

42
reje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

EVALUACION DE CONCENTRADOS PLAQUETARIOS POR MEDIO DE AGREGOMETRIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
RAQUEL LETICIA RAMIREZ TORRES

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

ENERO DE 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

*A mi esposo y a mi hija
porque son un motivo muy importante
para seguir superandome.*

A mi madre

A mis hermanos
Olga y Beto

A la madre de mi esposo

Por el apoyo incondicional brindado para que fuera posible la
realización de esta tesis

*Al Profesor Moises Flores E.
por sus consejos y apoyo
brindados en momentos muy
importantes para mi.*

Mi agradecimiento a las

Q.F.B. Margarita de Silva Rubio

y

Q.F.B. Martha Sánchez Rodríguez

Por el apoyo recibido para la elaboración de esta tesis

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA	4
MARCO TEORICO	5
OBJETIVOS	19
HIPOTESIS	20
DISENO DE INVESTIGACION	21
DISENO ESTADISCO	27
RESULTADOS	28
DISCUSION DE RESULTADOS	51
CONCLUSIONES	55
SUGERENCIAS	57
REFERENCIAS	58

RESUMEN

En este trabajo se realizó la estandarización de la prueba de agregometría para ser utilizada en el Banco Central de Sangre del Centro Médico "La Raza", para la cual se utilizaron cien muestras de sangre de los donadores "sanos" que acuden a este lugar . Estas muestras se evaluaron a las cinco horas de su obtención utilizando como agentes agregantes A.D.P. 5×10^{-4} y Adrenalina 0.005 mg/l; cuyas concentraciones máximas se obtuvieron previamente, midiendose también los parametros: número de plaquetas, porcentaje de agregación y tiempos de agregación.

Como una segunda parte de este trabajo se realizó una evaluación de concentrados plaquetarios almacenados bajo dos condiciones de temperatura: refrigeración y temperatura ambiente con rotación continua, utilizando como agentes agregantes los dos anteriormente mencionados.

De esta evaluación se observó que existe una marcada disminución de la función agregación conforme transcurre el tiempo de almacenamiento cuando se utilizaron A.D.P. y Adrenalina como agentes agregantes .

Los porcentajes de agregación de los concentrados almacenados en refrigeración, son mayores que los de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua cuando se utilizaron los dos agentes ya mencionados ($p < 0.05$); de igual forma sucede con los tiempos de agregación .

En los tiempos de agregación de los concentrados almacenados a temperatura ambiente, se observó una disminución conforme transcurre el tiempo de almacenamiento .En cambio los concentrados almacenados en refrigeración no se observó esta disminución .

INTRODUCCION

En los centros de salud constantemente se necesitan importantes cantidades de sangre y sus derivados como lo son los paquetes globulares, plasma, crioprecipitados y concentrados plaquetarios, a fin de satisfacer la demanda que es generada por diferentes causas. Los concentrados plaquetarios son utilizados en la terapia de enfermedades hemorrágicas (1).

Durante su almacenamiento, los concentrados plaquetarios humanos pierden progresivamente su capacidad para sobrevivir y su función *in vivo* después de la transfusión. Por lo que actualmente existe una gran controversia acerca de la técnica óptima para el almacenamiento de concentrados plaquetarios (2,3).

En el Banco Central de Sangre del Centro Médico "La Raza" se han realizado estudios sobre los factores que afectan a los concentrados plaquetarios durante el almacenamiento como son el cambio de pH y número de plaquetas, por lo que para completar dichos estudios se evaluarán dos diferentes temperaturas de almacenamiento por medio de la prueba de agregación plaquetaria utilizando esta prueba como un indicador de la viabilidad de estos concentrados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por estudios realizados anteriormente en cuanto al efecto del pH y el contenido de plaquetas se sabe que los concentrados plaquetarios se conservan viables por un tiempo de 120 hrs cuando son almacenados a temperatura ambiente con rotación vertical continua, y un tiempo de 72 hrs cuando son almacenados bajo refrigeración. Es necesario mencionar que después de estos tiempos mencionados el pH de los concentrados plaquetarios aumenta notablemente, lo que causa que la mayoría de las plaquetas pierdan su forma discoidal afectando drásticamente la funcionalidad de las plaquetas; la entrada de calcio al interior de la plaqueta produce también un cambio irreparable sobre esta dando el mismo resultado sobre la funcionalidad.

Como complemento a los estudios ya realizados se plantea utilizar la función agregación plaquetaria como evaluación de los concentrados plaquetarios y compararla bajo dos condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente con rotación vertical y refrigeración).

FUNDAMENTACION DEL PROBLEMA

Las enfermedades hemorrágicas que requieren de un tratamiento continuo de transfusión plaquetaria presentan como uno de sus principales problemas determinar la viabilidad de las plaquetas a ser usadas en la hemoterapia, puesto que se requiere para la efectividad del tratamiento que las plaquetas recobren en la circulación un número adecuado y la función hemostática de manera casi inmediato, o al menos parte de ella, después de la transfusión.

Por lo anterior, es necesario asegurarse que las condiciones de almacenamiento no afecten, o que el efecto a las funciones plaquetarias sea el mínimo posible; por lo que esto podría lograrse realizando un control sobre los concentrados plaquetarios ya que no solo conduce a mantener condiciones adecuadas de almacenamiento si no que además las pruebas de viabilidad establecen si dichas plaquetas conservan sus cualidades hemostáticas, o sea su funcionalidad .

MARCO TEORICO

Uno de los principales constituyentes de la sangre son las plaquetas, debido a que son nuestra primera y más importante línea de defensa contra la pérdida accidental de sangre, siendo también los más pequeños elementos celulares sanguíneos que se encuentran circulando (diámetro medio de 2 μm). Se producen en la médula ósea por invaginación y fragmentación del citoplasma de los megacariocitos (4,5).

Los megacariocitos proceden de una célula multipotencial capaz de diferenciarse en las líneas eritrocítica, mielocítica y megacariocítica. Las clasificaciones morfológicas arbitrarias, generalmente aplicadas a la serie megacariocítica, son: **MEGACARIOBLASTOS** para la forma más precoz; que es inicialmente de 20 a 30 μm de diámetro, posee un citoplasma basófilo y un núcleo ligeramente irregular con cromatina suelta, ligeramente reticular, y varios nucléolos (5-7).

PROMEGACARIOCITO O MEGACARIOCITO BASÓFILO para la forma intermedia.

MEGACARIOCITO MADURO acidófilo granular o productor de plaquetas (Fig. 1).

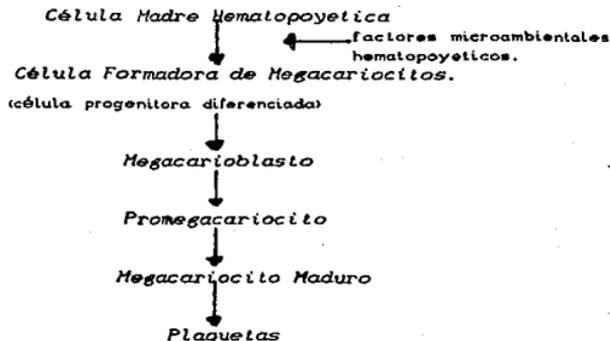


Fig.1 Serie megacariocítica. Fuente: Henry; 1964.

Las plaquetas contienen casi todos los rasgos estructurales de un glóbulo blanco (excepto el núcleo) y una compleja maquinaria enzimática para el metabolismo de la energía y de los lípidos; su vida media en el torrente circulatorio es de diez días (4).

Las plaquetas desempeñan un papel decisivo en la cohibición de las hemorragias, debido a que conforman el trombo plaquetario responsable de la hemostasia primaria o provisional, además suministran sustancias vasoactivas, como son la serotonina que también interviene en el proceso plaquetario de la hemostasia proporcionando factor plaquetario 3, un fosfolípido que actúa en la activación de la protrombina, y el factor plaquetario 4 que tiene efecto de antiheparina (4).

Estructura de la Plaqueta.

Para relacionar la estructura plaquetaria con la fisiología es conveniente considerar la morfología en subdivisiones funcionales (7-9). Hay 3 grandes zonas estructurales en la plaqueta, cada una de ellas ligada con algún aspecto específico de la función plaquetaria (fig.2).

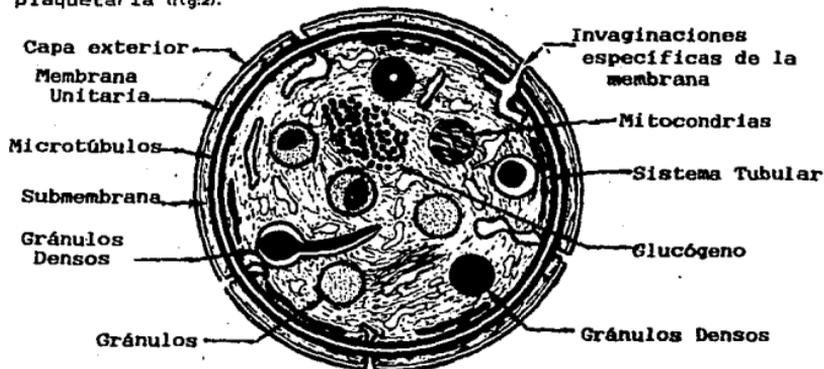


Fig:2 Estructura de la plaqueta . Fuente: Rathoff;1991

a.3) Submembrana.- En ella se observan finos filamentos distribuidos periféricamente a la banda de microtúbulos circunferenciales, se ha sugerido que éstos pueden contribuir a mantener la forma discoidal de la plaqueta y a participar en la formación y estabilización de pseudópodos.

b) Zona de Sol-Gel

Esta zona se considera como una división morfológica de las plaquetas líquidas a la función contráctil, debido a su relativa plasticidad de las plaquetas.

c) Zona de Organelos

En la matriz de la zona de sol-gel se encuentra flotando una gran variedad de elementos, formas y partículas, entre ellos gránulos, cuerpos densos y mitocondrias.

c.1) Gránulos.- Son de forma redonda y oval, tienen frecuentes variaciones de forma. Cada gránulo está encerrado en una membrana. En la tabla 1 se presentan los tipos de gránulos y el contenido de cada uno de ellos.

