



112361
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER. I.A.P.**

**"PROTOSCOLOS DE EVALUACIÓN PARA LA CRÍO
PRESERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE ERITROCITOS
CON GLICEROL A ALTA CONCENTRACIÓN"**

(ADAPTACIÓN DEL MÉTODO DE MERYMAN Y VALERI)

**TESIS DE POSTGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO EN LA ESPECIALIDAD DE:
PATOLOGÍA CLÍNICA**

P R E S E N T A :

DRA. SILVIA LUCRECIA CASTRO SOTELO

**ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO:
DR. JESÚS I. SIMÓN DOMÍNGUEZ**


**HOSPITAL
ABC**

MÉXICO, D.F.

2001



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 esta 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.

DEDICATORIAS

*Realmente no estoy tan sola; quien te dijo que te fuiste si uno no esta con el cuerpo sino con el recuerdo y a ti se te extraña tanto: Papá (Tomas).
Mil gracias por haberme dejado la mejor herencia; la capacidad de saber afrontar la adversidad.*

*A ti mamá, que a pesar de la distancia siento tu cariño y presencia. Gracias por ser siempre mi mejor amiga y consejera; el ejemplo de la humildad y armonía.
Te doy gracias infinitas por ser mi MADRE (María).*

*A ti "Alan" que eres el ser más importante en mi vida, la razón y el motivo de mis alegrías y preocupaciones; el reflejo de mis aciertos y errores.
Gracias por ser el hijo más noble y tierno que dios me otorgo.*

A ti Jorge, aun con el dolor y la nostalgia solo te pido le des a mi corazón la resignación de no tenerte entre nosotros.

A todos mis hermanos y hermanas; que con su apoyo, consejo, cariño, confianza y desempeño han sido para mi; estímulos para ser cada día mejor.

A mis sobrinas y sobrinos; que son fuente de dulzura, sencillez y jovialidad en mi vida.

A mis maestros : Dr. Jesús I. Simón , Dr. Luis Carlos Moreno, Dr. Pedro Álvarez . Por su atención y dedicación por compartir sus experiencias y transmitirme su conocimiento.

Con mi más grande agradecimiento para el Dr. Martín Guzmán; por ser guía y maestro y por sobre todas las cosas un amigo.

Para ustedes que siempre tienen tiempo de escucharme, que han demostrado ser amigos fieles y compañeros invaluable; mil gracias por brindarme su amistad y confianza; con todo mi respeto y cariño: Para Humberto y Raúl

Para Pedro Membrillo y Javier Bautista que con su apoyo y consejos han contribuido a desarrollar este trabajo.

A mis amigos: Günter, Gustavo, Francisco, Oscar y Adalberto; que con su apoyo y admiración han contribuido a ser más placentera mi estancia en esta ciudad.

A todos mis compañeros del Hospital ABC, por su apoyo y amabilidad.

“ La suprema facultad del hombre no es la razón sino la imaginación”

Edmundo O’Gorman

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCIÓN	1
AGENTES CRIOPROTECTORES	5
ANTECEDENTES	7
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	18
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	19
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	19
MÉTODO DE MERYMAN Y VALERI	20
DESCONGELAMIENTO Y DESGLICEROLIZACIÓN	22
CONTROL DE CALIDAD	25
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

INTRODUCCIÓN

El frío que es letal para la mayoría de las células vivas, también puede acelerar o detener reacciones bioquímicas y conservar o romper las estructuras celulares. Sin embargo, también es capaz de preservar las células a largo plazo al detener ciertos fenómenos biológicos y metabólicos, preservando la estructura morfológica y la funcionalidad en un proceso reversible. El desarrollo de la técnica de criopreservación surgió después de numerosos estudios sobre el efecto de la congelación en la viabilidad, morfología y funcionamiento de diversos tipos de células. En el año 1955, Barnes y Loutit consiguieron demostrar que la médula ósea de rata podía ser conservada utilizando la técnica de Polge, descrita para espermatozoides en presencia de glicerol.(1) Siguieron estudios de Cavins, Storb y Thomas, en los que demostraban la capacidad de médulas óseas autólogas, alogénicas y singénicas congeladas a -80°C de reconstituir la hemapoyesis en perros irradiados letalmente (2,3). Se estudiaron los agentes crioprotectores, entre los que destacó el dimetilsulfóxido (DMSO) y se establecieron los principios generales de la criopreservación. (4)

La criopreservación de células hematopoyéticas es un fenómeno complejo, en el cual la causa de daño celular no está del todo clara. La criopreservación óptima de cualquier suspensión celular depende de parámetros entre los que destacan aspectos modificables, como la velocidad de congelación, con un límite óptimo de descenso de temperatura para cada tipo celular, o la composición de la solución en la que se congela.

(5).

Varias teorías intentan explicar el daño producido por el frío. Lovelock postula en un modelo realizado con hematies humanos, que el daño celular es la consecuencia directa del aumento de concentración de electrolitos dentro y fuera de la célula.(6) Meryman interpreta los resultados no como una acción directa de los electrolitos, sino como una consecuencia de la reducción del volumen celular debido a la hiperosmolaridad extracelular, por debajo de un volumen tolerable (7, 8). Mazur 1966 habla de procesos independientes, con daños por efectos de solución con las congelaciones lentas, y otro por la formación de cristales intracelulares a las velocidades de congelación rápidas (9, 10). Consideramos a la sangre periférica como suspensión celular en un medio con solutos. Si la enfriamos por debajo de los cero grados centígrados, pese a su gran contenido de agua permanece sin congelar. Esto se debe, en parte, al descenso crioscópico de su punto de congelación debido a la gran cantidad de solutos que contiene. En este momento no existe daño celular.

A los -5 a -7°C comienza a formarse hielo en forma de cristal a partir de un centro de nucleación, esto es de un conjunto de moléculas agrupadas al azar a partir de los cuales se forman los cristales de hielo, extendiéndose por toda la suspensión. El tamaño crítico para la formación de estos núcleos varía de acuerdo a la temperatura y es mayor a temperaturas elevadas y menor a temperaturas más bajas. El interior de las células permanece sin congelar, pues la probabilidad de la nucleación es muy baja, debido al menor número de moléculas de agua libre y por actuar la membrana como barrera, impidiendo el

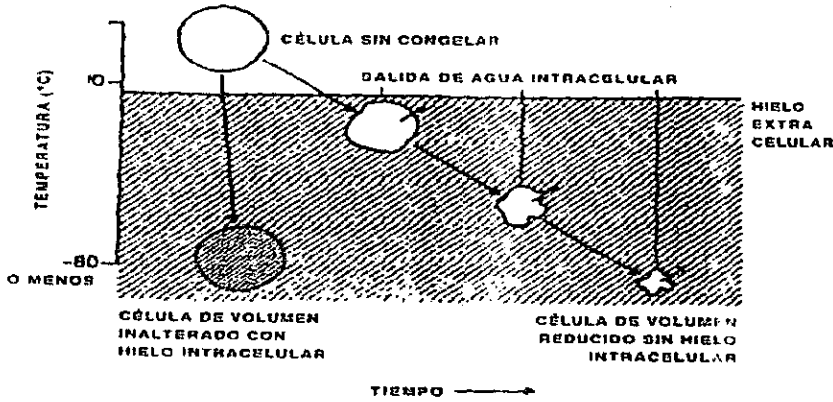
crecimiento de hielo dentro de la célula.(11) En el momento del cambio de estado líquido a sólido, se produce una liberación de calor, diferencia entre la formación de líquido a sólido.

A medida que se forman los cristales a expensas de agua pura, se excluyen los solutos, el medio extracelular experimenta un aumento de osmolaridad creciente. Al continuar el sobreenfriamiento, más agua se irá incorporando al hielo, concentrando los solutos en el líquido extracelular que permanece sin congelar, lo que produce una solución con puntos cada vez más bajos de congelación a cada nueva temperatura. Así, el remanente de solución en estado líquido es cada vez menor, y su osmolaridad cada vez mayor; Vila, 1984.(12)

El agua intracelular tenderá a salir de la célula con el fin de mantener el equilibrio osmótico y la célula se deshidratará. Si la velocidad de congelación es lo suficientemente lenta, la pérdida progresiva de agua deshidratará a la célula, pero ésta no se congelará. Si el descenso de la temperatura continúa, la deshidratación excesiva dañara a la membrana celular y sus estructuras internas, que contribuirán a la destrucción celular; Farrant, 1970.
(13)

Si, por el contrario, la velocidad de congelación es muy rápida, se evitará la salida del agua del interior de la célula al medio extracelular, pero su interior se sobre enfriará lo suficiente como para que la probabilidad de formación de un centro de nucleación sea muy elevada. Entonces se formarán cristales intracelulares y se producirá una destrucción de las

estructuras internas y de la membrana celular, de tipo mecánico. (14)



Si alcanza la velocidad de congelación, se llega a la temperatura de -40°C . Esta es la temperatura eutéctica del sistema al que nos estamos refiriendo, a partir de la cual se produce una nucleación homogénea con formación de sólido amorfo, es decir sin una estructura cristalina, en la que la formación de sólido no daña las estructuras celulares. A partir de esta temperatura, la muestra permanece inalterable y puede almacenarse a temperaturas muy bajas. Rowe, 1966; Sherman, 1976. (14, 15)

Para que estos fenómenos ocurran es necesario que el agua esté libre, es decir no unida a otras moléculas. Es justamente modificando el comportamiento del agua en lo que se basa la acción de las sustancias llamadas "crioprotectoras". Estas unidas a una velocidad de congelación óptima, logran las máximas recuperaciones de viabilidad tras los procesos

de congelación y descongelación de sangre periférica. (16)

AGENTES CRIOPROTECTORES

Estas son sustancias hidrosolubles que modifican el diagrama de fases de las soluciones intra y extracelulares. Es evidente que para que sean eficaces deben influir sobre la formación de hielo extracelular, sobre la deshidratación celular y sobre el desarrollo del hielo intracelular. (16, 17)

Existen diversas sustancias con acciones crioprotectoras, únicamente los que no son tóxicos y son biológicamente aceptables se utilizan en la congelación de sangre.

