



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS,**  
**ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD  
FARMACOLOGÍA CLÍNICA

**DETERMINACIÓN DE MICROPARTÍCULAS EN**  
**COMPONENTES SANGUÍNEOS DE BANCO DE**  
**SANGRE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**EMMANUEL RAFAEL HERNÁNDEZ GARZÓN**

TUTORA:  
**DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

ABRIL 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# **COMITÉ EVALUADOR**

---

**Presidente**

**Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza**

---

**Secretario**

**Dr. Óscar Armando Pérez Méndez**

---

**Vocal**

**Dra. Aurora de la Peña Díaz**

---

**Vocal**

**José Manuel Rodríguez Pérez**

---

**Vocal**

**Dr. Eduardo Anglés-Cano**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco infinitamente:

El apoyo recibido mediante la beca CONACYT (CVU 626210)

Al posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

El apoyo recibido por el personal que labora en el Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis del Instituto Nacional de Cardiología/UNAM a cargo de la Dra. Aurora de La Peña Díaz.

A la Dra. Mirthala Flores García por su invaluable apoyo para el desarrollo de este proyecto.

Los consejos y apoyo recibido por parte del Dr. Eduardo Anglés-Cano del INSERM, UMRS 1140 "Therapeutic Innovations In Haemostasis". Fac Sciences Pharmaceutiques & Biologiques. París, Francia.

El apoyo recibido por la jefa del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología, la Dra. Ana María Mejía Domínguez y a todo el personal que labora en él.

A los profesores que me apoyaron con sus comentarios y observaciones en la elaboración de mi proyecto y tesis.

A los miembros del comité de revisión de este trabajo.

Esta tesis forma parte del proyecto Fibrinolytic Microparticles: protein, functional and mRNA evaluation in acute CORonary syndromes (FIMICOR) 047/2014, del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM, IN219117.

## DEDICATORIA

A Dios

A mi familia

Padres: Rafael y Guadalupe

Hermanas: Zoe (JC, Martin y Fer) y Luz María

A los amores de mi vida BC y León

A las Familias Escandón - Hernández, Escandón - Escandón, Flores-García, Gaona-Flores, Álvarez-Flores que siempre me estuvieron apoyando y alentando a seguir.

A mis amigos

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	9
RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	12
GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....	14
GLOSARIO CONCEPTUAL .....	16
INTRODUCCIÓN .....	17
TIPOS DE VESÍCULAS .....	17
<i>EXOSOMAS</i> .....	18
<i>CUERPOS APOPTÓTICOS</i> .....	18
<i>MICROPARTÍCULAS / MICROVESÍCULAS</i> .....	19
FORMACIÓN DE UNA MICROVESÍCULA.....	24
CUANTIFICACIÓN DE MICROVESÍCULAS .....	27
FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS MICROVESÍCULAS .....	31
MICROVESÍCULAS EN DIVERSAS PATOLOGÍAS .....	34
ESTUDIO DEL LINAJE CELULAR DE LAS MICROVESÍCULAS .....	36
COMPONENTES SANGUÍNEOS DEL BANCO DE SANGRE.....	36
<i>CONCENTRADOS ERITROCITARIOS (CE)</i> .....	37
<i>CONCENTRADOS PLAQUETARIOS (CP)</i> .....	37
<i>PLASMA FRESCO (PF)</i> .....	38

<i>CRIOPRECIPITADOS (CRIO)</i> .....	38
ANTECEDENTES .....	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	42
JUSTIFICACIÓN.....	43
HIPÓTESIS .....	44
OBJETIVOS .....	45
OBJETIVO GENERAL .....	45
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	45
MÉTODOS .....	46
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	46
ESQUEMA DE DISEÑO DE ESTUDIO .....	46
CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA .....	47
CRITERIOS DE SELECCIÓN:.....	48
<i>CRITERIOS DE INCLUSIÓN:</i> .....	48
<i>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:</i> .....	48
<i>CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:</i> .....	49
METODOLOGÍA:.....	50
VARIABLES DE ESTUDIO .....	50
<i>EXTRACCIÓN DE CONCENTRADO PLAQUETARIO POR MÉTODO DE AFÉRESIS</i> .....	51
<i>EXTRACCIÓN DE UNIDAD DE SANGRE TOTAL</i> .....	51
<i>PROCESAMIENTO DE LA SANGRE TOTAL</i> .....	52
<i>ALÍCUOTAS DE COMPONENTES SANGUÍNEOS</i> .....	53
<i>PREPARACIÓN DE SOBRENADANTE PARA SEPARACIÓN DE Mvs:</i> .....	53
TRATAMIENTO PRE-ANALÍTICO A PARTIR DE CE, CP, PF Y CRIO.....	53
EXTRACCIÓN DE Mvs.....	54

<i>CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE Mvs</i> .....	56
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	57
RESULTADOS.....	58
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	58
<i>RESULTADOS Y CARACTERISTICAS DESCRIPTIVAS DE CONCENTRADOS ERITROCITARIOS</i> .....	59
<i>RESULTADOS Y CARACTERISTICAS DESCRIPTIVAS DE CONCENTRADOS PLAQUETARIOS</i> .....	61
<i>RESULTADOS Y CARACTERISTICAS DESCRIPTIVAS DE PLASMAS FRESCOS</i> .....	64
<i>RESULTADOS Y CARACTERISTICAS DESCRIPTIVAS DE CRIOPRECIPITADOS</i> .....	66
DISCUSION .....	70
CONCLUSIONES .....	74
ANEXOS .....	75
CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	75
BIBLIOGRAFÍA .....	78

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES. ....	17
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA TÍPICA DE UNA MICROVESÍCULA .....	21
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS DIFERENTES VESÍCULAS EXTRACELULARES. ....	22
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CITOESQUELETO EN REPOSO.....	24
FIGURA 5. ACTIVACIÓN CELULAR, APOPTOSIS O NECROSIS.....	25
FIGURA 6. ALTERACIÓN DEL CITOESQUELETO DESPUÉS DE UN ESTÍMULO. ....	26
FIGURA 7. LIBERACIÓN DE UNA MICROVESÍCULA.....	26
FIGURA 8. DIVERSOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE MICROVESÍCULAS.....	30
FIGURA 9. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS MICROVESÍCULAS.....	33
FIGURA 10. OBTENCIÓN DE MICROVESÍCULAS DE COMPONENTES SANGUÍNEOS. ....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	23
TABLA 2. VARIABLES DE ESTUDIO.....	50
TABLA 3. ESPECIFICACIONES DE CENTRIFUGACIÓN DE ACUERDO AL TIPO DE BOLSA.....	52
TABLA 4. PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DEL EQUIPO T-ACE II DE ACUERDO AL TIPO DE BOLSA. ....	52
TABLA 5. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y VIGENCIA DE LOS COMPONENTES SANGUÍNEOS.....	52
TABLA 6. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LOS DIFERENTES COMPONENTES SANGUÍNEOS .....	55
TABLA 7. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS Y RESULTADOS DE DONANTES DE CE. ....	59
TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS Y RESULTADOS DE DONANTES DE CP .....	61
TABLA 9. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS Y RESULTADOS DE DONANTES DE PF.....	64
TABLA 10. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS Y RESULTADOS DE DONANTES DE CRIO. ....	66
TABLA 11. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE PARA CE .....	68
TABLA 12. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE PARA CP .....	68

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS DE CE.....	60
GRÁFICA 2. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS DE CP - AF.....	62
GRÁFICA 3. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS DE PF .....	65
GRÁFICA 4. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS DE CRIO. ....	67

## RESUMEN

**Antecedentes:** Existe evidencia creciente sobre la importancia clínica de las microvesículas (Mvs) y su papel en la transfusión sanguínea. Los componentes sanguíneos de banco de sangre, tales como: concentrados eritrocitarios (CE), aféresis de concentrados plaquetarios (AF), plasma fresco congelado (PFC) y crioprecipitados (Crio), podrían contener una mayor cantidad Mvs en el transcurso de su almacenamiento. **Objetivo:** Cuantificar las Mvs en los componentes sanguíneos almacenados en el banco de sangre. **Métodos:** Se obtuvo sangre de donantes sanos de acuerdo con las normas éticas del comité de investigación y de la Declaración de Helsinki. Los componentes sanguíneos de banco de sangre (n = 80) fueron obtenidos y almacenados en estrictas condiciones controladas (Instituto Nacional de Cardiología, de acuerdo con los lineamientos nacionales NOM-253-SSA1-2012). Un curso temporal de liberación de Mvs inducidas por el almacenamiento fue realizado para cada componente (CE, AF, PFC y Crio). Las Mvs se aislaron por ultracentrifugación a 20000 x g durante 90 min a 4 ° C. Las Mvs aisladas se lisaron por choque térmico y su contenido proteico se determinó mediante espectrofotometría (a A280 nm). Se cuantificó la concentración de proteína de Mv, de acuerdo a lo realizado por Freyssinet y Toti (J Haemostas Thromb 2010). Los datos se presentan como mediana (mínimo-máximo) (Prueba de Wilcoxon, software SPSS v21.0). **Resultados:** Existió diferencia estadística en la concentración de proteína de Mvs en los tiempos de almacenamiento de CE, AF y Crio. La concentración de proteína de Mvs derivadas de componentes sanguíneos aumenta de manera significativa en función del tiempo de almacenamiento.

**Conclusiones:** Los procedimientos utilizados para el aislamiento y la cuantificación de proteína de Mvs garantiza la correcta evaluación de la concentración total de las mismas en los diferentes componentes sanguíneos de banco de sangre analizados. Proteína de Mvs derivadas de CE y AF aumentan de una manera dependiente del tiempo de almacenamiento. En Crio la concentración de proteína de Mvs aumenta solamente en el día 60, muy probablemente debido a la presencia de plaquetas precipitadas. Estos resultados muestran que las Mvs pueden ser un marcador adecuado para vigilar la caducidad de un componente de banco de sangre y plantean la posibilidad de un mecanismo que explique algunas consecuencias clínicas a largo tiempo, cuando se transfunden estos componentes sanguíneos.

**Palabras clave:** Componentes sanguíneos, microvesículas, espectrofotometría, almacenamiento.

## ABSTRACT

**Background:** There is growing evidence on the clinical importance of MVs and their role in blood transfusion. Stored Blood bank components: red blood cells (RBC), apheresis platelet concentrates (A-Plts), fresh frozen plasma (FFP) and cryoprecipitate (Cryo), may contain an increased number of microvesicles (MV).

**Aim:** To quantify MVs in stored blood bank components. **Methods:** Blood was obtained from healthy donors in accordance with the ethical standards of the local research committee and with the Helsinki declaration. Blood bank components (n=80) were obtained and stored under strict controlled conditions (National Institute of Cardiology, Regulation NOM-253-SSA1-2012). A time course of storage-induced MVs release was tested for each component (RBC, A-PLTs, FFP and Cryo). MVs were first isolated by sequential centrifugation at 20000g for 90min at 4°C. The isolated MVs were then lysed by thermal shock and their protein content measured at A280nm. MVs-protein concentration was further quantified, according to Freyssinet and Toti (J Haemostas Thromb 2010). Data are presented as median (minimum-maximum) (Wilcoxon test, SPSS v21.0 software). **Results:** There were statistical differences among MVs-protein of RBC, A-Plts and Cryo determined along the time. MVs-protein concentrations derived from cell membranes of blood components increased significantly with storage time. **Conclusions:** Procedures used for the isolation and quantitation of MVs-protein ensure the correct evaluation of the total MVs-protein concentration in the different blood bank components tested. MVs-protein concentration increases in RBC and A-Plts-derived in a time dependent manner during storage.

In Cryos, of Mvs increases only at day 60, probably due to the presence of precipitated platelets. These results raise the question about the clinical consequences when these blood components are transfused.