-GRANULOS α	GRANULOS DENSOS
Proteínas del plasma -antitripsina -macroglobulina C 1-inhibidor Proteínas de la Coagulación factor XI factor V fibrinógeno factor von Willebrand's Proteínas ligadas a la Heparina tromboglobulina (LAPP-4,PBP) factor plaquetario 4 Otras proteínas tromboposdin fibronectina gránulo dependiente de la activación de la membrana exterior	- Nucleótidos A T P A D P G T P - Otras moléculas Serotonina Calcio
GRANULOS LISOSOMALES	
- Enzimas hidrolíticas - Hidrolazas ácidas - β Galactosidasa - β Glucoronidasa - Heparitinasa - Elastasa - Colagenasa	

Tabla 1 : Diferentes tipos de gránulos y sus contenidos.

Fuente: William; 1991 .

c.2) Mitocondrias.- Las mitocondrias de las plaquetas son simples de estructura y pocas en número. Contribuyen significativamente al depósito metabólico de ATP, a fin de que el bloqueo de la glucólisis enzimática no afecte el nivel plaquetario de ATP o las funciones que requieran energía.

Además de los más importantes componentes ligados a las tres zonas funcionales, hay tres sistemas importantes en las plaquetas:

- a) El primero es un extenso sistema de canales tortuosos que comunican el plasma, física, morfológica y funcionalmente; el cual forma parte de la superficie celular.
- b) El segundo sistema es un aparato de Golgi, su papel es reducido parece tener alguna relación con la síntesis de proteínas.
- c) El tercer sistema esta estrictamente ligado a la banda circunferencial de microtúbulos que se encuentran dispersos al azar en la plaqueta. Se ha sugerido que el sistema tubular denso puede estar implicado en la elaboración de diversos componentes fibrosos de las plaquetas y pueden servir como modelo para la organización de la banda circunferencial de microtúbulos .

La función de las plaquetas se cumple por medio de una serie de relaciones interrelacionadas «».

1) Adhesión de plaquetas. Esta es la etapa inicial de la formación del tapón plaquetario y tiene lugar por contacto de la plaqueta con la pared del vaso, cuando ocurre alguna lesión en el vaso queda al descubierto el tejido conjuntivo subendotelial que está constituido por colágeno (Tipo I) . El mecanismo por el cual se lleva a cabo la adhesión es la unión de la glucoproteína I o glucocalicina con el colágeno por medio de una molécula de fibronectina o globulina insoluble, sugiriendo el papel de receptor para el colágeno.

2) Cambio de forma y contracción de la plaqueta. La adhesión de las plaquetas al colágeno provoca una serie de cambios en la misma, pierde su forma discoidea y adquiere una forma con emisión de pseudópodos. Simultáneamente tiene lugar una serie de fenómenos, todos ellos determinantes de la agregación plaquetaria: a) Contracción y relajación, b) síntesis de prostaglandinas, c) secreción del contenido de los gránulos.

a) Contracción y relajación: estos fenómenos desencadenados por el contacto con el colágeno se producen también por otras sustancias capaces de estimular la membrana de la plaqueta, entre las cuales se encuentran compuestos de bajo peso molecular como el ADP y serotonina, enzimas proteolíticas como trombina y tripsina, complejos antígeno-anticuerpo, virus, bacterias, endotoxinas, ácidos grasos y otras sustancias como el látex y zimosan. Los agentes inductores provocan una respuesta contractil de los microfilamentos que arrastran a la banda de microtúbulos en movimiento centrípeto quedando la zona de orgánulos en el centro rodeado por los microtúbulos. Si la intensidad del estímulo es alta con lleva a la salida del contenido de los gránulos.

Posteriormente se produce la relajación, volviendo el anillo de microtúbulos a su posición original y recobrando la plaqueta su forma discoidea. El mecanismo de contracción es similar a las fibras del músculo liso con requerimientos de calcio y participación de dos sistemas de canales de la submembrana que asemejan al músculo.

b) Síntesis de prostaglandinas: ésta se produce en la plaqueta, al estimular la membrana por inductores, activándose una enzima que es la fosfolipasa A₂, que libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. Se ha sugerido la hipótesis de que las prostaglandinas y en particular el tromboxano A₂ sirven de mensajeros químicos en la secreción del contenido de los gránulos, las evidencias sugieren que este tromboxano es el encargado de transportar calcio al citoplasma, dando lugar a la contracción y secreción del contenido granular. Algunos autores rechazan esta teoría y sostienen que la activación de las plaquetas por este tromboxano es secundaria a la secreción, ya que es necesaria la presencia de calcio para que se active la fosfolipasa A₂ que es el primer eslabón en la síntesis de tromboxano A₂.

c) Reacción de liberación o secreción: al producirse la contracción de la plaqueta, los organelos se mantienen en el centro y al producirse la relajación tiene lugar la expulsión del contenido de los orgánulos al exterior. En esta reacción sale el contenido de los gránulos α , gránulos densos, lisosomas.

3) Agregación o formación del trombo plaquetario

Todos los cambios producidos en la plaqueta por estímulo de su membrana, tales como contracción y emisión de pseudópodos favorecen la unión de unas plaquetas con otras para formar agregados; pero para que tenga lugar la agregación de las plaquetas son necesarios los siguientes factores:

1. Presencia de calcio extracelular,
2. Fibrinógeno extracelular, y
3. Presencia en la zona externa de la membrana de la plaqueta de las glucoproteínas IIB y IIIa que forman un complejo .

En la fig. se observa un resumen de los procesos anteriormente descritos .

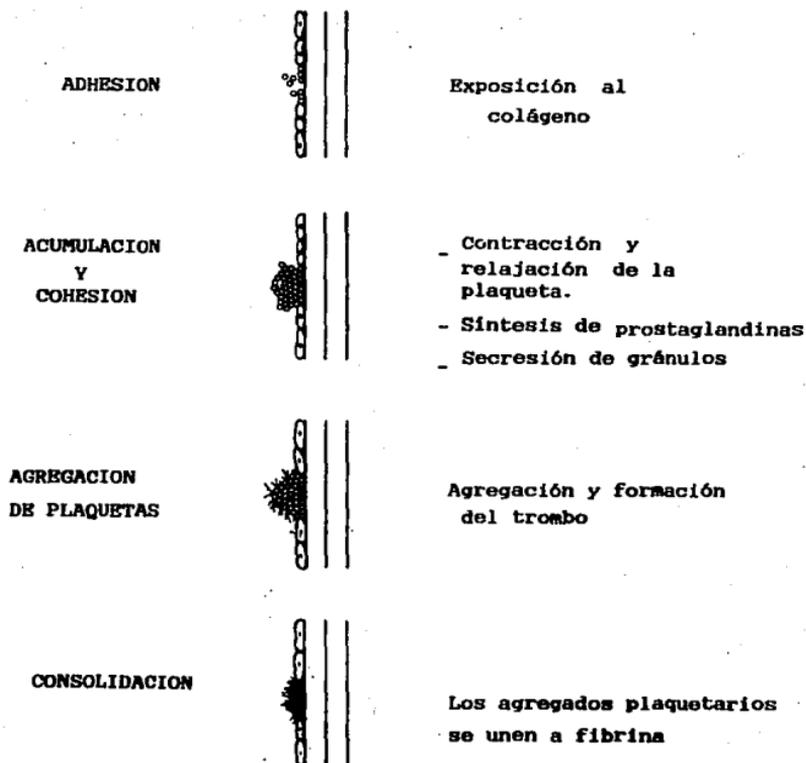


Fig:3 Resumen de las reacciones de la coagulación primaria

Fuente: Ratnoff; 1981

El mecanismo íntimo por el cual tiene lugar la unión de unas plaquetas es el siguiente (10,11):

En circulación las plaquetas son expuestas a la estructura fibrilar cuaternaria del colágeno, esta reacción es críticamente dependiente del factor Von Willebrand.

Todos los agonistas actúan sobre la membrana plaquetaria produciendo alteraciones en el potencial de membrana, flujo de iones y acción de los segundos mensajeros; incluyendo al calcio, 1,2 dicacilglicerol (DAG); inositol, 1,4,5 trifosfato (IP_3), endoperóxidos y tromboxano A_2 . Estos segundos mensajeros actúan sobre el receptor pasando una señal de transducción a la membrana resultando la activación de la fosfolipasa C, la cual da paso al fosfatidínisol y a otra serie de pasos que terminan con la activación de la miosina de cadena larga (fig.4).

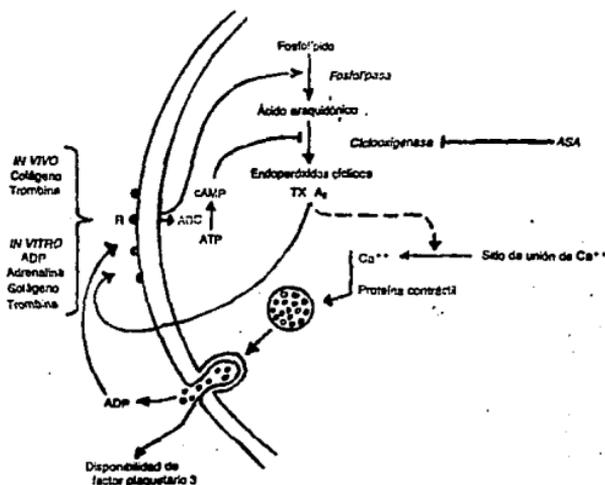


Fig.4: Mecanismos que intervienen en la respuestas de las plaquetas a estímulos específicos. Fuente: Monnenvirth spa.