Los agentes crioprotectores son clasificados como penetrantes y no penetrantes. Los agentes penetrantes como el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) son pequeñas moléculas que cruzan libremente la membrana celular introduciéndose al citoplasma. Los crioprotectores intracelulares proveen una fuerza osmótica que evita que el agua migre hacia el espacio extracelular y se forme hielo. Una alta concentración previene la formación de cristales de hielo y consecuentemente daño a la membrana.

El glicerol es un alcohol trihídrico, es menos colorido, de sabor dulce y un líquido parecido a jarabe, soluble en agua. Farmacológicamente, el glicerol es relativamente inerte. Dentro de sus características está la de ser penetrante y actuar como agente coligativo. La

de congelación y descongelación de sangre periférica. (16)

AGENTES CRIOPROTECTORES

Estas son sustancias hidrosolubles que modifican el diagrama de fases de las soluciones intra y extracelulares. Es evidente que para que sean eficaces deben influir sobre la formación de hielo extracelular, sobre la deshidratación celular y sobre el desarrollo del hielo intracelular. (16, 17)

Existen diversas sustancias con acciones crioprotectoras, únicamente los que no son tóxicos y son biológicamente aceptables se utilizan en la congelación de sangre.

Los agentes crioprotectores son clasificados como penetrantes y no penetrantes. Los agentes penetrantes como el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) son pequeñas moléculas que cruzan libremente la membrana celular introduciéndose al citoplasma. Los crioprotectores intracelulares proveen una fuerza osmótica que evita que el agua migre hacia el espacio extracelular y se forme hielo. Una alta concentración previene la formación de cristales de hielo y consecuentemente daño a la membrana.

El glicerol es un alcohol trihídrico, es menos colorido, de sabor dulce y un líquido parecido a jarabe, soluble en agua. Farmacológicamente, el glicerol es relativamente inerte. Dentro de sus características está la de ser penetrante y actuar como agente coligativo. La

importancia de que el crioprotector penetre a la célula radica en que no contribuye a aumentar la osmolaridad extracelular y agravar el daño que debe prevenir. Así, su incorporación produce un aumento de la osmolaridad a ambos lados de la membrana, manteniendo un balance. Evidentemente un requisito es que no sea tóxico para la célula a la concentración utilizada.

Los agentes coligativos tienen la propiedad de ligar moléculas de agua. Esto hace que la proporción de agua que puede incorporarse al cristal de hielo, a cualquier temperatura, este reducida, atenuándose de esta forma el aumento de la presión osmótica y los efectos de solución. (16)

Los agentes no penetrantes son macromoléculas que no penetran a la célula. Tales como el hidroxietil. Estas moléculas protegen a las células por un proceso llamado de vitrificación, porque ellos forman una cubierta de cristales alrededor de la célula. Estos evitan la pérdida de agua y el daño por deshidratación y altera la temperatura de la solución transición para líquido a sólido. El hidroxietil es un polímero crió protectante, inicialmente se utilizó para glóbulos rojos, pero este junto con DMSO se utilizan para la crió preservación de células hematopoyéticas progenitoras. (17)

El método más popular en la práctica clínica para la crió preservación de eritrocitos

humanos requiere de aditivos penetrantes como el glicerol a alta concentración 45 a 50% ó a baja concentración al 18 a 20% con técnicas de congelamiento rápidas. (16,17)

ANTECEDENTES

Se han realizado varios estudios sobre el efecto del glicerol en los eritrocitos entre ellos el trabajo realizado por Contreras y Valeri; cuando valúan la recuperación de los eritrocitos *in vitro*, hemoglobina sobrenadante, potasio extracelular y potasio eritrocitario, osmolaridad del sobrenadante, albúmina residual, glicerol posterior a su descongelamiento de unidades almacenadas con glicerol a alta y baja concentración. Ellos utilizaron cuatro procesadores de células automatizados; tres de estos utilizaban cloruro de sodio a diferentes concentraciones con circulación continua y centrifugación. El otro utilizó solución glucosada y centrifugación. Los procesadores IBM y el Fenwal Eluatramatic que utilizan solución con cloruro de sodio tienen excelentes resultados. Ellos concluyeron que para lograr un lavado más eficiente, tres principios deben utilizarse:

- a) Los valores de hematocrito de 90% de la sangre previos a la congelación y al descongelar.
- b) Las unidades de sangre con valores de hematocrito mayores a 90% deben ser diluidas con soluciones hipertónicas de cloruro de sodio con anterioridad a la recuperación y lavado
- c) Las células rojas de sangre que contienen 20% o 40% de glicerol deberían de diluirse con soluciones hipertónicas de cloruro de sodio antes de la recuperación

humanos requiere de aditivos penetrantes como el glicerol a alta concentración 45 a 50% ó a baja concentración al 18 a 20% con técnicas de congelamiento rápidas. (16,17)

ANTECEDENTES

Se han realizado varios estudios sobre el efecto del glicerol en los eritrocitos entre ellos el trabajo realizado por Contreras y Valeri; cuando valúan la recuperación de los eritrocitos *in vitro*, hemoglobina sobrenadante, potasio extracelular y potasio eritrocitario, osmolaridad del sobrenadante, albúmina residual, glicerol posterior a su descongelamiento de unidades almacenadas con glicerol a alta y baja concentración. Ellos utilizaron cuatro procesadores de células automatizados; tres de estos utilizaban cloruro de sodio a diferentes concentraciones con circulación continua y centrifugación. El otro utilizó solución glucosada y centrifugación. Los procesadores IBM y el Fenwal Eluatramatic que utilizan solución con cloruro de sodio tienen excelentes resultados. Ellos concluyeron que para lograr un lavado más eficiente, tres principios deben utilizarse:

- a) Los valores de hematocrito de 90% de la sangre previos a la congelación y al descongelar.
- b) Las unidades de sangre con valores de hematocrito mayores a 90% deben ser diluidas con soluciones hipertónicas de cloruro de sodio con anterioridad a la recuperación y lavado
- c) Las células rojas de sangre que contienen 20% o 40% de glicerol deberían de diluirse con soluciones hipertónicas de cloruro de sodio antes de la recuperación

y lavado.

Esto favorece la viabilidad de los eritrocitos posterior al descongelamiento y elimina casi por completo el glicerol intracelular. (18)

En 1977, Szymanski y Carrington realizaron una evaluación de un programa a gran escala de sangre congelada en la Cruz Roja de los Estados Unidos de Norteamérica. Donde muestran que una glicerolización (glicerol 6.2 M) gradual de los eritrocitos da como resultado una aceptable recuperación *in vitro* de los mismos. Estas unidades crió preservadas mantuvieron niveles normales de ATP y 2,3 DPG; no se reporta ninguna contaminación bacteriana. Las transfusiones terapéuticas tuvieron supervivencia de veinticuatro horas *in vivo*. (19)

Moroff y Meryman concluyeron que la glicerolización de eritrocitos humanos frescos principalmente reduce los niveles de ATP con retorno a su valor original seguido a la desglicerolización. La reducción de los niveles de ATP es prevenido por piruvato pero no por glucosa e inosina, solas o en combinación. Esto implica que el ATP esta asociado a lesión por glicerolización que se refleja más con la disminución de la relación NAD/NADH por consiguiente una reducción de la actividad de gliceraldehído-3-fosfatodehidrogenasa. Los niveles de 2,3-DPG no fueron influenciados por la glicerolización y desglicerolización. Los eritrocitos depletados de ATP en presencia de glicerol tienen que recuperar sus niveles de ATP, reemplazando por cualquiera de los dos compuestos piruvato o inosina, pero requiere de la presencia de ambos compuestos en un periodo de incubación para mantenerse durante y post-rejuvenecimiento. Está demostrado

que la presencia prolongada de glicerol influye en la relación de NAD/NADH y en el carbono como intermediador de la glicólisis. El glicerol no influye en el reemplazo de ATP de los eritrocitos almacenados a 4°C por 20 días, con inosina en combinación con piruvato; pero substancialmente disminuye el reemplazo de los niveles de 2,3-DPG. (20)

Las células rojas sanguíneas, en presencia de glicerol, pueden ser almacenadas por años a -80°C con excelente recuperación posterior al descongelamiento y supervivencia *in vivo*. Según la experiencia referida por el Dr. Valeri y la Marina de los EE.UU., estas unidades pueden mantenerse almacenadas hasta por 10 años sin modificaciones.

