

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 810**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01980741 .1**  
96 Fecha de presentación: **08.11.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1332373**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

54 Título: **MÉTODO PARA MEDIR LA ACTIVACIÓN DE LEUCOCITOS.**

30 Prioridad:  
**08.11.2000 GB 0027309**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.01.2012**

73 Titular/es:  
**BARTS AND THE LONDON NATIONAL HEALTH  
SERVICE TRUST  
R & D OFFICE, ROYAL LONDON HOSPITAL, 4TH  
FLOOR, ALEXANDER HOUSE  
WHITECHAPEL, LONDON E1 1BB, GB**

72 Inventor/es:  
**MACEY, Marion, Glenys**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 810 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para medir la activación de leucocitos.

A continuación se describe, aunque no forma parte de la invención reivindicada, la medición de la activación de los trombocitos o plaquetas de la sangre, y en particular dicha medición realizada mediante la determinación del denominado "componente medio de trombocitos".

Existen múltiples estudios que sugieren que la medición de los indicadores de activación de los trombocitos podría aportar ventajas en la evaluación clínica de pacientes con riesgo de trombosis y otras enfermedades (Macey, M.G., Carty, E., Webb, I., Chapman, E.S., Zelmanovic D., Okrongly D., Rampton D.S., Newland, A.C., (1999), "Uso del componente medio de trombocitos para medir la activación de los trombocitos en el sistema de hematología ADVIA 120 (sistema de analizador hematológico automatizado)" *Citometría*, 38, 250-255; Mody, M., Lazarus, A.H., Semple, J.W., Freedman, J., (1999), "Requisitos pre-analíticos para la evaluación citométrica de flujo de la activación de trombocitos: elección de anticoagulante." *Medicina de Transfusión* 9, 147-154.

El componente medio de trombocitos (en adelante MPC) es un parámetro que se puede determinar por analizadores hematológicos estándar de laboratorio, tal como el comúnmente utilizado Sistema Hematológico ADVIA® 120, fabricado por Bayer AG. El MPC es una medición del índice de refracción medio de los trombocitos, y su valor como una medición de la activación de los trombocitos ha sido sugerido anteriormente en la comunicación de Macey y colaboradores a la que se ha hecho referencia anteriormente. La estimulación *in Vitro* de trombocitos normales en sangre completa por trombina bovina resultó en una activación que condujo a un aumento de la expresión de trombocitos CD62P (P-selectina) (una medición de activación) y una disminución concomitante en MPC. Esta respuesta dependía de la dosis y del tiempo.

El sistema hematológico ADVIA 120 tiene un banco óptico de láser que consiste en un diodo de láser, una célula de flujo y conjuntos detectores. Se usa un diodo de láser para producir luz monocromática enfocada sobre la célula de flujo. Según la teoría de Mie sobre dispersión de la luz, la intensidad de la luz monocromática dispersa en un ángulo particular por una esfera homogénea uniforme depende solamente de su volumen y de la diferencia de índices de refracción (en adelante RI) medio entre la esfera y el medio en que está suspendida. Esto proporciona una ecuación para la luz dispersa monocromática dentro de intervalos angulares determinados que es una función solamente de dos incógnitas, el volumen y el RI. La medición de la dispersión de la luz en dos intervalos angulares diferentes apropiados proporciona dos ecuaciones con dos incógnitas que se pueden resolver numéricamente. Esta es la base de las mediciones de eritrocitos y trombocitos del Sistema Hematológico ADVIA 120 (Tycko, D.H., Metz, M. H., Epstein, E.A., Gribaum, A., (1985), "Medición citométrica de flujo por dispersión de la luz del volumen de eritrocitos y concentración de hemoglobina". *Applied Optics*, 24, 1355-1360; Zelmanovic, D., Colella, G.M., Heherington, E.J., Chapman, S.E., Paseltiner, L. (1998), "Método y dispositivo automatizados para identificar y cuantificar trombocitos y para determinar el estado de activación de trombocitos usando muestras de sangre completa". US-A- Kunicka, J.E., Fischer, G., Murphy, J., y Zelmanovic, D., "Cuenta mejorada de trombocitos usando dispersión bidimensional de luz de láser". *American Journal of Clinical Pathology* 114, 283-289).