Los agregados plaquetarios forman un trombo plaquetario inestable, si el estímulo cesa se produce la desagregación y las plaquetas recuperan su forma normal. Si el inductor es potente y mantenido, tiene lugar la formación de fibrina entre los agregados plaquetarios quedando estas atrapadas entre las redes de fibrina, con formación de un trombo estable y la agregación es irreversible.

Forma de medir la agregación plaquetaria.

Se han descrito varios métodos para medir la agregación plaquetaria *in vitro*, de ellos la técnica turbidimétrica de Born y O'Brien ha resultado particularmente útil en la investigación de la fisiología de la plaqueta y en la evaluación de factores y fármacos (4,12).

Michal (4) describe el principio turbidimétrico de la agregación plaquetaria para el cual es necesario utilizar plasma citratado rico en plaquetas (PRP), ya que para la agregación es necesaria la presencia de calcio y en el plasma citratado existe en cantidad suficiente. Se requiere también que exista contacto entre las plaquetas, por lo que se hace necesario un mecanismo de agitación.

El principio básico de la agregometría es la proyección óptica de la luz de una lámpara de tungsteno a través de una muestra o suspensión de plaquetas lavadas hacia una celda de cadmio-selenito. La fotocelda detecta los cambios de densidad óptica del PRP y convierte el voltaje eléctrico, el cual después de una amplificación adecuada alimenta un trazador para su observación.

La agregación de las plaquetas produce cambios en el nivel de la transmisión de la luz produciendo una deflexión positiva de la forma registrada. Debido a que la plaqueta agregada aumenta de tamaño produciendo un trazo oscilatorio por la interrupción del rayo se luz (13).

En la tabla 2 se muestran los valores de referencia de los porcentajes de agregación en la población mexicana (14).

AGENTE	CONCENTRACION FINAL	% DE AGREGACION
ADP	$1 \times 10^{-5} M$	100
α -epinefrina	$5 \times 10^{-4} M$	80.76
colágeno	84 μg dosis total	96.15
ristocetina	1.6 mg/ml dosis total	100

Tabla 2 Valores de referencia de los porcentajes de agregación en la población mexicana Fuente: Anaya; 1977.

Factores de las plaquetas que se ven afectados durante el almacenamiento

Dentro de la serie de cambios que le ocurren a las plaquetas cuando son almacenadas se han señalado como los más importantes a los siguientes cambios bioquímicos y morfológicos (15-19).

- Alteraciones en el pH, pO_2 , pCO_2 .
- Acumulación de Lactato.
- Oxidación de ácidos grasos.
- Concentración de glucosa y amonio.
- Disminución de nucleótidos de adenina.
- Regeneración de A.T.P.

El pH se ve disminuido cuando los concentrados son almacenados a temperaturas relativamente altas (22-24°C) y los requerimientos por O_2 se ven aumentados, el suministro inadecuado de O_2 a través de los contenedores propician la aceleración de la producción de ácido láctico; que provoca una disminución en el pH, que a su vez produce una hinchazón de la plaqueta y una transformación de la forma discoidea esfera, dando como resultado una marcada disminución de la función *in vitro* de las plaquetas (20,21,22).

Dentro de los factores más destacados que afectan la función *in vitro* de las plaquetas, durante el almacenamiento se encuentran los siguientes (23,24):

- pH
- Número de plaquetas.
- Tipo de bolsa
- Volumen mínimo de los concentrados.
- Tipo de agitación .

OBJETIVOS

- * Estandarizar la prueba de agregación plaquetaria para ser utilizada en el Banco Central de Sangre del Centro Médico " La Raza ".

- * Valorar la función plaquetaria Agregación en dos tipos diferentes de almacenamiento: temperatura ambiente con rotación continua y refrigeración de los concentrados plaquetarios.

HIPOTESIS DEL TRABAJO

Si los concentrados plaquetarios son almacenados bajo dos diferentes condiciones de temperatura, y muestras de éstos son sometidos a agregometría a partir de 5 horas después de su obtención hasta un tiempo de 120 horas; entonces se puede evaluar la función de agregación de los concentrados plaquetarios comparando las dos condiciones de almacenamiento. Esperando encontrar diferencias significativas en la función de agregación entre los dos tipos de almacenamiento, para así establecer nuevas condiciones para almacenar los concentrados plaquetarios con el fin de mejorar la calidad de estos en beneficio de los pacientes.

DISEÑO DE INVESTIGACION

Tipo de Estudio:

- Observacional.
- Transversal.
- Prospectivo.
- Descriptivo.

Población de Estudio:

La población de estudio estuvo constituida por cien donadores "sanos" que acuden al Banco Central de Sangre del Centro Médico "La Raza"; para realizar la estandarización de la prueba.

Para la realización de la prueba de agregación plaquetaria, para evaluar las dos diferentes temperaturas de almacenamiento se requirió de cien concentrados plaquetarios que son producidos en el mismo Banco de Sangre.

Criterios de Inclusión y Exclusión :

Para que tanto las muestras de sangre como los concentrados plaquetarios pudieran ser incluidos en este estudio fué necesario que acreditaran satisfactoriamente los siguientes puntos:

- Tener una edad entre 18-65 años.
- Tener un peso superior a los 50 Kg.
- No estar tomando medicamentos.
- Haber aprobado interrogatorio y exámen médicos.
- Tener un hematocrito entre 43-56 % .
- Haber resultado negativo a las siguientes pruebas de laboratorio:

* V.D.R.L.

* Brucela.

* Virus de la Inmunodeficiencia Humana (V.I.H).

* Antígeno de superficie para la Hepatitis "B". (HBs).

* Anticuerpo de la Hepatitis "C" (AchVc).

TECNICAS

MATERIAL DE LABORATORIO

ESPECIFICACION

- Vaso de precipitado de 100 ml.	Pyrex
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.	Pyrex
- Matraz volumetrico de 100 ml.	Pyrex
- Cámara de Neubauer con cubrehematímetro.	Bright-line A.C.O.
- Pipetas para cuenta de glóbulos rojos.	Propper Trophy
- Cámara húmeda.	Kimax
- Celdas siliconadas para agregómetro.	H.U.
- Agitadores magnéticos recubiertos de teflón.	H.U.
- Gradilla.	-----
- Tubos de ensaye de plástico de 8 X 4.	Sorin Biomedica
- Micropipeta de 250 μ l.	Nalgene
- Micropipeta de 50 μ l.	Nalgene
- Micropipeta de 5 μ l.	Nalgene

EQUIPO

- Agregómetro	H. U.
- Balanza analítica	METLER.
- Centrifugas.	CLAY. ADAMS. INC.
- Potenciómetro.	CORNING.
- Microscópio.	CARLS. ZEISS

REACTIVOS

- Agua bidestilada.
- A.D.P. sódico (Sigma).
- Adrenalina (Sigma).
- Oxalato de Amonio (Becker).
- Fosfato de sodio dibásico (Becker).
- Fosfato de potasio monobásico(Becker).

SOLUCIONES :

- Solución de ADP 5×10^{-4} M.
- Solución de Adrenalina 0.001 mg/ml.
- Solución salina al 0.8 %.
- Solución de oxalato de amonio al 1%.
- Solución amortiguadoras de fosfatos 0.15 M. pH 6.4.

METODOLOGIA

Este estudio fué dividido en dos etapas:

- a) estandarización de la Prueba de Agregometria.
- b) Pruebas de agregometria para los concentrados almacenados bajo las dos temperaturas de prueba.

a) Estandarización de la prueba

Para estandarizar la prueba de agregometria para ser utilizada en el Banco Central de Sangre del Centro Médico " La Raza " se tomaron muestras de sangre de 100 donadores que acuden normalmente al Banco de Sangre.

Las muestras fueron tomadas en tubos de plástico de 5 ml de capacidad que contenian 0.75 ml de ACD (ácido citrato dextrosa) como anticoagulante, las cuales fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min para obtener plasma rico en plaquetas (P.R.P), el cual fué separado en otro tubo y se procedió a hacer inmediatamente el conteo plaquetario con oxalato de amonio. El remanente de sangre se centrifugo nuevamente a 3000 rpm durante 15 min para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP).

Teniendo estos dos tipos de plasma se procedió a realizar la prueba de agregometria, ajustando en el aparato las siguientes características: temperatura de 37 °C y una agitación de 1300 rpm. En una de las celdas se colocó un agitador magnético y 500 μ l de PPP, la cual se introdujo en el agregómetro para ajustar el graficador al 100 % de agregación.

En otra celda se colocaron 500 μ l de PRP y se ajustó el graficador al 0 % de agregación, dejando correr el papel gráfica durante 1 min y se procedió después a realizar la prueba de agregometría utilizando como inductores de la agregación plaqueta ADP (Adenosin Difosfato) y adrenalina en diferentes concentraciones que pueden observarse en la tabla de tal manera que se obtuviera el máximo porcentaje de agregación.