Además de los beneficios de almacenamiento a largo plazo, el lavado extensivo asociado con la desglicerolización anula esencialmente todas las plaquetas, plasma, micro agregados celulares y detritus celulares, existe alguna evidencia de la disminución de la transmisión post-transfusión de hepatitis. La mayoría de las células blancas se pierden durante el tratamiento. (21) El trabajo realizado por Alter y col. muestra que los chimpancés transfundidos con sangre HBsAg positivo antes de ser congeladas y negativas para HBsAg posterior al descongelamiento transmitieron la enfermedad a los chimpancés transfundidos. Estos resultados no soportan que el uso de congelación de glóbulos rojos previene la transmisión de hepatitis post-transfusión (22,23)

Un estudio publicado en Francia, por Beaujean y col.; ellos evalúan la conservación de los eritrocitos congelados a -25°C con glicerol al 28%. Donde las unidades son almacenadas de 1 a 6 meses. Posterior a descongelar las unidades con solución de cloruro de sodio en el Procesador de Sangre IBM 2991. Los parámetros siguientes se investigaron

antes del congelamiento y después de descongelados, lavados y en su almacenamiento a 4°C por 24 horas. el nivel de hemoglobina sobrenadante, leucocitos y plaquetas, cantidad de 2,3-DPG y ATP. Los datos preliminares muestran, que la calidad *in vitro* de los eritrocitos almacenados a -25°C se conserva bien por 4 meses y que este método simple puede aplicarse en cualquier Banco de Sangre (22) Elghouzzi y col. ; comparan dos técnicas para congelar eritrocitos humanos, uno con glicerol al 60% el cual lo agregan al concentrado eritrocitario en dos pasos y otro donde agregan volumen a volumen glicerol al 40%. Posteriormente son lavados en el Procesador de Sangre 2991. Determinando nivel de hemoglobina sobrenadante, glicerol residual, leucocitos, plaquetas; cantidades de 2.3-DPG y ATP intraeritrocitario. El resultado de estas dos técnicas para congelar es similar. Ellos muestran que la solución salina-adenina-glucosa (SAG) no impide la penetración del glicerol. El control de calidad *in vitro* de los eritrocitos es bien preservada. (24)

Los concentrados de eritrocitos pueden rejuvenecerse antes de la crió preservación con glicerol a -80°C con solución que contiene piruvato de Na -inosina-glucosa- fosfato di sódico-adenina, para que sus niveles de 2,3-DPG se aumenten y su afinidad por él oxígeno disminuya. (25)

Aunque el método de glicerol a alta concentración tiene muchas ventajas para preservar células rojas sanguíneas, ningún procedimiento es factible para una desglícerolización completa. Sin embargo, por sedimentación las células glícerolizadas con anterioridad al congelamiento y descargando el exceso de glicerol, posterior al descongelamiento y desglícerolización puede simplificarse; esto consiste inicialmente en

dilución doble con Cloruro de Na hipertónica y solución isotónica salina-glucosa seguidos por dos ciclos de sedimentación y resuspensión en solución isotónica salina-glucosa. Este método es aplicable a unidades congeladas a -80°C ó en vapor de nitrógeno líquido. (26)

La popularidad y la promesa de células rojas congeladas en el decenio de 1970 era en su mayor parte atribuible a problemas logísticos asociados con el almacenamiento a 21 días y a los beneficios remunerativos adicionales de agotamiento de reacciones transfusionales febriles por la depleción de leucocitos, plasma y minimización de aloinmunización; así también se especula la disminución del riesgo de transmisión del virus de hepatitis B. (27) Actualmente la congelación de glóbulos rojos humanos es aplicado principalmente para almacenar unidades con tipos sanguíneos raros, pacientes con mezclas de aloanticuerpos y unidades autólogas. Estas sangres congeladas se pretende utilizarlas en desastres naturales o en casos de guerras civiles, pero su alto costo y su vida media posterior a la desglicerolización de 24 horas hacen que no se utilice de rutina en los Bancos de Sangre. (17, 30, 31) La sangre congelada también tiene importancia con fines antropológicos. (28)

Un adecuado control de calidad produce la detección de una inadecuada desglicerolización de las unidades de sangre, este es factible; aunque costo-efectivo del empleo rutinario de tales pruebas necesarias tienen que ser consideradas por cada Banco de Sangre de forma individual. Cuando el protocolo estándar para desglicerolización es seguido meticulosamente por personal experimentado, los errores producidos llamados mala desglicerolización son excepcionales. La transfusión de células con exceso de

glicerol residual tiene únicamente resultado en la lisis intravascular de las células infundidas. Sin embargo cada Banco de Sangre siente la necesidad de implementar pruebas de control de calidad para la desglicerolización de los eritrocitos, las células suspendidas en NaCL al 0.7% se debe estimar el porcentaje de hemólisis, midiendo hemoglobina en el sobrenadante con el método más confiable y efectivo. (29) Estudios recientes realizados en humanos demuestran que la transfusión de sangre crió preservada es una buena alternativa y que esta es tolerable; en 10 pacientes con cirugía de corazón se les transfundió eritrocitos crió preservados, valuando con microscopio electrónico que los crió eritrocitos en los pacientes con cirugía cardiaca son suficientemente resistentes a factores desfavorables de la circulación extracorpórea, y que no se producen cambios en las propiedades morfológicas de los eritrocitos; esto fundamenta que pueden ser aplicados como terapia de transfusión en cirugías de corazón abierto. (32) En otro estudio se transfundieron 7 unidades de sangre crió preservadas de donadores autólogos, las cuales fueron bien toleradas. No se detecto ninguna reacción adversa al frío. Solamente se reporto leucocitosis post-transfusión y un moderado incremento de LDH y bilirrubinas, pero estos efectos desaparecieron en 20 horas. La concentración de plaquetas, electrolitos, urea, proteínas y creatinina se encontraban en rangos fisiológicos. Las actividades de las enzimas hepáticas y los parámetros de los tiempos de coagulación no presentaron cambios. Inicialmente los niveles hemoglobina libre en plasma presento un incremento con un factor de 2. Disminuyendo en 20 horas, acompañado de la restauración de haptoglobina. Más del 85% de HES (hidroxietil) fue eliminado del plasma en un día. (31)

El uso de almidón hidroxietil (HES) es una alternativa al glicerol para la crió

preservación de eritrocitos. Inmediatamente después del descongelamiento los eritrocitos siguen alteraciones en el esqueleto de la membrana y disminuye la rigidez de la misma. Sin embargo en pocos minutos posteriores a la resuspensión en una solución fisiológica inicialmente existen cambios de poiquilocitosis en la bolsa a normocitos. Los niveles de ATP en los eritrocitos fue de aproximadamente 20 a 40% y no existe disminución de 2,3-DPG. Los radicales libres de O₂, generados es consecuencia de los procesos de congelación/descongelamiento cuando son inactivados los eritrocitos con sistemas antioxidantes. La hemólisis de eritrocitos humanos después del descongelamiento fue alrededor de 5%. Muchos de los problemas metodológicos y científicos concernientes a la crió preservación de eritrocitos son considerados ya resueltos. Después del permiso oficial para el uso en humanos, prácticamente se excluye completamente el riesgo de infecciones.

(33)

A diferencia de las mediciones colorimétricas, Iijima utilizo un estudio de cambios térmicos de la solución de glicerol-agua ó sistema binario y un sistema complejo glicerol-basado en solución crioprotectora, estas son utilizadas como soluciones crioprotectoras; en otros estudios se ha examinado el papel del glicerol en la preservación de glóbulos rojos en el congelamiento. La transición de temperatura entre el congelamiento y descongelamiento de las soluciones crioprotectoras de uso clínico fue medida, basada en un diagrama no equilibrado de fase de soluciones incorporándose solución salina isotónica como un fosfato ó buffer. Dos zonas fueron identificadas en las cuales la solidificación ocurrió cuando se formaron los cristales de hielo: un estado congelado esto es cristalograficamente amorfo fue

fundamentado por concentraciones de glicerol entre 40-55% en el sistema binario y entre 45-60% en el sistema complejo; un estado de congelamiento en completa ausencia de hielo se fundamenta a grandes concentraciones de glicerol de 55% para el sistema binario o 60% para el sistema complejo. En la práctica clínica, los crioprotectores son utilizados inicialmente a concentraciones bajas que aquellos con los cuales estos dos estados de congelación ocurren pero esto incrementa la concentración efectiva del glicerol dentro y fuera de la célula se forma hielo durante el proceso de congelación. (34) El comportamiento de los cristales de hielo y la estructura de los eritrocitos humanos durante la congelación puede ser bien estudiada con un microscopio tridimensional de rayo láser en células suspendidas en solución fisiológica con glicerol al 2.4%. (35)

