



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Estandarización y obtención de valores de
referencia de una técnica de adhesividad
plaquetaria en placa**

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

ANDRÉS URIOSTEGUI GARCÍA

**ASESORA: M. EN C. BEATRIZ LUCÍA GONZÁLEZ
MALDONADO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización y obtención de valores de referencia de una técnica de adhesividad plaquetaria en placa.

Que presenta el pasante: Andrés Uriostegui García

Con número de cuenta: 310333485 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

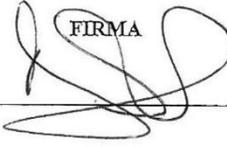
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. René Damián Santos	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Beatriz Lucia González Maldonado	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Luis Antonio Gordillo Reséndiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización y obtención de valores de referencia de una técnica de adhesividad plaquetaria en placa.

Que presenta el pasante: Andrés Uriostegui García
Con número de cuenta: 310333485 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. René Damián Santos	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Luis Antonio Gordillo Reséndiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización y obtención de valores de referencia de una técnica de adhesividad plaquetaria en placa.

Que presenta el pasante: Andrés Uriostegui García

Con número de cuenta: 310333485 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. René Damián Santos</u>	_____
VOCAL	<u>M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez</u>	_____
SECRETARIO	<u>M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Luis Antonio Gordillo Reséndiz</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización y obtención de valores de referencia de una técnica de adhesividad plaquetaria en placa.

Que presenta el pasante: Andrés Uriostegui García

Con número de cuenta: 310333485 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. René Damián Santos	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Luis Antonio Gordillo Reséndiz	

NOTA: los síndicales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización y obtención de valores de referencia de una técnica de adhesividad plaquetaria en placa.

Que presenta el pasante: Andrés Uriostegui García
Con número de cuenta: 310333485 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. René Damián Santos	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Beatriz Lucia González Maldonado	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Luis Antonio Gordillo Reséndiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

En primer lugar, quiero agradecer a mi *alma mater* por haberme brindado la oportunidad de desarrollarme académicamente en sus aulas, desde la etapa de bachillerato hasta poder haber concluido una licenciatura; por haberse convertido en mi segunda casa, donde conocí magníficos profesores que me compartieron sus conocimientos, ayudándome en mi crecimiento tanto profesional y persona.

A mis padres Sigifrido y Ma. Guadalupe.

Por su apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de la vida, por ser mi apoyo, regalarme sus experiencias, consejos y ser mi motivación en todo momento. Forman parte de mi desarrollo a nivel personal, ya que siempre me han orientado y ayudado en seguir adelante. De todo corazón mi más profundo y sincero agradecimiento, hoy y por el resto de mi vida.

A la M. en C. Beatriz Lucia González Maldonado.

Por permitirme realizar a su lado este proyecto, por compartirme parte de su tiempo y conocimientos, que sin duda me ayudaron a crecer tanto personal como académicamente. Su apoyo me permitió llegar a la culminación de este proyecto, también le agradezco su paciencia en todo momento y que no dejó de darme ánimos en cada etapa que conllevo su realización. Muchas gracias.

A mis profesores.

Es un pequeño reconocimiento a todos los profesores que aportaron en gran medida a mi formación académica, profesores que con sus enseñanzas engrandecieron mis conocimientos y que estaré eternamente agradecido, como lo es el Q.F.B. Rene Damián Santos, su alegría y entusiasmo son una constante inspiración para mí; el Q.F.B Luis Antonio Reséndiz Gordillo, le agradezco por haberme permitido saborear la experiencia de impartir clases a jóvenes y por esas charlas que tuvimos que recuerdo con mucho afecto. Y a todos mis demás profesores que llevó en el corazón, muchas gracias.

A mis amigos, que son mi familia.

A todas esas personas que forman parte de mi vida y que tengo el honor de llamar amigos muchas gracias; con su alegría palabras, muestras de cariño y momentos que compartimos juntos me ayudaron a crecer en cada instante y este proyecto también es gracias a ustedes. Ustedes más que amigos se convirtieron en miembros de mi familia, hermanas y hermanos: Sairt, Claudia, Rafael, Esther, Gaby, Jimena, Sharon, Vianey, Crhistian.

“La clave del éxito es dar lo que te piden y un poco más”

Lic. Francisco Martínez

Estandarización y obtención de valores de referencia de una técnica de Adhesividad plaquetaria en placa.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice de figuras	I
Índice de tablas.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
Resumen	V
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2. 1 Generalidades de la plaqueta.....	3
2.1.1 Origen y proliferación de los Megacariocitos	3
2.1.2 Formación y liberación de la plaqueta.....	5
2.1.3 Composición de la plaqueta y morfología.....	6
2. 2 Funciones plaquetarias	15
2.2.1 Adhesión plaquetaria	16
2.2.2 Activación plaquetaria.....	19
2.2.3 Agregación plaquetaria.....	22
2.2.4 Las fibrinólisis, el rol de las plaquetas.....	23
2. 3 Patologías asociadas con la función plaquetaria	25
2.4 Pruebas de laboratorio que evalúan la adhesividad plaquetaria	26
2.4.1 Técnica de Adhesividad de Salzman	27
2.4.2 Técnica de Adhesividad de Hellem	28
2.4.3 Técnica de Adhesividad de Breddin	28
2.4.4 Técnica de Adhesividad de Prost	30
2.5 Validación de métodos	31
2.5.1 Definiciones estadísticas	32
2.5.2 Parámetros estadísticos estudiados	33
2.6 Teoría de Valores de Referencia.....	35
2.7 La bioética en la investigación.....	37

2.8 Criterios de inclusión y exclusión.....	38
3. Objetivo General.....	40
3.1 Objetivos Particulares.....	40
4. Hipótesis.....	41
5. Metodología.....	42
5.1 Delimitación de la población de estudio.....	42
5.2 Características y obtención de la muestra biológica a utilizar.....	44
5.3 Procedimientos generales.....	44
5.4 Validación del método.....	50
6. Resultados.....	53
6.1 Estandarización de la técnica de adhesividad plaquetaria.....	53
6.2 Validación de la técnica estandarizada.....	59
6.3 Obtención de valores de referencia.....	61
Valores de referencia por Método Paramétrico.....	61
Valores de referencia por Método No Paramétrico.....	64
6.4 Metodología de adhesividad plaquetaria en una placa de vidrio.....	66
7. Análisis de resultados y discusión.....	68
8. Conclusiones.....	79
Referencias.....	80
Anexos.....	86

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Principales estímulos durante la Megacariopoyesis.	4
Figura 2. Precursores plaquetarios en sangre periférica.	6
Figura 3. Estructura de la plaqueta.	7
Figura 4. Gránulos plaquetarios.	10
Figura 5. Inclusiones tubulares.	12
Figura 6. Plaqueta discoidal.	13
Figura 7. Sistemas de membranas.	15
Figura 8. Iniciación de la activación plaquetaria.	21
Figura 9. Agonistas que participan en la activación plaquetaria y expresión de GPIIb/IIIa.	22
Figura 10. Principales agonistas plaquetarios.	23
Figura 11 Representación gráfica de la Campana de Gauss.	35
Figura 12. Recolección y separación de la muestra.	45
Figura 13. Llenar cámara de Neubauer con la muestra diluida.	46
Figura 14. Cuadrícula central.	46
Figura 15. Portaobjetos cubierto con PRP (dilución 1:2)	47
Figura 16. Plaquetas no adheridas observadas en Cámara de Neubauer 48	48
Figura 17. Microfotografías de plaquetas adheridas a una placa de vidrio.	58
Figura 18. Campana de Gauss de los porcentajes de adhesividad plaquetaria.	62

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Contenido de gránulos α	11
Tabla 2. Contenido de gránulos densos.....	11
Tabla 3. Contenido de Lisosomas plaquetarios	12
Tabla 4. Receptores y ligandos asociados a la adhesión plaquetaria.....	17
Tabla 5. Moléculas fibrinolíticas detectadas en plaquetas.	25
Tabla 6. Patologías relacionadas a la adhesión plaquetaria.....	25
Tabla 7. Patologías relacionadas a la activación plaquetaria.	26
Tabla 8. Patologías relacionadas a la agregación plaquetaria.	26
Tabla 9. Parámetros obtenidos en la estandarización del conteo plaquetario	53
Tabla 10.Comparación en el conteo inicial y porcentaje de adhesividad plaquetario.....	54
Tabla 11.Comparación de resultados usando diferentes colorantes plaquetarios.	56
Tabla 12. Porcentajes de adhesividad de plaquetaria con base al tiempo de contacto con una placa de vidrio	56
Tabla 13.Resumen de resultados óptimos obtenidos.....	58
Tabla 14. Parámetros estadísticos generales de repetibilidad.	59
Tabla 15.Prueba de reproducibilidad con sus respectivos resultados	60
Tabla 16.Parámetros estadísticos generales de reproducibilidad.....	60
Tabla 17.Valores estadísticos poblacionales.....	62
Tabla 18. Porcentajes de adhesividad plaquetaria ordenados de forma ascendente.....	64
Tabla 19.Comparación de los intervalos de referencia con respecto al método empleado.	77

Índice de gráficas

	Pág.
Gráfica 1. Regresión lineal de Anderson-Darling con sus respectivos datos estadísticos.....	63

Lista de abreviaturas.

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

BFU-Meg: Unidad formadora de brotes megacariocíticas

CD: Cúmulo de Diferenciación

CDc2: Ciclo de división celular 2

CFU-GEMM: Unidad formadora de colonias granulocíticas eritroides, monocitoides y megacariocíticas

CFU-Meg: Unidad formadora de colonias megacariocíticas

CLEC: Recetor tipo 2 de lectina tipo C

CONBIOÉTICA: Comisión Nacional de Bioética

CTH: Célula troncohematopoyética

CXCL: Quimiocina con ligando

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EMA: Entidad mexicana de acreditación

EvW: Enfermedad de von Willebrand

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

fL: Femtolitros

FPM: Factor promotor de la mitosis

FT: Factor tisular

FvW: Factor von Willebrand

GDP: Guanosín difosfato

GM-SCF: Factor estimulante de colonias Granulocíticas y monocitoides

GP: Glicoproteína

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

IL: Interleucina

min: Minuto

mL: Mililitro

MMP: Metaloproteasa

PDF: Productos de degradación del fibrinógeno y fibrina
PRP: Plasma rico en plaquetas
PSWA: Proteína de Swiskott-Aldrich
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PETVR: Panel de expertos en la teoría de valores de referencia
Poly-P: Polifosfatos
rpm: Revoluciones por minuto
s: Segundo (unidad de tiempo)
SBS: Síndrome de Bernard Soulier
SCA: Sistema canalicular abierto
SS: Secretaria de Salud
TAFI: Inhibidor de fibrinolisis activable por trombina
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TIMPs: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
TLT: Transcripción tipo TREM
t-PA: Activador tisular del plasminógeno
TPO: Trombopoyetina
TREM: Receptor desencadenante expresado en células mieloides
TSP: Trombospondina
UTP: Uridina trifosfato
VLA: Antígeno muy tardío (en inglés)
VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular
VPM: Volumen plaquetario medio

Resumen

Cuando las plaquetas fueron descritas por primera vez en 1882 se consideraron restos citoplasmáticos de megacariocitos; sin embargo, con el paso del tiempo este concepto fue cambiando, actualmente son consideradas como las principales células implicadas en el proceso de la hemostasia.

La hemostasia está conformada por un conjunto de mecanismos que buscan principalmente dos cosas: mantener la sangre en circulación y, en caso de que se presente un daño vascular, evitar la pérdida excesiva de sangre, es en este punto donde las plaquetas toman relevancia, pues se adhieren a la superficie endotelial dañada a través del reconocimiento de las fibras colágeno por el Factor de vonWillebrand y su posterior unión a la glicoproteína (GP) plaquetaria Ib/IX/V.

Una vez adheridas, las plaquetas presentan una serie de cambios morfológicos que les permite ampliar la superficie de contacto, además de procesos bioquímicos que provocan la liberación de sus gránulos y la expresión de otra GP IIb/IIIa, que será la encargada de reconocer las mallas de fibrina que se han empezado a formar en la zona, generando una unión más estable, lo que permite el reclutamiento o agregación de nuevas plaquetas.

Actualmente, la mayoría de las técnicas diseñadas para evaluar el proceso hemostático están enfocadas en la agregación plaquetaria o en los factores de coagulación, por ende, el proceso de adhesión ha sido relegado. En el presente trabajo se plantea diseñar una técnica nueva que sea confiable y a la vez sencilla de realizar en cualquier laboratorio (especialmente a nivel de enseñanza); y que cumpla con características tales como: precisión, reproducibilidad y robustez.

La técnica propuesta de Adhesividad Plaquetaria en placa se basa en la capacidad que tienen las plaquetas de adherirse a superficies cargadas negativamente como el vidrio; tomando en cuenta que se realiza un conteo inicial que nos brinda el número inicial de plaquetas; posteriormente se realiza la adhesión de las plaquetas a la placa para finalmente realizar un último conteo del cual se podrá extrapolar el porcentaje de plaquetas retenidas en la placa de vidrio.

Una vez estandarizada la técnica, se realizó en una población sana de 34 individuos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 (FESC-C1),

observándose que los valores de referencia fueron del: 27 a 51 % de Adhesividad, lo que permitirá comparar e interpretar los resultados de esta prueba.

Es preferible que la interpretación de los resultados de adhesividad se realice en conjunto con otras pruebas, dado que la hemostasia comprende una serie de procesos bioquímicos complejos e interconectados entre sí.

1. Introducción

Las plaquetas también son conocidas como trombocitos, dicha palabra proviene del griego antiguo y se compone de dos vocablos, *thrómvos* (grumo, coágulo) y el subfijo *-cito* (célula) (Han, 2016). Las plaquetas fueron descritas por primera vez en 1882, por Giulio Bizzozero, como restos citoplasmáticos de los megacariocitos; actualmente, son conocidas como células anucleares que juegan un papel sumamente importante en la hemostasia, además de participar en la regulación del proceso inflamatorio, remodelación tisular y, aunque aún no se ha descrito a detalle su interacción, han sido asociadas al control de infecciones tanto virales como bacterianas.

El proceso por el cual son generadas las plaquetas se lleva a cabo en la médula ósea, es conocido como megacariopoyesis o trombopoyesis, lo que implica desde la diferenciación de la célula troncohematopoyética hacia la línea megacariocítica culminando en la liberación de las plaquetas al torrente sanguíneo (Michelson, 2013).

Las plaquetas a pesar de ser células pequeñas anucleares son metabólicamente activas, ya que contienen una gran cantidad de receptores de superficie, moléculas de adhesión y numerosos gránulos, organelos funcionales como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y las mitocondrias, además de RNAm, lo que le permite generar sus propias proteínas (Flores, 2015). Sin embargo, la función principal de las plaquetas es adherirse rápidamente a los vasos sanguíneos dañados que exponen fibras de colágeno del subendotelio, permitiendo su activación y posterior agregación, para formar un trombo evitando así una pérdida excesiva de sangre (Becker, 2009).

Si las plaquetas no logran adherirse al vaso sanguíneo dañado no podrán desencadenar los procesos previamente mencionados, afectando claramente la hemostasia del individuo, por esta razón resulta de suma importancia evaluar su capacidad de adhesión. A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes

metodologías que buscan medirla: método *in vivo*, técnicas de Salzman, de Hellem, de Breddin, de Prost (López, 2015).

A pesar de que todas estas técnicas buscan determinar la adhesividad de las plaquetas se presentan diversas complicaciones al momento de su realización sobre todo a nivel de un laboratorio de docencia dado que no se cuenta con todos los sistemas, equipos o reactivos necesarios para su realización, por lo cual se ha visto necesario generar una técnica que permita evaluar de forma sencilla pero precisa la adhesividad de las plaquetas a una superficie de vidrio, para esto es necesario estandarizar la técnica de acuerdo con las condiciones de trabajo, de modo que se obtenga una metodología que tenga repetitividad, reproducibilidad y principalmente que resulte económica al no necesitar material especial, de tal forma que pueda ser llevada a cabo en cualquier momento (UNODC,2010).

En el presente trabajo se plantea una técnica de adhesividad plaquetaria en placa de vidrio (portaobjetos), para lo cual es necesario obtener plasma citratado rico en plaquetas, al cual debe definirse la cantidad de plaquetas, se somete a la placa de vidrio, para que se lleve a cabo la adhesión plaquetaria; posteriormente se vuelve a contar la cantidad de plaquetas libres, de modo que se pueda evidenciar el número de plaquetas que quedaron adheridas a la placa de vidrio.

Debido a que se trata de una técnica diferente es necesario contar con sus valores de referencia, para poder comparar e interpretar los diferentes resultados que puedan ser obtenidos durante la realización de esta técnica, tal y como lo indica la NOM 007-SSA3-2011, para lo cual se utilizará una población homogénea que estará formada por lo menos de 30 tanto hombres como mujeres que cumplirán las siguientes condiciones: serán alumnos de la FESC-1, de entre 21 a 25 años de edad y deberán contar con un ayuno de 6 a 12 horas previas a la recolección de la muestra.

Se plantea que esta técnica sea una opción dentro de la asignatura de Análisis Bioquímicos Clínicos de Sistemas, debido a la complejidad de las técnicas ya existentes, con el propósito de que el alumno pueda comprender más fácilmente el proceso de adhesión plaquetaria *in vitro* adecuadamente.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades de la plaqueta

Las plaquetas son las células más pequeñas que se encuentran en circulación sanguínea teniendo un diámetro de aproximadamente 2.0 a 5.0 μm , con un espesor de 0.5 μm , es decir, un volumen de 6 a 10 fL. La vida media de la plaqueta desde que sale a circulación hasta que es fagocitada por los macrófagos de los sinusoides esplénicos es de 7 a 10 días (Michelson, 2013).

2.1.1 Origen y proliferación de los Megacariocitos

Los megacariocitos, al igual que las demás células que se encuentran en circulación sanguínea, fueron generados a partir de una célula pluripotencial en médula ósea, estos progenitores hematopoyéticos expresan marcadores de superficie CD (cluster differentiation) CD34 y CD41; sin embargo, para que se logre la diferenciación hacia la formación de megacariocitos es necesario que se presenten una serie de estímulos que generarán la expresión de nuevos marcadores de superficie CD61 (integrina $\beta 3$ y GPIIIa) así como la elevación de los niveles de CD41 (integrinas αIIb , GPIIb), entre dichos estímulos están las interleucinas (IL) IL 3, IL-6, IL-1, IL-12 y el factor estimulante de colonias granulocíticas-megacariocíticas (GM-CSF) (ver figura 1, página 4) (Michelson, 2013).

Estas señales dan paso a la unidad formadora de colonias granulocíticas, eritroides, mieloides y megacariocíticas (CFU-GEMM), desde esta etapa hasta la formación de los megacariocitos estará mediada por diferentes factores de crecimiento y moléculas de señalización como las IL y las hormonas.

En general la maduración de los megacariocitos se divide en tres etapas que pueden ser identificadas en médula ósea, la primera es el promegacarioblasto, la siguiente etapa es el megacarioblasto que se caracteriza por su núcleo en forma de riñón con dos juegos de cromosomas, siendo una célula grande con un diámetro de 10 a 50 μm con un citoplasma sumamente azurófilo debido a la síntesis proteica que está siendo llevada a cabo, en esta etapa carece de gránulos. El

promegacariocito es una célula con un diámetro de 20 a 80 μm con citoplasma policromático y gránulos, constituyen del 5 al 20 % de la población megacariocítica de la médula ósea (Kellie, Joseph, 2017).

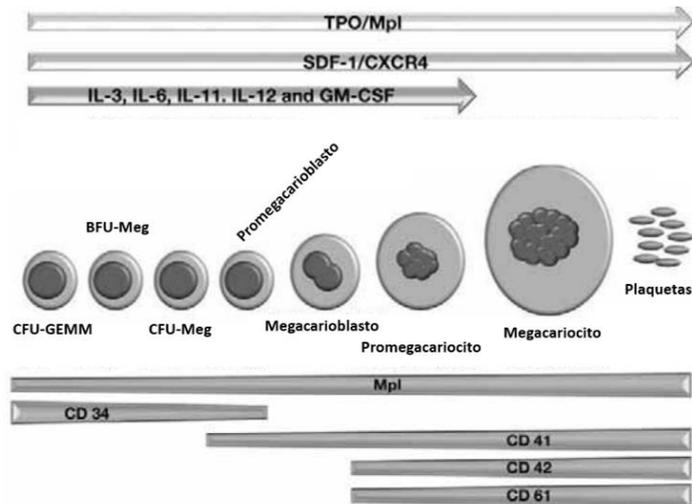


Figura 1. Principales estímulos durante la Megacariopoyesis. Todas las células sanguíneas parten de un antecesor en común que es la CTH, debido a diversos estímulos especialmente la presencia de TPO asociada a su receptor y del GM-SCF se lleva a cabo un proceso de diferenciación (maduración) que da paso a la CFU-GEMM, es de suma importancia que las señales de estímulo se mantengan para dar paso a BFU-Meg, CFU-Meg, en esta etapa el CD34 empieza a verse disminuido previo a la formación del promegacarioblasto, cuando por fin desaparece el CD34 se presenta el megacarioblasto, a su vez empieza a aumentar la concentración de CD41, 42 y 61, para dar paso al promegacariocito y megacariocito a partir del cual serán liberadas las plaquetas a circulación a través de los sinusoides medulares (González et al, 2010).

Posteriormente se da paso al megacariocito, que se caracteriza por realizar un proceso de endomitosis, es decir, que replica su material genético sin dividir su citoplasma lo cual genera una célula poliploide (4N, 8N, 16N, 32N y 64 N) lo que se busca es aumentar la síntesis de proteínas que serán necesarias para completar la maduración granular en paralelo con la amplificación celular (en la figura 1, es posible notar como el núcleo del megacariocito alcanza su máximo nivel en replicación del copias de material genético), este proceso de endomitosis no se ha detallado por completo pero se cree que se lleva a cabo por la disminución en la actividad del factor promotor de la mitosis (FPM) y por acción del complejo multiproteico compuesto por el CDc2 y ciclina B; sin embargo, aún no se ha logrado encontrar la función precisa de dicho complejo (Schulze, 2016).

Una vez que el proceso de endomitosis ha terminado, el megacariocito empieza la última etapa de maduración que culminará en el empaquetamiento y liberación de las plaquetas, durante esta etapa el citoplasma adquiere sus características ultraestructurales, es decir, la formación de un sistema tubular denso y la presencia de gránulos; también se llena rápidamente de proteínas específicas de plaquetas, formando un sistema de membranas, todo esto se va a subdividir y pasarán a formar plaquetas (González, 2007).