**Keywords:** Blood components, microvesicles, spectrophotometry, storage.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico	miARN: microARN
ARN: Ácido ribonucleico	MMPs: Metaloproteinasas
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	Mps: Micropartículas
ATP: Adenosin trifosfato	Mvs: Microvesículas
CE: Concentrado eritrocitario	NO: Óxido nítrico
CP: Concentrado plaquetario	PCA: Proteína C activada
CPD: Citrato-Fosfato-Dextrosa	PFC: Plasmas fresco congelado
CRIO: Crioprecipitado	PLP: Plasma libre de plaquetas
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	RPM: Revoluciones por minuto
EM: Esfingomiélinea	uPA: Activador de plasminógeno tipo urocinasa
FC: Fosfatidilcolina	uPAR: Receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa
FE: Fosfatidiletanolamina	VE: Vesículas extracelulares
FS: Fosfatidilserina	VHB: Virus de la hepatitis "B"
FT: Factor tisular	VHC: Virus de la hepatitis "C"
MDP: Micropartículas derivadas de plaquetas	

VIH: Virus de inmunodeficiencia  
humana

## GLOSARIO CONCEPTUAL

**Autoexclusión:** acto en el que el donante debe responder si considera apta su sangre o componente sanguíneo para uso transfusional.

**Leucorreducción:** procedimiento por el cual se disminuyen hasta un logaritmo los leucocitos de algún componente celular de la sangre; puede lograrse con los métodos actuales de fraccionamiento.

**Leucodepleción:** procedimiento por el cual se disminuyen de tres o más logaritmos los leucocitos de algún componente celular de la sangre; se logra con el empleo de filtros de tercera generación.

# INTRODUCCIÓN

## TIPOS DE VESÍCULAS

Las células eucariotas y procariontas llevan a cabo procesos en los que se diferencian, multiplican, cumplen su función, llegan a la apoptosis y finalmente se eliminan. Durante estos procesos las células son sometidas a una variedad de estímulos que conducen a la liberación de vesículas a su microambiente como resultado del equilibrio entre la proliferación y muerte celular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.(1) Estas vesículas secretadas al ambiente extracelular, también llamadas vesículas extracelulares (VE) se clasifican en: exosomas, cuerpos apoptóticos y micropartículas (Mps) o microvesículas (Figura 1). (2)

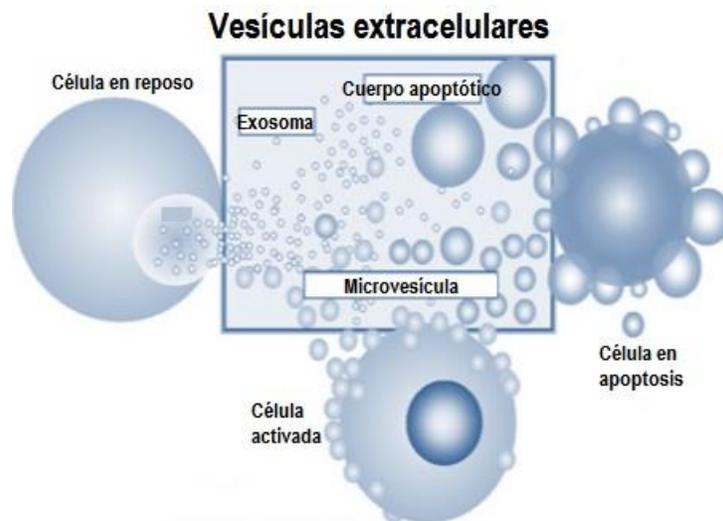


Figura 1. Representación esquemática de las vesículas extracelulares.

Modificada de Gyorgy B, et al. Cell Mol Life Sci. 2011;68(16):2667-88(3)

## EXOSOMAS

Los exosomas fueron descritos por primera vez en 1981 por Trams y cols. (4) como vesículas exocitadas con actividad enzimática. Tienen un diámetro de entre 50-100 nm con forma homogénea, están envueltas por una bicapa fosfolipídica, sedimentan por ultra-centrifugación a 100,000 x g. Son liberados de forma inducida o fisiológicamente al espacio extracelular por exocitosis de un conjunto endosomal, también llamado cuerpo multivesicular que contiene a los exosomas. Poseen membrana y otros componentes citosólicos que incluyen lípidos, ácido ribonucleico (ARN) y proteínas específicas que reflejan su origen celular, tales como; tetraspaninas. Su composición difiere dependiendo de su sitio de biogénesis. Para su estudio han sido caracterizados en células del sistema inmune y tumorales. Dentro de sus funciones principales están: presentación de antígenos, actividades inmuno-estimuladoras y de inhibición. (5)

## CUERPOS APOPTÓTICOS

En 1972, Kerr (6) acuñó el término “Cuerpo apoptótico”, que es un fragmento nuclear recubierto de membrana de tamaño similar a una plaqueta (de entre 1000-5000 nm de diámetro). Están conformados de: citoplasma, organelos y fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN), además externalizan fosfatidilserina (FS) para promover la fagocitosis y eliminación(7). Las funciones más importantes son: transferencia horizontal de información genética, presentación de antígenos e inmunosupresión.

En el estudio de los cuerpos apoptóticos se utilizan cultivos de células que experimentan apoptosis, y así, investigar sobre las funciones de estas estructuras.(1) (3)

## **MICROPARTÍCULAS / MICROVESÍCULAS**

En 1946, Chargaff y West descubrieron que el plasma libre de plaquetas (PLP) al ser centrifugado a alta velocidad y después de someterse a una prueba coagulométrica, el tiempo de coagulación se prolongaba significativamente, sin embargo, cuando el botón del plasma centrifugado era añadido de nuevo al sobrenadante el tiempo de coagulación se reducía de manera importante, mostrando una acción similar a la tromboplastina.(8).

Posteriormente en 1967, Wolf notó la presencia de un material particulado diminuto en el PLP obtenido por centrifugación a alta velocidad al que llamó “polvo plaquetario”. Wolf demostró que existía una correlación lineal entre los niveles de este polvo y la cuenta plaquetaria original de las muestras sanguíneas. Posteriormente con ayuda de la microscopia electrónica observó la génesis de microvesículas como numerosos bucles surgiendo de plaquetas activadas.(9) .

El interés acerca del “polvo plaquetario” ha incrementado significativamente debido al desarrollo de nuevas tecnologías y métodos más avanzados. En la actualidad las partículas descritas por Wolf se denominan microvesículas o micropartículas, las cuales aparentemente no solo son liberadas por las plaquetas, sino por otro tipo de células.(10)

Las Mvs son pequeños fragmentos de la membrana plasmática de células (sanguíneas, endoteliales entre otras) . Su tamaño puede variar de entre 100-1000 nm de diámetro.

La composición y estructura varía dependiendo de la célula que le dio origen (Figura 2).(11) Una característica importante es que externalizan la FS, la cual se ha propuesto como un marcador para la identificación de estas estructuras. Por otro lado, el proceso de liberación de estas vesículas está regulado por diferentes estímulos como: la activación celular y la apoptosis. Las plaquetas, leucocitos, eritrocitos y células endoteliales se han utilizado para realizar investigaciones sobre su origen, formación y función (10). Las Mvs poseen varios tipos de receptores y sustancias bioactivas en su superficie; citoquinas, proteínas de señalización y ácidos nucleicos, incluyendo el ARN mensajero (ARNm) y microARN (miARN), que juegan un papel importante en la comunicación intercelular y el intercambio de sustratos (12). Se ha sugerido la participación de estas Mvs en algunas funciones importantes como: homeostasis, comunicación intercelular, actividades procoagulantes y anticoagulantes, inmunológicas, angiogénesis, inflamación e inclusive en una gran variedad de condiciones patológicas(13).

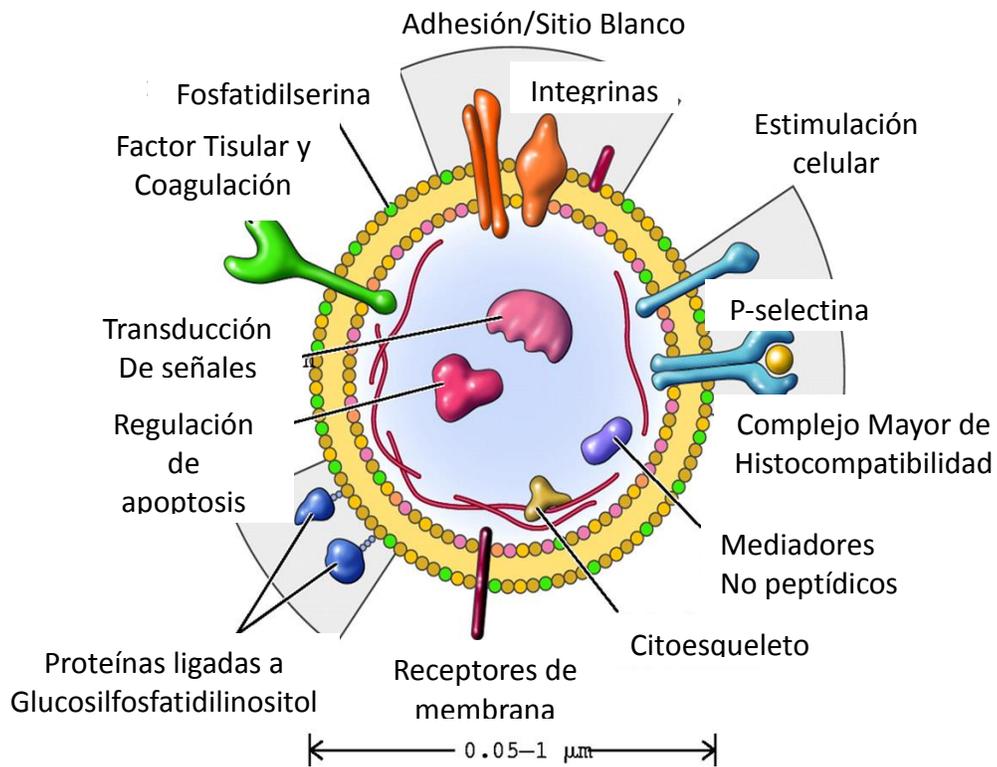


Figura 2. Representación de la estructura típica de una Microvesícula

Modificada de Hugel B, et al. Physiology (Bethesda, Md).2005;20:22-7. (14)

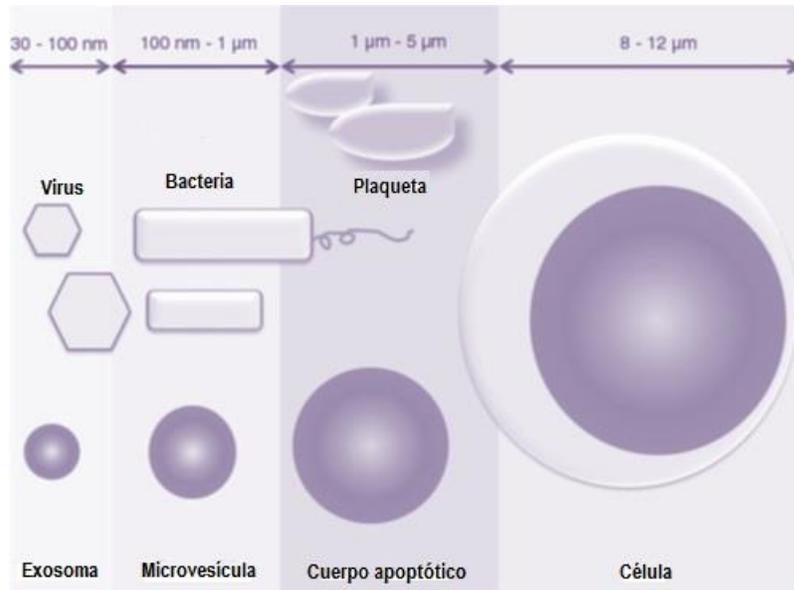


Figura 3. Representación gráfica de las diferentes vesículas extracelulares.

Modificada de Gyorgy B, et al. Cell Mol Life Sci. 2011;68(16):2667-88. (3)

Entre las principales diferencias (Figura 3) de estas VE están: la biogénesis y su composición, lo que delimita la función que desempeñará y el tipo de mensaje que podrá transmitir (mediante la interacción ligando/receptor, fusión o internalización) la vesícula resultante; sin embargo, existen otras características que podrían contribuir a su diferenciación (Tabla 1).(13, 15) Debido a que estas vesículas tienen funciones especializadas, juegan un papel muy importante en diferentes procesos celulares, como los mencionados anteriormente. El interés por estudiar estas estructuras ha ido en aumento debido a la aplicación clínica que pueden tener estas vesículas (terapia, pronóstico y diagnóstico) (1).