AGENTE ABREGANTE	CONCENTRACION	VOLUMEN
A D P	2.5×10^{-4} M	50 μ l
A D P	5.0×10^{-4} M	50 μ l
A D P	1.0×10^{-5} M	100 μ l
ADRENALINA	0.001 mg/ml	50 μ l
ADRENALINA	0.005 mg/ml	100 μ l

Tabla No.3 Concentraciones y volúmenes de los agentes utilizados para la estandarización de la prueba.

b) Pruebas de Agregometría para los concentrados almacenados bajo las temperaturas de prueba .

Para realizar estas pruebas fueron utilizados 100 concentrados plaquetarios que son preparados en el Banco de sangre, 50 fueron almacenados a 4 °C y los restantes fueron almacenados a temperatura ambiente con rotación continua.

Fueron tomadas muestras de 5 ml de estos concentrados en tubos de plástico, a las cuales se les realizó conteo plaquetario con oxalato de amonio; para posteriormente poder realizar el ajuste de número de plaquetas con su mismo P.P.P. a 300,000 pq/mm^3 .

La prueba de agregometría para la evaluación de estos concentrados fué realizada como se describe en el apartado de la estandarización de la prueba, utilizando los volúmenes y concentraciones de los agentes agregantes que se describen en la tabla 4 .Esta prueba se realizó a las 24,48,72,96 y 120 hrs de almacenamiento, en las dos temperaturas de prueba.

DISEÑO ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos se les aplicó estadística descriptiva, para poder analizarlos.

A fin de establecer si existen diferencias significativas entre las temperaturas de almacenamiento y entre los agentes agregantes utilizados se realizó un análisis de varianza (25).

Con la finalidad de saber entre que temperaturas de almacenamiento existían diferencias significativas, se llevó a cabo un análisis de varianza utilizando el diseño de bloques completos aleatorizados (25) y la prueba de rango múltiple de Duncan (26).

RESULTADOS

En la tabla 4 se muestran las concentraciones y volúmenes de los agentes utilizados A.D.P. y Adrenalina, con los cuales se obtuvieron los porcentajes máximos de agregación; mismos que fueron utilizados para obtener los valores de referencia de número de plaquetas, porcentaje y tiempo de agregación de los donadores "sanos" que acuden al Banco de Sangre. Cuyos resultados se muestran en la tabla 5.

En la fig 3 se muestra un comparación de los registros de porcentajes de agregación obtenidos a las 5,24,48,72,96 y 120 hrs de almacenamiento a temperatura ambiente, de los concentrados que fueron evaluados con ADP.

En la tabla 6 se aprecian los valores promedio obtenidos de los porcentajes de agregación de los concentrados evaluados con ADP; al comparar las temperaturas de almacenamiento probadas se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dichas temperaturas, lo que observa claramente en la gráfica 1, en donde también se observa que los concentrados almacenados en refrigeración presentan un porcentaje de agregación mayor al de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua. Al mismo tiempo se aprecia que el porcentaje de agregación disminuye más lentamente en el caso de los concentrados almacenados en refrigeración que los almacenados a temperatura ambiente.

Entre los tiempos de almacenamiento de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) desde el inicio de la prueba hasta las 72 hrs.

Para los concentrados almacenados en refrigeración evaluados con ADP se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) durante todos los tiempos de almacenamiento probados.

Entre los tiempos de almacenamiento de los concentrados almacenados a temperatura ambiente que también fueron evaluados con ADP, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) desde el inicio de la prueba hasta las 96 hr de prueba.

En lo que respecta los resultados obtenidos de los concentrados evaluados con Adrenalina que fueron almacenados a temperatura ambiente, estos se pueden observar en la tabla 7. La comparación de los registros obtenidos de dicha evaluación se muestra en la fig. 7 donde se observa la disminución de los porcentajes de agregación conforme transcurre el tiempo de almacenamiento.

Los resultados obtenidos de los concentrados almacenados en refrigeración, evaluados con Adrenalina se pueden observar en la tabla 7. En la fig. 8 se muestra la comparación de los registros obtenidos de esta evaluación donde se observa el mismo fenómeno descrito en punto anterior.

En lo que corresponde a los resultados de la comparación de las dos temperaturas de almacenamiento probadas se obtuvo lo siguiente:

- Al comparar las dos temperaturas de almacenamiento para los concentrados que fueron evaluados con ADP, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos temperaturas de almacenamiento probadas (gráfica No 1).

- Entre los tiempos de almacenamiento de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) desde el inicio de la prueba hasta las 72 horas.
- Para los concentrados almacenados en refrigeración que fueron evaluados con ADP, se hallaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tiempos de almacenamiento que fueron probados.
- Al comparar las temperaturas de almacenamiento de los concentrados evaluados con Adrenalina, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). gráfica No. 2
- Entre los tiempos de almacenamiento de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) desde el inicio de la prueba hasta las 96 horas.
- En cuanto a los concentrados almacenados en refrigeración, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los tiempos de prueba, excepto entre las 48 y las 72 horas.
- Al realizar la comparación estadística entre los dos agentes agregantes utilizados, para la evaluación de los concentrados almacenados a temperatura ambiente, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$). gráfica No. 3

- Se hallaron diferencias significativas al comparar los dos agentes agregantes utilizados para la evaluación de los concentrados almacenados en refrigeración. gráfica n.º 4, en las dos temperaturas de almacenamiento probadas. En donde también se observó que los porcentajes de agregación fueron mayores cuando se utilizó A.D.P como agente agregante. Además de que los porcentajes de agregación disminuyeron más rápidamente a través del tiempo de almacenamiento cuando se utiliza, como agente agregante Adrenalina en las dos temperaturas de almacenamiento.

En cuanto a los resultados obtenidos alrededor de tiempos de agregación, estos se pueden observar en las tablas e y p.

- Al realizar la comparación de las temperaturas de almacenamiento para los concentrados que fueron evaluados con Adrenalina, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) gráfica No. 5.

- Entre los tiempos de almacenamiento de los concentrados almacenados a temperatura ambiente, se hallaron diferencias significativas ($p < 0.05$) desde las 5 hasta las 72 horas, donde se observa una clara disminución de los tiempos de agregación conforme transcurre el tiempo de almacenamiento.

- Para los concentrados evaluados con Adrenalina, almacenados en refrigeración, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos 5 y 24 horas, así como 96 y 120 horas de almacenamiento (gráfica. 5).

- Cuando se realizó la comparación estadística de las temperaturas de almacenamiento para los concentrados que fueron evaluados con ADP, se hallaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos temperaturas de almacenamiento gráfica 6.

- No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de almacenamiento probados, para los concentrados almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración.

- Al realizar la comparación de los agentes utilizados para evaluar los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua, no se hallaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los agentes utilizados . gráfica 7.

- Al realizar el mismo tipo de análisis para los agentes utilizados para evaluar los concentrados almacenados en refrigeración, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). gráfica 8.

AGENTE AGREGANTE	CONCENTRACION UTILIZADA	VOLUMEN UTILIZADO
A D P	0.0005 M	50 ul
ADRENALINA	0.005 mg/l	100 ul

TABLA 4. CONCENTRACION Y VOLUMEN UTILIZADOS PARA EVALUAR LOS CONCENTRADOS PLAQUETARIOS ALMACENADOS A LAS DOS TEMPERATURAS DE PRUEBA.

AGENTE AGREGANTE	NUMERO DE PLAQUETAS	PORCIENTO DE AGREGACION	TIEMPO DE AGREGACION (seg)
A D P	274,210	86.99	196.50
ADRENALINA	281,530	83.94	329.48

TABLA 5. VALORES PROMEDIO DE NUMERO DE PLAQUETAS, PORCENTAJES DE AGREGACION Y TIEMPOS DE AGREGACION DE LOS ESPECIMENES DE SANGRE UTILIZADOS PARA LA ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA, UTILIZANDO ADP Y ADRENALINA COMO AGENTE AGREGANTE.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO					
	5 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
REFRIGERACION	88.70	72.51	61.90	49.65	34.70	26.29
AMBIENTE	79.70	55.44	39.05	26.73	22.48	15.96

TABLA 6. VALORES PROMEDIO DE LOS PORCENTAJES DE AGREGACION DE CONCENTRADOS PLAQUETARIOS EVALUADOS CON ADP A DOS DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO					
	5 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
REFRIGERACION	82.78	58.56	39.53	36.85	26.30	18.80
AMBIENTE	71.34	43.28	28.05	19.16	13.66	11.69

TABLA 7. VALORES PROMEDIO DE LOS PORCENTAJES DE AGREGACION DE CONCENTRADOS PLAQUETARIOS EVALUADOS CON ADRENALINA A DOS DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO					
	5 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
REFRIGERACION	311.50	172.12	143.84	154.64	122.85	73.42
AMBIENTE	230.60	115.55	90.00	56.61	34.61	26.37

TABLA 8. VALORES PROMEDIO DE LOS TIEMPOS DE AGREGACION (seg) DE LOS CONCENTRADOS PLAQUETARIOS EVALUADOS CON ADRENALINA A DOS DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO					
	5 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
REFRIGERACION	151.00	163.10	122.27	139.83	112.85	120.37
AMBIENTE	174.60	114.89	104.60	62.50	64.13	62.37

TABLA 9. VALORES PROMEDIO DE LOS TIEMPOS DE AGREGACION (seg) DE LOS CONCENTRADOS PLAQUETARIOS EVALUADOS CON ADP A DOS DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