2.1.2 Formación y liberación de la plaqueta

Aunque ha sido completamente aceptado que las plaquetas son derivadas de los megacariocitos, el mecanismo por el cual son liberadas de sus precursores sigue siendo controversial, el modelo actualmente aceptado propone que la biogénesis plaquetaria ocurre por medio de la formación de dos intermediarios previos a la plaqueta, estos son las proplaquetas y preplaquetas (Michelson, 2013).

La proplaqueta se forma cuando el megacariocito maduro ramifica su citoplasma, formando pseudópodos conectados entre sí, gracias a la asociación de actina y tubulina, que tienen la capacidad de polimerizar en forma reversible para modificar la forma de su citoesqueleto. La formación de la proplaqueta depende de la funcionalidad de los microtúbulos, que se encargan de reorganizar el citoplasma del megacariocito a la par que los pseudópodos empiezan a alargarse (a una velocidad promedio de $0.85 \mu\text{m}/\text{minuto}$), cada extremo distal será una proplaqueta, en su interior contiene un anillo de microtúbulos que la delimita (Schulze, 2016).

Los pseudópodos siguen formando nuevas ramificaciones que a su vez se van a condensar en forma lamelar (forma unitaria delimitada por una membrana circular), eventualmente las proplaquetas se van a desprender del megacariocito dejando así una célula con núcleo residual.

La preplaqueta se describió por primera vez en el año de 2010, siendo un nuevo intermediario en la biogénesis plaquetaria, se caracteriza por tener un tamaño mayor que una plaqueta madura (hasta $10 \mu\text{m}$), puede presentar dos tipos de morfología, sea circular o en forma de mancuerna, que son interconvertibles entre sí. El proceso de formación de la preplaqueta aún no ha sido explicado en su

totalidad; sin embargo, se ha demostrado en condiciones *in vitro* que las preplaquetas tienen la capacidad de madurar y que su estado de interconvertibilidad es impulsado por un sistema de microtúbulos que se rigen por dos propiedades biofísicas: diámetro y espesor de la bobina de microtúbulos (Schwartz, 2010).

Se ha propuesto que debido a su tamaño las preplaquetas se quedan atoradas en los sinusoides (microcapilares) de la médula ósea, pulmón o bazo, y en estas zonas son expuestas a una fuerza de cizallamiento intravascular lo cual lleva a la separación o ruptura de las preplaquetas generando así las plaquetas.

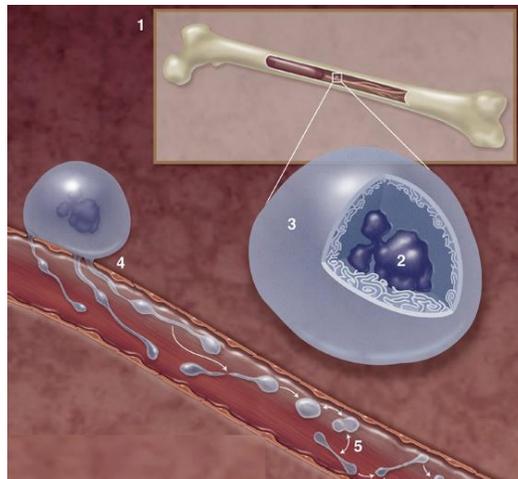


Figura 2. Precursores plaquetarios en sangre periférica. En la médula ósea se lleva a cabo la maduración del megacariocito (MC) (1), a su vez se genera la endomitosis (2) y maduración del citoplasma (3). A través de los sinusoides medulares el MC libera las proplaquetas (4), ya en circulación sanguínea las proplaquetas empiezan un proceso de interconversión a preplaquetas (5) hasta que por fin se liberan las plaquetas (Kellie, 2017).

2.1.3 Composición de la plaqueta y morfología

Para poder analizar la composición de la plaqueta es prudente que se divida en 4 partes:

a) *Zona periférica*

La membrana plasmática de la plaqueta es relativamente más simple comparada con la de un leucocito; sin embargo, cuando se observan en microscopía electrónica de barrido tanto de baja y alta tensión es posible notar una apariencia

rugosa o con ligeras circunvoluciones, las cuales se ha sugerido que proporcionan la membrana adicional cuando la plaqueta debe extenderse o cambiar su morfología en determinada superficie (Michelson, 2013). Para que esto se logre se ven implicados una serie de organelos que estarán regulando el correcto funcionamiento de la plaqueta, mismos que a continuación se mencionan:

- **Glucocálix:** Es una estructura dinámica que se encuentra en la superficie, su función es servir como el sitio de primer contacto y detectar los cambios en los compartimientos vasculares cuando existe alguna lesión en un vaso sanguíneo que requiera la respuesta hemostática. El glucocálix está cubierto en su mayor parte de receptores de glicoproteínas (GP) que serán necesarias para facilitar la adhesión de plaquetas a la superficie dañada, lo cual va a desencadenar en la activación total de las plaquetas promoviendo la agregación plaquetaria e interacción con otros elementos celulares para acelerar el proceso de retracción del coágulo. Los principales receptores implicados en el proceso de hemostasia son la glicoproteína GPIb-IX-V y la integrina α IIb β 3 (García, 2000).

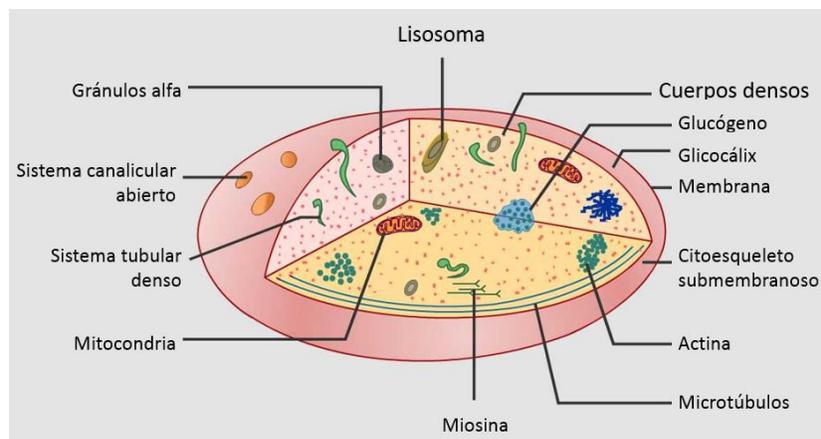


Figura 3. Estructura de la plaqueta. Principales organelos de la plaqueta (MeduHub, 2019)

El complejo GPIb-IX-V está acoplado al citoesqueleto submembranal por una proteína de unión de actina, mientras que el complejo GPIIb-IIIa se asocia a través de las colas citoplasmáticas de α IIb y β 3; ambos receptores tienen la característica de no ser fijos lo cual facilita mucho la etapa de adhesión donde reconocerá fibras colágeno o al factor de von Willebrand (FvW) (Bermejo, 2017).

- Unidad membranal: la bicapa lipídica de la membrana superficial y la cubierta del Sistema canalicular abierto (SCA) morfológicamente son similares; existe una diferencia significativa debido a que el papel de la unidad membranal es acelerar el proceso de coagulación, que suele iniciarse en el sitio vascular herido, ya que se expone el factor tisular (FT), desencadenando la activación de diversos factores hasta llegar a la formación de fibrina (Michelson, 2013).

Cabe mencionar que las plaquetas también contienen FT en su membrana, unido a “balsas lipídicas”, que son estructuras ricas en colesterol; sin embargo, cuando la plaqueta es activada por algún daño vascular las balsas lipídicas se asocian con el resto de la membrana (formando una membrana unitaria) lo cual deja disponible al FT para que pueda interactuar con otros factores coagulantes y amplificar así el proceso de coagulación (García, 2000).

- Área submembranal: Se encuentra situada justo debajo de la unidad membranal de la zona periférica, tiene la característica de poseer numerosos constituyentes proteicos que regulan los procesos de señalización y activación de las plaquetas, tales como el complejo GPIb-IX-V y las colas citoplasmáticas de GPIIb y IIIa, están asociados a calmodulina, miosina y filamentos cortos de actina, que forman la membrana contráctil del citoesqueleto. Dicho sistema contráctil está involucrado en la translocación de complejos de receptores incluyendo GPIb-IX-V y GPIIb-IIIa, relacionados con la adhesión y extensión del citoesqueleto submembranal en los sitios de lesión vascular (González, 2007).

b) Zona Sol-Gel o hialoplasma

Ubicada debajo de la zona periférica de las plaquetas, en estudios con microscopía de contraste de fase se reveló la presencia de organelos dentro de las plaquetas; sin embargo, la transparencia de la matriz impidió el reconocimiento de otros componentes estructurales. Debido a la plasticidad que tiene y a su capacidad de generar pseudópodos se cree que tiene una estructura de gel líquido (Michelson, 2013). Está compuesta por:

- Microtúbulos, formados por moléculas de tubulina, que son heterodímeros relacionados a dos polipéptidos globulares; la α y β tubulina y están

asociados con proteínas motoras. Los microtúbulos están situados de manera concéntrica para que la plaqueta mantenga su forma discoide y da resistencia a la deformación. Durante la activación plaquetaria se presenta un cambio de forma de la plaqueta, por lo cual los microtúbulos se deben fragmentar transitoriamente y se reensamblan en una posición más central, circundando los gránulos plaquetarios (Bermejo, 2017).

- Sistema contráctil de microfilamentos, cumple con funciones importantes en la fisiología de la plaqueta, una parte de estos están asociados con el interior de la membrana superficial y constituyen el citoesqueleto contráctil submembranal, otra gran porción de los filamentos se encuentra formando el citoesqueleto citoplasmático de filamentos de actina. Esto sirve como una matriz en la cual todos los organelos y otros componentes estructurales se encuentran suspendidos y separados entre sí. Cuando la plaqueta se activa tiene un papel sumamente importante ya que contrae los microtúbulos y acciona los gránulos α y densos, si la estimulación es suficientemente fuerte el contenido de los gránulos es excretado al exterior por los canales del SCA (García, 2006).

- Glucógeno, el citoplasma de la plaqueta es rico en este carbohidrato; está distribuido aleatoriamente en partículas diseminadas o aglomeradas, constituyendo la fuente energética de la plaqueta; se desconoce en gran parte el proceso por el cual estas partículas proporcionan energía, se ha sugerido que se asocian a membranas derivadas de retículo endoplásmico liso residual generado después de la pérdida de ribosomas, aunque se ha observado que los canales del sistema tubular denso originado del mismo lugar no presentan afinidad por el glucógeno (García y Coma 2000).

- Vesículas lisas y revestidas, en las plaquetas que se encuentran en circulación es difícil identificarlas debido a que son pequeñas y lisas, cabe señalar que estas vesículas debido a sus características morfológicas podrían llegar a confundirse con canales transversales del SCA; sin embargo, también se encuentran presentes unas vesículas, revestidas por la proteína clatrina, la cual hace que sea más fácil identificarlas, aunque se encuentran en menor cantidad (García y Coma, 2000).

c) Zona de organelos

La plaqueta contiene 3 tipos principales de organelos secretores incluyendo los gránulos α , cuerpos (gránulos) densos y lisosomas; sin embargo, pueden estar presentes cuerpos multivesiculares (CMV); otros organelos presentes en la membrana de la plaqueta son: glicosomas, cadenas y aglomerados de electrones densos e inclusiones tubulares (Schulze, 2016).

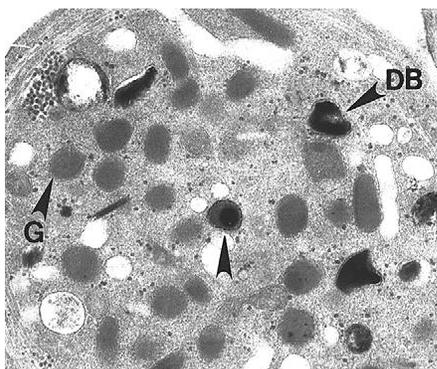


Figura 4. Gránulos plaquetarios. Se logran observar la diferencia morfológica que existe entre los gránulos α (\leftarrow G) y los cuerpos densos (\leftarrow DB), siendo muy notorio el cambio en las formas y en su opacidad. Aumento 25 000 (Michelson, 2013).

- Gránulos α : Son los organelos más numerosos de la plaqueta, la cantidad presente va a depender del tamaño de la plaqueta, así como del espacio existente, aproximadamente cada plaqueta contiene de 40 a 80 gránulos; sin embargo, en la etapa de proplaqueta puede llegar a tener hasta 100 (Figura 4, página 11). Estos tienen un tamaño de 200 a 500 nm de diámetro, su interior se encuentra dividido en diversas subestructuras como la zona submembranal, que contiene FvW, así como proteínas selectivas de plaquetas incluyendo el Factor V, trombospondina, P-selectinas y fibrinógeno (ver tabla 1) (Michelson, 2013).

- Cuerpos densos (GD, δ) son gránulos más pequeños que los α , no tienen una morfología bien definida, por plaqueta puede existir de 1 a 2 GD, son ricos en nucleótidos de adenina, guanina y uracilo, incluyendo ADP, ATP, además de aminas bioactivas (serotonina e histamina), pirofosfato, calcio y magnesio (ver figura 4, página 11); vistos a través del microscopio electrónico se observan como

estructuras opacadas, debido a que tienen una carga electrónica mayor a los gránulos α (ver tabla 2) (Bermejo, 2017).

Tabla 1. Contenido de gránulos α .

TIPO / FUNCIÓN	COMPONENTES
Proteínas de membrana	α IIb β 3, GPIIb α -IX-V, GPVI, TLT-1, P-selectina
Coagulantes	Factor V, Factor IX, Factor XIII
Proteínas de adhesión	Fibrinógeno, Factor von Willebrand, trombospondina.
Quimiocinas	CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL7, CXCL8, CXCL12, CCL2, CCL3, y CCL5.
Factores de crecimiento	EGF, HGF, factor de crecimiento similar a la insulina, TGF- β .
Factores angiogénicos e inhibidores	VEGF, FGF, PDGF, TIMPs, angiotensinas y endostatina.
Proteínas microbicidas	Timosina β -4, trombocidinas 1 y 2 (de NAP-2)
Mediadores inmunológicos	Precursor del complemento C3, precursor del complemento C4, globulina β 1H, factor D, factor H, Inhibidor de C1 e IgG.
Anticoagulantes, y proteínas fibrinolíticas	Antitrombina, Proteína S, inhibidor de la vía del factor tisular, plasminógeno, inhibidor del plasminógeno 1, macroglobulina α 2

CXCL: Quimiocina con ligando (número); GP: Glicoproteína; TLT: Transcripción tipo TREM; CCL: Quimiocina con ligando (motivo C-C); TGF- β : Factor de crecimiento transformante β ; NAP: Péptido activador de neutrófilos, VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular, FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, TIMPs: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, EGF: factor de crecimiento epidérmico, HGF: factor de crecimiento de hepatocitos (Michelson, 2013).

- Tabla 2. Contenido de gránulos densos.

TIPO	COMPONENTE
Cationes	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺
Fosfatos	Polifosfato, Pirofosfato
Aminas bioactivas	Serotonina, histamina
Nucleótidos	ADP, ATP, UTP, GTP

UTP: Uridina trifosfato; GTP: Guanosín difosfato (Michelson, 2013).

- Lisosomas, las plaquetas contienen aproximadamente de 0 a 2, pero no más de 3; aún no queda completamente clara la función de los lisosomas plaquetarios en el proceso de hemostasia, al grado que se ha generado la hipótesis que posiblemente son remanentes vestigiales en la plaqueta; sin embargo, se ha descubierto que contiene diversas proteínas para la degradación de otras proteínas, carbohidratos y lípidos (ver tabla 3) (Michelson, 2013).

Tabla 3. Contenido de Lisosomas plaquetarios

TIPO	COMPONENTE
Enzimas degradadoras de proteínas	Catepsinas, elastasa, collagenasas, carboxipeptidasa.
Enzimas degradadoras de carbohidratos	Glucosidasa, fucosinasa, galatosidasa, hexosaminidasa, manosidasa
Aminas bioactivas	Serotonina, histamina
Nucleótidos	ADP, ATP, UTP, GTP

(Zharikov, 2013)

- Inclusiones tubulares, han sido observadas en pacientes con síndrome de Bernard-Soulier (también conocido como “síndrome de la plaqueta gigante”), un trastorno de la hemostasia de origen genético, se presenta una disminución en la GP Ib/IX/V de las plaquetas, impidiendo su correcta adhesión al endotelio, además de presentarse plaquetas anormalmente grandes (Figura 5, página 13). Estas inclusiones tubulares suelen estar llenas de glucógeno (FMH, 2012).

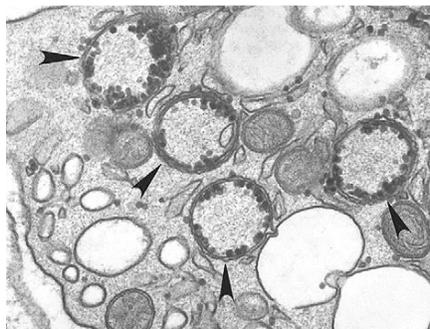


Figura 5. Inclusiones tubulares. Se logran diferenciar respecto al resto de los componentes del citoplasma gracias a partículas de glucógeno presentes en las inclusiones (←), aumento 33 000 (Michelson, 2013).

- Mitocondria plaquetaria, se encuentra en muy poca cantidad, además de ser una estructura simple, contribuye significativamente proporcionando energía a la célula. Las mitocondrias por sí solas tienen la capacidad de soportar los requerimientos energéticos de las plaquetas; durante las reacciones hemostáticas generan un cambio energético, volviéndose más densas en electrones; contienen calcio por lo que se vuelven excelentes activadores del proceso de la coagulación y de las plaquetas. Diversos estudios han mostrado que el sistema tubular de la plaqueta ayuda con el transporte de calcio, llegando a generar un flujo extracelular de calcio como segunda fuente (ver figuras 5 y 6) (Zharikov, 2013).

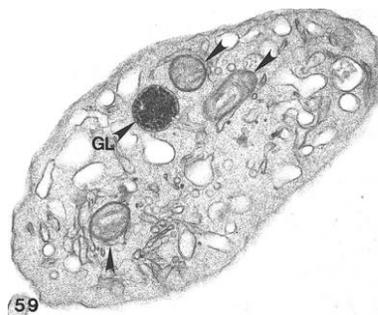


Figura 6. Plaqueta discoidal. Se logra observar la presencia de 3 mitocondrias (←) y un glicosoma (← GL). Aumento 30 000 (Michelson, 2013).

- Glicosomas. Este organelo tiene forma redonda u ovalada, similar a la de un gránulo α , se encuentra dentro la membrana, formando una sola unidad junto con otras partículas de glucógeno (ver figura 6).

d) Sistemas de membrana plaquetario

La estructura que destaca de dicho sistema es el aparato de Golgi que se encuentra normalmente confinado en el megacariocito; sin embargo, se pueden llegar a observar elementos residuales, por ende, resulta de suma importancia estudiar al sistema de membranas ya que se ve alterado durante desórdenes plaquetarios como el síndrome hipogranular plaquetario.

- Complejo de Golgi, Consiste en un conjunto de “sacos” aplanados y asociados paralelamente, cabe mencionar que son prominentes en el citoplasma perinuclear del megacariocito, cuando el proceso de desarrollo está completo el aparato del Golgi se dirige a la zona periférica del citoplasma del megacariocito donde normalmente desaparece antes del desarrollo de las proplaquetas, en menos del 1 % de los casos quedan elementos residuales en las plaquetas (Yadav et al., 2017).

Como ya se mencionó, solo en desórdenes plaquetarios es que se ve aumentada la presencia de complejos de Golgi en las plaquetas, especialmente en las trombocitopenias, ya que el organismo busca compensar la disminución de plaquetas, provocando una maduración acelerada de la estirpe plaquetaria lo cual implica mayor cantidad de proplaquetas, aunque la sensibilidad de agentes agregantes se ve disminuida y se presentan tiempos prolongados de sangrado (García y Jay, 2006).

- Sistema Canalicular abierto (SCA) conectado a la superficie, que son invaginaciones de superficie membranal, que están conectados a través del citoplasma, los estudios han mostrado que los canales de SCA se extienden por la superficie total expuesta a la circulación plasmática lo cual provee los medios y sustancias químicas a toda la plaqueta (ver figura 7).

El SCA es el principal sistema de transporte de sustancias o compuestos como fibrinógeno, gránulos α de la plaqueta al plasma y diversos productos de organelos secretores durante el proceso de liberación plaquetaria; también tiene un papel muy importante en el proceso hemostático, ya que, una vez que la plaqueta se activa como resultado de la interacción con una superficie endotelial dañada, el área de contacto de la plaqueta aumenta hasta un 420 %, siendo los canales de SCA la principal fuente de membrana para alcanzar dicho aumento (Selvadurai, 2018).

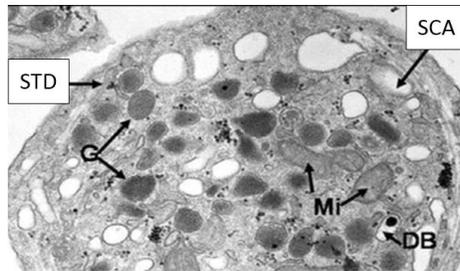


Figura 7. Sistemas de membranas. Se puede observar la diferencia entre los SCA y STD de la plaqueta (Michelson, 2013).

- Sistema tubular denso (STD), se distinguen del OCS debido a que sus estructuras se observan más opacas; sin embargo, tienen cierta similitud, ya que ambos están dispersos aleatoriamente en el citoplasma de la plaqueta. El STD se origina en el retículo endoplásmico del megacariocito, por lo tanto, en la etapa de plaqueta lo que quedan son solo fragmentos residuales del retículo endoplásmico, a pesar de las similitudes del SCA y del STD no se encuentran comunicados físicamente por ningún canal (ver figura 7) (Michelson, 2013).

- Retículo endoplásmico rugoso (RER), resulta interesante de estudiarlos en las plaquetas en circulación; han sido estudiados junto con los ribosomas, ya que desaparece cuando se ha completado el proceso de megacariopoyesis y antes que se hayan formado las plaquetas. Los complejos ribosomales se encuentran adyacentes al RER, aunque estas dos estructuras no se encuentran en condiciones normales; sin embargo, en pacientes con recambio rápido de plaquetas debido a trombocitopenia inmune se llegan a observar plaquetas con canales de RER (Michelson, 2013).

2. 2 Funciones plaquetarias

La plaqueta es una célula que en condiciones normales se mantiene en circulación sin interactuar con ninguna otra célula, previamente se ha señalado su papel en la hemostasia; existe una fuerte relación entre las plaquetas y los factores coagulantes que se estarán activando; a continuación, se mencionarán los procesos por los cuales atraviesa una plaqueta para llevar a cabo sus funciones.