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de vesículas extracelulares

Modificada de Mause SF, et al. Circ Res 2010; 107:1048.(5, 16)

Característica	Exosoma	Microvesícula/ Micropartícula	Cuerpo apoptótico
<b>Tamaño</b>	50-110 nm	100-1000 nm	> 1000 nm
<b>Sedimentación</b>	100,000 g	20,000 g	16,000 g
<b>Origen</b>	Vesículas internas	Membrana plasmática	Fragmentos celulares
<b>Liberación</b>	Constitutiva/activación celular	Activación celular y apoptosis	Apoptosis
<b>Marcadores</b>	CD63	Integrinas, selectinas, otros antígenos.	Histonas

## FORMACIÓN DE UNA MICROVESÍCULA

La activación celular y apoptosis son procesos celulares que están relacionados con la formación de las Mvs, y para que esto se lleve a cabo es necesario que exista un agonista que desencadene el proceso (17). Las Mvs son liberadas constitutivamente como fragmentos de la membrana citoplasmática envueltas en una bicapa fosfolipídica. Ya que las Mvs fueron descritas por primera vez en las plaquetas, éstas son las más estudiadas hasta el momento pero el mecanismo implicado en la formación de Mvs de la mayoría de las células es el mismo (18).

En condiciones fisiológicas los fosfolípidos; fosfatidilcolina (FC) y esfingomielinina (EM) están orientados hacia la parte externa de la membrana, mientras que la fosfatidilserina (FS) y fosfatidiletanolamina (FE) se encuentran orientados hacia el lado interno de la membrana celular. Tres enzimas están involucradas en el control de la asimetría: flipasa, flopasa (translocasas) y escramblasa (transportador) (13).

La flipasa (la translocasa de aminofosfolípidos) rápidamente orienta los fosfolípidos (FS y FE), a la parte interna, mientras que la flopasa promueve más lentamente la translocación de los lípidos hacia la parte externa. La escramblasa es un transportador bidireccional que promueve la distribución al azar de los fosfolípidos a través de la bicapa (16).

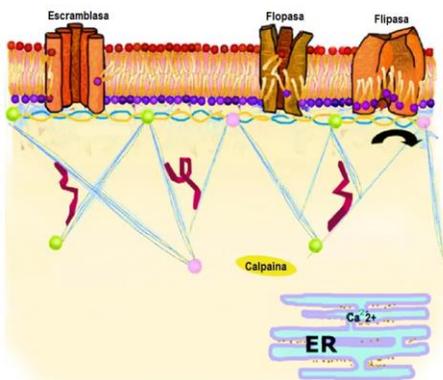


Figura 4. Representación esquemática del citoesqueleto en reposo.

La reorganización de la membrana ocurre bajo condiciones fisiológicas en respuesta a estímulos, como por ejemplo la activación plaquetaria, apoptosis y necrosis. Lo que implica un aumento en la concentración de calcio en el citosol y la subsecuente inhibición de la flipasa dependiente de calcio, lo cual promueve que la flopasa y escramblasa se activen. A este proceso se le conoce como pérdida de la asimetría. (5)

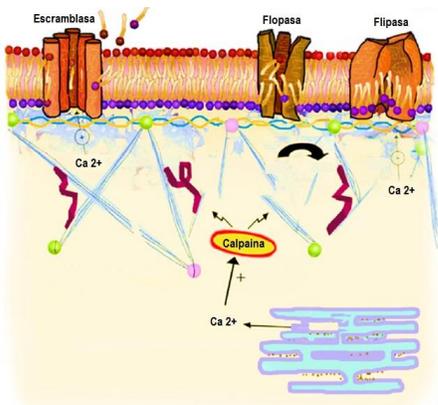


Figura 5. Activación celular, apoptosis o necrosis.

La liberación de las Mvs a partir de células activadas se asocia con la actividad de calpains. Las calpains son proteinasas de cisteína intracelulares que se encuentra en casi todas las células eucariotas y algunas procariontas, y juegan un papel importante en: el ciclo celular, la expresión génica, la escisión del citoesqueleto, la transducción de señales, la proliferación celular y la formación de Mvs. La calpaína reside en el citoplasma en su forma inactiva, por lo tanto, al haber un incremento de calcio en dicho lugar ésta se activa. Una vez activada la calpaína, rompe proteínas del citoesqueleto que se adhieren a la membrana plasmática lo que permite la liberación de las Mvs (17).

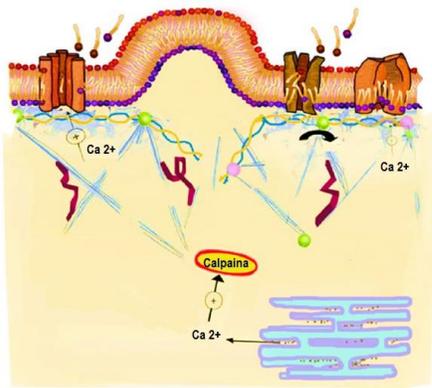


Figura 6. Alteración del citoesqueleto después de un estímulo.

Durante este proceso, la FS se redistribuye y orienta hacia la parte externa de la membrana plasmática. Tras la pérdida de la asimetría fosfolípida, el anclaje entre la membrana y el citoesqueleto se interrumpe, esto permite la vesiculación de la membrana y la posterior liberación de Mvs (18).

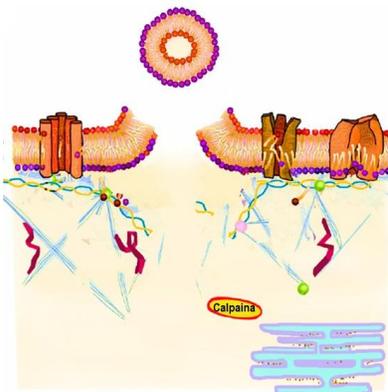


Figura 7. Liberación de una Microvesícula

Figuras 4-7: Modificada de Piccin A, et al. Blood reviews. 2007;21(3):157-71.(18)

## CUANTIFICACIÓN DE MICROVESÍCULAS

Existen diferentes métodos para abordar el estudio de las Mvs, cada uno tiene ventajas y desventajas frente a los demás(19). Diferentes sociedades científicas han llegado a consensos que facilitan su estudio, crean guías para permitir eliminar diferencias importantes en los resultados y permitir la comparación entre los diferentes estudios. En particular, la Sociedad Europea de Cardiología presenta un consenso que agrupa los principales aspectos que deben evaluarse en este contexto y resalta que en el estudio de las Mvs, la fase preanalítica representa una fuente importante de variabilidad e interferencia en el análisis(20). De los parámetros preanalíticos que impactan en el resultado de las Mvs están: la flebotomía (calibre de la aguja, tiempo y presión del torniquete), los tubos y el anticoagulante empleado, el transporte, el tiempo que transcurre desde la toma de la muestra hasta que se procesa la muestra, condiciones de centrifugación, temperatura de almacenamiento y tipo de congelamiento/descongelamiento de las muestras (21).

Una vez controlados los aspectos preanalíticos, la siguiente fase involucra la cuantificación de las Mvs y para esto, como se ha mencionado, existen diferentes técnicas que se utilizan para este fin, (véase Figura 8). A continuación, se comentarán algunos de ellos.

Citometría de flujo (CF), representa un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células. Esta técnica se basa en hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas por un haz luminoso.

La información que se obtiene, depende de las características de los reactivos empleados y puede agruparse en dos tipos, la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos al ser excitados por el rayo luminoso.

Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (22).

Por otra parte, la dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés "Dynamic light Scattering") considera la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo para determinar el tamaño de las partículas. La DDL, espectroscopía de correlación de fotones PCS (Photon correlation spectroscopy) o dispersión QELS (Quasi elastic light scattering) es una técnica fisicoquímica utilizada en la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución; tales como proteínas o polímeros. La luz láser al alcanzar numerosas partículas que hay en suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene un valor que corresponde a la intensidad de dispersión determinada. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas.

Por norma general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen (23).

El análisis de rastreo de nanopartículas (AMN) utiliza las propiedades tanto de dispersión de luz como de movimiento browniano para obtener la distribución del tamaño de las partículas en muestras en una suspensión líquida.

Un rayo láser se pasa a través de la cámara de la muestra, y las partículas en suspensión en el camino del haz dispersan la luz de tal manera que pueden verse fácilmente a través de un microscopio de 20 aumentos a una distancia de trabajo lejana, en el que está montada una cámara de video. La cámara captura un archivo de video de las partículas en estado de movimiento browniano. El programa de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) realiza un seguimiento de muchas partículas individualmente y utiliza la ecuación Stokes-Einstein para calcular sus diámetros hidrodinámicos. Sus aplicaciones incluyen los siguientes campos: la investigación y el desarrollo de vacunas virales, la nanotoxicología, los estudios de agregación de proteínas y la caracterización de exosomas o microvesículas (15).

Finalmente, la espectrofotometría (EF) es la técnica utilizada para determinar la concentración de una sustancia, es decir, cuantifica la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra en función de las longitudes de onda específicas.

El método más empleado que se utiliza para cuantificar Mvs en muestras biológicas es la citometría de flujo, ésta permite la detección, cuantificación y evaluación del origen celular de las Mvs.

Sin embargo, presenta una limitante importante ya que no detecta las Mvs menores a 300 nm y por lo tanto se subestima el número de las mismas.

La microscopía electrónica de transmisión representa el estándar de oro para la determinación del tamaño y estructura de la Mv, pero no las cuantifica (15).

En el caso de este estudio, seguimos el protocolo descrito por el Dr Anglés-Cano(24) que más adelante se describe detalladamente (20, 25).

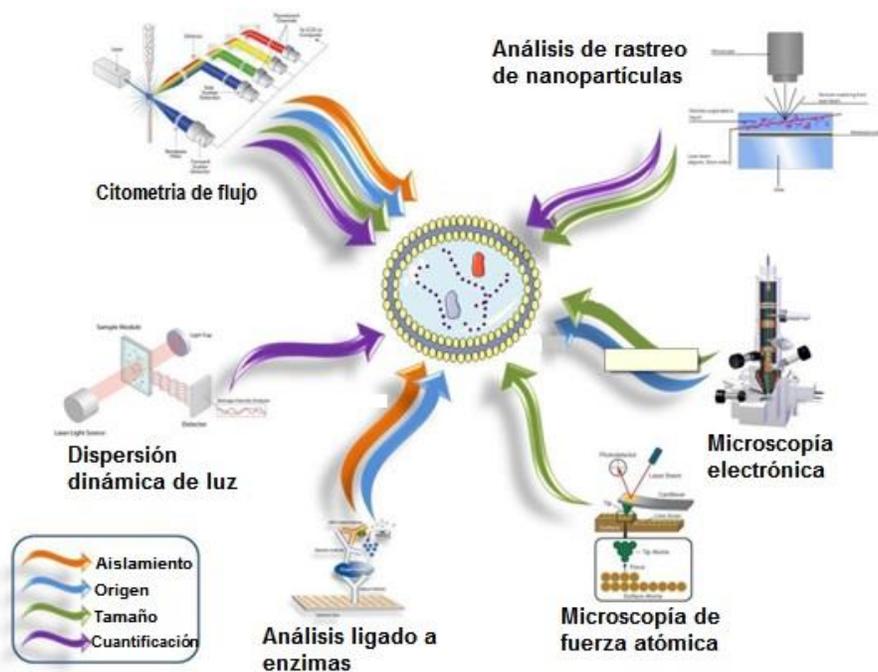


Figura 8. Diversos métodos de cuantificación de microvesículas.

Tomada de: Tissot JD, et al. Adv Integr Med. 2013;1(1):38-52(15).

## FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS MICROVESÍCULAS

La formación de las Mvs se lleva a cabo en condiciones fisiológicas como resultado de estímulos diversos. Hasta hace algunos años, se pensaba que una vez que las células cumplían su función biológica éstas desaparecían sin dejar huella. Sin embargo, estudios recientes indican que las Mvs pueden funcionar como vectores y estar involucradas en el intercambio intercelular de señales e información biológica; así mismo, pueden activar receptores celulares a través de moléculas bioactivas en su superficie, con lo cual, controlan la respuesta celular y sus propiedades (11).

Existe evidencia suficiente de que las Mvs pueden alterar la expresión genética en las células diana a través de la transferencia de ADN/miARN y modular las funciones de las células receptoras mediante la transferencia directa de las sustancias biológicamente activas. De hecho, pueden transferir parte de sus componentes a células específicas y mediar la activación, la modificación fenotípica y la reprogramación de la función celular.

En el caso de la función vascular e inflamación, modulan la producción de óxido nítrico (NO) y prostaciclina, estimulan la liberación de citocinas e inducen la expresión del factor tisular (FT) en las células endoteliales, así como de la regulación de la quimiotaxis (13).

En la actualidad se sabe que las Mvs tienen una amplia gama de actividades biológicas (Figura 9), participan en la hemostasia, la fibrinólisis, la comunicación intercelular (transferencia de la información), la inmunidad, la apoptosis, la angiogénesis, entre otras acciones (12).

El origen de las Mvs determina la función que ésta desempeñará. Algunas Mvs tienen funciones procoagulantes debido a la variedad de proteínas que poseen, tales como: FT, receptores de membrana y glicoproteínas que activan la coagulación, así como, la exposición de fosfolípidos negativos en la superficie (como FS) que proporciona las cargas negativas, necesarias para atraer a los factores de coagulación. De hecho, se demostró que las Mvs que provienen de plaquetas tiene acción procoagulante de 50 a 100 veces mayor en comparación con las plaquetas activadas.(26)

Por otra parte, la actividad anticoagulante *in vitro* de las Mvs se lleva a cabo mediante la inactivación proteolítica del factor Va por la proteína C activada (PCA), mecanismo por el cuál exhibe propiedades anticoagulantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas ya que inactiva a los cofactores de la coagulación Va y VIIIa.

Las Mvs poseen sistemas proteolíticos como, por ejemplo; los sistemas de activación del plasminógeno (fibrinolítico) y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (proteolítico). El sistema activador del plasminógeno está implicado en la remodelación tisular, ya que puede degradar proteolíticamente la matriz extracelular y regular la activación tanto de factores de crecimiento como de MMPs. Estudios más recientes han demostrado que las Mvs pueden proporcionar una superficie catalítica para la conversión de plasminógeno en plasmina mediante la expresión del activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA, por sus siglas en inglés) y su receptor (uPAR), y por lo tanto, proporcionar una función profibrinolítica. Además, la serinoproteasa uPA y su receptor juegan un papel importante en la angiogénesis mediante la activación de zimógenos de MMPs.

Resumiendo, las Mvs se han asociado a: vías de señalización de célula a célula, crecimiento y proliferación celular, regulación de la expresión génica y metabolismo de lípidos. También, pueden transportar de manera horizontal ácidos nucleicos y participan y contribuyen a una respuesta inflamatoria específica (27). Así mismo, se cuenta con evidencia de que las Mvs derivadas de células madre contienen ARNm que contribuye a la reprogramación de células diana. Los miARN son una clase de ARN no codificantes que regulan la expresión de genes después de la transcripción (28).

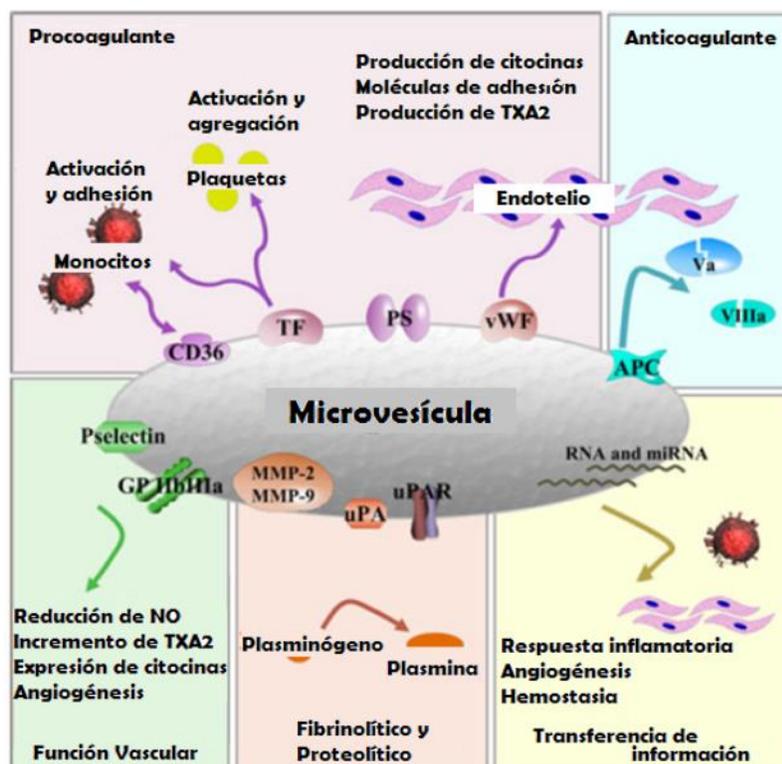


Figura 9. Efectos biológicos de las microvesículas.

Modificada de Montoro-García S, et al. Basic Res Cardiol 2011; 106: 918 (13)

## MICROVESÍCULAS EN DIVERSAS PATOLOGÍAS

Las Mvs están presentes en personas sanas y en enfermos con diferentes condiciones patológicas, sin embargo, pueden diferir en cantidad, fenotipo y composición. Se ha descrito su presencia en enfermedades autoinmunes, hematológicas, cardiovasculares, infecciosas, de trasplante, ginecológicas, renales e inclusive diferentes tipos de cáncer, entre otros eventos (11, 29).

En pacientes con enfermedades vasculares la proporción de Mvs provenientes de células endoteliales se encuentra aumentada. Por lo tanto, este tipo de Mvs puede ser considerado como un marcador diagnóstico de disfunción endotelial y estar asociado a este tipo de enfermedades (30).

Por otra parte, las Mvs juegan un papel muy importante en el cáncer. Se consideran como biomarcadores en varios tipos de cáncer, se elevan en pacientes con cáncer gástrico, y las Mvs derivadas de plaquetas (MDP) contribuyen en las metástasis, promueven la proliferación y adhesión de células cancerígenas. Por lo tanto, las MDP se señalan como un biomarcador para predecir la metástasis en pacientes con cáncer (31).

En la diabetes mellitus una amplia variedad de células, tales como: monocitos, células endoteliales, plaquetas e islotes de Langerhans liberan Mvs debido a una gran variedad de estímulos, entre ellos: citocinas, lipoproteínas, interleucinas, factor de necrosis tumoral, especies reactivas de oxígeno y la hiperglucemia (12). Por lo antes mencionado, la concentración de Mvs provenientes de monocitos y plaquetas en pacientes con diabetes se encuentra elevada.

En cuanto a la actividad procoagulante de las Mvs es mayor en enfermos con diabetes mellitus tipo I en comparación con el tipo II (32). Lo que muestra la utilidad que tienen las Mvs en los enfermos con diabetes como un marcador protrombótico (33).

El estudio de las Mvs en los mecanismos fisiopatológicos de diferentes enfermedades tiene gran interés, por ejemplo, en la inflamación, debido a que son una fuente de fosfolípidos, de tal manera que promueven la agregación plaquetaria y como consecuencia incrementan el proceso inflamatorio.

Este mecanismo se ve reforzado por las citocinas que amplifican la generación de Mvs provenientes de plaquetas con propiedades proinflamatorias, que a su vez vuelven a estimular la producción de citocinas. Los neutrófilos también participan liberando una gran cantidad de Mvs en el sitio de la inflamación, por lo que se consideran agonistas de la inflamación (34).

Las Mvs propagan las infecciones(35), por ejemplo, en el caso de VIH, incrementa el desarrollo de SIDA y la evasión del virus de la respuesta inmune.

También, en la sepsis meningocócica se incrementa la cantidad de Mvs liberadas de las plaquetas y los granulocitos (36).

Por otra parte, se ha propuesto el empleo de Mvs como una estrategia terapéutica, aspecto que todavía se encuentra en desarrollo.

Con esto, podemos decir que el estudio de las Mvs tiene una amplia área de oportunidad en la prevención y tratamiento de diferentes patologías.

## **ESTUDIO DEL LINAJE CELULAR DE LAS MICROVESÍCULAS**

Como ya se ha comentado, es muy conveniente conocer el linaje de las Mvs para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos en los que participan y su contribución en algunas enfermedades que con anterioridad se mencionaron. El conocimiento acerca de la formación de las Mvs está limitado a un pequeño grupo de células.(37) Sin embargo está demostrado que las Mvs se generan a partir de diferentes tejidos y tipos de células, por ejemplo, células del sistema inmune, adipocitos, hepatocitos, plaquetas, glóbulos rojos, células endoteliales, entre otras (12, 16, 38).

## **COMPONENTES SANGUÍNEOS DEL BANCO DE SANGRE**

En el banco de sangre, la obtención de componentes sanguíneos es el principal objetivo del procesamiento de la sangre, proceso que inicia desde de la extracción de la unidad de sangre total fresca hasta la separación de ésta en sus componentes. Un componente sanguíneo se define como la fracción separada de la sangre total, como, por ejemplo; los glóbulos rojos (concentrados eritrocitarios), plaquetas (concentrados plaquetarios) y plasma fresco (PF), del cual se puede obtener crioprecipitados, que se obtienen mediante los métodos de centrifugación o aféresis. Cada uno de estos productos debe almacenarse de acuerdo a sus condiciones particulares.

Sin embargo, durante su almacenamiento los componentes sanguíneos sufren modificaciones bioquímicas o degradaciones, las cuales se conocen coloquialmente como lesiones de almacenamiento. Estos cambios deben tomarse en cuenta para poder transfundir los productos (39, 40).

## **CONCENTRADOS ERITROCITARIOS (CE)**

Es el componente celular de la sangre que se obtiene después de separar el plasma por centrifugación. Su función principal es el transporte de oxígeno a los tejidos y se utilizan para suplir pérdidas sanguíneas y para tratamiento paliativo de algunas anemias. La temperatura de conservación es de entre +2 °C y +6 °C hasta su uso terapéutico y su vigencia es de 42 días utilizando como solución aditiva citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA) con manitol (39-41).

## **CONCENTRADOS PLAQUETARIOS (CP)**

Existen tres procedimientos para obtener concentrados plaquetarios: del plasma rico en plaquetas, de la capa leucoplaquetaria y por aféresis. Su función principal es que actúan en la hemostasia primaria. Son fragmentos celulares circulantes que en caso de hemorragia se agregan, adhieren y retraen el coágulo.

Los CP se deben mantener preferentemente dentro de equipos de almacenaje con las siguientes características: incubador cerrado con control de temperatura entre +20 °C y +24 °C, equipados con un agitador horizontal, que oscile a no más de 70 revoluciones por minuto (rpm), manteniendo a las plaquetas en agitación constante y mezclando el contenido de la bolsa. No se debe exceder la capacidad de unidades a almacenar, para permitir un intercambio gaseoso a través de la pared de la bolsa y evitar que éstas se plieguen. Su vigencia es de 5 días utilizando como solución aditiva CPDA con manitol (39-41).

## **PLASMA FRESCO (PF)**

Es el componente líquido de la sangre total que se obtiene después de separar las células por centrifugación. Contiene factores de coagulación, albúmina e inmunoglobulinas. Su función principal es el aporte de factores de coagulación y de la fibrinólisis, necesarios para la corrección de coagulopatías. La temperatura de conservación es de -25 °C o inferior y su vigencia es de 365 días o de 6 horas una vez descongelado utilizando como solución aditiva CPDA con manitol (39-41).

## **CRIOPRECIPITADOS (CRIO)**

Es la fracción proteica del plasma fresco congelado a temperatura de -70 °C. Su función principal es el aporte de factores de coagulación específicos, tales como: factor VIII, XIII, von Willebrand y fibrinógeno necesario para la corrección de las coagulopatías.