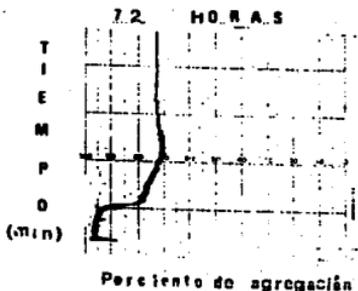
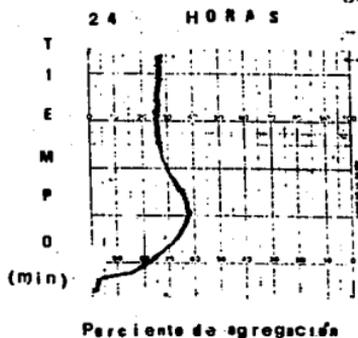
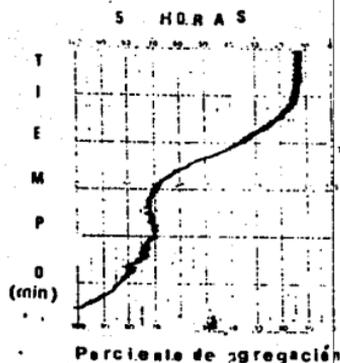
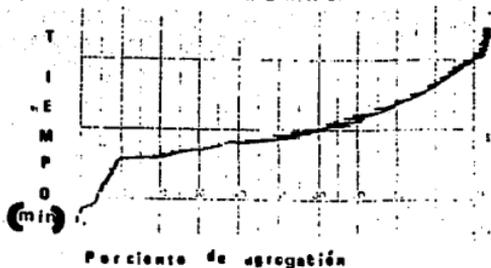
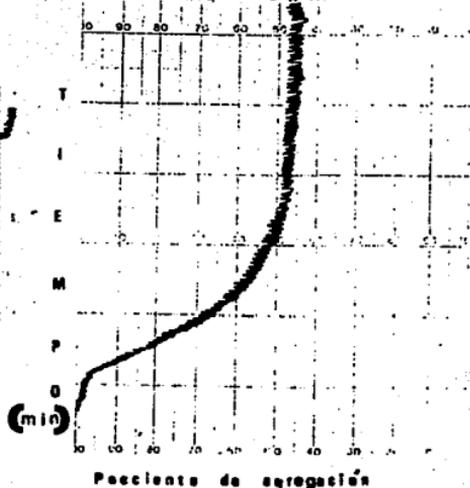


Fig. 3: Registros de los porcentajes de agregación de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua que fueron evaluados con A.D.P.

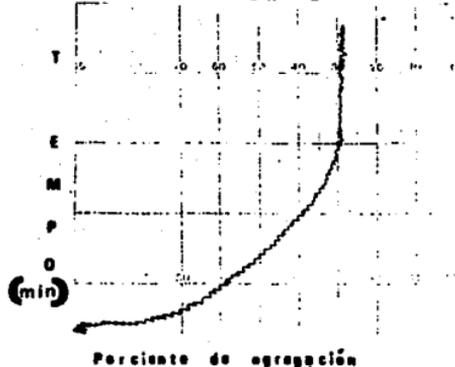
5 HORAS



24 HORAS



48 HORAS



72 HORAS

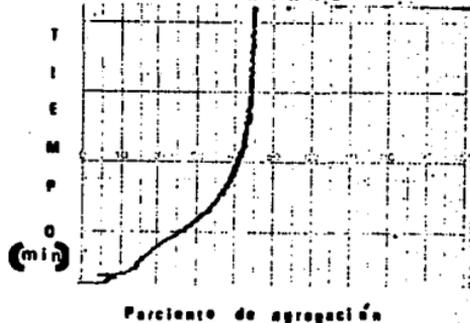


fig. α Registros de los porcentajes de agregación de los concentrados almacenados en refrigeración que fueron evaluados con A.D.P.

96 HORAS



120 HORAS

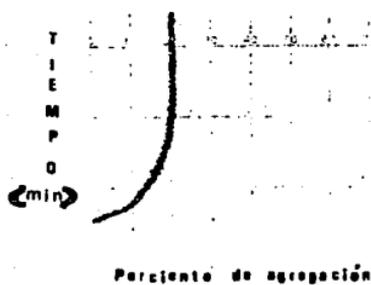
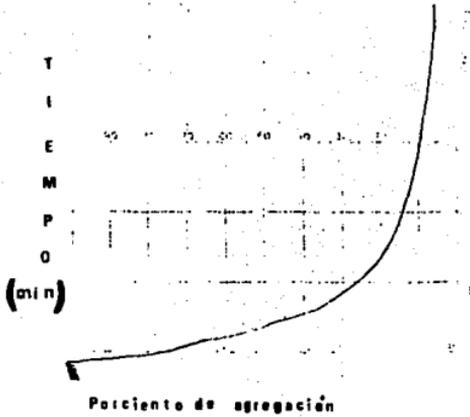
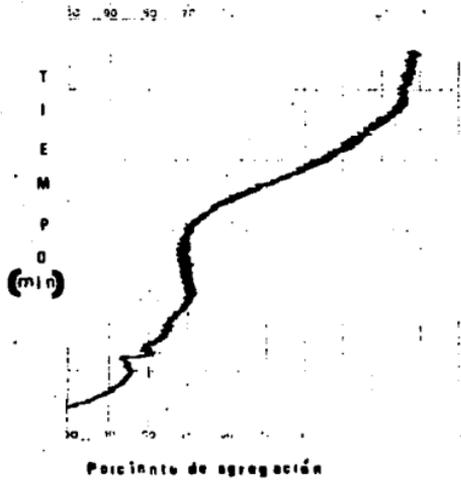


Fig.4 (Continuación)

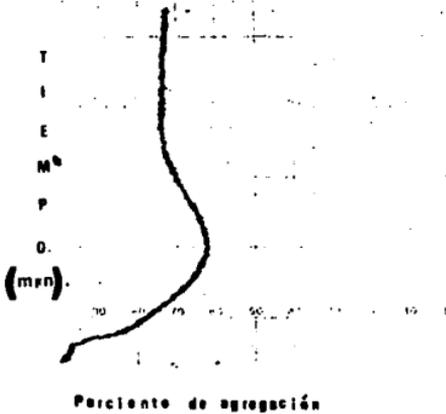
5 HORAS



24 HORAS



48 HORAS



72 HORAS

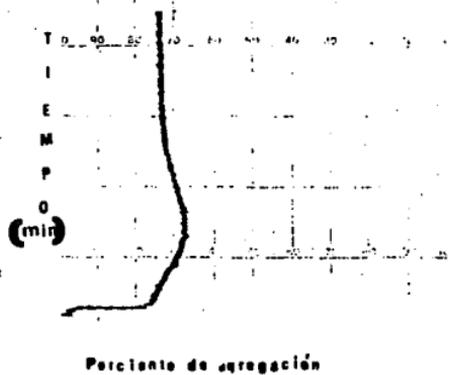


Fig. 7: Registros de los porcentajes de agregación de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua que fueron evaluados con Adrenalina.

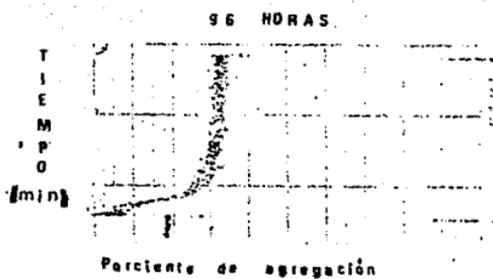


Fig:7 (Continuación)

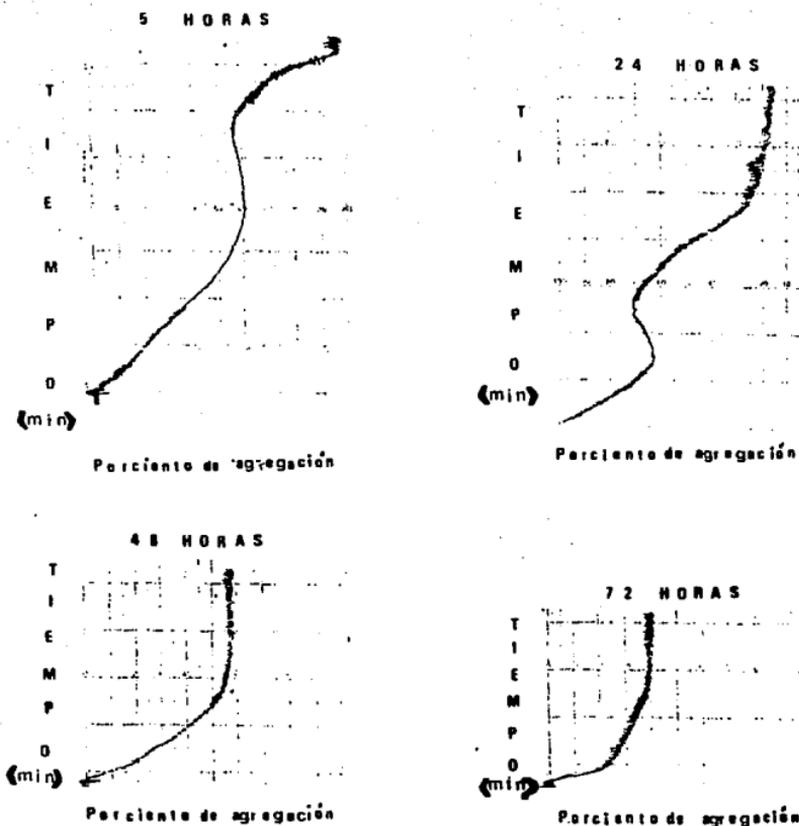


Fig. 8: Registros de los porcentajes de agregación de los concentrados almacenados en refrigeración que fueron evaluados con Adrenalina.