El ADVIA 120 determina el volumen y el RI de trombocitos en una base de célula por célula. Los trombocitos interceptan un rayo incidente de luz de láser monocromática de  $675 \pm 10$  nm emitida por un fotodiodo cuando pasan a través de una célula de flujo óptica. El sistema mide la intensidad de la luz dispersa en los intervalos de 2-3 grados y de 5-15 grados. El par de valores de intensidad por luz dispersa se transforma en valores de volumen de partículas y del RI por referencia a una tabla de consulta basada en la teoría de la dispersión de MIE para partículas esféricas homogéneas. El valor del RI de los trombocitos se convierte en la concentración de componente medio de trombocitos (MPC) mediante la sustracción del índice de refracción del agua (1,333) del RI, y dividiendo la diferencia por el incremento medio de índice de refracción (0,018 dL/g) (Zelmanovic y colaboradores, 1988). Esta constante se obtiene a partir de los incrementos medios ponderados de índices de refracción para los componentes principales de los trombocitos, a saber, proteínas, lípidos, e hidratos de carbono (Armstrong, S.H., Budka, M.J.E., Morrison K.C., Hasson, M., (1947) "Preparación y propiedades de las proteínas de suero y de plasma. Las propiedades refractivas de las proteínas del plasma humano y ciertas fracciones purificadas". *Revista de la Sociedad Americana de Química*, 69, 1747-1753; Barer, R., Joseph, S., (1954) "Refractometría de las células vivas" *Revista trimestral de la ciencia de la microscopía*, 95, 399- 423, Zelmanovic y colaboradores, (1998). Una evidencia reciente indica también una relación lineal entre la densidad de trombocitos (separada por gradientes de extractana) (Corash, L., Tan, H., Gralnick, H., (1997), "Heterogeneidad de las sub-poblaciones de trombocitos humanos de sangre completa. Relación lineal entre densidad de flotación, volumen de celdas, y ultraestructura". *Sangre*, 49, 71-87 y MPC (Chapman, E.S., Lerea, K.M., Kirk, R., Sorette, M.P., Sanjay, N.S., Zelmanovic, D. (1998) "Monitorización *in vitro* y actividad de trombocitos *ex vivo* : comparación de liberación de gránulos alfa, distribución de densidad, adherencia de trombocitos y concentración de componente medio de trombocitos (MPC)". *sangre*, 92, Suplemento 1, 68B, Resumen 3273).

La masa media de trombocitos (en adelante MPM, en pg) se calcula a partir del volumen medio de trombocitos (en adelante MPV) y del MPC. Los datos para trombocitos individuales podrían presentarse en histogramas mientras se tabula el valor medio para cada parámetro (Zelmanovic, D., Colella, G.M., Heherington, E.J., Chapman, E.S.,

Paseltiner, L. (1998) "Método y dispositivo automatizados para identificar y cuantificar trombocitos y para determinar el estado de activación de trombocitos usando muestras de sangre completa".US-A- 5817519.

La activación de los trombocitos ocurre rápidamente tras la flebotomía o muy poco después, y esta característica de los trombocitos hace difíciles los análisis *ex vivo*. Sin embargo, la extensión de esta activación *in vitro* sí depende del anticoagulante en el que se recoja la sangre (Kuhne, T., Horstein, A., Semple, J., Chang, W., Blanchette, V., Freedman, J. (1995) "Evaluación citométrica de flujo de activación de trombocitos en sangre recogida en ácido etilendiaminetetraacético (en adelante EDTA) en función de Diatube\_H, una solución de citrato de sodio suplementada con teofilina, adenosina, y dipiridamol". Revista Americana de Hematología, 50, 40-45). Por razones de sencillez y economía, el anticoagulante ideal sería el que permitiese obtener información sobre la activación de los trombocitos como parte del perfil total de la sangre

. El EDTA, como su sal de tripotasio líquida, se usa comúnmente como anticoagulante, debido a su disponibilidad y a su comodidad de preparación (Perrotta, G., Roberts, L., Glazier, J., Schumacher, H.R. (1998) "Uso del anticoagulante citrato sódico para análisis hematológicos rutinarios sobre el CELL-DYN® 4000: Una oportunidad para aumentar el rendimiento en el laboratorio clínico". Hematología de laboratorio, 4, 156-162.) Es también el anticoagulante preferido para hemogramas y diferencias en números de leucocitos debido a sus propiedades de conservación de células, y es el anticoagulante recomendado para estos fines por el Comité Nacional para Normas Clínicas de Laboratorio (en adelante NCCLS: Norma H1-A4).

Cuando se monitoriza la activación de trombocitos *ex vivo*, los requisitos principales son usar un procedimiento de venopunción que minimice la activación espontánea de trombocitos, y recoger la sangre en un medio que no sólo prevenga la coagulación, sino que también conserve el estado de activación de los trombocitos hasta que se pueda analizar la muestra (George J.N., Thio L.L., Morgan RK (1981) "Análisis cuantitativo de glicoproteínas de membrana de trombocitos; efecto del lavado de trombocitos y aislamiento de sub-poblaciones de densidad de trombocitos.". Investigación de trombosis 23, 69-77; Hawiger J (1989) "Caminos secretores de trombocitos: una visión de conjunto." Métodos en Enzimología 169, 191-195; Michelson AD (1996) "Citometría de flujo: un ensayo clínico de la función de los trombocitos-una revisión". Sangre 87. 4925-4936; Wu KK (1994) "Activación de trombocitos y trombosis arterial". Lancer 344, 991-995)

