



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“Medición de la viabilidad de concentrados plaquetarios sometidos a inactivación de patógenos después de un tratamiento fotoquímico con clorhidrato de amotosaleno y luz UVA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RAFAEL ROBLES ZAVALA



Ciudad Universitaria, CDMX, 2020



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: RODOLFO PASTELIN PALACIOS

VOCAL: ABEL GUTIERREZ RAMOS

SECRETARIO: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

1er. SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

2do. SUPLENTE: GENARO JIMÉNEZ REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO HLA, UBICADO EN EL BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

ASESOR DEL TEMA:

E.B.C JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SUSTENTANTE:

RAFAEL ROBLES ZAVALA

ÍNDICE GENERAL

❖ Abreviaturas	
❖ Índice de Figuras	
❖ Índice de Cuadros	
❖ Índice de Gráficos	
❖ Resumen	Página
1. Introducción	1
1.1 Asuntos Regulatorios	1
1.2 Riesgos asociados a la transfusión	2
1.3 Enfermedades infecciosas	8
1.4 Plaquetas	11
1.5 Contaminación bacteriana de concentrados plaquetarios	17
1.6 Métodos disponibles para detectar la contaminación bacteriana	18
1.7 Métodos disponibles para limitar la contaminación bacteriana de las plaquetas	20
1.8 Sistema de inactivación de patógenos mediante clorhidrato de amotosaleno y luz UVA.	22
2. Justificación	27
3. Objetivos	28
4. Hipótesis	28
5. Materiales y Métodos	29
6. Análisis Estadístico	29
7. Resultados	35
8. Discusión	45
9. Conclusiones	48
10. Perspectivas del estudio	48
❖ Referencias Bibliográficas	49
❖ Anexos (Técnicas utilizadas)	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de plaquetas en los vasos sanguíneos. (pg. 11)

Figura 2. Principales agonistas y proteínas de adhesión plaquetaria. (pg.14)

Figura 3. Estructura del Amotosaleno, S-59 y sus producto de degradación. (pg. 23)

Figura 4. Eventos o células totales obtenidas por muestreo de los CP antes y después de la IP. (pg. 37)

Figura 5. Eventos separados en dos poblaciones diferentes: Leucocitos y Plaquetas. (pg.38)

Figura 6. Población de plaquetas activadas marcadas con anti-CD62P. (pg. 39)

Figura 7. Población de linfocitos T antes y posterior a la IP. (pg. 40)

Figura 8. Población de linfocitos B antes y posterior a la IP. (pg. 40)

Figura 9. Valores del número de eventos y % respecto al Total de eventos obtenidos de las dos muestras (pre y pos), de donde se hacen referencia los resultados de las figuras anteriores. (pg. 41)

Figura 10. Representación de 15 CP y sus respectivos valores de actividad plaquetaria con marcador de expresión CD62P pre vs. Pos inactivación de patógenos con clorhidrato de amotosaleno y luz UVA. (pg 42)

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Poporción de componentes sanguíneos contaminados. (pg.18)

Cuadro 2. Composición de la solución de Amotosaleno. (pg.24)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de la prevalencia de contaminación bacteriana de los productos sanguíneos. (pg. 4)

Tabla 2. Estrategias para reducir el riesgo asociado a la transfusión de bacterias. (pg. 6)

Tabla 3: Efectos adversos prevenibles y no prevenibles. (pg. 7)

Tabla 4. Contenido de los gránulos alfa. (pg. 13)

Tabla 5. Eventos de sepsis relacionada con las transfusiones de plaquetas. (pg. 17)

Tabla 6. Tecnologías disponibles para Inactivación de Patógenos (autorizadas o en fase clínica. (pg. 21)

Tabla 7. Inactivación de Patógenos y Leucocitos con Intercept™. (pg. 26)

Tabla 8. Valores de la expresión de CD62P tomados de un muestreo de CP sometidos a IP. (pg. 35)

Tabla 9. Valores del marcador linfocitario CD3 tomados de la lectura de los CP anteriores. (pg. 36)

Tabla 10. Valores del marcador linfocitario CD19 tomados de la lectura de los CP anteriores.(pg. 36)

Tabla 11. Promedio del por ciento de plaquetas con expresión de CD62P. (pg. 43)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **AM** Azul de Metileno
- **BH** Biometría Hemática
- **BS** Bancos de Sangre
- **CAD** (**Compound Adsorption Device**) Dispositivo de Adsorción de Compuestos
- **CMV** Citomegalovirus
- **CNTS** Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea
- **CD3** (**Cluster of differentiation-3**) Marcador antigénico de linfocitos T
- **CD19** (**Cluster of differentiation-19**) Marcador antigénico de linfocitos B
- **CD62 P ó P- selectina** Marcador antigénico de plaquetas
- **CP** Concentrado(s) plaquetario(s)
- **DNA** (**deoxyribonucleic acid**) Ácido Desoxirribonucleico
- **ELISA** (**Enzyme-linked Immunosorbent Assay**) Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
- **HIV** (**human immunodeficiency virus**) Virus de inmunodeficiencia humana
- **IBS** *INTERCEPT Blood System™*
- **IP** Inactivación de Patógenos
- **NAT** (**Nucleic acid testing**) Tecnología de amplificación de ácidos nucleicos
- **NOM** Norma Oficial Mexicana
- **OMS** Organización Mundial de la Salud
- **OPS** Organización Panamericana de la Salud
- **PFC** Plasma fresco congelado
- **PCR** (**Polymerase Chain Reaction**) Reacción en cadena de la polimerasa
- **PLT** (**Platelet**) Plaqueta
- **RNA** (**ribonucleic acid**) Ácido Ribonucleico
- **TFQ** Tratamiento fotoquímico
- **UVA** Luz ultravioleta A
- **UFC** Unidad formadora de colonias
- **VHC** Virus de hepatitis C
- **VHB** Virus de hepatitis B
- **WNV** (**West Nile Virus**) Virus del Oriente del Nilo
-

RESUMEN.

La implementación de un proceso de IP permite el rediseño de procesos de obtención de componentes sanguíneos seguros al reducir la necesidad de realizar pruebas adicionales para detección de patógenos, minimiza el riesgo residual de infección (como la ventana de infectividad residual para aquellos patógenos que se detectan de forma rutinaria), sustituye el uso de pruebas selectivas (por ejemplo, serología para citomegalovirus) y complementa la irradiación gamma dada su capacidad para inactivar leucocitos. Además, la implementación de una IP reduce la incidencia de infección en receptores de componentes sanguíneos y permite que los servicios de sangre protejan en forma proactiva el suministro de sangre contra futuras infecciones emergentes.

La tecnología de IP *Intercept Blood System*TM para plasma y plaquetas utiliza un psoraleno sintético conocido como amotosaleno (S-59). Los psoralenos son furocumarinas que se encuentran en los alimentos, principalmente vegetales como el apio y el perejil. La ingesta diaria de estos alimentos es superior a 1 mg, mientras que la concentración nominal de amotosaleno para inactivar a los agentes patógenos en las PLT es de 150 μ M. Los psoralenos tienen una afinidad especialmente alta por los ácidos nucleicos, intercalándose dentro del DNA o sea el caso RNA, formando monoadductos (cada 83pb) con las bases de timina y uracilo respectivamente, a través del proceso de inactivación irradiando los componentes sanguíneos con luz UVA de onda larga (320-400 nm; 3J/cm²), formando enlaces covalentes irreversibles con las bases de pirimidina, evitando así la replicación y finalmente conduciendo a la muerte de cualquier microorganismo. Los estudios de laboratorio han demostrado que con las condiciones de tratamiento indicadas de amotosaleno y luz UVA, se aporta una gran capacidad de reducción de diferentes patógenos; bacterias, virus, parásitos y leucocitos. Esta eficiencia excede el límite de inactivación para la mayoría de los patógenos y está en el rango que garantiza la seguridad de los componentes sanguíneos. La latencia de los virus que han integrado su genoma en los leucocitos contaminantes también se logra inactivar.

Una de las variables para determinar la calidad de las plaquetas, después de la IP, es la medición de la expresión de CD62P o P- Selectina. La expresión de éste marcador de superficie de PLT refleja la desgranulación de las células y, por lo tanto sirve como un marcador sensible para el estado de actividad de las PLT in vitro.

El objetivo del estudio es comprobar la integridad y viabilidad de los concentrados plaquetarios después de haber sido inactivados de cualquier agente patógeno, para lograr ser utilizados como componentes inocuos, seguros y funcionales para ser transfundidos. La estructura y las propiedades de las plaquetas, así como su activación funcional, se analizaron por medio de citometría de flujo, que es una herramienta versátil y confiable para el estudio de células, fenotipificación y funcionalidad.

El protocolo también podrá ser una alternativa complementaria de inactivación como la gamma irradiación, ya implementada para evitar reacciones adversas a la transfusión y proporcionar componentes sanguíneos seguros. No se pretende ningún efecto farmacológico del amotosaleno residual, ni con sus productos de degradación.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Asuntos Regulatorios.

La disposición de sangre, componentes sanguíneos y células progenitoras hematopoyéticas en México, está a cargo de servicios de salud públicos y privados vigilando su cumplimiento por el CNTS y los Gobiernos de las Entidades Federativas con base en los acuerdos de coordinación.

Durante la década de los ochenta (mayo de 1986), se estableció la obligatoriedad de las pruebas serológicas para detectar la infección por HIV-1 en donadores, en conjunto con epidemiología, la infección por HIV se sometió a vigilancia epidemiológica.

La OMS recomienda establecer una entidad que coordine un programa nacional de sangre con objetivo de asegurar el aprovisionamiento adecuado y oportuno de productos sanguíneos, haciendo énfasis en la necesidad de contar con un programa eficaz de aseguramiento de la calidad.¹

En 1993, se crea la Norma Oficial Mexicana (NOM-003-SSA2-1993 para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos). Se inicia con capacitación en el ámbito de la medicina transfusional, mediante el advenimiento del Programa de Educación a Distancia, "Sangre y Componentes Seguros" en colaboración con la OMS/OPS.²

La NOM-253-SSA1-2012, (modifica a la NOM-003-SSA2-1993, publicada el 18 de julio de 1994), tiene por objetivo establecer las actividades, criterios, estrategias y técnicas operativas del Sistema Nacional de Salud, en relación con la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.³

Los bancos de sangre tienen por cometido la preparación eficiente y oportuna de componentes sanguíneos inocuos.

Sus funciones son la captación, selección, retención, educación y el registro de donantes; la extracción de sangre, separación en componentes, análisis inmunohematológico y serológico, almacenamiento y distribución, de forma tal que el donante, el paciente y el personal del banco de sangre estén protegidos contra posibles efectos nocivos de la exposición a la sangre humana. Por otro lado, los hemocomponentes deben mantener su integridad estructural y fisiológica, así

como su esterilidad, durante el procesamiento y almacenamiento hasta ser transfundidos.

En la actualidad, los retos del BS están enfocados a demostrar eficiencia, calidad y seguridad en el servicio que proporciona a los pacientes, médicos, instituciones y a la sociedad.

La transfusión de componentes y derivados de la sangre humana sirven para tratar a pacientes con trastornos y enfermedades graves que no pueden ser corregidas con otros medicamentos. A pesar de que se cuenta con algunos sustitutos de la sangre que permiten mantener su volumen y su consistencia, la mayor parte de los componentes celulares y plasmáticos de la sangre humana poseen una actividad biológica que los hace el tratamiento más eficaz para una gran variedad de afecciones.

En general, las situaciones vinculadas con accidentes, actos de violencia y cirugía mayor, enfermedades crónicas, los trastornos de la coagulación, las complicaciones del embarazo y el parto requieren el uso de algún componente o derivado sanguíneo. Por esta razón, el contar con hemocomponentes y hemoderivados para transfusión en los hospitales y centros de salud resulta indispensable para evitar la muerte o prevenir complicaciones mayores en los pacientes muy graves.⁴

1.2 Riesgos asociados a la transfusión.

Las infecciones transmitidas por transfusión sanguínea siguen siendo una amenaza para aquellos pacientes que reciben hemocomponentes durante el curso de su tratamiento médico, los principales agentes infecciosos transmisibles son: virus, bacterias, parásitos, protozoarios y priones.

Los leucocitos son también una importante fuente de generación de reacciones adversas debidas, entre otras, a las citoquinas. La inactivación de los leucocitos ha demostrado, en algunos países con sistemas de hemovigilancia proactivos con una sólida implementación, como Suiza o Francia, que las reacciones adversas a la transfusión atribuirles a esta causa, simplemente desaparecerían.

Con referencia a los parásitos, la variedad de pruebas implementadas en el proceso de gestión de la donación es muy reducida, pero es sabido que son endémicos en algunas zonas del planeta.

Las pruebas analíticas son un medio insuficiente para eliminar el riesgo de infección y mantienen la vulnerabilidad de los pacientes al contagio, se pueden aplicar cuando la amenaza es correctamente identificada. De este modo, estas pruebas, nunca podrán salvaguardar el suministro de componentes sanguíneos ante los patógenos emergentes o re emergentes como por ejemplo WNV, Dengue, Chikungunya o Virus del Zika.

El riesgo de contaminación bacteriana permanece a pesar de las medidas de seguridad que se implementan ya que son la causa más frecuente de infección transmitida por transfusión. Los reportes de hemovigilancia del Reino Unido informan que las infecciones asociadas a transfusión con mayor morbilidad y mortalidad son causa de contaminación bacteriana de la sangre.⁵

En 1939 se publicó un artículo especificando los riesgos de la contaminación bacteriana de la sangre, señalando la susceptibilidad de la sangre de contaminarse con bacterias, ellos sugirieron que esta contaminación provenía de la piel del donador, aun con la esterilización de la piel algunas bacterias se escapan de la acción bactericida del antiséptico, por lo que sugirieron agregar a la sangre almacenada el antibiótico sulfanilamida. Posterior a estos reportes existe un gran número de artículos que informan sobre el grave riesgo de la contaminación bacteriana en los productos sanguíneos.

Actualmente, el factor de riesgo infeccioso asociado a muerte más importante de la transfusión es la contaminación bacteriana.

La sepsis bacteriana asociada a transfusión más frecuente es causada por plaquetas contaminadas más que por concentrados eritrocitarios, porque las bacterias crecen principalmente a la temperatura en que las plaquetas son almacenadas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), lo que crea un excelente medio para el crecimiento y proliferación de las bacterias.

Se estima que el nivel de contaminación al momento de colectarse las plaquetas es relativamente bajo, aproximadamente de 1-10 UFC/mL o menor. Cuando el producto esta contaminado, la bacteria inoculada puede proliferar en horas hasta alcanzar un nivel de 10^6 UFC/mL o mayor. Esta cantidad de bacterias en el componente sanguíneo en un corto periodo de tiempo puede producir bacteriemia que puede progresar a sepsis y la muerte al paciente.⁶

Las reacciones sépticas asociadas a la transfusión causadas por la infusión intravenosa de concentrados plaquetarios contaminados parecen ser mucho más comunes que las debidas a los glóbulos rojos contaminados. Esto se debe a la temperatura más baja a la que se almacenan los glóbulos rojos (4°C).

La temperatura a la que se almacenan las plaquetas, 22°C, es más probable que facilite el crecimiento bacteriano, al menos para la mayoría de las especies bacterianas. Aproximadamente 1 de cada 3,000 unidades de plaquetas (derivadas de sangre total y aféresis) está contaminada con bacterias (Tabla 1) Esta tasa de contaminación es de órdenes de magnitud (de 1 a 1, 000 veces) mayor que el de los muchos virus actualmente asociados con infecciones transmitidas por transfusión.

Tabla 1. Resumen de la prevalencia de contaminación bacteriana de los productos sanguíneos.