2.2.1 Adhesión plaquetaria

La adhesividad es la capacidad de unirse establemente a diversas superficies, incluido el endotelio, sobre las cuales se expanden; *in vivo* (circulación) el endotelio vascular es una superficie tromboresistente que impide adhesión plaquetaria, debido a 3 mecanismos:

a) La producción endógena de óxido nítrico (NO), que es el principal regulador de la activación de las plaquetas, pues inhibe la exocitosis de gránulos α , densos y lisosomas plaquetarios, disminuyendo en el reclutamiento de plaquetas nuevas (Paramo, 2009).

b) La presencia de GMP cíclico (GMPc), que previene la activación plaquetaria mediante:

- El aumento indirecto de la concentración de AMPc por inhibición de la fosfodiesterasa 3, que genera sinergia con el GMPc en el proceso de inhibición plaquetario. El AMPc permite la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) además de impedir la liberación de los gránulos plaquetarios y transporte de calcio. La fosforilación de VASP está asociada a la inhibición GPIIb/IIIa (Flores, 2014).

- La inhibición de la fosfatidilinositol-3-cinasa, encargada de la activación de la GPIIb/IIIa.

- La fosforilación de receptor de TxA₂, inhibiendo su función.

c) Prostaciclina (PGI₂) además de su efecto vasodilatador tiene la capacidad de mantener a las plaquetas en su forma inactiva, esta molécula generalmente se encuentra en la pared vascular pero cuando es detectada por la plaqueta se produce la estimulación del adenilato ciclasa provocando el aumento de AMPc (López y Macaya, 2013).

Otras moléculas relacionadas con la adhesión plaquetaria se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Receptores y ligandos asociados a la adhesión plaquetaria.

RECEPTOR PLAQUETARIO	LIGANDO
GPIa/IIa	Colágeno, VLA-2; $\alpha 2\beta 1$, CD49b/CD29
integrina $\alpha 2\beta 1$	Diferentes tipos de colágenos fibrilares como I, II, III y V al igual que de los no fibrilares IV, VI, VII y VIII.
GP Ic*/IIa	De fibronectina; $\alpha 5\beta 1$, VLA-5; CD49e/CD29
GP Ic/IIa	Laminina $\alpha 6\beta 1$, VLA-6, CD49f/CD29
GP VI	Colágeno
GP IV	Colágeno, trombospondina y logra adherirse a eritrocitos infectados con <i>Plasmodium falciparum</i>

GP: Glicoproteína, VLA: Antígeno muy tardío, CD: Cumulo de diferenciación. (Michelson, 2013).

- Factor vonWillebrand (FvW), es una proteína multimerica, formada de aproximadamente 2050 residuos de aminoácidos (275 kDa) que se encuentra presente en el plasma y en la matriz subendotelial y es expresado en la superficie de las células endoteliales.

- Trombospondina (TSP), tiene la capacidad de iniciar el proceso de adhesividad plaquetaria utilizando como ligando la GPIb-IX-V, específicamente el sitio GPIb α .

- Colágeno, sus principales receptores en la plaqueta son: la GPVI y la integrina $\alpha 2\beta 1$, es importante mencionar que otro receptor principal para colágeno es la GPIb-IX-V, pero es de forma indirecta ya que su dominio A1 se une a GPIb y a su vez el dominio A3 se une a colágeno.

- P-selectina, fue de los primeros ligandos de GPIb-IX-V estudiados, reportado por primera vez en 1990; el complejo p-selectina-GPIb α provoca la activación de las células del endotelio o de más plaquetas, que expresarán a su vez p-selectina, de igual forma la activación de las células endoteliales lleva a que se incremente la interacción con las plaquetas siempre y cuando las células endoteliales igual contengan p-selectina (Schulze e Italiano, 2016).

- α M β 2 (Mac-1), es una integrina leucocitaria que fue identificada en el año 2000 como un contra receptor de la GPIb-IX-V, se propuso que su interacción tiene dos funciones, la primera mediar la adhesividad de las plaquetas y la segunda era controlar la migración de leucocitos a través de los trombos vasculares. También hay estudios que señalan que la interacción α M β 2/GPIb-IX-V ayuda a la formación de agregados de leucocito-plaqueta, aunque dichos mecanismos aún no han sido descritos en su totalidad (Ruggeri, y Mendolicchio, 2007).

- Fibrinógeno/Fibrina. El fibrinógeno es una proteína que está presente en la matriz extracelular, es una molécula que tiene la capacidad de empezar el proceso de adhesión plaquetaria gracias a la GP α IIb β 3 que se encuentra en las plaquetas no activas. En cambio, la fibrina es el producto final del proceso de la coagulación, un polímero insoluble que servirá para retener a las plaquetas que previamente se habían adherido, posiblemente se genera una sinergia con la unión de la GPIb-FvW. Las plaquetas son capaces de adherirse a estos dos compuestos (Michelson, 2013).

- Fibronectina. Hasta el momento se han identificado dos receptores: la GP α 5 β 1 y GP α IIb β 3, que requiere ser activado previamente; la posible función de la fibronectina en el proceso de la adhesividad no está muy clara, pero en experimentos con ratones se ha observado que tiene una acción como mediador de las interacciones de la adhesividad plaquetaria relacionada con la trombogénesis (García y Jay, 2006).

- Laminina, es una glicoproteína que puede ser encontrada en diferentes configuraciones, siendo la laminina 8 y 10 las que se encuentran expresadas en el subendotelio extracelular; se consideran sustratos para la adhesión plaquetaria, cuando la plaqueta se activa expresa laminina 11; sin embargo, es muy debatida su actividad e interacción, una de las teorías es que la laminina extracelular tiene una función similar a la del colágeno la cual es inmovilizar al FvW e indirectamente apoyar GPIb α mediante el anclaje de las plaquetas (García y Jay, 2006).

Es muy importante mencionar que durante todo el proceso de la coagulación hay una constante interacción entre las plaquetas y los factores de la coagulación. Cuando existe un daño en el tejido vascular se exponen una serie de moléculas principalmente fibras de colágeno de tipo I, III y VI, que se caracterizan por tener

cargas negativas al igual que las plaquetas, por lo que no se pueden unir directamente una con otra (Hoon Yun et al, 2016).

Para que se pueda llevar a cabo el proceso de adhesión plaquetaria es necesaria la participación de una molécula de enlace, el FvW, que posee los dominios A3 y A1 capaces de reconocer selectivamente a las fibras de colágeno que han sido expuestas en el endotelio dañado, también tiene la capacidad de reconocer a la trombospondina-1, por otro lado el FvW es reconocido por la plaqueta mediante la GP Ib/IX/V que se encuentra expresada en la superficie, la unión se realiza en los aminoácidos arginina-glicina-aspartato del FvW (Ruggeri. y Mendolicchio, 2007).

Conforme aumenta la interacción de la GPIb/IX/V con el FvW la plaqueta va disminuyendo su velocidad, es decir, se empieza a generar un efecto de rodamiento sobre el vaso sanguíneo dañado, permitiendo que otras GPIb/IX/V expresadas interactúen con más FvW, generando una unión más estable, inmovilizando a la plaqueta completamente. También es importante recordar que la plaqueta puede adherirse al endotelio por medio de otras moléculas como laminina, a través del reconocimiento por medio de la GPIc/IIa ($\alpha6\beta1$) (Martínez. 2006).

La GPIb también es receptor de la proteína Mac-1 que se encuentra localizada en la superficie de los leucocitos, esto resulta de suma importancia ya que permitirá reclutar y mediar la respuesta inflamatoria en la zona dañada. De igual forma la plaqueta cuenta con otros 2 receptores para fibras de colágeno, la GPVI y la integrina $\alpha2\beta1$. Cuando la adhesión es dada por la GPVI se genera a su vez la liberación de una serie de sustancias procoagulantes y proinflamatorias, así como la producción y liberación de fosfatidilserina que tiene la actividad de protrombinasa generando un aumento en la formación de trombina (López y Macaya, 2013).

2.2.2 Activación plaquetaria

Cuando la plaqueta logra detener su movimiento y adherirse al endotelio tendrá la capacidad de realizar plenamente una serie de procesos bioquímicos que llevarán a su plena activación; el primer estímulo lo realiza al entrar en contacto con el FvW, provocando un aumento de calcio citoplasmático, presente en el interior de

los gránulos densos, llevando a un aumento de proteínas de fosforilación (PLC β 2, ERK-1/2, Syk) y síntesis de tromboxano (TxA $_2$) (Flores et al, 2014).

Existen dos vías principales de activación plaquetaria, en la primera están implicadas las GP Ib-IX-V y la GP VI; en la segunda vía está implicado el receptor de lectina de tipo C2 (CLEC-2), todas estas son glicoproteínas de membrana.

La GP VI tiene una fuerte interacción con las fibras de colágeno y desencadena la liberación del contenido de los gránulos α y densos, ahora bien la activación sea por GP VI o por CLEC-2 se realiza través de receptores que posean un motivo activador basado en el inmuno-receptor de tirosina (ITAM), para que la plaqueta pueda realizar sus diferentes funciones dependerá de la señalización existente entre los ITAM y los receptores acoplados a proteína G (GPC-R), de hecho la mayoría de los agonistas solubles que se encuentran libres, como el ADP, TxA $_2$ y trombina activan a la plaqueta a través de GPC-R (Ruggeri y Mendolicchio, 2007).

Para este punto la concentración de ADP en circulación es alta debido a su liberación por las células endoteliales dañadas y por las plaquetas previamente activadas, a su vez el ADP actúa en la plaqueta específicamente en los receptores P2Y $_1$, P2Y $_12$ y en el GPC-R amplificando la señal de activación y aumentando la concentración de ADP (Flores et al, 2014).

El receptor P2Y $_12$ tiene como función mantener la plaqueta activa en respuesta al ADP y el TxA $_2$ tiene la capacidad de activar otras plaquetas amplificando el proceso de activación ya que se consideran como un factor agonista y facilita la formación de un tapón plaquetario en el endotelio dañado al ser un potente vasoconstrictor (ver figura 8, página 21) (Hoon et al, 2016).

Otra molécula de suma importancia para la activación plaquetaria es la trombina, ya que es el responsable de la conversión de fibrinógeno a fibrina, además es capaz de activar a la plaqueta por medio del receptor activador de proteasa 1 (PAR1) que requiere una baja concentración de trombina para iniciar la activación de la plaqueta. Todas las señales ya mencionadas tienen como fin que el mayor número de plaquetas estén adheridas en la zona dañada, exponiendo en el lado opuesto una gran cantidad de GPIIb/IIIa (Ruiz, 2006).

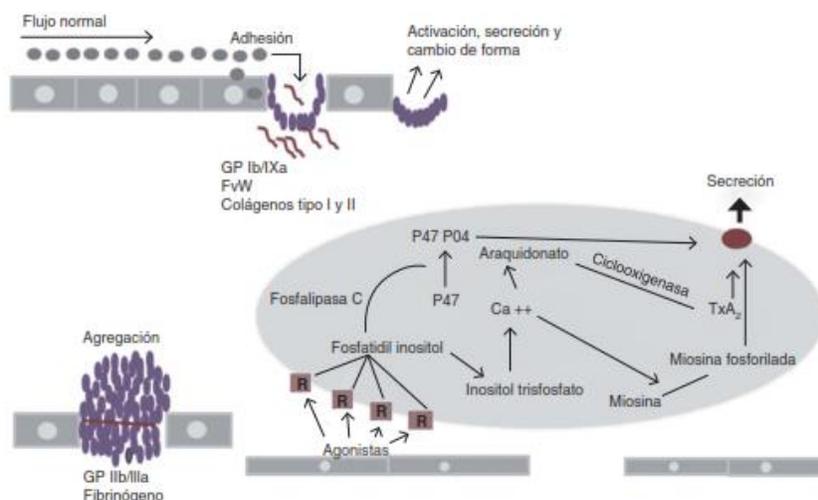


Figura 8. Iniciación de la activación plaquetaria. Se observa la interacción de la plaqueta con las fibras de colágeno lo cual genera una serie de reacciones bioquímicas que conllevan al aumento de Ca intracelular, producción y liberación de Tromboxano A2 (Flores et al, 2014).

Durante el proceso de activación plaquetario es normal que se presente un cambio en la morfología de la plaqueta, de ser una célula discoidal empieza a presentar prolongaciones en forma de pseudópodos con la finalidad de abarcar la mayor superficie posible.

Los cambios morfológicos se han asociado a la polimerización de la actina presente en el citoesqueleto y al aumento del calcio intracelular, dado que muchas proteínas y enzimas presentes en la plaqueta, como la gelsolina y las calpinas, son reguladas por su concentración, ambas moléculas tienen sitios específicos para reconocer filamentos de actina y adherirse a ellos, reorganizando la membrana plaquetaria (González y Moreno, 2007).

Es importante indicar que la plaqueta se mantendrá activa hasta que el endotelio dañado haya sido reparado en su totalidad. Después que se formó una monocapa plaquetaria sobre el endotelio dañado, es necesaria la formación del trombo para lo cual se requiere el reclutamiento de plaquetas previamente activadas, para llevar a cabo la agregación plaquetaria (ver figura 9, página 22).

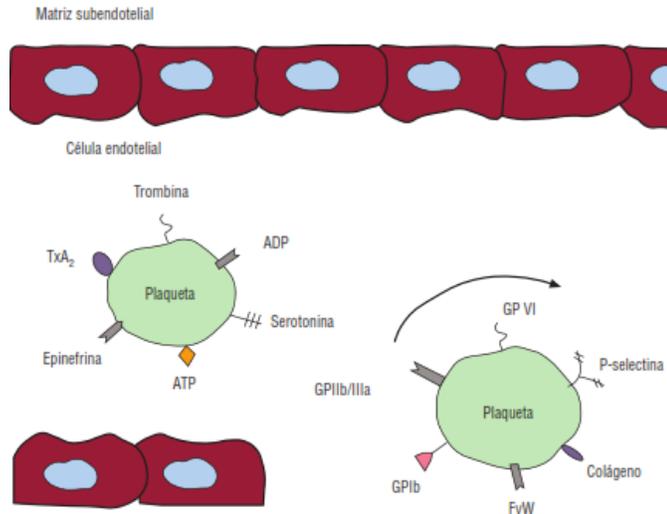


Figura 9. Agonistas que participan en la activación plaquetaria y expresión de GPIIb/IIIa. Es posible observar la interacción de diversas moléculas durante el proceso de activación plaquetaria lo cual lleva a la expresión de la GPIIb/IIIa (López, 2013).

2.2.3 Agregación plaquetaria

La agregación o reclutamiento plaquetario está mediado por la interacción plaqueta-malla de fibrina-plaqueta. La GP IIb/IIIa es el receptor más abundante en la plaqueta, aproximadamente entre 40 000 a 80 000 unidades en la superficie de cada plaqueta activada; es la encargada realizar la unión de la plaqueta a la malla de fibrina, también tiene la capacidad de adherirse a la fibrina en conjunto con ADP, fibrinógeno, FvW y fibronectina, aunque en estos dos últimos su unión es débil. Su gran capacidad de unión se debe a la polivalencia de dicha molécula.

Para que la GP IIb/IIIa se una a la fibrina y otras moléculas es necesaria la presencia de diferentes agonistas, es decir, moléculas que potencializan el efecto o acción; entre estos se encuentra: el ADP (liberado por los eritrocitos dañados en la zona de lesión y secretado por los gránulos densos plaquetarios), epinefrina (circulante), trombina (generada en la superficie de la plaqueta) y colágeno (presente en el subendotelio). Como ya se indicó durante el proceso de activación plaquetaria se presentará un aumento en la concentración de calcio estimulando así la actividad de la fosfolipasa A₂ conllevando a la liberación de ácido araquidónico que será convertido a un producto intermedio, la prostaglandina H₂ (PGH₂), por la

enzima ciclooxigenasa 1. La PGH₂ es metabolizada a tromboxano A₂ (TXA₂) por la tromboxano sintetasa, el TXA₂ es un potente activador plaquetario (ver figura 10).

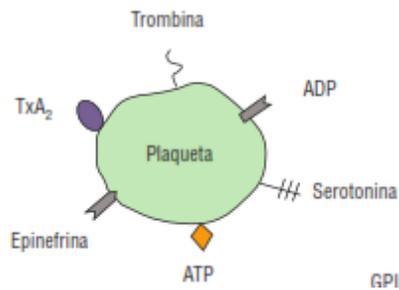


Figura 10. Principales agonistas plaquetarios. La mayoría de estos agonistas en condiciones normales no se tiene que encontrar ni en circulación ni expresados, ya que puede conllevar a una activación plaquetaria (López. y Macaya, 2013).

La unión de fibrina y fibrinógeno a las plaquetas requiere de la presencia de diferentes cationes como calcio y magnesio. En la interacción GP IIb/IIIa con la fibrina y fibrinógeno se verá involucrado el extremo carboxiterminal de la cadena y del fibrinógeno (γ -dodecapéptido) con la subunidad α de la GP IIb/IIIa; al igual la fibrina tiene un sitio de unión ($\alpha_v\beta_3$) que se une a las células endoteliales y a la GP IIb/IIIa lo cual se ha propuesto como un mecanismo para unir a las plaquetas con tejido endotelial generando así un tapón plaquetario más sólido y a su vez permite un proceso de curación más efectivo (Paramo et al, 2009).

2.2.4 Las fibrinolisis, el rol de las plaquetas

La fibrinolisis se define como el conjunto de eventos moleculares en serie que suceden *in vivo*, con el fin de degradar el trombo formado a partir de las adhesión y posterior agregación del coágulo. Durante todo este proceso interaccionan una gran cantidad de moléculas que ayudan a iniciar y controlar dicho proceso, una de estas es el plasminógeno que al ser activado dará paso a la plasmina, que es la principal enzima que se encargará de disolver o degradar el coágulo; se ha demostrado que el plasminógeno puede llegar a formar enlaces con las plaquetas y a su vez activarse por la acción de monocitos y micropartículas endoteliales, sin olvidar que el t-PA puede tener la función de mediar la activación del plasminógeno por un proceso autocatalítico (Whyte et al, 2017).

La fibrinólisis es potenciada a partir de una elevada concentración de fibrina, la cual formará un complejo estable con el t-PA, esta unión genera una mayor activación del plasminógeno, dando paso así a su forma activa de plasmina que a su vez podrá degradar la malla de fibrina, por otra parte el plasminógeno tiene la capacidad de unirse a diversas células endoteliales, lo cual tiene dos efectos, el primero es generar un aumento de plasminógeno de manera local y su respectiva activación y segundo, es proteger a la plasmina de su inhibición por la α -2antiplasmina. La degradación de fibrina da paso a la liberación de diversos fragmentos o productos de degradación del fibrinógeno y fibrina (PDF) y diversos fibrinopéptidos, de los cuales algunos son de relevancia clínica (Dímero D).

La fibrinólisis es sumamente dependiente de las plaquetas, una gran parte de moléculas tanto activadoras como reguladoras están inmersas en sus gránulos α , sustancias como fibrinógeno, plasminógeno, t-PA, α -2antiplasmina, inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI); en los gránulos densos se encuentran polifosfatos (poly-P).

Otro tipo de moléculas que son de suma importancia son las metaloproteasas (MMP), estas son endopeptidasas que se encuentran formando parte de la matriz extracelular, endotelio, músculo liso y monocitos y que tienen diversas funciones, por ejemplo, activar factores de crecimiento, son receptores de superficie y de moléculas de adhesión, a la fecha se han descrito 25 subfamilias (ver tabla 5, página 25) (Pereina, et al, 2016).

Aunque el papel de las MMP en la formación y posterior degradación del trombo no ha podido ser definido completamente, se ha demostrado que favorecen la infiltración monocitaria de la pared vascular, lo cual conlleva a una mayor infiltración macrofágica, lo que resulta de suma importancia pues se logra la eliminación de posibles restos celulares atrapados en el coágulo formado, también tienen la capacidad de degradar proteínas como colágenos, fibronectina, laminina de ahí que se ha demostrado que intervienen en gran medida en el remodelado vascular y por ende en la corrección de la matriz extracelular (Rodríguez, et al, 2007) (Moore et al, 2009).

Tabla 5. Moléculas fibrinolíticas detectadas en plaquetas.

Molécula	Concentración (ng/10 ⁹ plaquetas)	Localización primaria
Fibrinógeno	52500	Gránulos- α
Plasminógeno	No especificada	Gránulos- α
PAI-1	670	Gránulos- α
α_2 AP	62	Gránulos- α
TAFI	50	Gránulos- α
HRG	371	Gránulos- α
C1 inhibitor	620	Gránulos- α
PN-1	b	Gránulos- α
polyP	755	Gránulos densos
FXIII-A	60000	Citoplasma
tPA	No cuantificado	Membrana

(Whyte et al, 2017).

2. 3 Patologías asociadas con la función plaquetaria

Existen diversas patologías que afectan el correcto funcionamiento de las plaquetas, algunas son muy poco frecuentes por lo que no se estudian a profundidad; las principales patologías que alteran el proceso de adhesión plaquetario (ver tabla 6).

Tabla 6. Patologías relacionadas a la adhesión plaquetaria.

Trastorno	Conteo plaquetario ¹	Herencia	Defecto	Características morfológicas
SBS	20 – 100	AR	GPIb/IX/V	Plaquetas gigantes
Pseudo-EvW	Normal	AD	GPIb α	Tamaño heterogéneo
Receptor de colágeno $\alpha_2\beta_1$	Normal	N/A	α_2	Normales
Receptor de colágeno GPVI	Normal	N/A	GPVI	Normales

SBS: Síndrome de Bernard Soulier; Ewv: Enfermedad de von Willebrand; Gp: Glicoproteínas; AR: Autosómico recesiva; AD: Autosómico Dominante y N/A: No aplica ¹(x1000 plaquetas/mm³) (Sharathkumar, y Shapiro, 2008).

Las patologías relacionadas al proceso de activación plaquetario son raras, la mayoría están relacionadas con el déficit sea de gránulos densos o alfa, en algunos casos se asocia con un defecto en la megacariopoyesis (ver tabla 7).

Tabla 7. Patologías relacionadas a la activación plaquetaria.

Trastorno	Conteo plaquetario (x1000 plaquetas/mm ³)	Defecto
Síndrome de Scott	Normal	Transportador A1 dependiente de unión a ATP
Síndrome de la plaqueta gris	30 - 100	No se logran almacenar proteínas en gránulos α
Déficit de gránulos densos (asociado o no a albinismo)	Normal	Problemas con la formación y tránsito de vesículas

(Sharathkumar, y Shapiro, 2008).

Resulta complicado poder delimitar a ciencia cierta los trastornos que estarán afectando exclusivamente el proceso de agregación plaquetario, pues cualquier alteración previa conllevará a que se vea afectada; en la tabla 8 se muestran algunas de las principales patologías asociadas a este proceso.

Tabla 8. Patologías relacionadas a la agregación plaquetaria.