Para las investigaciones de trombocitos, el EDTA no es adecuado, porque causa que se hinchen y experimenten una auto-activación, que aumenta con el tiempo (Kuhne y colaboradores, 1995; Jackson, S.R., & Carter, J.M. (1993) "Volumen de trombocitos: medición de laboratorio y aplicación clínica" Revistas de Sangre, 7, 104-113; McShine, R.L., Das, F.P.C., Siblinga, C.S., Brozovic, B. (1990) "Diferencias entre los efectos de anticoagulantes de citrato y de EDTA del recuento de trombocitos y volumen medio de trombocitos.". Hematología clínica y de Laboratorio, 12, 277-285; Pidard, D., Didry, D., Kunicki, T.J., Nurden, A.T. (1986) "Efectos dependientes de la temperatura del EDTA sobre el complejo de glicoproteína de membrana IIb/IIIa y la agregabilidad de los trombocitos" Sangre, 67.604-611). El hinchamiento gradual de los trombocitos es debido a alteraciones en la membrana de plasma inducidas por el EDTA y resulta en una caída en densidad óptica y en un aumento en volumen medio de trombocitos (MPV). La caída en densidad óptica se podría medir en el sistema ADVIA 120 (Bayer AG) como un cambio en el componente medio de trombocitos (MPC). (Zelmanovic y colaboradores, 1998). El EDTA también altera la morfología de los trombocitos desde su forma elipsoidal innata hasta la esférica. El cambio de forma de los trombocitos es una reacción rápida que se puede medir, o bien por métodos morfológicos, como con un microscopio electrónico de barrido, o bien siguiendo el aumento en densidad óptica que ocurre en el agregómetro. La técnica óptica indica que el cambio de forma inducido por el ADP alcanza la mitad de un cambio máximo en densidad óptica en 2,5 segundos. El cambio de forma de los trombocitos se caracteriza por una transformación morfológica desde la forma discoidal (2 a 4 µm de diámetro y alrededor de 0,5 µm de espesor) hasta una esfera erizada de púas que contiene muchos filópodos largos y delgados. Este cambio de forma empieza inmediatamente tras la exposición al anticoagulante y es máximo a las 2 horas (Jackson y Carter, 1993). Estos cambios son detectables por el ADVIA 120 a los 30 minutos. Además, si se anticoagula con EDTA la sangre de ciertos individuos, los trombocitos se agregan, causando que se registre una trombocitopenia aparente (Okada T (1999) "desarrollo y problemas de analizadores hematológicos automáticos". Revista Internacional Sysmex, 9, 52-57.

Por tanto, para estudios de trombocitos, el citrato trisódico se ha establecido como el anticoagulante a elegir para estos estudios (Perrotta y colaboradores, 1998). Se ha demostrado que los anticoagulantes que comprenden citrato dan lugar a un MPV menor que con el EDTA, una característica explicada parcialmente por la conservación de la morfología discoide normal (Jackson y Carter, 1993) Cuando la sangre se recoge en citrato, inicialmente se produce un pequeño cambio, o ninguno, en la forma y volumen de los trombocitos. Sin embargo, en citrato, los trombocitos adoptan lentamente una forma esférica (Macey y colaboradores, 1999) y, como en el EDTA, se hinchan progresivamente durante 1 período de 1-2 horas (3- 10% de aumento de volumen por procedimientos de impedancia dependiendo de la concentración del citrato sódico ((Bath, PWM (1993), "La medición habitual del tamaño de los trombocitos usando citrato sódico solamente como el anticoagulante." Trombosis y hemostasia 70, 687-690; Threutte G.A., Adrados C., Ebbe S., Breecher G. (1984) "Volumen medio de trombocitos. La necesidad de un método de referencia". Am J. Clin Pathol. 81: 769-72). Por estas razones el citrato no se consideró inicialmente fiable para la medición del volumen de los trombocitos. (Thompson CB, Diaz DD, Qinn PG, Lapins M, Kurtz SR, Valeri CR. (1983) "El papel de la anticoagulación en la medición de volúmenes de trombocitos". AmJ, Clinic Pathol. 180: 327-32 .

