



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

35
2ej.

FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES DE LAS
PLAQUETAS DURANTE LA CIRCULACION EXTRACORPOREA

TESIS DE POSGRADO

Para obtener la Especialidad de
CARDIOLOGIA

presente

MANUEL F. GUZMAN HERRERA



SUBDIRECCION GENERAL
DE ENSEÑANZA



Subdirector de Enseñanza: Dr. Eduardo Salazar Dávila
Asesor de Tesis: Dr. Raúl Izaguirre Avila

México, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION:	Pag 1 - 24.
JUSTIFICACION:	Pag 25 - 26.
OBJETIVOS:	Pag 27.
MATERIAL Y METODOS:	Pag 28 - 38.
RESULTADOS:	Pag 39 - 52.
DISCUSION:	Pag 53 - 61.
CONCLUSIONES:	Pag 62.
FOTOGRAFIAS:	Pag 63 - 68.
TABLAS:	Pag 69 - 71.
GRAFICAS:	Pag 72 - 81.
BIBLIOGRAFIA:	Pag 82 - 92.

INTRODUCCION

El papel de la cirugía cardiovascular está bien establecido. El éxito creciente en los resultados de la cirugía cardiaca, especialmente en la corrección de cardiopatías congénitas complejas, cardiopatías plurivalvulares y de revascularización miocárdica extensa, depende en gran medida de técnicas de perfusión extracorpórea con eficiente mecanismo de intercambio gaseoso.

Sin embargo la circulación extracorpórea (CEC) expone la sangre a superficies sólidas sintéticas, gases atmosféricos y anestésicos, así como a tejidos de células no endoteliales, motivos por los que es esperable que ocurran alteraciones en los constituyentes sanguíneos, junto a estimulación de reacciones en los elementos formes y no formes de la sangre.

De estos elementos son las plaquetas las más profundamente afectadas. Durante la CEC las plaquetas reaccionan con superficies sólidas y/o gaseosas, se adhieren a aquellas, forman agregados y liberan una variedad de sustancias vasoactivas a la circulación. La CEC reduce el número de plaquetas circulantes y estimula la movilización de plaquetas nuevas. Sin embargo la consecuencia más importante

es la interferencia en la función plaquetaria (1).

Como resultado de esta disfunción los tiempos de sangría postoperatorios están prolongados, con aumento de las pérdidas sanguíneas postoperatorias y retardo en el cierre y cicatrización de la herida, fenómenos todos ellos que influyen decisivamente el pronóstico postquirúrgico de estos pacientes (2).

Inicialmente analizaremos aspectos de la ultraestructura y función plaquetaria, de la fisiología de la perfusión extracorpórea y las características de los equipos con que se realiza, los cambios en la estructura y función de las plaquetas durante la CEC, experimental y clínica.

MORFOLOGIA PLAQUETARIA

La plaqueta es una célula anucleada cuyo precursor inmediato es el megacariocito de la médula ósea. Tiene un diámetro de 2 a 5 micras y un volumen de 5 a 7 micras cúbicas (2). En su estado de reposo tiene contornos lisos y superficie convexa. En un análisis detallado se pueden ver indentaciones en la superficie que representan los sitios de apertura del sistema canalicular abierto(3).

La investigación de las plaquetas con la utilización de la microscopía electrónica (ME) fue iniciada en 1939 con los estudios de Wolpers y Ruska(4). Todos los detalles que a continuación se mencionan se obtuvieron con ME.

La anatomía plaquetaria puede dividirse en cuatro regiones (3,5): La zona periférica, la zona sol-gel, la zona de organelos y los sistemas de membrana.

A la zona periférica se le puede subdividir a su vez en tres zonas: El glicocálix, la unidad de membrana y la región submembranosa, que es el área situada inmediatamente por dentro de la unidad de membrana.

La zona sol-gel constituye la matriz citoplasmática y contiene varios sistemas de fibras, algunos con propiedades contráctiles. La zona de organelos contiene gránulos electrónicos, peroxisomas, lisosomas y mitocondrias. El sistema de membranas presenta dos componentes principales: El sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso.

ZONA PERIFERICA : El glicocálix cubre la superficie externa de la plaqueta, tiene un espesor de 200 Angstroms y está compuesta principalmente por glicoproteínas - IA, IB, IC, IIA, IIB, III, IV y V-(6,7).

Algunas tienen un papel sumamente importante en las funciones de adhesión y agregación (8).

La unidad de membrana es la responsable de la separación entre los constituyentes de los procesos bioquímicos intra y extracelulares. Es una bicapa lipídica similar al de otras células sanguíneas, pero con significativa variación en el número y distribución de las partículas protéicas intercaladas; de ella dependen propiedades específicas de superficie

La región submembranosa contiene un sistema de filamentos similares a los de los microtúbulos, sistema al que está asociado en sus funciones. Contiene alfa actinina y proteína fijadora de actina, ambas vinculadas a la formación de pseudopodos (9,10).

ZONA SOL - GEL : Otros dos sistemas están presentes en la matriz de la plaqueta : Los microtúbulos y los microfilamentos. Los microtúbulos están justo por debajo de la pared celular siguiendo su máxima circunferencia . El constituyente fundamental es la tubulina, proteína que en la plaqueta inalterada se encuentra en forma polimerizada. Existen estudios que relacionan la banda de microtúbulos a funciones de soporte citoesquelético (11) y de contracción de la plaqueta activada (12) . Los microfilamentos son esencialmente elementos del sistema contráctil , y su polimerización puede ser un proceso constante o alternante , o bien puede ocurrir como respuesta a

la estimulación durante la reacción hemostática de las plaquetas (13). La relación de filamentos de actina y miosina es de 100:1 (14). En el fenómeno de contracción interna, hecho característico de la plaqueta activada, interviene en forma principal los microfilamentos aportando la fuerza contráctil (15),

ORGANELOS : Son las mitocondrias, gránulos alfa, gránulos densos, lisosomas y peroxisomas distribuidos aleatoriamente en el citoplasma. Los gránulos densos miden de 250 a 300 nanómetros y se llaman así porque absorben electrones en preparaciones no fijadas ni teñidas, son altamente osmiófilos y su aparente peso específico es de 1.2 gramos/cms cúbicos, lo cual le da la mayor densidad que cualquier otro organelo plaquetario. Los gránulos alfa son esferas de 200 a 500 nanómetros, y tienen diferentes patrones en su densidad, pero todos ellos contienen la misma composición (proteína 16).

COMPLEJOS DE MEMBRANA : Existen zonas en las plaquetas, en las cuales el sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso tienen una estrecha relación física. Esta relación tiene un soporte funcional en los movimientos del calcio y la activación plaquetaria ya que el sistema tubular denso (STD) es el sitio de secuestro del calcio, en forma similar a los

sarcotúbulos de la célula muscular(17). El STD también es el sitio de síntesis de prostaglandinas plaquetarias.

FUNCION PLAQUETARIA

Las funciones de la plaqueta se pueden resumir en: 1)Adhesión a superficies alteradas, extrañas o endógenas.

2)Cohesión de una plaqueta con otra.

3)Participación en la coagulación.

4)Agregación y liberación de sustancias

5)Almacenamiento y transporte de sustancias solubles.

6)Contracción y retracción del coágulo.

7)Participación en la inflamación (18).

-ADHESION: El evento inicial en la formación del tapón plaquetario es la adherencia de la plaqueta a los lugares de daño endotelial. Cuando este ocurre se exponen varios constituyentes subendoteliales, de los cuales el colágeno, juega un papel fundamental en el fenómeno de adhesión (19). Es imprescindible también la presencia en el plasma de una proteína, el factor de Von Willebrand, que circula asociada al factor VIII de la coagulación (20,21). Es un multímero de una subunidad de

peso molecular de 230.000 Daltons y se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos, se encuentra también en los gránulos alfa de las plaquetas. Su función específica es permitir la adhesión de la plaqueta al subendotelio a través de receptores estereoespecíficos de membrana (proteínas IB, IIB-III A).

AGREGACION : Después de la adhesión de la plaqueta a la pared del vaso dañado , el tapón hemostático crece por la agregación de las plaquetas unas con otras. Se han descrito múltiples inductores de la agregación plaquetaria , fuertes y débiles : colágeno y trombina entre los primeros, difosfato de adenosina (ADP) y adrenalina entre los últimos (22). Consta de una primera fase ("primera onda ") la cual no está asociada a secreción plaquetaria y/o síntesis de prostaglandinas, siendo por lo tanto reversible. La segunda fase que sigue a la primera (" segunda onda "), es irreversible; está asociada a secreción plaquetaria y es aumentada por la secreción de ADP y por productos de síntesis de prostaglandinas (tromboxanoA₂), por un mecanismo de retroalimentación positiva . La agregación plaquetaria es dependiente de Calcio y Magnesio y fibrinógeno extracelular y de la colisión entre las plaquetas (23). Característicamente, los agonistas débiles inducen sólo la

secreción de los gránulos densos y alfa. Los agonistas fuertes inducen además la secreción de las hidrolasas ácidas de los lisosomas. Los gránulos densos contienen grandes cantidades de difosfatos y trifosfatos de adenosina (ADP, ATP) y guanosina (GTP, GDP) en agregados estabilizados por magnesio y serotonina (24,25). Fisiológicamente el ADP es la sustancia más importante liberada por estos gránulos (23). El contenido de los gránulos alfa se puede subdividir en proteínas específicas de las plaquetas (el factor plaquetario IV de alta y de baja afinidad), proteínas catiónicas (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor quimiotáctico, etc.), factores de la coagulación (fibrinógeno, factor V, factor de Von Willebrand, Cininógeno de alto peso molecular) y glicoproteínas (trombospondina, lecitina endógena, etc.) (26,27,28,29,30,31). Todas ellas liberadas durante la fase secretoria de la activación plaquetaria y con funciones muchas veces reflejadas en el nombre. Las hidrolasas se encuentran en los lisosomas y en menos cantidad en un tipo especial de gránulos alfa ("ojo de buey"), y sirven para digerir el material que la plaqueta ha endocitado (32).

MECANISMOS DE ACTIVACION
E INHIBICION
PLAQUETARIA.

La plaqueta necesita ser activada para cumplir su función. Este proceso requiere de un sistema de transducción de señales que comprende receptores específicos de membrana, generación de segundos mensajeros intracelulares que en última instancia generen los cambios físicos en la célula que le permitan cumplir con su función. En la traducción de señales, el activador se une a un receptor específico que a su vez interactúa con varias proteínas de dicha membrana que requieren la presencia de GTP, conocidas por esto como "proteína G". A su vez estas interactúan con enzimas o canales iónicos, estimulando la producción de segundos mensajeros o modulando flujos iónicos. Los receptores son proteínas embebidas en la membrana plasmática. Varios han sido identificados (el de la trombina, que es el más potente activador plaquetario fisiológico, el de la glicoproteína IB, el del colágeno es la glicoproteína IA, etc) (33,34,35). En las plaquetas el evento primario acoplado con la estimulación por el agonista, parece ser la activación de la fosfolipasa C, la cual está ligada a su receptor por una proteína G. La fosfolipasa C rompe al fosfatidil inositol para producir diacilglicerol y un fosfato de

Inositol. El diacilglicerol junto al calcio conforman los denominados segundos mensajeros, que regulan la activación proteica (36). El diacilglicerol activa la proteinquinasa C que fosforila una proteína cuya función no se conoce con exactitud (37), y fosforila la miosina plaquetaria, desconociéndose la importancia de este hecho. El calcio cumple funciones regulatorias. La proteína fijadora de calcio más importante en la plaqueta es la calmodulina (38) que regula un sistema de quinasas de cadenas ligeras de miosina. Otro sistema dependiente de calcio es el de las "calpains", proteasas involucradas en la polimerización de la actina y por tanto en la formación del citoesqueleto plaquetario. (39). El ácido araquidónico usado para la síntesis de endoperóxido (PG G₂, PGH₂, TRA₂) está disponible por la acción y liberación de la membrana plaquetaria de una o más fosfolipasas. La vía de la fosfolipasa A₂ es la más importante. Otras sustancias se ha involucrado en la activación plaquetaria en humanos, pero su papel es poco claro (serotonina, factor de activación plaquetario) (40, 41).

FUNCION DEL
ADENOSINMONOFOSFATO CICLICO
3' - 5' (AMPC)

Los niveles elevados del AMPC

inhiben la activación de la plaqueta (42). Es sintetizado por la adenilatociclasa y destruido por varias fosfodiesterasas. El grado de activación de estas enzimas determinan la concentración de este nucleótido de adenina. Son sustancias que estimulan la adenilatociclasa, las PG E1, PGD2, PG I2 (prostaciclina) y adenosina. La prostaciclina es el más importante inhibidor de la activación plaquetaria y es sintetizado por las células endoteliales. Los activadores plaquetarios son inhibidores de esta enzima. El mecanismo por el cual el AMPc ejerce su acción inhibitoria es desconocido parcialmente. La plaqueta tiene capacidad de sintetizar monofosfato de guanosina (43). Su acción predominante es inhibir la activación de la plaqueta por un mecanismo de retroalimentación negativa (44).