La temperatura de conservación es de -25 °C o inferior y su vigencia es de 365 días o de 6 horas una vez descongelado, utilizando como solución aditiva CPDA con manitol (39-41).

El estudio acerca de la formación de Mvs en los componentes sanguíneos que son utilizados para la transfusión es un tema actual y relevante, ya que se ha reportado un incremento en la incidencia de efectos adversos (infecciones, falla renal, respiratoria o multiorgánica y muerte) asociados a la transfusión de un gran número de unidades, sobre todo cuando éstas han permanecido en un almacenaje prolongado (42).

Se cuenta con evidencia que señala la contribución de las Mvs en estas reacciones adversas (43).

Aunque también se ha señalado la posibilidad de que, en algunas circunstancias, modifiquen favorablemente el desenlace clínico de los enfermos, dependiendo de la cantidad de Mvs, función biológica que posean y patología que presenta el paciente (11).

## ANTECEDENTES

En 1986, George y cols. (44) demostraron por primera vez la presencia de Mvs en crioprecipitados y plasma fresco congelado. En el PF tienen principalmente, origen plaquetario. Las plaquetas contenidas en esos productos formaron Mvs mientras eran sometidos a congelación y descongelación.

En los CRIO, encontraron que las Mvs derivaban de plaquetas y se encontraban altamente concentradas, con este hallazgo, sugirieron el papel hemostático de las Mvs (45). Por otro lado, en 1987, Solberg y cols. demostraron la presencia de Mvs en CP (44), así como, Bode y cols. observaron que las Mvs son liberadas de las plaquetas durante el almacenamiento como consecuencia de la activación plaquetaria por la interacción con la pared de la bolsa (46).

Las Mvs están presentes en los fluidos de individuos sanos y su concentración puede variar bajo ciertas condiciones patológicas, sin embargo, hasta el momento no se sabe si el incremento de las Mvs contribuye o es el resultado de la enfermedad (12, 15).

En la práctica clínica, las Mvs circulantes provenientes de la sangre y las células vasculares se elevan en una variedad de desórdenes protrombóticos e inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, infecciosas y cáncer.

En estos contextos, la cuantificación de Mvs puede ser útil para: la identificación de pacientes en riesgo de trastornos vasculares, monitorizar la respuesta al tratamiento o utilizarse como un biomarcador para el diagnóstico. Por tanto, la cuantificación de las Mvs circulantes es de suma importancia (21, 36), en algunas patologías que se conoce su participación, como biomarcadores.

Así mismo, se requiere de investigaciones para averiguar si existe una relación entre los efectos adversos y la cantidad de Mvs en los componentes sanguíneos, así como, de la liberación de Mvs asociada con el procesamiento de los productos de la sangre (47).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Aproximadamente, cada año se realizan 15,000 transfusiones de componentes sanguíneos en el Instituto Nacional de Cardiología, las cuales benefician a los pacientes que las reciben, ya que resuelven a corto plazo la circunstancia hemorrágica, deficiencia de factores de coagulación o hipovolemia.

Sin embargo, durante el almacenamiento de los diferentes componentes sanguíneos, éstos sufren cambios en sus características fisicoquímicas y composición, tales como: modificación del pH, presencia de hemólisis, disminución de ATP, entre otros. Existen estudios para dar seguimiento a la concentración de proteína de Mvs en los productos de banco de sangre que se consideran como un marcador bioquímico que permite identificar cambios que podrían ser deletéreos para su uso, en el Instituto Nacional de Cardiología, no tenemos aún estudios en esa dirección.

## JUSTIFICACIÓN

Este trabajo de tesis se dirige a evaluar la asociación entre la concentración de proteína de Mvs en los concentrados eritrocitarios, plaquetarios, plasma fresco congelado y crioprecipitados y su tiempo de almacenamiento. Con los datos obtenidos se elaborará un modelo matemático que permita predecir la cantidad de Mvs dependiendo del tiempo de almacenamiento. Este modelo permitirá conocer si el tiempo de almacenaje de los diferentes productos de banco de sangre se encuentra entre las dos desviaciones estándar del promedio o excede este valor al concluir el tiempo máximo de almacenaje actualmente permitido.

## HIPÓTESIS

Durante el tiempo de almacenamiento de los componentes sanguíneos (CE, PF, CP y CRIO) de banco de sangre, se incrementa la concentración de proteína de Mvs. Considerando que en aquellos que son componentes celulares (CE y CP) es más factible que puedan tener Mvs, así como, en los componentes no celulares (PFC y CRIO) es probable que contengan Mvs residuales de la circulación y neo-Mvs producidas por plaquetas o eritrocitos residuales. Por otro lado, las condiciones de almacenamiento podrían favorecer el estrés celular y la producción de Mvs, por ello sería necesario investigar cual es el contenido de Mvs en los diferentes componentes.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración de proteína de Mvs de componentes sanguíneos de banco de sangre durante su periodo de almacenamiento.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Extraer unidades de sangre total y concentrados plaquetarios (aféresis) de donadores.
2. Fraccionar unidades de sangre total en componentes sanguíneos:
  - a. Concentrado eritrocitario
  - b. Plasma fresco
  - c. Crioprecipitados
3. Extraer microvesículas de muestras de componentes sanguíneos durante 3 ocasiones (curso temporal al tiempo cero (día 1), al tiempo de vida media y al tiempo de caducidad del producto sanguíneo)
  - a. Concentrado eritrocitario: 1°, 21° y 42° día
  - b. Concentrado plaquetario: 1°, 3° y 5° día
  - c. Plasma fresco: 1<sup>er</sup>, 30° y 60° día
  - d. Crioprecipitados: 1<sup>er</sup>, 30° y 60° día
4. Determinar la concentración de proteína presente en las microvesículas.
5. Realizar la curva de curso temporal de la producción de Mvs



## CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Se calculó con el programa GPower v3.1

- Error alfa: 0.05
- Error beta: 0.20
- Tamaño del efecto: 0.10
- Grupos: 4, Núm. de mediciones: 3
- Se obtiene tamaño de muestra de: **232**

El dato obtenido de  $232 / 4 = 58$  (4 es el número de total de grupos, componentes sanguíneos, que se incluyen en el estudio)

$58 / 3 = 19.3$  (3, es el número de mediciones que se les realizará a cada uno de los diferentes componentes sanguíneos)

Se redondeó a 20 muestras por cada uno de los diferentes componentes sanguíneos.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN:

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Se consideraron a todos los componentes sanguíneos provenientes de donantes con las siguientes características:
  - Recolectados en el periodo de agosto 2014 y enero 2015
  - Con pruebas serológicas del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis “B” (VHB), Virus de la Hepatitis “C” (VHC), sífilis y chagas: **negativas**
  - Provenientes de ambos sexos
  - En edades comprendidas entre 18 a 65 años.
  - Con talla y peso, cuyo índice de masa corporal sea  $\leq 30 \text{ Kg/m}^2$

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Cuando la bolsa que contiene a cada uno de los diferentes componentes sanguíneos presente una fuga o si la temperatura a las cuales se mantienen estuviera fuera del rango especificado.
- Componentes sanguíneos provenientes de donantes con pruebas serológicas **positivas** a VIH, VHB, VHC, sífilis y chagas.
- Cuando se carezca datos de los donantes sobre el sexo, edad, talla y peso.

### **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:**

- Cuando accidentalmente se derrame la muestra o se pierda.
- Cuando el donante no otorgue el consentimiento informado.
- Cuando la unidad de sangre total estuviera coagulada.

## METODOLOGÍA:

### VARIABLES DE ESTUDIO

Tabla 2. Variables de estudio.

Variable	Descripción	Escala	Tipo
Dependiente: Microvesículas	Pequeñas vesículas provenientes de la membrana plasmática celular	Mvs contienen 15% de proteínas (mg/mL)  1 mg/mL=1000 µg/mL	Cuantitativa continua
Independiente: Tiempo de almacenamiento	Días transcurridos desde su obtención hasta su fecha de caducidad dependiendo del componente sanguíneo	1-21-42 días (Concentrado eritrocitario) 1-3-5 días (Concentrado plaquetario) 1-30-60 días (Plasma fresco) 1-30-60 días (Crioprecipitados)	Cuantitativa discreta

## **EXTRACCIÓN DE CONCENTRADO PLAQUETARIO POR MÉTODO DE AFÉRESIS**

1. Se seleccionó la vena a puncionar.
2. Se etiquetaron las bolsas de aféresis a utilizar con nombre y número de unidad del donante.
3. Se realizó el procedimiento de asepsia (alcohol 70%, clorhexidina 20%, yodopovidona 11g).
4. Se puncionó la vena seleccionada y se obtuvieron los concentrados plaquetarios con equipos automatizados. Dicha obtención está basada en el siguiente algoritmo: extracción de la sangre, anticoagulación, centrifugación, separación, recolección y retorno de componentes no utilizados.
5. Se recolectó un volumen aproximado de concentrado plaquetario de 300 mL.
6. La preparación de alícuotas, sobrenadante y cuantificación de las Mvs se realizó de la misma manera como se describe más adelante.

## **EXTRACCIÓN DE UNIDAD DE SANGRE TOTAL**

1. Se seleccionó la vena a puncionar.
2. Se etiquetaron las bolsas a utilizar con nombre y número de unidad del donante.
3. Se colocó el torniquete y realizó el procedimiento de asepsia (alcohol 70%, clorhexidina 20%, yodopovidona 11g).
4. Se puncionó la vena seleccionada.
5. Se recolectó un volumen de sangre de  $450 \pm 45$  mL.

## PROCESAMIENTO DE LA SANGRE TOTAL

1. Se centrifugaron las unidades de sangre total (ST) de acuerdo a las siguientes especificaciones (Tabla 3):

Tabla 3. Especificaciones de centrifugación de acuerdo al tipo de bolsa.

TIPO DE BOLSA	PRODUCTOS OBTENIDOS	RPM	<i>g</i> ( <i>r</i> =18cm)	TIEMPO	TEMP °C
Bolsa cuádruple	C.E y P.F.	4000	3226	10 MIN	+2 a +6
Imuflex	C.E y P.F.	3500	3000	15 MIN	+2 a +6
Bolsa quintuple	C.E. y P.F.	4000	3226	10 MIN	+2 a +6

2. Una vez centrifugadas las unidades de sangre total, se procesaron en el equipo Fraccionador TACE II, de acuerdo a la bolsa utilizada, como se indica en la Tabla 4:

Tabla 4. Protocolo de procesamiento del equipo T-ACE II de acuerdo al tipo de bolsa.

No. Programa	Bolsa a Utilizar	Componentes sanguíneos
5	Triple ( Imuflex)	CE y PF
6	Quadruple CPD-Optisol TAB	CE, PF, BC
8	Quintuple CPD-Optisol TAB	C.E y PF, BC

3. Posteriormente se resguardaron los diferentes componentes sanguíneos como se describe en la Tabla 5:

Tabla 5. Condiciones de almacenamiento y vigencia de los componentes sanguíneos

Componente sanguíneo	Temperatura de conservación	Vigencia
Concentrado eritrocitario	+2 °C a +6 °C	42 días
Concentrado plaquetario	+20 °C a +24 °C	5 días
Plasma fresco congelado	-25 °C o inferior	365 días
Crioprecipitado		

### ALÍCUOTAS DE COMPONENTES SANGUÍNEOS

1. Del componente sanguíneo que cumplió con los criterios de inclusión, se tomaron 3 alícuotas de 5 mL cada una en bolsa de transferencia nueva y estéril de 150 mL.



2. Se vertió el contenido de la bolsa de transferencia en un tubo de polipropileno de 5 mL para su posterior centrifugación.

### PREPARACIÓN DE SOBRENADANTE PARA SEPARACIÓN DE Mvs:

#### TRATAMIENTO PRE-ANALÍTICO A PARTIR DE CE, CP, PF Y CRIO

1. Se centrifugó a 1500 x g, 15 min, a temperatura ambiente.

2. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de polipropileno o poliestireno de 10 mL. Se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos de fondo cónico de 1.5 mL.