- 5 Se han usado anticoagulantes a base de citrato para la determinación de parámetros de trombocitos en el ADVIA 120 (Macey y colaboradores, 1999; Zelmanovic y colaboradores, 1998), Sin embargo, la desviación típica del MPC (registrada como la anchura de la distribución de componentes de trombocitos (en adelante PCDW) es inicialmente mayor en el citrato que en el EDTA, porque las características de dispersión de la luz de los trombocitos discoidales, a diferencia de los trombocitos esféricos, depende de su orientación (Macey y colaboradores, 1999; Zelmanovic y colaboradores, 1998).
- 10 En estudios anteriores se ha averiguado que, cuando la sangre anticoagulada o bien con citrato sódico (Maurer Spurej, E., Pfeifer, G., Maurer, N., Linder, H., Glatter, O., Devien, D.V. (2001) "La temperatura ambiente activa los trombocitos de la sangre humana", Lab. Invest. 81, 581-592) o bien en dextrosa de citrato ácida (en adelante ACD) (Oliver, A.E., Tablin, F., Walker, N.J., Crowe, J.H., (1999) "La concentración interna de calcio de los trombocitos humanos aumenta durante el enfriamiento" Biochimica Biophysica Acta, 1416, 349-360) se enfrió hasta 20° C y 5° C respectivamente, se averiguó que los trombocitos se activaban como células esféricas con pseudópodos. Se ha demostrado (datos no publicados) en sangre anticoagulada con citrato sódico incubado a 4° C que hay un aumento dependiente del tiempo en la expresión de CD62P en trombocitos y un aumento significativo en la formación de PLA.
- 15 Un estudio piloto usando el sistema hematológico Abbott CELL- DYN 4000® indica que el citrato se puede usar en lugar de del EDTA para hemogramas completos habituales, siempre que las correcciones se hagan para tener en cuenta el factor de dilución diferente.
- 20 O'Malley y colaboradores ("Medición del volumen de trombocitos usando una variedad de mezclas diferentes de anticoagulantes e inhibidores plaquetarios" Coagulación y fibrinólisis de la sangre 7 (4), 1996, 431-436) describen un anticoagulante que contiene EDTA y teofilina para usar en la medición del volumen medio de los trombocitos .
- 25 Se ha desarrollado un anticoagulante relativamente nuevo con el nombre comercial de Diatube\_H® para inhibir la activación de los trombocitos, y se ha usado para medir los niveles de heparina del plasma y el factor 4 de los trombocitos y la liberación de β- tromboglobulina de trombocitos activados (Kuhne y colaboradores, 1995). Los principales constituyentes del Diatube-H® son citrato, teofilina, adenosina y dipiridamol, y se ha denominado oficiosamente CTAD. La teofilina y el dipiridamol han mostrado inhibir la actividad de la fosfodiesterasa, que conduce a un incremento del monofosfato de adenosina (en adelante AMP) cíclico de los trombocitos y a una reducción en la actividad de los trombocitos. La adenosina inhibe también la agregación de trombocitos inducida por trombina y la liberación de calcio intracelular (Kuhne y colaboradores, 1995). El dipiridamol tiene el inconveniente de ser sensible a la luz, por lo que los tubos de anticoagulante CTAD se deben almacenar apropiadamente.
- 30 Los trombocitos en el EDTA se aproximan a esferas homogéneas para los fines de aplicar la teoría de Mie y de obtener un volumen y unos valores de MPC precisos sobre una base de célula por célula (Zelmanovic y colaboradores, 1998). Sin embargo, debido a la propiedad de activación de los trombocitos del EDTA, en general se cree que es muy inadecuado para usarlo como anticoagulante para medir estados de activación de trombocitos de pacientes.
- 35 La medición de la activación de neutrófilos tiene también importancia clínica. Los neutrófilos muestran poca o ninguna evidencia de activación (por ejemplo, por su nivel de expresión de CD11b) si se analizan en sangre completa anticoagulada poco tiempo después de la venopunción. Desafortunadamente, tanto el EDTA como el citrato disminuyen la concentración de Ca<sup>2+</sup> en plasma y por consiguiente afectan a la capacidad antigénica de los epítomos dependientes del Ca<sup>2+</sup> como el CD11b. Un reactivo alternativo, Cyto-Chex® (Laboratorios Streck, Omaha, New Brunswick, EE.UU) que se recomienda para la conservación de sangre completa, estabiliza la expresión de antígeno en linfocitos y neutrófilos, pero poco se sabe todavía de sus efectos sobre los trombocitos.
- 40 Se ha descubierto ahora que, sorprendentemente, el EDTA y los anticoagulantes similares que en general se creían inadecuados para tales aplicaciones, se podrían emplear para estudios de activación de trombocitos, con tal que se haga uso también de un antagonista adecuado de los trombocitos, como los empleados en la mezcla CTAD.
- 45 Se ha descubierto también que manteniendo la sangre anticoagulada con dichas mezclas a bajas temperaturas, se podría reducir la activación de los trombocitos durante un período de horas, en comparación con las mezclas a temperatura ambiente. Esto contrasta con el incremento conocido en la activación de trombocitos en citrato o en dextrosa de citrato ácida en el enfriamiento anteriormente indicado.
- 50 Además, se ha descubierto que tales mezclas inhiben eficazmente la activación de neutrófilos en sangre anticoagulada.
- 55 De acuerdo con lo anteriormente expuesto en el método de la presente invención, se ha usado una composición anticoagulante de sangre que comprende componentes para efectuar la conversión en la forma esférica (que son uno o más agentes quelantes seleccionados del EDTA o [ etilene-bis (oxietilenenitrilo)] ácido tetraacético ] (en adelante EGTA) o una combinación de los mismos), y uno o más antagonistas de trombocitos. Los términos EDTA y EGTA, tal como se usan en la presente memoria, están destinados a incluir sales y derivados de los mismos.

