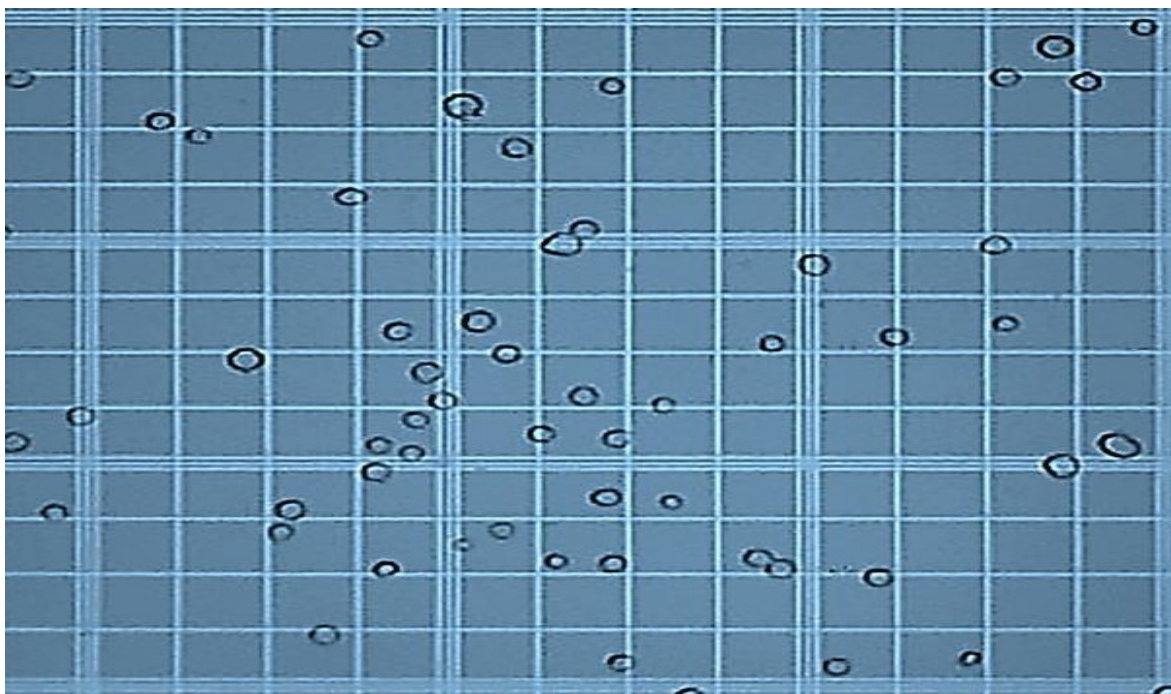


Figura 10: Vista de plaquetas distribuidas en una cámara de Neubauer (cortesía autor)

También se tomaron en cuenta la medición del pH de las plaquetas criopreservadas luego de ser descongeladas (valores esperables entre 6,4 y 7,4) y la inmunofenotipificación de las plaquetas mediante citometría de flujo (CMF) de 8 colores FACS-Canto II marca Becton Dickinson Pharmingen, utilizando anticuerpos fluorescentes murinos conjugados CD41 mouse-anti human (Gp IIb) ID3674 y CD61 mouse-anti human (GP IIIa) ID 3690

fluoresceína 5 isotiocianato (FITC) marca Becton Dickinson Pharmingen™, así como CD42a mouse-anti human (Gp IX) picoeritrina (PE) V IP-34 marca Becton Dickinson Pharmingen™.

III. Funcionalidad

Se evaluó a partir de la inmunofenotipificación de las plaquetas mediante citometría de flujo (CMF) utilizando anticuerpos fluorescentes CD41, CD42a y CD62P mouse-anti human (P-Selectina) ID 6403 fluoresceína 5 isotiocianato (FITC) marca Becton Dickinson Pharmingen™.

Estimulación con ADP: Se utilizó como medio de reacción un Tampón regulador Hepes (Tampón Hepes-Mg): Hepes 10 mM, NaCl 145 mM, KCl 1 mM, MgSO 4 1 mM, pH 7.4 La estimulación se realizó con ADP Reagent (Helena Laboratories Beaumont) liofilizado que se reconstituyó con agua destilada para lograr una solución de 1 mM.

Agregación plaquetaria: Se evaluó a partir del porcentaje de agregación obtenido tras la estimulación del producto conservado con trombina según la siguiente metodología: se lavaron 500 µL de cada alícuota de plaquetas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de pH 7,4 hasta una concentración de 1: 10 se obtuvo y se estimuló con trombina bovina 1 nM. La lectura se realizó utilizando un agregador de plaquetas Chromo-Log modelo 490 a una densidad óptica de 620 nm.

Tanto el análisis de viabilidad como la funcionalidad del producto criopreservado fue llevado en el laboratorio de análisis bioquímico del hospital Carlos G. Durand de la ciudad autónoma de Buenos Aires a donde fueron transportadas las muestras siguiendo las normas de bioseguridad estipuladas para el transporte de material biológico estipuladas en el “Manual

de Calidad y Procedimientos para el Transporte de Muestras Biológicas para Diagnóstico” del ministerio de salud.

4.6 Variables en la investigación

Las variables evaluadas en el presente trabajo de investigación fueron:

- Recuento de plaquetas obtenidas previo a la congelación
- Recuento de plaquetas obtenidas post congelación
- Funcionalidad de las plaquetas obtenidas post congelación
- Edad y sexo de los donantes
- Fecha en que se realizó la obtención de plaquetas de los donantes

4.7 Análisis estadístico

Los datos se almacenaron en una base de datos Excel 2018 (la cual quedara almacenada en un ordenador del hospital) y fueron analizados mediante el programa estadístico R-studio o Graph pad 7.01.

Para el análisis de las variables categóricas se usaron frecuencias absolutas y porcentajes mientras que para las variables numéricas se emplearon medidas de tendencia central y su dispersión.

Las variables continuas fueron expresadas como mediana e intervalos intercuartiles y las variables cualitativas serán expresadas en porcentaje. Se determinaron las diferencias entre

los grupos de solución criopreservante utilizando ANOVA y test de comparaciones múltiples.

4.8 Análisis de factibilidad del estudio

4.8a Factibilidad operativa

Durante la realización del procedimiento para la obtención de plaquetas del donante, descrito previamente en la sección “clasificación de la muestra” se deben tener en cuenta además los lineamientos de seguridad propuestos para este tipo de procedimientos, realizados en forma rutinaria dentro de las instalaciones del hospital.

Lineamientos de seguridad para el donante de plaquetas:

Efectos adversos (EA) asociados al procedimiento (aféresis): Los efectos adversos durante el procedimiento incluían:

- Sangrado o hematoma en el sitio de colocación del catéter venoso periférico
- Hipotensión arterial transitoria
- Hipocalcemia con manifestaciones clínicas asociadas (parestias en extremidades, cara o labios)

Procedimientos considerados para la prevención y manejo de EA asociados a la aféresis

Se realizó fijación del sitio de colocación del catéter venoso con parche adhesivo para evitar su desplazamiento. Una vez finalizado el procedimiento se realizó compresión local sobre el área de punción y posterior cubrimiento del sitio con gasa y adhesivo antialérgico el cual se mantuvo durante al menos 60 minutos contados a partir del momento de colocación.

En caso de hipotensión arterial asociada a síntomas clínicos (mareo persistente, cefalea, astenia), la conducta a seguir era la suspensión del procedimiento y dar aviso al médico encargado del sector quien evaluaría la situación para definir la continuidad del procedimiento o su finalización.

En caso de hipocalcemia sintomática, se consideró la administración de gluconato de calcio al 10% 10 ml endovenoso y así como la reducción de la velocidad del procedimiento de aféresis.

4.8b Factibilidad ética y legal

Para el presente trabajo no se realizaron procedimientos fuera de los ya establecidos para la práctica de aféresis plaquetaria según el protocolo del hospital Británico de Buenos Aires.

Por otra parte, el presente protocolo fue evaluado y aprobado por el comité científico y de revisión institucional quien estará a cargo de supervisar el cumplimiento del mismo, así como de garantizar que bajo ninguna circunstancia se incurra en la violación de la normativa internacional propuesta para la investigación empleando muestras biológicas. También se garantizó la protección de datos a cada una de las personas que participaron del estudio.

La investigación se encuentra inscrita en el registro de ensayos clínicos de la biblioteca nacional de medicina de los Estados Unidos (<https://www.clinicaltrials.gov>) bajo el código de identificación: NCT04754841.

Capítulo 5

Resultados

Durante el periodo comprendido entre Agosto de 2021 y Enero de 2022 fueron reclutados 84 donantes escogidos al azar en forma aleatorizada.

Un total de 72 cumplieron con los criterios de inclusión para entrar en el estudio, 79% correspondieron a donantes masculinos con una edad media de $31,6 \pm 12$ años y el 21% restante correspondió a donantes de sexo femenino con edad media de 52 ± 2 años (Figura 11); por cada uno de los concentrados obtenidos se extrajo una alícuota siguiendo el procedimiento indicado en la sección “materiales y métodos”.

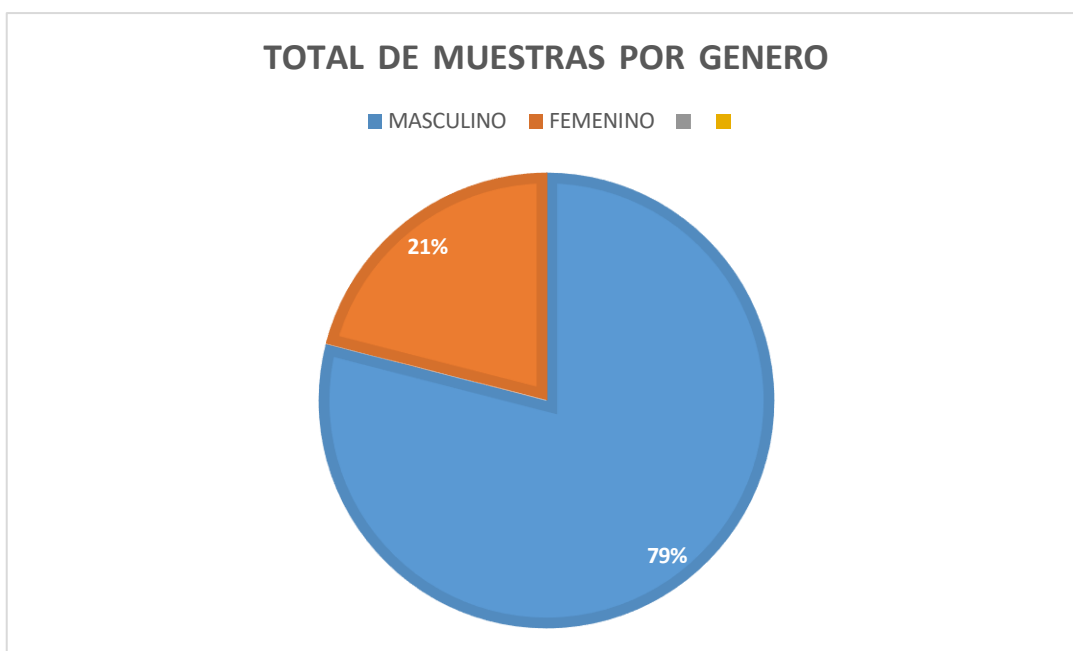


Figura 11: Clasificación de las muestras por género de los donantes

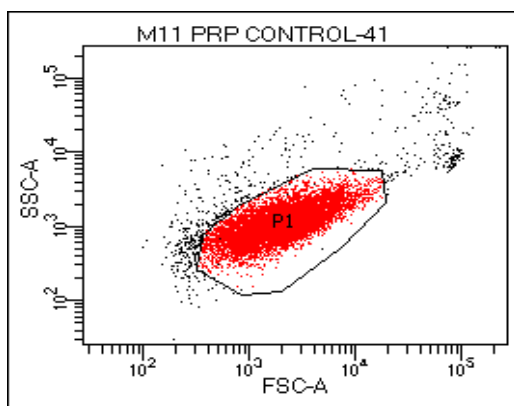
18 alícuotas fueron asignadas al grupo control; el recuento plaquetario medio fue de $1934 \pm 0,5 \times 10^9$ /L con una viabilidad de 100%, así mismo la totalidad de ellas presentaron pH de 7.0 y volumen plaquetario medio de $11 \pm 0,1$ fl.