Trastorno	Conteo plaquetario (x1000 plaquetas/mm ³)	Defecto	Características morfológicas
Trombastenia de Glanzmann	Normal	GP IIb/IIIa	Normales
Síndrome de Wiskott-Aldrich	10 - 100	Defectos de señalización por la PSWA	Menor tamaño y cantidad de gránulos
Déficit de ciclooxigenasa	Normal o disminuido	Enzima ciclooxigenasa	Normales

PSWA: Proteína asociada al Síndrome de Wiskott-Aldrich (Sharathkumar, y Shapiro, 2008).

2.4 Pruebas de laboratorio que evalúan la adhesividad plaquetaria

Se han desarrollado diversas pruebas de laboratorio que se encargan de evaluar a las plaquetas tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, desde un punto de vista cuantitativo hasta los aspectos funcionales. En este caso solo se abordarán

las principales pruebas de laboratorio que se han desarrollado para evaluar la adhesión (Martínez, 2015).

2.4.1 Técnica de Adhesividad de Salzman

Es una técnica que evalúa la capacidad de las plaquetas a adherirse a una superficie de vidrio, en este caso perlas de vidrio, que están contenidas en una columna o tubo de polivinilo. Para llevarla a cabo es necesario:

a) Rellenar un tubo de polivinilo (3 mm de diámetro interior, 13.5 cm de longitud) con 1.5 g de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) colocando en cada extremo un filtro de Nylon que evite la fuga de las perlas.

b) Conectar una aguja a un extremo del tubo, en el otro extremo se colocará un tubo de plástico o vidrio (con una presión negativa de 550 mm de Hg) que contendrá anticoagulante EDTA disódico al 5 % (la dosificación es de 0.02 a 0.04 mL de anticoagulante por cada mL de sangre).

c) Puncionar al paciente con el sistema armado y esperar a que la sangre pase por todo el sistema por acción de la presión negativa del tubo, el tiempo aproximado de recolección es de 40 a 50 segundos para poder recolectar 7 mL.

d) A la par, obtener una nueva muestra sanguínea del paciente en un tubo con EDTA que no haya tenido contacto con el sistema mencionado en el paso "a".

e) Posterior a la recolección de ambas muestras se procederá a hacer un recuento de rutina de ambas muestras. Tomando como 100% la muestra del paso "d" y obteniendo el porcentaje de plaquetas que fueron retenidas por el sistema de perlas de vidrio.

f) Los valores normales de esta técnica se han reportado entre un 30 a 50 % de plaquetas retenidas en las perlas.

Esta técnica es útil para detectar una baja capacidad de adherencia en las plaquetas (hipoadhesividad); sin embargo, resulta difícil de estandarizar especialmente en un laboratorio de docencia, debido a las características especiales de los materiales a emplear, dadas sus medidas específicas del diámetro y largo del tubo de polivinilo a emplear, con un diámetro mayor o menor puede disminuir o aumentar la presión y velocidad de flujo de la muestra sanguínea a

través de él; otro aspecto importante es la medida de las perlas de vidrio, pues deben de ser de un mismo tamaño para no alterar la superficie de contacto de las plaquetas; por último, uno de los factores más difíciles de estandarizar es la presión negativa a emplear para la toma de muestra.

2.4.2 Técnica de Adhesividad de Hellem

Comparte el mismo fundamento que en la Técnica de Salzman; se siguen estos pasos:

a) Se obtienen 5.5 mL de sangre, utilizando una jeringa de plástico (muestra original).

b) 3.6 mL de la muestra recolectada se impulsa a través de un tubo de plástico (de 3 mm de diámetro interior de 13.5 cm de longitud), que contendrá en su interior 1.3 g de perlas de vidrio de 0.3 a 0.4 mm de diámetro, a una velocidad de 1 mL de muestra cada 9.2 segundos.

c) La muestra se recupera en un tubo de EDTA disódico al 5 % (la dosificación es de 0.02 a 0.04 mL de anticoagulante por cada mL de sangre)

d) Por otro lado, de la muestra original (muestra recolectada en jeringa en el inciso a) se vierten 0.9 mL en un tubo con solución de citrato de sodio 0.11 M

e) De la muestra del paso "c" se vierte 1 mL en un tubo con citrato de sodio 0.11 M

f) Se procede a realizar un recuento plaquetario de ambas muestras recolectadas y se obtiene el porcentaje de plaquetas adheridas al sistema de perlas de vidrio.

Para esta técnica se han reportado valores de referencia del 40 a 50 %; sin embargo, esta técnica es difícil de estandarizar, dado que hay que mantener una velocidad constante de vaciado de la muestra a través del sistema de perlas vidrio.

2.4.3 Técnica de Adhesividad de Breddin

Esta técnica fue publicada en 1968; se fundamenta en que las plaquetas, al entrar en contacto con una superficie de vidrio siliconada, se unen a esta por efecto de cargas negativas, el número de plaquetas adheridas es proporcional a su capacidad de adherencia.

Presentaba menos complicaciones que las metodologías propuestas de Hellem o Salzman; sin embargo, un problema que existe con la técnica de Breddin es el proceso de siliconado y lavado de la cámara de Neubauer, que no puede ser controlado por completo y altera la superficie original de la cámara; por otra parte, se debe de ser muy cuidadoso al momento de realizar los lavados, pues los movimientos muy bruscos pueden ocasionar que se desprendan las plaquetas (Ingelmo, 1978). La técnica es la siguiente:

a) Extraer 6 mL de sangre venosa y verter rápidamente (evitando hemolizar la muestra), en un tubo de plástico con citrato de sodio al 3.8 % (cuidando la relación de 9 partes de sangre por 1 de anticoagulante).

b) Obtener plasma rico en plaquetas (PRP) centrifugando la muestra a 1500 rpm durante 3 min, posteriormente transferir el PRP a un tubo de plástico limpio y realizar un conteo plaquetario (se recomienda que se realice por triplicado, tomando el promedio de estos como cuenta total).

c) Con el resto del plasma recuperado se procede a llenar la cámara de Neubauer (la cual ha sido previamente siliconada), y se deja en reposo durante 10 min (de preferencia en cámara húmeda, para evitar la evaporación).

d) Posteriormente se retira el cubreobjetos de la cámara y se lava 10 veces con una solución de lavado (conformada de 9 partes de solución isotónica y 1 de citrato de sodio 3.8 %)

e) La cámara se coloca en una cubeta de fijación y se fija 5 min con formaldehído al 40 % para finalmente lavar con agua destilada.

f) Por último, se procede a contar las plaquetas que lograron permanecer adheridas a la cámara, se recomienda que el conteo sea realizado en la cuadrícula central, aunque se deben tomar la cantidad de cuadrantes contados al momento de obtener el número de plaquetas adheridas (los conteos son reportados en plaquetas por mm²), calcular el índice de adhesividad con la siguiente formula:

$$I.A = \frac{\# \text{ de plaquetas adheridas por } mm^2 \times 100}{\# \text{ plaquetas en el PRP}}$$

Los valores de referencia que se han reportado para esta técnica son 0.7 a 1.4. Un inconveniente con esta metodología es su índice de adhesividad, ya que es un valor muy pequeño y sus intervalos son muy cercanos, al ser una técnica manual el margen de error aumenta, por lo cual los resultados podrían salir fácilmente de la normalidad establecida.

2.4.4 Técnica de Adhesividad de Prost

Esta técnica sigue manejando como fundamento la adhesión de plaquetas a superficies de vidrio (perlas de 2 mm de diámetro); sin embargo, la variante es que desde el inicio se utiliza plasma con citrato de sodio. La metodología es:

a) En una estufa a 37 °C se introduce una columna de vidrio con un volumen fijo de perlas de vidrio de 2 mm.

b) La muestra será recolectada en tubos con citratos de sodio al 3.8 % para obtener plasma rico en plaquetas (PRP) sea por centrifugación o dejando sedimentar la muestra en posición vertical de 2 a 4 h.

c) Realizar un conteo total o inicial de plaquetas en cámara de Neubauer.

d) Recolectar 2.5 mL del plasma obtenido en el paso “b” y hacerlos pasar a través del sistema previamente calentado del paso “a” (debe de permanecer en contacto con las perlas de vidrio 30 segundos (s) exactos) se recomienda tapan un extremo para evitar la fuga en el sistema.

e) Después de los 30 s recuperar el plasma en un tubo limpio de plástico y repetir el paso anterior (d) en 8 ocasiones más (dando un total de 9 pases) a través de un sistema “nuevo” o limpio.

f) Realizar conteos plaquetarios en el 4° y 9° pase, para obtener el porcentaje de plaquetas adheridas al sistema del punto “a”.

Los valores normales en porcentaje de plaquetas adheridas al sistema reportador son:

4° pase: 40 a 50 % de plaquetas adheridas

9° pase: 70 % de plaquetas adheridas

El principal problema es la estandarización de la prueba ya que se necesita de un equipo o sistema especial para llevar a cabo la técnica además de la cantidad de perlas de vidrio que se requieren. De igual forma resulta difícil controlar la velocidad con la cual avanza la muestra por el sistema lo cual puede llegar a generar interferencia con los valores obtenidos (González y Moreno, 2007).

2.5 Validación de métodos

De acuerdo con la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico emitida por el CENAM en conjunto con la EMA, validación puede definirse como la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista.

La validación de los métodos analíticos usados en el laboratorio clínico es de suma importancia de ahí que en el proyecto de actualización de la NOM-007-SSA3-2017, para la organización y funcionamiento de los laboratorio clínicos (cuya aplicación es de carácter obligatorio en México) se indica en su numeral 5.5.4 que solo aquellas técnicas que hayan sido validadas por el fabricante y cuyos resultados sean verificados por el laboratorio (tanto precisión, linealidad, veracidad, incertidumbre y valores de referencia) podrán ser utilizadas (SEGOB, 2018).

La validación de cualquier método analítico resulta primordial para poder asegurar que los resultados sean confiables, especialmente cuando se trata de resultados de laboratorio donde el estado de salud del paciente está de por medio. Es tanta la importancia de esto que se han tenido que redactar normas que establezcan los lineamientos de los laboratorios clínicos para poder validar los diferentes métodos que emplean, la ISO 15189:2012 es la que se encarga de dar estas indicaciones internacionalmente, en cambio en México se hizo la adaptación con base en las necesidades y normas nacionales dando pie a la NMX-EC-15189-IMNC-2015 Laboratorios clínicos – Requisitos de la calidad y competencia.

La NMX-EC-15189-IMNC-2015 indica que los procedimientos a utilizar por un laboratorio clínico tienen que haber sido verificados previo a su uso, esto incluye obtener información del método por parte del fabricante o desarrollador para poder

confirmar el desempeño del procedimiento y determinar si dicha metodología puede ser aplicada con base a sus propias condiciones de trabajo u operación (equipo, calibradores, analistas, etc.). Para que se logre, existen una serie de parámetros que se utilizarán para evaluar el método, los cuales se abordarán a continuación.

2.5.1 Definiciones estadísticas

- Curtosis. Puede definirse como una medida o coeficiente que indicará cuán achatado o escarpada será una curva de distribución (Duffau et al., 2010). Existen diferentes tipos de curtosis:

a) Leptocúrtica: la Curtosis >0 . Los datos están muy concentrados en la media, siendo una curva muy apuntada.

b) Mesocúrtica: la Curtosis $=0$. Distribución normal.

c) Platicúrtica: la Curtosis <0 . Muy poca concentración de datos en la media, presentando una forma muy achatada.

- Exactitud. Se puede definir como el grado de concordancia entre un resultado de un ensayo con un valor conocido, en un método analítico la exactitud implica que se tenga veracidad y precisión con los resultados.

Precisión. Se puede definir como el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo circunstancias estipuladas; sin embargo, hay más parámetros correlacionados que permiten hacer un análisis más profundo de los resultados; para poder indicar el grado de precisión se suele expresar en términos de imprecisión para lo cual es necesario calcular la desviación estándar de los resultados previamente obtenidos (Duffau et al., 2010).

Dentro de la precisión es necesario abordar dos aspectos fundamentales:

a) Repetibilidad. Es cuando se realiza un mismo método bajo las mismas circunstancias, esto implica que el procedimiento, el analista, la ubicación, el instrumento y las condiciones de medición sean las mismas; se sugiere que las mediciones se realicen en periodos cortos de tiempo.

b) Reproducibilidad. Implica la concordancia que existe entre los resultados obtenidos de un mismo método bajo condiciones diferentes de medición, para poder determinar el grado de precisión de la reproducibilidad intralaboratorio es necesario realizar por lo menos 3 mediciones del mismo método, cambiando al analista y material utilizado (Delgado, 2009).

Robustez. Indica la fiabilidad de un método al realizar pequeños cambios deliberados en su realización, de tal forma que se puede observar en qué grado es afectado por las variaciones que puedan surgir, es importante analizar hasta qué punto la técnica no es afectada por dichas variaciones, entre las condiciones que pueden afectar a un método se encuentran (NMX-EC-15189-IMNC-2015):

- Analista
- Equipos y material utilizado
- Soluciones colorantes
- Condiciones de la muestra (volumen y estabilidad), entre otros.

Veracidad. Es el grado de concordancia que existe entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado de referencia, normalmente se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático y se puede expresar como un valor absoluto (NMX-EC-15189-IMNC-2015).

2.5.2 Parámetros estadísticos estudiados

Para fines de validación se pueden utilizar mediciones estadísticas, que permitan establecer si los resultados obtenidos por el método evaluado están en parámetros aceptables, estos son (Crespo, 2013):

Media (\bar{x}): Matemáticamente se puede definir como la suma de todos los valores, dividido entre el número de los sumandos

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Siendo:

\bar{x}_i = valores obtenidos

n = Número de las lecturas

Desviación estándar muestral (s): Este parámetro permite cuantificar la dispersión o variación que se presenta en un conjunto de valores, es muy útil para poder determinar si los datos obtenidos se acercan a lo esperado. A su vez una desviación estándar de una muestra estima la desviación estándar de una población basada en una muestra aleatoria.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - X)^2}{n-1}}$$

Siendo:

x_i = valor de una lectura.

X = promedio de la totalidad de lecturas.

n = número de lecturas

Coeficiente de Variación (CV): Es el resultado de dividir la desviación estándar entre la media. Se interpreta como el porcentaje en el que se aleja un resultado con respecto de la media, por lo que se usa como una calificación que permite evaluar la calidad estadística de las diferentes estimaciones realizadas. Puede expresarse en decimales o en porcentaje, basta multiplicar por 100.

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Siendo:

S = desviación estándar de las lecturas.

X = promedio de la totalidad de lecturas.

A partir de estos se pueden realizar diversas representaciones gráficas que permitan visualizar mejor el comportamiento de los resultados obtenidos, un claro ejemplo es la gráfica o campana de Gauss, que representa la distribución de frecuencias normal de una población de valores, lo que permite calcular la probabilidad de que varios valores ocurran dentro de ciertos rangos o intervalos, (ver figura 11; Duffau, et. al. 2010).

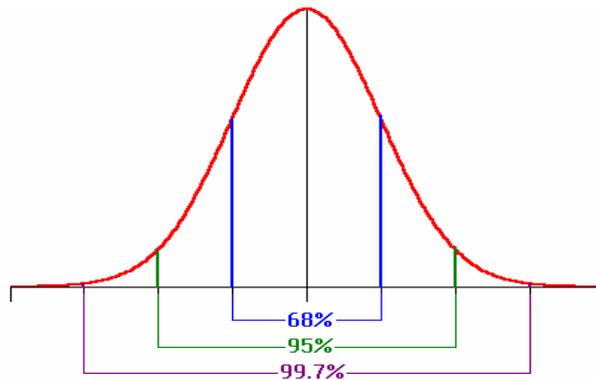


Figura 11 Representación gráfica de la Campana de Gauss. En una distribución normal los rangos de $\pm 1s$ estarán abarcando el 68 % de los datos recopilados, a su vez cuando se abarca el rango de $\pm 2s$ corresponderá al 95 % de los datos y por último, cuando se abarcan desde $\pm 3 s$ se logra cubrir en 99.7 de los datos.

2.6 Teoría de Valores de Referencia

El concepto de valores de referencia surge en la década de 1970 y ha sido modificado a lo largo del tiempo por diversas organizaciones a nivel internacional, particularmente por la Federación internacional de Química clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC) y el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) actualmente conocido como el Instituto de Estándares clínicos y de laboratorio (CLSI en Estados Unidos). Otra institución que cobro gran relevancia desde su fundación en 1947 fue la Organización Internacional de Estandarización (ISO), cuyo propósito era alcanzar la estandarización de diferentes áreas científicas, con el tiempo dicho organismo emitió la norma internacional ISO 15189 que en sus diversas actualizaciones ha indicado que los laboratorios clínicos deben de incluir sus valores de referencia en cada prueba (Henny et al, 2016).

Los intervalos de referencia pueden definirse como el rango en el que se encuentran el 95 % de una población de sujetos clínicamente sanos; su utilidad es comparar un valor observado (resultado de un paciente) con un valor estadísticamente establecido, para la toma de decisiones médicas (Henny et al, 2016).

Para un laboratorio clínico resulta de suma importancia que cuente con los valores o intervalos de referencia de cada una de las pruebas que ofrece al público en general tal y como lo indica la NOM-007-SSA3-2011 en su numeral 4.8

Es importante que los valores de referencia sean representativos de la población en la cual se va a reportar un resultado de laboratorio para esto se deben de aplicar ciertos criterios, tales como: (Ceriotti y Henny. 2008).

a) Selección de Individuos

Los métodos de selección de los individuos dependerán del uso proyectado para los valores de referencia, normalmente para estudios de poblaciones univariados se pueden emplear método retrospectivo y prospectivo, el método que se empleará es el segundo ya que nos permite fijar los criterios de inclusión y exclusión de los individuos que serán empleados. El propósito de utilizar criterios de exclusión es que los resultados tengan menor desplazamiento o menor dispersión entre ellos (Ministerio de Salud, 2013).

b) Método estadístico

Dependiendo de la distribución que presenten los datos será el método empleado para la estimación de los intervalos de referencia, el procedimiento general es:

- a) Recolectar los diferentes resultados obtenidos.
- b) Agruparlos y ordenarlos (se recomienda que sea en forma ascendente).
- c) Analizar y determinar el tipo de distribución o comportamiento estadístico.
- d) Eliminar los datos que sean estadísticamente aberrantes, para lo cual se puede ocupar la fórmula de Dixon, en donde se considera que X_n es aberrante si (Fuentes, 2011):

$$|X_n - X_{n-1}| \geq \frac{X_f - X_i}{3}$$

Donde:

X_n : valor a evaluar

X_f : último valor de la serie

X_{n-1} : valor inmediato (considerar la diferencia en valor absoluto)

X_i : primer valor de la serie

- e) Seleccionar el método estadístico de análisis:

- Método no Paramétrico (o de *Distribución libre*). Permite el análisis de muestras grandes y es útil debido a su simplicidad. Cuando se presenta este tipo de distribución existen 3 posibilidades:

- Obtener los intervalos por el método de los fractiles (calculando los percentiles 2.5 y 97.5) usando un sistema estadístico independiente a la distribución de los valores. Cabe mencionar que se prefiere este método y es comúnmente conocido como "*Método no paramétrico*". Las fórmulas empleadas para la obtención de los percentiles 2.5 y 97.5 es el siguiente:

$$L_1 = 0.025(N + 1) \qquad L_2 = 0.975(N + 1)$$

Siendo:

L_1 Límite inicial

L_2 Límite final

N el número de datos

El resultado obtenido de en ambas operaciones indica la posición en la serie del valor, debe considerarse como el límite inferior y superior respectivamente.

- Encontrar la ecuación de la distribución de los datos y de acuerdo con dicha función deducir los intervalos de referencia.

- Transformar o ajustar matemáticamente los datos para obtener una simetría en la distribución (o distribución normal) (Barreto, 2001).

- Método Paramétrico. Suele necesitar de datos que tengan una distribución normal o *gaussiana*, donde el intervalo de referencia se determina como el 95 % central de los datos. Una forma de obtener dichos intervalos es sumando y restando 1.96 desviaciones estándar a la media de los datos (muchas veces se prefiere redondear las desviaciones a 2), los valores obtenidos son comparables a los obtenidos por los percentiles 2.5 y 97.5. El método paramétrico es teóricamente más preciso con muestras pequeñas (Queralto y Ordoñez, 1983).

2.7 La bioética en la investigación

La Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA) define a la bioética como "la rama de la ética aplicada que reflexiona, delibera y hace planteamientos normativos y de políticas públicas para regular y resolver conflictos en la vida social, especialmente en las ciencias de la vida, así como en la práctica y en la

investigación médica que afectan la vida en el planeta, tanto en la actualidad como en futuras generaciones” (Comisión Nacional de Bioética 2010).

Esta definición es aplicable para la realización de todo experimento que implique a otro ser vivo, especialmente con seres humanos, de ahí que la Secretaría de Salud (SS) sugiera el uso de cartas de consentimiento informado, que se pueden definir como la expresión tangible del respeto a la autonomía de las personas en el ámbito de la atención médica y, en este caso, de la investigación; se trata de un respaldo y permite confirmar que se ha informado al paciente las características y detalles del procedimiento que se le realizará, salvaguardando su información.

El consentimiento informado consta de dos partes:

- Derecho a la información, que debe ser clara, veraz, suficiente, oportuna y objetiva acerca de todo lo relativo al proceso de atención, principalmente el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del padecimiento. El proceso incluye comprobar si el paciente ha entendido la información, propiciar que realice preguntas, dar respuesta a éstas y asesorar en caso de que sea solicitado. Los datos deben darse a personas *competentes* en términos legales, edad y capacidad mental, en el caso que la persona sea *incompetente* sea por alguna limitación de conciencia, raciocinio o inteligencia; será necesario conseguir el consentimiento o autorización a través de un representante legal (CONBIOÉTICA, 2015).

- Libertad de elección: después de haber sido informado adecuadamente, el paciente tiene la posibilidad de otorgar o no el consentimiento para que se lleven a cabo los procedimientos. Es importante privilegiar la autonomía y establecer las condiciones necesarias para que se ejerza el derecho a decidir.

Cuando se trata de un procedimiento de riesgo mayor al mínimo, el consentimiento debe ser expresado y comprobado por escrito, mediante un formulario firmado; sin embargo, dependiendo del experimento el formato puede modificarse, con la finalidad de que sea un documento claro y que sirva como respaldo tanto para el paciente como para el investigador (Revisar anexo 1).

2.8 Criterios de inclusión y exclusión

En la realización de todo ensayo clínico es necesario delimitar la población en la cual se realizará por diversos motivos, por ejemplo: no se obtienen resultados tan dispersos entre sí, lo cual facilita el análisis de resultados, se obtienen resultados más representativos, etc. Los criterios de inclusión y exclusión permiten llevar a cabo dicha delimitación de sujetos de estudio (EUPATI, 2015).

- Criterios de exclusión: Son todas las características que debe de cumplir un sujeto o un grupo de individuos para poder formar parte de un experimento.