CIRCULACION EXTRACORPOREA

Dentro del equipo necesario para llevar a cabo una perfusión extracorpórea, un integrante fundamental es el oxigenador. Existen dos tipos de oxigenadores:

- 1) Los que tienen una fase interfase directa sangre-gas, dentro de las cuales el más representativo es el

oxigenador de burbuja .

2.) Aquellos que tienen una membrana porosa entre el fluido circulante y la mezcla gaseosa (oxigenadores de membrana) (45)

OXIGENADOR DE BURBUJA .

Los compartimientos básicos del oxigenador de burbuja son: Una columna de oxigenación , un compartimiento antiespuma y el reservorio arterial. A pesar del éxito y el amplio uso de este tipo de oxigenadores, se han descrito numerosas limitantes para su utilización clínica , de las cuales la más importante , sin duda, es que la interfase sangre- gas representa un estado no fisiológico. Se produce a este nivel una distorsión en la configuración normal de las proteínas , alterando su especificidad biológica y causando alteraciones funcionales, que en último término producen alteración plaquetaria . Algunas de estas proteínas alteradas adquieren actividad biológica potenciada (activación del complemento , liberación de quininas , etc). Es esta reacción de la sangre con la interfase de gas libre , el factor limitante principal en el uso del oxigenador de burbuja para perfusiones prolongadas. Sin embargo, una justificación para su amplio uso es que hasta ahora no se han demostrado diferencias clínicas significativas con los oxigenadores de membrana para tiempos de CEC menores a las dos horas

(45).

OXIGENADOR DE MEMBRANA :

Intentan remedar la situación fisiológica de la existencia de una membrana que separa el gas de la sangre (barrera alveolocapilar del pulmón) . El intercambio de oxígeno logrado por estos equipo depende en gran medida de las características de la membrana (coeficiente de permabilidad , dimensiones , uniformidad , material, presencia de microporos , etc,). No existe ningún equipo que tenga las características suficientes de la membrana alveolocapilar. Está bien demostrado que la oxigenación con equipos de membrana no es fisiológica y que se puede producir daño cerebral , renal , pulmonar y de otros órganos vitales con su uso.

Ambos tipos de oxigenadores producen daño en los elementos formes de la sangre. Sin embargo no son los únicos responsables de este daño. Se deben tener en cuenta otros factores al momento de comparar ambos sistemas, como la aspiración de la sangre del campo quirúrgico para ser reinfundida al paciente (46) , el uso de filtros en el sistema de CEC , heparina , etc.

Existen numerosos reportes que demuestran que los equipos de oxigenación de membrana son menos traumáticos que los de burbuja , (47,48 y 49), y que ocasionan disminuciones menos marcadas en el número de las

plaquetas, con menor disfunción plaquetaria, reversibilidad rápida y un rápido incremento en el número ("fenómeno de rebote").

Al igual que con las plaquetas, hay una marcada reducción en el número de leucocitos al inicio de la perfusión, especialmente de los polimorfonucleares, con rápida recuperación y sobrepaso de los valores basales. Esto refleja una combinación de destrucción, secuestro por el equipo o el paciente, hemodilución seguido de un estímulo de la mielopoyesis, movilización de "pools" de reserva intravasculares o extravasculares, que explican la leucocitosis final (50,51, 52). En estudios in vitro los oxigenadores de membrana son menos lesivo que los de burbuja (58). También producen menos agentes embolizantes los primeros (59,60).

PLAQUETAS DURANTE C.E.C.

Durante la CEC, se producen alteraciones cuanti y cualitativas en las plaquetas como resultado de las interacciones de estas con superficies sintéticas, interfases sangre-gas y otros factores esbozados antes.

INTERACCION SUPERFICIE SINTETICA - PLAQUETA:

La única superficie totalmente no trombogénica es el endotelio vascular normal. La interacción superficie

sintética-plaqueta promueve cambios en la plaqueta similares a los producidos por agonistas débiles solubles (61). Al inicio del contacto, primeros segundos, las proteínas plasmáticas se absorben formando una capa de hasta 20 nanómetros compuesta principalmente por fibrinógeno (62,63). Las plaquetas se adhieren en gran número al fibrinógeno absorbido a través de receptores específicos, convirtiéndose en un factor esencial para la adhesión y agregación plaquetaria (64).

Por lo tanto a los pocos minutos de expuesta la sangre a la superficie sintética, pero discretamente retardado respecto de la absorción proteica, la activación se hace evidente.

Se han observado todas las fases de activación plaquetaria inducidas por los agonistas débiles solubles. Esto ocurre después que se ha producido la interacción sangre - superficie sintética.

Los factores de la coagulación son también absorbidos sobre las superficies sintéticas pero el mayor porcentaje de la disminución observada durante la CEC, se deben atribuir a la hemodilución (65).

Se puede concluir que excepto en raras circunstancias, los factores de la coagulación no disminuyen lo suficiente como para causar una hemorragia postoperatoria anormal.

CIRCULACION EXTRACORPORA (IN VITRO)
SIMULADA CON OXIGENADOR DE MEMBRANA

El funcionamiento de las plaquetas en contacto con las superficies sintéticas puede ser examinado durante la C.E.C simulada con oxigenador de membrana. Los sistemas in vitro tienen la ventaja sobre los sistemas que emplean el modelo animal al eludir el inconveniente de la hemodilución. (66).

Cuando la sangre humana es anticoagulada con heparina y recirculada a 37 grados centígrados in vitro con oxigenador de membrana, las plaquetas circulantes disminuyen aproximadamente un 20% con respecto a los valores normales del inicio de la circulación extracorpórea y posteriormente aumenta dicho porcentaje en las siguientes horas (67).

Un factor importante de dicha pérdida plaquetaria de la circulación in vitro está claramente relacionado con la adhesión plaquetaria a la superficie de la interfase, como ha sido visualizado por microscopía electrónica de barrido .

Las interacciones interplaquetarias con formación de agregados, ocurre en la sangre circulante y contribuye también a la pérdida temporal de plaquetas .

La exposición previa de superficies

sintéticas a la albúmina disminuye la afinidad de la superficie por plaquetas y es suficiente para prevenir la disminución de las plaquetas circulantes por hasta 6 horas.

La adsorción de albúmina reduce la liberación de gránulos plaquetarios y preserva de forma importante de la integridad morfológica y funcional de la plaqueta (68). La albúmina adsorta a la superficie puede reducir la adhesión plaquetaria al limitar la disponibilidad de lugares de fijación de la superficie sintética para el fibrinógeno.

Alternativamente la albúmina puede fijar los productos del metabolismo del ácido araquidónico con la consecuente inhibición del reclutamiento plaquetario.

La proteína específica de plaquetas de baja afinidad (factor plaquetario IV), ha sido empleado como un indicador sensible de la reacción de la liberación plaquetaria en el circuito in vitro (69).

Durante la circulación in vitro, los niveles plasmáticos de dicho factor plaquetario aumentan durante los primeros minutos y alcanzan aproximadamente el 50% del nivel del factor plaquetario liberado en la primera hora de la CEC. (69).

La liberación de los gránulos densos presumiblemente también ocurre, dado que no hay antecedentes

para la liberación de dicho factor sin liberación concomitante de los gránulos densos .

Estos datos toman consistencia con las observaciones realizadas con microscopía electrónica durante CEC in vitro, en la que se observa dicha degranulación .

No está totalmente el mecanismo por el cual la reacción de la liberación plaquetaria es disparado en el circuito in vitro .

Es sabido que cuando las plaquetas son estimuladas por agentes agonistas solubles, la reacción de liberación ocurre al menos por tres vías de acoplamiento estímulo-respuesta.

La respuesta plaquetaria en CEC simulada in vitro con oxigenador de membrana, puede ser atenuada si al circuito se le adiciona prostaciclina (PGI₂) o prostaglandina E₁ (PGE₁) (71) .

La prostaciclina es un potente inhibidor plaquetario sintetizado por el endotelio de las células vasculares que actúa como agente antitrombótico por estimulación de la adenilatociclasa y con un aumento del AMP cíclico intracelular .

Estos son los motivos por los que la adición de prostaciclina al reservorio venoso del circuito de perfusión (previo al inicio de la CEC) simula las características antitrombogénicas del endotelio

vascular, previniendo los efectos adversos de la reacción entre la plaqueta y la superficie como son la adhesión plaquetar y la liberación del factor plaquetar en dicho modelo experimental (71).

CIRCULACION EXTRACORPOREA SIMULADA IN
VITRO
CON OXIGENADOR DE MEMBRANA .

Durante la CEC simulada in vitro con oxigenador de burbuja se producen alteraciones morfológicas y funcionales de las plaquetas como resultado de la interacción de plaquetas con la interfase aire - sangre. Estas alteraciones ocurren en adición a aquellas producidas por interacciones plaquetarias con superficies sintéticas.

En la interfase aire -sangre las plaquetas se adhieren a películas de proteínas plasmáticas que contienen fibrinógeno en forma similar a lo que ocurre en la interfase sangre superficie sintética .

Desde hace tiempo se conoce en la interfase sangre -gas la desnaturalización de las proteínas plasmáticas así como la destrucción de gran número de plaquetas .

Durante la CEC in vitro con oxigenador de burbuja, la cuenta de plaquetas circulante disminuye de forma

más gradual que durante la CEC con oxigenador de membrana (72).

La liberación de gránulos plaquetarios es pronunciada, aunque no tanto como con oxigenador de membrana, estas diferencias pueden reflejar el hecho de que los oxigenadores de burbuja contienen menos área de superficie sintética para la interacción plaqueta -superficie

En el circuito de oxigenador de burbuja ,sin embargo no hay evidencia de retorno de plaquetas a la circulación, reflejando presumiblemente destrucción plaquetaria (73).

La incompleta preservación de la función plaquetaria resultante de la inhibición en la interacción plaqueta-superficie sintética y la falla de las plaquetas para retornar a la circulación , después de circulación extracorporea con oxigenador de burbuja, indica que la interfase plaqueta-aire induce una lesión plaquetaria directa que se agrega a la que resulta de la interacción plaqueta -superficie .

PLAQUETAS EN CIRCULACION
EXTRACORPORA
IN VIVO CON AMBOS OXIGENADORES

Durante la CEC in vivo la cuenta plaquetaria cae al igual que durante la

CEC simulada.

En la CEC in vivo , la hemodilución es un factor principal causante de la disminución de dicha cuenta plaquetaria y en menor proporción debida a la adhesión plaquetaria en superficies sintéticas y formación del agregado plaquetario .

Durante la CEC in vivo con oxigenador de membrana en humanos , se observa una disminución de la cuenta plaquetar, en el proceso de la CEC y después de dicho periodo. La dilución es responsable en mayor porcentaje de dicha caída, sin embargo cuando se hacen las correcciones para la dilución, la cuenta plaquetaria corregida está también, de forma significativa, reducida, lo que refleja la ocurrencia de agregación plaquetaria inducida por interacción plaqueta-superficie. . Aunque la cuenta plaquetaria circulante aumenta durante la CEC desde su nadir , posterior al inicio de CEC, por razones no precisadas vuelve a declinar después del postoperatorio hasta el tercer día (74).

En contraste empleando el sistema oxigenador de burbuja, la disminución en el número de plaquetas es debida principalmente a dilución (75)

Se ha documentado la reacción de liberación con secreción del contenido de los gránulos plaquetarios, en ambos tipos de oxigenadores, en experimentos

animales y humanos, por medición de los niveles plasmáticos de las proteínas específicas liberadas de los gránulos plaquetarios (tromboglobulinas FP4). (76).

Los cambios cuantitativos se acompañan de alteraciones cualitativas de en la función plaquetaria (77). Así mismo se ha observado disminución de los receptores plaquetarios para fibrinógeno y una sensibilidad disminuida a los agonistas solubles disparadores. Por tanto existe una capacidad alterada para la activación normal de la función plaquetar.

La reacción de la liberación plaquetaria durante la CEC in vivo incluye la liberación del contenido de los gránulos lisomiales (hidrolasas), indicando que las superficies sintéticas muestran algunas de las características de los agonistas fuertes (79). Estos efectos funcionales persisten por varias horas y contribuyen a la prolongación del tiempo de sangría postoperatorio observado después de CEC.

El defecto patológico preciso, responsable de la alteración funcional resultante, permanece parcialmente explicado. La evidencia disponible parece indicar que la minoría de las plaquetas está totalmente activada, pero la mayoría circulan con función reducida (80).