El 99% de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 con inmunofluorescencia (IFM) media de 5148, mientras el 98.5% marcaron para CD61 (IFM media 3750) y 96,5% (IFM media 9857) para CD42 (Figura 12).

Respecto al análisis de marcación con P-Selectina (CD62P) el 3,4% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM 65); luego de ser estimuladas con ADP dicho porcentaje aumentó a 50,1% (IFM media 348). El porcentaje de agregación fue del 99%, iniciando su actividad 30 s después de ser estimulado con trombina.

El resto de alícuotas recolectadas fueron separadas en conjuntos de 18 unidades y asignadas a los grupos 1, 2 y 3 cuyo análisis en el tiempo se describe a continuación (Tabla 2).

A



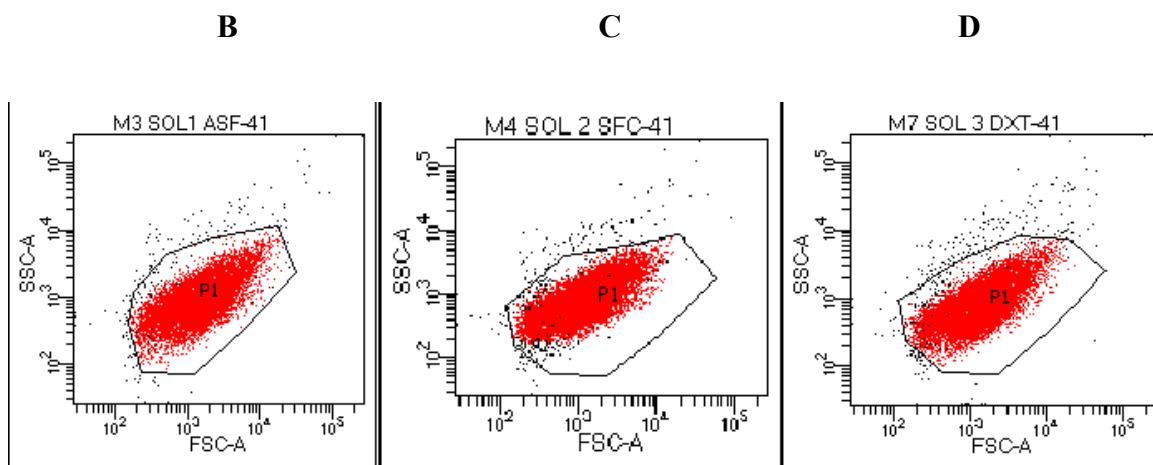


Figura 12: Identificación de plaquetas por citometría de flujo (CMF): Para ello se tomaron como ejemplos la identificación realizada a las plaquetas del grupo control (A) así como a los grupos 1 2 y 3 (B, C YD) al día 7 post congelación.

5.1 Evaluación al día 7 post congelación

Fueron analizadas 18 alícuotas de las cuales 33.3% (6) pertenecían al grupo 1, 33,3% al grupo 2 y 33,3% al grupo 3 respectivamente.

En el grupo 1 el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fue de $1844,3 \pm 102 \times 10^9 /L$; todas las alícuotas evaluadas reportaron un pH de 7.0, viabilidad del 98% y el VPM fue de $12,4 \pm 1,4$ fl.

El 97,3 % de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media de 5393), el 96,7% marcaron para CD61 (IFM media 4017) y 93,2% para CD42 (IFM media 14821). En el análisis de marcación con P-Selectina (CD62P) el 8,2% de las plaquetas en reposo

reportaron marcación positiva (IFM media 156); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 7,4% (IFM media 156).

El porcentaje de agregación fue del 90%, iniciando su actividad 3 segundos después de ser estimuladas con trombina.

Para el grupo 2 el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fue de $1856 \pm 76 \times 10^9 /L$; todas las alícuotas evaluadas reportaron un pH de 7.0 y viabilidad del 96% mientras que el VPM fue de $15 \pm 0,1$ fl.

El 98,4 % de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 5482), por su parte el 97,2% marcaron para CD61 (IFM media 4026) y 91% para CD42 (IFM media 15538). En el análisis de marcación con P-Selectina el 3,5% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM media 109); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 3,7% (IFM media 109).

El porcentaje de agregación fue del 98%, iniciando su actividad 2 segundos después de ser estimuladas con trombina.

Respecto al grupo 3, el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fué de $1752 \pm 226 \times 10^9 /L$; todas las alícuotas evaluadas reportaron un pH de 7.0, viabilidad de 95% y el VPM fue de $13,6 \pm 0,3$ fl.

El 98 % de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 5479), el 98,3% marcaron para CD61 (IFM media 3788) y 92,1% para CD42 (IFM media 15870). En el análisis de marcación con P-Selectina el 11,2% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM media 140); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 9,8% (IFM media 140).

El porcentaje de agregación fue del 89%, iniciando su actividad 2 segundos después de ser estimuladas con trombina. (Figura 13).

5.2 Evaluación al día 14 post congelación

Fueron analizadas 18 alícuotas, distribuidas en partes iguales entre los grupos 1 al 3.

En el grupo 1 el recuento plaquetario media luego de ser descongeladas fué de $1722 \pm 238 \times 10^9 /L$; el pH promedio fue reportado en $7.0 \pm 0,1$ con una viabilidad de 96%; así mismo el VPM fue de $12 \pm 1,3$ fl.

El 98,2% de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 4000), el 98,3% marcaron para CD61 (IFM media 2896) y 96% para CD42 (IFM media 10912). En el análisis de marcación con P-Selectina el 4,1% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM media 61); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 5% (IFM media 76).

El porcentaje de agregación fue del 88%, iniciando su actividad 3 segundos después de ser estimulado con trombina.

Para el grupo 2 el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fué de $1649 \pm 215 \times 10^9 /L$; el pH promedio fue reportado en $7.0 \pm 0,1$ con una viabilidad del 95%, mientras que el VPM fue de $15 \pm 0,1$ fl.

El 98,3 % de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 5886), por su parte el 98,1% marcaron para CD61 (IFM media 4285) y 92.4% para CD42 (IFM media 17889). En el análisis de marcación con P-Selectina el 3,5% de las plaquetas en reposo

reportaron marcación positiva (IFM media 118); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 3,8% (IFM media 131).

El porcentaje de agregación fue del 98%, iniciando su actividad 3 segundos después de ser estimulado con trombina.

Respecto al grupo 3, el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fue de $1578 \pm 223 \times 10^9 /L$; todas las alícuotas evaluadas reportaron un pH de 7.0 y una viabilidad de 94%; así mismo el VPM fue de $12,9 \pm 0,1$ fl.

El 94,7% de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 5752), el 94,3% marcaron para CD61 (IFM media 4177) y 91,4% para CD42 (IFM media 15352). En el análisis de marcación con P-Selectina el 4,2% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM media 113); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 4,8% (IFM media 125).

El porcentaje de agregación fue del 87%, iniciando su actividad 3 segundos después de ser estimulado con trombina. (Figura 13).

5.3 Evaluación al día 28 post congelación

Fueron analizadas 18 alícuotas, distribuidas en partes iguales entre los grupos 1 al 3.

En el grupo 1 el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fue de $1602 \pm 374 \times 10^9 /L$; el pH promedio fue reportado en $7.0 \pm 0,1$ con una viabilidad del 96% y el VPM fue de $13,9 \pm 0,05$ fl.

El 94,8 % de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 4971), el 95% marcaron para CD61 (IFM media 3802) y 88,3% para CD42 (IFM media 15982). En el análisis de marcación con P-Selectina el 3,2% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM media 111); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 3,3% (IFM media 124).

El porcentaje de agregación fue del 84%, iniciando su actividad 3 segundos después de ser estimulado con trombina.

Para el grupo 2 el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fue de $1438,6 \pm 429 \times 10^9 /L$; el pH promedio fue reportado en $7.0 \pm 0,1$ con una viabilidad de 94%, mientras que el VPM fue de $15 \pm 0,05$ fl.

El 94,1 % de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 5429), por su parte el 94,6% marcaron para CD61 (IFM media 3746) y 92% para CD42 (IFM media 16513). En el análisis de marcación con P-Selectina el 2,9% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM media 120); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 3% (IFM media 126).

El porcentaje de agregación fue del 95%, iniciando su actividad 3 segundos después de ser estimulado con trombina.

Respecto al grupo 3, el recuento plaquetario medio luego de ser descongeladas fue de $1406,6 \pm 436 \times 10^9 /L$; el pH promedio fue reportado en $7.0 \pm 0,1$ con viabilidad del 93% y el VPM fue de $13,9 \pm 0,05$ fl.

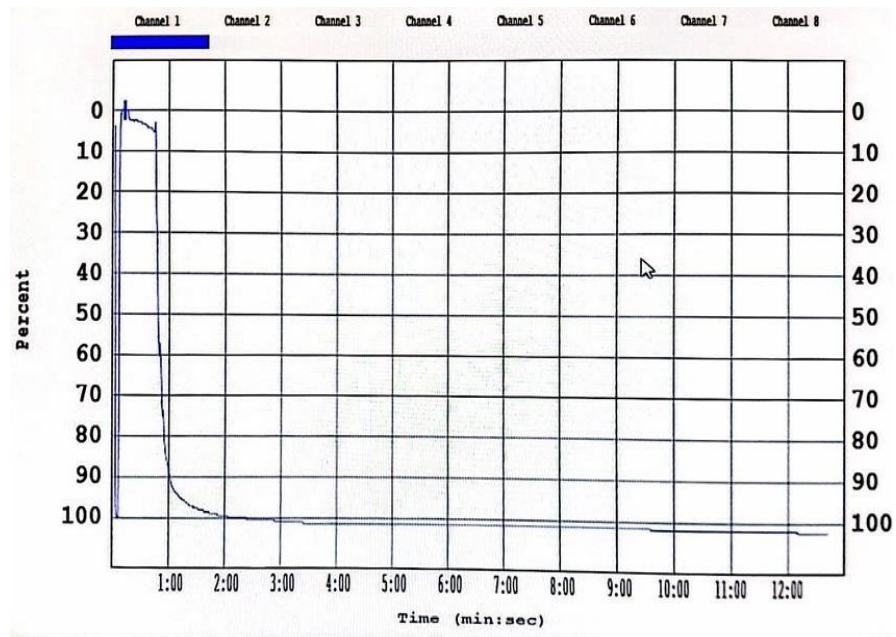
El 94 % de las plaquetas analizadas marcaron positivo para CD41 (IFM media 5103), el 92,5% marcaron para CD61 (IFM media 3605) y 98,1% para CD42 (IFM media 15374). En el análisis de marcación con P-Selectina el 1,8% de las plaquetas en reposo reportaron marcación positiva (IFM media 107); luego de ser estimuladas con ADP el porcentaje fue 2% (IFM media 113).