La toxicidad de los crioprotectores es el principal obstáculo del fuerte potencial de criopreservación artificial, no obstante es pobre la que se entiende de este fenómeno. Desafortunadamente no se han realizado más estudios bioquímicos básicos que demuestren los mecanismos de toxicidad. Un estudio modelo bioquímico fue realizado por Baxter y Lathe, el cual demostró que la alteración específica de la enzima fructosa difosfatasa, fue causa de daño en la glucólisis después del tratamiento para remover el DMSO. Este daño es previsible por la aplicación de amidas simultáneamente. Baxter y Lathe postularon que el efecto del DMSO previene de la unión entre el hidrogeno y el DMSO y el grupo amino a la superficie de los residuos de lisina de la fructosa difosfatasa, esto fundamenta que las moléculas con las cuales se ensamblan estos grupos alteran los bloques fríos inducidos por el DMSO, presumiblemente por competir con la lisina para la asociación con el DMSO. (36) Los efectos fisicoquímicos del glicerol convierten a los eritrocitos bicóncavos en

estomatocitos, con lo cual se disminuye el área de superficie expuesta. La externalización de alcaloides y alcalinoides y la penetración del glicerol da como resultado una disminución en el área de superficie proyectada y la formación de esferocitos lisos. (37) El incremento de la concentración celular durante la crió preservación de los glóbulos rojos aumento la hemólisis. Las demanda importante aparece cuando los niveles de concentración celular exceden al 60%. El rechazo por hemólisis se presenta en un 63% de los paquetes eritrocitarios con exceso de volumen. (38)

Otros intentos para prevenir la hemólisis causada por las temperaturas bajas en los eritrocitos son la utilización de rayos láser previamente a su congelamiento, esto mostró que por arriba del 80% de los eritrocitos fue recuperado posterior al descongelamiento. (39) Un estudio hecho con electroforesis en gel de policrilamida de las proteínas de la membrana de los eritrocitos, muestra que el total de proteínas y el ácido siálico son significativamente disminuidos durante el congelamiento. El daño de la membrana eritrocitaria es causado por la adición de NaCl incrementando su osmolaridad. Estos cambios de la membrana son eliminados con la adición de glicerol. (40)

La experiencia desde 1971 de la transfusión de unidades crió preservadas en ultra-freezer y nitrógeno líquido, muestran que los efectos tóxicos del glicerol son mínimos, cuando se realiza una adecuada desglícerolización. Y la viabilidad de los eritrocitos post-transfusión es adecuada. (41)

La disminución gradual de ATP en los glóbulos rojos almacenados altera la función de la bomba Na/K; además, como las células se lisan durante el almacenamiento, se produce alza en el potasio plasmático. El nivel del potasio plasmático se puede elevar hasta 28 mEq/L en la sangre almacenada en CPDA-1 por 21 día. Es bien conocido que la capacidad de transporte de oxígeno se reduce con la sangre almacenada. El efecto resulta en una alteración en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno con reducción en los niveles de 2,3-DPG, durante el almacenamiento (después de los 5 ó 7 días de almacenamiento a 6°C). Cuando los niveles de 2,3-DPG se reducen, se aumenta la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Desvía la curva de disociación de la Hb hacia la derecha, disminuye el volumen de oxígeno que puede descargar a la presión fisiológica de O₂ venoso de 40 mm Hg. (42)

Característica de la Sangre Total almacenada por 35 días en CPDA-1

Características	0	7	14	21	35
Potasio plasma mEq/L	3.3	12.3	17.6	21.7	17.2
pH sangre total	7.16	6.94	6.93	6.87	6.73
Amonio sangre total (µg/dl)	82	280	423	521	703
Hemoglobina plasma (mg/dl)	0.5	13.1	24.7	24.7	45.6
ATP GR (µmol/gHb)	4.18	-	-	-	2.40
2,3-DPG GR (µmol/gHb)	13.2	6.80	5.40	3.52	2.40

JUSTIFICACIÓN

La sangre es un tejido de gran importancia y que actualmente aun con la tecnología más desarrollada no se ha podido sustituir. Este es un líquido vital que ha restaurado la salud de millones de personas . A pesar de que la oferta y la demanda de la sangre en México es abastecida, en algunas circunstancias como la presencia de grupos sanguíneos raros, desastres naturales y guerras civiles, pacientes con mezcla de aloanticuerpos esta obtención y conservación de la misma, no es adecuada. Es aquí donde importante y trascendente es la mejor conservación y almacenamiento, ya que con métodos convencionales de refrigeración de eritrocitos su almacenamiento es a corto plazo. Para estas personas una alternativa es la crió preservación de eritrocitos, método óptimo para preservar unidades a largo plazo.

HIPOTESIS

Las unidades de glóbulos rojos crió preservadas con glicerol a alta concentración posterior a su descongelamiento y desglicerolización cubrirán los estándares internacionales de viabilidad eritrocitaria.

JUSTIFICACIÓN

La sangre es un tejido de gran importancia y que actualmente aun con la tecnología más desarrollada no se ha podido sustituir. Este es un líquido vital que ha restaurado la salud de millones de personas . A pesar de que la oferta y la demanda de la sangre en México es abastecida, en algunas circunstancias como la presencia de grupos sanguíneos raros, desastres naturales y guerras civiles, pacientes con mezcla de aloanticuerpos esta obtención y conservación de la misma, no es adecuada. Es aquí donde importante y trascendente es la mejor conservación y almacenamiento, ya que con métodos convencionales de refrigeración de eritrocitos su almacenamiento es a corto plazo. Para estas personas una alternativa es la crió preservación de eritrocitos, método óptimo para preservar unidades a largo plazo.

HIPOTESIS

Las unidades de glóbulos rojos crió preservadas con glicerol a alta concentración posterior a su descongelamiento y desglicerolización cubrirán los estándares internacionales de viabilidad eritrocitaria.

OBJETIVOS

- 1.- Evaluación y validación del método de glicerolización y congelación de glóbulos rojos, con glicerol a alta concentración.
- 2.- Establecer un protocolo de control de calidad adecuado para la crió preservación de eritrocitos en el Banco de Sangre Hospital ABC, I.A.P.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizará un estudio longitudinal prospectivo, en cual se emplearán seis concentrados eritrocitarios de donadores altruistas ó familiares del Banco de Sangre del Hospital ABC, I.A.P. con menos de seis días de extracción y colectadas con CPDA-1, a las cuales se determinará su peso inicial, potasio, hemoglobina libre, plaquetas, leucocitos, hematocrito y 2,3-DPG básales. Para ser crió preservadas por el método manual con glicerol a alta concentración de Meryman y Valeri y almacenadas a -80°C en congelador F, modelo REVCO; por un periodo de 12 a 19 días. Posteriormente se eliminará el glicerol y se les realizará determinaciones de: Hemoglobina sobrenadante, 2,3-DPG, peso final, potasio, cuenta de leucocitos, plaquetas y hematocrito.

OBJETIVOS

- 1.- Evaluación y validación del método de glicerolización y congelación de glóbulos rojos, con glicerol a alta concentración.
- 2.- Establecer un protocolo de control de calidad adecuado para la crió preservación de eritrocitos en el Banco de Sangre Hospital ABC, I.A.P.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizará un estudio longitudinal prospectivo, en cual se emplearán seis concentrados eritrocitarios de donadores altruistas ó familiares del Banco de Sangre del Hospital ABC, I.A.P. con menos de seis días de extracción y colectadas con CPDA-1, a las cuales se determinará su peso inicial, potasio, hemoglobina libre, plaquetas, leucocitos, hematocrito y 2,3-DPG básales. Para ser crió preservadas por el método manual con glicerol a alta concentración de Meryman y Valeri y almacenadas a -80°C en congelador F, modelo REVCO; por un periodo de 12 a 19 días. Posteriormente se eliminará el glicerol y se les realizará determinaciones de: Hemoglobina sobrenadante , 2,3-DPG, peso final, potasio, cuenta de leucocitos, plaquetas y hematocrito.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1- Donantes con historia clínica completa
- 2- Carta firmada por el donador de su consentimiento (altruista) ó carta del Jefe de Banco de Sangre que dona las unidades para dicho protocolo.
- 3- Colectadas en CPDA-1
- 4- Serología negativa de las unidades a crió preservar
- 5- Concentrados Eritrocitarios con peso inicial de 300 a 360gr
- 6- Concentrados Eritrocitarios con hematocrito de 55 a 80%
- 7- Concentrados Eritrocitarios de seis o menos días de extracción.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Eritrocitos de donantes con serología positiva
2. Unidades con más de seis días de extracción
3. Unidades que no son recolectadas con CPDA-1
4. Unidades de peso menor a 300gr ó mayores de 390gr
5. Unidades con presencia de coágulos
6. Concentrados Eritrocitarios con presencia de hemólisis a simple vista