Product	No. of Studies	References	No. of Positive Units	No. of Units Tested	Positive Units (per 10 ⁵ U)
WB-PCs	8	2,8,10,13-17	64	188,958	33.9
A-PCs	5	7,10-13	21	41,175	51.0
RBCs	2	10,11	1	38,475	2.6
Overall	15		86	268,608	32.0*

Abbreviations: WB-PCs, whole blood-derived, platelet concentrates; A-PCs, apheresis platelet concentrates; RBCs, red blood cells.

* 95% confidence intervals: 25.6 to 39.1.

Se ha estimado que la incidencia de episodios sépticos graves asociados a transfusiones puede ser 1 en 50,000 para plaquetas y 1 en 500,000 para glóbulos rojos.

La transfusión de una unidad concentrada de plaquetas contaminadas puede estar asociada con signos y síntomas variables.

Los signos y síntomas iniciales incluyen fiebre y escalofríos que generalmente comienzan durante o poco después (dentro de las 2 horas) posteriores al inicio de una transfusión. Subsecuente u otros signos adicionales incluyen hipotensión, náuseas, vómitos, diarrea, oliguria y shock.

Otros síntomas potenciales incluyen síntomas respiratorios (disnea, sibilancias y / o tos) y sangrado debido a las consecuencias de la coagulación intravascular diseminada inducida por endotoxina. Es importante tener en cuenta que las reacciones de transfusión séptica asociadas con unidades de glóbulos rojos contaminados generalmente ocurren con unidades que han sido almacenadas por más de 21 días, mientras que las reacciones asociadas con la transfusión de unidades de concentrado de plaquetas contaminadas generalmente ocurren con unidades que han sido almacenadas para más de 3 días.

Por lo tanto, la gravedad clínica de una reacción séptica asociada a la transfusión puede variar considerablemente, dependiendo de lo siguiente:

- 1) Las especies de bacterias presentes en una unidad de concentrado de plaquetas, con organismos gramnegativos que tienden a causar reacciones más severas debido a la presencia de endotoxinas, a menudo elaboradas por dichos organismos.
- 2) El número total de bacterias infundidas a un receptor.
- 3) La tasa de propagación de las bacterias presentes.
- 4) Las características del receptor (huésped), como la enfermedad subyacente, el recuento de leucocitos, el estado del sistema inmune y si el receptor está recibiendo terapia con antibióticos contaminantes.

Muchas de las medidas que se han propuesto, y en algunas jurisdicciones se han implementado, en un intento de reducir el riesgo de sepsis asociada a la transfusión se resumen en la Tabla 2. Estas medidas, muchas de las cuales se están investigando activamente como posibles soluciones a la transfusión relacionado con el problema de la sepsis, se pueden subdividir en cuatro categorías distintas:

- 1) No infundir producto sanguíneo contaminado.
- 2) Detección previa de agentes contaminantes.
- 3) Reducción de la exposición del donante a agentes infecciosos.⁷

Tabla 2. Estrategias para reducir el riesgo asociado a la transfusión de bacterias.

-
- A. Avoiding blood product contamination**
 - 1. Extension of donor screening
 - 2. Improving donor arm disinfection
 - 3. Removal of the first aliquot of the donor blood
 - B. Altering component processing and storage**
 - 1. Optimizing storage temperature
 - 2. Leukocyte filtration
 - 3. Limiting component storage time
 - C. Pretransfusion detection of bacteria**
 - 1. Visual inspection
 - 2. Endotoxin assays
 - 3. Direct staining
 - 4. Ribosomal assays
 - 5. NAT assays
 - 6. Direct culture (manual or automated)
 - D. Reducing donor exposure**
 - 1. Optimizing transfusion indications
 - 2. Reducing transfusion triggers
 - 3. Increasing use of apheresis products
 - 4. Pathogen inactivation
-

Abbreviation: NAT, nucleic acid testing.

En la tabla 3 se muestran cómo los efectos y las reacciones adversas pueden deberse al propio componente sanguíneo, a errores en las pruebas pretransfusionales o a interacciones entre la sangre del paciente y el hemocomponente transfundido que pueden no deberse a ningún error y ser no evitables.^{8,9}

Tabla 3: Efectos adversos prevenibles y no prevenibles.

Tipo de reacción adversa	¿Está relacionada con la calidad y la seguridad del componente sanguíneo distribuido?	¿Está relacionada con un error en el proceso de transfusión clínica?	Métodos de prevención
Infección bacteriana transmitida por la transfusión	Si	Debida posiblemente a un error en la inspección del componente antes de la transfusión	Desinfección de la piel del donante Bolsa de derivación en la línea de donación Reducción de patógenos Condiciones de almacenamiento correctas
Infección vírica transmitida por la transfusión • VHB • VHC • VIH-1/2 • Otra	Si	No	Manipulación correcta para no estropear los contenedores Selección de los donantes Análisis en los donantes Reducción de patógenos
Infección parasitaria transmitida por la transfusión • Malaria • Otra	Si	No	Selección de los donantes Análisis en los donantes Reducción de patógenos
Hemólisis por un almacenamiento incorrecto	No	Si	Control de calidad en el proceso de transfusión clínica
Hemólisis inmunológica por incompatibilidad ABO	No	Si	
Hemólisis inmunológica por otros aloanticuerpos	No	Si	
Anafilaxis o hipersensibilidad Púrpura postransfusional Lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (LPAT) (en inglés, TRALI)	No	No	Puede ser impredecible e inevitable Puede reducirse el riesgo de TRALI con plasma fresco congelado de donantes varones
Enfermedad del injerto contra el huésped	No	Si Debida a un error a la hora de seleccionar el componente o a no identificar un paciente de riesgo	Uso de componentes irradiados para los pacientes susceptibles de recibir una transfusión Uso de plaquetas tratadas con amotosaleno
Transfusión asociada a sobrecarga circulatoria	No	Si Debida a no identificar un paciente de riesgo	Evitar una transfusión excesiva

1.3 Enfermedades Infecciosas.

En todo el mundo, el mayor riesgo evitable de la transfusión se asocia probablemente a la transfusión de PFC en indicaciones clínicas no probadas. El plasma tiene prácticamente las mismas probabilidades de transmisión de infecciones virales que la sangre total. En zonas en las que las pruebas de seguridad de la sangre pueden ser poco fiables, la transfusión de PFC, a no ser que se haya sometido a un procedimiento de IP, puede ser una fuente de importante transmisión de estas infecciones.

Existe una infinidad de agentes infecciosos potencialmente transmisibles (virus, bacterias, parásitos, protozoos y priones) y el mayor o menor grado de preocupación para los bancos de sangre, depende de la gravedad de la enfermedad que un determinado patógeno pueda producir.

Las fuentes de infección pueden clasificarse como:

Bacterias: es la primera causa de infección pos transfusional, a pesar de las medidas de asepsia durante el proceso, los sistemas de separación de los componentes en circuito cerrado y de los sistemas de refrigeración para el almacenamiento. La combinación de un método de cultivo en los primeros momentos de almacenamiento, seguido de un test rápido aplicado justo antes de la transfusión que pueda detectar bacterias omitidas por el cultivo, son por el momento la mejor combinación de **sistemas de detección** pero un sistema que **sólo reduce en un 50% el riesgo**, por lo que no se puede considerar adecuado.¹⁰

Patógenos conocidos: las pruebas en rutina cubren sólo un número limitado de ellos.

La investigación en técnicas de laboratorio es cada vez más elevada y el riesgo actual de contraer algunas de las infecciones como VHB, VHB y HIV por vía transfusional es extremadamente bajo, pero continúan existiendo infecciones pos transfusionales fatales que no se analizan.

Desde que se conoce el riesgo de una nueva enfermedad y se descubre el agente causal hasta que se desarrollan ensayos para detectarlo, pueden pasar muchos años y mientras tanto la enfermedad se propaga sin ningún control.

Limitaciones del escrutinio: debido al periodo ventana y a la sensibilidad.

Las técnicas serológicas dejan un espacio a la transmisión debido al periodo de ventana inmunológico, durante el que el individuo recientemente infectado todavía no ha desarrollado anticuerpos frente al agente infeccioso.

Existen técnicas más sensibles que acortan dicho periodo de ventana, detectando casos no reconocidos en serología, estas técnicas se conocen como NAT y existen muchos procedimientos.^{11,12}

Patógenos nuevos y emergentes: un riesgo que las medidas de seguridad actuales no pueden eliminar.

La gran amenaza de la seguridad transfusional es que los agentes infecciosos emergentes tardan en ser identificados y hasta que no se puedan tomar medidas, serán muchos los pacientes infectados. Se consideran emergentes todos los agentes infecciosos nuevos, reemergentes, migratorios y resistentes a los fármacos.

Las causas de este hecho deben buscarse en los cambios medioambientales, el calentamiento global, los movimientos migratorios de personas, cambios demográficos humanos, la falta de políticas de calidad en sanidad en muchas zonas del mundo o incluso las mutaciones que experimentan los microorganismos como respuesta al abuso y mal uso de antibióticos, las vacunas o las inmunoterapias. Tal es el caso que en el futuro se prevé la necesidad de implantar test para el VHH-8 (Virus Herpes Humano), la babesia, el parvovirus B19, el dengue, la malaria, la borrelia y el VPH (Virus Papiloma Humano).

En los últimos años se ha llevado a cabo un esfuerzo enorme para prevenir la transmisión de agentes infecciosos mediante la transfusión, gracias a ello, actualmente el riesgo es muy bajo. Pero desgraciadamente este éxito ha venido motivado por el reconocimiento de haber transmitido decenas de millones de enfermedades infecciosas a través de la transfusión en todo el mundo.

Un agente infeccioso con un periodo más o menos largo de presencia en la sangre antes de provocar la enfermedad, y capaz de ser transmitido por transfusión, podría generar una nueva epidemia como en su día fue el HIV, tal es el caso del WNV en los últimos años.

En cuanto al tamizaje universal, el CNTS reconoce que todavía no se alcanza la cobertura de 100%, pues si bien más del 95% de los donantes de sangre a nivel nacional se somete a tamizaje para HIV, VHC, VHB, Chagas y sólo 42% se somete a la prueba de escrutinio para la detección del *T. cruzi*.¹³

Es evidente que si se comparan los logros obtenidos por México en las últimas décadas con respecto a la seguridad de la cadena transfusional con los de los países más desarrollados, la brecha aún es muy amplia; sin embargo, resulta incuestionable que se ha avanzado a nuestro propio ritmo para alcanzar la meta de proporcionar una sangre cada vez más segura a los pacientes.

El reto es doble: mejorar la seguridad de las reservas sanguíneas en relación con los agentes que se sabe pueden transmitirse por la vía transfusional y estar preparados ante las amenazas que las llamadas enfermedades emergentes, algunas de las cuales pueden transmitirse por transfusión sanguínea. Será necesario incorporar el programa de hemovigilancia en el quehacer cotidiano.

1.4 Plaquetas.

Las plaquetas son células anucleadas de 1-2 μm de tamaño, generadas en la médula ósea por fragmentación de los bordes de los megacariocitos, que se acumulan en el lugar donde el endotelio está disfuncional o dañado dentro de la pared arterial, lo que inicia la formación del trombo (Ver figura 1). El intervalo fisiológico de las plaquetas es de $150-400 \times 10^9$ PLT/L. Un adulto sano produce cada día una media de alrededor de 1×10^{11} plaquetas. La expectativa de vida de las plaquetas es de 7 a 10 días.

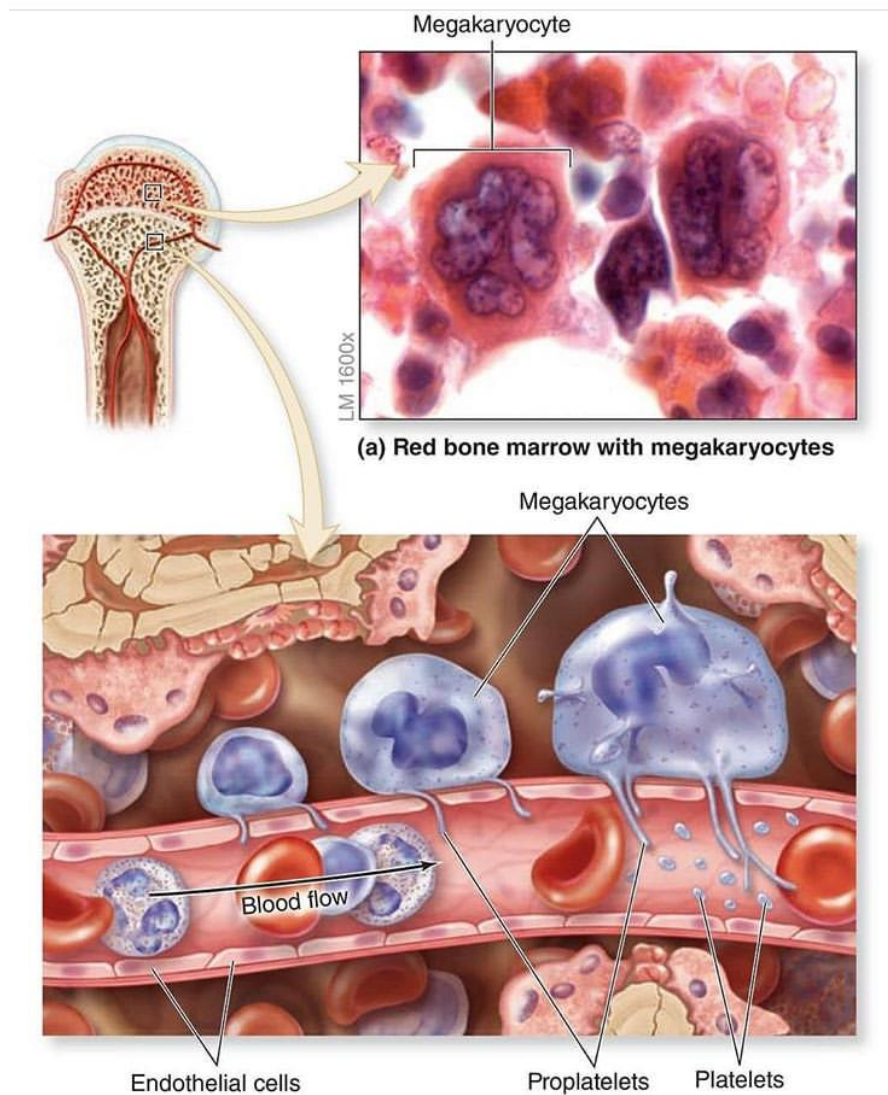


Figura 1. Formación de plaquetas en los vasos sanguíneos.

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma no activa y expresan en su superficie un número relativamente pequeño de muchas de las moléculas que, en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno. Además, las plaquetas contienen diferentes tipos de gránulos (fundamentalmente gránulos densos, gránulos α , peroxisomas y lisosomas) desde los que al ser activadas liberan diferentes factores almacenados en ellos y que a su vez estimulan más la actividad de la propia plaqueta. Estos factores tienen también efectos biológicos sobre otras células del entorno plaquetario.

Un estudio ha descrito que las plaquetas activadas por trombina liberan más de 300 proteínas diferentes, muchas de ellas relacionadas con reacciones inflamatorias. Además, las plaquetas pueden interaccionar con patógenos bacterianos e incluso expresar receptores del complemento, lo que las convierte también en células involucradas en la inmunogenicidad del organismo. De hecho, las plaquetas expresan y almacenan proteínas antibacterianas llamadas trombocidinas.

- Gránulos α

Los gránulos α son los más prominentes y los que se encuentran en mayor número, aproximadamente entre 50 a 80 gránulos por plaqueta. Se forman durante la maduración temprana de los megacariocitos y aparecen en la malla transGolgi en forma de pequeñas vesículas y de gránulos inmaduros que transitan a través de cuerpos multivesiculares hasta alcanzar su tamaño y densidad definitiva.