El porcentaje de agregación fue del 95%, iniciando su actividad 3 segundos después de ser estimulado con trombina. (Figura 13).

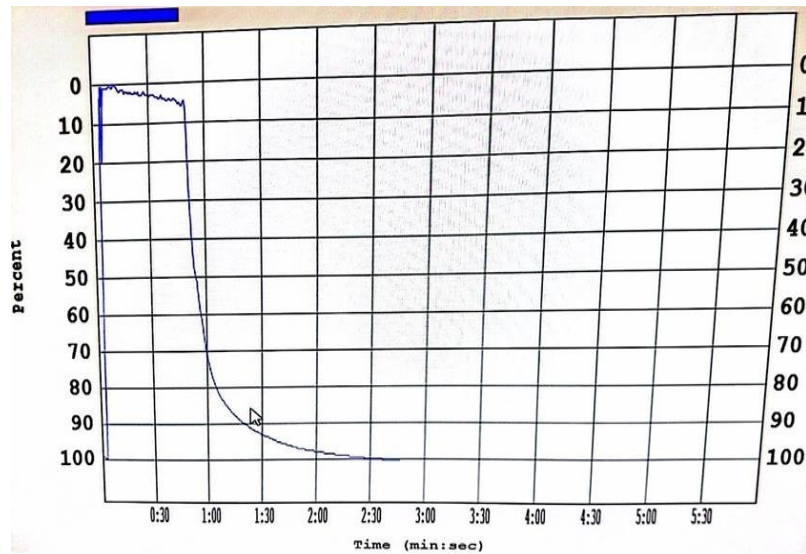
GR	RCTO PLAQUETAS 10 ⁹ /L	VIABILIDAD (%)	CD41 (%)	CD61 (%)	CD42a (%)	AGREGACION (%)
	Día 7 Post- Congelación					
S 1	1844 ± 102	98.0	97.3	96.7	93.2	90.0
S 2	1856 ± 76	95.0	98.4	97.2	91.0	98.0
S 3	1752 ± 226	94.0	98.0	98.3	92.1	89.0
	Día 14 Post- Congelación					
S 1	1722 ± 238	96.0	98.2	98.3	96.0	88.0
S 2	1649 ± 215	95.0	98.3	98.1	92.4	98.0
S 3	1578 ± 223	94.0	94.7	94.3	91.4	87.0
	Día 28 Post- Congelación					
S 1	1602 ± 374	96.0	95.0	94.8	88.0	84.0
S 2	1438,6 ± 429	94.0	94.0	95.0	91.8	95.0
S 3	1406,6 ± 436	93.0	94.0	92.0	97.8	82.0

Tabla 2: Recuento de plaquetas, niveles de marcación para antígenos de membrana y viabilidad en las plaquetas criopreservadas (Grupos S1, S2 y S3).

MUESTRA GRUPO S1



MUESTRA GRUPO S2



MUESTRA GRUPO S3

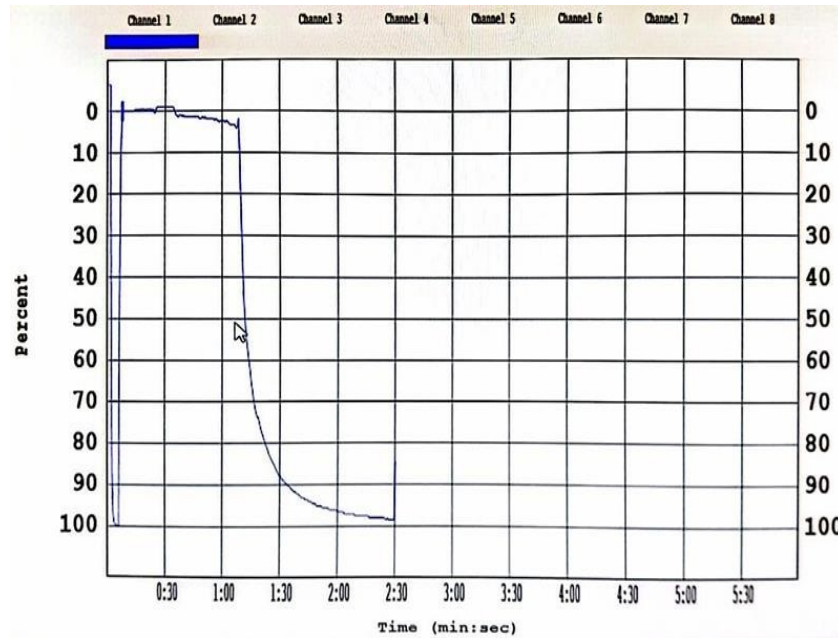


Figura13. Gráfico representativo de la agregación plaquetaria obtenida en el análisis individual de muestras de los grupos S1,S2 y S3.

5.4 Análisis comparativo de grupos

Al emplear el test de comparaciones múltiples de Dunn's con intervalo de confianza de 95%, no se reportó diferencia estadísticamente significativa en el recuento plaquetario medio del grupo control y el obtenido al día 7 post congelación en los grupos 1, 2 y 3 (Figura 14); así mismo no se obtuvieron diferencias significativas al comparar internamente los valores informados por estos últimos grupos.

Los resultados del recuento plaquetario obtenido en los días 15 y 28 post congelación, mantuvieron una tendencia similar a la reportada en el día 7, no evidenciando diferencias significativas frente al grupo control ni en la comparación entre grupos (Figura 15A y B).

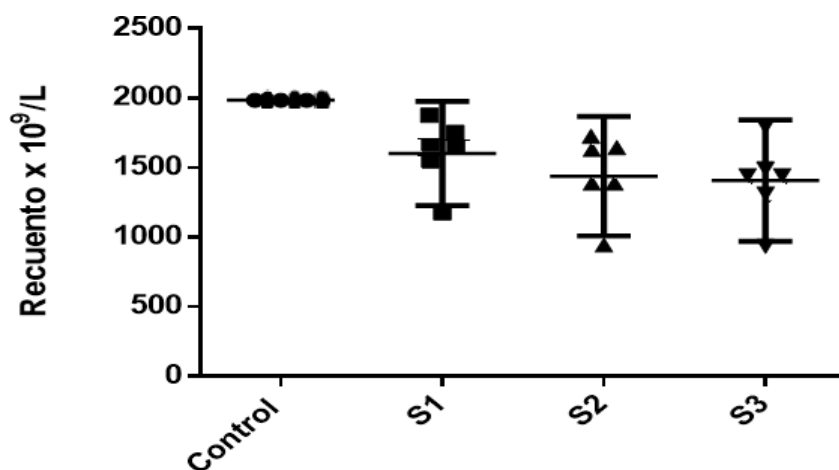


Figura 14: Recuento plaquetario al día 7 post congelación

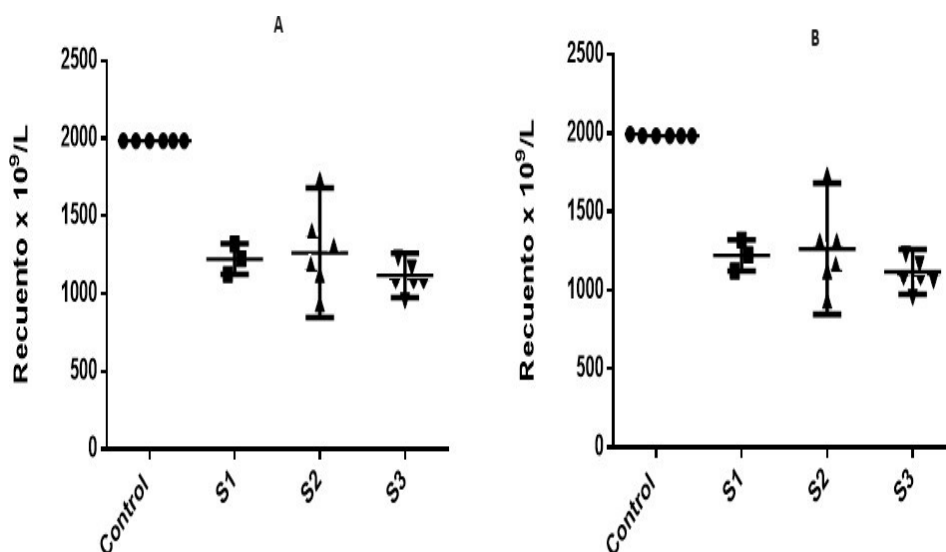


Figura 15: Recuento plaquetario al día 15 (A) y 28(B) post congelación

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la marcación con CD41, CD61 y CD42 entre el grupo control y el grupo 1 al día 7 post congelación (IC 95% test de Dunn's), sin embargo, al comparar las mismas variables con el grupo 2, se reportó una diferencia significativa de 5,4% en el porcentaje de marcación para CD42 ($p < 0,05$).

En el grupo 3, la diferencia entre el porcentaje de marcación para CD42a con respecto al grupo control fue de 4,2%, siendo esta significativamente estadística ($p < 0,05$) (Figura 16).