- Criterios de exclusión: Se pueden definir como las características o condiciones que presenten los posibles participantes de un ensayo y que pueden modificar o alterar los resultados del experimento por lo tanto no son elegibles para que sean parte del experimento.

3. Objetivo General

Estandarizar una técnica de adhesividad plaquetaria en placa que permita la obtención de los valores de referencia en una población sana de estudiantes de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.

3.1 Objetivos Particulares

- Diseñar una técnica de adhesividad plaquetaria en placa que sea económica, sencilla y a la vez confiable que permita evaluar la adhesividad de las plaquetas *in vitro*.

- Estandarizar la técnica diseñada de adhesividad plaquetaria en placa con base en las condiciones de trabajo con las que se cuenta en un laboratorio de docencia.

- Obtener valores de referencia representativos de la comunidad estudiantil de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.

4. Hipótesis

A partir de la estandarización de una técnica de adhesividad plaquetaria en placa con base en las condiciones de trabajo de un laboratorio de enseñanza será posible determinar los valores de referencia de una población sana representativa de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, usando métodos de estadística paramétrica y no paramétrica para su obtención, logrando así comprender mejor una parte primordial del proceso de coagulación.

5. Metodología

5.1 Delimitación de la población de estudio

Durante la realización de cualquier experimento existen una serie de características decisivas a considerar, una de ellas es la homogeneidad, es decir, que los miembros de la población tengan las mismas características, que se determinan con base en las variables del experimento a realizar (Arias, Villasis y Miranda, 2016).

Los criterios de inclusión para delimitar a la población son los siguientes:

- Hombres y mujeres con un rango de edad de 21 a 25 años
- Alumnos de la FESC-1
- Ayuno de 6 a 12 horas

Por otra parte, los criterios de exclusión utilizados son los siguientes:

- Muestras coaguladas: Los coágulos representan una disminución considerable en el número de plaquetas disponibles en la muestra, dado que estarán atrapadas en una red de fibrina, además que no se puede asegurar que las plaquetas que no sean parte del coágulo no hayan sido activadas.

- Embarazo. En el 85 % de los embarazos (después de primer trimestre) se observa un cuadro de trombocitopenia moderado (hasta de 80 000 plaquetas/ μ L) por diferentes motivos, siendo los principales la hemodilución y la inmunosupresión que se presenta. Esta disminución de plaquetas repercute directamente con el experimento pues no se pueden considerar como pacientes sanos (con base en los valores de referencia), además que dicho valor tan bajo implica una muestra diluida lo cual repercutiría directamente con los conteos que se realicen a lo largo de la experimentación (Cabrera y Castillo, 2014).

- Terapia con anticoagulantes y antiplaquetarios. En el sector salud existe una gran cantidad de medicamentos que son empleados para tratar problemas trombóticos, por ende, el funcionamiento de los fármacos empleado va a ser diferente, en este caso, resulta de suma importancia los que tienen acción o alteran la adhesión plaquetaria. Un ejemplo de esto son los inhibidores de la ciclooxigenasa

(inhibidor de la síntesis del TxA_2), si es inhibida la síntesis de TxA_2 la plaqueta no podrá llevar a cabo correctamente su funcionamiento, ya que su activación será anormal impidiéndole que realice correctamente sus procesos de adhesión y agregación plaquetaria, este inhibidor se encuentra presente en diversos medicamentos como lo son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE, por ejemplo, el ácido acetilsalicílico) (Chávez, 2012).

- Se descartan individuos con edad inferior a 18 años o mayores a 26 años. Como ya se indicó, es de suma importancia que la población sea homogénea con respeto a las necesidades y fines del experimento, en este caso el experimento se diseñó para ser usado en una comunidad universitaria por ende la edad de los participantes debe ser similar a esta. Si en algún momento se llegara a utilizar en una comunidad diferente es necesario ajustar el rango de edad de la población.

- Alcoholismo. Se ha descrito que la ingesta de alcohol afecta directamente el funcionamiento de la plaqueta ya que puede inducir una disminución de ATP y ADP y de AMP por inhibición de la adenil ciclasa. También se altera la síntesis de prostaglandinas, TXA_2 y la disponibilidad del factor 3 plaquetario (Gómez, Rodríguez y Díaz, 2018).

- Tabaquismo. Se ha descrito que el hábito de fumar genera un aumento en la agregación plaquetaria; sin embargo, esto es debido a que precisamente al aumento de TXA_2 , aunque no se ha podido esclarecer el mecanismo exacto por el cual se presenta dicho aumento. Sin embargo, este aumento de TxA_2 implica una hiperactividad plaquetaria que podría comprometer la veracidad de los resultados de adhesión plaquetaria (Asadurian, 2011).

- Muestras lipémicas y hemolizadas. Algunos estudios han asociado la lipemia con un ligero aumento en la concentración de plaquetas; sin embargo, no se ha podido confiar en dicha observación, en este caso se descartan las muestras lipémicas debido a que la lipemia elevada afectará la viscosidad del plasma, lo que interfiere con la correcta distribución de las muestras sobre la placa, entorpeciendo así la metodología (Moreno, 2012). Se ha observado que muestras hemolizadas disminuyen considerablemente sus tiempos de coagulación, debido a la activación del sistema de coagulación y a su vez de las plaquetas, al seguir un proceso de

amplificación en su activación, pueden llegar a interferir en los resultados, generando un posible aumento en la adhesión plaquetaria (Aulesa, et al, 2002).

5.2 Características y obtención de la muestra biológica a utilizar

La muestra de elección es la obtenida por punción venosa ocupando comúnmente el brazo en la zona de flexura del codo, ya que es un área donde las venas son más accesibles, fijas y de mejor calibre para obtener muestra suficiente. El paciente debe estar en una posición cómoda, que le permita descansar el brazo de tal forma que no se produzcan movimientos bruscos o repentinos de postura; la punción debe realizarse en un lugar limpio y bien iluminado, sea por luz natural o artificial y en donde se cuente con todo el material necesario para la obtención de la muestra (Ministerio de Salud, 2013; Barreto, 2001). Las características que debe cumplir la muestra para que utilizada en el método son las siguientes:

- Deberá rotularse correctamente sea con los datos del paciente o algún folio/código que permita su identificación.

- Se ocuparán muestras sanguíneas obtenidas por punción venosa y anticoaguladas, usando citrato de sodio al 3.2% (es importante mantener la relación 9 partes de sangre por una de anticoagulante).

- Recolectar muestra suficiente de sangre anticoagulada

- Desde que se recolecta la muestra hasta su procesamiento no debe pasar más de 30 min a temperatura ambiente.

- Los plasmas lipémicos, hemolizados no son idóneos para su procesamiento (consultar: criterios de exclusión).

- Después de haber centrifugado la muestra separar el plasma.

5.3 Procedimientos generales

Para poder llegar a una metodología bien definida fue necesario abordar por separado los diferentes aspectos que la conformarían, a continuación, se mencionan los procedimientos que se realizaron:

a) **Conteo de plaquetas en cámara de Neubauer**

1. Recolectar una muestra de sangre periférica anticoagulada.
2. Centrifugar la muestra a 1500 rpm por 10 min para obtener PRP
3. Separar el PRP del paquete globular con ayuda de una pipeta de transferencia.
4. Realizar una dilución del PRP 1:200, utilizando como diluyente el colorante a emplear (revisar inciso d, selección de colorante) y homogeneizar suavemente por 20 s.

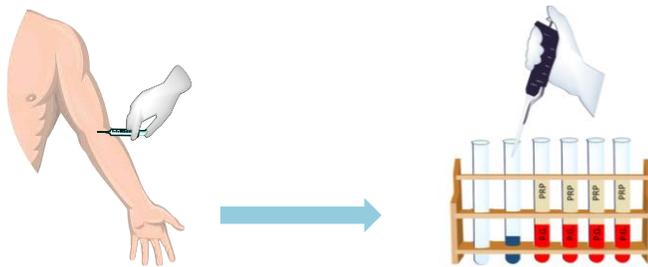


Figura 12. Recolección y separación de la muestra.

5. Revisar en el microscopio que la cámara de Neubauer se encuentre completamente limpia, de no ser así limpiarla y volver a revisarla.
6. En una caja Petri de 100 mm colocar un papel absorbente impregnado de agua y tapar la caja para generar un ambiente húmedo en su interior (cámara húmeda).
7. Colocar la cámara de Neubauer (con su respectivo cubrehematímetro) en el interior de la cámara húmeda.
8. Con ayuda de una micropipeta llenar una cuadrícula de la cámara de Neubauer. El volumen idóneo para realizarlo es con 10 μ L; sin embargo, se debe depositar la muestra hasta el primer “tope” de la micropipeta, si se llega al segundo se puede introducir aire a la cámara.
9. Dejar en reposo la cámara de Neubauer por 10 min, evitando moverla bruscamente (tal y como se observa en la figura 13, página 45).
10. Transcurrido este tiempo retirar con cuidado la cámara de Neubauer y secar la base con suavidad.
11. Montar la cámara de Neubauer en el microscopio, enfocar a 10 X localizando la cuadrícula central y después ajustar a 40X.



Figura 13. Llenar cámara de Neubauer con la muestra diluida.

Para llenar la cámara se puede utilizar una micropipeta precargada con 10 μL .

12. Contar por completo la cuadrícula central de la cámara de Neubauer (a 40 X) con ayuda de un contador celular, el número de plaquetas será multiplicado por el factor de dilución (2000), lo que permitirá determinar la concentración de plaquetas en un mm^3 o en microlitro (μL).

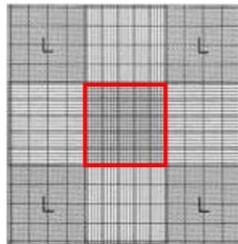


Figura 14. Cuadrícula central. Se recomienda que se cuente la cuadrícula central, pero es posible contar uno o más cuadros periféricos, pero es necesario tomarlo en cuenta para obtener el factor de la dilución

13. Registrar y analizar los conteos plaquetarios obtenidos.

b) Selección del anticoagulante

Los anticoagulantes a evaluar fueron: EDTA y citrato de sodio (revisar anexo 3), ambos en su versión comercial con sistema al vacío, para evitar alguna posible contaminación que pueda alterar a la muestra.

La metodología a seguir es la misma que la indicada en el inciso a, conteo de plaquetas en cámara de Neubauer; al finalizar los conteos también se analizarán otros aspectos como lo son:

- Cantidad de PRP obtenido
- Limpieza en la muestra (vista a través del microscopio)
- Porcentaje de adhesión dependiendo del anticoagulante

Una vez que se estandarizó y seleccionó el anticoagulante que da mejores resultados, se procedió a plantear una metodología para la adhesión de plaquetas en placa.

c) Adhesión de plaquetas a una placa de vidrio

1. Realizar una dilución 1:2 del PRP utilizando SSF. Se recomienda preparar mínimo 3 mL.
2. Colocar un portaobjetos dentro de una caja Petri de plástico de 100 mm, que esté sobre un soporte de plástico.
3. Colocar el PRP diluido en el portaobjetos de forma rápida y constante, de tal manera que se cubra en su totalidad el portaobjetos y no se generen burbujas.

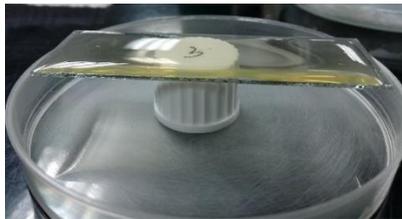


Figura 15. Portaobjetos cubierto con PRP (dilución 1:2)

4. En cuanto se coloca el PRP diluido en el portaobjetos se debe empezar a cronometrar (revisar inciso e, selección de tiempo óptimo para adhesión de plaquetas en placa).
5. En cuando transcurra el tiempo seleccionado, decantar el contenido la solución sobre la caja Petri de plástico.
6. Recuperar el PRP diluido con una pipeta de transferencia y transferirlo a un tubo de ensayo de plástico.
7. El portaobjetos se dejará secar a temperatura ambiente, es recomendable inclinar el portaobjetos para que se seque más fácilmente (revisar inciso g, tinción de la placa de vidrio con plaquetas adheridas).
8. Realizar conteo de plaquetas no adheridas en cámara de Neubauer, diluyendo la muestra recuperada 1:100 usando colorante como diluyente.
9. Repetir los pasos 5 a 12 del inciso a, conteo de plaquetas en cámara de Neubauer.

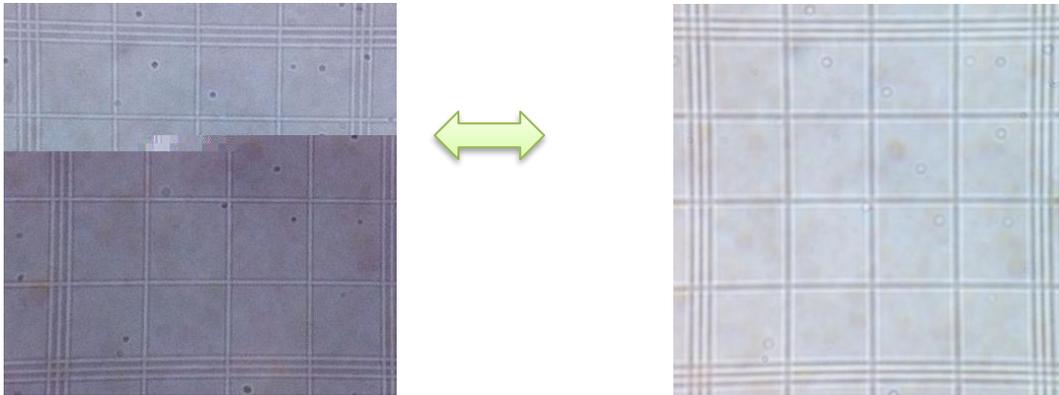


Figura 16. Plaquetas no adheridas observadas en Cámara de Neubauer Al mover el tornillo micrométrico es posible apreciar el efecto de refringencia característico de las plaquetas.

d) Selección de colorante

Es de suma importancia poder añadir un colorante que permita el conteo en cámara de Neubauer y a su vez no altere la morfología o interacción con las plaquetas, los dos evaluados fue: la solución colorante de Rees Ecker (revisar anexo 2) y una mezcla de oxalato de amonio al 1 % con azul de cresil brillante (ver Anexo 3. Preparación de soluciones, inciso a) Oxalato de amonio al 1%). Es importante mencionar que ambos colorantes cuentan citrato de sodio como anticoagulante para evitar que las plaquetas empiecen sus procesos de activación y que a diferencia el colorante de Rees Ecker está adicionado con una solución fijadora como lo es el formol neutro.

Debido a la sensibilidad analítica de la balanza ocupada se pesaron 0.50 g los cuales fueron disueltos en 50 mL de agua destilada esto equivale a una solución del 1.03 %. De la solución original se tomaron 5 alícuotas de 10 mL cada una, a las cuales se adicionaron 2 gotas de azul de cresil brillante.

Para poder evaluar dichas soluciones se siguió la metodología planteada en el inciso c: Adhesión de plaquetas a una placa de vidrio; registrando las diferencias observadas en cada preparación.

e) Selección de tiempo óptimo para adhesión de plaquetas en placa

Se evaluaron diversos tiempos de contacto entre plaquetas y una placa de vidrio hasta encontrar el tiempo óptimo, que permitiera una correcta adhesión, los tiempos evaluados en minutos (min) fueron: 2, 2:30, 3, 5 y 10.

La metodología seguida es la indicada en el inciso c Adhesión de plaquetas a una placa de vidrio, específicamente en el numeral 4, después de esto fue necesario evaluar los resultados para lo cual se calculó el porcentaje de plaquetas adheridas (inciso f) a cada placa, aunado a esto fue necesario correlacionar su morfología, para lo cual se tiñó la placa con colorante de Wright (revisar inciso g). Posterior a esto fue posible seleccionar el tiempo idóneo para el proceso de adhesión de plaquetas.

f) Cálculo del porcentaje de plaquetas adheridas

Para poder calcular el porcentaje de plaquetas adheridas a la placa de vidrio se utiliza la siguiente formula:

$$\% pa = 100 - \left(\frac{P_{No} * 100}{C_i} \right)$$

Donde:

% pa: Porcentaje de plaquetas adheridas

P_{NO}: Plaquetas no adheridas (contadas en cámara de Neubauer)

C_i: Conteo inicial de plaquetas

Ejemplo.

A partir de una muestra sanguínea anticoagulada con citrato de sodio se realizó la metodología previamente descrita. Obteniendo los siguientes resultados:

Conteo inicial de plaquetas: 235 000 plaquetas/ μ L.

Las plaquetas no adheridas, que se contaron después de la adhesión a la placa fueron: 109 000 plaquetas/ μ L.

A partir de estos datos es posible calcular el porcentaje de plaquetas con la fórmula mencionada, solo hay que sustituir los valores, lo cual quedaría de la siguiente forma:

$$\% pa = 100 - \left(\frac{109\ 000 * 100}{235\ 000} \right)$$

$$\% pa = 100 - 46.4$$

$$\% pa = 53.6 \approx 54$$

El resultado obtenido es de un 54 % de plaquetas adheridas a una placa de vidrio.

g) Tinción de la placa de vidrio con plaquetas adheridas

Esta técnica se aplicó a la placa en donde se adhirieron las plaquetas (indicada en el inciso c, numeral 7), realizando la tinción de Wright.

1. Adicionar colorante de Wright y cubrir por completo la placa, evitando que se desborde el colorante.
2. Revisar o cuidar que no se seque la preparación, dejando en contacto con el colorante por 7 min.
3. Sin decantar el colorante adicionar el buffer de fosfatos (de preferencia un volumen equivalente al empleado originalmente con el colorante de Wright) y dejar reposar por 15 min con el buffer
4. Decantar y enjuagar con agua corriente, evitar el contacto directo del chorro de agua con el frotis.
5. Dejar secar el frotis teñido a temperatura ambiente, posteriormente montar en microscopio.
6. Enfocar al microscopio con aumentos 10X, 40X en búsqueda de una zona apropiada, posteriormente observar con el objetivo de inmersión 100X.

5.4 Validación del método

Una vez propuesta la metodología fue necesario establecer la forma en la que se evaluaría su repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

- Repetibilidad

Se procedió a obtener muestras sanguíneas del mismo paciente en días diferentes, en cada una de estas se realizó la metodología previamente mencionada, realizando a su vez dos preparaciones por día, cabe mencionar que los conteos plaquetarios fueron realizados por triplicado para poder corroborar los resultados obtenidos.

Se monitorearon diversos parámetros, como lo fueron: velocidad de centrifugación, volumen de muestra obtenido (relación sangre-anticoagulante), material utilizado, condiciones de la placa vidrio, misma cámara de Neubauer (limpieza), tiempos de incubación y de adhesión, de igual forma todas estas actividades fueron realizadas por el mismo analista.

Para el análisis estadístico se calcularon el promedio, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación.

- Reproducibilidad

Para poder corroborar que el método es reproducible fue necesaria la colaboración de 3 analistas diferentes que pudieran realizar la técnica de adhesión plaquetaria en placa.

La muestra analizada fue del mismo paciente; sin embargo, cada uno analista contaba con su correspondiente material de trabajo (placas de vidrio, diluyentes, colorantes, cámara de Neubauer, caja Petri, pipetas de transferencia, etc.). Para la evaluación de la reproducibilidad se calcularon los parámetros estadísticos promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

- Robustez

Para poder evaluar este aspecto fue necesario probar el impacto que tiene realizar ciertas modificaciones en puntos clave de la metodología. Algunos de estos cambios fueron de suma importancia al momento de poder estandarizar la técnica, por lo cual algunos se han descrito previamente. Los aspectos que a continuación se mencionan fueron elegidos debido a su directa repercusión sobre los resultados, además que durante la experimentación fueron los puntos en los cuales más modificaciones podían presentarse:

1. Anticoagulante (revisar procedimiento, inciso b, selección de anticoagulante).

2. Modificar la velocidad de centrifugación para la obtención de PRP, 1000 y 1500 rpm durante 10 min.

3. Establecer el número de plaquetas que estarán en contacto con la placa de vidrio para la adhesión plaquetaria.

4. Uso de colorante de Rees Ecker u oxalato de amonio al 1 % como diluyentes del PRP (revisar procedimiento, inciso d, selección de diluyente para PRP).

Los resultados obtenidos con dichas modificaciones fueron recabados y analizados para poder determinar su repercusión en la metodología plateada.

La metodología final se encuentra al final de la sección 6.1 Estandarización de la técnica de adhesión plaquetaria, en la cual se engloban todos los pasos que se deben seguir para su correcta realización.

6. Resultados

6.1 Estandarización de la técnica de adhesividad plaquetaria

Primeramente, fue necesario estandarizar el conteo plaquetario con la finalidad que los resultados de una misma muestra fueran lo más homogéneos posibles con la finalidad de poder disminuir el factor humano como una variante que pudiera afectar los resultados obtenidos durante la experimentación.

Para esto fue necesario practicar la metodología anteriormente descrita, incluyendo el proceso de adhesión plaquetaria en placa, lo cual permitiría obtener observaciones importantes para la selección, modificación e implementación de nuevos pasos a la metodología propuesta. Se requirió la ayuda de una sola persona (paciente) que pudiera donar muestras sanguíneas en repetidas ocasiones.

Primero se realizaron 10 conteos plaquetarios, cabe mencionar que para poder realizar dichos conteos se requirieron diversas muestras del mismo paciente. Una vez realizados dichos conteos se obtuvieron los siguientes parámetros:

Tabla 9. Parámetros obtenidos en la estandarización del conteo plaquetario

Promedio*	361.10 (*10 ³ plaquetas/mm ³)
DS	18.92
CV	0.05
% CV	5.24

De estos parámetros obtenidos el que toma gran relevancia es el porcentaje de coeficiente de variación (% CV), es posible notar que los valores obtenidos son homogéneos entre sí considerando que la técnica es manual por lo cual el grado de error puede llegar a ser mayor.

Durante esta primera etapa de experimentación fue posible observar algunos puntos clave que necesitarían de ciertas modificaciones para optimizar el rendimiento de la técnica, entre estos se incluyen:

- Selección del anticoagulante

Como ya se indicó, los anticoagulantes probados fueron EDTA y Citrato de sodio al 3.2 % (usando sistema al vacío). Posterior a la obtención y centrifugación de la muestra, se logró observar que el volumen de PRP era similar; en ambos casos se obtuvo entre un 40 a 45 % de PRP con respecto a la muestra total.

A partir del PRP obtenido de la misma muestra se realizaron una serie de conteos plaquetarios con ambos anticoagulantes (por triplicado y se obtuvo su respectivo promedio) lográndose observar una variación significativa (revisar la tabla 10 comparación en el conteo inicial y porcentaje de adhesividad plaquetario), el anticoagulante que presentó un mayor número de plaquetas en su conteo inicial corresponde al EDTA, siendo esta diferencia prácticamente de 150000 plaquetas/ μ L. Por otro lado, el porcentaje de adhesividad plaquetario es mayor cuando se emplea citrato de sodio al 3.2 %, este valor es más del doble con respecto al obtenido empleando EDTA.