Los gránulos α contienen proteínas adhesivas, factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, proteoglicanos e inmunoglobulinas. En la Tabla 4 se muestra una clasificación de acuerdo a su funcionalidad.

La membrana de los gránulos α contiene diferentes receptores moleculares, cuyos sitios de reconocimiento están orientados hacia su lado interno.

Algunos como la **P-selectina**, la osteonectina y el GMP33 son receptores específicos y están ausentes en la membrana plasmática de la plaqueta en reposo. En particular, la **P-selectina es indicadora de activación plaquetaria cuando se la encuentra expresada en la superficie celular.**

Tabla 4. Contenido de los gránulos alfa.

Categorías	Contenido de α gránulo	Funciones
Factores de crecimiento y mitogénicos	PDGF (A, B y C), EGF, IGF-1, VEGF (A y C), bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3	Quimiotaxis, proliferación celular y angiogénesis
Quimioquinas, citoquinas y otros	TGF- β 1 y - β 2, IL-1, RANTES (CCL5), IL-8, MIP-1 α , MIP-2, GRO- α , MCP-1, MCP-3, PF4, β -TG, NAP-2, angiopoyetina-1, HMGB1, IL-6sR, endostatina, osteonectina, dickkopf-1, osteoprotegerina	Regulación de angiogénesis, quimiotaxis, interacción celular, remodelación vascular
Proteínas antimicrobianas	Trombocidinas, quinocidinas	Bactericida y fungicida
Glicoproteínas de membrana	allbb3, avb3, GPIb, PECAM-1, constituyentes de la membrana plasmática, receptores para agonistas primarios, P-selectina , TLT-1, CD63, CD40L, TF, TRAIL, furina, cellubrevina, syntaxina-2, clatrina	Adhesión y agregación plaquetaria, endocitosis de proteínas, secreción, inflamación, generación de trombina, interacción plaqueta-leucocito y plaqueta pared vascular
Otras	4-sulfato de condroitina, albúmina, inmunoglobulinas G y M, precursor de amiloide b proteína, factor H de complemento, semaforin 3A.	Varias

Los gránulos α son reservorios de proteínas que van desde factores de crecimiento hasta moléculas de adhesión o receptores que utiliza la plaqueta para interactuar con otras células. Entre estos receptores se incluyen las glucoproteínas (GP) Ib y aIIb β .

Otra de las moléculas de adhesión contenidas en estos gránulos es la **P-selectina**, que permite la interacción de las plaquetas con las células endoteliales, los leucocitos y otras células inmunitarias. En los gránulos α hay también moléculas asociadas a la respuesta inflamatoria, como las citocinas.^{15,16} Ver figura 2.

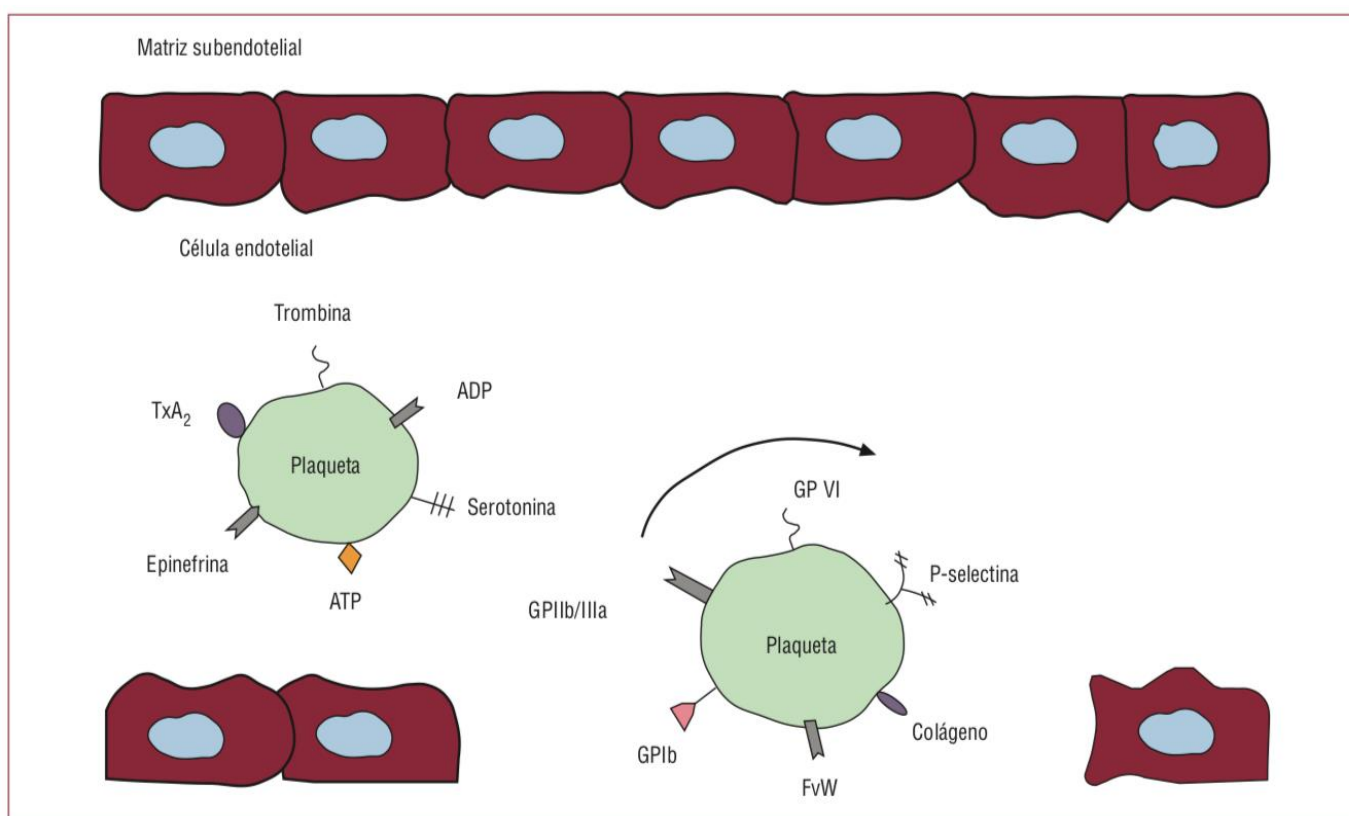


Figura 2. Principales agonistas y proteínas de adhesión plaquetaria.

- **Activación plaquetaria.**

El mecanismo de formación del trombo plaquetario puede dividirse en cuatro etapas:

1. Frenado de las plaquetas circulantes sobre la pared vascular contra la corriente del flujo sanguíneo que las empuja.
2. Activación y adhesión firme de la plaqueta a la pared del vaso.
3. Unión de más plaquetas a las ya adheridas, que sería la fase de crecimiento del trombo.
4. Estabilización del trombo, la última fase.

- **Transfusión plaquetaria.**

La disminución de la cifra de plaquetas es conocida como trombocitopenia; ésta puede producirse por hemorragia o secuestro secundario en caso de enfermedades hematológicas, así como en tratamientos de quimioterapia mieloablativos, en enfermedades oncológicas o en el caso de trasplante de órganos. La transfusión de plaquetas es indicada por el médico de acuerdo a presencia o no de sangrado, cuenta plaquetaria y cuadro clínico del paciente.

La necesidad de plaquetas está indicada para los siguientes pacientes:

- Pacientes con leucemia promielocítica aguda
- Pacientes que van a ser sometidos a procedimientos invasivos o cirugía con cuenta de plaquetas $< 50,000/\mu\text{L}$
- Pacientes con púrpura trombocitopénica
- Leucemias
- Hemorragias
- Trasplante hepático

Los donadores son parte vital del trabajo que se realiza en un BS; sin ellos no podríamos transfundir a los pacientes que lo requieren; por ésta razón, el proceso de selección del donador tiene como objetivo transformar al disponente en un donador que no genere daños a la salud del receptor ni del mismo donador.

- **Recolección de componentes sanguíneos por aféresis.**

El desarrollo de la medicina transfusional de nuestros días, los avances tecnológicos y la nueva era de la medicina basada en evidencias han fortalecido la práctica de los procedimientos de aféresis en todo el mundo, gracias a los beneficios que han observado en la obtención de componentes sanguíneos por este medio.

El concepto integral de aféresis se refiere a la obtención de un componente sanguíneo por medio de la centrifugación de la sangre total, a través de un equipo automatizado, retornando el resto de los componentes al donador.

- **Plaquetaféresis.**

Los estándares nacionales e internacionales marcan que un concentrado plaquetario contiene 5.5×10^{11} plaquetas; la dosis mínima indicada para un paciente adulto es de al menos 5 CP, por lo que la colección por aféresis garantiza 1 ó 2 dosis de plaquetas, ya que el mínimo obtenido es de 3.0×10^{11} hasta 9.9×10^{11} (5 a 18 CP) de un solo donador.

El donador debe cumplir con ciertos requisitos para garantizar un procedimiento exitoso:

- Peso mayor a 50 kg.
- Cuenta de plaquetas mayor a $150 \times 10^9/L$.
- Hematocrito no mayor de 54% (para evitar contaminación con glóbulos rojos).
- Buen acceso venoso en fosa antecubital.

La donación de PLT puede realizarse a las 72 horas después de la primera donación y no exceder 24 donaciones por año.¹⁷

1.5 Contaminación bacteriana de concentrados plaquetarios.

Los microorganismos implicados en la contaminación bacteriana de las plaquetas incluyen al *Staphylococcus spp* (42%), *Streptococcus spp* (12%), *Escherichia Coli* (9%), *Bacillus spp* (9%), *Salmonella spp* (9%), *Serratia spp* (8%), *Enterobacter spp* (7%) y otros organismos (4%). Alrededor del 56% de los organismos son Gram positivos y la mayoría aerobios.

La siguiente tabla resume el número de casos de sepsis asociada a transfusión de plaquetas por especies bacterianas.²⁶

Tabla 5. Eventos de sepsis relacionada con las transfusiones de plaquetas.

Platelet transfusion-related sepsis events

Organism	Gram stain	Characteristics	Total observations	Fatalities	Frequency
<i>S. epidermidis</i>	Gram +	Frequent skin contaminant; implicated in transfusion related fatalities	35	1	61.4%
<i>S. aureus</i>	Gram +	Grows rapidly at body temperature, many sources; implicated in transfusion related fatalities	6	3	10.53%
<i>E. coli</i>	Gram –	Normal human flora; implicated in transfusion fatalities	1	1	1.75%
<i>P. aeruginosa</i>	Gram –	Implicated in transfusion fatalities	2	2	3.51%
<i>B. cereus</i>	Gram +	Frequent skin contaminant; implicated in transfusion related fatalities	3	0	5.26%
<i>S. marcescens</i>	Gram –	Opportunistic environmental contaminant; implicated in transfusion related sepsis	2	0	3.51%
All other species	–		8	0	14.04%
Total	–		57	7	100%

Múltiples estudios han demostrado que 1:2,000-3,000 unidades de plaquetas están contaminadas de bacterias (Cuadro I). El riesgo de muerte relacionado a la contaminación bacteriana de las plaquetas es de 1:7,500- 1:100,000. En los EUA, la contaminación bacteriana es la segunda causa de muerte secundaria a transfusión (después de errores a la hora de la obtención del componente sanguíneo) con una frecuencia de sepsis relacionada a la transfusión de plaquetas de 1:20,000 a 1:85,000 unidades transfundidas.

El riesgo de recibir plaquetas contaminadas con bacterias puede ser 50-250 veces más elevado que el riesgo de infección por VIH- 1/2, VHC, VHB y HTLV-I/II.

Cuadro1. Poporción de componentes sanguíneos contaminados.

Componente Sanguíneo	Riesgo	
Concentrados	Contaminación bacteriana	1:3,000 unidades
Plaquetarios	Sepsis Clínica	1:20,000 transfusiones
	Mortalidad	1:60,000 transfusiones
Concentrados	Contaminación Bacteriana	1:500,000 unidades
Eritrocitarios	Sepsis clínica	1:250,000 transfusiones
	Mortalidad	1:1,000,000 transfusiones

Existen varias causas posibles de contaminación bacteriana de los productos plaquetarios del donante. Estos incluyen la incapacidad de reducir adecuadamente la contaminación bacteriana de la piel del donante en el momento de la punción venosa; bacteriemia donante no detectada; y contaminación ambiental durante la recolección y procesamiento de plaquetas. De estas posibles causas de contaminación bacteriana, la gran mayoría de los casos se debe a una preparación inadecuada de la piel.^{6,18}

1.6 Métodos disponibles para detectar la contaminación bacteriana.

La contaminación bacteriana de la sangre requiere tiempo para que los organismos proliferen antes de que sean detectables, varios métodos se han investigado para detectar bacterias en los productos plaquetarios previos a la transfusión.

Los métodos más sensibles son recomendados si las muestras se analizan dentro del los días 1 o 2 de la recolección de sangre, los métodos menos sensibles pueden ser aceptados si las muestras son realizadas unas pocas horas antes de la transfusión.

1. Determinación del pH o los niveles de glucosa son métodos rápidos pero detectan bacterias a un nivel $>10^7$ UFC/mL de bacterias y requiere solo unos segundos para realizarse. Para aumentar los niveles de sensibilidad se recomienda hacer los dos parámetros.
2. Otro método es la tinción directa con la tinción de Gram (detecta $>10^6$ UFC/mL de bacterias) o el naranja de acridina (detecta $>10^5$ UFC/mL de bacterias) todas estas pruebas no son de gran utilidad debido también a su baja sensibilidad cuando son comparadas con las concentraciones de bacterias que causan sepsis.
3. Métodos inmunológicos. Dos métodos inmunológicos están en desarrollo para la detección de bacterias en los concentrados de plaquetas casi en el momento de la transfusión. Uno de los métodos (verax Biomedical, Worcester, MA) emplea anticuerpos conjugados con oro y ácido lipoteicoico para detectar bacterias Gram-positivas o contra lipopolisacáridos para detectar bacterias Gram-negativas, logrando detectar un nivel de bacterias de 10^3 - 10^4 UFC/mL en aproximadamente 20 min. El otro método (Inmunetics Inc., Cambridge, MA) emplea anticuerpos contra los peptidoglicanos de organismos Gram-positivos y Gram-negativos son utilizados en una sola incubación, detectando un nivel de 10^3 UFC/mL de especies Gram-positivas y Gram-negativas, aproximadamente en 1 hora.
4. Métodos de Biología Molecular. Un método de biología molecular basado en la detección de RNA ribosomal puede detectar $>10^4$ UFC/mL de bacterias en 60-90 min. La prueba amplificada requiere varias horas para su detección porque frecuentemente se contaminan con niveles bajos de RNA.

1.7 Métodos disponibles para limitar la contaminación bacteriana de las plaquetas.

Existen varios métodos para limitar la entrada de organismos bacterianos en los concentrados plaquetarios.