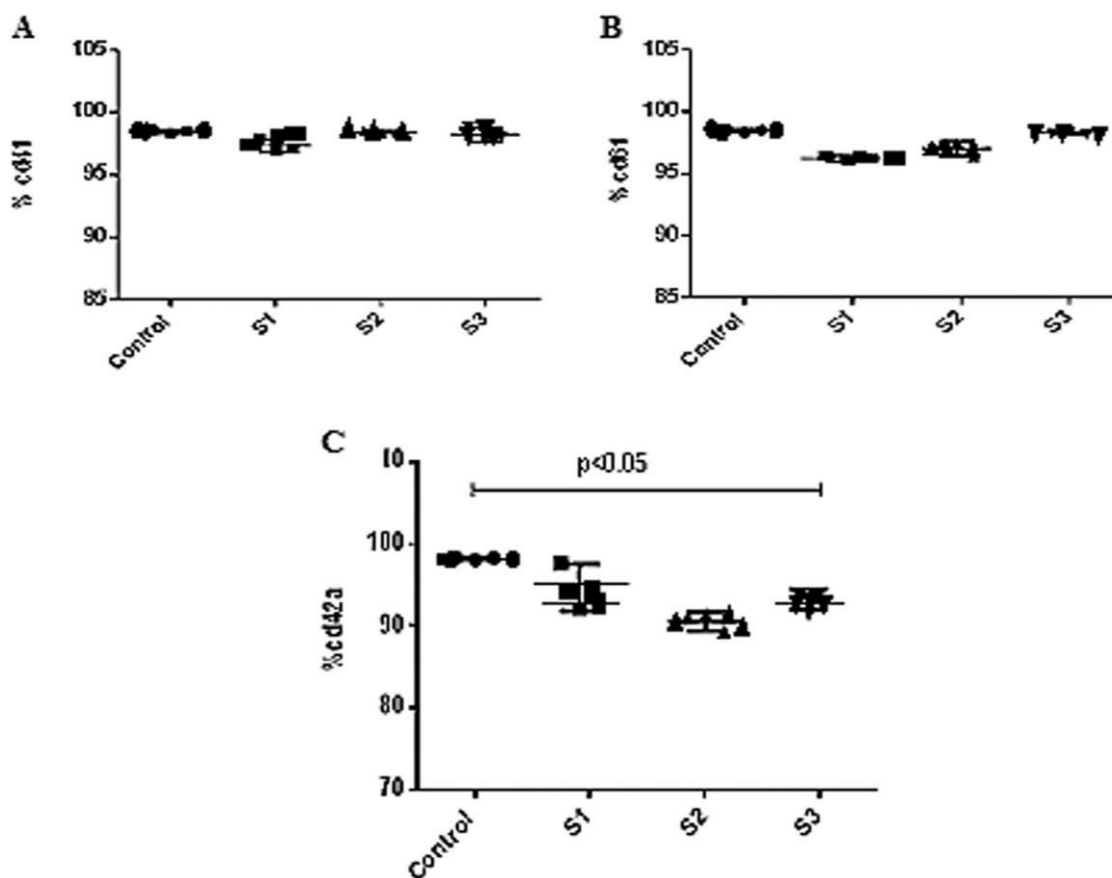


Figura 16: Porcentaje de marcación para antígenos de la membrana plaquetaria CD41 (A), CD61 (B) y CD42a (C) al día 7 post congelación.

Al día 14 post congelación se reportaron diferencias significativas entre el porcentaje de marcación para CD41 y CD61 del grupo 3 con respecto al grupo control fue de 3,1% ($p < 0,05$), así mismo hubo significancia estadística en la diferencia de porcentajes para la marcación CD42a de los grupos 2 y 3 con respecto al grupo control (3,9 y 4,9% con $p < 0,05$); dicha diferencia se evidenció también frente a los valores obtenidos en el grupo 1 (2,1 y 3,1% con $p < 0,05$). Referente al porcentaje de marcación para CD41 y CD61 no se reportaron diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 (Figura 17).

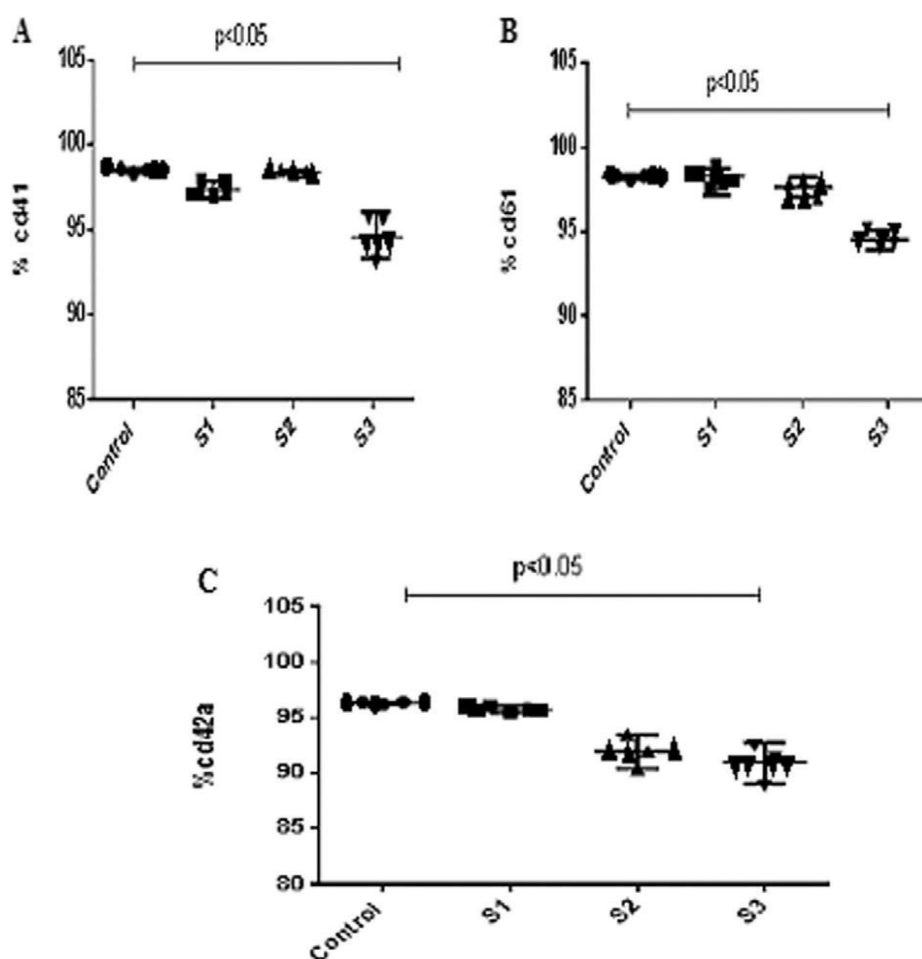


Figura17: Porcentaje de marcación para antígenos de la membrana plaquetaria CD41 (A), CD61 (B) y CD42a (C) al día 14 post congelación.

En el día 21 post congelación los porcentajes de marcación reportaron diferencias significativas para los 3 grupos en comparación al grupo control.

Respecto al grupo 1, la diferencia fue de 3,6% ($p < 0,001$) en la marcación CD41, 2,9% ($p 0,02$) en la marcación CD61 y 8% ($p 0,02$) en la marcación CD42. En el grupo 2 la diferencia fue de 4,3% ($p < 0,001$) en la marcación CD41 y 3,6% ($p < 0,05$) en la marcación CD61; no se reportó una diferencia significativa en el porcentaje de marcación CD42 frente a los controles.

Finalmente, el grupo 3 reportó una diferencia con el grupo control de 4,4% ($p < 0,001$) en la marcación CD41 y 5,7% ($p 0,02$) en la marcación CD61 sin diferencia significativa en la marcación CD42 (Figura 18).

Al comparar los grupos 1, 2 y 3 se obtuvieron diferencias significativamente estadísticas en el porcentaje de marcación para CD61 entre el grupo 1 y el 3 (2,8%; valor de $p 0,02$), así como en el porcentaje de marcación para CD42 entre el grupo 3 y el 1 (9,8%; valor de $p 0,02$).

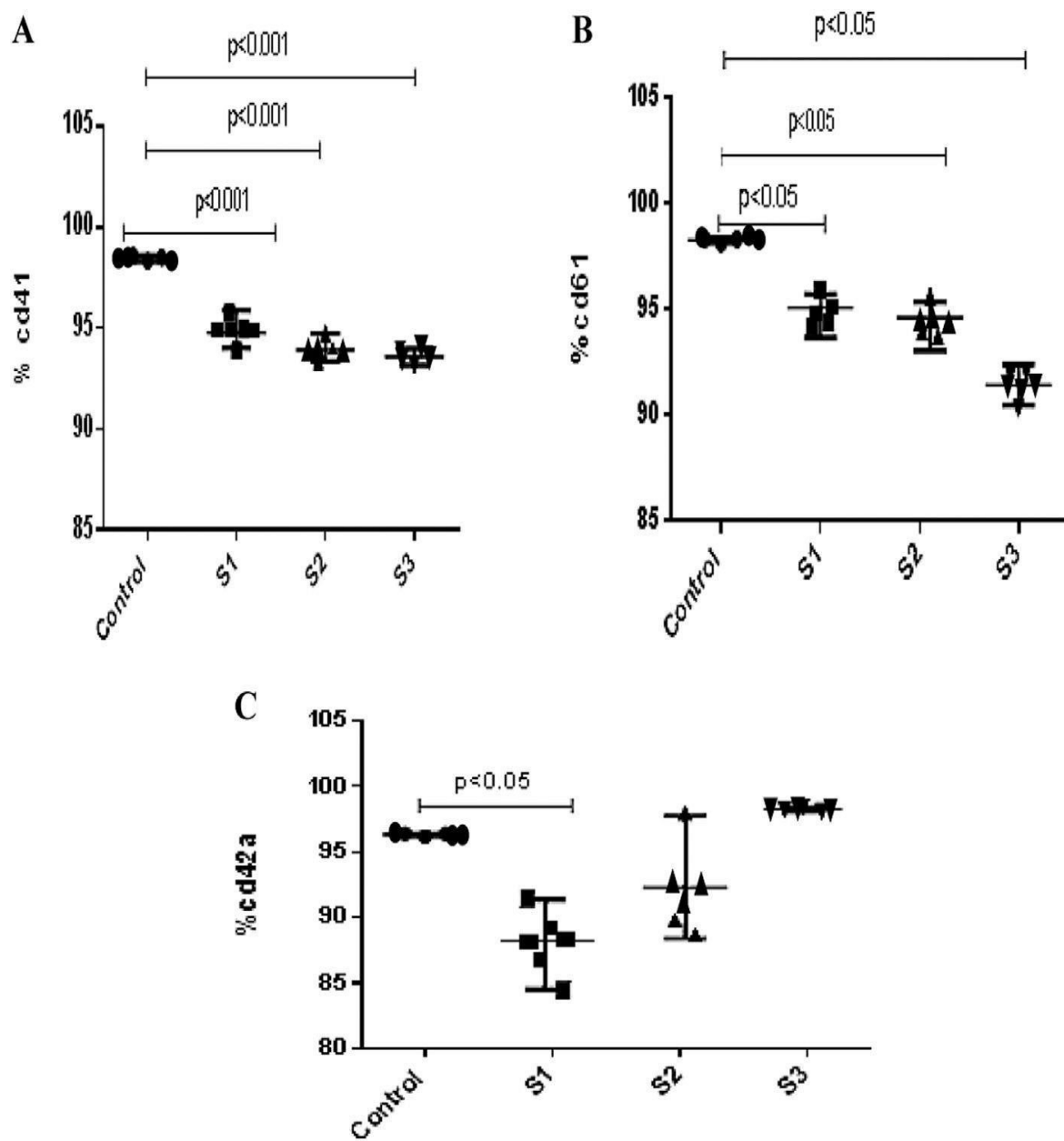


Figura 18: Porcentaje de marcación para antígenos de la membrana plaquetaria CD41 (A), CD61 (B) y CD42a (C) al día 28 post congelación.