Se han propuesto varias hipótesis

para explicar dichos defectos funcionales (74,75). El defecto puede ser debido a la depleción parcial de los gránulos de depósito resultante de la liberación de los gránulos alfa y densos . Otras teorías especulan con la presencia de un inhibidor de la función plaquetaria circulante , o bien la presencia de una anomalía reversible de la membrana plaquetaria responsable de alteraciones en los receptores para los agonistas disparadores (81). Además del circuito extracorpóreo y del oxigenador, otros factores contribuyen a las alteraciones cualitativas de la plaqueta durante la CEC in vivo. La hipotermia ha sido demostrada como causante de la disfunción plaquetar. Puede aparecer trombocitopenia transitoria debida al secuestro de plaquetas cuando la temperatura corporal disminuye debajo de los 25 grados centigrados (82). Así mismo , estudios in vitro demostraron abolición de la agregación debajo de los 33 grados centigrados (83).

Los sistemas de aspiración en cardiotoromía , al retornar sangre del campo operatorio producen interfases sangre -gas y sangre-tejido induciendo activación y lesión plaquetaria.

El volumen y porcentaje de sangre aspirado por estos sistemas se correlaciona directamente con la pérdida de plaquetas (84).

Los filtros incluidos en el

circuito de perfusión para reducir el número de microagregados circulantes, pueden de forma paradójica a la formación de agregados plaquetarios, al proveer superficies para la activación y/o destrucción de plaquetas .

Otras posibles causas de trombocitopenia o disfunción plaquetaria siguientes a circulación extracorpórea son la agregación plaquetaria inducida por catéteres pulmonares arteriales, heparina , protamina , complejos de heparina, protamina así como el ADP liberado de los eritrocitos liofilizados .

La reducida función plaquetaria producida por la circulación extracorpórea es temporal y los tiempos de sangría suelen retornar a la normalidad a las cuatro horas posteriores a la finalización de la CEC (85).

Este retorno de la función puede indicarnos la recuperación de las plaquetas inhibidas o bien la aparición de un sustancial número de plaquetas nuevas .

JUSTIFICACION.

La cirugía cardiaca empleando circulación extracorpórea, es un procedimiento que se ha difundido en diferentes sectores hospitalarios del País y resuelve un numeroso grupo de casos. Esto se debe en parte a que en México, la fiebre reumática sigue siendo un problema de salud y deja secuelas que requieren de tratamiento quirúrgico, específicamente de instalación de prótesis valvulares. Por otra parte también se ha incrementado el número de casos de cardiopatía isquémica que requiere tratamiento quirúrgico mediante la revascularización coronaria. Para ello es necesario someter a los enfermos a CEC y emplear oxigenador. Se ha observado que un número elevado de enfermos presenta hemorragia abundante en la primera hora del postoperatorio que frecuentemente obliga a reintervenciones y que deben ser tratadas con elevados volúmenes de fracciones sanguíneas.

La hemorragia abundante, puede frustrar lo que la cirugía había corregido. En estudios previos efectuados en el INC, hemos observado que las alteraciones de la coagulación que se presentan corresponden fundamentalmente a disminución en la cuenta de plaquetas, además de alteraciones en la fase plasmática y en

la fibrinólisis. Sin embargo el descenso observado en la cuenta de plaquetas , no justifica totalmente la alteración en esta fase de la hemostasis, por lo que es de suponer que ocurren además alteraciones funcionales.

El presente estudio tiene como justificación indagar la alteración estructural que se produce en las plaquetas cuando los enfermos son sometidos a Circulación Extracorpórea.

Existen reportes aislados de que los diferentes tipos de oxigenador pueden lesionar en grado variable la estructura plaquetar , incluyendo al contenido de organelos, que obviamente repercuten en una disminución entre las funciones de las plaquetas, específicamente en la adhesión, en la agregación y las funciones secretoras.

Al determinar cual tipo de oxigenador se relaciona con mayores alteraciones plaquetares, permitirá seleccionar con mayor seguridad, el modelo adecuado para aplicar a dichos pacientes . Además la identificación de estas alteraciones permitirá tomar medidas preventivas que logren disminuir la morbilidad postoperatoria

OBJETIVOS

1.- Conocer las variaciones en la cuenta de plaquetas , el volumen plaquetar medio , el trombocrito durante la CEC con distintos tipos de oxigenador .

2.- Conocer y cuantificar las alteraciones ultraestructurales de la plaqueta en distintos momentos y distintos tipos de oxigenador.

3.- Determinar en que momento de la circulación extracorporea se inician las variaciones de estos parametros

4.- Relacionar las alteraciones plaquetares encontradas con el tipo de oxigenador y la magnitud de la hemorragia postoperatoria .

MATERIAL Y METODOS

Para estudio se conformaron dos grupos de pacientes sometidos a C.E.C. en cirugía cardiovascular:

I.- Grupo I (pacientes sometidos a CEC con oxigenador de membrana).

II.- Grupo II (pacientes sometidos a CEC con oxigenador de burbuja).

CRITERIOS DE INCLUSION:

- 1.- Pacientes entre los 18 y 65 años.
- 2.- Que sean sometidos a cirugía cardiaca de primera vez .
- 3.- Que sean sometidos a C.E.C. por más de 30 minutos.
- 4.- Cuenta plaquetaria preoperatoria superior a 130.000/ml.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- 1.- Antecedentes de enfermedad hemorrágica .
- 2.- Ingesta de anticoagulantes dos semanas previas.
- 3.- Ingesta de antiagregantes plaquetarios dos semanas previas.
- 4.- Enfermedad hepática.
- 5.- Hiperesplenismo.
- 6.- Transfusión de plaquetas durante el procedimiento .

Al grupo I pertenecieron 18 pacientes (5 del sexo femenino y 13 del masculino). Su edad promedio fue de 58+/- 13 años.

El grupo II estuvo constituido por 16 pacientes (7 del sexo femenino y 9 del masculino), con una edad promedio de 50+/-11 años.

El peso corporal promedio de ambos grupos fue de 71+/-18 kilogramos; no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos para dicha variable .

El tipo de cirugía al que fueron sometidos fue el siguiente:

Grupo I : 13 para revascularización miocárdica , 4 valvulares y un congénito

Grupo II : 5 para revascularización miocárdica , 9 valvulares , un congénito y un mixoma de aurícula izquierda.

El tiempo de C.E.C. al que fueron sometidos fue :

Grupo I : 115 minutos +/- 43

Grupo II: 93 minutos +/-37 (Gráfica XVI)

No hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto al tiempo de C.E.C. entre ambos grupos de estudio.

El tiempo de pinamiento aórtico fue :

GRUPO I : 58+/- 21 minutos .

GRUPO II: 49 +/-22 minutos .

(Sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos).

La dosis de heparina promedio administradas fueron :

GRUPO I : 28.570 +/-8.561 unidades.

GRUPO II : 27.235 +/-7.985 unidades.

(Gráfica XVII)

(Sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos).

Las dosis de protamina promedio administradas fueron :

GRUPO I : 238 +/- 54 unidades.

GRUPO II : 229 +/- .48 unidades .

(Sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos)

Estos datos han sido incluidos en material y métodos para demostrar la homogeneidad de ambos grupos y no como resultados objetivos perseguidos durante este trabajo .

Se cuantificó la cantidad de sangre en las 24 horas posteriores a la C.E.C . en mililitros.

Dos casos, ambas mujeres sometidas a revascularización coronaria, pertenecientes a distintos tipos de oxigenador no fueron incluidas en dicha cuantificación, ya que fallecieron en el postoperatorio inmediato, sin relación a hemorragia . También se cuantificó la cantidad de plasma ,paquetes globulares y unidades de plaquetas recibidas durante las primeras 24 horas. Dichas fracciones fueron medidas en mililitros

Para la realización del estudio citométrico y de microscopía electrónica, se tomaron muestras basales dentro de las primeras 24 horas previas a cirugía, y a los 30, 60, 90 y 120 minutos en función del tiempo de C.E.C. alcanzado en cada paciente, así como una toma de muestra 30 minutos posterior al cese de la perfusión.

Para la toma de muestras se utilizaron dos tubos de plástico. En cada tubo se colectaron 5 mililitros de sangre venosa. Un tubo contenía EDTA (Etilen diamino tetra acetato), como anticoagulante que se envió al Departamento de Hematología del Instituto Nacional de Cardiología, para ser analizada por un método automatizado con un aparato Coulter-Counter S Plus, para así obtener de cada momento:

- 1.- Número de leucocitos .
- 2.-Número de eritrocitos .
- 3.-Hemoglobina .
- 4.- Hematocrito.
- 5.-Volumen corpuscular medio.
- 6.- Número de plaquetas .
- 7.- Trombocrito .
- 8.-Volumen plaquetar medio.

En el otro tubo eran vertidos otros 5 mililitros de sangre venosa, para ser procesados en el Departamneto de Microscopía Electrónica del Instituto.

A dicho tubo se le había agregado

previamente Citrato de sodio al 3%, para evitar la coagulación y poder separar con facilidad el plasma rico en plaquetas .

La precocidad en el envío de dicha muestra , fue un factor de suma transcendencia para obviar la activación de las plaquetas, Inmediatamente recibida la muestra, se procedía a centrifugar durante 10 minutos a 1000-1500 revoluciones por minuto (rpm).

Una vez separado el plasma rico en plaquetas éste era lavado tres veces con solución de Gacodilato de Sodio 0.19 Molar a un PH de 7.4 durante 10 minutos en cada lavado, agitando suavemente y centrifugando en cada fase de dicho proceso .

Posterior a la serie de lavados, se procedió a la fijación.

La primera fijación se realizó con Glutaraldehído al 2.5% en Solución Buffer de Gacodilato de sodio 0.19 Molar con PH de 7.3 durante 10 minutos.

La segunda fijación se realizó con Glutaraldehído a 2.5% más ácido Tánico de alto peso molecular al 0.5%. (86) en Solución Buffer de Gacodilato de sodio al 0.9 Molar, a un PH de 7,3-7,4 durante una hora .

En la tercera fijación, se utilizó Tetraóxido de Osmio al 1% en Solución Buffer de Gacodilato 0.19 Molar a un PH de 7.3-7.4 durante una hora. (87).

Nuevamente se lavaron y posteriormente se procedió a la deshidratación en alcoholes graduales. Inmediatamente a este proceso de deshidratación el producto era incluido en resinas epóxicas. Una vez obtenida esta inclusión en resinas en forma diferida se realizaron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo MT1 de un grosor aproximado de 70 nms, con cuchilla de vidrio. Los cortes obtenidos eran montados en rejillas de Lakoe de 3 milímetros de diámetro, cubiertas con film de Formvas reforzado con cubrimiento de Cardón. Posteriormente eran teñidas con sales de Acetato de Uracilo acuoso al 3.5 % y con citrato de sodio al 0.3% (88).

Los cortes ultrafinos fueron observados con un microscópio electrónico EM 9 Zeiss a un aumento de 10.400.

Se realizaron 6 microfotografías electrónicas al azar en cada muestra, utilizando Electron Microscope film de 100 (7X7cm) Kodak.

El número total de microfotografías obtenidas al final del estudio fue de 869.

Para el análisis estructural de las plaquetas realizado en el departamento de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Cardiología (INC).

Los films obtenidos, fueron

procesados en el centro de Instrumentos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), utilizando una computadora PC-SX 386 (DELL) con monitor VGA color, Tarjeta digitalizadora Matrox, Mcuse Microsoft, Programa IMAL Biocom, al cual se le adaptó una cámara CCD (QUON) con lente macro (Cannon), la cual está unida por un brazo a un Negatoscópico, en el que se colocaban dichos films. Además se utilizó un monitor accesorio para visualizar en forma simultánea las funciones del programa y medidas así como la imagen de la plaqueta proyectada.

Tras un periodo de pruebas se ideó el subprograma para obtener el análisis más adecuado de medidas de imágenes.

Entre las aportaciones se incluyó la valoración del Factor de Forma, parámetro que relaciona el perímetro y la superficie de la imagen seleccionada, en el cual los valores que se acercan a 1, tienden hacia la esfericidad y los valores que se acercan a 0, a una mayor irregularidad y deformación de la estructura analizada (89,90). Con lo cual podíamos evitar el valor relativo del conteo de número de pseudópodos en la plaqueta como parámetro indicador de activación, ya que se observaron en las plaquetas activadas durante C.E.C. numerosas y variadas deformaciones, sin poderse por ello catalogar como emisión

de pseudópodos .

Los parámetros que se analizaron en dicho proceso fueron:

- 1.- Perímetro de la Plaqueta .
- 2.- Superficie por corte de sección cruzada de plaqueta .
- 3.- Diámetro mayor de la Plaqueta .
- 4.- Superficie del sistema canalicular abierto .
- 5.- Factor de Forma.

Así mismo se identificaron y cuantificaron :

1.- Gránulos alfa : Estructuras redondeadas u ovaladas de moderada densidad electrónica .