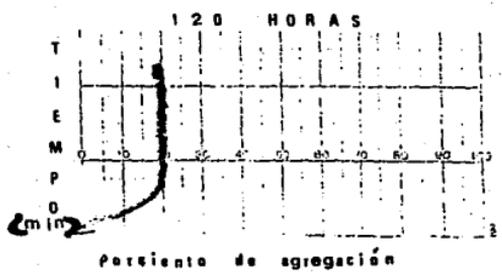
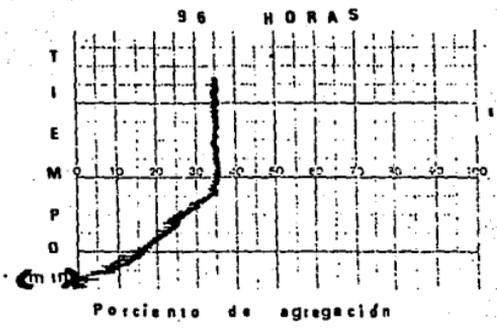
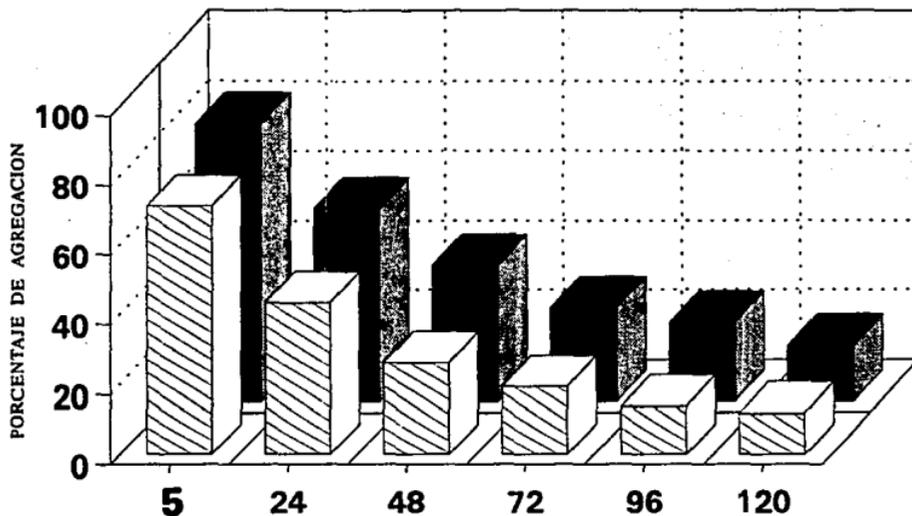


Fig. (continuación)

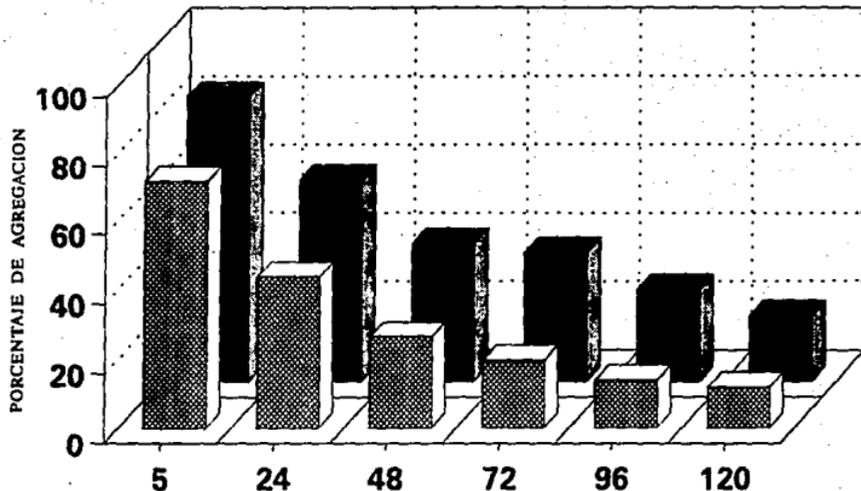
Graf. 1. COMPARACION DE TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE LOS CONCENTRADOS EVALUADOS CON A.D.P. EN RELACION A PORCENTAJES DE AGREGACION.



Refriger.	■	79,7	55,44	39,05	26,73	22,48	15,96
Temp. Amb.	▨	71,14	43,28	26,05	19,16	13,66	11,69

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

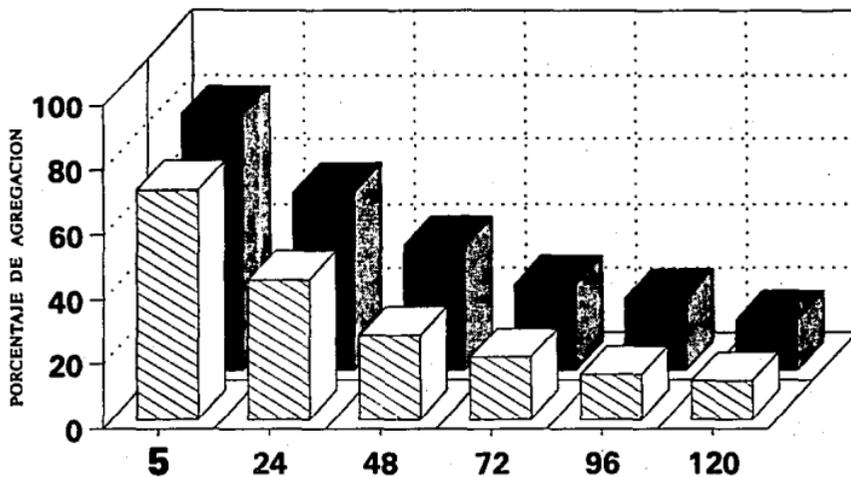
Graf. 2. COMPARACION DE TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE LOS CONCENTRADOS EVALUADOS CON ADRENALINA EN RELACION A PORCENTAJES DE AGREGACION.



Refriger.	82,78	58,56	39,53	36,85	26,3	18,8
Temp. amb.	71,34	43,28	26,05	19,16	13,66	11,69

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

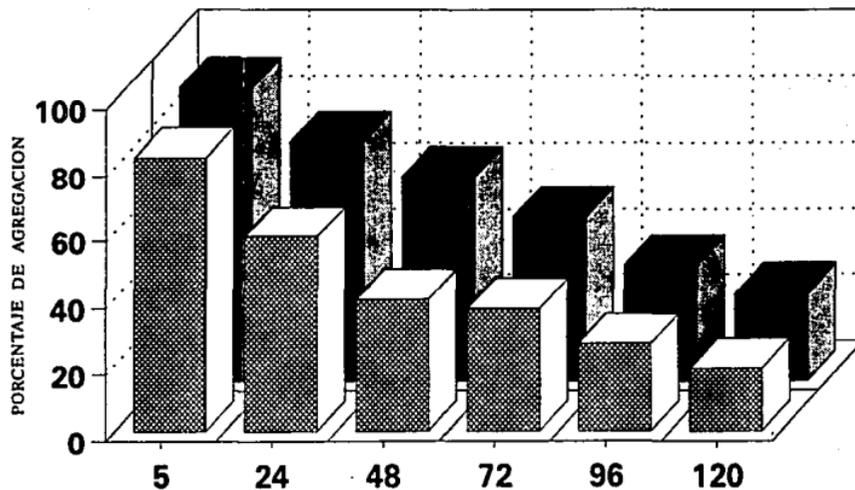
Graf. 3. COMPARACION DE LOS AGENTES UTILIZADOS PARA EVALUAR LOS CONCENTRADOS ALMACENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE EN RELACION A PORCENTAJES DE AGREGACION.



A. D. P.	■	79,7	55,44	39,05	26,73	22,48	15,96
Adrenalina	▨	71,14	43,28	26,05	19,16	13,66	11,69

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

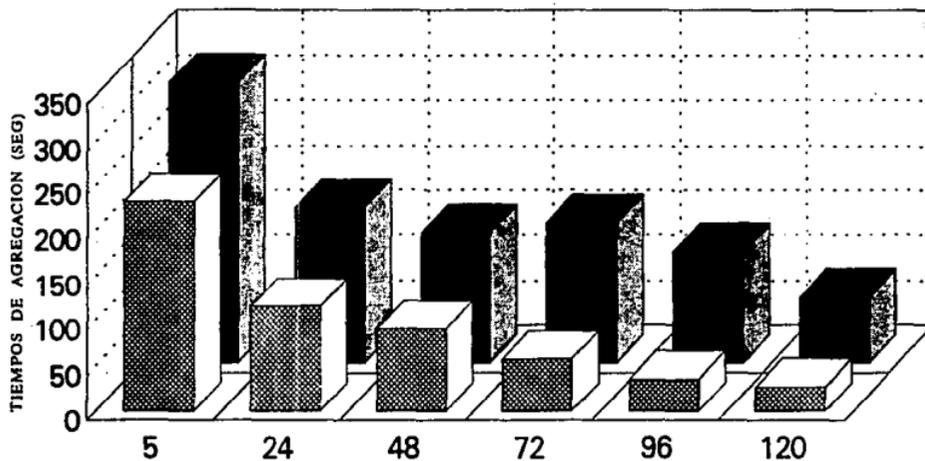
Graf. 4. COMPARACION DE LOS AGENTES UTILIZADOS PARA EVALUAR LOS CONCENTRADOS ALMACENADOS EN REFRIGERACION EN RELACION A PORCENTAJES DE AGREGACION.