1. **Mejorar la evaluación del donador.** Excluir donadores con bacteriemia no aparente; historia clínica, enfatizar en los procesos infecciosos, síntomas gastrointestinales en el último mes, así como los procedimientos dentales y la temperatura del donador.
2. **Preparación del sitio de venopunción.** Las técnicas de flebotomía reducen la incidencia de contaminación bacteriana relacionada a la flebotomía a causa de la microbiota cutánea. El uso de soluciones con yodo son las más efectivas en reducir el número de bacterias de la piel. En caso de que el donador sea alérgico al yodo se utiliza la clorhexidina.
3. **Eliminar los primeros 15-30 ml de la sangre del donador,** la mayoría de las bacterias contaminantes pueden ser detectadas en los primeros mililitros de sangre que pasa a través de la aguja de venopunción. Este método puede reducir la proporción de unidades contaminadas por bacterias en el momento de la recolección. Datos de grupos Europeos recomiendan eliminar los primeros 10-40 ml de sangre para disminuir el riesgo de contaminación.
4. **La contaminación bacteriana se reduce por el uso de concentrados plaquetarios de aféresis.** La sepsis ocurre de 6-10 veces más en los concentrados plaquetarios unitarios porque existe un incremento en la exposición de donadores de 6-10 veces más.
5. **Almacenamiento de los concentrados de plaquetas.** La FDA ha reducido el tiempo de almacenamiento de las plaquetas de 7 a 5 días.
6. **Inactivación de patógenos.** Por más de 10 años, un número de métodos fotodinámicos o fotoquímicos se han reportado que pueden conducir a la reducción de virus, bacterias y protozoarios que están presentes en los productos sanguíneos. Estos métodos de reducción de patógenos incluyen; la combinación de un psoraleno con luz ultravioleta A (UVA); riboflavina y luz visible; irradiación ultravioleta B; y la adición de azul de metileno con ftalocianinas con luz visible. Se ha comprobado que un psoraleno, el amotasaleno S-59 combinado con luz UVA expuesto a los concentrados plaquetarios tiene un papel efectivo en la inactivación de las bacterias.

Estos compuestos químicos que pueden agregarse a los productos de transfusión interactúan con los ácidos nucleicos de los patógenos, de manera espontánea o a través de la activación inducida por la energía de la luz, este compuesto se liga de manera cruzada con los ácidos nucleicos y previene la transcripción y la replicación de los patógenos. Estos tratamientos son eficaces sí el nivel de reducción es de 6-10 log de reducción de bacterias.

La expectativa de un sistema de **reducción de patógenos** es que logre niveles suficientemente altos de reducción de patógenos para disminuir o prevenir la probabilidad de transmisión de la enfermedad. Además, el sistema debe ser no tóxico, no mutagénico y debe ser fácil de usar.^{6,14}

En la Tabla 6 se muestran las tecnologías que se encuentran disponibles actualmente para la inactivación de agentes patógenos en componentes sanguíneos.

Tabla 6. Tecnologías disponibles para Inactivación de Patógenos.

<u>Producto</u>	<u>Compañía</u>	<u>Compuesto/Tecnología</u>	<u>Estado de ensayo /autorizada</u>
Plaquetas	Cerus	Amotosaleno + luz UVA ¹ INTERCEPT	Marca CE May 2002 (Clase III) ² (buffy coat & aféresis 7d de almacenam.)
Plaquetas	Terumo BCT	Riboflavina & luz UV ³ Mirasol ⁴	Marca CE Oct 2007(clase IIB), (buffy coat & aféresis 5d de almacenam)
Plaquetas	Macopharma	Luz UVC (254nm) Theraflex	Marca CE 2009. En ensayo fase II/III.
Plasma	Cerus	Amotosaleno + luz UVA ¹ INTERCEPT	Marca CE Nov 2006 (Clase III) ⁶
Plasma	Terumo BCT	Riboflavina + luz UV ³ Mirasol	Marca CE Ago 2008 (clase IIB)
Plasma	Macopharma	Azul de metileno + luz visible ³ Theraflex	Marca CE 2001 (clase IIB), 2004 (clase III) ⁴
Plasma	Octapharma	Solvente Detergente ⁵ OctaPlas	Autorizado 1998 (UK) (pools) ⁷
Plasma	VIPS (Colombier,Switzerland)	Solvente Detergente ⁵	Marca CE 2009 (Donante único o minipools)
G. Rojos	Cerus	S-303 ⁵ (2ª Generación) INTERCEPT	Fase III en curso
G. Rojos	Vitex	Inactine (PEN110) ⁵	Abandonada 2003
G. Rojos	Macopharma	P-Capt Filtro para Priones	Marca CE Sept 2006
G. Rojos	Pall	Leukotrap Affinity Plus	Marca CE Feb 2010
Sangre Entera	Terumo BCT	Riboflavina & luz UV Mirasol	Bajo desarrollo Fase II/III planeada en sangre entera
Sangre Entera	Cerus	S-303 ⁵	Bajo desarrollo

1.8 Sistema de inactivación de patógenos mediante clorhidrato de amotosaleno y luz UVA.

El objetivo de la tecnología *IBS_{TM}* es impedir la replicación de los patógenos y reducir las reacciones inmunes adversas asociadas a la transfusión de plasma y plaquetas, sin dañar las células vitales del componente sanguíneo, con la menor pérdida de actividad posible y sin ocasionar efectos adversos en el paciente receptor.

La tecnología *IBS_{TM}* para plasma y plaquetas utiliza un psoraleno sintético, el amotosaleno (S-59), el cual se une a los ácidos nucleicos (DNA y RNA), cuando es activado por la luz ultravioleta (UVA) (320-400nm; 3J/cm²) da como resultado el entrecruzamiento por enlaces covalentes con las bases de pirimidina de una manera irreversible e independiente del oxígeno (reacción fotoquímica). A diferencia de este método, las tecnologías alternativas para plaquetas y plasma (Mirasol “riboflavin plus UV”) o plasma IP luz visible y AM que utilizan la fotoinactivación son, al menos en parte, dependientes de la generación de iones y radicales libres de oxígeno para su acción (reacciones fotodinámicas). Tales especies del oxígeno tienen una vida útil limitada, son muy reactivas y reaccionan de manera descontrolada con moléculas adyacentes.

Clorhidrato de amotosaleno (psoraleno).

El dispositivo *IBS_{TM}* emplea clorhidrato de amotosaleno (ver Cuadro 2), un compuesto fotoactivo, e iluminación (UVA) de longitud de onda larga para el tratamiento fotoquímico.

Los psoralenos son sustancias que se encuentran en la familia de productos naturales conocidos como furocuraminas. Estas sustancias son sintetizadas por diferentes plantas y se ingieren en la dieta habitual a través de los vegetales. Se calcula que la ingesta media diaria de psoraleno es > 1mg/día.

Hay una serie de características de los psoralenos que van a determinar mayor utilidad para inactivar microorganismos en los componentes sanguíneos: su pureza química, que se activen sólo en presencia de luz, que sean retenidos preferentemente por el/los organismo/s diana, su excreción o eliminación rápida, su toxicidad mínima y un amplio espectro de actuación. Han sido evaluados cientos de psoralenos, pero sólo el amotosaleno (S-59), un psoraleno sintético formulado como una sal, cumple los criterios referidos.

El clorhidrato de amotosaleno, junto con la luz UVA forma parte del proceso de inactivación de patógenos en 3 pasos:

1. El componente químico se intercala entre las hebras del ácido nucleico, bien DNA o RNA.
2. La exposición a la luz UVA, con una longitud de onda entre 320-400nm, facilita que el amotosaleno se una a las bases pirimidínicas (timina, citosina y uracilo) y forme un monoadducto o puente (en el lado furano de la molécula), lo cual ocasiona que la hélice del ácido nucleico se desenrede ligeramente.
3. Al continuar la exposición a la luz se forma un doble puente, provocando un entrecruzamiento entre hebras (1 entrecruzamiento por cada 83 pb) que es estable haciendo que la replicación no sea posible y el material genético queda completamente inutilizado y no funcional. Este mismo proceso ocurre en ácidos nucleicos de una sola hebra que tiene estructuras secundarias como horquillas o bucles.

Los estudios de laboratorio han demostrado que con las condiciones de tratamiento de amotosaleno y UVA indicadas, se ha descrito una gran capacidad de reducción de diferentes patógenos; bacterias, virus y parásitos y de los leucocitos. Dicha eficacia supera el límite para la mayoría de virus y están en el rango que permite garantizar la seguridad de los componentes sanguíneos aun en presencia de esos agentes. Los virus que están en forma latente o que tienen su material genético integrado en el ácido nucleico de leucocitos contaminantes (p.e. la forma proviral del HIV) son también inactivados. No se pretende ningún efecto farmacológico del amotosaleno residual, (ver estructura de amotosaleno en la Figura 3).

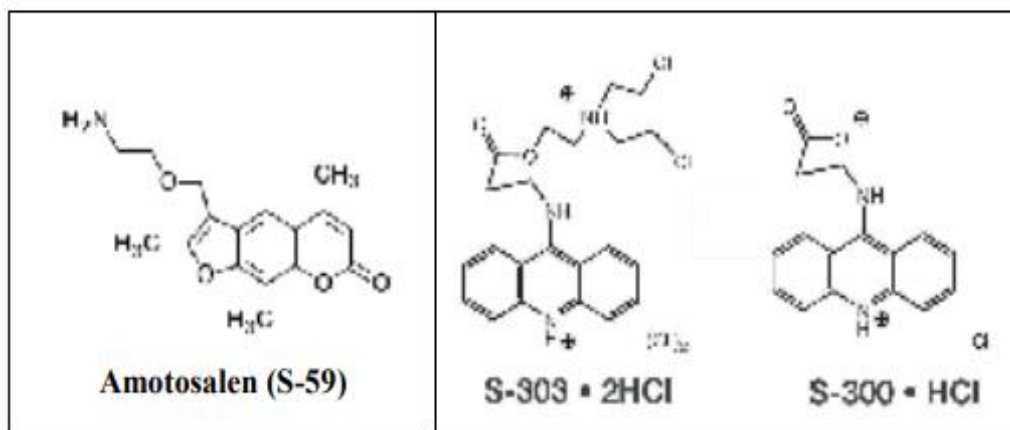


Figura 3. Estructura del Amotosaleno, S-59 y sus producto de degradación.

Cuadro 2. Composición de la solución de Amotosaleno.

<i>Nombre del ingrediente</i>	<i>Cantidad por cada 100 mL</i>	<i>Función</i>
Sustancia activa		
Amotosalen Clohidrato	203 mg	Inactivación de patógenos
Excipientes		
Cloruro de sodio	924 mg	Mantenimiento de isotonicidad
Agua para inyección	Cbp 100 mL	Vehículo

El sistema de inactivación de patógenos Intercept™ para plaquetas y plasma ha demostrado ser seguro y eficaz en una exhaustiva serie de estudios preclínicos y clínicos.

Es relevante destacar que, en la mayoría de las pruebas realizadas, en las grandes dosis detectadas no se observaron efectos tóxicos, ni siquiera cuando se omitió el paso de remoción de amotosaleno por utilización del dispositivo CAD del proceso estándar. En pruebas de fototoxicidad se observaron márgenes algo más bajos (>40), en pruebas que se hicieron con ratas albinas y con radiación UV, un modelo menos relevante para la práctica clínica. El fabricante también realizó estudios minuciosos, tales como HPLC para la detección de amotosaleno libre residual o sus fotoproductos creados pos IP, incluso en ausencia de luz UVA, así como estudios para detectar la formación de neoantígenos en componentes como resultado del proceso para IP, el cual podría haber causado reacciones inmunológicas no deseadas y no se encontró evidencia, ni en estudios pre-clínicos ni en muestras de pacientes durante pruebas clínicas, sobre la formación de nuevos antígenos luego de la transfusión de plasma y plaquetas tratados con amotosaleno.¹⁹

La tecnología de IP elimina un amplio rango de microorganismos patógenos, sin toxicidad ni efecto sobre la potencia del producto. Los países están adoptando el sistema IP para plasma y plaquetas por los beneficios de un abasto de sangre más seguro que impacta el potencial de componentes y viabilidad.²⁰

Espectro de actividad de amotosaleno.

- Inactivación de patógenos.

El nivel de inactivación en bacterias se calcula en términos de reducción logarítmica, mediante la fórmula siguiente:

Reducción log= log (título de bacterias pretratamiento / título de bacterias postratamiento)

La inactivación suficiente para que el microorganismo quede por debajo del límite de detección se indica como “mayor de” o “>”. Así, una reducción mayor de 6 log presenta una inactivación mayor de 99.9999% de la carga bacteriana.

Como la cantidad de bacterias en sangre es baja en el momento de la donación, la IP es altamente eficaz contra la carga bacteriana observada en plaquetas y glóbulos rojos, los hemocomponentes que más preocupan. En primera instancia, las tecnologías necesitan ser suficientemente fuertes como para poder inactivar las elevadas cargas que aumentan debido al crecimiento durante el tiempo entre la colecta y el proceso. Dependiendo de qué tan rápido se desarrolle la bacteria, la cantidad puede ser significativa incluso después de un corto período de tiempo (unas horas) a temperatura ambiente. Segundo, una tecnología que es 100-10,000 veces más efectiva en la inactivación de patógenos puede proveer una mayor garantía de que no van a quedar bacterias luego de la IP, así como también que las bacterias restantes van a estar totalmente inactivadas y no van a estar sólo mutadas. Una inactivación incompleta puede provocar unidades contaminadas ya que las bacterias podrían proliferar en ellas, de la misma manera que podrían causar infecciones por virus incompletamente inactivados.

En lugares donde son obligatorias las pruebas NAT o la detección de antígenos virales, la IP debería estar en condiciones de hacer frente a cualquier nivel de virus residuales, pero la capacidad de inactivación puede ser excedida en el caso de infecciones emergentes si durante la infección temprana hay grandes niveles de viremia. La alta capacidad de inactivación provee protección contra tales posibilidades.

Existen múltiples estudios que recogen toda la información relacionada con la inactivación de bolsas de plasma y plaquetas con amotosaleno que fueron inoculadas con diferentes patógenos. Los niveles de reducción son muy altos para todos los patógenos estudiados, permitiendo garantizar la seguridad de los componentes sanguíneos.

En la tabla 7 se resumen los resultados obtenidos frente a multitud de virus, bacterias y parásitos con el empleo del agente fotoquímico, amotosaleno y luz UVA.²¹

Tabla 7. Inactivación de Patógenos y Leucocitos con Intercept™.

Microorganismos inactivados con INTERCEPT Blood System para Plasma	Reducción log ₁₀ (extensión de inactivación)
Virus encapsulados	
HIV-1 intracelular **	> 6.7
HIV-1 libre	> 6.8
VHB	> 4.5
VHC	> 4.5
CMV	> 5.9
PRV	> 5.1
HTLV-I (Virus linfotrópicos de células T)**	≥4.5
HTLV-II (Virus linfotrópicos de células T)**	>5.7
WNV (Virus del Nilo Occidental)	≥ 6.8
SARS-CoV (Coronavirus humano)	≥ 5.5
BVDV (Virus de la diarrea viral bovina, modelo virus VHC humano)	≥ 6.0
DHBV (Virus de la Hepatitis B del pato, modelo virus VHB humano)	4.4 – 4.5
Virus Chikungunya	≥ 7.6
Virus Influenza A H5N1 (Avian Influenza)	> 5.7
Dengue	> 5.0
Vaccinia	> 5.2
Virus no encapsulados	
<i>Escherichia coli</i>	> 6.4
<i>Serratia marcescens</i>	> 6.7
<i>Pseudomona</i>	
Bacterias Gram-Positivas	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>7.3
Espiroquetas	
<i>Treponema pallidum</i> (syphilis) **	> 5.9
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Enfermedad de Lyme)	> 10.6
Protozoos	
<i>Plasmodium falciparum</i> ** (malaria)	≥6.9
<i>Trypanosoma cruzi</i> (Enfermedad de Chagas)	>5.0
<i>Babesia microti</i> (babesiosis)	>5.3

“>” referido a inactivación por debajo del límite de detección del ensayo.

“≥” referido a inactivación igual o debajo del límite de detección del ensayo.

2. JUSTIFICACIÓN.

Debido al alto riesgo que existe de contagio por agentes patógenos presentes, emergentes y re emergentes por trasfusión de componentes sanguíneos, se deben tomar medidas innovadoras con un amplio espectro de inactivación de microorganismos, sin alterar las características funcionales de las células a transfundir, por ello se debe implementar el uso de nuevas tecnologías fotoquímicas de inactivación de patógenos, basado en la viabilidad plaquetaria. Actualmente en México no se aplican protocolos estrictos para la donación, la transfusión, la hemovigilancia y la evaluación del riesgo de contaminación al que se exponen los pacientes con demanda de componentes sanguíneos.