3. Posteriormente se centrifugó a 13,000 x g, 2 min, a temperatura ambiente.



4. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 10 mL de polipropileno.
5. Se fraccionaron alícuotas de 500  $\mu$  en tubos de fondo cónico de 1.5 mL.
6. Se etiquetó cada tubo con los siguientes datos:
  - a. Número de unidad de componente sanguíneo (7 dígitos)
  - b. Código de identificación para el Laboratorio de Investigación
  - c. Fecha
7. Se resguardaron a -80 °C hasta su extracción.



### EXTRACCIÓN DE MVS

1. Se descongelaron las muestras a temperatura de refrigeración, una muestra de testigo y máximo 9 del componente sanguíneo que se eligió para trabajar (CE, PF, CRIO o CP).
2. Se rotularon los respectivos tubos de policarbonato para ultracentrífuga.
3. Se sometieron a ultracentrifugación con, las siguientes condiciones:
  - a. Velocidad 30,000 rpm (20,000 x g, r=2.5 cm)
  - b. Tiempo: 90 min
  - c. Temperatura: 4°C
4. Posteriormente, se realizaron 2 lavados (bajo las mismas condiciones) con amortiguador Hepes (HEPES 10 mM y NaCl 0.14 M; pH = 7.4) y las Mvs se resuspendieron en el mismo amortiguador. El protocolo de extracción se siguió de acuerdo a lo referido a la Tabla 6:

Tabla 6. Protocolo de extracción de los diferentes componentes sanguíneos

Componente sanguíneo	1ª extracción (48)	2ª extracción (días)	3ª extracción (días)
CE	1	21	42
CP	1	3	5
PF*	1	30	60
CRIO*	1	30	60

\* Por cuestiones de tiempo, se decidió procesar los PF y CRIO hasta dos meses, ya que, no hubiese sido posible procesarlos debido a su periodo tan extenso de vigencia (365 días).

5. Se rotularon tubos de fondo cónico de 0.6 ml para cada muestra con los siguientes datos:

- a. Número de identificación
- b. Número de unidad
- c. Día de la extracción (fecha)
- d. Mv o Sobrenadante



6. Las alícuotas se resguardaron en el ultracongelador hasta su utilización en sus respectivas cajas, rotuladas de la siguiente manera:

- a. Banco de sangre
- b. CE, PF, CP O CRIO
- c. Tiempo de almacenamiento:
- d. Numero de caja.

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE Mvs

1. Se colocaron en nitrógeno líquido durante un minuto las alícuotas de Mvs.
2. Se sacaron y colocaron en baño maría a 37°C por un minuto.
3. Se repitieron los pasos anteriores 4 veces más (choque térmico).
4. Posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína en el espectrofotómetro para microplacas Eon™ ( marca Bio Tek) a una longitud de onda de 280 nm.
5. Se guardaron los resultados en la base de datos correspondiente.



## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas Microsoft® Excel® 2016 y SPSS v21.0.

Los datos se presentan con medidas de tendencia central y de dispersión, en función de su tipo de dato y distribución (mediana (mínimo – máximo) o media  $\pm$  desviación estándar).

Se realizó un análisis con pruebas no paramétricas o paramétricas, en función de la distribución de los datos, así mismo, se realizaron pruebas de estadística descriptiva (porcentajes).

Debido a que el número de muestras fue menor de 50 en cada grupo, se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para determinar la distribución de los datos.

Se realizaron pruebas de significancia estadística correspondientes a la distribución de los datos:

- a. Friedman y prueba post hoc de Wilcoxon.
- b. Regresión lineal múltiple.
- c. Regresión lineal simple.

# RESULTADOS

## DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se conformó de 4 grupos (CE, PF, CP y CRIO). En cada grupo se incluyeron 20 muestras de su respectivo componente sanguíneo, de cada muestra se obtuvieron 3 alícuotas de 5 mL cada una y fueron procesadas como se mostró en la Tabla No. 6. En las siguientes tablas (7, 8, 9 y 10) se muestran los resultados de las mediciones y características descriptivas de cada grupo.

## RESULTADOS Y CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE CONCENTRADOS

### ERITROCITARIOS

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar, mediana (mínimo – máximo) o porcentaje (%) dependiendo del tipo de dato y su distribución.

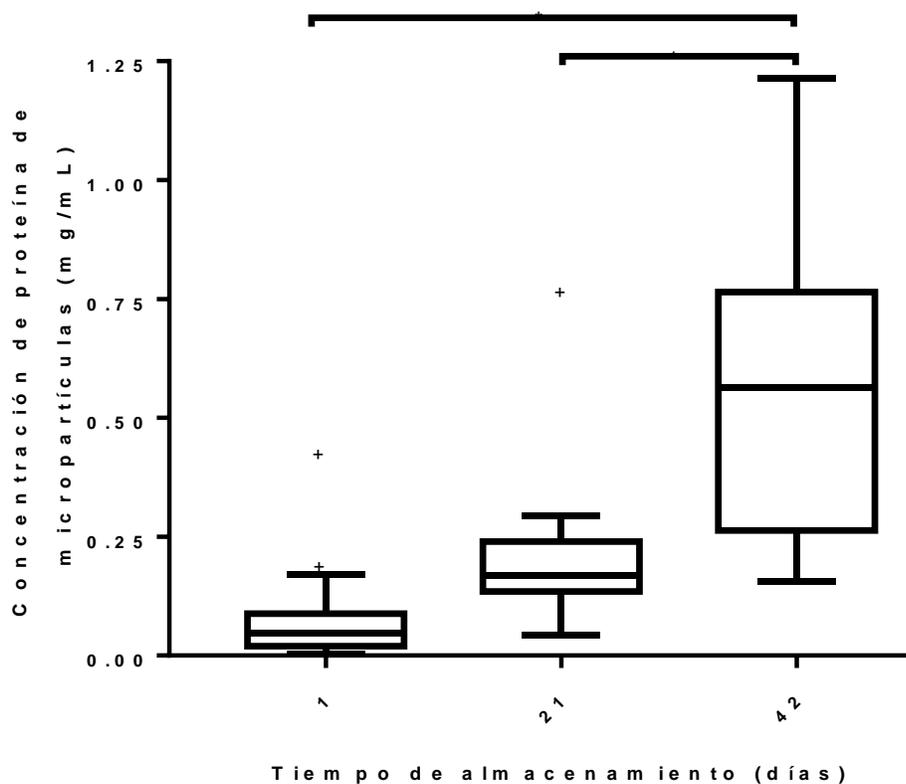
Tabla 7. Características descriptivas y resultados de donantes de CE.

Característica/variable	N	Estadística descriptiva	Shapiro Wilk (p)		
Edad (años)	20	32.85 $\pm$ 11.47	0.080		
Peso (kg)	20	70.6 $\pm$ 8.30	0.851		
Talla (m)	20	1.63 $\pm$ 0.08	0.506		
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20	26.4 $\pm$ 2.92	0.051		
Sexo (%)	9	F: 45	NA*		
	11	M: 55	NA*		
Grupo sanguíneo (%)	20	O+: 100	NA*		
Días de almacenamiento	N	Proteína de Mvs (mg/mL)*	P (Shapiro Wilk)	P (Friedman)	P (Wilcoxon)
1	20	0.0577 (0.0026 – 0.4740)	0.000	< 0.05	< 0.05 (1 VS 21)
21	20	0.1791 (0.0439 – 0.7612)	0.000		< 0.05 (21 VS 42)
42	20	0.5634 (0.1552 – 1.2130)	0.005		< 0.05 (1 VS 42)

\*NA: No aplica

Los datos se analizaron con el programa SPSS v21 mediante la prueba de Friedman con post-hoc Wilcoxon \*P ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Gráfica 1. Representación de la distribución de los datos de CE



Los símbolos (+) que aparecen en la gráfica representan muestras consideradas como outlier y los (\*) diferencia estadísticamente significativa.

Se observa significancia estadística entre los grupos con la prueba de Friedman, posterior a la prueba post hoc de Wilcoxon se observa diferencia estadística entre los grupos CE-día 1 y CE- día 42, así como, CE-21 y CE-42, siendo no significativo entre los grupos CE-1 y CE-21.

## RESULTADOS Y CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE CONCENTRADOS PLAQUETARIOS

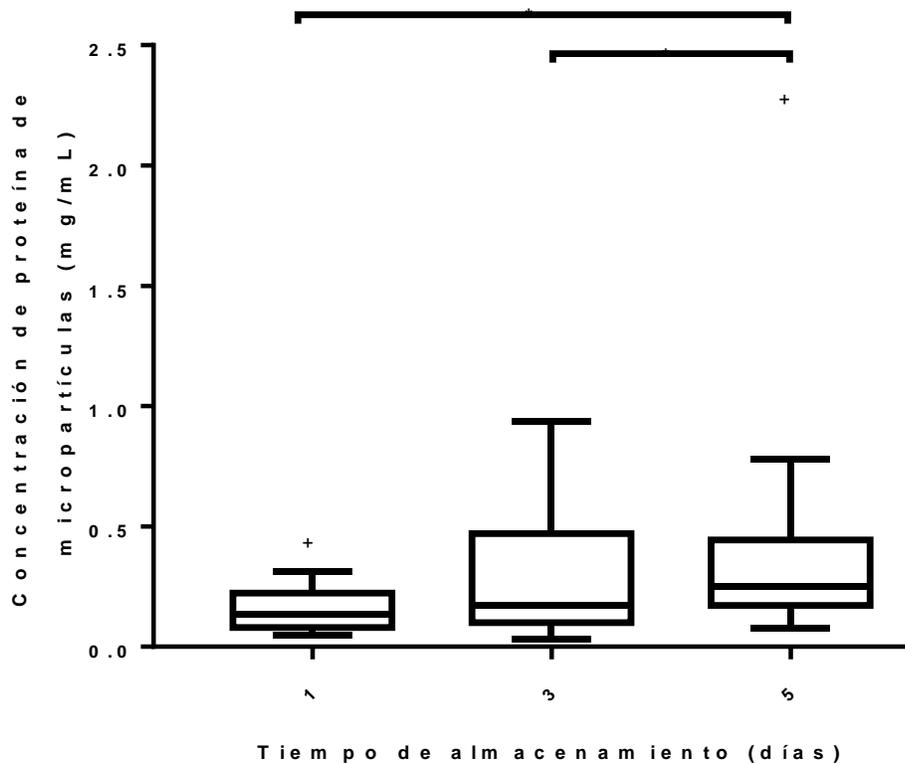
Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar, mediana (mínimo - máximo) o porcentaje (%) dependiendo del tipo de datos y su distribución.

Tabla 8. Características descriptivas y resultados de donantes de CP

Característica/variable	N	Estadística descriptiva	Shapiro Wilk (p)
<b>Edad (años)</b>	20	32.5 $\pm$ 9.0	.387
<b>Peso (kg)</b>	20	73.86 $\pm$ 11.3	.388
<b>Talla (m)</b>	20	1.64 $\pm$ 0.088	.440
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	20	27.7 (17.6 – 29.8)	0.000
<b>Sexo (%)</b>	5	F: 25	NA
	15	M: 75	NA
<b>Grupo sanguíneo (%)</b>	10	O+: 50	NA
	5	A1+: 25	NA
	1	A2+: 5	NA
	1	O-: 5	NA
	1	A1B+: 5	NA
	1	B+: 5	NA
	1	A1-: 5	NA

Días de almacenamiento	N	Proteína de Mvs (mg/mL)*	P (Shapiro Wilk)	P (Friedman)	P (Wilcoxon)
1	20	0.1394 (0.0495 – 0.8166)	0.000	< 0.05	NS (1 VS 3)
3	20	0.1696 (0.0323 – 0.9383)	0.001		< 0.05 (3 VS 5)
5	20	0.2648 (0.0778 – 2.3066)	0.000		< 0.05 (1 VS 5)

Gráfica 2. Representación de la distribución de los datos de CP - AF.



Los símbolos (+) que aparecen en la gráfica representan muestras consideradas como outlier y los (\*) diferencia estadísticamente significativa.