2.- Gránulos densos : Estructuras redondeadas con un cuerpo central sumamente electrodenso , usualmente rodeado de un área electrolúcida y una membrana electrodensa.

3.- Mitocondrias : Estructuras redondas o elongadas, las cuales demuestran una membrana interna y una membrana interna con pliegues ,llamadas "crestas".

4.- Sistema Canalicular abierto: Estructuras vacías con variadas formas y rodeado de una delgada membrana .

5.- Glucógeno : Acumulos o granos aislados de moderada electrodensidad. Este último fue valorado de forma semicuantitativa de la forma siguiente :

Valor 1: Glucógeno escaso o nulo .

Valor 2: Acúmulos de Glucógeno o distribuidos en forma dispersa en cantidad normal .

Valor 3: Glucógeno discretamente aumentado, no superando un área total de 0.14 micras cuadrado de superficie por plaqueta.

Valor 4: Grandes acúmulos de Glucógeno con superficie total superior a 0.15 micras cuadradas (Foto 3).

El primer paso en el tratamiento de la imagen es la calibración para la cual se coloca en el Negatoscopio un patrón con medidas previamente conocidas y tras ser enfocada dicha imagen se inicia la digitalización. Posteriormente se traza un segmento visualizado en la pantalla, introduciendo las unidades a la que corresponde con la equivalencia conocida (10.400 aumentos).

Una vez calibrado el film en negativo, es tratado por medio de una tabla de inversión para pasar la imagen a positivo.

Dicha tabla de inversión se define a partir de un programa promedio de varios negativos analizados con el objetivo de analizar que interfieran la visualización de la estructura plaquetaria (91).

Esta primera imagen adquirida es guardada en memoria y guardada en otro archivo, para así poder trabajar con dicha imagen.

A la imagen original se le realiza un realze de Rehaoss.

La copia de la imagen es tratada

con la aplicación de un filtro de 30 X 30, y una vez filtrada se le realiza una recta óptica de la original (92). La imagen que resulta es multiplicada por una constante (2) y posteriormente se le realiza la segmentación utilizando la técnica de "Umbralaje" y por la cual podemos regular la luminosidad en un rango entre 0 y 255 como valor máximo .

La fijación del contraste también es manipulada y nos permite observar y regular con diferente coloración los organelos de la plaqueta en función de su electrodensidad (foto1), así como cuantificar el Glucógeno plaquetario (Foto 3).

Esta regulación del contraste pasará finalmente a llenar la superficie de la plaqueta para así poder delimitarla .

Una vez obtenida la imagen " ideal" y fijado el nivel de contraste , el programa utiliza los niveles de "umbralaje " para realizar la " poligonización" , con la opción de poder rectificar si este contorno no se ajusta a los verdaderos contornos de la plaqueta .

Una vez obtenidos y corregidos los contornos se selecciona la plaqueta que se deseamos analizar , siendo guardado el contorno de interes , en otro segmento de la memoria .

Posteriormente el contorno se llena de blanco y se realiza "lógica de AND"

(93) ., quedando la plaqueta aislada .

Una vez aislada, demandamos al programa la cuantificación de superficie, Factor de Forma , Perimetro y Máximo diámetro por corte de sección cruzada de plaqueta (Foto 4, 7)

Una vez registrados dichos parámetros, accedemos nuevamente al programa para medir el sistema canalicular abierto, utilizando nuevamente las técnicas citadas anteriormente y desechando las imágenes que no pertenecen a dicha estructura .

Todos los datos han sido registrados

.
El tratamiento estadístico se analizó con la prueba de Student entre los distintos momentos y tipos de oxigenador utiliza.

RESULTADOS

CITOMETRIA: (ver tablas y gráficas)

CUENTA PLAQUETARIA.:- La cuenta plaquetaria basal fue de 200.611 pL/ml en los pacientes sometidos a oxigenador de membrana (Grupo I), y de 202.562 Pl/ml en el grupo de oxigenador de burbuja (Grupo II). La cuenta no tiene diferencia significativa entre ambos grupos al iniciarse la cirugía. La tabla IA demuestra que a partir de los treinta minutos existe una disminución significativa (p menor 0.001) en el número de plaquetas en los dos grupos con respecto al basal (Grupo I : Caída de 47.3% y Grupo II : Caída del 57.5 %) , que se mantiene durante todos los momentos de la circulación extracorpórea hasta finalizado el estudio. A partir de los 60 minutos y hasta el final , aparece una diferencia significativa en el número de plaquetas entre el grupo I y II , siendo el número mayor en el primero (p menor a 0.01).

Como se observa en la gráfica X , en el grupo de oxigenador de membrana I, hay una disminución muy importante, ya mencionada a los 30 minutos , y que a partir de ese momento existe una recuperación gradual en la cuenta

plaquetaria hasta los 120 minutos sin alcanzar significación estadística. Los controles de los 90 y 120 minutos son mayores que la cuenta final en forma significativa, en dicho grupo (p menor 0.02 y P menor 0.05 respectivamente). En dicha gráfica se puede observar también que en el grupo II el comportamiento es distinto, con una disminución progresiva en el número plaquetario hasta el final,, pero sin alcanzar significado estadístico.

VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO:

El registro basal no demuestra diferencias significativas entre ambos grupos . El volumen plaquetario medio (VPM) del grupo I fue de 7.94 +- 0.97.micras cúbicas ,y el grupo II fue de 7.93 +-0.82 micras cúbicas .

A los treinta minutos se observa una disminución en ambos grupos en el VPM (Grupo I del orden del 9.1% y grupo II del 7,1 %) que posteriormente se incrementa hasta el final del procedimiento sin alcanzar en ningún momento significancia estadística .(Gráfica XI).

TROMBOCRITO:

El trombocrito medio en la medición basal fue en el grupo I de 0.173+- 0.06 % y en el grupo II fue de 0.172 +-

0.04%, sin diferencias significativas (p mayor 0.05).

A los 30 minutos existe una caída del trombocrito del 53% en el grupo I y del 64.8% en el grupo II (p menor 0.01)

Esta disminución se mantuvo en forma significativa hasta el final. (Gráfica XII) .

HEMOGLOBINA :

No hubo diferencias significativas en los valores medios de hemoglobina (HB) entre ambos grupos en el registro basal (Grupo I con 12 ,138 +- 1,660 gramos / decilitro y Grupo II con 12,700 +-1,690 gramos / decilitro) : También se observó una marcada caída de la HB a los 30 minutos de iniciada de la C.E.C. (Grupo I del orden del 20 ,1% y grupo II del 23,7 % en ambos grupos , que se mantuvo con respecto al basal en forma significativa en el grupo I hasta los 120 minutos y en el grupo II hasta el final .Existe un incremento de dichos valores al finalizar la CEC en ambos grupos, en el grupo I solamente con respecto a los 30 minutos (p menor 0.02) y en el grupo II con respecto a los 90 y 120 minutos (P menor 0.05 y p menor 0.01 respectivamente).

En ningún momento en el transcurso del estudio se observaron diferencias significativas entre ambos grupos .(

Gráfica XIV).

HEMATOCRITO:

Los valores basales fueron en el grupo I de $41.01 \pm 3,13 \%$ y en el grupo II de $42,37 \pm 2,80\%$, no teniendo diferencias significativas. En la comparación por momentos entre ambos grupos no hubo diferencias significativas, salvo a los 120 minutos en que en el Grupo I hubo un hematocrito mayor que en el Grupo II (P menor 0,001). A los 30 minutos se observó un descenso en el hematocrito (Hto) en ambos grupos) Grupo I de $25,8 \%$ y grupo II de $27,9 \%$) con significado estadístico (P menor 0.001) que se mantuvo hasta el final del estudio con iguales características. En el registro final hubo una recuperación del Hto en ambos grupos, que alcanzó significancia estadística en el grupo II con respecto a los 30 minutos .(P menor 0.02), 60 minutos (p menor 0,01), 90 minutos (p menor 0,002) y 120 minutos (p menor 0,001).

En el grupo I los valores fueron significativamente superiores al final con respecto a los 30 minutos (p menor 0,01) , 60 minutos (0,05) y 90 minutos (p menor 0,02) (Gráfica XIII).

LEUCOCITOS :

Los valores basales medios en el grupo de oxigenador de membrana (I) fueron de 6.555 ± 1.839 leucocitos / mililitro y en el grupo de oxigenador de burbuja (II) fueron de 6.262 ± 1.831 leuc / mililitro, sin diferencias estadísticamente significativas. Luego de una disminución no significativa de leucocitos a los 30 minutos en ambos grupos (Grupo I del orden del 20,3% y grupo II del 14,6%) existe un incremento progresivo hasta el final alcanzando significado estadístico con respecto al basal ,30 y 60 minutos (p menor 0,01, p menor 0,001, y p menor 0,01 respectivamente) en el grupo II .

La cuenta final de leucocitos fue superior en forma significativa al basal (p menor 0.001), 30 minutos (p menor 0.001), 60 minutos (p menor 0.001) y 90 minutos (p menor 0,01) en el grupo I .

No se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de oxigenadores en ningún momento del estudio con respecto a esta variable (Gráfica XV).

MICROSCOPA ELECTRONICAPERIMETRO PLAQUETARIO :

El valor medio en el grupo I , fue de $6,95 \pm 1,95$ micras y en el grupo II

fue de 7,05 +- 2,17 micras ,
nuevamente, sin diferencias
significativas. A partir de los 30
minutos hubo un incremento en esta
variable del orden del 11 % en el grupo
I y del 11,5 % en el grupo II. De los
90 minutos en adelante el perimetro
plaquetario fue mayor en el grupo I que
en el grupo II en forma
estadísticamente significativa (
90 minutos, 120 minutos y final con p
menor 0.01). Sin embargo el
incremento en el perimetro que se ve
desde los 30 minutos en ambos grupos
alcanza valores significativamente
mayores en el grupo II a los 30 minutos
con respecto a los 90 minutos (p menor
0.01), 120 minutos (p menor 0.01) y
final (p menor 0.05); y a los 60
minutos con respecto a los 90 minutos (
p menor 0,01) ,120 minutos (p menor
0.01) y final (p menor 0.05) en dicho
grupo .

En el grupo I , el perimetro
plaquetario fue mayor al final (p menor
0.01) y a los 120 minutos (p menor
0.01) con respecto al basal .) Gráfica
II.

SUPERFICIE PLAQUETARIA POR
CORTE DE SECCION CRUZADA

La superficie plaquetaria por corte
de sección cruzada en el grupo I es
2.54 +- 1,12 micras cuadradas y en el
grupo II es de 2,64 +- 1,2 micras

cuadradas, sin diferencias significativas entre ambos grupos. A los 30 minutos aumenta un 10,6 % en el grupo I y disminuye un 7,2% en el grupo II sin llegar a ser significativos estos cambios. Los valores fueron superiores en el grupo I con respecto al grupo II, a los 30, 90 y 120 minutos (p menor 0.02) .

La superficie plaquetaria al final en el grupo I fue mayor que la basal y a los 90 minutos (p menor 0.01). En el grupo II la superficie fue mayor que a los 90 minutos en forma significativa (p menor 0.01). Gráfica I

FACTOR DE FORMA

Los valores medios basales en el grupo I fueron de $0,69 \pm 0,15$ y en el grupo II de $0,69 \pm 0,016$, no encontrándose diferencias significativas. A los 30 minutos se observó una disminución con respecto a los basales del 23% en el grupo I, y de 35 % en el grupo II, ambos con significancia estadística (P menor 0.01). Estas diferencias se mantuvieron hasta el final del procedimiento con la misma significancia estadística .

El factor de forma en el grupo I fue superior que el del grupo II a los 30 y 60 minutos, con p menor 0.001. En el grupo II posterior al descenso marcado de los 30 minutos existe hasta el final un progresivo incremento en el

factor de forma con diferencias significativas entre los 90 minutos con respecto a los 30 y 60 minutos (P menor 0.02 y p menor 0.01 respectivamente), y entre los 120 y los 30 y 60 minutos (p menor 0,001 y p menor 0.01 respectivamente).

En el grupo I , la disminución alcanzada a los 30 minutos se mantiene sin cambios estadísticamente significativos hasta el final en este factor de forma.
(Gráfica III)

SISTEMA CANALICULAR :

El valor basal promedio en el grupo I expresado en superficie, fue $0.10 \pm 0,07$ micras cuadradas y de $0,09 \pm 0.08$ micras cuadradas en el grupo II. Estos cambios no eran significativos desde el punto de vista estadístico.

A los 30 minutos se observa un incremento del 160% en el grupo I y del 177 % en el 2 , siendo esta diferencia estadísticamente significativa con el basal. (p menor 0.001) en ambos . Esta diferencia se mantiene hasta el final con la misma significancia. En el grupo II a los 90 minutos se alcanza el valor máximo de superficie con diferencias significativas con respecto a la basal (P menor 0.001) , a los 60 minutos (p menor 0.02), 120 minutos (p menor 0.01) y final (p menor

0.001). Gráfica V.