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1- Donantes con historia clínica completa
- 2- Carta firmada por el donador de su consentimiento (altruista) ó carta del Jefe de Banco de Sangre que dona las unidades para dicho protocolo.
- 3- Colectadas en CPDA-1
- 4- Serología negativa de las unidades a crió preservar
- 5- Concentrados Eritrocitarios con peso inicial de 300 a 360gr
- 6- Concentrados Eritrocitarios con hematocrito de 55 a 80%
- 7- Concentrados Eritrocitarios de seis o menos días de extracción.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Eritrocitos de donantes con serología positiva
2. Unidades con más de seis días de extracción
3. Unidades que no son recolectadas con CPDA-1
4. Unidades de peso menor a 300gr ó mayores de 390gr
5. Unidades con presencia de coágulos
6. Concentrados Eritrocitarios con presencia de hemólisis a simple vista

MÉTODO DE MEYMAN Y VALERI

Material

1. Seis unidades de eritrocitos de donante colectadas en CPDA-1
2. Seis soluciones para crió preservación: Glicerol 6,2 M. 450 ml
3. Balanza
4. Baño termostático a 37°C
5. Conectores
6. Congelador F, Modelo REVCO -80°C
7. Centrifuga de Bolsas
8. Gasas estériles
9. Conector estéril

Procedimiento:

- 1- Una vez seleccionada la unidad a congelar se debe tener en cuenta su peso y los días transcurridos desde la extracción. No debe sobrepasar de los 6 días desde la extracción.
- 2- La unidad seleccionada se deja a temperatura ambiente para que tome temperatura de 25°C. También puede ser colocada en un baño termostático (se coloca envuelta en una bolsa plástica) para que alcance dicha temperatura. En paralelo se produce de igual manera con glicerol. Una vez alcanzada la temperatura óptima se procede con la glicerolización.

- 3- Se conecta en forma aséptica (utilizando el conector estéril) el extremo de la bolsa con glicerol al chicote de la bolsa de glóbulos.
- 4- Una vez realizada la conexión se agrega 50 ml. de glicerol por medio de un desnivel entre la bolsa de glicerol y la bolsa de glóbulos. La diferencia de altura debe ser de aproximadamente 25 a 30 cm a favor de la primera. Todo el procedimiento debe realizarse mientras se agita constantemente la bolsa de glóbulos. Este movimiento continuo se realizará en forma circular con una intensidad de 200 ciclos, dejando a continuación a la unidad en reposo por 5 minutos. Una vez transcurrido el plazo en el cual la bolsa permanece estática, se repite el movimiento de agitación circular de la unidad y se deja en reposo durante otros 5 minutos.
- 5- Luego de transcurridos los 5 minutos, se agregan los 400 ml de glicerol restantes. El procedimiento se repetirá tal como se lo describió en el punto 4, pero el desnivel entre las bolsas será de 70 cm. a favor del glicerol.
- 6- Una vez completada la glicerolización de los eritrocitos se deja que estos refluyan hacia la bolsa que contenía el glicerol. Para ello se coloca la bolsa de glóbulos a 50 cm. aproximadamente sobre el glicerol. Nuevamente se realiza una agitación lenta hasta que se complete el trasvase.
- 7- Cuando se haya completado el traspaso de células a la bolsa que contenía el glicerol, se sella el extremo y se rotula la bolsa con los siguientes datos: No. De Unidad, Resultados de serología, Grupo ABO y Factor Rh (en el caso que sea negativo aclarar el genotipo), Fecha de extracción y Masa inicial de glóbulos rojos (M.I.). Además, debe colocarse una aclaración que especifique NO USAR PARA TRANSFUSIÓN, unidades de protocolo de investigación.

Este paso de identificación puede realizarse también luego de la centrifugación, pero manteniendo la identificación de la unidad para no perder datos de la bolsa.

- 8- Se centrifuga la unidad a 1000 g durante 10 minutos, se elimina el glicerol sobrenadante cortando el extremo de la tabuladora en forma aséptica y se le sella utilizando un sellador mecánico.
- 9- Se corrobora que todos los códigos de barras estén colocados.
- 10- Se introduce la bolsa en una caja plástica o de cartón para asegurar su integridad durante el almacenamiento.
- 11- Se ingresa en los registros del banco de sangre la condición de "glóbulos congelados" para la unidad procesada.
- 12- Se coloca la unidad en el congelador F, modelo REVCO a -80°C , entre 2 bolsas ya congeladas para favorecer su congelamiento. Si al momento de congelar la unidad transcurrieron más de 4 horas desde la glicerolización, la unidad deberá colocarse a 4°C hasta su congelación.

DESCONGELAMIENTO Y DESGLICEROLIZACIÓN (Lavado Manual)

Material:

- 1- Baño Termostático a 37°C .
- 2- Solución de Cloruro de Na 12%
- 3- Solución de Cloruro de Na 1.6%
- 4- Solución de Cloruro de Na 0.9%
- 5- Centrifuga de Bolsas

Este paso de identificación puede realizarse también luego de la centrifugación, pero manteniendo la identificación de la unidad para no perder datos de la bolsa.

- 8- Se centrifuga la unidad a 1000 g durante 10 minutos, se elimina el glicerol sobrenadante cortando el extremo de la tabuladora en forma aséptica y se le sella utilizando un sellador mecánico.
- 9- Se corrobora que todos los códigos de barras estén colocados.
- 10- Se introduce la bolsa en una caja plástica o de cartón para asegurar su integridad durante el almacenamiento.
- 11- Se ingresa en los registros del banco de sangre la condición de "glóbulos congelados" para la unidad procesada.
- 12- Se coloca la unidad en el congelador F, modelo REVCO a -80°C , entre 2 bolsas ya congeladas para favorecer su congelamiento. Si al momento de congelar la unidad transcurrieron más de 4 horas desde la glicerolización, la unidad deberá colocarse a 4°C hasta su congelación.

DESCONGELAMIENTO Y DESGLICEROLIZACIÓN (Lavado Manual)

Material:

- 1- Baño Termostático a 37°C .
- 2- Solución de Cloruro de Na 12%
- 3- Solución de Cloruro de Na 1.6%
- 4- Solución de Cloruro de Na 0.9%
- 5- Centrifuga de Bolsas

- 6- Balanza
- 7- Gasas Estériles
- 8- Sellador
- 9- Conector

Procedimiento:

- 1- Colocar los Glóbulos Rojos seleccionados en el baño termostático (37°C), dentro de un recipiente protector.
Agitar manualmente el recipiente en forma periódica, con intervalos de 3 minutos, para favorecer el descongelamiento. Debe controlarse permanentemente que la temperatura del baño se mantenga estable a 37°C.
El proceso de descongelamiento dura entre 15 y 20 minutos.
- 2- Una vez descongelada la unidad, se la conecta por medio del chicote al extremo distal de la bolsa de cloruro de sodio al 12%.
Se colocan las unidades en un desnivel de 60 cm. entre la bolsa de cloruro de sodio al 12% y la bolsa a descongelar, que de esta manera recibirá de la primera el cloruro de sodio al 12%.
- 3- Se agregarán 50 ml de cloruro de sodio al 12%, agitando la bolsa a desglícerar para favorecer la homogeneización. Posteriormente la bolsa con los glóbulos debe quedar en reposo durante 5 minutos.

- 4- Una vez transcurridos los 5 minutos se conecta el extremo que contiene el chicote a la orejuela preparada para tal fin que tiene la bolsa de cloruro de sodio al 1.6%. Se agregan 300 ml de solución con un desnivel entre la bolsa de cloruro de Na y la bolsa a descongelar de 90 centímetros. Se sella la tabuladora y se deja reposar la unidad durante 5 minutos.
- 5- Se equilibra para la centrifugación y eliminación del sobrenadante. Se centrifugará a una velocidad de 1000 g durante 10 minutos, dejando que ésta se detenga totalmente sin utilización del freno.
- 6- Se coloca la bolsa, tratando de no agitarla, y se procede a eliminar el sobrenadante. Esto se realiza cortando el chicote distal de la bolsa y separando el sobrenadante por medio de una prensa de bolsas.
- 7- Una vez eliminado el sobrenadante se agrega nuevamente cloruro de sodio al 1.6% tal cuál se describió en el paso No. 4. Nuevamente se deja en reposo a la unidad durante 5 minutos y se la vuelve a centrifugar, según lo descrito en el paso No. 5.
- 8- Se repiten los pasos No. 6 y 7 consecutivamente hasta completar un volumen de lavado del cloruro de sodio al 1.6% de aproximadamente 2000 ml.
- 9- Si el sobrenadante no es limpio, se repiten los pasos 6 y 7 hasta alcanzar un volumen de lavado de 1000 ml, con solución de cloruro de sodio al 1.6%. Si no se alcanza el nivel mínimo de hemoglobina sobrenadante se descartará la bolsa. Este parámetro está detallado al final de la técnica, en los aspectos relacionados con el control de calidad.
- 10- Si se observa el sobrenadante limpio, se procede a realizar los lavados con cloruro de sodio al 0.9% y su posterior resuspensión en dicha solución.
- 11- Se lava a los eritrocitos desglícerolados con 300 ml de cloruro de sodio al 0.9% y se

elimina en cada paso el sobrenadante, cortando el extremo distal del chicote de la bolsa. Se repiten los lavados y luego se sella el extremo distal. Se completará aproximadamente un volumen de 1000 ml de lavado.