Capítulo 6

Discusión

Desde la realización de los primeros estudios enfocados en investigar la viabilidad de las plaquetas criopreservadas, se han publicado varios trabajos en los cuales se hace una descripción de los diferentes cambios que desde el punto de vista morfológico y fisiológico caracterizan a las plaquetas sometidas a congelación.

Trabajos como el de Six y colaboradores en 2020 han podido determinar que, en su mayoría, las plaquetas criopreservadas presentan aumento del volumen plaquetario medio, algo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio ya que se pudo notar como en las plaquetas criopreservadas, el VPM para los grupos 1, 2 y 3 era mayor en comparación al grupo control durante las 3 fases de tiempo analizadas⁶⁰.

Otra particularidad de las plaquetas congeladas es que al ser evaluadas mediante microscopía electrónica evidencian irregularidad de la superficie de membrana y aumento en el número de pseudópodos. Estos cambios de forma podrían explicar la poca refractariedad a la luz de los concentrados criopreservados, lo que determina una significativa disminución e incluso ausencia del fenómeno conocido como remolino o “Swirling”^{61,62}.

Entre los principales receptores de membrana expresados por las plaquetas se encuentra la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Gp IIb/IIIa), pudiéndose determinar su presencia mediante el uso de los anticuerpos CD41 y CD61; dicho receptor tiene un destacado papel durante las etapas iniciales de la activación de las plaquetas mediado por la acción del fibrinógeno sobre este⁶³.

Los resultados del estudio reportaron que durante el día 7 y 14 post congelación, las plaquetas pertenecientes a los grupos 1 y 2 presentaron porcentajes de ambos anticuerpos en una proporción similar a la expresada por las plaquetas frescas; sin embargo, se evidenció una disminución significativa de la marcación el día 28 post congelación con respecto al grupo control. Aun así, tales valores mantuvieron valores superiores al 50% total (tomando como referencia los porcentajes obtenidos por el grupo control).

En el caso de las plaquetas pertenecientes al grupo 3 la disminución en el porcentaje de marcación de CD41 y CD61 se hace notoria desde el día 14 post congelación en adelante, sin embargo, al igual que lo sucedido con los grupos 1 y 2 tales porcentajes se mantienen por encima del 50%.

Respecto a los cambios relacionados al citoplasma, la criopreservación desencadena aumento en la expulsión hacia el exterior del contenido granular siendo la P-selectina uno de los fosfolípidos de mayor expresión; al analizar los resultados de investigaciones previas aportados por Kelly (2018), Waters (2018) y Eker (2017), se deja ver que las plaquetas criopreservadas una vez descongeladas se encuentran en un estado basal de preactivación sin llegar a la apoptosis, reportando porcentajes de P selectina entre 40% y 70% lo que permite explicar que luego del proceso de preservación, puedan conservar aún sus propiedades hemostáticas^{60,63,64}.

Esta última afirmación ha sido avalada por varios estudios, citando entre los principales el realizado por Khuri y colaboradores en una serie de 53 pacientes sometidos a cirugía de bypass cardiaco de los cuales 29 recibieron transfusión de plaquetas frescas y 24 recibieron transfusión de plaquetas criopreservadas, reportando en este último grupo una superioridad significativa en cuanto sus propiedades hemostáticas demostrado en el volumen total de pérdidas hemáticas post cirugía (2329 ml, vs 1830 ml , $P = .0089$)⁶⁵.

En los resultados aportados por este estudio se observó que al día 7 y 14 post congelación, los niveles de P-selectina (CD62P) presentaron ligeramente una mayor expresión en los 3 grupos que contenían plaquetas criopreservadas en comparación con las plaquetas frescas lo que podría sugerir que presentan un estado de “basal procoagulante” sin embargo ninguno de estos valores presentó alguna diferencia estadísticamente significativa.

Una de las razones para entender porque estos resultados difieren de forma importante con los reportados en la literatura corresponde a que una parte de la P-selectina detectada e informada por los diferentes trabajos corresponde a la zona definida como “micropartículas”, dicha afirmación se sustenta en los hallazgos publicados por Barnard y colaboradores (1999) y Tegegn (2016), quienes explican que dichas partículas, cuyo origen se debe al fenómeno de fosforilación y reorganización del citoesqueleto y la membrana celular ocurrido en las plaquetas congeladas, tienen la capacidad de expresar P-selectina y Gp 53 (CD63) las cuales están relacionadas con la activación y el rol hemostático de las plaquetas^{5,66}.

Johnson y colaboradores en 2015 reportaron que las micropartículas tienen la capacidad de expresar inclusive otras glicoproteínas plaquetarias funcionales como GPIIb (CD41), GPIIIa (CD61) y GPIX (CD42a), así mismo quedo demostrada su capacidad para acelerar *in vitro* la formación de coágulos⁶⁷.

Tomando en cuenta que la identificación y estudio de micropartículas a través de los recursos disponibles, en este caso el programa empleado para la interpretación de datos obtenidos por citometría de flujo (FACSDiva, software) no pudo ser realizado, podría constituir una limitación dentro de la presente investigación.

Otra razón para explicar los resultados obtenidos en este trabajo respecto al porcentaje de marcación para CD62P, puede encontrarse en el trabajo publicado por Dumont y colaboradores (1999) en el cuál realizaron un estudio para comparar la variabilidad en el porcentaje de marcación de P-selectina en la superficie plaquetaria, entre 14 centros que participaron de la investigación; entre los resultados obtenidos se evidenció que dicha variabilidad comprendía porcentajes heterogéneos y significativamente diferentes en el rango de 4,2 a 77% los cuales podían atribuirse a características del anticuerpo CD62P (marca y tipo de fluorescencia: picroeritrina / fluoresceína), el tipo de citómetro de flujo empleado y la técnica usada para la preparación de las muestras antes de la medición⁶⁸.

Volviendo a los resultados de esta investigación, tras la estimulación con ADP los valores de CD62P no presentaron cambios significativos en las muestras criopreservadas, algo que si sucedió con las plaquetas del grupo control; Tynngård y colaboradores (2020) afirman que esto pudiera explicarse en parte por la disponibilidad reducida de ATP que tienen las plaquetas criopreservadas, algo que guardaría relación con una escasa respuesta a agonistas débiles como el ADP⁶⁹.

Por su parte Yilmas y colaboradores (2016) demostraron una mayor capacidad de respuesta por parte de las plaquetas congeladas a la prueba de agregación con trombina (Figura 19) lo que confirmaría que las plaquetas criopreservadas conservan su función hemostática luego de la descongelación⁷⁰.

Esto guarda estrecha relación con los datos reportados en la presente investigación, tomando en cuenta que durante los distintos periodos evaluados (7,14 y 21 días) el total de muestra evaluada dentro de los 3 grupos obtuvo porcentajes de agregación con trombina superiores al 50%; inclusive al caracterizar de forma más específica se evidenció que para los grupos 1 y 2 tales porcentajes de agregación correspondían a porcentajes superiores al 80% y en el caso de la solución 2 evidenció un porcentaje de agregación superior al 90% durante los distintos análisis realizados.

Inclusive, respecto de las plaquetas seleccionadas dentro del grupo 2 reportaron porcentajes de agregación similares al grupo control lo cual demostraría (por lo menos en esta investigación), que las plaquetas criopreservadas podrían reportar funcionalidades similares a las procesadas en la forma convencional.

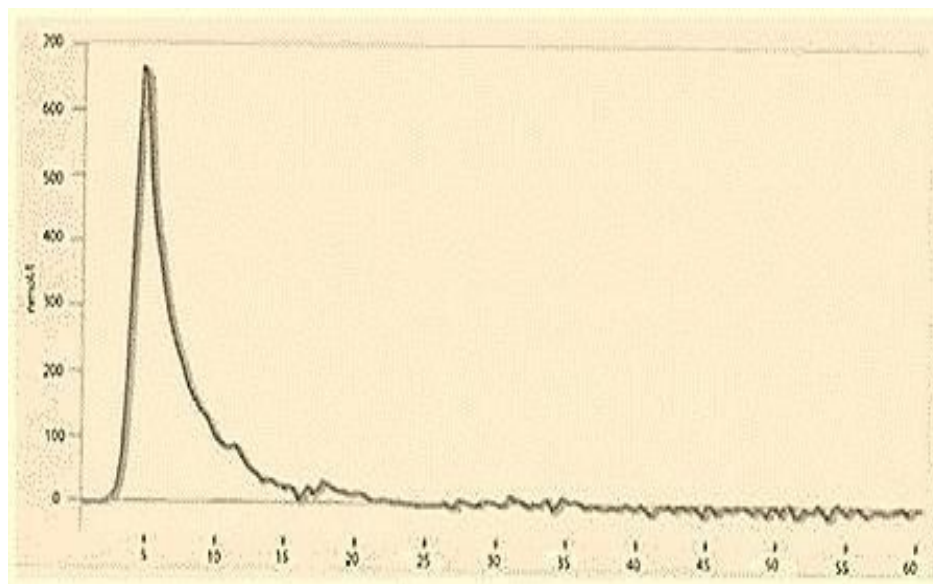


Figura 19: Resultados de la prueba de estimulación con trombina en concentrados de plaquetas criopreservadas. (Yılmaz S, Çetinkaya RA, Eker İ, et al., 2016)

El análisis de la determinación del complejo Gp Ib/IX/V en las muestras congeladas mediante la marcación de CD42a (Gp IX) mostró que para el grupo 1, los porcentajes de detección al día 7 y 14 post congelación eran similares a los obtenidos por el grupo control, situación que lo diferenció de los grupos 2 y 3 que presentaron una diferencia significativa en el porcentaje de marcación con respecto al grupo control al día 7 (grupo 2) y al día 14 post congelación (grupo 2 y 3).

Sin embargo, para el día 21 post congelación los 3 grupos habían reportado un descenso significativamente estadístico en los niveles de marcación en comparación a lo reportado por las plaquetas frescas.

El el trabajo publicado por Ouyang y colaboradores (2008), informa como el complejo GPIb/IX/V juega un papel clave en el proceso de adhesión plaquetaria mediada por la unión del FVW a este receptor; por tanto luego de la activación plaquetaria es esperable que su expresión se vea disminuida, esto llevaría a pensar que las plaquetas criopreservadas, al encontrarse “ basalmente activadas” manifiesten una tendencia a la disminución en la expresión del complejo similar al de las plaquetas frescas activadas.

Sin embargo, esta correlación no se lleva a cabo en la totalidad de los casos, lo cual se ve reflejado en los resultados donde muestra una heterogeneidad en los porcentajes de marcación para CD42 los cuales pueden encontrarse disminuidos o dentro de sus valores normales.⁷¹ Por tal motivo los resultados de esta investigación se encuentran en concordancia con lo reportado por estudios similares.

En relación al pH, se trata de uno de los parámetros usados para el control de calidad aplicado a las plaquetas procesadas en los centros de hemoterapia y banco de hemocomponentes; por ejemplo, su disminución está relacionada al aumento del ácido láctico ocasionado por la pérdida progresiva de glucógeno plaquetario generada durante su conservación en el tiempo.