Tabla 10. Comparación en el conteo inicial y porcentaje de adhesividad plaquetario

	EDTA	Citrato de sodio (3.2 %)
Conteo inicial (x1000plaquetas/ μ L)	676	412
Promedio del porcentaje de adhesión plaquetario (%)	18	47

Otro aspecto que se analizó fue la morfología plaquetaria buscando algún tipo de anormalidad que pudiera interferir con la prueba, esta se evaluó en tres ocasiones, primero al realizar el conteo inicial de plaquetas, la segunda ocasión fue cuando se contaron las plaquetas no adheridas a la placa (para poder determinar el porcentaje de adhesividad plaquetario) y la tercera fue al examinar la placa a la cual se adherieron las plaquetas.

Sin embargo, no se observaron cambios morfológicos relevantes al usar dichos anticoagulantes, en ambos casos se observaron plaquetas redondas, refringentes a la luz, no se observaron pseudópodos o alteraciones que pudieran indicar un proceso de activación plaquetario. La única diferencia apreciable fue que

las preparaciones obtenidas usando EDTA se observaron ligeramente más saturadas con respecto al citrato de sodio, aunque no se observaron agregados plaquetarios.

Con base en las observaciones previamente mencionadas se determinó que el anticoagulante que mejor rendimiento y resultados ofrece para esta metodología es el citrato de sodio al 3.2 %.

- Selección de colorante

Para los conteos plaquetarios se utilizaron diluyentes con colorantes, tales como la solución de Rees Ecker y una mezcla de oxalato de amonio al 1 % adicionada con azul de cresil brillante, cabe mencionar que se utilizó la misma muestra biológica con la finalidad de reducir las variables que se pudieran presentar, de igual forma ambos colorantes fueron evaluados al mismo tiempo. Una vez realizada la metodología correspondiente se evaluaron las siguientes características:

- Morfología plaquetaria
- Calidad (limpieza) de los campos observados
- Calidad del colorante (contraste)

Una vez que se analizaron y compararon los resultados obtenidos se decidió que el colorante adecuado es la solución de Rees Ecker, ya que nos permite apreciar claramente el efecto de birrefringencia de las plaquetas, campos limpios y no altera la morfología celular, facilitando la identificación y conteo plaquetario. Esta mejoría en la observación microscópica esta asociada a que el colorante de Rees Ecker está adicionado con formol neutro, el cual permite que las células conserven su morfología sin modificar el pH del medio.

- Selección de tiempo óptimo para adhesión de plaquetas en placa

Un aspecto de suma relevancia fue la selección del tiempo de contacto entre el PPP y la placa de vidrio, en la tabla número 12 (página 56) se muestran los diferentes tiempos de contacto que fueron puestos a prueba, con sus respectivos

resultados de plaquetas adheridas (en porcentaje). Cabe mencionar que los resultados fueron revisados por triplicado.

Tabla 11. Comparación de resultados usando diferentes colorantes plaquetarios.

	Rees Ecker	Oxalato de amonio (1 %)
Morfología plaquetaria	Se observan células pequeñas, birrefringentes, redondas bien definidas, sin presencia de pseudópodos y agregados plaquetarios. Las células estas distribuidas homogéneamente en el espacio.	Se observan células ligeramente alargadas, sin presencia de pseudópodos, ligeramente birrefringentes
Calidad de campos observados	Se observan campos limpios, sin presencia de partículas extrañas que pudieran confundirse con plaquetas.	Se aprecian estructuras filamentosas muy tenues distribuidas por todo el campo, de igual forma hay presencia de una cantidad considerable de partículas extrañas amorfas, distribuidas en todo el campo.
Calidad del colorante	Al microscopio se ve un fondo oscuro, uniforme y permite el contraste con las plaquetas facilitando su observación. Macroscópicamente permite apreciar cuando la cámara de Neubauer está llena y sin burbujas de aire	Los campos observados al microscopio se ven ligeramente oscuros por lo cual el efecto de birrefringencia de las plaquetas se observa disminuido, complicando así la visualización de las células. A simple vista se dificulta un poco más observar si existe la presencia de burbujas en la cámara de Neubauer.

Tabla 12. Porcentajes de adhesividad de plaquetaria con base al tiempo de contacto con una placa de vidrio

	Tiempo de contacto (en segundos) entre plaquetas y placa de vidrio				
	60	90	120	180	300
% pa	19	38	38	42	49
% pna	81	62	62	58	51

% pa: Porcentaje de plaquetas adheridas

% pna: Porcentaje de plaquetas no adheridas.

NC: No cuantificado

Las placas de vidrio usadas para el proceso de adhesión plaquetaria fueron teñidas usando colorante Wright (siguiendo la metodología previamente descrita), esto se realizó con la finalidad de probar que en realidad las plaquetas se hubieran adherido y demostrar que no se habían formado agregados plaquetarios durante dicho proceso de adhesión; al realizar la correspondiente observación microscópica fue posible observar que en los periodos de 60 a 300 s de contacto plaquetas-placa no se presentan alteraciones morfológicas, ni agrupaciones entre ellas, la diferencia más notoria es que en la primer placa se observaban abundantes zonas limpias o libres de plaquetas y conforme aumenta el tiempo de contacto estas áreas van disminuyendo de tal forma que a los 300 s se aprecian plaquetas distribuidas homogéneamente en toda la superficie de la placa sin presentar alteraciones morfológicas o agregados plaquetarios (revisar figura 17, página 57)

Es importante mencionar que no fue posible realizar una cuantificación de plaquetas en la preparación de 10 minutos o 600 segundos ya que cuando se realizó la observación microscópica se notó la presencia de una gran cantidad de artefactos, es decir, se podían ver estructuras diminutas (vistos desde el microscopio parecían “puntos” de color azul escasos agregados plaquetarios de igual forma la mayoría de las plaquetas libres presentaban anormalidades morfológicas.

Es posible notar un incremento en el porcentaje de plaquetas adheridas a una placa de vidrio conforme aumentaba el tiempo de contacto; sin embargo, este no es constante de tal forma que es posible observar una disminución a los 240 s. Con base en los datos anteriores se sugiere que el tiempo óptimo de contacto para la metodología planteada es de 300 s o 5 min exactos.

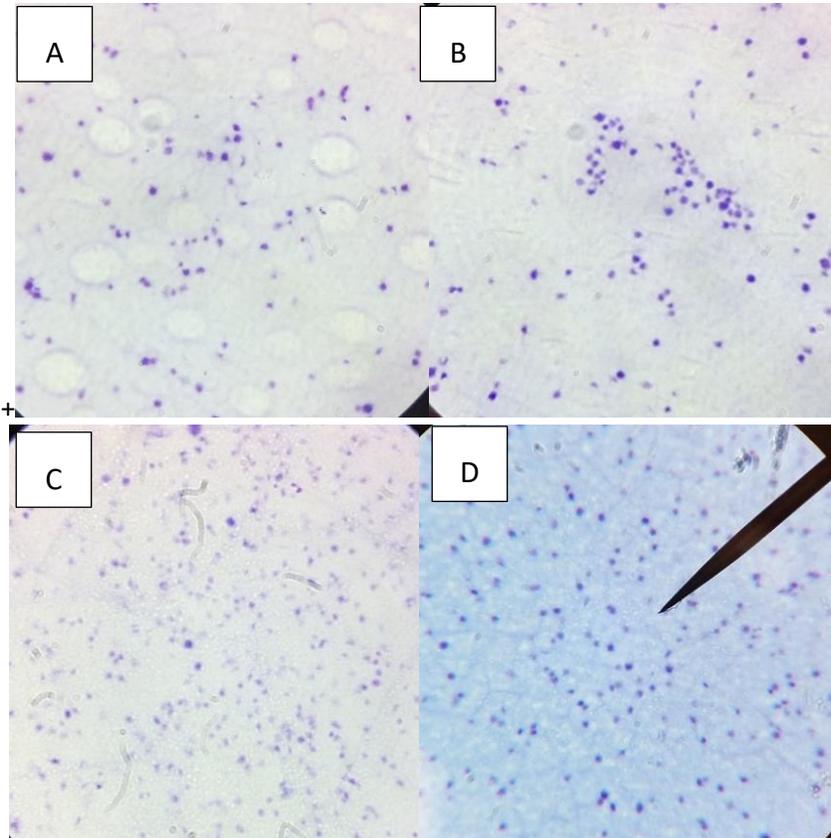


Figura 17. Microfotografías de plaquetas adheridas a una placa de vidrio. Es posible observar un aumento en las plaquetas adheridas a la superficie de cada placa, la microfotografía A y B, corresponden a un tiempo de contacto de 60 y 120 s respectivamente pudiéndose notar áreas ausentes de plaquetas (ambas imágenes tienen un aumento de 400 veces), sobre todo en la A, ya que se notan áreas ovaladas en las cuales no se adhirió la muestra por otro lado la microfotografía C tiene un aumento de 100 veces y corresponde a un tiempo de contacto de 180 s, la distribución de plaquetas es homogénea, observando que la superficie ha sido cubierta casi en un 85 %, por último la microfotografía D corresponde a los 300 s de contacto, con un aumento de 400 veces, en esta se notan plaquetas con morfología normal, distribuidas en la superficie sin formar agregados y sin presencia de artefactos u objetos extraños.

Los resultados obtenidos se pueden resumir en la siguiente tabla:

Tabla 13. Resumen de resultados óptimos obtenidos

Parámetros	Resultado óptimo
Anticoagulante	Oxalato de sodio al 3.2 %
Colorante	Solución de Rees Ecker
Tiempo de contacto	300 segundos

6.2 Validación de la técnica estandarizada

Una vez que se definieron las condiciones en las que se realizó la metodología fue necesario determinar su repetibilidad, por lo cual se necesitó repetir la técnica bajo las condiciones óptimas previamente señaladas, cabe mencionar que durante dichas mediciones se cuidó que las condiciones de trabajo fueran las mismas, incluido el mismo paciente, el cual donó muestra sanguínea en repetidas ocasiones y en un corto periodo de tiempo. Cada vez que se realizó la prueba los conteos fueron verificados por triplicado, en la tabla 14 se muestran los parámetros obtenidos de dichos resultados.

Tabla 14. Parámetros estadísticos generales de repetibilidad.

PROMEDIO (*10 ³ plaquetas/mm ³)	36.43
DS	3.21
CV (%)	8.8

Al observar el porcentaje de coeficiente de variación se puede determinar que no existe una gran variación entre los resultados obtenidos.

Para poder evaluar la reproducibilidad, se solicitó la colaboración de 3 analistas para que llevaran a cabo la técnica por triplicado, bajo las mismas condiciones del experimento: anticoagulante, muestra, colorante tiempo de contacto, para eliminar variabilidad en el procedimiento.

Los resultados obtenidos de manera individual están indicados en la tabla 15, página 59. A partir de los datos anteriores se calcularon nuevos parámetros estadísticos los cuales permitieran analizar los datos en conjunto.

Otro aspecto que fue analizado en todo momento fue la robustez del método, en el numeral 2.5.1 Definiciones estadísticas, se mencionaron los aspectos que se evaluarían, sus correspondientes resultados se encuentran indicados a continuación:

Tabla 15. Prueba de reproducibilidad con sus respectivos resultados

	Analistas		
	1	2	3
Adhesividad	34.0	37.5	38.8
	37.2	42.2	40.7
	35.1	39.6	39.3
Promedio (*10 ³ plaquetas/mm ³)	35.5	39.8	39.6
DS	1.6	2.3	0.98
CV (%)	4.6	5.9	2.4

Tabla 16. Parámetros estadísticos generales de reproducibilidad.

PROMEDIO (*10 ³ plaquetas/mm ³)	38.3
DS	2.59
CV (%)	6.8

- Analista: Se notó que la técnica pudo ser replicada por diferentes analistas, obteniendo de igual forma buenos resultados de conteos plaquetarios y en porcentaje de adhesión.
- Equipos y materiales: El uso de diferentes equipos y materiales no representó ningún problema., siempre y cuando se mantenga el debió de cuidado en ciertos aspectos como lo fue la centrifugación ya que a una velocidad menor no se lograra obtener PRP, por otra parte, es posible usar material usado como lo son cajas Petri de plástico y portaobjetos; sin embargo, se observaron preparaciones más limpias al ocupar materiales completamente nuevos.

- Solución colorante: Se probaron 2 reactivos o soluciones colorantes de plaquetas; sin embargo, la solución de Rees Ecker fue la que mostró mejores resultados (revisar sección de resultados 6.1 en el apartado Selección de colorante).
- Tiempo de contacto: De los diferentes tiempos de contacto que se probaron solo uno mostro tener el mejor porcentaje de adhesión (revisar sección de resultados 6.1 en el apartado Selección de tiempo óptimo para adhesión de plaquetas en placa), por lo cual es de suma importancia cuidar que el tiempo de contacto sea lo más exacto posible.
- Condiciones de la muestra: La muestra de PRP presento una buena estabilidad a temperatura ambiente ya que fue posible realizar la técnica casi 2 hora después haber sido extraída la muestra sanguínea, el principal inconveniente se presenta cuando el volumen de PRP es muy bajo y no se logran obtener el volumen ideal para llenar la placa de cristal. Cabe mencionar que durante la experimentación se descartaron muestras lipémicas (revisar el numeral 2.8 Criterios de inclusión y exclusión, en donde se indica en qué circunstancias puede rechazarse a muestra) de tal forma que disminuyeron las posibles desviaciones en los resultados obtenidos.

6.3 Obtención de valores de referencia

Para la obtención de valores de referencia se procesaron un total de 34 muestras de pacientes diferentes (solo se procesaron las muestras que reunían las características de los criterios de inclusión, de lo contrario la muestra era desechada), obteniendo los datos indicados en la tabla 17, página 62.

Valores de referencia por Método Paramétrico.

Para poder realizar el cálculo de los intervalos de referencia es necesario evaluar que los resultados obtenidos tengan un comportamiento de distribución normal o distribución Gaussiana (siendo lo más representativo la Campana de Gauss).

Tabla 17. Valores estadísticos poblacionales.

Media (\bar{x})	39.10
Moda	40
Mediana	39
Desviación estándar (σ)	6.052
Coefficiente de Variación (CV)	0.1548
Porcentaje de CV	15.5
Curtosis	0.10153
Coefficiente de asimetría de Fisher	0.28
Coefficiente de asimetría de Pearson	- 0.14
Coefficiente estadístico de Anderson - Darling	0.887

Los resultados de adhesión previamente fueron graficados con base en su valor de distribución, obteniéndose la figura 18.

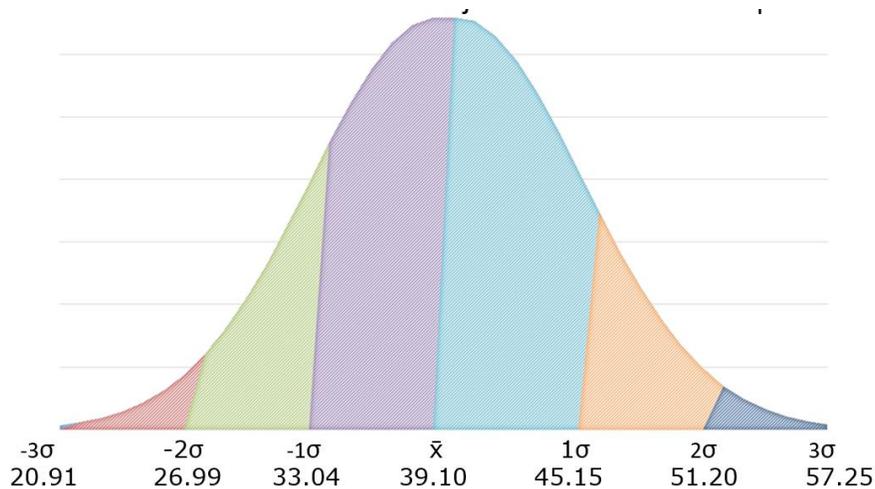
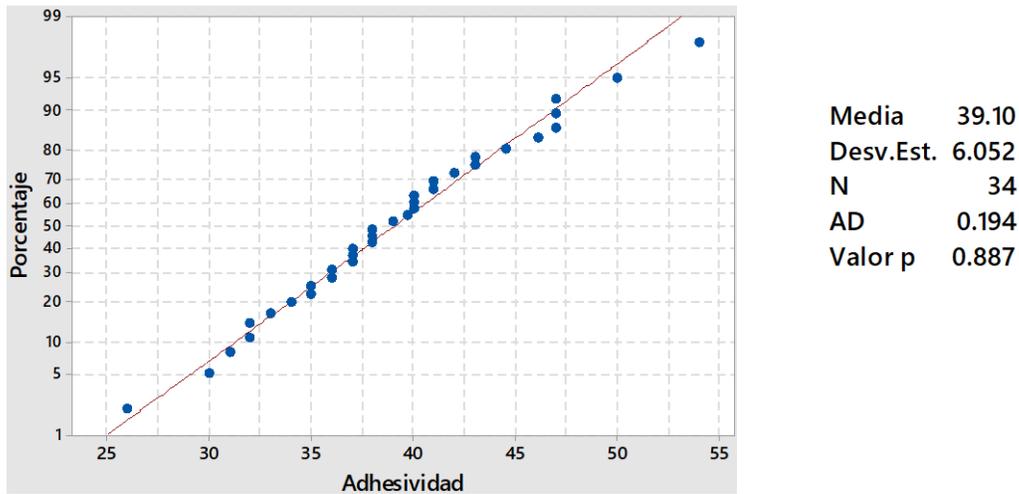


Figura 18. Campana de Gauss de los porcentajes de adhesividad plaquetaria.

Para corroborar si era una distribución normal se usaron los coeficientes de *Pearson* y *Fisher* los cuales indican que si el coeficiente es "0" consiste en una

distribución, el coeficiente de Fisher calculado fue de 0.28 en cambio el de Pearson fue de -0.14, ambos muy cercanos a “0” por lo cual se realizó una prueba confirmatoria, este fue el estadístico de *Anderson-Darling* y el resultado obtenido fue el siguiente:



Gráfica 1. Regresión lineal de Anderson-Darling con sus respectivos datos estadísticos.

En dicha gráfica se observó que los valores están sumamente cercanos a una línea recta además es importante el **valor p** indicado al lado del gráfico, cuando el valor p es mayor a 0.05 (o el 5%) indica que los datos provienen de una distribución normal, en este caso fue una prueba positiva ya que el valor p fue de 0.88

A partir de esto se logró calcular de forma rápida los valores de referencia usando únicamente el valor previo de desviación estándar (σ) y el promedio (\bar{x}) por medio de la siguiente fórmula:

$$L_i = \bar{X} - 2\sigma$$

$$L_s = \bar{X} + 2\sigma$$

Esto nos lleva a obtener los siguientes resultados

$$L_i = 39.10 - (2 * 6.052)$$

$$L_s = 39.10 + (2 * 6.052)$$

$$L_i = 26.99 \approx 27$$

$$L_s = 51.20 \approx 51$$

Donde:

L_i: Límite inferior

L_s: Límite superior

Por lo tanto, los valores de referencia de la adhesividad plaquetaria en placa usando el método paramétrico en una población sana de la FES-Cuautitlán Campo 1 son del 27 a 51 %.

Valores de referencia por Método No Paramétrico.

Aunque se sabía que se contaba con una distribución normal se procedió a realizar el cálculo de los valores de referencia por medio del método no paramétrico; para lo que fue necesario verificar la presencia de datos aberrantes mediante la fórmula de Dixon y eliminarlos en caso de que existieran. Es necesario evaluar tanto el número inferior como el superior de la serie.

Para esto se acomodaron los datos de nueva cuenta en orden ascendente. De los resultados de adhesividad son importantes para este caso el primero y el ultimo los cuales se encuentran indicados en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentajes de adhesividad plaquetaria ordenados de forma ascendente.

Numero de paciente	%Adhesividad
1	26
34	54

Sustituyendo la fórmula de Dixon previamente mencionando obtenemos lo siguiente:

$$|X_n - X_{n-1}| \geq \frac{X_f - X_i}{3}$$

Evaluando 26:

$$|26 - 30| = 4$$

Evaluando 54

$$|54 - 50| = 4$$

$$\frac{54 - 26}{3} = 9.3$$

En ambos casos, la regla de Dixon se cumple, por lo cual ambos datos no se consideraron como valores aberrantes y se dice que todos los resultados son

pertencientes a dicha serie. Para la determinación de los límites de referencia bastó con sustituir las ecuaciones propias del método de percentiles.

$$\begin{aligned}L_1 &= 0.025(N + 1) & L_2 &= 0.975(N + 1) \\L_1 &= 0.025(34 + 1) & L_2 &= 0.975(34 + 1) \\L_1 &= 0.875 \therefore 1 & L_2 &= 34.125 \therefore 34\end{aligned}$$

Estos valores indicaron la posición de los datos en la serie que serían eliminados. Se eliminó el primer dato y la posición 34 de la serie, es decir los valores 26 y 54 respectivamente.

Por lo tanto, los valores de referencia de la Adhesividad plaquetaria en placa usando el método no paramétrico o de percentiles en una población sana de la FES-Cuautitlán Campo 1 son del 30 a 50 %.

Es importante recalcar que el cálculo de los valores de referencia se realizó por ambos métodos para mostrar el correspondiente tratamiento estadístico que debe realizarse en cada caso; sin embargo, cuando se logra obtener un conjunto de datos o resultados de una población es importante determinar el tipo de distribución que presentan sea normal o no y con base en esto poder determinar cuál será el mejor método estadístico. De igual forma cada método tiene sus particularidades que fueron descritas previamente (revisar apartado 1.5 Teoría de valores de referencia).

Para este proyecto en específico y con base en el comportamiento de los resultados obtenidos es posible determinar que el método idóneo a emplear para la determinación de los correspondientes valores de referencia es el método paramétrico, por lo cual los valores de referencia asignados son del 27 a 51 % de plaquetas adheridas.