12- Una vez completado el lavado con cloruro de Na al 0.9%, se realiza una resuspensión en dicha solución, agregando 50 ml mediante la conexión del extremo distal del chicote de la bolsa al extremo de la tabuladora conectada al cloruro de sodio.

La bolsa se debe mantener hasta su uso a una temperatura de 1 a 6°C durante no más de 24 horas. (17, 43)

Control de Calidad:

Temperatura: La temperatura del congelador se controla como mínimo 3 veces al día y con alarma auditiva que indique cuando están fuera del rango de temperatura aceptado.

Peso: Se debe recuperar como mínimo el 80% del peso inicial de la bolsa de glóbulos.

Hemoglobina Sobrenadante: Se determina la hemoglobina sobrenadante con método de bencidina. Esta no debe ser mayor de 1gr/unidad.

Observación del Sobrenadante: El sobrenadante debe ser limpio y sin hemólisis.

elimina en cada paso el sobrenadante, cortando el extremo distal del chicote de la bolsa. Se repiten los lavados y luego se sella el extremo distal. Se completará aproximadamente un volumen de 1000 ml de lavado.

12- Una vez completado el lavado con cloruro de Na al 0.9%, se realiza una resuspensión en dicha solución, agregando 50 ml mediante la conexión del extremo distal del chicote de la bolsa al extremo de la tabuladora conectada al cloruro de sodio.

La bolsa se debe mantener hasta su uso a una temperatura de 1 a 6°C durante no más de 24 horas. (17, 43)

Control de Calidad:

Temperature: La temperatura del congelador se controla como mínimo 3 veces al día y con alarma auditiva que indique cuando están fuera del rango de temperatura aceptado.

Peso: Se debe recuperar como mínimo el 80% del peso inicial de la bolsa de glóbulos.

Hemoglobina Sobrenadante: Se determina la hemoglobina sobrenadante con método de bencidina. Esta no debe ser mayor de 1gr/unidad.

Observación del Sobrenadante: El sobrenadante debe ser limpio y sin hemólisis.

Tabla de Control de la Unidad Descongelada:

NO. Unidad	Tiempo de almacenamiento	Leucoci tos	K	Peso de unidades	Hemoglobina Sobrenadante	Motivo de descarte

México D.F. a _____ del 2000.

Yo _____; por medio de la presente hago constar que dono mi sangre y autorizo utilizarla; para un protocolo de crió preservación de glóbulos rojos a alta concentración de glicerol; que se realizará en el Hospital ABC, I.A.P. ; México D.F.

Acepto bajo mi responsabilidad, las reacciones adversas inherentes a la donación.

Atentamente

Firma del donador

RESULTADOS

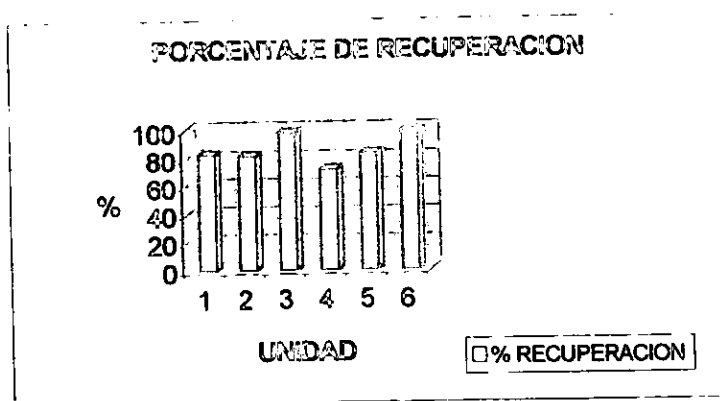
Se seleccionaron seis unidades de Concentrados Eritrocitarios colectados en CPD/ADSOL, del Banco de Sangre del Hospital ABC, I.A.P. de diferentes grupos sanguíneos, dos de 6 días, dos de 3 días y dos de 3 horas de extracción respectivamente.

En la tabla 1 y gráfica 1 se muestra el porcentaje de recuperación de masa de cada unidad.

FORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE MASA

UNIDAD	BASAL	FINAL	% RECUPERACION
	PESO (grs)	PESO (grs)	
1	386.5	320.3	82.87192755
2	332.6	271.8	81.71978352
3	349.2	343.5	98.36769759
4	374.4	269.5	71.98183761
5	349.8	292.3	83.56203545
6	325.2	319.6	98.27798278

TABLA 1



GRAFICA 1

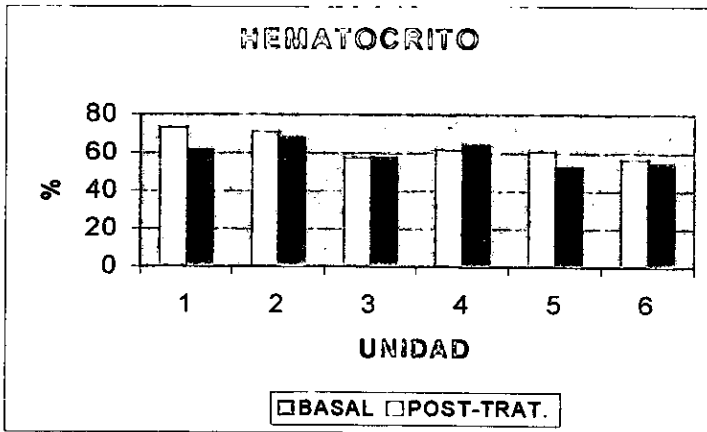
La temperatura del congelador F, modelo REVCO se mantuvo entre 80° y 81°C durante los 19 días de congelamiento.

En la tabla 2 y gráfica 2 se presenta el porcentaje de recuperación de hematocrito, de las unidades posterior a su descongelamiento.

HEMATOCRITO

BOLSA	BASAL	POST-TRAT.	% RECUPERACIÓN.
1	73	61.4	84.109589
2	71.2	68.3	95.9269663
3	57	57.4	100.701754
4	61.3	64.1	104.5677
5	60.7	52.5	86.490939
6	56.3	54.6	96.9804618

TABLA 2



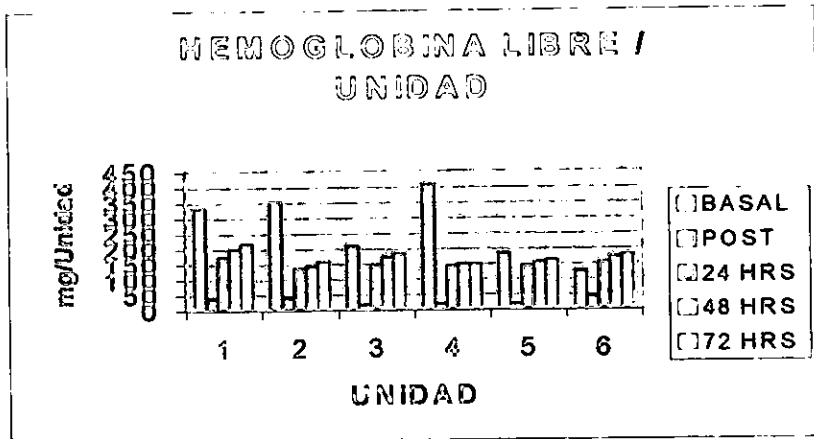
GRAFICA 2

En la tabla 3, gráfica 3 se muestra la concentración de hemoglobina libre por unidad; basal posterior al descongelamiento y su seguimiento por 72 horas.

HEMOGLOBINA LIBRE POR UNIDAD

UNIDAD	BASAL mg/unidad	POST mg/unidad	24 HRS mg/unidad	48 HRS mg/unidad	72 HRS mg/unidad
1	331.3	37.05	173.63	198.17	217.22
2	353.56	39.76	136.27	141.08	152.99
3	207.12	15.59	147.39	172.22	182.09
4	407.47	20.05	142.8	148.1	148.1
5	182.98	17.28	143.44	154.24	161.54
6	124.15	41.09	154.4	171.19	176.88

TABLA 3



GRAFICA 3

Podemos observar en la tabla 3.1, que la concentración de hemoglobina libre durante el primer lavado de la unidad número cuatro es mayor a un gramo; debido a la mayor presencia de hemólisis.