Normalmente se consideran viables las unidades o concentrados de plaquetas cuyo valor de pH oscile entre 6,2 a $7,4 \pm 2$; la justificación de tales valores se sustenta en trabajos que informan la presencia de cambios en la forma de las plaquetas (de su característica forma discoide a una forma esférica) con valores de pH menores o iguales a 6.0, lo que se traduce en una importante reducción de su sobrevivencia.

Con respecto a los resultados de este trabajo la totalidad de las muestras, tanto de los grupos A, B y C como del grupo control presentaron valores de pH considerados como esperables para las plaquetas viables.

Muchos de los parámetros usados para evaluar la viabilidad en las plaquetas conservadas bajo la forma convencional son aplicables también a las plaquetas criopreservadas; algunos como el valor del pH y la presencia o no de swirling fueron descriptos al inicio de este apartado, sin embargo, existen otras variables a tener en cuenta como: la ausencia de contaminación bacteriana, temperatura de almacenamiento, y recuento de plaquetas obtenido en función del tiempo de conservación.

Respecto a esta última variable constituye otro dato importante comúnmente relacionado con la viabilidad de las plaquetas conservadas en un lapso de tiempo determinado, por lo que gran parte de los trabajos mencionados a lo largo de la discusión que abordan el estudio de la criopreservación plaquetaria, avalan la recuperación plaquetaria post congelación (representada en el recuento plaquetario obtenido) como parámetro para determinar tanto la sobrevida como el porcentaje de viabilidad de los elementos conservados.

De igual manera otro de los métodos ampliamente conocidos para corroborar la viabilidad de las plaquetas consiste en la confirmación del recuento esta vez por cámara de Neubauer, procedimiento que se llevó a cabo con cada una de las muestras procesadas en nuestra investigación y cuyos valores eran en definitiva concordantes con el recuento total de plaquetas reportado por el Coulter.

Al comparar los resultados obtenidos para cada periodo de tiempo evaluado se evidenció que al día 7 post congelación los grupos 1 y 2 mostraron la mayor recuperación de plaquetas post congelación, al presentar un recuento medio de $1842,3 \pm 104$ y $1859,6 \pm 77 \times 10^9 /L$ (equiparables al 95 y 96% del reportado en el grupo control), por otra parte ambos grupos mostraron los mayores porcentajes de marcación para CD41 (equivalentes al 93 y 94% de los obtenidos en el grupo control) mientras que el grupo 1 reportó los niveles de marcación más altos para CD61 y CD42 equivalentes al 92 y 89% de los obtenidos en las plaquetas frescas. Por otra parte, los niveles de CD62P presentaron su expresión más alta previo a la estimulación con ADP en las plaquetas de los grupos 1 y 3.

En el día 14 post congelación los grupos 1 y 2 mostraron la mayor recuperación de plaquetas post congelación, al presentar un recuento medio de $1722,2 \pm 239$ y $1649,2 \pm 216 \times 10^9 /L$ (equiparables al 89 y 85% del reportado en el grupo control), por su parte ambos grupos mostraron los mayores porcentajes de marcación para CD41 (equivalentes al 87 y 84% de los obtenidos en el grupo control), CD61 (equivalentes al 88 y 84% de los obtenidos en el grupo control) y CD42 (equivalentes al 86 y 80% de los obtenidos en el grupo control). Así mismo, los niveles de CD62P mantuvieron su expresión más alta previo a la estimulación con ADP en las plaquetas los grupos 1 y 3.

Finalmente, al día 28 post congelación, fue el grupo 1 quien presentó la mayor viabilidad obteniendo un recuento medio de plaquetas de $1602 \pm 374 \times 10^9 /L$ (equiparable al 83% del reportado en el grupo control), mientras que los porcentajes de marcación de CD41, CD61 y CD42 fueron equivalentes al 79, 79 y 73% de los obtenidos en plaquetas frescas. Por otro lado, los niveles de CD62P presentaron su expresión más alta previo a la estimulación con ADP en las plaquetas del grupo control y el grupo 1.

Los resultados descriptos anteriormente muestran que los 3 grupos evaluados mostraron tanto porcentajes de recuperación de plaquetas, así como de marcación para antígenos de membrana plaquetaria superiores al 50% tomando como referente los resultados obtenidos por el grupo control sin embargo llamaron ampliamente la atención los siguientes hallazgos:

El grupo 1 mantuvo los porcentajes de recuperación de plaquetas más altos y así mismo conservó los niveles de marcación para antígenos de membrana plaquetaria (incluyendo P-Selectina pre estimulación) más altos al compararlo con los 2 grupos restantes.

Aun así, referente a la funcionalidad fueron las plaquetas seleccionadas dentro del grupo 2 las que claramente representaron el mayor porcentaje de agregación con trombina dentro de cada uno de los periodos evaluados, superando en menor medida los porcentajes reportados por el grupo 1 y en mayor medida a los reportados por el grupo 3.

Si bien existen investigaciones en las cuales se demostró que las plaquetas criopreservadas hasta por 2 años pueden ser consideradas como viables para su uso en medicina transfusional, entre las razones que motivaron al empleo de un periodo de tiempo significativamente más corto por parte de este estudio fueron:

1. la poca experiencia con que se contaba para el momento de la investigación respecto a la manipulación y medición de parámetros de calidad en plaquetas criopreservadas.
2. La ausencia de trabajos o experiencias previas realizadas y/o publicadas en la Argentina e inclusive el resto de países latinoamericanos a excepción de Brasil donde se encontró un solo trabajo en el cual se estudió la criopreservación plaquetaria siguiendo la técnica de Valeri y colaboradores⁷².

3. Las consecuencias generadas por la situación de emergencia sanitaria que se vive a nivel global producto de la pandemia por el coronavirus, teniendo en cuenta que las medidas empleadas para proteger a la población y evitar la propagación del virus (entre las que se incluye el periodo de cuarentena) lo que representó una importante reducción en el número de donantes y por tanto la obtención de cada vez menos concentrados de plaquetas. Esto motivó al desarrollo de los proyectos de investigación institucional que pudieran otorgar posibles soluciones a esta situación problema en un lapso de tiempo corto.

Otra limitante de este trabajo constituyó la cantidad de muestras empleadas en la investigación, por tanto, la realización de estudios posteriores empleando un n mayor de muestras sería necesario para consolidar la evidencia obtenida en el presente trabajo.

Por otro lado, se debe destinar un espacio en este apartado para destacar los múltiples escenarios en los cuales hoy día se emplean técnicas de criopreservación con fines de atención en salud, dado que como se ha expuesto al inicio de esta investigación se han desarrollado trabajos para prolongar la sobrevida y funcionalidad de glóbulos rojos (mediante el uso de soluciones criopreservantes a base de glicerol) y asimismo ha quedado consolidada su utilidad en la conservación de células progenitoras hematopoyéticas, lo cual ha representado una ayuda significativa en el desarrollo y evolución del trasplante de médula ósea.⁷³

Otros ejemplos para citar incluyen la criopreservación de células mesenquimales y células germinales lo que ha representado un claro avance en la multiplicidad de aplicaciones que pueden llevarse a cabo mediante la aplicación de estas técnicas de conservación.⁷⁴

Tampoco se debe olvidar que el proceso de conservación en frío cuenta con aplicaciones no ligadas de manera exclusiva a la salud humana ya que también se ha descrito en la literatura científica ejemplos del uso de técnicas de crioconservación para la preservación de embriones

y gametos sexuales enfocados al desarrollo de la ganadería, por otro lado, se ha empleado también en el cuidado de especies vegetales en vía de extinción e inclusive en la conservación de semillas.

En referencia a la última aplicación mencionada en el párrafo anterior, cabe destacar que durante desde principios del año 2000 se ha dado prioridad al desarrollo de este tipo de proyectos, lo cual ha otorgado para si un alto grado de interés mundial teniendo como precedente la crisis climática derivada del calentamiento global y la desaparición de especies vegetales a consecuencia de la intervención humana.

Para ello tomamos como referencia el “Banco de semillas de Svalbard”, proyecto desarrollado en conjunto por el Reino de Noruega y organizaciones privadas que desde 2008 viene almacenando dentro de sus instalaciones ubicadas a 1300 km del círculo polar ártico alrededor de 1.500.000 de variedades de semillas a -18°C sin embargo su capacidad total incluye la posibilidad de almacenar 4.500.000 variedades de cultivo y 2.5 billones de semillas.⁷⁵

Inclusive, debe destacarse el hecho que se estén desarrollando al momento de la redacción de este trabajo, estudios similares enfocados a la conservación de tejidos para su posterior empleo en procesos de cirugía reconstructiva así como en el desarrollo de tejidos sintéticos a partir de secuencias celulares tomadas de tejido previamente criopreservado lo que confirma la importancia de continuar realizando de la mano estudios similares al presente que puedan diversificar cada vez más las bondades de un empleo adecuado de las técnicas de preservación en frío.

Para poner en contexto la afirmación descrita anteriormente se ha visto como por ejemplo la crioconservación de hepatocitos ha repercutido en el desarrollo de estudios fisiológicos además de estudios inherentes al metabolismo hepático lo que representaría un gran avance en el desarrollo de la industria farmacéutica enfocada al tratamiento de trastornos del hígado además de la realización de trasplantes experimentales y clínicos con órganos constituidos a base de componentes progenitores crioconservados.⁷⁶

Asimismo ha abierto el campo para el planteamiento de ensayos de preservación de otros componentes como células neuronales primarias, cardiomiocitos e islotes pancreáticos, siendo el trasplante de este último componente una alternativa para el tratamiento de la diabetes tipo I, sin embargo a la fecha los resultados respecto a la criopreservación de islotes han sido subóptimos por lo que aún se encuentra en periodo de optimización y mejoras tanto de la técnica empleada como de la solución criopreservante a utilizar.^{77, 78}

Cabe destacar que desde una perspectiva realista no todo son ventajas tomando en cuenta que al someter elementos celulares a procesos de criopreservación se debe tener presentes algunas limitaciones derivadas de la técnica como son:

1. La ausencia de procesos metabólicos celulares a temperaturas extremadamente bajas como $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ejemplo las conservadas en nitrógeno líquido), lo que puede generar variaciones biológicas a nivel de los lípidos y proteínas celulares en detrimento de su actividad biológica.
2. La toxicidad que pueda generarse a partir del uso de soluciones criopreservantes (principalmente dimetilsulfóxido y glicerol)

3. Riesgo del desarrollo de alteración de la estabilidad de los cromosomas (fragilidad cromosómica), derivada de la exposición a soluciones criopreservantes aun en cantidades bajas predisponiendo al desarrollo de neoplasias.^{79,80}

Todo ello constituye un desafío, al tiempo que abre la puerta al desarrollo de procesos de mejora para la optimización de las técnicas de criopreservación ya sea a través del desarrollo de otras alternativas de solución criopreservante más costo-efectivas y con una menor tasa de eventos adversos identificables o mediante un proceso de reingeniería de las técnicas ya conocidas.