El componente para efectuar la conversión en esferas de los trombocitos y el antagonista de trombocitos se podrían mezclar antes de la adición de la muestra de sangre, o bien se podrían mezclar después de la adición de la muestra de sangre a uno de los componentes.

- 5 El antagonista de trombocitos incluye teofilina, adenosina o 2- cloroadenosina y dipiridamol, y preferiblemente todo del conjunto de citrato, teofilina, adenosina o 2-cloroadenosina y dipiridamol. Las concentraciones preferidas de citrato, teofilina, adenosina o 2-cloroadenosina y dipiridamol son generalmente las descritas en la comunicación de Contant y colaboradores (Investigación sobre trombosis, 31,;páginas 365-374, 1983), y en particular, dentro de los intervalos siguientes:

	Teofilina	7,5-22,2 mM
10	Adenosina	0,01 mM- 3,7 Mm
	Dipiridamol	0,01- 2 mM, preferiblemente alrededor de 0,02 mM
	Ácido cítrico	0,1 M- 0,258 M, preferiblemente alrededor de 0,11 M

El pH de la composición es preferiblemente de 4, 5 a 6,4, con preferencia alrededor de 5,0.

La composición anticoagulante de sangre podría comprender preferiblemente EDTA y CTAD.

- 15 Las técnicas para la determinación del MPC por medio del índice de refracción son bien conocidas per se, y se exponen, por ejemplo, en la comunicación de Macey y colaboradores mencionada anteriormente, así como en otra parte de la bibliografía La determinación del índice de refracción se lleva a cabo preferiblemente midiendo la dispersión de la luz hacia delante en dos ángulos diferentes, con más preferencia en ángulos de 2-3 grados y 5-15 grados.
- 20 La invención provee un método de medir la activación de leucocitos, que comprende medir un indicador de activación de leucocitos de los leucocitos suspendido en una composición que comprende, al menos, uno o más componentes para efectuar la conversión en esferas, de los trombocitos que comprende EDTA o EGTA o una combinación de los mismos, y como mínimo un antagonista de trombocitos según se ha descrito en la presente memoria. Preferiblemente, la composición anticoagulante de sangre es la anteriormente indicada.
- 25 Se hace referencia a los ejemplos que siguen en los dibujos adjuntos, en los que:

Ejemplo 1

La Figura 1 muestra el análisis de trombocitos en sangre completa.

- 30 Los trombocitos de la región R1 se identificaron por sus propiedades de dispersión de la luz hacia delante y la dispersión lateral (histograma A )y se confirmaron mediante el análisis de fluorescencia verde en relación de asociación con la fijación de CD42a (histograma B).

- 35 La Figura 2 muestra el análisis de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre completa. Los leucocitos se identificaron en un gráfico de dispersión lateral (ordenadas a escala logarítmica) en función de la fluorescencia naranja (histograma A). Se registraron los eventos sin leucocitos (histograma B). Los leucocitos identificados por su tinción positiva con PE CD45 se llevaron a un histograma de fluorescencia verde (ordenadas a escala logarítmica) de fluorescencia naranja (abcisas a escala logarítmica) (histograma C). Los eventos que eran verdes y naranjas se consideraron agregados de leucocitos y trombocitos.

Ejemplo 3:

- 40 La Figura 3 presenta el análisis de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre completa. La sangre se tiñó con ficoeritrina conjugada CD45 y fluoresceína. isotiocianato conjugado CD42a. Los leucocitos se identificaron (región R1) por su tinción positiva con PE CD45 en un gráfico de dispersión lateral (ordenadas a escala logarítmica) en función de fluorescencia naranja (abcisas a escala logarítmica) (gráficos de puntos A ) y se presentaron visualmente en un gráfico de fluorescencia verde (ordenadas a escala logarítmica) y fluorescencia naranja (abcisas a escala logarítmica) (gráficos de puntos B). Los eventos que eran verdes (CD 42a) y naranjas (CD45) (región R2) se consideraron agregados de leucocitos y trombocitos. Llevando hacia atrás estos eventos a un gráfico de dispersión lateral (ordenadas a escala logarítmica) en función de fluorescencia naranja (abcisas a escala logarítmica) (gráfico de puntos C) se demostró que la mayoría de los agregados tenían las características de la dispersión de luz lateral de los granulocitos y monocitos. Un ejemplo de un análisis realizado en sangre de un control normal se ha ilustrado en el panel superior de la Figura, y el de un paciente con una enteropatía inflamatoria en el panel inferior.