A. D. P.	88,7	72,51	61,9	49,65	34,7	26,29
Adrenalina	82,7	58,56	39,53	36,85	26,3	18,8

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

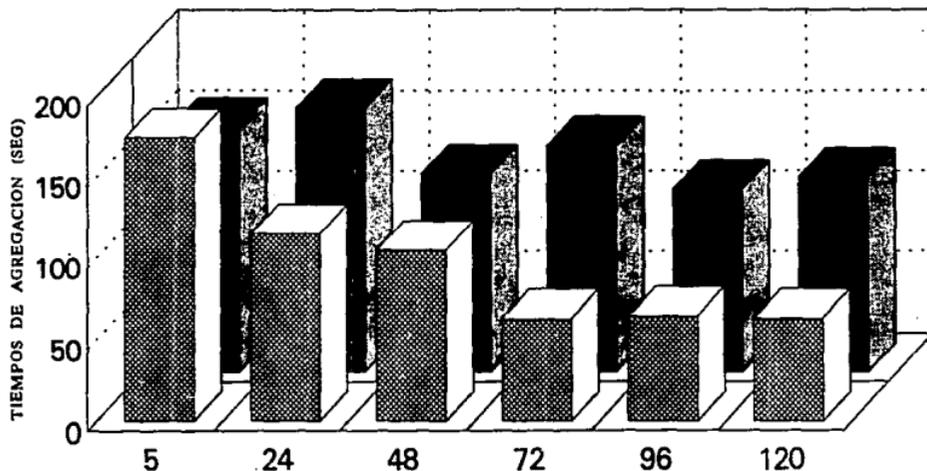
Graf. 5. COMPARACION DE LAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE LOS CONCENTRADOS EVALUADOS CON ADRENALINA EN RELACION A TIEMPOS DE AGREGACION.



Refriger.	■	311,5	172,12	143,84	154,64	122,85	73,42
Temp. amb.	▨	230,6	115,55	90	56,61	34,61	26,37

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

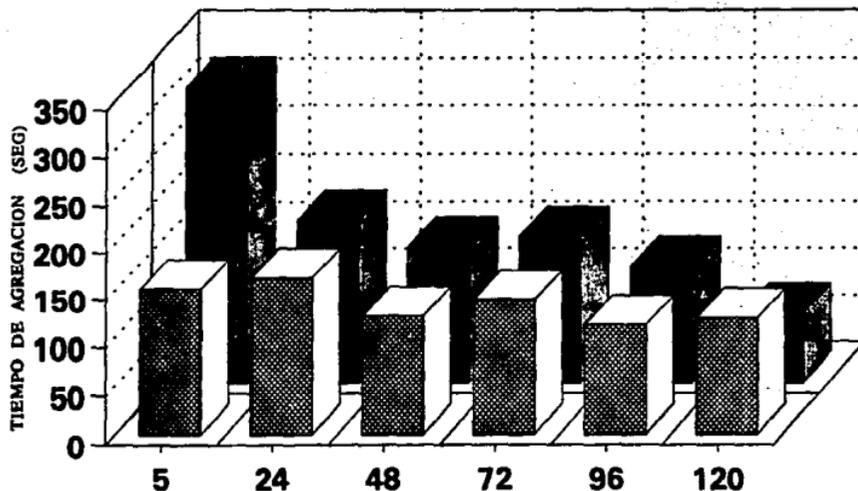
Graf. 6. COMPARACION DE TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE LOS CONCENTRADOS EVALUADOS CON A. D. P. EN RELACION A TIEMPOS DE AGREGACION.



Refriger.	151	163,1	122,27	139,83	112,85	120,37
Temp. amb.	174,6	114,89	104,6	62,5	64,13	62,67

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

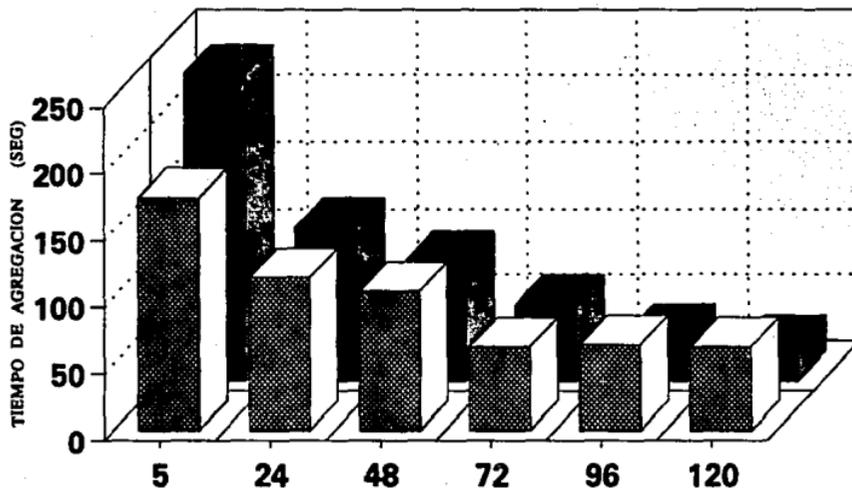
Graf. 7 COMPARACION DE LOS AGENTES UTILIZADOS PARA EVALUAR LOS CONCENTRADOS ALMACENADOS EN REFRIGERACION EN RELACION A TIEMPOS DE AGREGACION.



Adrenalina	311,5	172,12	143,84	154,64	122,85	73,42
A. D. P.	151	163,1	122,27	139,83	112,85	120,37

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

Graf. 8. COMPARACION DE LOS AGENTES UTILIZADOS PARA EVALUAR CONCENTRADOS ALMACENADOS A TEMPERATURA AMBIENTE EN RELACION A TIEMPOS DE AGREGACION.



Adrenalina	230,6	115,55	90	56,61	34,61	26,37
A. D. P.	174,6	114,89	104,6	62,5	64,13	62,67

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HRS)

DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados nos permiten observar que los concentrados plaquetarios almacenados a temperatura ambiente que fueron evaluados con A.D.P. y ADRENALINA, muestran una marcada disminución de la función plaquetaria agregación, lo que coincide con lo reportado por Murphy en 1971. Esto está estrechamente relacionado con la serie de cambios que ocurren durante el almacenamiento; que alteran tanto morfológica como bioquímicamente la función *in vitro* de las plaquetas, dichos cambios han sido observados por varios autores (21,22,24,27,29,30).

Considerando que estos cambios influyen sobre las plaquetas almacenadas; estos son la justificación de las diferencias significativas encontradas en los porcentajes de agregación entre los tiempos de almacenamiento de los concentrados almacenados a temperatura ambiente que fueron evaluados con A.D.P y Adrenalina.

Se considera que las diferencias significativas encontradas entre los tiempos de almacenamiento hasta las 72 hrs en el caso de los concentrados almacenados a temperatura ambiente, que fueron evaluados con A.D.P. se deben a que en el lapso de estas 72 de almacenamiento ocurren los cambios bioquímicos que alteran la función *in vitro* de las plaquetas (graf. 2) y en los demás casos donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de almacenamiento.

Además de la influencia de los cambios bioquímicos que ocurren durante el almacenamiento de los concentrados plaquetarios a temperatura ambiente, sobre la función de las plaquetas; existe un consenso general que señala que el mantenimiento de la forma discoidea de la plaqueta está relacionada con la viabilidad de las plaquetas (1,2,3).

También se ha señalado que las glicoproteínas de la membrana parecen estar relacionadas con las lesiones de almacenamiento, al igual que la eficacia hemostática de las plaquetas almacenadas depende del mantenimiento adecuado de los niveles de estas glicoproteínas (4,5).

En lo que respecta a los resultados de los porcentajes de agregación de los concentrados almacenados en refrigeración, tanto cuando fueron evaluados con A.D.P. como con Adrenalina se observó que (gráf. 1 y 2), que los porcentajes de los almacenados en refrigeración son mucho mayores que los de los concentrados almacenados a temperatura ambiente; lo que se ajusta a la descripción hecha por algunos autores (6,7).

El mecanismo propuesto para lesión que ocurre en la plaquetas almacenadas en refrigeración difiere totalmente del propuesto para las lesiones que se producen en las plaquetas almacenadas a temperatura ambiente (8).

Al observar las gráficas 3 y 4 y al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los agentes agregantes utilizados; tanto para los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua como para los almacenados en refrigeración. Donde también se observó que los porcentajes de agregación son mayores cuando se utiliza como agente agregante A.D.P. que cuando se utiliza Adrenalina; estas diferencias observadas se pueden atribuir al mecanismo por el cual actúan estos agentes agregantes sobre las plaquetas (10,10), que es diferente para cada uno de ellos .

En el caso del mecanismo del A.D.P. sobre las plaquetas se trata de una interacción de plaqueta-plaqueta, más que un efecto directo sobre las plaquetas por parte de este agente (11).

El mecanismo propuesto para la Adrenalina es llamado estímulo natural, el cual tiene un efecto sobre la plaqueta, produciendo la liberación de ácido araquidónico y oxigenándolo, transformando a este en un derivado (12).

Además también se observó que conforme transcurre el tiempo de almacenamiento el porcentaje de agregación disminuye más rápidamente cuando se utiliza Adrenalina como agente agregante que cuando se utiliza A.D.P. en todos los tiempos de almacenamiento probados; lo que también se puede atribuir a los mecanismos por los cuales actúan estos agentes sobre las plaquetas.

En lo que respecta a los resultados de los tiempos de agregación en los concentrados almacenados a temperatura ambiente, tanto cuando estos fueron evaluados con Adrenalina (gráfica 5) como cuando se utilizó A.D.P (gráfica 6), se observó que este parámetro disminuye conforme transcurre el tiempo de almacenamiento. Lo cual se puede atribuir a los siguientes factores (40,41):

- Concentración del agente agregante.
- Cantidad de plaquetas.
- Velocidad de agitación.
- Cantidad de calcio.

Considerando que los primeros tres parámetros se mantuvieron controlados durante la evaluación de los concentrados plaquetarios, podemos atribuir esta disminución en los tiempos de agregación al aumento de Calcio. Se atribuyen las alteraciones en la velocidad de agregación a la inhibición ejercida por este ión sobre los procesos de enlace fibrinógeno (42).