Es por todas estas razones anteriormente mencionadas, que los sistemas de inactivación de patógenos que demuestren capacidad para reducir significativamente los niveles de contaminación bacteriana constituyen, con toda probabilidad, la mejor estrategia para abordar este problema.

El personal de los bancos de sangre, servicios de transfusión, servicios clínicos y quirófanos, deberá manejar y dar destino final a las unidades de sangre y componentes sanguíneos de manera que minimice la exposición potencial a agentes infecciosos.

La presente investigación se enfoca en un estudio experimental en la que se medirán y analizarán datos obtenidos del conteo de plaquetas con expresión de un marcador de actividad (CD62P) por citometría de flujo con el objetivo de medir la viabilidad de los CP sometidos a IP con clorhidrato de amotosaleno y luz UVA.

3. OBJETIVOS.

General.

Verificar la integridad y viabilidad de los concentrados plaquetarios, después de haber sido inactivados de cualquier agente patógeno, utilizando la tecnología *IBSTM*.

Particulares:

- Implementar un protocolo para medir por citometría de flujo la viabilidad e integridad de las plaquetas en concentrados plaquetarios inactivados de patógenos por agentes químicos, con fines de control de calidad.
- Analizar el efecto de los psoralenos y luz UVA sobre los valores de la cuenta plaquetaria con expresión de CD62P (P-Selectina), así como la cantidad de linfocitos T (CD3) y Linfocitos B (CD19) presentes en los concentrados plaquetarios.

4. HIPÓTESIS.

Los CP sometidos a inactivación con psoraleno y luz UVA no sufrirán alteraciones en su integridad y por tanto serán viables para poder ser transfundidos.

Ho: Existe diferencia significativa en los valores de cuentas de plaquetas sometidas a inactivación.

H1: No existe diferencia significativa en los valores de cuentas de plaquetas sometidas a inactivación.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

La presente investigación se enfoca en un estudio prospectivo transversal descriptivo y experimental en la que se medirán y analizarán datos obtenidos del conteo por citometría de flujo de muestras de concentrados plaquetarios, obtenidas de donadores sanos del BS. Se realizará un muestreo inmediato de cada donación de concentrados plaquetarios tomando un piloto de 2 mL pre IP y otro piloto pos IP (16 horas posteriores al término del proceso), con lecturas por medio de citometría de flujo. Una vez procesados los concentrados plaquetarios serán liberados como componentes seguros para su finalidad donativa.

Recopilados los datos experimentales del conteo plaquetario con expresión de marcador de actividad plaquetaria respecto al total plaquetario, se realizará una prueba comparativa, no paramétrica, entre dos medidas (pre vs post) Wilcoxon y determinar si existe diferencia significativa en la expresión de marcador CD62P después de IP.

Los resultados obtenidos no tendrán ningún impacto sobre la salud, tratamiento u otro ámbito relacionado con el estado de salud de los donadores de CP.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las variables dependientes se analizaron con respecto a su distribución no normal, realizando una prueba no paramétrica, ordinal de dos medidas, aplicando la prueba estadística wilcoxon con un nivel de confianza del 95%, $p < 0.05$.

VARIABLES.

Variables dependientes.

NOMBRE	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	DEF. CONCEPTUAL	DEF. OPERACIONAL	UNIDAD DE MEDICIÓN
Cuenta Plaquetaria	Cuantitativa	Razón	Concentración de plaquetas del donador	Cantidad obtenida por equipo analizador de biometrías hemáticas Pentra 80 XL®	En mm ³
Viabilidad de plaquetas contenidas en los concentrados plaquetarios	Cuantitativa	Nominal	A través de un marcador fluorescente para glicoproteínas de la membrana P-selectina (CD 62P).	A través de un Citómetro de Flujo Facs Canto II BD®	Cel/μL
Viabilidad de Linfocitos T en los concentrados plaquetarios	Cuantitativa	Nominal	A través de un marcador fluorescente para glicoproteínas de la membrana (CD3).	A través de un Citómetro de Flujo Facs Canto II BD®	Cel/μL
Viabilidad de Linfocitos B en los concentrados plaquetarios	Cuantitativa	Nominal	A través de un marcador fluorescente para glicoproteínas de la membrana (CD19).	A través de un Citómetro de Flujo Facs Canto II BD®	Cel/μL
Luz UVA	Cuantitativa	Razón	Radiación administrada para inactivación.	A través de equipo Illuminator	Nm ó J/cm ²
Clorhidrato de amotosaleno	Cuantitativa	Razón	Reactivo dentro del equipo de procesamiento de	IP La concentración	

			plástico desechable con paso de fluidos integrado estéril y apirógeno, con 15 mL de solución de amotosaleno	nominal de amotosaleno en plasma es de 150 μ M	mL
Dispositivo de adsorción de compuestos (CAD)	Cuantitativa	Razón	Gránulos de adsorbente molido y un aglutinante de polietileno de peso molecular ultraalto	Filtro fijador de clohidrato de amotosaleno y sus productos de degradación, desechable.	NA

VARIABLES INDEPENDIENTES.

NOMBRE	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	DEF. CONCEPTUAL	DEF. OPERACIONAL
Edad	Cualitativa	Ordinal	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo hasta la fecha actual	Información obtenida del sistema de recopilación de datos del donador
Sexo	Cualitativa	Nominal	Características biológicas y fisiológicas que definen a hombres y mujeres	Información obtenida del sistema de recopilación de datos del donador
Grupo Sanguíneo	Cualitativa	Nominal	A través del proceso de aglutinación observar la presencia del antígeno y anticuerpo de grupo sanguíneo	Información obtenida del sistema de recopilación de datos del donador
Serología infecciosa	Cualitativa	Nominal	Comprobar o descartar la presencia de anticuerpos dirigidos contra virus o bacterias específicos (VIH, VHC , VHB, sífilis y Chagas)	Información obtenida del sistema de recopilación de datos del donador

Lugar de desarrollo de estudio.

- UMAE Banco Central de Sangre CMN sXXI, IMSS.

Descripción general del estudio.

La presente investigación se enfoca en un estudio prospectivo transversal descriptivo y experimental en la que se medirá y analizarán datos obtenidos del conteo por citometría de flujo de muestras de concentrados plaquetarios, obtenidas de donadores sanos del Banco Central de Sangre, con el fin de establecer parámetros de control de calidad para estos hemocomponentes.

Procesamiento de datos.

Se recopilarán y analizarán datos de una población de pacientes sanos, incluidos en el protocolo de “*Medición de la viabilidad de concentrados plaquetarios sometidos a inactivación de patógenos después de un tratamiento fotoquímico con clorhidrato de amotosaleno y luz UVA*” los donadores por norma deberán cumplir con la edad suficiente para donar, que en nuestro país es entre 18 y 65 años, y aquellas mujeres lactantes o que han estado embarazadas en los últimos 6 meses no deberán donar. Los candidatos llenarán una carta de consentimiento informado donde se necesitará de la autorización para poder consultar la información que se enlista a continuación, la cual se encuentra contenida en su expediente médico.

Información a consultar: Nombre, edad, sexo, grupo sanguíneo, cuenta plaquetaria, fecha de la donación y resultados de serología infecciosa.

Se informará que no existe algún posible riesgo, inconveniente o molestia durante su participación en este protocolo debido al carácter prospectivo del mismo. Los resultados obtenidos no tendrán ningún impacto sobre el tratamiento u otro ámbito relacionado con el estado de salud.

Todos los datos proporcionados relacionados con la privacidad serán tratados en forma estrictamente confidencial, y la identidad no será revelada en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio.

Las donaciones de plaquetas serán procesadas por aféresis de acuerdo a las normas establecidas, los concentrados plaquetarios serán sometidos a IP en plataforma *IBS™* con equipo *Illuminator*, procedimiento apegado a la ley general de salud con número de **registro sanitario 0673E2014 SSA**.

Obtención y tratamiento de las muestras.

Las donaciones de plaquetas se procesaron por aféresis de acuerdo a las normas establecidas, posteriormente los concentrados plaquetarios fueron sometidos a IP en plataforma *IBS™* con equipo *Illuminator*; se realizó un muestreo inmediato de cada donación de concentrados plaquetarios tomando un piloto de 2 mL pre inactivación de patógenos y otro piloto post inactivación (16 horas después de IP al término del proceso). La viabilidad plaquetaria de cada muestra fue evaluada poniendo en evidencia el marcador de expresión CD62P por medio de un marcaje con un anticuerpo anti-CD62P, así como lectura de linfocitos T y B, utilizando marcadores anti-CD3 y anti-CD19, respectivamente y posterior lectura por citometría de flujo. Una vez procesados los concentrados plaquetarios se liberaron como componentes seguros para su finalidad donativa.

La estructura y las propiedades de las plaquetas, así como su activación, se pueden analizar por medio de citometría de flujo, que es una herramienta versátil y confiable para el estudio de células, fenotipificación y funcionalidad. Por lo

general, antes del análisis, las células se marcan con anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos o con células permeables.

La amplia gama de anticuerpos marcados o celulares permeables, proteínas fluorescentes ahora disponibles comercialmente no permiten sólo el análisis de varios parámetros celulares, sino también el estudio detallado de fenotipo celular y función, interacción célula-célula, activación celular, apoptosis y ciclo celular, solo por nombrar algunos. La citometría de flujo permite el aislamiento y caracterización de las diferentes poblaciones, por ejemplo puede ser empleado factiblemente en análisis clínicos múltiples para analizar las características plaquetarias, tales como el estado de activación, la reactividad a los agonistas, estructurales y anomalías morfológicas, recambio plaquetario y recuento.

Las plaquetas al experimentar varios cambios en los antígenos de superficie o ligandos unidos y liberación de gránulos tras la activación, pueden detectarse mediante citometría de flujo reconociendo los marcadores de la activación plaquetaria. Las moléculas más utilizadas para este propósito son la forma activada de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb- Complejo IIIa, CD41 / CD61), selectina P (CD62p), CD63, CD40 ligando (CD154) y serotonina.²²

La P-selectina o CD62P es una medida de la glicoproteína expresada en la superficie celular de las plaquetas activadas. Una plaqueta activada es aquella que ha liberado el contenido de los gránulos a los medios circundantes y, como resultado, tiene marcadores de gránulos como la P-selectina presente en la membrana celular. La P-selectina se mide por citometría de flujo con anticuerpos específicos del sitio (Anti-CD62P). Los datos de P-selectina indican que las plaquetas están más activadas que los controles. Si el grado de esta activación pudiera estar directamente relacionado con la liberación irreversible de gránulos de plaquetas, se consideraría que las plaquetas tratadas serían menos capaces de proporcionar factores estimulantes del crecimiento tisular necesarios como la exposición a $\text{TGF}\beta$, RANTES, P-selectina y productos químicos de reclutamiento de plaquetas en sitios de lesión.

Durante la preparación (recolección de sangre, centrifugación, agrupación y / o filtración) y el posterior almacenamiento de los concentrados plaquetarios, las plaquetas se activan gradualmente, la llamada lesión de almacenamiento de la plaqueta. Esto se refleja en un aumento en la expresión de CD62P en la superficie de la membrana externa de las plaquetas, es decir son íntegras. Por lo tanto, la medición de la expresión del marcador CD62P en la superficie plaquetaria es una herramienta útil para monitorear el efecto de la IP con clorhidrato de amotosaleni y luz UVA en la función plaquetaria in vitro.²³

7. RESULTADOS.

En la Tabla 8 podemos observar los resultados para el marcador de actividad plaquetaria CD62-P.

Se encontró que de cada concentrado plaquetario donado, se presenta diferente porcentaje de actividad plaquetaria pre inactivación vs pos inactivación (ver tabla 8), es decir, no siempre se presenta un aumento de la expresión del marcador CD62P (p.e. CP No. 3), después de la IP. Es importante recordar que el muestreo de 2mL para el análisis pre y post inactivación, no es el mismo ya que se realiza lectura de la muestra pre inactivación mientras que la bolsa con CP están siendo inactivados, posteriormente se toma un nuevo muestreo de los CP inactivados de patógenos (pos inactivación).

Tabla 8. Valores de la expresión de CD62P tomados de un muestreo de CP sometidos a IP.

CP	CD62P Pre IP %	CD62P Pos IP %
1	15.5	15.8
2	17.0	17.2
3	13.6	11.3
4	25.8	31.3

Valores de los porcentajes de las poblaciones linfocitarias encontradas, respecto al total de células obtenidas en la lectura por citometría de flujo.

En la Tabla 9 se observa que para los CP obtenidos por aféresis y sometidos a IP, no contienen poblaciones de linfocitos T (CD3).

Tabla 9. Valores del marcador linfocitario CD3 tomados de la lectura de los CP anteriores de la Tabla 8.

CP	CD3 Pre IP %	CD3 Pos IP %
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0

En la Tabla 10 se observa la presencia de linfocitos B (CD19) en los CP obtenidos por aféresis, antes y después de IP. No existe patrón alguno de disminución de linfocitos después de la IP.

Tabla 10. Valores del marcador linfocitario CD19 tomados de la lectura de los CP anteriores de la Tabla 8.

CP	CD19 Pre IP %	CD19 Pos IP %
1	0.3	0.7
2	0.4	0.6
3	1.2	0.2
4	0.2	0.2

Escategramas o dot plot.

Información obtenida por la técnica de análisis de citometría de flujo donde cada punto representa una célula según sus medidas asociadas. Se asigna el mismo color a la misma población en todos los gráficos que a continuación se muestran.

Se utilizó un posicionamiento del mismo parámetro FCS: Forward Scatter (Tamaño celular) en ambos ejes con el objetivo de discriminar correctamente las poblaciones celulares, con ello se asigna el mismo color a la misma población (ver figura 4).

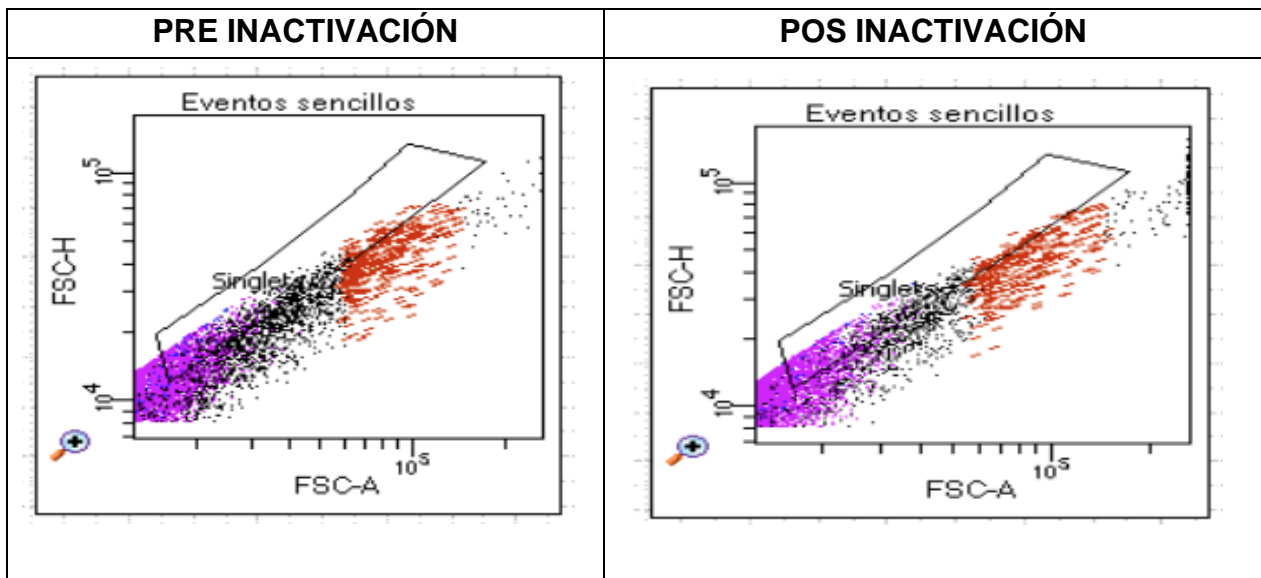


Figura 4. Eventos o células totales obtenidas por muestreo de los CP antes y después de la IP.