Ejemplo 1: Comparación de E/C con EDTA y CTAD

- 50 Materiales y métodos.

**Materiales.** La solución salina de Tyrode (en adelante TS) era de Sigma (CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O 0,265 g/l, Mg Cl 6 H<sub>2</sub>O= 0,214 g/l, KCl 0,2 g/l, Na H<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> 1,0 g/l, Na Cl 8,0 g/l, Na PO<sub>4</sub> 0,05 g/l, glucosa 1,0 g/l). El EDTA y la CDTA en recipientes Vactainer<sup>®</sup> eran de Becton Dickinson. Estos últimos se guardaron en cajas de protección contra la luz y se retiraron inmediatamente antes de usarlos.

5 **Antisueros.** LgG1-FITC, IgG1-PE, CD62P-FITC y CD45-RPE eran de Immunotech. Ratón IgG2 a- FITC y CD42 a- FITC eran de Becton Dickinson.

**Muestras de sangre.** Muestras de sangre normal (n= 6). Edad media 35, 4 hombres, 2 mujeres.

10 Valoración de la activación de trombocitos en el ADVIA 120. Se tomaron muestras de sangre completa en recipientes Vacutainer<sup>®</sup> (Becton Dickinson) que contenían o bien EDTA, CTAD, o una mezcla de EDTA y CTAD (en adelante E/C). Se analizaron las muestras inmediatamente después de la venopunción y en intervalos temporizados de 30, 60, 120 y 180 minutos después de la venopunción. Se realizaron análisis del número de trombocitos (en adelante PLT), volumen medio de trombocitos (en adelante MPV), componente medio de trombocitos (en adelante MPC) y anchura de la distribución del componente medio de trombocitos (en adelante PCDW) usando el sistema hematológico ADVIA 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, N.Y.) calibrado antes de usarlo con reactivos de control hematológico puntual ADVIA TEST (Bayer Corporation, Tarrytown, N.Y.)

15 **Medición de la expresión de CD62P y del número de agregados de leucocitos y trombocitos (en adelante PLAs).** Se incubó sangre anticoagulada (5 µl) a temperatura ambiente con isotiocianato de fluoresceína (en adelante FITC) C62P (5 µl) o control de isotipo de FITC (5 µl) o PE CD45 (5 µl) y control de isotipo de FITC (5 µl) o FITC CD42a (5 µl) y PE CD45 (5 µl) en 90 µl de TS durante 5 minutos. Las muestras se diluyeron a 1 ml con TS y se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

20 **Citometría de flujo.** Se analizaron los glóbulos sanguíneos en un FACScan (Becton Dickinson Oxford, Gran Bretaña) dotado de software CellQuest<sup>®</sup>. El citómetro de flujo se calibró antes de usarlo con cuentas etiquetadas de fluorocromo (Fluorospheres<sup>®</sup>, Dako).

25 Para el análisis de la expresión de CD62P se adquirieron datos en tiempo real con un equipo de puerta primaria en un histograma de doble parámetro de dispersión de luz hacia delante (en adelante FLS) a escala logarítmica (abcisas) y dispersión de luz lateral (en adelante SLS) a escala logarítmica (ordenadas). Esto facilitó la identificación de los trombocitos dentro de la sangre, y se confirmó mediante el análisis de la expresión de CD42a (Figura 1). La fluorescencia de fondo se valoró con trombocitos marcados con el anticuerpo de control de isotipo conjugado de FITC. Los cursores se ajustaron en un histograma de un solo parámetro de frecuencia (ordenadas) e intensidad de fluorescencia verde (abcisas), de tal manera que menos del 1% de los trombocitos se tiñeron positivamente con el control de anticuerpo. Luego se registraron los cambios en la expresión de CD62P (Escala logarítmica de fluorescencia verde), junto con los de FLS y SLS, en los trombocitos analizados.

30 Para el análisis de los agregados de leucocitos y trombocitos (Figura 2) se analizaron los glóbulos en un histograma de dispersión lateral (ordenadas a escala logarítmica) y fluorescencia naranja (abcisas a escala logarítmica). Los leucocitos identificados por su tinción positiva con PE CD45 se trasladaron a un histograma de fluorescencia verde (ordenadas a escala logarítmica) y fluorescencia naranja (abcisas a escala logarítmica). Los eventos que eran verdes y naranjas se consideraron como agregados de leucocitos y trombocitos y se registraron como un porcentaje de un total de 10.000 leucocitos analizados.