Aun con todo lo anterior no debe desconocerse la gran contribución realizada por la puesta en marcha de este tipo de procesos de conservación en el desarrollo de diversas alternativas para el mejoramiento de la atención en salud (sobre todo para la obtención de elementos como tejidos/muestras biológicas que de otra manera sería difícil conservar mediante otras técnicas) y asimismo la generación propuestas innovadoras que impliquen el uso de procesos de conservación en frío.

Capítulo 7

Conclusiones

Es conocido en primera instancia, la creciente limitación para el acceso a hemocomponentes de uso fundamental en el campo de la medicina transfusional (principalmente glóbulos rojos y plaquetas) motivado por el aumento en la demanda de estos recursos generada por pacientes que requieren su uso inmediato en situaciones de emergencia (en su gran mayoría con riesgo de vida) o como medida de soporte terapéutico; esta creciente demanda sumada al escaso número de donantes se han convertido en un problema común que involucra a diferentes sistemas de salud a nivel mundial, llevando al desarrollo de estrategias que permitan plantear posibles soluciones a esta situación en lapsos de tiempo razonables.

El presente trabajo abordó la criopreservación de plaquetas, ya que se trata de un modelo que en las últimas décadas ha demostrado tener buenos resultados respecto a la prolongación del tiempo de sobrevivencia funcional de este hemocomponente.

Una motivación que consideramos de gran importancia para el desarrollo de la idea y posteriormente el argumento conceptual y puesta en marcha de este proyecto obedeció a que, sumado a la ya poca disponibilidad que abarcara una o más respuestas a las preguntas de investigación, para nuestro asombro, desde la década de 1950 que es el momento en el que se escribe por primera vez sobre la técnica de criopreservación plaquetaria no se encontraron publicaciones relevantes del tema y menos aún investigaciones clínicas desarrolladas en referencia a este llevadas a cabo o publicadas en América latina.

Así que, con la información disponible al inicio del presente proyecto, se estableció como primera medida replicar la técnica criopreservante que mejores resultados hubiese reportado para con ello evaluar si era posible reproducir los resultados en nuestra muestra de evaluación dado que era importante asegurar la adecuada distribución de recursos (principalmente durante la ganancia de la curva de aprendizaje a fin de evitar errores del proceso durante el desarrollo del estudio).

Sin embargo, hubo un elemento agregado durante el planteamiento y puesta en marcha de esta investigación al proponer la evaluación de dos modelos de solución criopreservante que surgieron tomando como referencia el desarrollado por Valeri y colaboradores, con el objetivo de encontrar alternativas razonables que pudiesen mejorar la calidad de las plaquetas congeladas, empleando recursos de fácil acceso y disponibles en el país.

Los resultados de esta investigación reportaron que las plaquetas congeladas, independientemente de la solución empleada para su criopreservación tuvieron una viabilidad mayor al 50% confirmando el planteamiento propuesto en la hipótesis 1; sin embargo, al comparar los datos obtenidos durante los diferentes periodos de tiempo evaluados mostraron que las plaquetas del grupo 1 presentaron porcentajes de viabilidad más altos respecto de las muestras clasificadas en los grupos 2 y 3.

Basados en este primer informe sobre la experiencia institucional empleando el modelo de criopreservación, ha mostrado la posibilidad de prolongar el tiempo de sobrevida de las plaquetas almacenadas hasta por 21 días manteniendo una viabilidad superior al 50% independientemente del grupo al cual fueron asignadas, sin embargo, los mejores resultados fueron reportados por las plaquetas del grupo 1.

Respecto a la funcionalidad, si bien los resultados de la evaluación mostraron que las plaquetas criopreservadas en los grupos 1 y 3 presentaban en promedio niveles de marcación para P-selectina mayores a los del grupo control los días 7 y 14 post congelación y solo el grupo 1 al día 21 post congelación que según lo consultado en la literatura pudiera considerarse como un estado de “activación basal”, algo común en las plaquetas congeladas.

Aun así, la respuesta de las muestras criopreservadas no se vio reflejada inicialmente en los resultados de la prueba de estimulación con ADP, un hallazgo que también fue reportado por otros estudios de referencia por lo que algunos adicionaron la realización de pruebas de estimulación con agonistas fuertes como la trombina obteniendo mejores tasas de respuesta.

Inicialmente habíamos descrito estos hallazgos como una limitante para este trabajo, sin embargo algo que llamó fuertemente la atención fue que al someter estas mismas muestras a pruebas de agregación (usando para este caso trombina y siguiendo los lineamientos de investigaciones previas consultadas) se obtuvo que mediante la técnica de agregometría plaquetaria la totalidad de las muestras evaluadas presentaron un promedio de actividad (agregación) entre 80 a 95% algo que supera ampliamente el límite inferior de 50% que se había establecido dentro del diseño del estudio para considerar que la muestra cumplía con condiciones de viabilidad aceptables (para esto último se tuvo en cuenta también los datos obtenidos de las pocas investigaciones disponibles sobre el tema).

No podemos dejar de lado la mención que se ha hecho en capítulos anteriores respecto de los múltiples escenarios (médicos y no médicos) en los cuales se ha empleado y se emplean hoy día técnicas de criopreservación, derivando así en beneficios claros atribuidos de manera directa o indirecta a esta iniciativa los cuales han impactado en el desarrollo de la humanidad; como se ha reiterado ya, no todos relacionados estrictamente al área de la salud, por ello citamos nuevamente y a modo de ejemplo la iniciativa llevada a cabo por el gobierno noruego que a través de su banco de semillas prepara una solución alternativa que permita afrontar

una posible crisis alimentaria derivada de las consecuencias de la intervención humana sobre la naturaleza.

Dado que los resultados alentadores obtenidos en el presente estudio se dieron sobre la base de un tamaño muestral pequeño, que como bien se había descrito anteriormente fue una limitante que estuvo condicionada en gran medida por el periodo de emergencia sanitaria en el cual se dio inicio y se desarrolló la mayor parte de esta investigación, además del periodo inmediato post pandemia el cual se caracterizó por una baja disposición de recursos destinados a investigación como consecuencia de las secuelas económicas propias de tal situación, se espera que este proceso sea el estímulo para el surgimiento de propuestas con fines de investigación que puedan emplear mayor número de muestra, a fin de confirmar el análisis derivado de este trabajo.

Por otra parte consideramos de vital importancia incentivar en latinoamérica el surgimiento de este tipo de proyectos de investigación, tomando en cuenta el protagonismo que han venido tomando algunas instituciones de la región en el desarrollo de estrategias innovadoras en salud así como en la generación de conocimientos médicos a través de publicaciones, simposios, programas de entrenamiento y cursos de actualización como por hacer mención de algunas de estas estrategias , lo que ha permitido ubicar (con mucho esfuerzo y tropiezos de por medio) a la investigación latinoamericana a la vista de los grandes centros de investigación que tradicionalmente venían siendo los encargados de generar las directrices (en cuanto a contenidos y preparación académica se refiere) muchas veces a partir de datos limitados a estudios en población caucásica o anglosajona dejando de lado otros grupos poblacionales , explicando con ello que en muchas ocasiones los resultados obtenidos en centros de los Estados Unidos o Europa no pudieran ser replicables a individuos de África, Latinoamérica o El Caribe.

Es una responsabilidad ética y moral que como agentes generadores de conocimiento en la región debemos asumir el compromiso de estimular la producción científica local y de los países latinoamericanos en general con la mayor seriedad dado que producto de la globalización y el surgimiento de cada vez mayores posibilidades de libre acceso a la información debemos ser los encargados de dar a conocer que en nuestra latitud estamos en capacidad de crear y compartir datos de alto rigor y calidad científica.

Bibliografía

1. Bohonek, Milos; Cryopreservation of Platelets: Advances and Current Practice; Cryopreservation Biotechnology in Biomedical Sciences; 2018; Chap 4; P47-66.
2. Dumont LJ, Cancelas JA, Dumont DF, et al; A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide frozen autologous platelets in healthy volunteers. Transfusion; 2013; 53; p: 128-37.
3. Sloan AW;The Normal Platelet Count in Man; Journal of Clinical Pathology 1951;4:37-46
4. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozzero (1882) and the discovery of the platelet. Br J Haematol. 2006 May; 133(3):251-8. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x. PMID: 16643426.
5. Bermejo E; Plaquetas, Fisiología de la hemostasia normal; Hematología 2017 (21);p:10-18
6. Luis Vélez, J., Montalvo, M., Vélez, P. A., Velarde, G., Jara González, F. E., & Barboza-Meca, J. (2019). Glicocáliz endotelial: relevancia clínica y enfoque traslacional. Horizonte Médico (Lima), 19(4), 84–92. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n4.12>
7. Li R, Hoffmeister KM, Falet H. Glycans and the platelet life cycle. Platelets. 2016; 27(6):505-511. doi:10.3109/09537104.2016.1171304
8. Quach ME, Li R. Structure-function of platelet glycoprotein Ib-IX. J Thromb Haemost. 2020;18(12):3131–41
9. Karampini E, Bierings R, Voorberg J. Orchestration of primary hemostasis by platelet and endothelial lysosome-related organelles. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020; 40(6):1441–53.
10. Maynard DM, Heijnen HF, Gahl WA, et al.: The α -granule proteome: novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome. J Thromb Haemost. 2010; 8(8):1786–96. 10.1111/j.1538-7836.2010.03932.x
11. Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules; 2018 ;(7) p: 236. doi:10.12688/f1000research.13283.1

12. Gunning WT 3rd, Raghavan M, Calomeni EP, et al. A Morphometric Analysis of Platelet Dense Granules of Patients with Unexplained Bleeding: A New Entity of Delta-Microgranular Storage Pool Deficiency. *J Clin Med.* 2020; 9(6):1734. doi:10.3390/jcm9061734
13. Chen Y, Yuan Y, Li W. Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from α -granules. *Biosci Rep.* 2018; 38(5):BSR20180458. doi:10.1042/BSR20180458
14. Seifert J, Rheinlaender J, Lang F, Gawaz M, Schäffer TE. Thrombin-induced cytoskeleton dynamics in spread human platelets observed with fast scanning ion conductance microscopy. *Sci Rep.* 2017; 7(1):4810. Published 2017 Jul 6. doi:10.1038/s41598-017-04999-6
15. Moskalensky AE, Yurkin MA, Muliukov AR, et al. Method for the simulation of blood platelet shape and its evolution during activation. *PLoS Comput Biol.* 2018; 14(3):58-99. doi:10.1371/journal.pcbi.1005899
16. Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, Rivera J, Teruel-Montoya R. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters [published correction appears in *Int J Mol Sci.* 2020 May 19;21(10):]. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(14):3484. doi:10.3390/ijms20143484
17. Heller P; Megacariocitopoyesis y trombopoyesis, *Fisiología de la hemostasia normal; Hematología* 2017 (21);p:7-9
18. Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood.* 2015 Oct 15;126(16):1877-84
19. Dewitte A, Lepreux S, Villeneuve J, et al. Blood platelets and sepsis pathophysiology: A new therapeutic prospect in critically ill patients? *Ann Intensive Care.* 2017; 7(1):115.
20. Cho J, Kim H, Song J, et al. Platelet storage induces accelerated desialylation of platelets and increases hepatic thrombopoietin production. *J Transl Med.* 2018; 16(1):199.
21. Hoffmeister KM, Falet H. Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thromb Res.* 2016;141 Suppl 2(Suppl 2):S68-S72. doi:10.1016/S0049-3848(16)30370-X