La Figura 5 nos permite identificar las poblaciones celulares en dos diferentes áreas delimitadas, sin embargo con estos datos no es posible separar específicamente a los linfocitos del área de leucocitos para poder comparar finalmente la cantidad de linfocitos y plaquetas, antes y después de la IP. El gráfico nos permite comparar FSC vs SSC (complejidad o granulosidad celular).

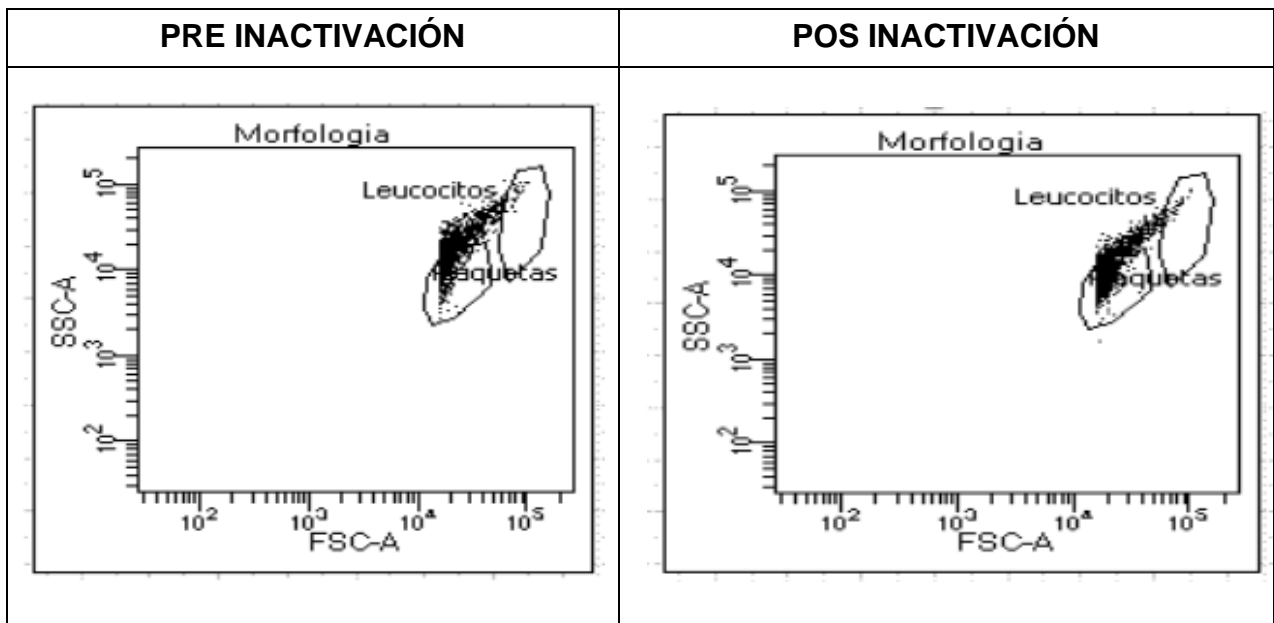


Figura 5. Eventos separados en dos poblaciones diferentes: Leucocitos y Plaquetas.

En la Figura 6 se comparan de las poblaciones celulares, aquellas plaquetas con expresión del marcador CD62P, notando una mayor expresión posterior a la IP, 17% pre IP vs 24.4 % pos IP del % total de eventos. Ver valores en la Figura 9.

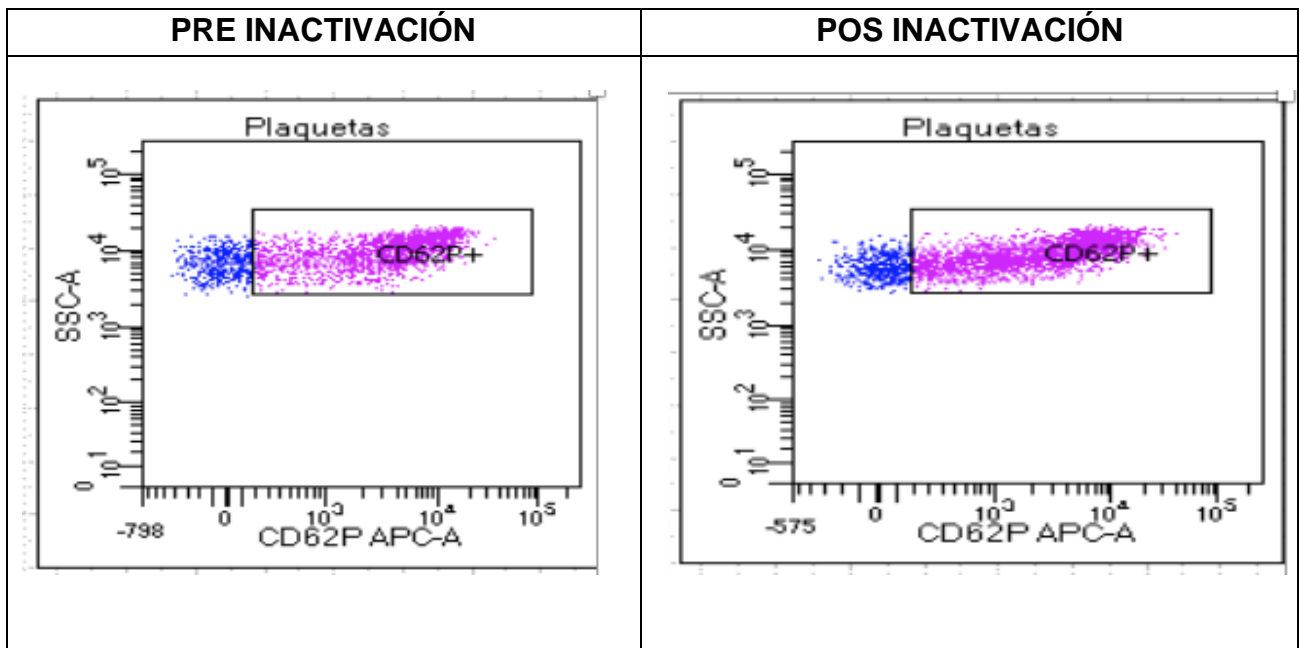


Figura 6. Población de plaquetas activadas marcadas con anti-CD62P.

Los valores de eventos de linfocitos T de la figura 7 pre IP son de 1 célula vs 0 células pos IP. Ver valores en la Figura 9.

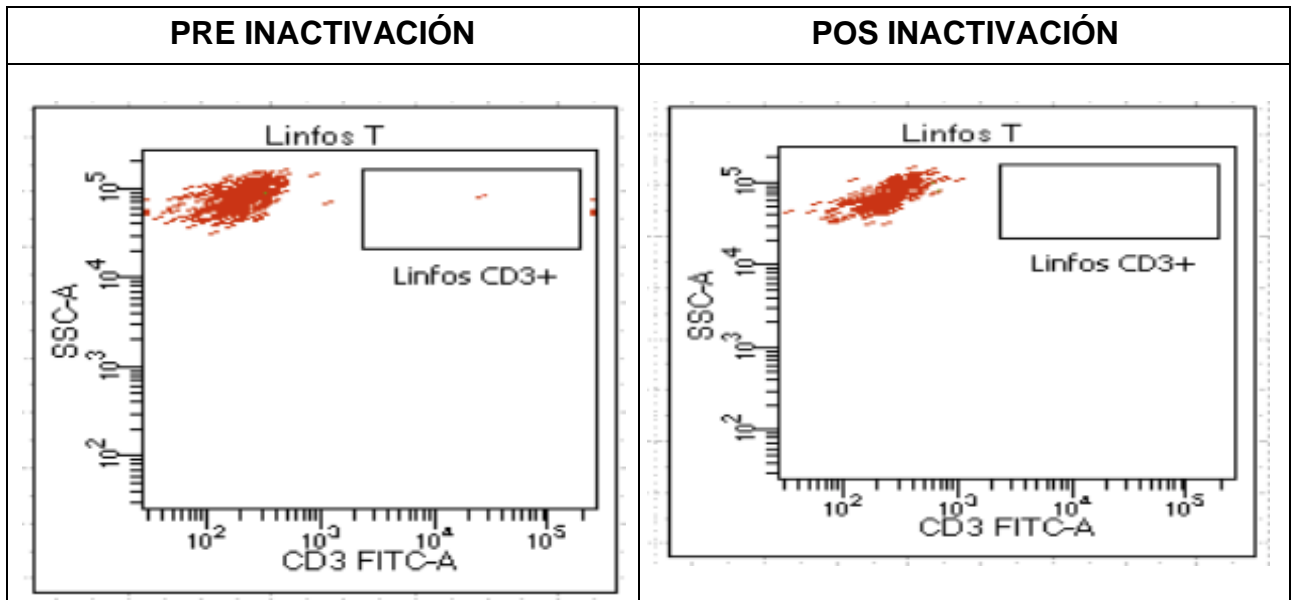


Figura 7. Población de linfocitos T antes y posterior a la IP.

Los valores de eventos de linfocitos B de la figura 8 pre IP son de 1 célula vs 2 células pos IP. Ver valores en la Figura 9.

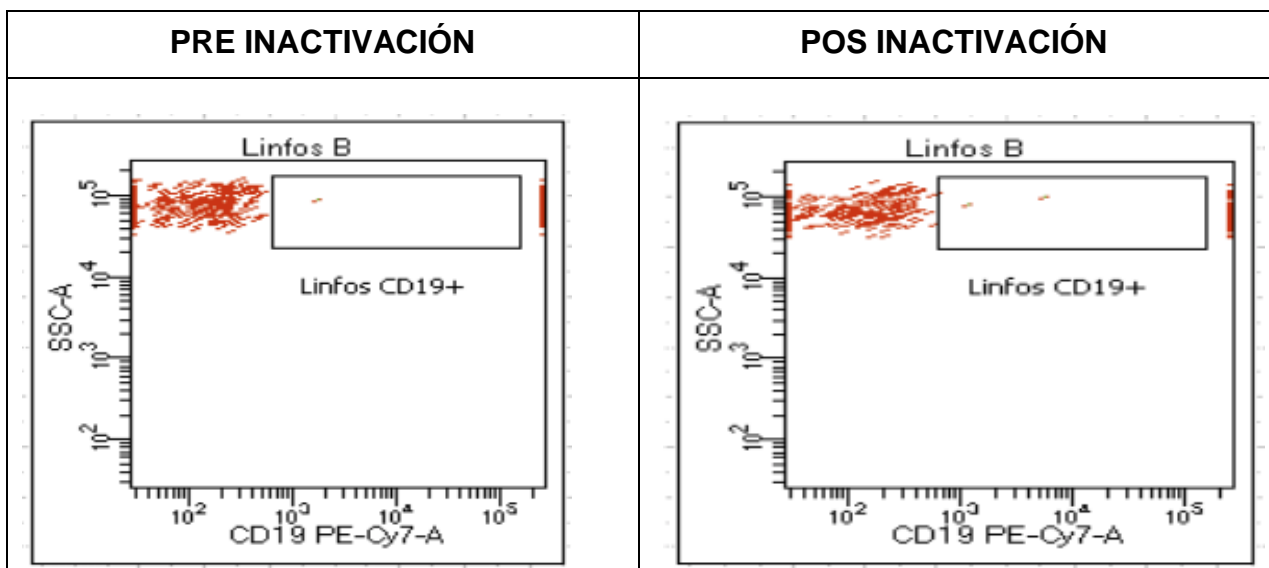


Figura 8. Población de linfocitos B antes y posterior a la IP.

En la Figura 9 se muestran los marcadores de las diferentes poblaciones detectadas por citometría de flujo así como sus respectivos valores en el muestreo de un CP antes y después de la IP.

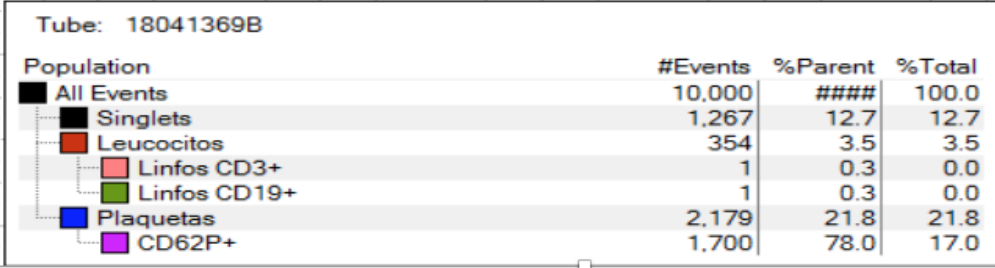
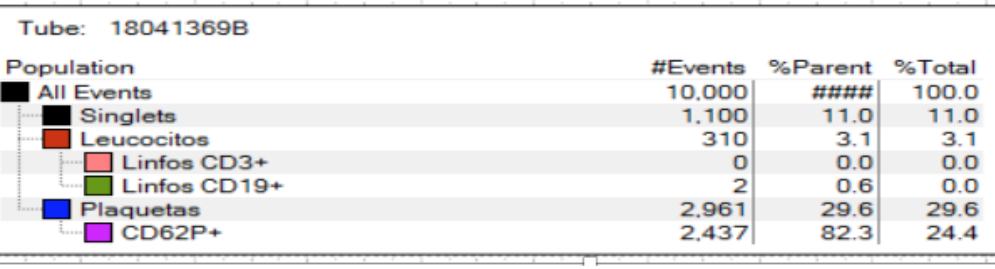
<p>PRE INACTIVACIÓN</p>	 <table border="1" data-bbox="500 611 1490 877"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>10,000</td> <td>####</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>Singlets</td> <td>1,267</td> <td>12.7</td> <td>12.7</td> </tr> <tr> <td>Leucocitos</td> <td>354</td> <td>3.5</td> <td>3.5</td> </tr> <tr> <td> Linfos CD3+</td> <td>1</td> <td>0.3</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td> Linfos CD19+</td> <td>1</td> <td>0.3</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>Plaquetas</td> <td>2,179</td> <td>21.8</td> <td>21.8</td> </tr> <tr> <td> CD62P+</td> <td>1,700</td> <td>78.0</td> <td>17.0</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	10,000	####	100.0	Singlets	1,267	12.7	12.7	Leucocitos	354	3.5	3.5	Linfos CD3+	1	0.3	0.0	Linfos CD19+	1	0.3	0.0	Plaquetas	2,179	21.8	21.8	CD62P+	1,700	78.0	17.0
Population	#Events	%Parent	%Total																														
All Events	10,000	####	100.0																														
Singlets	1,267	12.7	12.7																														
Leucocitos	354	3.5	3.5																														
Linfos CD3+	1	0.3	0.0																														
Linfos CD19+	1	0.3	0.0																														
Plaquetas	2,179	21.8	21.8																														
CD62P+	1,700	78.0	17.0																														
<p>POS INACTIVACIÓN</p>	 <table border="1" data-bbox="500 982 1490 1249"> <thead> <tr> <th>Population</th> <th>#Events</th> <th>%Parent</th> <th>%Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>All Events</td> <td>10,000</td> <td>####</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>Singlets</td> <td>1,100</td> <td>11.0</td> <td>11.0</td> </tr> <tr> <td>Leucocitos</td> <td>310</td> <td>3.1</td> <td>3.1</td> </tr> <tr> <td> Linfos CD3+</td> <td>0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td> Linfos CD19+</td> <td>2</td> <td>0.6</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>Plaquetas</td> <td>2,961</td> <td>29.6</td> <td>29.6</td> </tr> <tr> <td> CD62P+</td> <td>2,437</td> <td>82.3</td> <td>24.4</td> </tr> </tbody> </table>	Population	#Events	%Parent	%Total	All Events	10,000	####	100.0	Singlets	1,100	11.0	11.0	Leucocitos	310	3.1	3.1	Linfos CD3+	0	0.0	0.0	Linfos CD19+	2	0.6	0.0	Plaquetas	2,961	29.6	29.6	CD62P+	2,437	82.3	24.4
Population	#Events	%Parent	%Total																														
All Events	10,000	####	100.0																														
Singlets	1,100	11.0	11.0																														
Leucocitos	310	3.1	3.1																														
Linfos CD3+	0	0.0	0.0																														
Linfos CD19+	2	0.6	0.0																														
Plaquetas	2,961	29.6	29.6																														
CD62P+	2,437	82.3	24.4																														

Figura 9. Valores del número de eventos y porcentaje respecto al total de eventos obtenidos de las dos muestras (pre y pos), de donde se hacen referencia los resultados de las figuras anteriores.