35 **Análisis estadístico.** La expresión de CD62P de los trombocitos, los agregados de leucocitos y trombocitos y el MPC se compararon usando estadísticas paramétricas (ensayo t apareado de Student) empleando valores de probabilidad de colas.

Resultados

*% de trombocitos positivos de CD62P*

Tiempo en minutos	Expresión de % de CD62P en sangre anticoagulada con EDTA	Expresión de % de CD62P en sangre anticoagulada con CTAD	Expresión de % de CD62P en sangre anticoagulada con E/C
0	1,10 ± 0,24	1,22 ± 0,26	1,28 ± 0,37
30	3,71 ± 0,04	1,42 ± 0,37	2,01 ± 0,61
60	11,27 ± 0,60	3,09 ± 0,84	5,94 ± 2,90
90			
120	18,94 ± 2,53	2,38 ± 0,29	6,98 ± 1,48

## ES 2 372 810 T3

150			
180	23,05 ± 2,79	4,14 ± 0,61	8,45 ± 0,86

- 5 El % de trombocitos positivos de CD62P en los seis pacientes fue bajo a los 0 minutos (% 1,10 ± 0,24, medio ± se). A los 180 minutos los valores del % de CD62P subieron significativamente en los tres anticoagulantes (p < 0,02), pero hasta una extensión mayor en el CDTA (% 23,05 ± 2,79). En la sangre anticoagulada con CTAD se observó la mínima activación (% 4,14 ± 0,61), mientras que la sangre anticoagulada con E/C tuvo una activación intermedia de trombocitos % 8,45 ± 0,79). La expresión de CD 62P en la sangre anticoagulada con EDTA fue significativamente mayor (p < 0,01) que en la sangre anticoagulada con CTAD después de 60 minutos.

### Formación de agregados de leucocitos y trombocitos

Tiempo en minutos	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con EDTA	% de agregados de leucocitos y trombocitos con sangre anticoagulada con CTAD	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con E/C
0	3,50 ± 0,50	3,95 ± 0,73	2,82 ± 0,67
30	4,16 ± 0,86	5,57 ± 1,36	3,13 ± 0,86
60	8,87 ± 1,54	9,64 ± 1,41	4,48 ± 0,94
90			
120	8,50 ± 1,44	15,80 ± 2,15	6,18 ± 2,28
150			
180	13,50 ± 2,41	18,88 ± 3,38	7,81 ± 1,52

- 10 Los agregados de leucocitos y trombocitos (PLA) a los 0 minutos fueron detectables en todos los pacientes y estuvieron presentes en números mayores en la sangre anticoagulada con EDTA (% 3,50 ± 0,50, media ± se) y en CTAD (% 3,95 ± 0,73), que en la sangre anticoagulada con E/C (% 2,82 ± 0,67). El porcentaje de los PLA en la sangre anticoagulada con CTAD aumentó a los 180 minutos (% 18,88 ± 3,38) y fue significativamente más alto que el número detectado en la sangre recogida en EDTA (% 13,50 ± 2,41, p < 0,05) y en E/C (% 7,81 ± 1,52, p < 0,02)

### 15 Número de trombocitos (PLT)

Tiempo en minutos	Número de trombocitos en sangre anticoagulada con EDTA	Número de trombocitos en sangre anticoagulada con CTAD	Número de trombocitos en sangre anticoagulada con E/C
0	235 ± 12	229 ± 12	230 ± 13
30	246 ± 14	230 ± 13	237 ± 13
60	249 ± 14	234 ± 13	239 ± 13
90			
120	247 ± 14	230 ± 12	232 ± 11
150			
180	246 ± 5	225 ± 6	225 ± 9

- 20 Todos los números de trombocitos en sangre anticoagulada con EDTA para los pacientes estuvieron en el intervalo normal, con una media ± se de 235 ± 12. No se produjeron cambios significativos en los números de trombocitos durante el período de 180 minutos. Se averiguó que los cambios en sangre anticoagulada con CTAD y E/C, una vez corregidos por dilución (factor de dilución = 1,11 y 1,125, respectivamente) eran similares a los de la sangre anticoagulada con EDTA.