Se observa significancia estadística entre los grupos con la prueba de Friedman, posterior a la prueba post hoc de Wilcoxon se observa diferencia estadística entre los grupos CP-1 y CP-5, así como, CP-3 y CP-5, siendo no significativo entre los grupos CP-1 y CP-3.

## RESULTADOS Y CARACTERISTICAS DESCRIPTIVAS DE PLASMAS

### FRESCOS

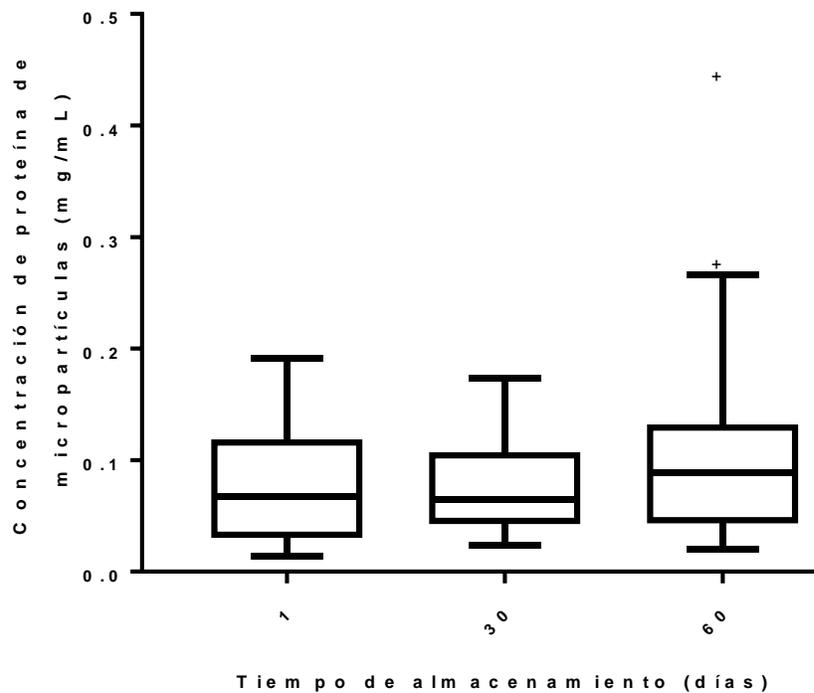
Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar, mediana (mínimo – máximo) o porcentaje (%) dependiendo del tipo de datos y su distribución.

Tabla 9. Características descriptivas y resultados de donantes de PF.

Característica/variable	N	Estadística descriptiva	Shapiro Wilk (p)
Edad (años)	20	34.2 $\pm$ 10.9	00.240
Peso (kg)	20	76.3 $\pm$ 10.6	0.694
Talla (m)	20	1.67 $\pm$ 0.08	0.685
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20	27.6 (22.3 – 29.9)	0.029
Sexo (%)	6	F: 30	NA
	14	M: 70	NA
Grupo sanguíneo (%)	17	O+: 85	NA
	2	A1+: 10	NA
	1	B+: 5	NA

Días de almacenamiento	N	Proteína de Mvs (mg/mL)	P (Shapiro Wilk)	P (Friedman)	P (Wilcoxon)
1	20	0.0669 (0.0142 – 0.1917)	0.003	> 0.05	NA
30	20	0.0650 (0.0242 – 0.1731)	0.007		NA
60	20	0.0929 (0.0197 – 0.4556)	0.001		NA

Gráfica 3. Representación de la distribución de los datos de PF



Los símbolos (+) que aparecen en la gráfica representan muestras consideradas como outlier.

No se observa significancia estadística entre los grupos.

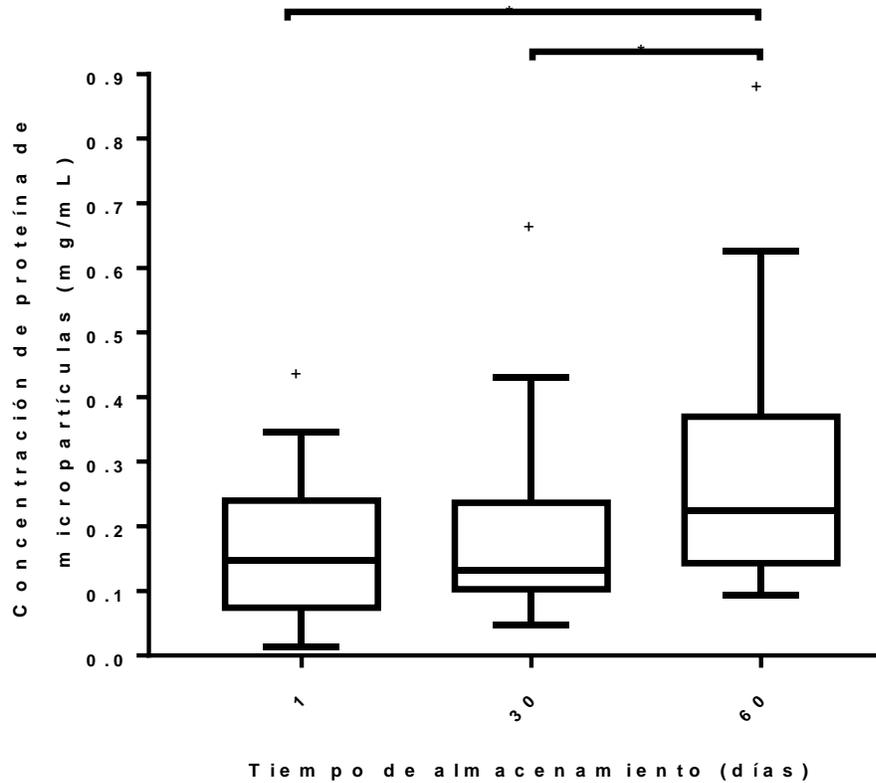
## RESULTADOS Y CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE CRIOPRECIPITADOS

Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar, mediana (mínimo – máximo) o porcentaje (%) dependiendo del tipo de datos y su distribución.

Tabla 10. Características descriptivas y resultados de donantes de CRIO.

Característica/variable		N	Estadística descriptiva		Shapiro Wilk (p)
Edad (años)		20	33 (18 – 51)		.016
Peso (kg)		20	69.1 $\pm$ 9.7		.710
Talla (m)		20	1.63 $\pm$ 0.1		.598
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		20	26 $\pm$ 2.1		0.556
Sexo (%)		11	F: 55		NA
		9	M: 45		NA
Grupo sanguíneo (%)		15	O+: 75		NA
		1	A1B+: 5		NA
		4	B+: 20		NA
Días de almacenamiento	N	Proteína de Mvs (mg/mL)*	P (Shapiro Wilk)	P (Friedman)	P (Wilcoxon)
1	20	0.1584 (0.1323 – 0.4696)	0.009	<0.05	NS (1 VS 30)
30	20	0.1366 (0.0464 – 0.6722)	0.001		< 0.05 (30 VS 60)
60	20	0.2376 (0.0930 – 0.9016)	0.003		< 0.05 (1 VS 60)

Gráfica 4. Representación de la distribución de los datos de CRIO.



Los símbolos (+) que aparecen en la gráfica representan muestras consideradas como outlier y los (\*) diferencia estadísticamente significativa.

Se observa significancia estadística entre los grupos con la prueba de Friedman, posterior a la prueba post hoc de Wilcoxon se observa diferencia estadística entre los grupos CRIO-1 y CRIO-60, así como, CRIO-30 y CRIO-60, siendo no significativo entre los grupos CRIO-1 y CRIO-30.

Se realizó un análisis de regresión múltiple para identificar si existía alguna otra variable independiente que impactara sobre la variable de desenlace, sin embargo, la única variable que tuvo impacto fue la variable tiempo de almacenamiento.

Tabla 11. Análisis de regresión lineal múltiple para CE

Modelo para CE	Coeficientes no estandarizados	Coeficientes estandarizados	Sig.
	B	Beta	
1 (Constante)	-7.381		.659
EDAD (AÑOS)	.004	.123	.541
PESO (Kg)	-.069	-1.750	.555
TALLA (m)	5.899	1.432	.560
IMC	.115	1.028	.718

Tabla 12. Análisis de regresión lineal múltiple para CP

Modelo para CP	Coeficientes no estandarizados	Coeficientes estandarizados	Sig.
	B	Beta	
1 (Constante)	-14.573		.633
EDAD (AÑOS)	-.001	.018	.942
PESO (Kg)	-.103	.198	.611
TALLA (m)	9.279	17.783	.609
IMC	.270	.576	.645

En la propuesta de modelos de regresión lineal múltiple de CE y CP, se puede observar que los valores de p de las variables independientes son >0.05, por lo tanto, el modelo no funciona para realizar una ecuación.

De los resultados obtenidos se realizó un modelo de regresión lineal simple para predecir la cantidad de Mvs durante su tiempo de almacenamiento para los concentrados eritrocitarios y plaquetarios, ya que solo estos componentes tienen significancia estadística importante:

Modelo para los concentrados eritrocitarios:

$$Y = 0.163 + 0.007x$$

Modelo para los concentrados plaquetarios:

$$Y = 0.053 + 0.109x$$

En donde “Y”, es la concentración de proteínas provenientes de Mvs y “X” son los días de almacenamiento.

## DISCUSION

En general los componentes sanguíneos tienen perfiles de calidad bien definidos, los cuales se sabe que tienen modificaciones a lo largo de su periodo de almacenamiento(39, 41). Sin embargo, la cuantificación de las Mvs no se había considerado dentro de dichos perfiles (49). Por sus características pueden ser un marcador útil al considerar los cambios que sufre un componente sanguíneo durante su almacenamiento (50) y serán considerados dentro del perfil de control de calidad. El aspecto pre-analítico del manejo de las muestras es de suma importancia. La centrifugación es un paso crítico, así como la remoción de glóbulos rojos, plaquetas y detritus celulares antes de su procesamiento. El tiempo y velocidad de centrifugación tiene que ser la adecuada y la muestra para el análisis de Mvs debe congelarse como sobrenadante libre de células.

Las condiciones de la recolección de las muestras, tales como, el diámetro de la aguja utilizada para la punción, la duración del torniquete, el tiempo transcurrido antes, durante y después del procesamiento, el transporte, la duración del almacenamiento, la temperatura, el tipo de anticoagulante, el número y tiempo de centrifugación, el número de lavados, los ciclos de choque térmico, los fragmentos celulares, los componentes frescos contra mayor tiempo de almacenamiento, pueden artificialmente afectar la parte analítica de las Mvs y deben ser estandarizadas (21). En nuestro caso estos factores fueron controlados, ya que, el banco de sangre del instituto nacional de cardiología se encuentra certificado por la ISO 9001:2015, lo cual nos garantiza que todos sus procesos están perfectamente estandarizados.

En el caso del anticoagulante, el citrato de sodio es el más empleado y no se han observado diferencias significativas entre el citrato de sodio y CPD que es el empleado en este estudio (51, 52).

Entre las diferentes técnicas que existen para identificar (15, 51) la presencia de Mvs empleamos la que contempla diferentes centrifugaciones ya que permite obtener las Mvs de menor tamaño con cuantificación más precisa (24) además de ser una técnica fácil de estandarizar, rápida, confiable y económica. La medición de la concentración de proteínas provenientes de Mvs mediante el método espectrofotométrico, tiene una buena correlación con otros métodos como es la citometría de flujo (25), además, tiene también la ventaja de obtener mayor número de Mvs de tamaño pequeño, que no pueden ser medidas por otros métodos.

Las Mvs son parte inherente de los componentes sanguíneos que se utilizan en la transfusión sanguínea. Están presentes e incrementan su producción principalmente en los componentes celulares (CE y CP) durante su almacenamiento, y por otra parte en PF y CRIO durante su descongelamiento.(53) Rubin y cols. (54) reportaron un incremento de las Mvs provenientes de los concentrados eritrocitarios durante su almacenamiento, de  $3.3 \times 10^9/L$  en el día 6 a  $20 \times 10^9/L$  al día 35, lo cual muestra una tendencia parecida a los resultados que obtuvimos en este estudio, de 0.05 mg/mL en el día 1 a 0.57 mg/mL al día 42.