Compilación de un muestreo de 15 CP con su respectivo análisis pre y pos IP.

En la Figura 10 se muestra cada binomio (pre y pos) de las 15 muestras de CP donde se observa que las plaquetas no están perdiendo su actividad después del proceso de inactivación. Sí bien existe una tendencia de mayor actividad plaquetaria, es decir, una mayor expresión del marcador CD62P pos IP, lo cual indicaría que no existe pérdida funcional de las plaquetas después de ser sometidas a un tratamiento fotoquímico con luz UVA.

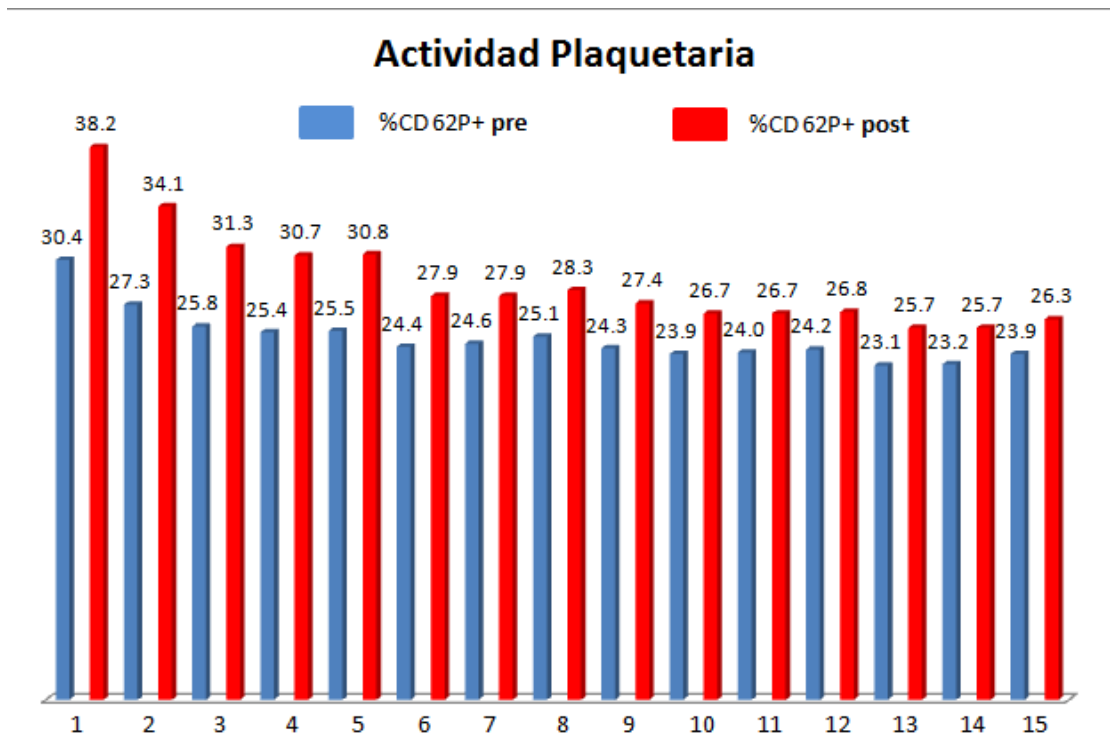


Figura 10. Representación de 15 CP y sus respectivos valores de actividad plaquetaria con marcador de expresión CD62P pre vs. Pos inactivación de patógenos con clorhidrato de amotosaleno y luz UVA.

Se realizó un promedio del porcentaje de las plaquetas activadas con expresión del marcador CD62P, pre y pos IP de los 106 CP, ver Tabla 11. Así como una prueba estadística comparativa no paramétrica Willcoxon con un nivel de confianza del 95%, $p < 0.05$.

Tabla 11. Promedio del por ciento de plaquetas con expresión de CD62P.

	Pre IP	Pos IP
Promedio (%)	18.9	20.6

Resumen de Resultados.

- Se estudiaron 106 CP independientes, en donde el porcentaje de plaquetas promedio pre inactivación con expresión del marcador CD62P, es decir, las plaquetas que están activadas y por lo tanto funcionales, fueron del 18.9%, mientras que el porcentaje promedio de plaquetas funcionales post inactivación son del 20.6%.
- Recopilados los datos experimentales del conteo plaquetario con expresión de marcador de actividad plaquetaria respecto al total, se realizó una prueba comparativa, no paramétrica, entre dos medidas (pre vs post) Wilcoxon y se determinó si existe diferencia significativa en la actividad plaquetaria después de IP.
- Los linfocitos T (CD3), linfocitos B (CD19) son escasos debido a la leucodepleción por aféresis, sin embargo hay linfocitos que llegan a detectarse en la lectura antes y después del tratamiento, sin presentar alguna tendencia de aumento o disminución en el conteo celular.

8. DISCUSIÓN.

El comité asesor en la transfusión de sangre del ministerio de salud alemán declaró en su opinión el papel en la inactivación de patógenos (S18, 85 a Reunión, 17 de abril de 2018) que los resultados in vitro son muy heterogéneos debido a diferentes **entornos de prueba / metodología, diferente calidad de plaquetas, diferencia en los donantes y las pruebas no estandarizadas**. También afirman que existe en general sólo un aumento significativo en la expresión de la P-Selectina post tratamiento después del día 5 de almacenamiento.

La activación plaquetaria dependerá de dos señales importantes:

- Las señales de activación: que se presentan cuando se produce daño vascular y disparan inmediatamente la adhesión y agregación de las plaquetas.
- Las señales regulatorias negativas: que también se ponen en marcha una vez que se inicia la activación y proporcionan el mecanismo de control, que limita la formación del tapón hemostático y aseguran el éxito del proceso fisiológico.

Sin mecanismos inhibidores, las plaquetas se activarían incluso en ausencia de señales de activación, por lo cual no existe una activación descontrolada en cascada de las plaquetas y no se ve un aumento significativo de la actividad plaquetaria.

La razón por la cual obtenemos expresión del marcador de expresión (CD62P) in vitro como consecuencia de la activación plaquetaria es que durante la separación de los componentes en la centrifugación o durante la agitación en el almacenamiento no sólo se activan las plaquetas, sino que también puede causar lisis y activación de proteasas, como la calpaína. La lisis plaquetaria conduce a la liberación y acumulación de la enzima lactato deshidrogenasa citosólica (LDH) y contenidos granulares (Mittal et al., 2015).

Además la lesión plaquetaria de almacenamiento el cuál se define como el conjunto de cambios deletéreos en la estructura y función de las plaquetas que se producen desde el momento en que se extrae la sangre del donante hasta el momento en que se transfunden las plaquetas al receptor tal como lo refiere Mittal K et al., 2015, es un factor a considerar en el conteo absoluto de las PLT.

El grado de alteración morfológica y funcional de las plaquetas influye en su eficacia hemostática in vitro. Estas alteraciones dependen de una serie de variables, como el método empleado para preparar los concentrados plaquetarios o buffy coat, tiempo de almacenamiento y temperatura, tipo de recipiente plástico y plastificante, la agitación continua de los concentrados, la aplicación de técnicas de inactivación de patógenos en los CP y la naturaleza del medio de suspensión (Ohto H et al., 2011).

Los valores de expresión de la P- Selectina promedio antes de la IP es de 18.9 %, en los primeros días posteriores a la inactivación, tal como lo sugiere (Helena C et al., 2005) en su estudio, en el cual indica que el valor medio de expresión antes del proceso de inactivación de *IBSTM* es de $22.7 \pm 6.4\%$.

Después de la inactivación en el estudio referente, nos indican un porcentaje de los valores de expresión de la P- Selectina de $31.6 \pm 5.7\%$ aumentando a $58.7 \pm 8.2\%$ al final del almacenamiento (día 7), en lo que respecta a nuestro estudio, tenemos una expresión de 20.6% posterior a la IP (día 1).

El recuento de plaquetas puede llegar a disminuir ligeramente durante el almacenamiento posiblemente debido a la formación de agregado plaquetario irreversible.

El sistema IBS se ha desarrollado durante casi 10 años y ha sido aplicado por varios investigadores para mejorar el margen de seguridad de la terapia plaquetaria.

Es de importancia vital que cualquier método de reducción de patógenos, dirigido específicamente como blanco al material genético (DNA o RNA), debe garantizar la preservación de la viabilidad de las células sanguíneas durante el almacenamiento. De particular interés son los cambios en el estado de activación de las plaquetas y la formación de células apoptóticas, que sigue siendo un área de interés actual, Helena C et al., 2005.

Hemos observado que después del tratamiento con IBS, las plaquetas se activan bajo diferentes factores, reflejado en un aumento de la expresión de CD62P (P-selectina), como se muestra gráficamente en la figura 10.

Los resultados son muy heterogéneos, desde ningún cambio significativo en la expresión de P-Selectina (CD62P) pos inactivación, hasta una pérdida de expresión o un aumento de la misma.

Estos resultados confirman que no solo se puede llegar a producir una pequeña pérdida de funcionalidad después del tratamiento fotoquímico con luz UVA, sino también durante el almacenamiento, sin embargo la funcionalidad plaquetaria en lo que refiere a la capacidad de las plaquetas para experimentar activación o expresar actividad procoagulante, se mantiene en buen estado.

La integridad funcional de las plaquetas se mantiene bien posterior al tratamiento de IP.

Actualmente, los concentrados de plaquetas tienen licencia para usarse hasta un máximo de 5 días de almacenamiento. Aumentar el almacenamiento a 7 días mejoraría la logística del suministro y podría reducir el desperdicio.

9. CONCLUSIONES.

La evaluación de la actividad plaquetaria en función de la expresión del marcador CD62P permite evaluar la viabilidad de los concentrados plaquetarios sometidos a inactivación de patógenos.

El proceso de inactivación de patógenos en plaquetas utilizando un tratamiento fotoquímico con clorhidrato de amotosaleno y luz UVA aplicado a concentrados plaquetarios, proporciona productos funcionales que cumplirán con su actividad para quienes necesiten éstos componentes sanguíneos seguros, sin riesgo de contaminación transfusional. Éste procedimiento podrá incluirse en el cuadro básico del Instituto como protocolo rutinario para el tratamiento de concentrados plaquetarios.

10.PERSPECTIVAS.

La morfología discoide plaquetaria se correlaciona bien con la viabilidad in vivo de las plaquetas y se sabe que los factores que afectan a la morfología discoide, como la disminución del pH por debajo de 6.4, la exposición al frío afectan la viabilidad plaquetaria. Esta alteración morfológica se puede estudiar directamente por microscopía, o valorarse por el cambio en el patrón de distribución del tamaño de las plaquetas, o la pérdida del efecto remolino o swirling, por lo que serían pruebas complementarias para el estudio.

Queda por determinar si la tecnología de unión al DNA que se utiliza en el *IBS™* dañará el DNA mitocondrial de las plaquetas y si conducirá a la formación de plaquetas apoptóticas / necróticas, las cuales ya no cumplirían con el objetivo de ser benéficas para el paciente receptor de los CP.

BIBLIOGRAFÍA.

1. OMS. Transfusión de sangre [en línea]. Director General de la OMS Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus. [ref. 26/06/2018 12:22] de Disponible en Web: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>
2. Secretaría de Salud. Programa de Acción Transfusión Sanguínea. Primera Edición, 2002 pp. 9-14 de Disponible en Web: http://www.salud.gob.mx/cnts/pdfs/transfusion_sanguinea.pdf [ref. 11/10/2018]
3. SEGOB. Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana. NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. [ref. 11/10/2018] de Disponible en Web: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5275587&fecha=26/10/2012
4. E.B.C. Martínez Álvarez Julio César, Dra. D´ Artote González Ana Luisa. Medicina Transfusional. AMMTAC. Graphimedic. S.A. de C.V. 2012. Pp.17-18.
5. Mohammad R. Abedi. Inactivación de patógenos en Plaquetas: concepto de dosis doble en el uso rutinario. Experiencias uso sistema intercept indd. Rev 22/10/18.
6. Sandra QG, Gac. Méd. Mex Vol. 140, Suplemento No.3, 2004. Contaminación Bacteriana de los componentes sanguíneos. Rev. 18/01/20.
7. Blajchman, M. A., & Goldman, M. (2001). Bacterial contamination of platelet concentrates: Incidence, significance, and prevention. Seminars in Hematology, 38, 20–26. doi:10.1016/s0037-1963(01)90120-9
8. Blood Transfusion 2012 (10). 23 Congreso Anual de la SETS
9. Manual de usos óptimos de componentes Sanguíneos. Informes, Estudios de Investigación 2011. Ministario de Sanidad, Política Social e Igualdad.