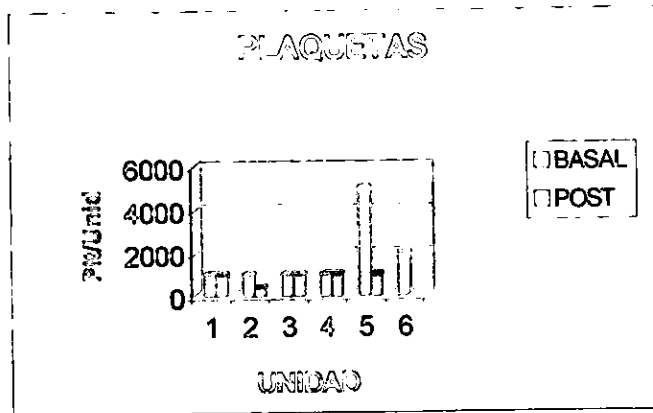
TABLA DE HB LIBRE / UNIDAD

UNIDAD	1er. Lavado mg/unid	último Lavado mg/unid
1	874.28	37.05
2	753.5	39.76
3	648.9	15.59
4	1234.3	20.05
5	620.15	17.28
6	549.4	41.09

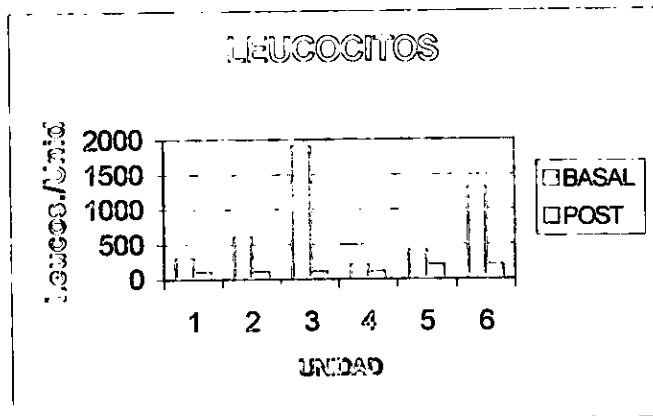
La concentración de plaquetas y leucocitos por unidad se muestra en la tabla 4 y gráficas 4 y 4.1.

TABLA DE PLAQUETAS Y LEUCOCITOS

UNIDAD	PLAQUETAS		LEUCOCITOS	
	BASAL Miles/Unidad	POST Miles/Unidad	BASAL Miles/Unidad	POST Miles/Unidad
1	1000	1000	300	100
2	1000	400	600	100
3	1000	1000	1900	100
4	1000	1000	200	100
5	5000	1000	400	200
6	2000	0	1300	200



GRAFICA 4



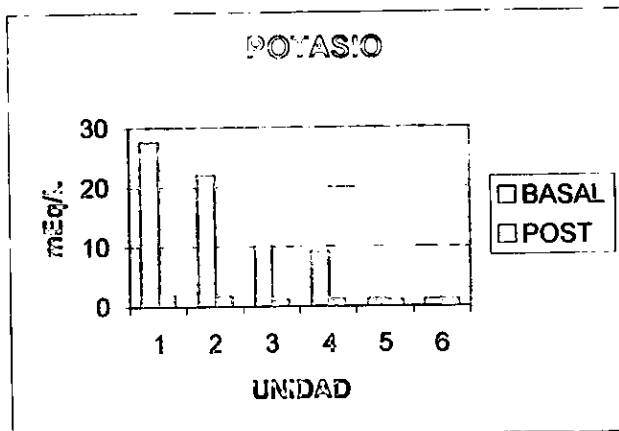
GRAFICA 4.1

En la tabla 5 y gráfica 5 se muestra la concentración de potasio de las seis unidades crío preservadas con cifras basales y posterior a su descongelamiento.

TABLA DE POTASIO

UNIDAD	BASAL	POST
1	27.55	1.8
2	21.99	1.5
3	10	1
4	9.1	1.1
5	1.08	0.9
6	1.04	1

TABLA 5



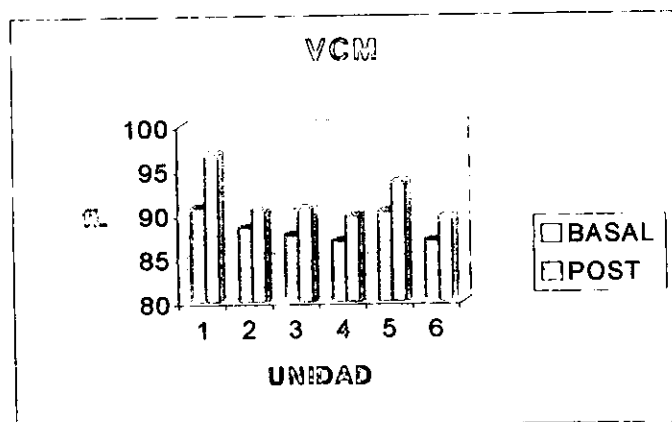
GRAFICA 5

En la tabla 6, gráfica 6 se muestra el volumen corpuscular de los eritrocitos previos a su glicerolización y posterior al descongelamiento.

VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO

BOLSA	BASAL fl.	POST fl.	% AUMENTO
1	90.8	95.8	6.607929515
2	88.5	90.5	2.259887006
3	87.6	90.7	3.538812785
4	87	89.8	3.218390805
5	90.3	93.7	3.765227021
6	87	89.7	3.103448276

TABLA 6



GRAFICA 6

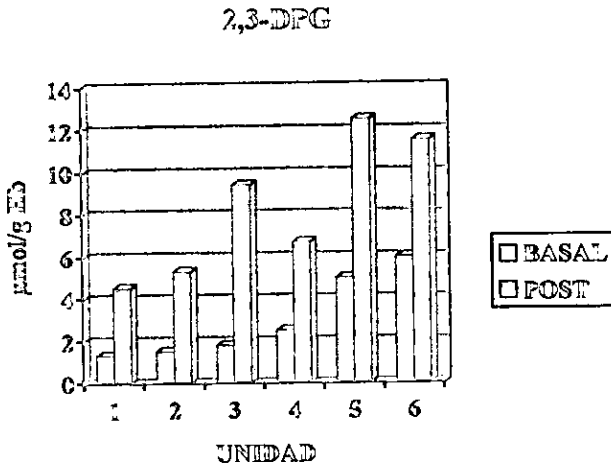
No se documento ninguna contaminación bacteriana, el reporte de los hemocultivos de las seis unidades post-desglicerolización a los siete días fue negativo.

En la tabla 7, gráfica 7 mostramos que los niveles de 2,3-DPG, se conservan posterior al congelamiento y descongelamiento.

TABLA DE 2,3-DPG

u	BASAL	POST
1	1.3	4.5
2	1.5	5.3
3	1.8	9.4
4	2.5	6.7
5	5	12.5
6	6	11.5

TABLA 7



GRAFICA 8

DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo se cumplió se logró congelar glóbulos rojos con el método manual de Meryman y Valeri.

La cuenta de leucocitos y la determinación de potasio mostró una disminución posterior a la desglícerolización, similar a los reportes hechos en la literatura. (21, 27)

La disminución de las plaquetas en nuestras unidades fue mínimo, ya que nuestros concentrados eritrocitarios son fraccionados con un método de leucorreducción.

Se observó un incremento del VCM de los eritrocitos, lo cual no es referido en la literatura. Quizás este incremento se deba a remanentes de glicerol en el interior del eritrocito. Similar a lo encontrado por la Fundación Hematológica Sarmiento, en Argentina. (43)

Los niveles de hemoglobina libre por unidad post-desglícerolización muestran que la velocidad de congelación fue óptima y la lisis eritrocitaria fue dentro de límites permisibles; excepto en la unidad número cuatro en la cual la hemólisis posterior a la glicerolización fue mayor a lo permisible; al realizar la glicerolización con la misma metodología así como su descongelamiento, quizás esta hemólisis se deba a un daño provocado por el glicerol a la membrana eritrocitaria.

Con el objeto de valorar la hemólisis realizamos un seguimiento de la hemoglobina libre, se puede observar que a las 24 horas presenta una elevación importante mayor al 100% y posterior a las 48 horas tiende a mantenerse el incremento de la hemólisis más estable, esto confirma que en nuestras unidades la hemólisis se encuentra dentro de la reportada en diversos trabajos. (41)

Durante el procedimiento de glicerolización como de descongelamiento y desglícerolización se utiliza una técnica estéril, la cual se corrobora con los resultados de hemocultivos negativos de todas las unidades sometidas al procedimiento; como lo refiere la Marina de los Estados Unidos y la Cruz Roja Americana. (19)

Los niveles de 2,3-DPG se mantuvieron aceptables pre y pos-tratamiento de las unidades, lo cual nos indica buena capacidad de transporte de oxígeno. (19,20)

El método es fácil y laborioso, se debe tener un seguimiento adecuado sin omisión de la técnica, se debe contar con adecuados contenedores para la conservación de las unidades.

CONCLUSIONES

Se cumplió con los objetivos; se logró glicerolizar, congelar a -80°C las seis unidades de glóbulos rojos y desglicerolizarlas con técnica estéril. El segundo realizar diferentes determinaciones básicas y post-desglicerolización de plaquetas, leucocitos, potasio, hemoglobina libre por unidad y 2,3-DPG.

Logramos validar la técnica de glicerolización y congelación de glóbulos rojos.

Por lo que, nuestra hipótesis fue cierta al obtener resultados de pruebas *in vitro* que demuestran la viabilidad de los eritrocitos posterior al descongelamiento y desglicerolización; así como la eliminación casi total de las plaquetas, leucocitos y potasio de las unidades; se demostró la reproducibilidad del método.

Las unidades de menos tiempo de extracción presentan menor hemólisis durante el procedimiento y niveles adecuados de 2,3-DPG, por lo cual recomendamos glicerolizar unidades de menos de 24 horas de extracción.