6.4 Metodología de adhesividad plaquetaria en una placa de vidrio

1. Establecer criterios de inclusión y exclusión de la población a utilizar.
2. Recolectar una muestra de sangre periférica utilizando como anticoagulante citrato de sodio al 3.2%
 - 2.1 Se recomienda recolectar la muestra por sistema al vacío obteniendo un volumen total de sangre anticoagulada de 12 mL
3. Centrifugar la muestra a 1500 rpm por 10 min para obtener plasma rico en plaquetas (PRP) y posteriormente separarlo del paquete globular con ayuda de una pipeta de transferencia.
4. Realizar un conteo inicial de plaquetas en cámara de Neubauer
 - 4.1 Realizar una dilución 1:200 del PRP, utilizando como diluyente colorante Rees Ecker.
 - 4.2 Revisar escrupulosamente que la cámara de Neubauer se encuentre limpia y llenar ambas cámaras con la muestra diluida.
 - 4.3 Colocar la cámara de Neubauer en cámara húmeda por 10 minutos.
 - 4.4 Montar la cámara de Neubauer en el microscopio, enfocar a 10X localizando la cuadrícula central y después enfocar a 40X
 - 4.5 Contar la cuadrícula central de la cámara de Neubauer (a 40X) con ayuda de un contador celular, el número de plaquetas será multiplicado por el factor de dilución (2000), lo cual permitirá determinar la concentración de plaquetas en un mm^3 o en microlitro (μL).
5. Adherir plaquetas a una placa de vidrio.
 - 5.1 Realizar una dilución 1:2 de PRP con solución salina fisiológica (SSF),
 - 5.2 Colocar un portaobjetos dentro de una caja Petri de plástico de 100 mm, que este sobre un soporte de plástico.
 - 5.3 Colocar todo el PRP diluido en el portaobjetos de forma rápida y constante de tal manera que se cubra en su totalidad el portaobjetos y no se generen burbujas.
 - 5.4 En cuanto se coloca el PRP diluido en el portaobjeto se deben cronometrar 5 min exactos y cuando estos concluyan se debe decantar el contenido la solución sobre la caja Petri de plástico.

5.5 Recuperar el PRP diluido con una pipeta de transferencia

5.6 El portaobjetos se dejará inclinado sobre una superficie hasta que esté completamente seco.

6. Realizar conteo de plaquetas NO adheridas en cámara de Neubauer, diluyendo la muestra 1:100.

6.1 Repetir los pasos del numeral 4.2 a 4.5

6.2 Calcular el porcentaje de plaquetas adheridas, empleando la siguiente formula:

$$\% pa = 100 - \left(\frac{X_f}{X_i * 100} \right)$$

Donde:

% PA: Porcentaje de plaquetas adheridas

X_f: Conteo final (Posterior al proceso de adhesión en placa)

X_i: Conteo inicial de plaquetas

7. Teñir portaobjetos con plaquetas adheridas, se recomienda ocupar la Tinción de Wright

7.1 Una vez que el frotis está totalmente seco adicionar el colorante de Wright y dejar con el colorante por 7 min, evitando que se seque la preparación

7.2 Sin decantar el colorante adicionar el buffer de Fosfatos (un volumen equivalente al empleado originalmente con el colorante de Wright) y dejar reposar por 15 min con el buffer

7.3 Decantar y enjuagar con agua corriente, evitar el contacto directo del chorro de agua con el frotis.

7.4 Dejar secar el frotis teñido a temperatura ambiente, posteriormente montar en microscopio.

7.5 Enfocar a 10X, 40X en búsqueda de una zona apropiada para observar con objetivo de inmersión 100X.

7. Análisis de resultados y discusión

En la implementación de cualquier técnica o procedimiento nuevo de laboratorio es necesario estandarizar sus condiciones y características específicas, en México existe un organismo en particular, la Entidad Mexicana de Acreditación a.c. (EMA) la cual da recomendaciones al respecto, en su documento “Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico” (2017), que menciona que es de suma importancia la precisión de una prueba y que los conceptos estadísticos que se deben emplear para evaluarla son la media (\bar{x}), desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación (% CV).

Siguiendo las recomendaciones emitidas por la EMA, en el presente trabajo se buscó en todo momento estandarizar cada paso de la técnica propuesta, empezando por el conteo manual de plaquetas, en este aspecto la desviación obtenida fue de 19 y un promedio de 361.1×10^3

Estadísticamente hablando, un CV menor a 7 % indica que el método es preciso, lo cual resulta sumamente importante en este caso, ya que se trata de una técnica completamente manual, lo cual aumenta el porcentaje de tener errores que se pueden presentar durante su realización (DANE, 2008).

Por otro lado, un aspecto que resultó de suma importancia en la implementación de la presente metodología fue la selección del anticoagulante a emplear, una de las diferencias observadas es la cantidad inicial de plaquetas, utilizando EDTA fue posible contabilizar un mayor número de células con respecto al obtenido usando citrato de sodio, esta disminución está asociada a la dilución que se presenta en la muestra al utilizar citrato de sodio, ya que como se ha mencionado por cada 9 partes de sangre es necesario utilizar 1 parte de citrato de sodio, lo cual representa una disminución del 10 % en la muestra total, dicha situación no se suele presentar usando EDTA ya que comúnmente este se encuentra impregnado en las paredes del tubo recolector o al vacío (Agustino, et. al., 2002).

En otros experimentos se ha analizado la estabilidad de la muestra con ambos anticoagulantes observando que el número de plaquetas se mantiene

constante; sin embargo, un anticoagulante que presenta una clara disminución en dichos estudios ha sido la heparina de sodio, mostrando después de varios minutos agregado o cúmulos plaquetarios modificando también el VPM (Sujeros, Pieri y Orsilles, 2000).

No existen muchos estudios que expliquen o analicen las alteraciones morfológicas que se presentan en las plaquetas dependiendo del uso de anticoagulante, de hecho, se han llegado a mencionar que los resultados entre ambos pueden ser comparables ya que un buen anticoagulante debe de poder preservar la morfología plaquetaria (Rangel, et. Al., 2009).

Sin embargo, durante la experimentación fue posible observar ligeras anormalidades morfológicas, presentándose un pequeño alargamiento con respecto a su forma esférica, sin llegar a una etapa de activación y mucho menos de agregación, lo que se asocia al comportamiento o mecanismo de acción del citrato de sodio con respecto del EDTA, el citrato de sodio se fija y forma un complejo (quelado) con el calcio ionizado (y magnesio) presente en la sangre del paciente. Este calcio ionizado es aquel que se encuentra libre en circulación, también es conocido como factor IV de la coagulación, de tal forma que al ser capturado por el citrato se inhibe o detiene el proceso de coagulación (Lundia, 2009).

De igual forma el EDTA forma complejos con el calcio; sin embargo, en este caso la unión es más fuerte, logrando quelar el calcio total (aún aquel que se encuentra adherido a proteínas) presente en la muestra y como se indicó en el numeral 1.2.2. el calcio es de suma importancia para la regulación del citoesqueleto de la plaqueta, por lo cual al haber formado complejos con el EDTA la disponibilidad de este ion se ve drásticamente reducida, generando así una reestructuración en el citoesqueleto y por ende se generan cambios en la morfología de la plaqueta (González y Moreno,2007).

Aunque se ha analizado la interacción de los anticoagulantes con los índices plaquetarios aún no se ha estudiado a fondo su efecto en los procesos de adhesión y agregación de las plaquetas, por lo cual no es posible explicar a detalle el por qué la diferencia tan amplia entre los porcentajes de adhesión de plaquetas; sin

embargo, se ha sugerido que el EDTA al lograr secuestrar por completo el calcio de la muestra impide que la plaqueta se active al contacto con una superficie de vidrio, lo cual conlleva a un menor número de plaquetas adheridas, en cambio con el citrato aún existe una pequeña cantidad de calcio disponible en la plaqueta, sea que se encuentre unido a proteínas o inmerso en el contenido de los gránulos, lo cual permite que la plaqueta se active o tenga un mejor proceso de adherencia a una superficie cargada con cargas negativas como lo es el vidrio.

Otro motivo de promover el uso de citrato con respecto a EDTA, es que permite descartar la presencia de una pseudotrombocitopenia asociada a EDTA, a pesar que la incidencia de los casos es de apenas el 0.09 a 0.11 % de la población en general. Se cree que dicho fenómeno *in vitro* se asocia a inmunoglobulina de tipo IgM e IgG que son reactivas a temperaturas menos de 37 °C y que las plaquetas al entrar en contacto con el EDTA se producen cambios conformacionales generando una mayor expresión de GP IIb/IIIa, mismas que reacción con las IgG e IgM previamente mencionadas, generando un efecto de agregación plaquetaria y por ende una baja en los recuentos de las mismas (Reyes, Ávila y Villacrés., 2019).

De igual forma el EDTA puede afectar a la membrana de los polimorfonucleares, lo cual lleva a que se formen puentes entre estas dos células, usando la fracción variable de anticuerpo contra GP IIb/IIIa y la fracción cristalizable del receptor contra neutrófilos, dicho fenómeno ha recibido el nombre de satelitismo plaquetarios (Chakrabarti, 2014).

Para poder observar correctamente a las plaquetas y poder contarlas, fue necesario seleccionar un colorante que permitiera su diferenciación sin causar alteraciones morfológicas y que fuera estable a temperatura ambiente, para esto se probaron dos soluciones, la primera fue el colorante comercial de Rees Ecker y por otra parte se evaluó una mezcla de oxalato de amonio al 1 % adicionada con azul de cresil brillante.

El colorante de Rees Ecker debe su nombre a dos doctores (Enrique E. Ecker y H. Mayarad Rees) que en 1923 dedicaron sus esfuerzos para obtener una técnica que permitiera el conteo de plaquetas, en su estudio ellos sugieren el uso de citrato

de sodio al 3.8 % como anticoagulante además de usar una solución de formaldehído al 0.2 % y azul de cresil brillante al 0.1 %, dicha investigación fue recopilada en un artículo del mismo año bajo el título “Un método mejorado para el conteo de plaquetas sanguíneas” (An improved method for counting blood platelets). Por otro lado, el azul de cresil brillante es una solución colorante que es ampliamente usada en hematología, especialmente en el recuento de reticulocitos (Rees y Ecker, 1923).

Tomando esto en cuenta, se procedió a evaluar la morfología de las plaquetas, notando claras diferencias entre ambos colorantes, la primera diferencia notable fue la preservación de la morfología original de las plaquetas, con la solución de oxalato de amonio se observaron plaquetas de formas variadas caso contrario que con la solución de Rees Ecker donde las plaquetas mantenían su forma original y estaban mejor distribuidas.

Estas diferencias pueden deberse principalmente al formaldehído o formol presente en el colorante de Rees Ecker, que es ampliamente usado como conservador y fijador de una gran variedad de muestras biológicas, ya que logra formar enlaces cruzados entre las proteínas y los ácidos nucleicos de las células permitiendo su preservación de igual forma esto permite que las plaquetas puedan mantener una buena distribución en la superficie de contacto (CRUE, 2015). Por estos motivos, es que se prefirió la solución de Rees Ecker como colorante y poder asegurar una buena observación morfológica y un adecuado conteo plaquetario.

Uno de los aspectos más trascendentales fue la selección del tiempo de contacto o adhesión de las plaquetas, ya que una exposición prolongada podría causar su activación y posterior agregación, es importante mencionar que las técnicas previamente mencionadas estaban basadas en sistemas donde el plasma permanecía en movimiento, de igual forma con la implementación de equipos automatizados las técnicas manuales empezaron a caer en desuso, por lo que fue complicado encontrar algún referente con el cual comparar los resultados.

Por tal motivo, fue necesario realizar la metodología con diferentes periodos de contacto (consultar tabla 12). De igual forma correlacionaron los resultados con

la morfología observada en cada tiempo evaluado. Para este experimento el tiempo de contacto idóneo fue a 5 min exactos, ya que fue donde se obtuvo el porcentaje más alto de plaquetas adheridas a la placa de vidrio siendo este del 49 %, además la morfología de las plaquetas no presentó alteración alguna y no se observaron agregados plaquetarios, sino por el contrario la muestra presentaba una buena distribución a lo largo de la placa, perfectamente separadas entre sí, y mantenían una forma discoidal.

Es importante mencionar que las placas de vidrio en donde se realizó el proceso de adhesión plaquetaria fueron teñidas mediante la tinción de Wright con el fin de poder evidenciar y apreciar las plaquetas que se lograron adherir, además de poder descartar la presencia de agregados plaquetarios; sin embargo no es posible descartar por completo la presencia de dichos agregados, en casos donde sea completamente necesario evaluar que no se hayan formado agregados plaquetarios es posible hacer uso de la citometría de flujo, ya que durante los procesos de agregación se presentan cambios de las señales de FS y SS de partículas positivas para un marcador específico de la plaqueta (por ejemplo el CD41) (Monteiro, Martínez, Marcial, y O'Connor, 2002).

El motivo por el cual se buscaron las condiciones óptimas de trabajo no solo fue para obtener buenos resultados, también se buscaba la validación de este método analítico, ya que se deben cumplir ciertas características, por ejemplo, debe ser evaluado de manera sistemática, experimental y documentada, de esta manera se puede demostrar que se cumplen los requisitos mínimos necesarios para lo que fue diseñada la técnica (Escalona y Acosta, 2007).

Uno de los primeros aspectos que se evaluaron fue la repetibilidad, por esto mismo se siguieron las recomendaciones de diversas instituciones que indican que se debe repetir la técnica bajo las mismas condiciones (mínimo por triplicado), con la finalidad de poder obtener resultados que puedan ser comparados entre sí, debido a esto algunos autores lo refieren como precisión. El valor del porcentaje de CV fue cercano al 9 % esto puede ser interpretado como una prueba de precisión aceptable, indicando así que las condiciones en las cuales se realizó el experimento

son prácticamente las mismas y que los resultados no sufrieron modificaciones significativas (DANE, 2008).

Sin embargo, para complementar este aspecto se evaluó la reproducibilidad del método, siendo este un aspecto que le confiere mayor confiabilidad a la técnica, los resultados recabados de la experimentación realizada por 3 químicos con la habilidad y experiencia necesaria mostraron un CV cercano al 7%, lo que se puede interpretar como una prueba precisa, ya que se debe tomar en cuenta la complejidad que conlleva un método manual (DANE, 2008). Esto resulta de suma importancia ya que muchos expertos indican si el método es válido o no a partir de dicho coeficiente, debido a que está conformado por dos estadísticos que reflejan diferentes características de una misma población (Bowman, 2001).

Otro aspecto relevante fue analizar la robustez del método, ya que así se logró observar el impacto que tuvieron algunas motivaciones sobre los resultados obtenidos; de las diferentes modificaciones realizadas solo 2 mostraron tener un gran efecto sobre los resultados, estas fueron: la solución colorante y el tiempo de contacto usado (el respectivo análisis de dichas variables está indicado previamente en la presente sección). De cierta forma estas dos variables son fáciles de controlar ya que siempre y cuando se cuente con la solución colorante adecuada y se pueda cronometrar el tiempo exacto de contacto los resultados no deberán presentar alteraciones significativas.

Es importante señalar que durante la realización de la metodología el principal temor era que al cambiar al analista los resultados fueran poco precisos entre sí, asociándose principalmente a la falta de práctica con la técnica; sin embargo, este no fue el caso ya que los resultados resultaron ser precisos, detalle que fue demostrado al analizar el correspondiente porcentaje de coeficiente de variación. Esto permite señalar que la técnica presentada si cuenta con la robustez necesaria para poder ser realizada sin mayor problema.

Una de las cuestiones de suma importancia en toda técnica es poder controlar el grado de error durante su realización, en este caso como ya se ha comentado en reiteradas ocasiones, por tratarse de un método manual es más complicado poder

controlar el proceso; sin embargo, es posible puntualizar los puntos en los cuales se debe tener mayor cuidado, como lo son:

- Que el personal que vaya a realizar la técnica tenga conocimiento pleno de la misma y que se le puedan resolver sus dudas
- Contar con el material necesario para la realización en óptimas condiciones, sea que se ocupe material nuevo o que este perfectamente limpio.
- Contar con una muestra biológica que haya cumplido con los criterios de inclusión y exclusión previamente mencionados.
- Cuidar el buen estado de los reactivos, manteniendo limpias las soluciones colorantes.
- Tener cuidado con los tiempos de incubación y de contacto, cuidando que en lo más exactos posibles.

Los valores de referencia son herramientas fundamentales usadas para el cuidado de la salud por los laboratorios clínicos y son de gran importancia al grado que han surgido diversas guías internacionales donde se encuentran recomendaciones para su correcto cálculo, una de ellas es la guía del CLSI EP28-A3c, en la cual se indica que deben estar formados por una muestra representativa de la población a estudiar y que abarquen al 95 % de los resultados de la población sana, otro aspecto fundamental es que su cálculo dependerá de la dificultad de la metodología y capacidad de análisis que se cuenta en el laboratorio (Ozarda, et. al., 2015).

Estadísticamente se considera representativo un número de individuos mayor a 20, por esta razón se decidió usar un número mayor de pacientes para asegurar que la muestra fuera representativa, siendo este de 34 individuos sanos, tanto hombre y mujeres, además se tomó en cuenta la posible presencia de valores aberrantes.

La estimación de los valores de referencia se puede realizar principalmente por dos métodos estadísticos, el método paramétrico y no paramétrico; sin embargo, para poder escoger entre alguno de estos dos es necesario analizar los datos obtenidos durante la experimentación, especialmente definir el comportamiento

estadístico y determinar qué tipo de distribución presenta (consultar apartado 1.5.2 Método estadístico).

- Método paramétrico. De acuerdo con las recomendaciones del Panel de expertos en la teoría de valores de referencia (PETVR) se recomienda seguir dos etapas, la primera consiste en transformar los datos a un modelo de campana de Gauss (ver grafica 2) y la segunda es corroborar con base a la gráfica obtenida si el comportamiento corresponde a una distribución normal (Solberg,2004).

Cuando esto se realizó se generó incertidumbre al respecto, ya que la gráfica presentaba una ligera inclinación a la derecha, por lo cual, se requirió utilizar diversos índices o pruebas estadísticas que permitieran determinar qué tipo de distribución se observaba como lo son el coeficiente de *Fisher* y *Pearson*.

Sin embargo, los resultados no permitieron determinar el tipo de distribución (revisar sección de Resultados, valores de referencia por método paramétrico), por lo cual se empleó el coeficiente de estadístico de *Anderson-Darling*, ya que es uno de los estadísticos más potentes para poder detectar la discrepancia con respecto a la normalidad, aunado el hecho que se puede emplear en muestras de bajo nivel donde $n \leq 25$ (Reyes, 2008). Esta prueba indicó que los datos presentaban una distribución normal.

Si la prueba hubiera indicado que los datos no presentaban una distribución normal no podría seguir con el procedimiento ya que el resultado carecería de confiabilidad. Posterior a esto se pudo realizar el cálculo de los valores de referencia usando la formula correspondiente (revisar sección de Resultados, valores de referencia por método paramétrico), lo cual llevo a obtener el intervalo de 27 a 51 % de plaquetas adheridas a una superficie de vidrio.

- Método no paramétrico. Es comúnmente utilizado en diversos estudios para obtener valores de referencia y es ampliamente recomendado su uso por la IFCC, principalmente porque no requiere un tratamiento estadístico tan detallado como en el método paramétrico ya que no es necesario corroborar el tipo d distribución que se presenta en los resultados obtenidos, sin embargo; lo que muchas veces se desconoce es que el método es recomendado en aquellos estudios donde se obtiene como mínimo una cantidad de 120 resultados (cabe mencionar que el

numero de 120 no es un valor definido, más bien es un mínimo recomendado) (Solberg,2004).

Siguiendo el procedimiento descrito para este método (revisar sección de Resultados, valores de referencia por método no paramétrico) se obtuvo como intervalo de referencia los valores de 26 a 54 % de plaquetas adheridas a una superficie de vidrio; sin embargo, no se recomienda en absoluto tomar en cuenta dicho intervalo ya que no se cumple el mínimo de resultados (120), pero se mostró su cálculo con fines demostrativos aunado a esto recordar que se busca presentar una técnica que pueda ser empleada en un laboratorio de análisis clínicos a nivel de docencia o enseñanza.

También como parte de la validación de un método es necesario corroborar la precisión de sus resultados, por esta razón una vez que se obtuvieron los porcentajes de adhesividad de todos los pacientes se calcularon los parámetros estadísticos indicados en la tabla 16 (sección de resultados), de estos datos los más relevantes son la desviación estándar y el coeficiente de variación.

En esta ocasión el CV fue elevado, esto se asocia directamente a la cantidad de muestras realizadas, ya que la posibilidad que se presenten errores aleatorios es aún mayor por tratarse de una técnica manual, también se debe tomar en cuenta que el uso del CV ya no es tan usado y se ha optado por diferentes parámetros como la desviación estándar la cual no tiene un valor tan elevado (de 6 unidades) esto indica que los datos no se encuentran tan dispersos entre ellos (Delgado, 2009).

Es importante recordar que la metodología aquí presentada no consideran algunos aspectos biológicos que se presenta *in vivo* en el organismos del paciente como lo es la fuerza de cizallamiento, dicha fuerza depende principalmente de la zona en la cual la plaqueta se encuentre, por ejemplo en la microcirculación y en las arterias dicha fuerza es sumamente alta por lo cual las plaquetas requerirán de un cofactor para lograr adherirse al colágeno y demás receptores de plaquetas, dicho cofactor es FvW (Monteiro, O'Connor y Martínez, 2001).

Si bien se ha mostrado que las fuerzas de cizallamiento transiten señales moleculares a través de las membranas aún no se ha logrado describir por completo, pero todo indica que son iniciados a partir de la GPIb (Monteiro, O'Connor y Martínez, 2001)

Aunque, cada método tiene su propio fundamento es posible realizar una comparación entre sus respectivos intervalos de referencia.

Tabla 19. Comparación de los intervalos de referencia con respecto al método empleado.

Método de adhesividad	Intervalos de referencia	Unidades
<i>In vivo</i>	SIN DATOS	%
Técnica de Salzman	30 – 50	%
Técnica de Hellem	40 – 50	%
Técnica de Breddin	0.7 – 1.4	Adimensional
Técnica de Prost	40 – 50 (4° pase)	%
	70 (9° pase)	%
Técnica de adhesión en placa		
a) M. Paramétrico	27 – 51	%
b) M. No paramétrico	26 - 54	%

Debido a la antigüedad y el desuso de algunas técnicas resulta difícil el poder indicar si los valores de referencia siguen siendo vigentes y aplicables; en el caso del método *in vivo* no se logró encontrar los intervalos de referencia en la literatura disponible.

Cabe mencionar que aún existen diversos aspectos que se pueden mejorar en la técnica, como aumentar el número de pacientes a 120 con la finalidad de poder realizar correctamente el cálculo de sus intervalos de referencia por el método no paramétrico, establecer criterios de exclusión más específicos que permitan eliminar la mayor cantidad de variables o interferencias de la muestra, proponer o diseñar técnicas de conteo plaquetario en las que se pueda eliminar la variación entre conteos del mismo o diferente analista. Estas mejoras claramente se verían reflejadas en la precisión de la prueba (CV).

El método presentado cumple el propósito de poder ser utilizado en un laboratorio de enseñanza ya que en todo momento se tomaron en cuenta los

recursos disponibles en el laboratorio, se buscó que la técnica tuviera las siguientes características:

- Bajo impacto económico, es decir que el material como colorantes, reactivos e insumos a utilizar no fuera costoso.
- No requiere de equipos especiales como lo son equipos automatizados.
- No requiere una preparación especial el analista.
- Puede realizarse en condiciones de temperatura ambiente, aunque se recomienda su realización en lugares onde no fluctué excesivamente la temperatura.
- Producción baja de desechos y RPBI, además que algunos de los insumos en caso de ser necesario pueden reutilizarse, aunque queda a consideración de cada laboratorio.