10. Yomtovian RA, Palavecino EL, Dysktra AH et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion* 2006; 46:719-30.
11. Alvarez do bm, Gonzalez DR, Hernandez JM. Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, and impact of nucleic acid testing. *Euro Surveill* 2005; 10:20-22.
12. Pillonel J, Laperche S. Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). *Euro Surveill* 2005; 10: 5-8.
13. ELSEVIER. *Medicina Universitaria. La Seguridad de la Transfusión Sanguínea en México.* Sergio Arturo Sánchez Guerrero. Instituto Nacional de Cancerología. de Disponible en Web: <http://www.elsevier.es/en-revista-medicina-universitaria-304-articulo-la-seguridad-transfusion-sanguinea-mexico-X1665579610504716> [ref. 11/10/2018]
14. Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga N, Keil SD. A laboratory comparison of pathogen reduction technology treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. *Transfusion* 2009;49:1205–16.
15. Antonio LF, y Carlos M. *Antiagregación plaquetaria Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición.* Unidad de Investigación Cardiovascular, Servicio de Cardiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España. Disponible en Web: [https://sci-hub.tw/10.1016/S1131-3587\(13\)70073-6](https://sci-hub.tw/10.1016/S1131-3587(13)70073-6) [ref. 18/01/2020]
16. Bermejo. E, Instituto de Investigaciones Hematológicas “Mariano R. Castex”. Academia Nacional de Medicina de Bs As, Dpto. de Hemostasia y Trombosis. Artículo de revisión. *HEMATOLOGÍA Volumen 21 No Extrarordinario: 10-18 Fisiología de la hemostasia normal Agosto 2017.* Disponible en Web: <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol%2021-extra.pdf> [ref. 8/01/2020]
17. E.B.C. Martínez Álvarez Julio César, Dra. D´ Artote González Ana Luisa. *Medicina Transfusional.* AMMTAC. Graphimedic. S.A. de C.V. 2012. Pp. 87,114,115, 341-343

18. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006;35:5–17.
19. Revista Argentina de Transfusión. Inactivación de patógenos en hemocomponentes: Revisión crítica. Christopher V Prowse. Vol. XLIII. Pág. 223-254
20. Stramer SL, Hollinger BF, Catz LM et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 2009; 49:1S-29S.
21. Sawyer L, Kodner C, Johnson R, Higgs S, et al. Inactivation of transfusion-transmitted vector borne pathogens. *Vox Sang* 2009; 96:133.
22. Cecilia Carubbi, Elena Masselli, *Cytofluorimetric Platelet Analysis*. Department of Biomedical, Biotechnological and Translational Sciences (S.Bi.Bi.T.), University of Parma, Ospedale Maggiore, Via Gramsci, 14, I-43100 Parma, Italy. published online December 31, 2013. DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1363472>. [ref. 14/01/19].
23. *Transfusion*. Curvers J1, de Wildt-Eggen J, Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort. Publicado por primera vez: 08 de julio de 2008. [ref. 07/11/18] de Disponible en web: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01738.x>
24. Mohr H, Steil L, Gravemann U, Thiele T, Hammer E, Greinacher A, et al. A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short-wave ultraviolet light. *Transfusion* 2009;49:2612–24.
25. The New England Journal of Medicine. George B. Schreiber, D.Sc., Michael P. Busch. Ph.D. “The Risk of Transfusion-Transmitted Viral Infections”. for the Retrovirus Epidemiology Donor Study [ref. 07/11/18] de Disponible en web: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199606273342601>

26. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006;35:5–17.
27. Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: An update. *Asian Journal of Transfusion Science*. 2015;9: 1-7.
28. Ohto H, Nolle KE. Overview on platelet preservation: Better controls over storage lesion. *Transfusion and Apheresis Science*. 2011;44: 321–325.
29. Helena, C., Carmen, A., Matilde, S.. (2005). The combined effect of platelet storage media and intercept pathogen reduction technology on platelet activation/ activability and cellular apoptosis/necrosis: Lisbon-RBS experience. Enero 25, 2019, de *Transfusion and aphaeresis science Sitio web*: <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/j.transci.2005.09.041>.

ANEXOS.

Técnica de inactivación con clorhidrato de amotosaleno y luz UVA

Materiales.

Kit de inactivación.

- EL Kit contiene bolsas de procesamiento de plástico desechable con paso de fluidos integrado estéril y apirógeno, un recipiente de plástico con 15 mL de solución de amotosaleno, un dispositivo de adsorción de compuestos (CAD) y un recipiente de almacenamiento de plástico, todos integrados secuencialmente.

El plasma fluye a través del recipiente de amotosaleno y al interior del recipiente de iluminación. Antes de la iluminación, la concentración nominal de amotosaleno en plasma es de 150 μ M. El iluminador INTERCEPT suministra la iluminación. Este dispositivo está diseñado para suministrar luz UVA de 3 julios/cm² durante 4-6 minutos.

El equipo de procesamiento de plasma INTERCEPT incluye un dispositivo de adsorción de compuestos (CAD) que reduce considerablemente el nivel de amotosaleno residual y los fotoproductos libres en el plasma antes del almacenamiento. El plasma iluminado fluye por acción de la gravedad a través del CAD y al interior de los recipientes de almacenamiento. El plasma se almacena de acuerdo con los requisitos para el plasma congelado hasta que se utiliza para la transfusión.

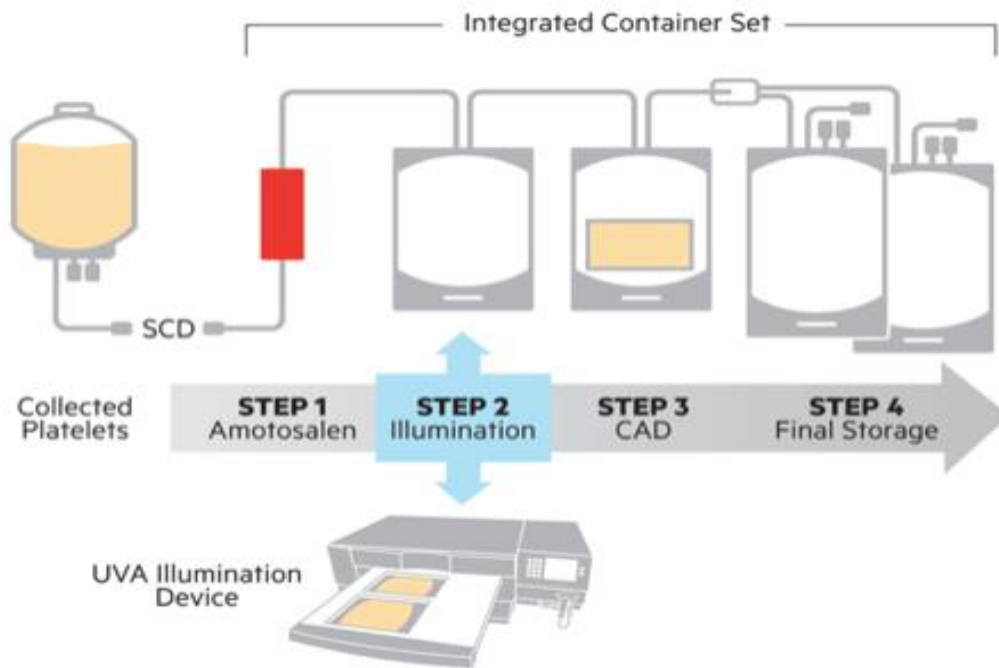


Figura1. Etapas de inactivación de plaquetas *IBS™*.

Procedimiento para lectura de plaquetas obtenidas de los CP.

Se utilizaron concentrados plaquetarios ($3.6 \times 10^{11} \text{PLT/ml}$) obtenidos por aféresis. Aquí ocurre la toma de muestra pre inactivación de los CP (se toman 2 mL), seguido de lectura por citometría de flujo.

Procedimiento de inactivación de patógenos.

Los CP se someten a inactivación con el reactivo (clorhidrato de amotosaleno), trasvasando el contenido plaquetario de la bolsa de aféresis a bolsa para inactivación del KIT, y se mezcla junto con el reactivo. Posteriormente se introduce la bolsa con la mezcla de PLT con reactivo de inactivación a equipo *Illuminator* y comienza el proceso de irradiación con luz UVA a los CP, tiempo estimado, 4-6 minutos. Una vez terminado el procedimiento de IP y cumplida la función del CAD, se toma una nueva muestra del recipiente de almacenamiento de los CP pos inactivación posterior a las 16 horas de IP y se realiza lectura en el citómetro de flujo.

Técnica de Citometría de flujo.

- Generalidades de la técnica citometría de flujo.

La citometría es una técnica que permite medir simultáneamente múltiples características físicas y químicas de células o partículas en suspensión que atraviesan un haz de luz (láser), y ofrece la posibilidad de separar las células (sorting) en función de sus características.

En el citómetro de flujo, las células alineadas pasan a través del haz enfocado de un láser, que activa el fluoróforo unido al anticuerpo (marcaje celular) a una longitud de onda de excitación específica y finalmente varios detectores procesan las propiedades de fluorescencia emitida y de fluorescencia de cada elemento. La intensidad de la luz emitida por los fluoróforos depende de la densidad del antígeno, las propiedades de dispersión de la luz frontal y lateral reflejan el tamaño y granularidad, respectivamente, que proporcionan información sobre la dimensión celular y la complejidad.

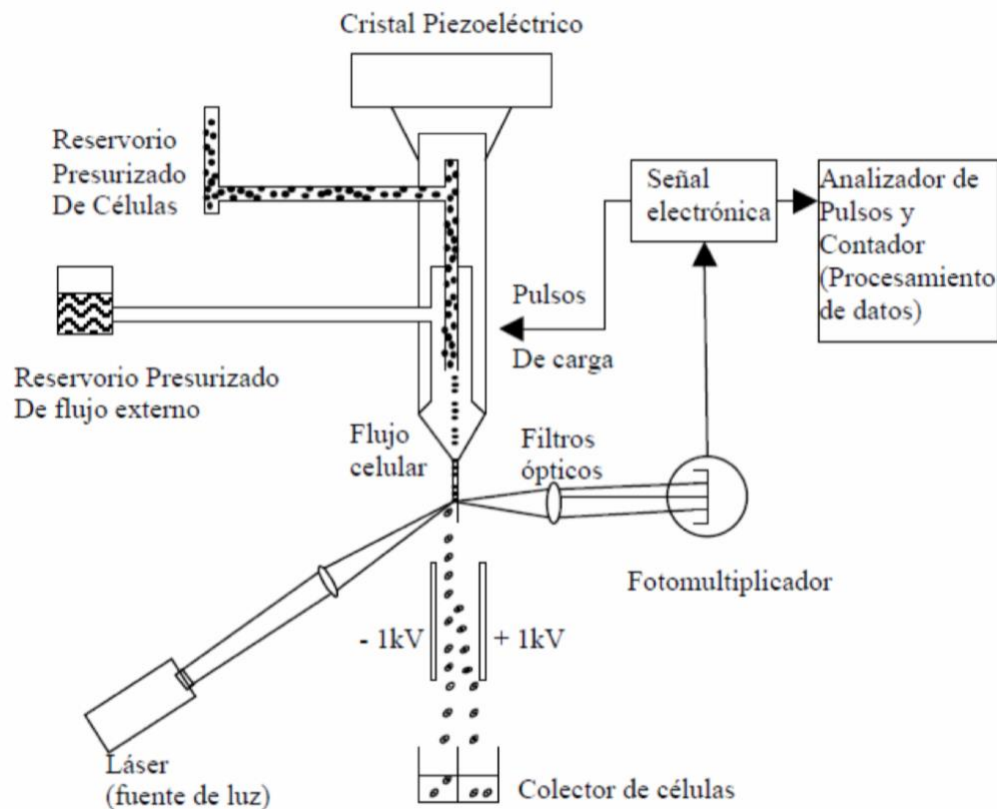


Figura 2. Esquema de un citómetro.

A medida que la célula pasa a través del rayo láser, la señal óptica va a generar un pulso, que tiene una altura (o pico), ancho y área. Cada pulso se inicia una vez que la célula se asoma delante del rayo luminoso. Después, si la velocidad es constante y la célula uniforme, el pulso desciende simétricamente hasta que desaparece la señal de esa célula.

- Cuando la partícula se encuentra en el centro del rayo láser se logra la máxima dispersión o fluorescencia, es el punto más alto del pulso.
- El pulso vuelve a la línea de base cuando la partícula abandona el rayo láser.

El área, altura y anchura de los pulso eléctricos son proporcionales a la cantidad total de luz, la intensidad máxima y a la duración de la señal luminosa, respectivamente. Ver Figura 3.

- Todos estos parámetros se relacionan con las características de la célula.

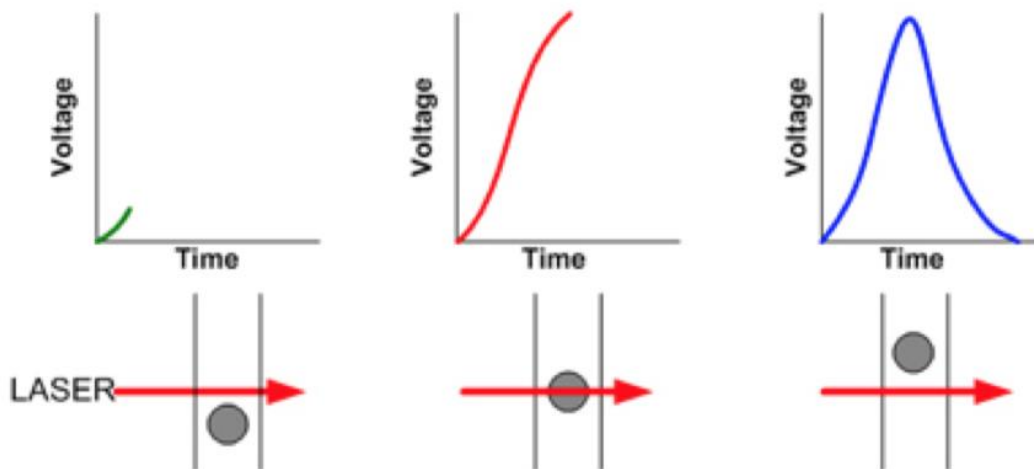


Figura 3. Formación del pulso o señal transmitida.

Después de guardar los datos en un archivo de datos se pueden representar en forma de:

- Histograma.
- Gráfico de Puntos (Dot Plot) o escatergrama.

Escatergrama o dot plot.

- Es un gráfico de puntos donde se enfrentan dos parámetros.
- Cada punto representa una célula según sus medidas asociadas. Puede relacionarse de esta forma cualquier pareja de parámetro. A medida que se van poniendo puntos aparece una población.

Cada evento con sus medidas está representado por un punto. A medida que se van poniendo puntos aparece una población. Ver figura 4.

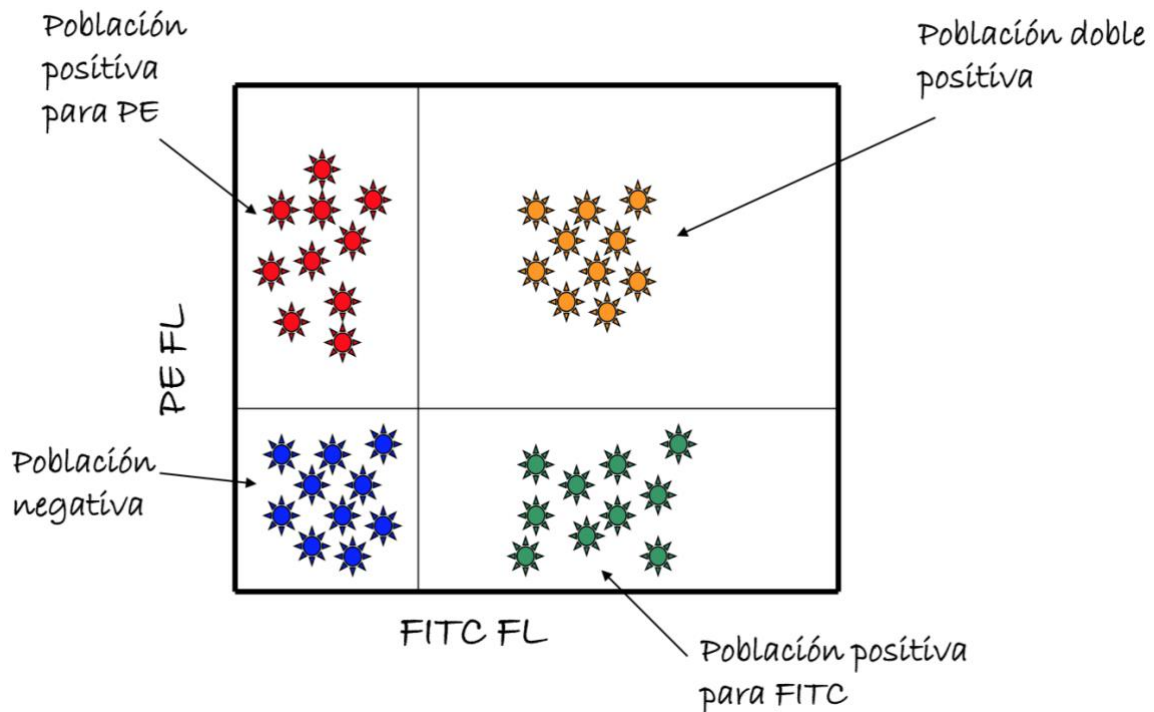


Figura 4. Histograma representando lectura de diferentes células separadas por dos diferentes marcadores PE y FITC.