Para realizar un adecuado control de calidad de las unidades posterior a su desglicerolización el mejor indicador de viabilidad eritrocitaria son la determinación de la hemoglobina libre/ unidad en el último lavado con solución 1.6% para descartar hemólisis mayores de 1g/unidad y los niveles de 2,3-DPG.

Nosotros recomendamos realizar, estudios *in vivo*, en donde el objetivo sea valorar la viabilidad de los eritrocitos crío preservados.

El método es fácil y laborioso, se debe tener un seguimiento adecuado sin omisión de la técnica, se debe contar con adecuados contenedores para la conservación de las unidades.

CONCLUSIONES

Se cumplió con los objetivos; se logró glicerolizar, congelar a -80°C las seis unidades de glóbulos rojos y desglicerolizarlas con técnica estéril. El segundo realizar diferentes determinaciones básicas y post-desglicerolización de plaquetas, leucocitos, potasio, hemoglobina libre por unidad y 2,3-DPG.

Logramos validar la técnica de glicerolización y congelación de glóbulos rojos.

Por lo que, nuestra hipótesis fue cierta al obtener resultados de pruebas *in vitro* que demuestran la viabilidad de los eritrocitos posterior al descongelamiento y desglicerolización; así como la eliminación casi total de las plaquetas, leucocitos y potasio de las unidades; se demostró la reproducibilidad del método.

Las unidades de menos tiempo de extracción presentan menor hemólisis durante el procedimiento y niveles adecuados de 2,3-DPG, por lo cual recomendamos glicerolizar unidades de menos de 24 horas de extracción.

Para realizar un adecuado control de calidad de las unidades posterior a su desglicerolización el mejor indicador de viabilidad eritrocitaria son la determinación de la hemoglobina libre/ unidad en el último lavado con solución 1.6% para descartar hemólisis mayores de 1g/unidad y los niveles de 2,3-DPG.

Nosotros recomendamos realizar, estudios *in vivo*, en donde el objetivo sea valorar la viabilidad de los eritrocitos crió preservados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnes D, Loutit J. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes Technique. *J Nat Cancer Inst* 1955;15:901-7. U.S.A.
2. Cavins J, Scher S, Thomas E, Ferrebee J. The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at -80°C . *Blood* 1964;23:38-43. U.S.A.
3. Storb R, Epstein R, Leblond R, et al. Transplantation of allogenic canine bone marrow stored at -80°C in dimethyl-suphoxide. *Blood* 1969; 5: 537- 42. U.S.A.
4. Ashwood - Smith M. Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethylsuphoxide. *Nature* 1961; 190: 1204-5. U.S.A.
5. Clark J, Pati A, Mc Carthy D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled rate-freezer. *Bone Marrow Transplantation* 1991; 7: 121-5. U.S.A.
6. Lovelock J, Bishop M. Prevention of freezing to living cells by dimethylsuphoxide. *Nature* 1959; 183: 1394 -5. E.E.U.U.
7. Meryman H. Preservation of living cells. *Fed. Proc.* 1963; 11:81-9 U.S.A.
8. Meryman H. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971; 8: 173-83. U.S.A.
9. Mazur P. Theoretical and experimental affects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 1966; 1: 181 - 4. U.S.A.
10. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 14: 251 - 72. U.S.A.

11. Franks F, Mathias S, Galfre P et al. Ice nucleation in undercooled cells. *Cryobiology* 1983; 20: 298 – 309. U.S.A.
12. Vila L, García J, Carretero F, et al. Estudio de la transmisión de calor en los procesos de congelación de muestras biológicas. *Biol Clin Hematol* 1984; 3: 44 – 7. España.
13. Farrant J, Woolgar A. Possible relationship between the physical properties of solutions and cell damage during freezing. En: Wollstenholme G, O' Connor M, Churchill A. editores. *The frozen cell*. London 1970. 97-114. Inglaterra
14. Sherman J, Liu K. Relation of ice formation to ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of rough endoplasmic reticulum. *Cryobiology* 1976; 13: 599 – 608. U.S.A.
15. Rowe a, Rinfret A. Controlled rate freezing of bone marrow. *Blood* 1966; 20: 636 – 41. U.S.A.
16. Radillo A. *Medicina Transfusional*. Ed. Prado 1999. pags. 599 – 610.
17. American Association of Blood Banks. *Technical Manual*. 1996. 12th edition. Pags. 147- 156.
18. Contreras TJ, Valeri CR. Comparison of methods to wash Liquid-Stored red blood cells and red blood cells Frozen with high or low concentrations of glycerol. *Transfusion* 1976; 16(6): 539- 65. U.S.A.
19. Szymanski IO, Carrington EJ. Evaluation of a large-scale frozen blood program. *Transfusion* 1977; 17(5): 431 – 7. U.S.A.
20. Moroff G, Meryman HT. Influence of glycerol on ATP and 2,3-DPG levels of human erythrocytes. *Vox Sang* 1979; 36(4): 244-51.

21. Meryman HT. Red cell freezing by the American National Red Cross. *Am J Med Technol* 1975; 41(7): 265-82. U.S.A.
22. Beaujean F, Le Forestier C, Duedari N. Red cell preservation by freezing at - 25 degrees C. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1982; 25(4): 427- 38. Francia.
23. Alter HJ, Tabor E, Meryman HT, et al. Transmission of hepatitis virus infection by transfusion of frozen-deglycerolized red blood cells. *N Engl J Med* 1978. 23;298(12): 637 - 42. Inlaterra.
24. Eighouzzi MH, Sabolie V, Cavalier J. Adaptation of a freezing technic with a low concentration of glycerol for preserving red blood cells resuspended in saline - adenine - glucose. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1984; 27(1): 67 - 76. Francia.
25. Valeri CR. Simplification of the methods for adding and removing glycerol during freeze-preservation of human red blood cells with the high or low glycerol methods: biochemical modification prior to freezing. *Transfusion* 1975; 15(3): 195 - 218. U.S.A.
26. Meryman HT, Hornblower M. A simplified procedure for deglycerolizing red blood cells frozen in a high glycerol concentration. *Transfusion* 1977; 17 (5): 438 - 42. U.S.A.
27. Meryman HT. Frozen red cells. *Transfus Med Rev* 1989; 3(2): 121 - 7. U.S.A.
28. Merriwether DA. Freezer anthropology: new uses for old blood. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 199; 29: 354 (1379): 121 - 9. Inlaterra.
29. Meryman HT, Hornblower M. Quality Control for deglycerolized red blood cells. *Tansfusion* 1981; 21(3): 235 - 40. U.S.A.
30. Thomas MJ. Blood transfusion in disasters, war, and emergencies. *Curr Opin*

Hematol 1997; 4(6): 459 – 63. U. S. A.

31. Sputtek A, Singbartl G, Langer R, Schleinzner W, et al. Cryopreservation of erythrocytes using hydroxyethyl starch: in vivo results of an autologous retransfusion model in humans. Beitr Infusionsther Transfusionsmed 1994; 32:44 – 7. Germany
32. Shilo VV, Novozhilova AP, Sudus AV. Morphological changes of cryopreserved erythrocytes in heart surgery patients under effects of continuous perfusion. Vestn Khir Im II Grek 1997; 156(6): 49-52. Rusia.
33. Henrich HA, Langer R. Erythrocytes after cryopreservation with HES: molecular, structural and functional characteristics. Zentralbl Chir 1999; 124(4): 271-7. Germany.
34. Iijima T. Thermal analysis of cryoprotective solutions for red blood cells. Cryobiology 1998; 36(3): 165 – 73. U.S.A.
35. Ishiguro H, Koike K. Three-dimensional behavior of ice crystals and biological cells during freezing of cell suspensions. Ann NY Acad Sci 1998. 11; 858: 235 – 44. U.S.A.
36. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Cryobiology 1990; 27(3): 247 – 68. U.S.A.
37. Bakaltcheva IB; Odeyale CO; Spargo BJ. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. Biochim Biophys Acta; 1996. 1280; ISS 1: 73 – 80. U.S.A.

38. De Loecker W, Koptelov VA, Grischenko VI, et al. Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation. *Cryobiology* 1998; 37(2): 103 – 9. Belgium.
39. Fowler AJ, Toner M. Prevention of hemolysis in rapidly frozen erythrocytes by using a laser pulse. *Ann NY Acad Sci* 1998.11; 858: 245 – 52. U.S.A.
40. Ballas SK. Red cell membrane protein changes caused by freezing and the mechanism of cryoprotection by glycerol. *Transfusion* 1981; 21(2): 203 – 10. U.S.A.
41. Marshall LR, Campbell AL, Anderson JC; et al. Routine Freezing of red blood cells for transfusion in Western Australia. *Pathology* 1976; 8(4): 281 – 8. Australia.
42. Mollison, Engelfried, Contreras. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*; Naith Edition; Blackwell. Pags. 410-427.
43. Fundación Hematológica Sarmiento. Método manual para la crío preservación de glóbulos rojos con glicerol a alta concentración. Adaptación del método de Meryman y Valeri. Buenos Aires. Argentina.