22. Xavier-Ferruccio J, Krause DS. Concise Review: Bipotent Megakaryocytic-Erythroid Progenitors: Concepts and Controversies. *Stem Cells*. 2018; 36(8):1138-1145. doi:10.1002/stem.2834
23. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017; 544(7648):105-109. doi:10.1038/nature21706
24. Kostyak JC, Liverani E, Kunapuli SP. PKC-epsilon deficiency alters progenitor cell populations in favor of megakaryopoiesis. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182867.
25. Noetzli LJ, French SL, Machlus KR. New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39(7):1288-1300. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312129
26. González Villalva A, et al. The megakaryocyte: a very original cell. *Rev Fac Med Univ Nac Auton Mex*. 2019;62(1):6–18.
27. Frelinger AL 3rd. Using flow cytometry to monitor glycoprotein IIb-IIIa activation. *Platelets*. 2018 Nov;29(7):670-676. doi: 10.1080/09537104.2018.1478073.
28. Chatterjee M, Rath D, Gawaz M. Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function. *Biochem Soc Trans*. 2015 Aug;43(4):720-6.
29. Poulter NS, Thomas SG. Cytoskeletal regulation of platelet formation: Coordination of F-actin and microtubules. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 Sep;66: 69-74. doi: 10.1016/j.biocel.2015.07.008. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26210823.
30. French SL, Vijey P, Karhohs KW, Wilkie AR, Horin LJ, Ray A, Posorske B, Carpenter AE, Machlus KR, Italiano JE Jr. High-content, label-free analysis of proplatelet production from megakaryocytes. *J Thromb Haemost*. 2020 Oct;18(10):2701-2711.
31. Rubenstein DA, Yin W. Platelet-Activation Mechanisms and Vascular Remodeling. *Compr Physiol*. 2018 Jun 18;8(3):1117-1156.
32. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin*. 2017 Jan;6(1):1-12. doi: 10.1016/j.iccl.2016.08.001.
33. Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood Rev*. 1995 Sep;9(3):143-56. doi: 10.1016/0268-960x(95)90020-9.

34. Amano H, Ito Y, Eshima K, Kato S, Ogawa F, Hosono K, Oba K, Tamaki H, Sakagami H, Shibuya M, Narumiya S, Majima M. Thromboxane A2 induces blood flow recovery via platelet adhesion to ischaemic regions. *Cardiovasc Res*. 2015 Sep 1;107(4):509-21.
35. Mammadova-Bach E, Mauler M, Braun A, Duerschmied D. Autocrine and paracrine regulatory functions of platelet serotonin. *Platelets*. 2018 Sep;29(6):541-548. doi: 10.1080/09537104.2018.1478072.
36. Joshi N, Kopec AK, Ray JL, Luyendyk JP. Inhibition of PAR-4 and P2Y12 receptor-mediated platelet activation produces distinct hepatic pathologies in experimental xenobiotic-induced cholestatic liver disease. *Toxicology*. 2016 Jul 15;365:9-16.
37. Romon I, Lozano M. Quality indicators for Transfusion Medicine in Spain: a survey among hospital transfusion services. *Blood Transfus*. 2017; 15(3):207-214. doi:10.2450/2016.0018-16
38. Karafin MS, Bruhn R, Westlake M, et al. Demographic and epidemiologic characterization of transfusion recipients from four US regions: evidence from the REDS-III recipient database. *Transfusion*. 2017; 57(12):2903-2913. doi:10.1111/trf.14370
39. Adam EH, Fischer D. Plasma transfusion practice in adult surgical patients: Systematic review of the literature. *Transfus Med Hemother*. 2020; 47(5):347–59.
40. Humbrecht C, Kientz D, Gachet C. Platelet transfusion: Current challenges. *Transfus Clin Biol*. 2018 Sep;25(3):151-164. doi: 10.1016/j.tracli.2018.06.004.
41. García-Chávez Jaime, Hernández-Juárez Jesús, Sánchez-Jara Berenice, García-Lee María Teresa, Rodríguez-Castillejos Cecilia, Montiel-Cervantes Laura et al . Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la trombastenia de Glanzmann. *Gac. Méd. Méx* [revista en la Internet]. 2022 ; 158: 1-17.
42. Nurden AT, Pillois X, Wilcox DA. Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39:642-55.
43. Poon MC, Di Minno G, d'Oiron R, Zotz R. New insights into the treatment of Glanzmann thrombasthenia. *Transfus Med Rev*. 2016;30:92 9.
44. Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. New horizons in platelets flow cytometry. *Malays J Med Sci*. 2013 Mar;20(2):62-6.

45. Michelson AD, Linden MD, Barnard MR, Furman MI, Frelinger AL. In: Platelets. 2nd ed. Michelson, editor. San Diego (CA): Elsevier Academic Press; 2007. Flow cytometry; pp. 545–564.
46. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost.* 1991;65(5):467–473.
47. Salvagno GL, Montagnana M, Degan M, Marradi PL, Ricetti MM, Riolfi P, et al. Evaluation of platelet turnover by flow cytometry. *Platelets.* 2006;17(3):170–177.
48. Inder HM. Platelet function testing by flow cytometry. *Clin Lab Sci.* 1998;11(6):365–372.
49. Born GRV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927-029.
50. Bick RL. Platelet function defects. En: Bick RL, editor. *Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and Laboratory Practice.* Lippincott Williams & Wilkins, 2002;59-90.
51. Dynamically resizable nanometre-scale apertures for molecular sensing"; Stephen J. Sowerby, Murray F. Broom, George B. Petersen; *Sensors and Actuators B: Chemical* Volume 123, Issue 1 (2007), pages 325-330
52. Giles C. The platelet count and mean platelet volume. *Br J Haematol.* 1981 May;48(1):31-7.
53. Organización Panamericana de la Salud; Suministro de Sangre para transfusiones en los países de Latinoamérica y del Caribe 2014 y 2015; Washington, D.C: OPS; 2017.P:31-35.
54. Salazar, Mauricio; Guías para la transfusión de sangre y sus componentes; *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 13(2/3), 2003. P: 183-187.
55. Doyle AJ, Danaee A, Furtado CI, Miller S, Maggs T, Robinson SE, Retter A. Blood component use in critical care in patients with COVID-19 infection: a single-centre experience. *Br J Haematol.* 2020 Nov;191(3):382-385.
56. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* 2017 Mar;6(1):12-18.
57. Karlsson J.O., Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials.* 1996;17:243–256.

58. Djerassi I, Farber S, Roy A, Cavins J. Preparation and in vivo circulation of human platelets preserved with combined dimethylsulfoxide and dextrose. *Transfusion*. 1966; 6(6):572-6.
59. Eker İ, Yılmaz S, Çetinkaya RA, Pekel A, et al. Generation of Platelet Microparticles after Cryopreservation of Apheresis Platelet Concentrates Contributes to Hemostatic Activity. *Turk J Haematol*. 2017;34(1):64-71
60. Six KR, Compennolle V, Feys HB. Platelet biochemistry and morphology after cryopreservation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):935.
61. Karin M. Hoffmeister & cols. Glycosylation Restores Survival of Chilled Blood Platelets; *Science* 12 Sep 2003:Vol. 301, Issue 5639, pp. 1531-1534.
62. Johnson L, Cameron M, Waters L, Padula MP, Marks D. The impact of refrigerated storage of UVC pathogen inactivated platelet concentrates on in vitro platelet quality parameters. *Vox Sang*. 2019 Jan; 114(1):47-56.
63. Kelly K, Dumont LJ. Frozen platelets. *Transfus Apher Sci*. 2019;58(1):23–9
64. Waters L, Cameron M, Padula MP Marks DC, Johnson L. Refrigeration, cryopreservation and pathogen inactivation: an updated perspective on platelet storage conditions. *Vox Sang*. 2018 May; 113(4):317-328.
65. Khuri SF, Healey N, MacGregor H, et al.: Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 172– 183.
66. Barnard MR, et al. Fresh, liquid-preserved, and cryopreserved platelets: adhesive surface receptors and membrane procoagulant activity. *Transfusion*. 1999;39 (8):880–8.
67. Tegegn TZ, et al. Characterization of procoagulant extracellular vesicles and platelet membrane disintegration in DMSO-cryopreserved platelets. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:30422.
68. Johnson, L., Raynel, S., Seghatchian, J., & Marks, D. Platelet microparticles in cryopreserved platelets: Potential mediators of haemostasis. *Transfusion and Apheresis Science*, 2015; 53(2), 146–152.
69. Dumont L, VandenBroeke T, Ault K. Platelet surface P-selectin measurements in platelet preparations: an international collaborative study. *Biomedical Excellence for*

- Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion (ISBT). *Transfus Med Rev.* 1999 (1):31-42. doi: 10.1016/s0887-7963(99)80086-8.
70. Tynngård N, Wikman A, Uhlin M, Sandgren P. Haemostatic responsiveness and release of biological response modifiers following cryopreservation of platelets treated with amotosalen and ultraviolet A light. *Blood Transfus.* 2020;18(3):191-199.
 71. Yılmaz S, Çetinkaya RA, Eker İ, et al. Freezing of Apheresis Platelet Concentrates in 6% Dimethyl Sulfoxide: The First Preliminary Study in Turkey. *Turk J Haematol.* 2016;33(1):28-33. doi:10.4274/tjh.2014.0181
 72. Ouyang XL, Zhou D, Wu JH, et al; Cryopreservation strengthens procoagulative activities of platelets. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi.* 2008 ;16(4):930-932.
 73. Cohn CS, Dumont LJ, et al. Vox Sanguinis International Forum on platelet cryopreservation. *Vox Sang.* 2017 (7), p:69-85.
 74. Haack-Sørensen M, Ekblond A, Kastrup J. Cryopreservation and Revival of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:357-74.
 75. Asdal Å, Guarino L. The Svalbard Global Seed Vault: 10 Years-1 Million Samples. *Biopreserv Biobank.* 2018 Oct;16(5):391-392.
 76. Lloyd TD, Orr S, Skett P, Berry DP, Dennison AR. Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell Tissue Bank.* 2003;4(1):3-15.
 77. Kojayan GG, Alexander M, Imagawa DK, Lakey JRT. Systematic review of islet cryopreservation. *Islets.* 2018 Jan 2;10(1):40-49.
 78. Bustamante JO, Jachimowicz D. Cryopreservation of human heart cells. *Cryobiology.* 1988 Oct;25(5):394-408.
 79. Redaelli S, Bentivegna A, Foudah D, et al. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3(6):47.
 80. Whaley D, Damyar K, Witek RP, et al. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations [J]. *Cell Transpl.* 2021;30:963689721999617.