DIAMETRO MAYOR

Los valores promedio en el grupo I del diámetro mayor fue de 2,24 \pm 0,66 micras y en el grupo II 2,28 \pm 0.72 micras. Esta diferencia no fue significativa. A los 30 minutos se encuentra un incremento en este diámetro del orden del 13 % en el grupo I y del 10 % en el grupo II.

Este incremento tiene significancia estadística en ambos grupos (p menor 0.01 y p menor 0.05 respectivamente).

En el grupo I el incremento alcanzado a los 30 minutos se mantiene a los 60 y 90 minutos (p menor 0.001 y p menor 0.01 respectivamente), y a los 120 minutos y al final con p menor 0.01 con respecto al basal. En este mismo grupo existe además una diferencia significativa entre los 120 y los 60 y 90 minutos (P menor 0.02) a favor del primero. En el momento final y los 60 y 90 minutos también existe una diferencia significativa (p menor 0.05) a favor del primero .

El diámetro mayor fue significativamente más alto a los 120 minutos y al final en el grupo I en relación al grupo II (P menor 0.001). Gráfica IV .

GRANULOS ALFA POR CORTE DE
SECCION CRUZADA

En el grupo I el valor promedio del conteo de gránulos alfa fue 8.13 +- 5.4 y de 8.42 +- 4.8 en el grupo II, en el basal, no siendo significativa esta diferencia. A los 30 minutos se observan en ambos grupos una disminución del número de gránulos alfa (en el Grupo I fue de 20,7 % y en el II del 26,2 %) alcanzando significancia estadística (p menor 0.01 y p menor 0,001 respectivamente).

En el grupo de oxigenador de Burbuja (II) se mantiene esta diferencia con iguales características hasta los 120 minutos y al final los valores se incrementan con respecto a los 60, 90 y 120 minutos en forma significativa (p menor 0.01 para los tres momentos) pero que se sigue manteniendo por debajo del valor basal con una p menor a 0,05. En el grupo de oxigenador de membrana (I) a los 60 minutos no hay diferencias significativas con respecto al basal, pero si a los 90 y 120 minutos (p menor 0,05 y p menor 0.02 respectivamente en donde vuelve a ser menor.

Entre el conteo inicial y final del grupo I, no existe diferencia significativa, pero este último es mayor que el de los 30, 60, 90 y 120

minutos en forma significativa (p menor 0.01, p menor 0.02 , p menor 0.01 y p menor 0.01 respectivamente). A partir de los 60 minutos y hasta el final el número de gránulos alfa es significativamente mayor en el grupo I que en el II (P menor 0.01 , p menor 0.01 , p menor 0.05 y p menor 0.02 respectivamente) Grafica VI .

GRANULOS DENSOS POR CORTE DE SECCION CRUZADA

El número promedio de los gránulos densos por corte de sección cruzada fue de 0.44 +- 0.25 y para el grupo II de 0.43 +- 0.21. Esta diferencia no alcanzó significancia estadística . No se encontró cambios significativos durante todo el estudio y tampoco entre ambos grupos(Grafica VII)

MITOCONDRIAS POR CORTE DE SECCION CRUZADA

El conteo basal de mitocóndrias por sección cruzada fue en el grupo I de 1,19 +- 1,13 y en el grupo II de 1.13 +-1.2. Nuevamente no hubo diferencias significativas entre ambos grupos en el registro basal . A los 30 minutos se encontró una disminución en el número de mitocóndrias del orden del 19,3 % en

el grupo I y del 15,1 % en el grupo II, pero que no alcanza significancia estadística comparada con el basal. Dichos valores continúan disminuyendo en ambos grupos, en el grupo I el conteo de los 60 y 120 es significativamente menor que el basal (p menor 0,02) y el grupo II a los 60 , 90 y 120 también es significativamente menor que el basal (p menor 0,05, p menor 0.01y p menor 0.05 respectivamente). En el minuto 90 se observó que el número de mitocondrias era menor en el grupo II en comparación al grupo I en forma significativa (p menor 0.01). Sin embargo al final esta diferencias no eran significativas. Gráfica VIII.

GLUCOGENO.

El valor basal calculado en forma semicuantitativa fue para el grupo I de 2,20 \pm 0.84 y para el grupo II de 2.06 \pm 0.89 sin diferencias significativas entre ambos .

A los 30 minutos se observó una disminución del 9,1 % en el grupo I y del 8,7 % en el II : Este cambio fue significativo (P menor 0,05%) . En el grupo I existe un incremento relativo al final en relación a los 30 , 60 y 90 minutos (Pmenor 0.001) lo que lleva a que no existan diferencias significativas entre los valores

basales y finales.

En el grupo II se observó la mayor disminución en el Glucógeno a los 90 minutos con respecto al basal (p menor a 0,05) con posterior recuperación, no estableciéndose diferencias significativas a los 120 minutos y al final con el basal. Sin embargo se observó menos cantidad de Glucógeno en el grupo II , en relación al primero , y est diferencia fue significativa (p menor 0.01). Gráfica IX .

CANTIDAD DE HEMORRAGIA EN LAS PRIMERAS
24 HORAS

La cantidad de sangrado para el grupo I fué de 459 mililitros +- 355 y de 815 mililitros +- 661 para el grupo II , con diferencia significativa .(p menor 0.05) Gráfica XVIII.

CANTIDAD DE FRACCIONES SANGUINEAS
TRANSFUNDIDAS EN LAS PRIMERAS 24
HORAS

PLASMA :

Para el grupo I un promedio de 788 +- .324 mililitros y de 980 +- 411 mililitros para el grupo II. No encontrando diferencias significativas entre ambos grupos .

PAQUETES GLOBULARES :

La cantidad de paquetes globulares fue de 340 +- 493 mililitros para el grupo I y de 524 +- 580 en el Grupo II, no encontrando diferencias estadísticamente significativas.

CONCENTRADOS DE PLAQUETAS :

Fueron transfundidos la cantidad de 15 +-63 para el grupo I y 34 .60 +- 62.90 para el grupo II , sin diferencias significativas entre ambos grupos . Gráfica XIX.

DISCUSION

Nuestra observación confirma hallazgos , previamente reportados en la literatura , en relación al número de plaquetas durante la C.E.C. .

La cuenta plaquetaria cayó alrededor de un 50% en ambos tipos de oxigenadores , tan pronto como a los 30 minutos de iniciado el procedimiento(74). Se ha explicado este fenómeno como dependiente en gran medida de la hemodilución que se produce necesariamente para iniciar la CEC , para así cebar el circuito con soluciones (75).

Otro factor involucrado en esta disminución , es la activación que sufren las plaquetas por adhesión a superficies sintéticas, agregación y consumo de las mismas por destrucción en las interfases gas-sangre (71,72 y 73).

Existen marcadores biológicos, de que dicha activación se está llevando a cabo (ej: Factor plaquetario IV de baja afinidad) (69).

El mecanismo exacto que lleva a esta activación está parcialmente aclarado . También observamos el comportamiento distinto en función del tipo de oxigenador utilizado para la CEC (72).

En el grupo del oxigenador de burbuja se produce una caída gradual y progresiva de la cuenta plaquetaria

durante todo el tiempo de C.E.C., a diferencia del oxigenador de membrana en que existe una recuperación parcial a partir de los 60 minutos, estableciéndose una diferencia significativa a favor de este grupo durante el resto de la C.E.C (p menor 0.01). Esta observación no confirma hallazgos previamente reportados en la clínica, en los cuales no se encuentran diferencias significativas en el número de plaquetas entre ambos tipos de oxigenadores(93,94). Sin embargo nuestros resultados están acordes con estudios clínicos más recientes(95).

Pocos estudios han evaluado el comportamiento del volumen plaquetario medio "durante" la C.E.C. (96,97), pero varios han estudiado los cambios en el volumen plaquetario medio, antes y después de la C.E.C.(98): Reportaron una disminución significativa del mismo en el postoperatorio. Nosotros no encontramos diferencias significativas durante e inmediatamente después de la C.E.C. en esta variable, pero hubo una disminución a los 30 minutos de iniciada la misma que no alcanzó significancia estadística, y a partir de ese momento una recuperación con respecto a los valores basales.

En nuestro estudio hubo una caída significativa del trombocrito con respecto al inicial, a partir de los 30 y durante todo el transcurso de

C.E.C . y que atribuimos a dilución .

El comportamiento de la hemoglobina fué bimodal, con un descenso marcado y precoz de la misma , que se mantiene hasta los 120 minutos para luego recuperarse parcialmente.

Atribuimos estos cambios en gran medida a la hemodilución de la fase inicial , aunque no podemos valorar el papel de otros factores (Ej : Pérdidas sanguíneas intraoperatorias) que hayan contribuido a este descenso y que dependan más del tipo de cirugía : La recuperación final la explicamos por la transfusión habitual de sangre a que son sometidos estos pacientes al momento de salir de la C.E.C..

El hematocrito presentó una evolución similar a los descritos previamente para la hemoglobina , y los atribuimos a los mismos fenómenos .

Los cambios en el número de Leucocitos durante la C.E.C están bien caracterizados desde hace largo tiempo (99).

Nuestros hallazgos corroboran en todo, las alteraciones previamente descritas en la cuenta leucocitaria .

Tan importante como las alteraciones cuantitativas son las cualitativas , con especial referencia a la disminución de la capacidad fagocítica y quimiotáctica en los leucocitos sometidos a C.E.C., punto este que no fue evaluado en el presente estudio (100 y 101).

Existe una disminución temprana al inicio de la C.E.C. en la cuenta leucocitaria que se recupera durante el transcurso de la misma, para llegar al final a valores significativamente más altos a los basales.

Por el diseño de este estudio no se evaluó el comportamiento tardío de los glóbulos blancos, luego de finalizada la C.E.C. No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos de oxigenadores con respecto a esta variable.

El área de sección cruzada y el perímetro de las plaquetas obtenidos en la medición basal de nuestro estudio está acorde con datos previamente comunicados en la literatura médica (102).

En este estudio se utilizaron métodos de análisis morfométricos similares a los nuestros. Durante la C.E.C. aumenta en forma significativa el área de sección cruzada y el perímetro plaquetario variando el momento de máximo incremento de estas variables en función del tipo de oxigenador. Es así que en el oxigenador de burbuja, es más precoz que en el de membrana. Explicaciones posibles para este fenómeno podrían ser la aparición de plaquetas jóvenes e inmaduras secundaria a estimulación de la mielopoyesis, por un lado, y a una deformabilidad aumentada dependiente de la estimulación plaquetaria con

formación de pseudópodos .El factor de Forma no ha sido estudiado previamente durante C.E.C . Nosotros observamos una disminución marcada con diferencia significativa (p menor 0.01) , a los 30 minutos de iniciada la C.E.C . con respecto a los valores basales . Esto sugiere que una mayor deformación plaquetaria ha ocurrido y que se puede correlacionar con la emisión de pseudopodos secundaria a la activación plaquetaria. La diferencia encontrada en favor de los sistemas de oxigenador de burbuja en la disminución de este factor a los sistemas de membrana, apoya una mayor y más precoz activación de las plaquetas en los primeros .

El sistema canalicular en ambos tipos de oxigenadores aumenta de forma significativa su superficie a los 30 minutos, para mantenerse hasta el final con las mismas características : Este aumento del área refleja una activación plaquetaria significativa con ambos sistemas. Un hecho a resaltar es que a los 90 minutos de la C.E.C con oxigenador de burbuja hay un incremento mayor en forma significativa con respecto a la basal , 60, 120 y final.

Los valores del diámetro mayor por corte de sección cruzada en el momento basal son similares a los reportados en otros estudios de microscopía electrónica (102). Se observó un aumento de este diámetro a

partir de los 30 minutos en forma significativa en ambos grupos , correlacionando este fenómeno con los relatados en superficie de corte de sección cruzada y perímetro .

El número de gránulos alfa por corte de sección cruzada en la medición basal en nuestro estudio fue mayor que la reportada por otros (102) en forma significativa .Este estudio tuvo un número inferior de plaquetas estudiadas que el nuestro . Se observó una disminución ,marcada del número de gránulos alfa en ambos grupos , a partir de los 30 minutos con respecto al basal , manteniendose bajo dicho número durante toda la C.E.C. en el grupo de oxigenador de burbuja , con un nadir a los 90 y 120 minutos . En cambio en el grupo de oxigenador de membrana se observó un incremento final en la cuenta de estos gránulos no habiendo diferencias significativas con el basal pero sí con el conteo final del grupo de oxigenador de Burbuja . Esto sugiere una mayor preservación de la ultraestructura plaquetaria en el primer grupo . Existen estudios que describen pero no cuantifican ni especifican las características de este fenómeno (103) .