Se ha reportado que existe aumento de calcio total durante el almacenamiento de los concentrados plaquetarios, el cual es almacenado en la superficie de la plaqueta (43); el aumento del calcio intracelular produce cambios en la superficie de las plaquetas alterando conformacionalmente las glicoproteínas de la membrana, llegando a ser estas un receptor ávido para el fibrinógeno (44).

En lo que respecta al análisis realizado para comparar los agentes utilizados no se encontraron diferencias significativas entre la utilización de estos agentes; aunque en la práctica siempre se observó que los tiempos de agregación eran mucho pronunciados cuando se utilizaba Adrenalina que cuando se utilizaba A.D.P (gráficas 7 y 8).

CONCLUSIONES

- * Los porcentajes de agregación de los concentrados almacenados en Refrigeración, son mayores que los de los concentrados almacenados a temperatura ambiente con rotación continua durante todos los tiempos de prueba. Tanto cuando fueron evaluados utilizando A.D.P. como ADRENALINA como agentes agregantes .
- * Existe una marcada disminución de la función plaquetaria agregación conforme transcurre el tiempo de almacenamiento, en las dos temperaturas de almacenamiento. Cuando se utilizaron los agentes agregantes A.D.P. y ADRENALINA.
- * Los porcentajes de agregación cuando se utiliza A.D.P. como agente agregante son mayores que los obtenidos con la utilización de ADRENALINA durante todos los tiempos de prueba y en las temperaturas de almacenamiento .
- * Los tiempos de agregación son mayores para los concentrados almacenados en refrigeración que los de los concentrados almacenados a temperatura ambiente ; tanto cuando se utilizó como agente agregante A.D.P. como en la utilización de la ADRENALINA .
- * Los tiempos de agregación de los concentrados almacenados a temperatura ambiente presentan una disminución conforme transcurre el tiempo de almacenamiento cuando se utilizan como agentes agregantes A.D.P. y ADRENALINA.

- * En los tiempos de agregación de los concentrados almacenados en Refrigeración , evaluados con A.D.P. y ADRENALINA no existe una influencia clara del tiempo de almacenamiento sobre los tiempos de agregación .

- * No existe una diferencia significativa entre la utilización de uno u otro agente cuando se evalúan tiempos de agregación.

SUGERENCIAS

- * Es necesario la evaluación de más parámetros que afectan a los concentrados plaquetarios, durante el almacenamiento para poder definir las condiciones óptimas de almacenamiento, para que estos puedan ser utilizados con un alto grado de confiabilidad en los pacientes que lo necesitan .

- * Es importante dar un seguimiento de la función de los concentrados, después de que han sido transfundidos para hacer una evaluación de los resultados obtenidos *in vitro* y poderse aplicar en beneficio de los pacientes que requieren de preparados.

REFERENCIAS

- 1.- Castillo R, Ordinas A, Casal S F. Trastornos de las plaquetas. Fisiología de la Hemostasia .Medicine México .1a. serie Hematología 1982: 508-520.
- 2.- Fijnheer R, Pieterz N I, Korte De D, Ross D. Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates .Transfusion 1989; 29(1): 36-40.
- 3.- Holme S, Vaidja K, Murphy S. Platelet storage at 22 °C : Effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. Blood 1978; 52(2): 425-435.
- 4.- Sonnenwirth AC, Jarett L. Métodos y diagnósticos del laboratorio clinicos. .8a Ed. Argentina Buenos Aires: Panamerica, 1986 : vol 1 : 917-925.
- 5.- Williams W J. Hematología .2a Ed. España Barcelona :Salvat, 1983: vol:2 : 1283-1289.
- 6.- Henry J B. Diagnóstico y tratamiento clinicos por el Laboratorio 7a Ed.España Barcelona: Salvat, 1985: vol 1: 1099-1117.
- 7.- William S B. Hematology. 5a.Ed. Cambrige: The mit press, 1991: 1-15.
- 8.- Ratnoff O D, Forbes C D. Disorders of hemostasis .2a. Ed. Philadelphia : W.B.Saunders Company, 1991:75-79.

- 9.- Escriba P, Maluenda M P. Fisiología de la Hemostasia
Medicine México primera serie hematología 1982;
60-90.
- 10.- William S B. Hematology. 5a Ed. Cambridge : The mit Press,
1991; 543-575.
- 11.- Adelman B, Canson P, Powers P. Von Willerbrand Factor is
is present on the surface of platelets plasma by
A.D.P. Blood 1987; 70(5): 1362-1366.
- 12.- Born G V R .Agregation of blood platelets by adenosine
diphosphate and its reversal .Nature 1962; 194
(4832): 927-929.
- 13.- Michal F, Born G V R. Effect of the rapid shape change of
platelets on the transmission and scattering of light
through plasma. Nature 1971; 231: 220-222.
- 14.- Anaya R, Flores R M, Linares G, Alger M. Valores normales
de agregación plaquetaria en la población mexicana.
Revista de Investigación Clínica 1977; 29: 127-135.
- 15.- Rock G, Labow R S, Adams G A. Storage of platelet
concentrates for transfusion .Prog.Clin.Biol.Res
1988; 283: 673-704.
- 16.- Koerner K. Platelet function of room temperature platelet
concentrates stored in a new plastic material with
high gas permeability. Vox Sang 1984; 47: 406-411.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 17.- Dzik W H, Cusack W F, Sherborne B, Kicler T. The effect of prestorage white cel reduction on the function and viability of stored platelet concentrates Transfusion 1992; 32(4):334-339.
- 18.- Buchhoolz D H,Porten J H, Grode G y col. Extended storage of single-donor platelet concentrate collecty by blood cell separator Transfusion 1985; 25(6) : 557-562.
- 19.- Labow R S, Tocchi M, Rock G. Platelet storage effects of leachable materials on morphology and function. Transfusion 1986; 26(4): 351-357.
- 20.- White J G, Long-Term storage of functional platelets in vitro Vox Sang 1981; 40 (suppl 1): 119-122.
- 21.- Bannai M, Mazda T, Sasakawa S.The effects of pH and agitation on platelets preservation .Transfusion 1985; 25(1): 57-59.
- 22.- Murphy S, Principles storage of platelet concentrates. Infusionstherapie 1991; 18(suppl 1):3-9.
- 23.- Snyder E L, Koerner T A W, Hezzey A Jr. Platelets concentrates. Influence of different preparative protocols on the in vitro release reaction .Vox Sang 1982; 43:71-75.
- 24.- Snyder E L, Stack G, Napychank P, Roberts S. Storage of pooled platelet concentrates .Transfusion 1989; 29(5): 390-395.

- 25.- Wayne W D, Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 3a Ed. México: Limusa-Noriega, 1987: 45.
- 26.- Miller I, Freund J E. Probabilidad y estadística para ingenieros. México Pentrice-Hall Hispanoamericana, 1984: 364-413.
- 27.- Dzik, W. H., et al. The effect of prestorage white cell reduction on the function and viability of stored platelet concentrates. *Transfusion*. 32: 334 - 339. 1992.
- 28.- Murphy S, Sayer S N, Gardner F H, Storage of platelets concentrates at 22°C. *Blood* 1970; 35(4):549-557.
- 29.- Kroll M H, Schafer A I. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; 74(4): 1181-1195.
- 30.- Charo I F, Feinnan R D, Detwiler T C. Interrelations of platelets aggregation and secretion .*The Journal of Clinical Investigation* 1977; 60: 866-873.
- 31.- Murphy S, Gardner F H. Platelet storage at 22 °C, metabolic morphologic and functional studies. *The Journal of Clinical Investigation* 1971; 50: 370-376.
- 32.- Snyder E L. Activation during preparation and storage of of platelet concentrates. *Transfusion* 1992; 32 (6) : 500-502.

- 33.- Aster R H, Jenkins J, Torey D y col. Which are the parameters to be controlled in platelet concentrates in order that they may be offered to the medical profession as a standardized product with specific properties ?
Vox Sang 1981; 40:115-126.
- 34.- Ribeiro A, Swann J C, Bemdt M C. Alterations of the levels of glycoproteins Ib-X and IIb-IIIa in platelets stored at 22 °C. Thrombosis Research 1992; 66: 619-627.
- 35.- Bode A P, Miller D T, Toffaletti J. Plasma levels of ionized and total calcium during storage of citrated platelet concentrate. Transfusion 1989; 29(6): 534-538.
- 36.- Moroff G. Aggregation: Release of platelets stored at 22 °C.
Vox Sang 1981; 40(suppl 1): 110-114.
- 37.- Snyder E L, Horne W C, Napychank P, Heinemann F S, Dunn B. Calcium-dependent proteolysis of actin during storage of platelet concentrate .Blood 1989; 73(5): 1380-1385.
- 38.- MacMillan D E. Secondary clumping effect in human citrated platelet-rich plasma produced by adenosine diphosphate and adrenaline. Nature 1966; 211(5045): 140-145.
- 39.- Hensler M E, Frojmovic M, Taylor R G, Hantgan R R, Lewis J C. Platelet morphologic changes and fibrinogen receptor localization American Journal of Pathology 1992; 141(3): 707-719.

- 40.- Bell D N, Spain S, Goldsmith H L. Adenosine diphosphate-induced aggregation of human platelets in flow through tubes. Biophysical Journal 1989; 56: 817-828.
- 41.- Landolfi R, Decristofaro R, De Candia E, Rocca B, Bizzi B. Effect of fibrinogen concentration on the velocity of platelet agregation. Blood 1991; 78(2):377-381.