Todas estas condiciones planteadas permiten que la técnica sea versátil y pueda realizarse prácticamente en cualquier laboratorio, aunque no sea de enseñanza.

8. Conclusiones

- Se diseñó, estandarizó y optimizó una técnica de adhesividad plaquetaria en placa *in vitro*, de modo que se tuviera un método confiable, reproducible y fácil de realizar en futuras ocasiones; además que fuera acorde a las condiciones que se cuentan en un laboratorio de enseñanza tanto de equipos como de reactivos.
- Fue posible la implementación de dicha técnica en una población sana representativa de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, lo cual permitió la obtención de los correspondientes valores de referencia, mediante el método paramétrico, que fue el apropiado para su obtención, resultando un rango de 27 al 51 % de plaquetas adheridas a una superficie de vidrio.
- Se propusieron puntos que podrían mejorarse de la presente metodología que llevarán a la obtención de resultados más confiables y representativos tanto de la población, como del paciente (como individuo) al que se realice dicha técnica.

Referencias

1. Agustino, A., Piqueras, R., García de Rojas M., et. Al. (2002). Recuento de plaquetas y volumen plaquetario medio en una población sana. *Revista de Diagnóstico Biológico*. 51, 1-5, 2019, julio 12. scielo.com.isciii.es
2. Arias, J., Villasis, M. y Miranda, M. (2016). El protocolo de investigación III: la población de estudio. *Revista de Alergias Mexicana*, 63, 201 - 206.
3. Asadurian, P. (2011). Exposición al humo de tabaco y trombosis. *Revista uruguaya de cardialgia*, 26, 5-11.
4. Aulesa, R., Ruíz, G., Durán, J. y Galimani. R. (2002). Estudio de la influencia de la hemólisis en un perfil básico de coagulación. *Revista de diagnóstico biológico*, 51, 2-15.
5. Barreto, R. (2001). Evolución de un programa de control de calidad aplicado a la obtención de valores de referencia. México: UNAM.
6. Bermejo, E. (2017). Plaquetas. *Hematología*, 21, 10-18. 2017, diciembre 26, De *Hematología Base de datos*.
7. Bowman, D.T. 2001. Common use of the CV: a statistical aberration in crop performance trials (Contemporary Issue). *J. Cotton Sci.* 5:137-141.
8. Cabrera, Y. y Castillo D. (2014). Trombocitopenia en el embarazo: gestacional, inmune y congénita. *Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter*, 30, 196-207.
9. Chakrabarti I. (2014). Platelet satellitism: a rare, interesting, in vitro phenomenon. *Indian journal of hematology & blood transfusion: an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*, 30(3), 213–214.
10. Chávez, L. (2012). Antiplaquetarios. *Revista Costarricense de Cardiología*, 14, 1-2.
11. Ceriotti, F. y Henny, J. (2008). "Are my laboratory results normal?" Considerations to be Made Concerning Reference Intervals and Decision Limits. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry*, 19, 106-114. 2017, junio 10, De *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Base de datos*.
12. Comisión Nacional de Bioética (2010). *Guía Nacional para la Integración y el Funcionamiento de los Comités de Hospitalarios de Bioética*. Secretaria de Salud, 2010. 60, págs.
13. CONBIOÉTICA. (2015). Normas para la redacción del consentimiento informado, recomendadas por CIOMS. marzo 01, 2019, de CONBIOÉTICA Sitio web: <http://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx>
14. Crespo, R. (2013). *Fórmulas y apuntes de Estadística aplicada a las ciencias sociales*. Cuba: Creative Commons.
15. CRUE. (2015). Utilización de formaldehído como conservante y fijante de muestras anatómicas. *Grupo de prevención de riesgos laborales*, 01, 2-39.

16. Delgado, G. (2009). Validación y verificación de métodos de ensayos. Un dilema en los laboratorios de ensayos y en las auditorías de la acreditación. *Univerisitas*, 3, 14-21. 2017, mayo 13, De Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León Base de datos.
17. DANE. (2008). Estimación e interpretación del coeficiente de variación de la encuesta cocensal. *Dirección de censos y demografía*, 2008, 5-6.
18. Dion, I., Baquey, C. y Monties, J.R. (1993). A new model to test platelet adhesion under dynamic conditions. *The International Journal of Artificial Organs*, 16, 545-550. 2018, mayo 10, De The International Journal of Artificial Organs Base de datos.
19. Duffau. B., Rojas. F., Guerrero. I., et. al. (2010). Validación de los métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Chile: Instituto de Salud Pública.
20. Escalona, M y Acosta, A. (2007). Validación de los métodos de laboratorio. *Revista chilena de tecnología médica*, 27, 1387-1394. 2017, mayo 15, De Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Base de datos.
21. EUPATI. (2015). Criterios de inclusión. mayo, 2019, de Academia Europea de Pacientes Sitio web: <https://www.eupati.eu/es/glossary/criterios-de-inclusion>
22. Flores, I., Ramírez, K., Meza, J. y Arturo, J. (2014). Fisiología de la Coagulación. *Revista mexicana de Anestesiología*, 37, 382-386. 2017, mayo 04, De www.medigraphic.com/rma Base de datos.
23. FMH. (2012). Síndrome de Bernard-Soulier. marzo 04, 2019, de Federación Mundial de Hemofilia Sitio web: <https://www.wfh.org/es/page.aspx?pid=946>
24. Fuentes, X. (2011). Intervalos de referencia biológicos. *NOTICONAQUIC*, 54, 46-51. 2017, junio 07, De NOTICONAQUIC Base de datos.
25. García, E. y Jay, D. (2006). Filamina plaquetaria: Una proteína del citoesqueleto integradora de la función celular. *Archivos de Cardiología de México*, 76, 67-75. 2017, noviembre 01, De Instituto Nacional de Cardiología Base de datos.
26. García, M. y Coma, C. (2000). Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Revista Cubana de angiología y cirugía vascular*, 2, 132-141. 2017, agosto 27, De Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular Base de datos.
27. Gómez, B., Rodríguez, F. y Díaz, E. (2018). Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Medicina interna mexicana*, 34, 244-260.
28. González, A., Falcón, C. y Fortoul, T. (2010). Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis. *Gaceta Medica mexicana*, 146, 136-148. 2017, julio 17, De www.anmm.org.mx Base de datos.
29. González, M. y Moreno, L. (2007). Plaquetas, morfología, bioquímica, función, patología y pruebas de diagnóstico. México: UNAM.

30. Henny, J., Vassault, A., Bousier, G., et al. (2016). Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54, 1893-1900. 2016, noviembre 30, De De Gruyter Base de datos.
31. Hoon Yun, S., Sim, E., Goh, R., et al. (2016). Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed Research International*, 26, 1-7. 2017, noviembre 30, De <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9060143> Base de datos.
32. Horowitz, G. (2008). Reference Intervals: Practical Aspects. *Journal of the International Federation of Clinical*, 19, 95-105. 2017, junio 10, De Journal of the International Federation of Clinical Base de datos.
33. Ingelmo, M. (1978). Métodos y técnicas. En Contribución al reconocimiento de la hiperfunción plaquetaria en la clínica (82-83). Barcelona, España: Universidad de Barcelona.
34. James, B. (2010). Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian Journal of Andrology*, 12, 83-90. 2017, junio 06, De www.nature.com/aja Base de datos.
35. Jones, G. y Barker, A. (2008). Reference Intervals. *The Clinical Biochemist Reviews*, 29, 93-97. 2017, junio 19, De The Clinical Biochemist Reviews Base de datos.
36. Kellie, R y Joseph, E. (2017). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of Cell Biology*, 201, 785-793. 2017, julio 20, De jcb.rupress.org Base de datos.
37. Kellie, R., Kelly, E., Rajesh, K., et al. (2016). CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. *Blood*, 127, 921-925. 2017, agosto 30, De www.bloodjournal.org Base de datos.
38. Kulkarni, S., Sacha, M. et al. (2000). A revised model of platelet aggregation. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 783-791. 2017, enero 01, De www.jci.org Base de datos.
39. López, A. y Macaya, C. (2013). Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*, 1131, 2-7.
40. Lundia, G. (2009). Anticoagulación con citrato mediante sistema Prismaflex ®. GAMBRO. 10-15.
41. Martínez, C. (2006). Mecanismos de activación de la Coagulación. *Revista médica del instituto mexicano del seguro social*, 44, 51-58. 2017, noviembre 29, De Medigraphic Base de datos.
42. Martínez, M., López, B. y Parra, I. (2015). Pruebas de laboratorio para la evaluación de la función de las plaquetas. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 62, 245-252. 2018. mayo 18, De www.medigraphic.com/patologiaclinica Base de datos.
43. Michelson, A. (2013). *Platelets*. 3rd ed. USA: Elsevier.
44. Ministerio de Salud. (2013). Manual de toma, manejo y envío de muestras de laboratorio. El Salvador: Ministerio de Salud.

45. Monteiro, M.C., O'Connor, J.E., & Martínez, M. (2001). La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas: (I) Aspectos Estructurales y Funcionales de las Plaquetas. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50(3), 111-136. Recuperado en marzo de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000300002&lng=es&tlng=es.
46. Monteiro, María-do-Céu, Martínez, Marcial, & O'Connor, José Enrique. (2002). La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(3), 87-99. Recuperado en abril 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732002000300001&lng=es&tlng=es.
47. Moore, R., Hawley, A., Sigler, R., Farris, D., Wroblewski, S., Ramacciotti, E. y Myers, D. (2009). El inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 es un marcador temprano de disfunción endotelial en un modelo murino de lesión oxidativa venosa. *Anales de Cirugía Vascul*, 23, 498-505. octubre, 2019, De ELSEVIER Base de datos.
48. Moreno J. (2012). Efecto del plasma rico en plaquetas sobre la codrogénesis. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
49. Morishima, N. y Nakanishi, K. (2016). Proplatelet formation in megakaryocytes is associated with endoplasmic reticulum stress. *Genes to Cells*, 21, 798-806. 2017, julio 21, De Molecular Biology Society of Japan and John Wiley & Sons Australia, Ltd Base de datos.
50. NMX-EC-15189-IMNC-2015. Laboratorios clínicos – Requisitos de la calidad y competencia. Norma Mexicana IMNC, 2015.
51. NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. Norma Oficial mexicana, 27 de marzo de 2012.
52. Ozarda, Y. (2015). Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemia Medica*, 26, 5-16. 2017, junio 16, De <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2016.001> Base de datos.
53. Paramo, J., Panizo, E., Pegenaute, C. y Lecumberri, R. (2009). Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Revista médica universitaria de Navarra*, 53, 19-23. 2017, noviembre 27, De Clínica Universidad de Navarra Base de datos.
54. Pereina, V., Asquino, N., Apellaniz, D., Rossy, B., Tapia, G. y Bologna R. (2016). Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) en Odontología. *Odontología*, 18, 20 - 30. noviembre 2019, De <http://www.scielo.edu.uy> Base de datos.
55. Queralto, J. y Ordoñez, J. (1983). Valores de referencia. *Química Clínica*, 2, 43-56. 2018, agosto 01, De Comité Científico de la Sociedad Española de Química Clínica Base de datos.
56. Ramiro, E. y Caballero, A. (2011, julio-septiembre). Inconsistencia del coeficiente de variación para expresar la variabilidad de un experimento en un modelo de análisis de varianza. *Cultivos tropicales*, 32, 3.

57. Rangel, L., Quintero, M., Archile, A. y Benitez, B. (2009). Evaluación del tripolifosfato de sodio como anticoagulante en determinaciones hematológicas en seres humanos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional*, 25, 34-44.
58. Rees, H. y Ecker, E. (1923). Improved method for counting blood platelets. *The Journal of the American Medical Association*, 80, 621. 2019. septiembre, De Monash University Library Base de datos.
59. Rendon, B., Ponce, Q., Ramírez, I., Rodríguez, L. y et al. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Entidad mexicana de acreditación, a.c., 2008, 20-35.
60. Reyes, P. (2008). Distribución normal, prueba de normalidad. noviembre, 2019, de ICICM Sitio web: <https://icicm.com/index.html>
61. Reyes-Peña IM, Ávila-Zambrano JD, Villacrés-Mosquera LF. (2019). Pseudotrombocitopenia inducida por ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). *Hematol Méx.* 2019 abril-junio;20(2):142-145.
62. Rivadeneyra, L., Ivani, P. y Pozner, R. (2016). Así comienza la vida plaquetaria: un viaje desde los megacariocitos medulares a las plaquetas circulantes. *Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 50, 233-245. 2017, julio 11, De Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana Base de datos.
63. Rivera, J., Lozano, M., Navarro, L. y Vicente, V. (2009). Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Hematology*, 94, 700-712. 2017. noviembre 19, De doi:10.3324/haematol.2008.003178 Base de datos.
64. Rodriguez, J., Orbe, J. y Paramo J. (2007). Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Revista Española de Cardiología*, 60, 959-967. noviembre, 2019, De evespcardiol.org Base de datos
65. Ruggeri, Z. y Mendolicchio, G. (2007). Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circulation Research*, 3, 1673-1683. 2018, mayo 10, De <http://circres.ahajournals.org> Base de datos.
66. Ruiz, E. (2006 abril). Antiagregantes plaquetarios. *Revista Peruana de Cardiología*, 32, 30-31.
67. Sánchez, M. (2007). Valores de referencia o valores de corte clínico: ¿qué criterio tomar en el laboratorio clínico actual? *Bioquímica*, 32, 37-38. 2017, mayo 13, De Medigraphic Base de datos.
68. Santos, J., Andrade, M., Dias, W. y Malheiros, A. (2014). *Platelet-Rich Plasma*. USA: Springer.
69. SEGOB. (2018). PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-007-SSA3-2017, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. marzo, 2020, de SEGON Sitio web: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5511878&fecha=31/01/2018
70. Selvadurai, M., & Hamilton, J. (2018). Structure and function of the open canalicular system – the platelet's specialized internal membrane network. *Platelets*, 1-7. 2019, marzo 01, De *Platelets* Base de datos.

71. Schulze, H. & Italiano, J. (2016). *Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation*. USA. Springer.
72. Schwertz, H. y Weyrich, A. (2010). Platelet precursors display bipolar behavior. *The Journal of Cell Biology*, 191, 699-700. 2017, julio, De jcb.rupress.org Base de datos.
73. Sharathkumar, A. y Shapiro, A. (2008). *Trastornos de la función plaquetaria*. USA: Federación Mundial de Hemofilia.
74. Solberg, H. (2004). The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. *The RefVal Program. Clinical chemistry and laboratory medicine*, 42, 710-714. 2018, agosto 11, De Utrecht University Library Base de datos.
75. Sujeros, G., Pieri, E. y Orsilles, M. (2000). Efecto de distintos anticoagulants sobre índices plaquetarios. *Hematología*, 4, 22-27. 2019, Julio 22.
76. Thon, J., Montalvo, A., Patel, S., et al. (2015). Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *The Journal of Cell Biology*, 191, 961-976. 2017, julio 22, De jcb.rupress.org Base de datos.
77. Thorburn, D., Danzer, K. y Townshend, A. (2009). A Tutorial Discussion of the use of the terms "Robust" and "Rugged" and the Associated Characteristics of "Robustness" and "Ruggedness" as used in Descriptions of Analytical Procedures. *Journal of the Association of Public Analysts*, 37, 40-60. 2017, junio 16, De [Journal of the Association of Public Analysts \(Online\)](http://www.japa.org) Base de datos
78. Todd, L. y Becker, C. (2016). Inhibitors of Platelet Adhesion. *Circulation*, 120, 2488-2495. 2016, septiembre 21, De <http://circ.ahajournals.org> Base de datos.
79. Whyte, C., Mitchell, J y Mutch, N. (2017). Platelet-Mediated Modulation of Fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost*, 43, 115-128. noviembre 2019, De Thieme E-Journals Base de datos
80. Yadav, S., Williamson, J., Aronova, M., Prince, A., et al. (2017). Golgi proteins in circulating human platelets are distributed across non-stacked, scattered structures. *Platelets*, 28, 400 - 408. 2019, febrero 15, De HHS Base de datos.
81. Zharikov, S., & Shiva, S. (2013). Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society Transactions*, 41, 118 - 123. 2019, febrero 4, De NCBI Base de datos.

Anexos

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

Por la presente yo, _____, con ____ años de edad y estudiante de la licenciatura de _____, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo ____ con número de cuenta _____ acepto participar en el proyecto de TESIS EXPERIMENTAL intitulado “Estandarización de técnica y obtención de valores de referencia de Adhesividad plaquetaria en placa”.

El pBQD. Andrés Uriostegui García encargado de realizar la experimentación me ha explicado que este proyecto es fundamental para medir el porcentaje de adhesividad plaquetaria, cuya técnica podrá ser realizada posteriormente en la asignatura de Análisis Bioquímicos Clínicos de Sistemas, para lo cual estoy dispuesto a proporcionar una muestra sanguínea, para lo cual cuento con ____ horas de ayuno.

Estoy enterado y acepto que los datos demográficos (edad, sexo, etc.) y los resultados de los exámenes diagnósticos sean analizados, discutidos y autorizo sean utilizados para su publicación posteriormente, con el conocimiento que nunca será identificado y siempre se mantendrá anonimato y confidencialidad de mi identidad personal. Los resultados se analizarán como grupo y mi nombre no aparecerá en la publicación.

Estoy enterado(a) que este estudio es confidencial y libre de costo.

FIRMA DE AUTORIZACIÓN

RESPONSABLES DE TESIS

Asesora de tesis:

M. en C. Beatriz Lucia González Maldonado FIRMA_____

Tesista:

pBQD. Andrés Uriostegui García FIRMA_____

En caso de cualquier duda puede comunicarse en días laborales de 12 a 19 horas con el pBQD Andrés Uriostegui García al 55-35-04-86-08, al correo electrónico bqd.andres14@hotmail.com o con la asesora de Tesis la M. en C. Beatriz Lucia González Maldonado al correo bhonzales79@comunidad.unam.mx

Número_____

Anexo 2. Inserto del colorante de Rees Ecker



Colorante Plaquetas Rees Ecker

Colorante para el recuento manual de Plaquetas

REF	01681	1 x 50 ml
------------	-------	-----------



PRINCIPIO

El recuento de plaquetas es uno de los métodos de rutina. La condición previa de todos los métodos de recuento es la dilución programada y preparación de una muestra de sangre. La solución de reacción hemoliza la sangre. Se recuenta el tipo de célula deseado en un volumen definido y se calcula el número de células en un microlitro de sangre.

CONTENIDOS

R 1	COLORANTE PLAQUETAS –Listo para su uso
	Azul de Cresilo Brillante R.A. 1 g/l
	Sodio Citrato R.A. 38g/l
	Formol neutro 22 ml
	Agua desmineralizada tipo II 978 ml

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Las soluciones deben almacenarse entre 15°C y 30°C y protegidos de la luz. Después de abierto el contenido almacenado entre 15°C y 30°C y protegidos de la luz es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Temperaturas inferiores a 15°C puede precipitar colorantes de las soluciones colorantes.
- Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Observe la simbología en los rótulos de las soluciones.
- Las soluciones usadas y las caducadas deben eliminarse como desechos especiales, debiendo cumplir las regulaciones locales para el desecho de compuestos peligrosos.

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Microscopio
- Camara de Neubauer
- Pipeta glóbulos rojos
- Cronometro y/o timer

MUESTRAS

Sangre venosa anticoagulada.



Toda muestra biológica debe se considerada como potencialmente infecciosa.

PROCEDIMIENTO

- Obtener sangre venosa o capilar hasta la marca 0,5 de pipeta de glóbulos rojos.
- Llenar con el diluyente hasta la marca 101, haciendo una dilución a 1:200 de la sangre.
- Mezclar la sangre diluida durante 5 minutos, preferiblemente en un agitador de pipetas.
- Descartar varias gotas de la suspensión celular, llenando entonces ambas cámaras del contaje de la cámara de Neubauer y colocarlo en una placa de Petri cerrada conteniendo una pieza húmeda de algodón. Permitir reposar 15 minutos.
- Utilizar un objetivo de 40 X del microscopio, contar las plaquetas contenidas en un mm². (las plaquetas se observan color azul refringente), multiplicar el resultado por 2.000, obteniéndose así el numero de plaquetas por milímetro cúbico.

VALORES DE REFERENCIA

Varones, mujeres, niños: 150.000 – 300.000/mm³

NOTAS SOBRE EL EMPLEO

- El microscopio usado debe cumplir los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico.
- Utilizar pipeta para leucocitos o pipeta para eritrocitos y cámara de recuento (Neubauer) estándar.
- Utilizar solamente pipetas para leucocitos y cámaras de recuento (Neubauer) limpias.
- Usar placas preferiblemente nuevas, sin ralladuras y libres de grasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Brecher, G. Gronkite, E.P., 1950, Morphology and Enumeration of Human Blood Platelets, J. Appel Physiol 3:365.
- Brecher, G. Scheneiderman, M. Cronkite, E.P. 1953. The Reproducibility and Consistency of the platelet count. Amer J. Clin Pathol 23:15-26.
- Miale, J. B., 1962, Laboratory Medicine, Hematology 2nd ed. C.V. Mosby Co., St. Louis, p 806-808.
- Seivert, C.E., 1958, Hematology-for Medical Technologists. 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, p 145-150.
- Tocantins, L.M. Kazal, LA., 1964, Blood Coagulation-Hemorrhage and. Thrombosis. 2nd ed. Grune and Stratton, New York, p 44-45.

Índice de Símbolos					
	Producto para diagnóstico in-vitro		Referencia o Código		Pruebas por Kit
	Para usar consulte las instrucciones		Precaución Consultar las instrucciones		Fabricante
	Número de Lote		Fecha de Caducidad		Fecha de Fabricación
	Límite de Temperatura		Riesgo Biológico		



ESPECIALIDADES DIAGNOSTICAS IHR Ltda.
 PBX: +(2) 552 5444 / Calle 7 A No. 45-07 Santiago de Cali - Colombia
 e-mail: servicioalcliente@ihrdiagnostica.com
www.ihrdiagnostica.com

Anexo 3. Preparación de soluciones

Oxalato de amonio al 1 %.

Para preparar 50 mL de una solución de oxalato de amonio al 1 %, se ocupó reactivo con una pureza del 99.5 % y un peso molecular de 142.11 g/mol, los cálculos realizados para su preparación son los siguientes:

$$a) 50 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ g}}{100 \text{ mL}} \times \frac{100 \text{ g reactivo}}{99.5 \text{ g de oxalato}} = 0.5025 \text{ g de reactivo}$$

Anexo 4. Diagrama de flujo de Adhesión plaquetaria en placa