El conteo de los gránulos densos en la medición previa a la cirugía fue superior en nuestro estudio a reportes previos en forma significativa (p menor 0.01) (102) .

Nuevamente el número de plaquetas estudiadas fue marcadamente menor en el estudio citado (102). En el presente reporte, aunque se observó a partir de los 30 minutos una disminución del número de gránulos densos, esta no fue significativa en ningún momento, en contraposición a estudios aislados en que se describe pero no se cuantifica descenso de los mismos (103).

Aparentemente los gránulos resisten más el traumatismo, ya que no se observó una modificación significativa

El número de mitocondrias por corte de sección cruzada encontrados por nosotros en el conteo previo a CEC, fue similar al descrito en otro estudio (102), se observó una disminución de esta cifra a partir de los 30 minutos y que a los 60 minutos alcanza significancia estadística con respecto al basal de ambos grupos (p menor 0.05): En el minuto 90 el número de mitocondrias era significativamente menor en el grupo de oxigenador de burbuja, pero al final, no se mantuvo esta diferencia. Esta disminución probablemente está vinculada a la destrucción de dicho organelo por la activación, con la consecuencia potencial para la plaqueta de perder su fuente energética y con ello perder su capacidad proadherente y proagregante.

Al igual que con otros componentes intracelulares, existe una depleción

del glucógeno citoplasmico en el transcurso de la C.E.C.,, independientemente del oxigenador utilizado . Sin embargo , la caída es más marcada en el grupo de oxigenador de burbuja , sugiriendo un consumo metabólico y expulsión mayor por el sistema canalicular (Ver Fotografía 2) .Esto podría estar relacionado con la hipótesis de una activación más intensa y profunda de las plaquetas durante C.E.C. con oxigenador de burbuja. El nadir en la disminución del Glucógeno ocurre en el minuto 90 en este grupo , asociado al nadir de los gránulos alfa , mitocondrias y una mayor area de superficie del sistema canalicular. La recuperación parcial al final del número de partículas de glucógeno por plaquetas en ambos tipos de oxigenadores podría estar relacionada con una captación de las mismas del medio que rodea a la plaqueta o simplemente , reflejar la aparición de plaquetas nuevas , juvenes en la circulación .

La diferencia en el volumen de sangre perdida entre ambos grupos en las primeras 24 horas . Fue significativamente mayor en el grupo de oxigenadores de burbuja , aunque la cantidad de fracciones sanguíneas repuestas no tuvo diferencias significativas entre los dos grupos . Esto está acorde con una opinión minoritaria que demuestran que en el

sangrado es mayor con el uso de oxigenador de burbuja , aún no rebasando el límite considerado como seguro de dos horas, en la práctica clínica, para este tipo de oxigenador (104).

CONCLUSION

Los hallazgos de este estudio demuestran una diferencia significativa entre el grupo de oxigenador de burbuja y el de membrana en las siguientes variables :

- Número de plaquetas, trombocrito , Factor de forma , gránulos alfa , mitocondrias y partículas de glucógeno , siendo más pronunciados estos cambios en el primer grupo .

Esto sugiere que el daño en la estructura y el consiguiente compromiso en la función plaquetaria es mayor durante la C.E.C . que emplea el Oxigenador de Burbuja. .

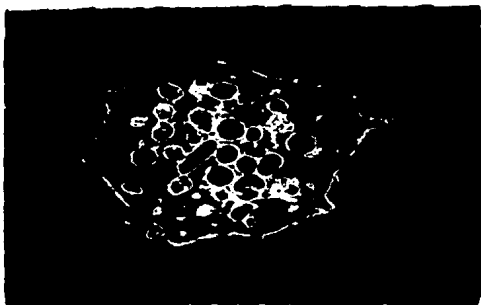
A los 90 minutos de la C.E.C.en Oxigenador de burbuja estas diferencias alcanzan su mayor significancia .

La mayor cuantía del sangrado en las primeras 24 horas del postoperatorio en este grupo puede ser dependiente de este fenómeno .

En base a este estudio concluimos , que el uso del oxigenador de burbuja para la circulación extracorporea en cirugía cardiovascular , debe limitarse a aquellos procedimientos en los que se prevea una duración de la perfusión menor de 90 minutos .



Plaqueta basal (En azul se identifican Gránulos Alfa)

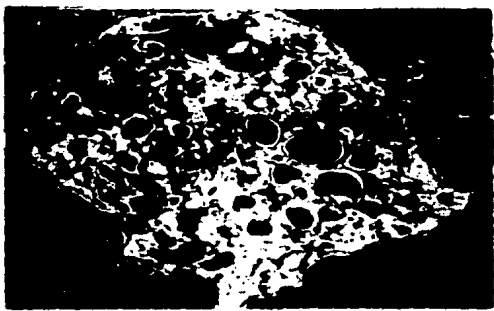


Plaqueta a los 120 minutos de C.E.C con Oxigenador de Membrana . Probablemente plaqueta joven.

F 2. TECNICA PARA DELIMITAR Y CUANTIFICAR EL SISTEMA CANALICULAR ABIERTO



Plaqueta correspondiente al momento final con Oxigenador de Membrana.



F3.
TECNICA PARA VALORAR LA CANTIDAD DE GLUCOGENO PLAQUETAR 65



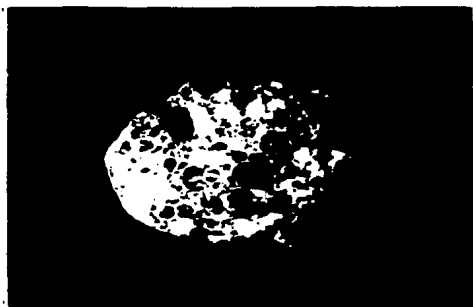
Plaqueta con valor de 4 en la escala configurada.



F TECNICA PARA DELIMITAR Y AISLAR A LA PLAQUETA.



Plaqueta correspondiente al minuto 60 de C.EC.con Origenador de Membrana (Sistema canalicular con expulsion de Glucog)



Plaqueta aislada.

DISTINTOS MOMENTOS DE C.E.C. EN UN CASO REPRESENTATIVO
CON OXIGENADOR DE BURBUJA.



BASAL



30 Minutos.



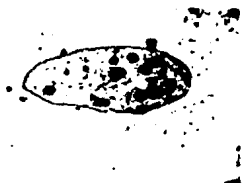
90 Minutos



Final .

DISTINTOS MOMENTOS DE C.E.C .EN UN CASO REPRESENTATIVO

CON OXIGENADOR DE MEMBRANA.



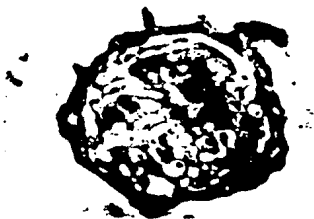
BASAL



30 Minutos.



90 Minutos.



Final.

	BASAL		30 Minutos		60 Minutos		90 Minutos		120 Minutos		FINAL	
	n	y ± Sg	n	y ± Sg	n	y ± Sg	n	y ± Sg	n	y ± Sg	n	y ± Sg
No de Plaquetas M No de Plaquetas B (miles/ μ l)	18 16	200:62 202:43	18 16	105:30 109:44	18 13	109:44 62:26	16 8	117:37 54:27	8 4	118:34 46:29	18 16	90:22 56:22
Del. Plaquetas Media M Del. Plaquetas Media B (μ %)	18 16	7.9:0.97 7.9:0.82	18 16	7.2:0.91 7.3:0.99	18 13	7.5:0.89 7.6:1.0	16 8	7.5:0.93 7.2:1.4	8 4	7.7:0.96 7.6:1.55	18 16	7.8:1.0 7.6:0.98
Trombocrito M Trombocrito B (%)	18 16	0.17:0.06 0.17:0.04	18 16	0.08:0.02 0.06:0.02	18 13	0.09:0.03 0.07:0.01	16 8	0.08:0.1 0.06:0.01	8 4	0.09:0.01 0.07:0.02	18 16	1.0:0.01 0.6:0.01
No de Leucocitos M No de Leucocitos B (miles/ μ l)	18 16	6.55:1.8 6.26:1.83	18 16	5.22:2.6 5.3:2.0	18 13	5.6:2.9 5.9:2.7	16 8	7.56:3.0 7.84:4.4	8 4	9.23:3.2 7.32:5.2	18 16	11.7:5.1 10.0:4.5
Hematocrito M Hematocrito B (%)	18 16	41.0:3.1 42.3:2.8	18 16	30.4:3.21 30.5:4.0	18 13	31.0:4.84 29.6:3.72	16 8	30.7:3.9 29.2:2.1	8 4	33.3:3.5 28.2:1.7	18 16	35.0:5.3 34.5:4.6
Hemoglobina M Hemoglobina B (g/dl)	18 16	12.1:1.66 12.7:1.69	18 16	9.77:1.19 9.69:1.66	18 13	10.0:1.39 9.06:1.34	16 8	9.88:1.6 9.55:1.11	8 4	10.2:1.3 8.8:0.79	18 16	11.2:2.2 10.8:1.6

M MEMBRANA
B BURBUJA

g MEDIA
Sg DESVIACION STANDARD

• 1 YTDVI

	BASEL		30 Minutos		60 Minutos		90 Minutos		120 Minutos		FINAL	
	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$
Perimetro Burbuja Perimetro Membrana (μ)	07	7.05 \pm 2.17	124	7.05 \pm 1.05	01	7.99 \pm 2.32	66	6.75 \pm 1.04	36	6.51 \pm 2.48	100	7.21 \pm 2.47
	110	6.95 \pm 1.95	127	7.75 \pm 2.10	135	7.65 \pm 2.50	119	7.65 \pm 2.41	62	6.99 \pm 3.57	144	8.11 \pm 2.33
Superficie Burbuja Superficie Membrana (μ^2)	07	2.64 \pm 1.20	124	2.45 \pm 1.13	01	2.50 \pm 1.06	66	2.09 \pm 0.93	36	2.43 \pm 1.02	100	2.56 \pm 1.0
	110	2.54 \pm 1.12	127	2.81 \pm 1.20	135	2.71 \pm 1.33	119	2.51 \pm 1.33	62	2.09 \pm 1.20	144	2.92 \pm 1.2
Factor de Deformación B Factor de Deformación M	07	0.70 \pm 0.16	124	0.45 \pm 0.15	01	0.40 \pm 0.15	66	0.56 \pm 0.15	36	0.57 \pm 0.13	100	0.56 \pm 0.16
	110	0.69 \pm 0.15	127	0.53 \pm 0.16	135	0.56 \pm 0.15	119	0.55 \pm 0.10	62	0.52 \pm 0.15	144	0.56 \pm 0.15
Sistema Capilar B Sistema Capilar M (μ)	07	0.90 \pm 0.59	124	0.25 \pm 0.5	01	0.22 \pm 16.6	66	0.27 \pm 12.8	36	0.21 \pm 10.1	100	0.21 \pm 9.32
	110	0.10 \pm 7.47	127	0.26 \pm 25.1	135	0.21 \pm 19.1	119	0.23 \pm 19.1	62	0.26 \pm 20.6	144	0.22 \pm 15.7
Diámetro Burbuja Diámetro Membrana (μ)	07	2.20 \pm 0.72	124	2.55 \pm 0.66	01	2.49 \pm 0.53	66	2.35 \pm 0.55	36	2.51 \pm 0.44	100	2.41 \pm 0.59
	110	2.25 \pm 0.66	127	2.55 \pm 1.02	135	2.40 \pm 0.61	119	2.47 \pm 0.69	62	2.70 \pm 0.53	144	2.66 \pm 0.15

B BURBUJA
M MEMBRANA

\bar{y} MEDIA
 S_y DESVIACION STANDARD

	BASAL		30 Minutos		60 Minutos		90 Minutos		120 Minutos		FINAL	
	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$	n	$\bar{y} \pm S_y$
Gránulo α Burbuja Gránulo α Membrana	87 118	0.42±4.8 8.13±5.4	124 127	6.2±4.47 6.45±4.45	81 135	5.24±3.30 6.97±5.38	66 119	4.92±3.10 6.73±4.79	36 62	4.87±3.14 6.38±4.65	100 144	6.95±4.24 8.34±4.59
Gránulo Bensa Burbuja Gránulo Bensa Membrana	87 118	0.43±0.25 0.44±0.21	124 127	0.43±0.57 0.32±0.65	81 135	0.40±0.53 0.49±0.72	66 119	0.40±0.54 0.44±0.85	36 62	0.48±0.55 0.44±0.69	100 144	0.51±0.62 0.50±0.67
Mitochondria Burbuja Mitochondria Membrana	87 118	1.13±1.02 1.19±1.13	124 127	0.96±1.28 0.96±1.00	81 135	0.79±0.85 0.86±0.99	66 119	0.63±0.77 0.98±0.99	36 62	0.70±0.60 0.67±0.80	100 144	0.83±1.00 1.02±1.30
Glicógeno Burbuja Glicógeno Membrana	87 118	2.06±0.09 2.20±0.04	124 127	1.88±0.78 2.00±0.79	81 135	1.80±0.90 1.93±0.84	66 119	1.75±0.78 1.97±0.78	36 62	2.10±0.79 2.29±0.70	100 144	2.07±0.75 2.36±0.65