Las diferencias que se observan en las concentraciones y valores podrían deberse al método de determinación.

En relación a los resultados de los Concentrados plaquetarios Xie y cols. (55) reportaron un aumento de la concentración de Mvs en el transcurso de su almacenamiento, del día 1: 73, 746  $\mu\text{L}$ , día 3: 124,558  $\mu\text{L}$  y día 5: 135 851  $\mu\text{L}$ , así mismo, los resultados que obtuvimos, fueron de: 0.14 mg/mL en el día 1, 0.17 mg/mL en el día 3 y 0.26 mg/mL en el día 5, concordando con la misma tendencia. Las diferencias observadas podrían deberse al método de determinación y al tipo de análisis estadístico empleado.

El PFC y el CRIO preparados en el banco de sangre con fines transfusionales contienen un número significativo de plaquetas. (56) Hasta el momento la única publicación que existe sobre la cuantificación de Mvs en PFC y CRIO es la de George y cols. (45) en donde cuantificaron la glucoproteína IIb (GPIIb) de las plaquetas (a esto le llamaron determinación de Mvs). Sin embargo, solo realizaron una determinación (día 1), en este trabajo realice un curso temporal en el que incluyo 3 cuantificaciones (día 1, 30 y 60) para ambos componentes. Donde en el PFC no hay diferencia estadística significativa y en CRIO incrementa aproximadamente dos veces la concentración de proteína de Mvs del día 1 vs día 60 y día 30 vs día 60. Esta diferencia podría deberse a que en el CRIO se encuentran más concentrada la cantidad de plaquetas residuales en comparación del PFC. (45)

Una transfusión con concentrados eritrocitarios o plaquetarios con almacenamiento prolongado implica que el receptor recibirá una carga elevada de Mvs, debido a que el tiempo de almacenamiento influye en la concentración de Mvs.

En la actualidad se han observado incidencias de eventos adversos asociados con la transfusión de un gran número de componentes sanguíneos o con tiempo prolongado de almacenamiento.(11, 29)

Al incrementar la cantidad de Mvs en los componentes sanguíneos durante el almacenamiento aumenta en consecuencia la concentración de las mismas en los pacientes que reciben la transfusión, con las diferentes repercusiones fisiológicas y patológicas que esto puede inducir (11).

Existe evidencia (31) que sugiere que los CE, CP y PFC pueden afectar adversamente a los pacientes que reciben transfusiones de estos componentes. Lo que aún no queda claro es cuál es la concentración o el umbral de Mvs en el que el receptor se encuentra en riesgo de representar consecuencias patológicas.

Por otro lado, con los datos obtenidos del curso temporal de los componentes sanguíneos obtuvimos un modelo matemático. Dicho modelo propuesto en este estudio presenta la limitante de que se realizó con solo tres puntos de la recta. Sin embargo, la tendencia de los resultados concuerda con lo reportado por otros estudios.(45, 54, 55)

## CONCLUSIONES

- Los diferentes componentes sanguíneos; CE, CP, PFC y CRIO contienen Mvs.
- La concentración de proteína de Mvs en los CE, CP y CRIO incrementa en función del tiempo de almacenamiento; y en los PFC no se observan diferencias estadísticas significativas. En CE incrementa tres y diez veces al comparar el día 1 vs día 21 y 42, respectivamente; en CP incrementa, aproximadamente, dos veces día 1 vs día 3 y 5, respectivamente; y en CRIO incrementa, aproximadamente, dos veces del día 1 y 30 vs día 60.
- Con los datos obtenidos del curso temporal de los componentes sanguíneos obtuve un modelo matemático, el cual propongo que podría ayudar a estimar la concentración de proteína proveniente de Mvs.
- Así mismo, propongo que la cuantificación de proteína de Mvs o Mvs debería emplearse como un marcador de control de calidad de los componentes sanguíneos, para que la transfusión sanguínea sea más segura para el receptor, sin someterlo a un riesgo adicional de un posible efecto adverso.

# ANEXOS

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

**Título del proyecto:** Determinación de micropartículas de componentes sanguíneos de banco de sangre

**Investigador principal:** Dra. Aurora de la Peña Díaz

**Sede donde se realizará el estudio:** Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis de la Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no debe de conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto de este estudio. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento.

**Justificación del estudio.** La transfusión sanguínea provee beneficios a los pacientes que la reciben, dentro de los más importantes están: el transporte de oxígeno a los tejidos y la provisión de los factores de coagulación y otras proteínas, sin embargo, poco se sabe acerca de la cantidad de microvesículas (pequeñas esferas circulantes en la sangre) que contienen los componentes sanguíneos de los donadores de sangre y los efectos que provoca el almacenamiento de estos componentes.

**Objetivo del estudio.** Conocer la cantidad de microvesículas que se producen durante el almacenamiento de la sangre que dona.

**Beneficios del estudio.** Al participar en este estudio usted ayudará a conocer cuántas microvesículas están presentes en los componentes sanguíneos, así mismo, permitirá que otros pacientes puedan beneficiarse de la información obtenida.

**Procedimientos del estudio.** De la unidad de sangre o concentrado plaquetario que usted done se tomarán 15 mL en condiciones seguras y limpias. Este procedimiento no afectará en ningún momento la sangre o concentrado plaquetario que se le transfundirá a su familiar.

**Riesgos asociados con el estudio.** La extracción y cuantificación de las microvesículas no representa ningún riesgo para usted.

#### **Aclaraciones**

- ✓ Su decisión de participación es completamente voluntaria.
- ✓ No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- ✓ Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar las razones o no de su decisión la cual será respetada en su integridad.
- ✓ No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- ✓ No recibirá pago por su participación.
- ✓ La información obtenida de este estudio, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- ✓ Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de consentimiento informado anexa a éste documento.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

\_\_\_\_\_  
**Firma del donante**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Testigo**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Testigo**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

He explicado al Sr(a).\_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
**Firma del Investigador (o su representante)**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):676-705.
2. Fleury A, Martinez MC, Le Lay S. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front Immunol.* 2014;5:370.
3. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(16):2667-88.
4. Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr., Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981;645(1):63-70.
5. Nomura S. Extracellular vesicles and blood diseases. *Int J Hematol.* 2017.
6. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
7. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature.* 2002.
8. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166(1):189-97.
9. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269-88.
10. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *J Thromb Haemost.* 2009;101(3):439-51.
11. Kriebardis A, Antonelou M, Stamoulis K, Papassideri I. Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent-bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions. *Blood Transfus.* 2012;10(Suppl 2):s25-38.

12. Wu Z, Ji C, Li H, Qiu G, Gao C, Weng X. Membrane microparticles and diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(18):2420-7.
13. Montoro-García S, Shantsila E, Marín F, Blann A, Lip GY. Circulating microparticles: new insights into the biochemical basis of microparticle release and activity. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(6):911-23.
14. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:22-7.
15. Tissot J-D, Canellini G, Rubin O, Angelillo-Scherrer A, Delobel J, Prudent M, et al. Blood microvesicles: from proteomics to physiology. *Adv Integr Med*. 2013;1(1):38-52.
16. Mause SF, Weber C. Microparticles protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010;107(9):1047-57.
17. Roseblade A, Luk F, Rawling T, Ung A, Grau GE, Bebawy M. Cell-derived microparticles: new targets in the therapeutic management of disease. *J Pharm Pharm Sci*. 2013;16(2):238-53.
18. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21(3):157-71.
19. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*. 2010;8(12):2596-607.
20. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-Piallat ML, et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb Haemost*. 2017;117(7):1296-316.
21. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost*. 2012;10(3):437-46.

22. Barrera Ramirez L, Drago Serrano M, Perez Ramos J, Sainz Espuñes T, Zamora A, Gomez Arroyo F, et al. Citometria de flujo: vinculo entra la investigacion basica y la aplicacion clinica. *Revista del Inst Nac Enf Resp.* 2004;17:42-55.
23. Cuadros-Moreno A CPR, San Martín-Martínez E, Yáñez Fernández J. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat Am J Phys Educ.* 2014;8(4):4314-1-5.
24. Lacroix R, Plawinski L, Robert S, Doeuvre L, Sabatier F, De Lizarrondo SM, et al. Leukocyte-and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica.* 2012;97(12):1864-72.
25. Freyssinet JM, Toti F. Membrane microparticle determination: at least seeing what's being sized! *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):311-4.
26. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, et al. Platelet microparticle membranes have 50-to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *J Thromb Haemost.* 2007;97(3):425.
27. Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood.* 2012;119(26):6288-95.
28. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE.* 2008;3(11):e3694.
29. Rubin O, Crettaz D, Tissot J-D, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs. *Blood Transfus.* 2010;8(Suppl 3):s31-s8.
30. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2003;59(2):277-87.
31. Goubran HA, Elemetry M, Radosevich M, Seghatchian J, El-Ekiaby M, Burnouf T. Impact of transfusion on cancer growth and outcome. *Cancer Growth Metastasis.* 2016;9:1-8.

32. Morel O, Hugel B, Jesel L, Lanza F, Douchet MP, Zupan M, et al. Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 2004;91(2):345-53.
33. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes.* 2002;51(9):2840-5.
34. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, Chou ML, Seghatchian J, Burnouf T, et al. The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):159-67.
35. Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood S, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Combes V, et al. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *J Infect Dis.* 2011;203(5):700-6.
36. Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, Stern JN, Ponomarev ED, Duckett L, et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC cell biology.* 2013;14(1):1.
37. Herring JM, McMichael MA, Smith SA. Microparticles in health and disease. *J Vet Intern Med.* 2013;27(5):1020-33.
38. Conde-Vancells J, Gonzalez E, Lu SC, Mato JM, Falcon-Perez JM. Overview of extracellular microvesicles in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6(5):543-54.
39. MJ. Vite-Casanova BN-G. Fraccionamiento de la sangre. In: *Transfusional. AMdM*, editor. *Fraccionamiento de la sangre Guía técnica para la obtención y control de calidad de componentes sanguíneos.* México, D.F.2013. p. 91-141.
40. Luis-López A. Fundamentos de banco de sangre y medicina transfusional. In: *Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología AC*, editor. *Fundamentos de banco de sangre y medicina transfusional.* México, D.F.2008. p. 125-34.

41. Arriola M. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos". México, D.F. : Diario oficial de la federación; 2012.
42. Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *New Engl J Med.* 2008;358(12):1229-39.
43. Vandromme MJ, McGwin Jr G, Marques MB, Kerby JD, Rue III LW, Weinberg JA. Transfusion and pneumonia in the trauma intensive care unit: an examination of the temporal relationship. *J Trauma Acute Care Surg.* 2009;67(1):97-101.
44. Solberg C, Osterud B, Little C. Platelet storage lesion: formation of platelet fragments with platelet factor 3 activity. *Thromb Res.* 1987;48(5):559-65.
45. George JN, Pickett EB, Heinz R. Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate. *Blood.* 1986;68(1):307-9.
46. Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood.* 1991;77(4):887-95.
47. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev.* 2006;20(1):1-26.
48. Hughes D. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat Rev Genet.* 2003;4(6):432-41.
49. Bicalho B, Pereira AS, Acker JP. Buffy coat (top/bottom)- and whole-blood filtration (top/top)-produced red cell concentrates differ in size of extracellular vesicles. *Vox Sang.* 2015;109(3):214-20.
50. Hess JR. Measures of stored red blood cell quality. *Vox Sang.* 2014;107(1):1-9.
51. Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost.* 2011;105(3):396-408.

52. Gyorgy B, Paloczi K, Kovacs A, Barabas E, Beko G, Varnai K, et al. Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thromb Res.* 2014;133(2):285-92.
53. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang.* 2008;95(4):288-97.
54. Rubin O, Canellini G, Delobel J, Lion N, Tissot J-D. Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transf Med Hem.* 2012;39(5):342-7.
55. Xie RF, Hu P, Li W, Ren YN, Yang J, Yang YM, et al. The effect of platelet-derived microparticles in stored apheresis platelet concentrates on polymorphonuclear leucocyte respiratory burst. *Vox Sang.* 2014;106(3):234-41.
56. Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev.* 2014;28(4):155-66.