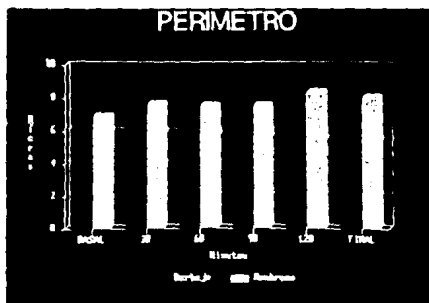
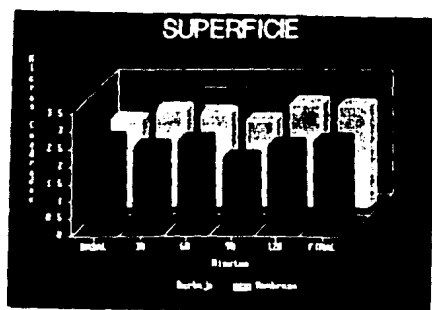
M MEMBRANA
B BURBUJA

\bar{y} MEDIA
 S_y DESVIACION STANDARD

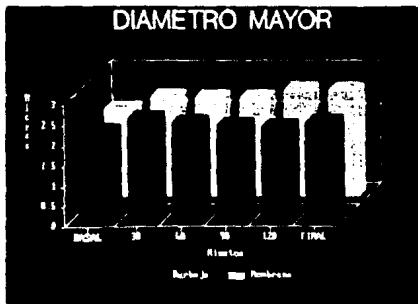
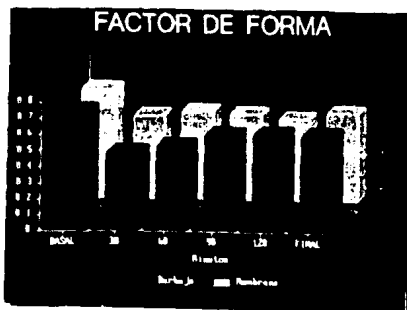
TABLA 3.

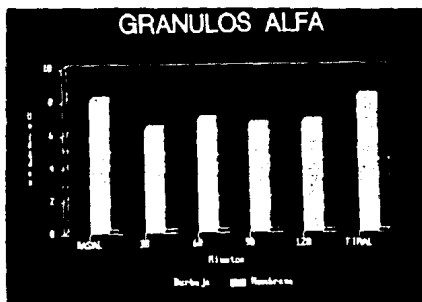
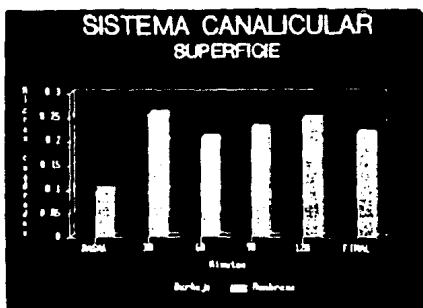
71

GRAFICA I

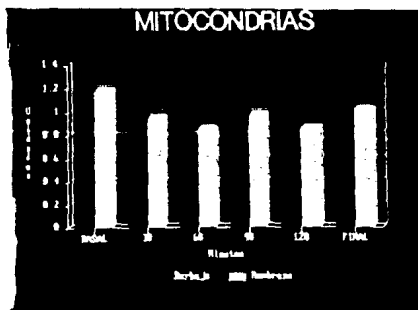
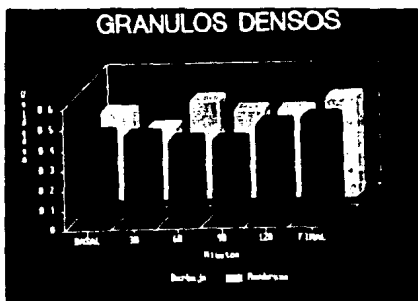


GRAFICA II

GRAFICA IIIGRAFICA IV

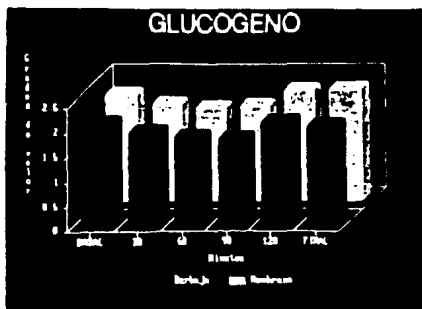
GRAFICA VGRAFICA VI

GRAFICA VII

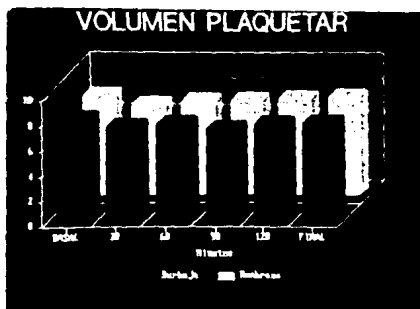
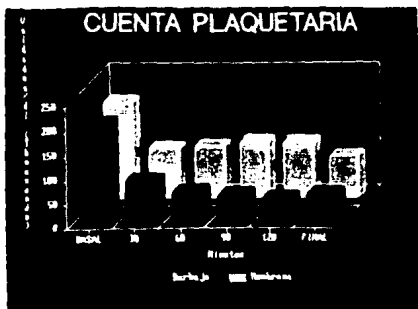


GRAFICA VIII

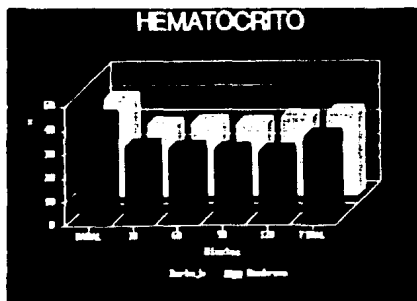
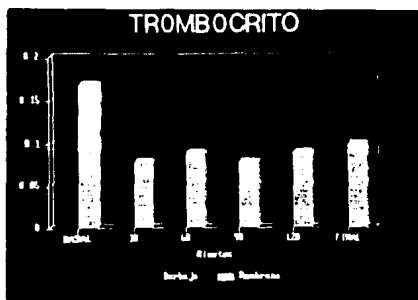
GRAFICA IX.



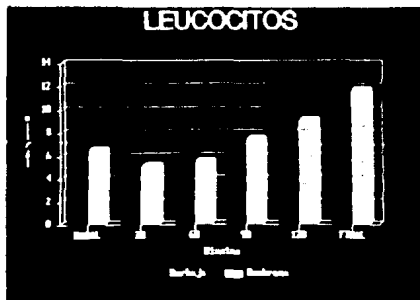
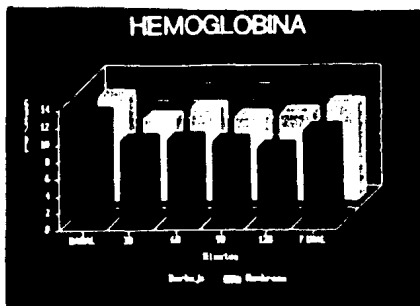
GRAFICA X



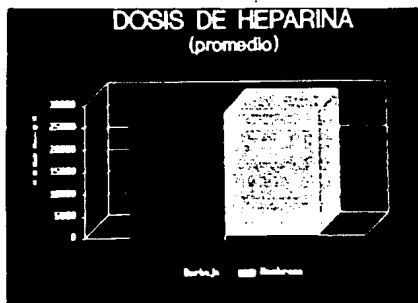
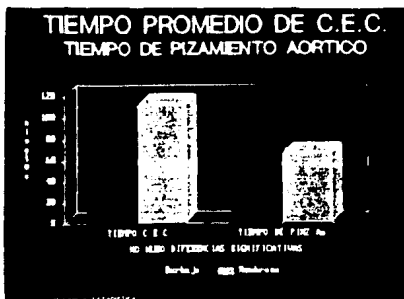
GRAFICA XI

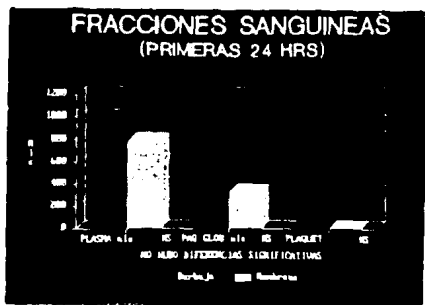
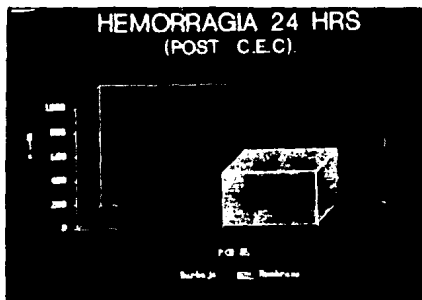
GRAFICA XIIGRAFICA XIII

GRAFICA XIV



GRAFICA XV

GRAFICA XVIGRAFICA XVII

GRAFICA XVIIIGRAFICA XIX

- 1.- MamenEF, Koest MH, Washington, et al: Hemostasis changes during cardiopulmonary bypass. Semin Trombosis Hemostasis. 11:281, 1985.
- 2.- Forbes CD. Thrombosis and artificial surfaces. Clin in Haematol. 10:653, 1981.
- 3.- Bessis M: Living blood cells an their structure springer-verlag. Berlin Hedelberg. New York. 1971.
- 4.- Wolpers and Ruska: Strukturuntersuchungen zur Blutgerinnung Klin Wschr, 1939.
- 5.- White JG: Platelet morphology. In Jhonson SA (ed): The circulating platelet: 45. New York Academic Press. 1971.
- 6.- Philips D: Platelet plasma membrane glycoprotins. J Biolog Chemic. 252:2121, 1977.
- 7.- Behnke, O: Electron microscopic observations on the membrane system of the rat blod platelet. Anat Rec. 158:121, 1967.
- 8.- George JN: Studies on platelet plasma membranes, Quantitative analisys of platelets membrane glycoproeins. J Lab Clin Med. 92:430, 1978.
- 9.- Weiss HJ, Tschopp TB: Impaired interaction (adhesion-aggregation) of platelets with the subendothelium in storage pool dusease abd after aspirin ingestion. N Engl J Med. 293: 619, 1974.
- 10.- Gerrard JM, Schollmeyer JV: Possible identify of actinin deficiency in thrombastenia. Am J Pathol. 94:509, 1979.
- 11.- Puszkin EG, Spaelc TH: Human platelet alpha actinin subcellular localitation. Circulation. 58:217, 1978.

- 12.- White JG: Effects of colchicine and vinca alkaloid on human platelets. I. Influence on platelets microtubules and contractile function. *Am J Pathol.* 53:281, 1968.
- 13.- White, JC: Fine structural alterations induced in platelets with adenosine diphosphate. *Blood.* 31:604, 1968.
- 14.- Cohen I, Gerrard JM: The role of contractile filaments in platelets activation. In *Protides in the biological Fluids.* pp 555, 1979.
- 15.- Pollard TD: Functional implications of the biochemical and structure properties of cytoplasmic contractile proteins. *Molecules and cell movement.* 259. New York Raven Press. 1975.
- 16.- Adelstein RS, Pollard TD: Platelets contractile proteins *Progr Hemost Tromb.* 4:37, 1978.
- 17.- White JG: Is the canalicular system the equivalent of the muscle sarcoplasmic reticulum? *Haemostasis.* 4:185, 1975.
- 18.-Zucker A: Atlas of blood cells. Function and pathology. *Ernes (ed).* 1981.
- 19.- Weiss HJ, Philips j: Separation of subunits of anti-hemophilic factor (AHF) by agarose gel chromatography. *Thromb Diath haemorrh.* 27:212, 1972.
- 20.- Sussman JJM Rosner H. Concentration-dependent dissociation of factor VIII/Von willebrandt factor in plasma and platelets. *J Clin Invest.* 65:1318, 1980.
- 21.- Fujimura Y, Titani LZ, Holland S et al: Von Willbrand factor. A reduced and alkylated. 52/48 KDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein. *J Biol Chem.* 261:381. 1986.

- 22.- Holsem W, Weiss HJ: Secretate storage pools platelets. *Ann Rev Med.* 30:119, 1979.
- 23.-Holsem H. Physiological functions of platelets. *Anal of Medicine.* 21: 23, 1989.
- 24.- Ugurbil K, Fukami MH: Proton NMR studies of nucleotide an amine storage in the dense granules of pig platelets. *Biochemistry.* 23:416, 1984.
- 25.- Stolz JF: Uptake and storage of serotonin by platelets. New York: Raven Press. p 37, 1985.
- 26.- Gogstad GO, Hagen I: Evidence for release of soluble, but not membrane-integrated proteins from human platelet a-granules. *Biochem Biophys Acta.* 702:81, 1982.
- 27.- Sander HJ, Slot JW, Bouma BM et al: Immunocytochemical localitation of fibrinogen platelet factor 4 and betathromboglobulin in thin frozen section of human blood platelets. *J Clin Invest.* 72:1277, 1983.
- 28.- Ginsberg MH, Painther RG, Forsyth K et al: Trombin increases expression of fibrinectin antigen on the platelet surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1980.
- 29.- Ross R, Raines EW: The biology of platelet-derived growth factor. *Cell.* 46:155, 1986.
- 30.-Niewlarowski S, Holt JC: Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins. In: *Haemostasis and thromosis.* Philadelphia JB Lippincott Company. p. 618, 1987.
- 31.- Chesney C, Poter D, Colman RW: Subcellular localitation and secretion of factor V from human platelets. *Blood,* 1981.

- 32.- Weiss, HJ, de Wite et al: Heterogeneity in storage pool deficiency: Studies on granule-bound substances in 18 patients including variants deficient in alpha-granules platelet factor 4, B-thromboglobulin and platelet derived growth factor. *Blood*. 54:1296, 1979.
- 33.- Svieuwenhuis HK, Akkerman JWN: Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein. *Nature*. 264:75, 1989.
- 34.- Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA: Identification of glycoprotein IV (CD 36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*. 264:75, 1989.
- 35.- Bourne HR, Masters SB, Mamalian G: Proteins: structure and function. *Biochem Soc Trans*. 15:35, 1987.
- 36.- Kramer BM, Checani GC: Stimulation of Ca^{2+} -activated human platelet phospholipase A2 by diacylglycerol. *Biochem J*. 248:779, 1987.
- 37.- Imaoka T, Asayi T: Platelet 47K phosphoproteins may not function as inositol phosphate 5-monoesterase and lipocortin. *FASEB J*. 3:A1287, 1989.
- 38.- Hathaway Jr, Aldelstein RS: Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:1653, 1979.
- 39.- Lebowitz EA, Cooker H: Contractile properties of actomyosin from human blood platelets. *J Biol Chem*. 253:5443, 1978.
- 40.- Daniel JL, Molish Jr; Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelets shape change

response. J Biol Chem. 259:9826, 1984.

41.- Sakon M, Tsujinaka T: A specific endogenous inhibitor of two forms of Ca^{++} activated neutral proteases in platelets. *Experientia*. 38:1099, 1982.

42.- Chiang TM, Le Couedic: The role of platelet-activating factor in platelet-aggregation. *Nature*. 255:799, 1979.

43.- Mills DCB: The role of cyclic nucleotides in platelets. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin Heidelberg. Springer-verlag 58/11. p. 73, 1982.

44.- Grant PG, Colman RW: purification of cAMP phosphodiesterase from platelets. *Methods enzymol*. 159:772, 1988.

45.- Taylor KM: Cardiopulmonary bypass, principles and management. Ed Chapman et Hall, 1986.

46.- Siderys H, Herod GT, Halbrook H et al: A comparison of membrane and bubble oxygenation as used in cardiopulmonary bypass in patients. The importance of pericardial blood as source of hemostasis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 69:708, 1975.

47.- Clark RE, Beauchamp RA, Magrath RA et al: Comparison of bubble and membrane oxygenators in short and long perfusions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 66:894, 1979.

48.- Peterson KA, Dewanjee MK, Kaye MP: Fate of 111 indium labelled platelets during cardiopulmonary bypass performed with membrane and bubble oxygenators. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 84:39, 1982.

49.- Dancy CM, Townsend ER, Boylett A et al: Pulmonary dysfunction associated with cardiopulmonary bypass: a comparison of bubble and membrane oxygenators. *Circulation*. 64(2):

54, 1981.

50.- Purce EC: The membrane versus bubble oxygenator controversy. *Ann Thorac Surg.* 29:497, 1980.

51.- Galletti PM, Richardson PD, Snider MT: Blood oxygenator testing and evaluation, Part I. Evaluation techniques. National Institute of Health. Report No NIH-69-2047-1, 1971.

52.- Pierce EC: Extracorporeal circulation for open-heart surgery, Thomas Springfield III, 1969.

58.- Mortensen JD: Evaluations of tests for blood damage produced by oxygenators. *Trans Am Soc Artif Int Organs.* 23: 747, 1977.

59.- Carlson Rg, Landé AJ, Landis B, et al: The Landé-Edwards membrane oxygenator during heart surgery: oxygen transfer, microembolism counts, and Mender-Gestalt visual motor scores. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 66:894, 1973.

60.- Dutton RC, Edmund LH Jr, Hutchinson Jc, et al : platelet agregate emboli produced in patient during cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenators and blood filters. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 67:258, 1974.

61.- Addonizio VP, Colman RW: Platelets and extracorporeal circulation. *Biomaterials* 3:9, 1985.

62.- Baier Re, Dutton RC: Initial events in interactions of blood with a foreing surface. *Biomed Mat Res.* 3:191, 1969.

63.- Portner PM, Green GF, Ramasany N: The blood interface at

artificial surfaces within a left ventricular assist system. Ann NY Acad SCI. 416:471, 1983.

64.- Hennessey VLJr, Hicks RE, Miewlarowsky et al: Function of human platelet during extracorporeal circulation. Am J Physiol. 232:622, 1977.

65.- Harker LA, Malpass TW, Branson AT, et al: Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass. Blood. 56:284, 1980.

66.- Addonizzio VP: Species effects in testing materials and cardiovascular devices in experimental animals. In Guiderlines for blood-materials interactions. National Heart, Lung and blood institute. NH Publication. No 85. 2185. July 1985.

67.-Addonizzio VPJr, Macarak J, Colman RW, et al: Preservation of human platelets with prostaglandin E during in vitro stimulation of cardiopulmonary bypass. Circ Res. 44:350, 1979.

68.- Addonizzio VP Jr, Macarak J, Micolaou KC, et al : Effects of prostacyclin and albumin on platelet loss during in vitro stimulation of extracorporeal circulation. Blood. 53:1033, 1979.

69.- Tamary Y, Aledort L, Puzskin E, et al : Functional changes in platelets during extracorporeal circulation. Ann Thorac Surg. 19:639, 1975.

70.- Addonizzio VPJr, Smith JB, Gurod LR, et al: The relationship between thromboxane synthesis and platelet protein release during simulated extracorporeal circulation. Blood. 54:371, 1979.

71.- Addonizzio VPJr, Macarak, EJ, Niewiarowski S, et al: Preservation of human platelets with prostaglandin E₁ during in vitro cardiopulmonary bypass. Circ Res 44:350, 1979.

- 72.- Addonizzio VPJr, Strauss JF, Colman RW, et al: Effects of prostaglandin E1 on platelet loss during in vivo and in vitro extracorporeal circulation with a bubble oxygenator. J Thorac. Cardiovasc Surg. 77:119, 1979.
- 73.- Van de Dungen JJ, Karliazek, GF, Brenken U, et al: Clinical study of blood trauma in perfuccion with membrane and bubble oxygenators. J Torac Cardiovasc Surg. 1982.
- 74.- Edmund LHJr, Ellison N, Colman RW, et al: Platelet function during cardiopulmonary bypass surgery. Semin Thromb hemost. 11:281, 1985.
- 75.- Mc Kenna R, Bachman F, Witaker B, et al : The hemostatic mechanism after open heart surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 70:298, 1975.
- 76.- Addonizzio VP, Fisher CA, Kappa JT, et al: Prevention of heparin-induced thrombocytopenia during open cardiac surgery with ZK36372 (cloprosi). Surgery. 102:796, 1987.
- 77.-Thomas R, Hessel, EA, Harker LA, et al: Platelet function during and after deep surface hypothermia. Surg Res. 31:314, 1981.
- 78.-Musial J, nieylarowsk S, Herschock D, et al: Loss of fibrinogen receptors from the platelet surface during simulated extracorporeal circulation. J Lab Clin Med. 105:514, 1985.
- 79.- Addonizzio VP Jr, Chang LK, Strauss JF, et al: release of lysosomal hydrolases during extracorporeal circulation. J Thorac Cardiovasc Surg. 84:28, 1982.
- 80.- Harker LA, Malpass TW, Branson HE, et al: Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonar bypass. Blood. 56:824, 1980.

- 81.- Edmunds LH, et al: Platelet function during cardiac operation. Comparison of membrane and bubble oxygenators. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 83:805, 1982.
- 82.- Aster RH: Thrombocytopenic due to sequestration of platelets. *Haematology* (ed3) New York. Mc Graw-Hill. p.1157, 1983.
- 83.- Holsnsen H, Karpatkin: Metabolism of platelets. *Haematology* (ed 3). New York. Mc Graw-Hill. p. 1157, 1983.
- 84.- Edmunds LH Jr, Saxena NC, Hilyer, et al: Relationship between platelet count and cardiotomy suction return. *Ann Thorac Surg.* 25:306, 1978.
- 85.- Sell LL, Cullen ML, Whittlesey GC, et al: Hemorrhagic complications during extracorporeal membrane oxygenation: Prevention and treatment. *J Ped Surg.* 21:1087, 1986.
- 86.- Nuñez-Duran H: Tannic acid as an electron microscope tracer for permeable cell membranes. *Stain technol.* 55:361, 1980.
- 87.- Riboni L, Ubaldo E, Nuñez-Duran H: Morphometric and three dimensional study of platelets during activation. *Karger acta Anat* 0001-5180/88.
- 88.- Nuñez duran H, Ubaldo E: Platelet-endothelium interaction in arterial lesions produced by ultrasound. *Journal TESEM.* Vol 12 No 3p. 27, 1981.
- 89.- Russ J: Computer-assisted microscopy; the measurement and analysis of images. Plenum Press. NY. EU. 1990.

- 90.- Rosenfeld A, Kak A: Digital picture processing. Academic Press, M.Y., 1976.
- 91.- Corkidi G, Garza M, Gonsbatt ME, et al: "El procesamiento digital de imágenes biomédicas: Grupo universitario interinstitucional". Ciencia y desarrollo (Revista de CORACYT) Número 97, vol XVII; MarzoAbril de 1991, pages 96-112.
- 92.- Corkidi G, Marquez J: Microestación de procesamiento digital de imágenes para aplicaciones biomédicas: Instrumentación y desarrollo. Revista de instrumentación y desarrollo de la SOMI, vol 3, No 2, 1991.
- 93.- Willian R .Friëdenberg, MD.O Myers et al: Platelet Dysfunction Associated with Cardiopulmonary Bypass: The Annals of Thoracic Surgery Vol25 N4 1978.
- 94.-Clark RE, Beauchamp ,RA Magrath RA, etal:Comparison of bubble and membrane oxigenators in short and long perfussions J Thorac . Surg , 655 1978.
- 95.- Henry Edmunds L . Ellison N. Colwan R et al : Platelet function during cardiac operation. Comparison of membrane and bubble oxigenators; J Thoracic Cardiovasc Surgery 83 , 805, 1982.
- 96.-Solis RT, Beall AC . Noon GP et al :Platelet aregation :effects of cardiopulmonary Bypas:Chest 67 (5) 558.1975.
- 97.- Mohr R :Effect of cardiac operation on platelets: J.Thorac Cardiovasc Surg (92) 434 Sept 1986.

- 98.- Laufer N, Merin G . Grover NB et al: The influence of cardiopulmonary Bypass on the size of human platelets.:
J Thorac Cardiovasc Surg 70 (4) 727 Oct 1975.
- 99.- Brinsfield DE . Hopf MA . Geering RB et al : Haematological changes in long -term perfusion: JApplPhysiol 17:531 1962
- 100.- Bubenick O, Meakins JL: Neutrophil chemotaxis in surgical patients : Effect of cardiopulmonary bypass: SurForum 27: 267 , 1976.
- 101.- Taguchi K , Takamura K , Mochizuki T et al : Alteration of the phagocytic function in cardiopulmonary Bypass: Hishima J Med Sci 25 (1) 7 1976.
- 102.- Chamberlain KG , Froebel M Macpherson J et al : Morphometric Analysis of Density Subpopulations of Normal Human Platelets : Thrombosis and Haemostasis 60 (1) 44 1988.
- 103 .- William R Friemdenberrg MD et al : Platelet Dysfunction Associated with Cardiopulmonary Bypass: The annals of Thoracic Surgery Vol 25 N 4 April 1978.
- 104.- Liddicoat JE : Bekassy SM: Beall AC Jr : Membrane VS bubble Oxygenator : Clinical comparison: Ann Surg 181 (5) 747 May 1975 .