Volumen medio de trombocitos (MPV)

Tiempo en minutos	MPV en sangre anticoagulada con EDTA	MPV con sangre anticoagulada con CTAD	MPV en sangre anticoagulada con E/C
0	8,0 ± 0,37	9,1 ± 0,24	9,0 ± 0,24
30	7,7 ± 0,27	8,4 ± 0,24	8,6 ± 0,32
60	7,7 ± 0,24	8,5 ± 0,27	8,7 ± 0,30
90			
120	8,0 ± 0,30	8,9 ± 0,28	9,0 ± 0,28
150			
180	8,1 ± 0,21	9,2 ± 0,20	9,2 ± 0,28

5 El valor de MPV cayó entre 0 minutos y 330 minutos en cada uno de los tres diferentes anticoagulantes, reflejando el hecho de que cualquier medición de trombocitos en sangre completa realizada en el ADVIA 120 dentro de los 30 minutos de la venopunción no será estable, porque durante este período estará ocurriendo la conversión en la forma esférica. El MPV fue el más estable entre 30 y 60 minutos y luego aumentó en una pequeña cantidad en los tres anticoagulantes a los 180 minutos. El volumen de trombocitos aumentó en la sangre anticoagulada con E/C desde 9,0 ± 0,24 fL a 9,2 ± 0,28 fL (media ± se). En EDTA desde 8,0 ± 0,3 fL hasta 8,1 ± 0,21 fL y en CTAD desde 9,1 ± 0,24 fL hasta 9,2 ± 0,20 fL, respectivamente

10 Componente medio de trombocitos (MPC)

Tiempo en minutos	MPC en sangre anticoagulada con EDTA	MPC en sangre anticoagulada con CTAD	MPC en sangre anticoagulada con E/C
0	28,0 ± 0,87	25,2 ± 0,62	25,6 ± 0,54
30	29,1 ± 0,52	27,1 ± 0,40	26,6 ± 0,66
60	28,8 ± 0,42	26,7 ± 0,40	26,4 ± 0,64
90			
120	27,9 ± 0,48	26,3 ± 0,67	25,4 ± 0,67
150			
180	27,1 ± 0,36	25,2 ± 0,40	25,0 ± 0,67

15 El EDTA dio lugar a los valores más altos del MPC, y la disminución en el MPC durante 180 minutos fue también la mayor en la sangre con este anticoagulante (28,0 ± 0,87 g/dl a 27,1 ± 0,36 g/dl, media ± se). Los valores más bajos del MPC se observaron en sangre anticoagulada con con E/C en cada intervalo de tiempo. En la sangre anticoagulada con CTAD el MPC fue el más estable, con ningún cambio en el MPC medio entre 0 minutos y 180 minutos (25,2 ± 0,62 g/dl y 25,2 ± 0,40 g/dl respectivamente). Los valores medios del MPC aumentaron desde 0 a 30 minutos y luego disminuyeron subsiguientemente en los tres anticoagulantes. En los tres anticoagulantes se observaron valores menores del MPC a los 60 minutos que a los 30 minutos; sin embargo, esto fue lo más notable en el CTAD (27,1 ± 0,40 g/dl a 26,7 ± 0,40 g/dl).

20



*Anchura de la distribución de componentes de trombocitos (PCDW)*

Tiempo en minutos	PCDW en sangre anticoagulada con EDTA	PCDW en sangre anticoagulada con CTAD	PCDW en sangre anticoagulada con E/C
0	5,85 ± 0,28	7,41 ± 0,13	7,35
30	5,00 ± 0,09	7,21 ± 0,13	6,87 ± 0,38
60	5,00 ± 0,12	7,26 ± 0,15	7,02 ± 0,42
90			
120	4,80 ± 0,11	7,53 ± 0,15	7,5 ± 0,44
150			
180	4,80 ± 0,06	7,80 ± 0,11	6,97 ± 0,43

5 Este parámetro variaba entre anticoagulantes. El CTAD dio valores más altos de PCDW, y durante 180 minutos este anticoagulante causó un pequeño aumento en PCDW ( $7,41 \pm 0,13$  g/dl a  $7,80 \pm 0,11$  g/dl, media  $\pm$  se). En contraste, los valores medidos en sangre anticoagulada con EDTA y E/C disminuyeron con el tiempo, aunque hubo una disminución mucho mayor con EDTA ( $5,85 \pm 0,28$  g/dl hasta  $4,80 \pm 0,06$  g/dl) que con E/C ( $7,35 \pm 0,21$  hasta  $6,97 \pm 0,43$ ).

10 Los resultados demuestran que la CTAD es un inhibidor muy bueno de la activación de los trombocitos, incluso en presencia de un agente de activación de trombocitos como el EDTA. La expresión de CD62P no aumentó tras la exposición a la CTAD o durante un período de tres horas, en contraste con los otros anticoagulantes. Entre 60-120 minutos, la expresión CD62P disminuyó en CTAD; la razón de esto no está clara, pero podría deberse a pérdida de CD62P de la superficie de los trombocitos, o a la adherencia de los trombocitos activados a la pared del tubo, o a otros leucocitos de la sangre. Esta última teoría se soporta por el marcado incremento en agregados de leucocitos y trombocitos medido en sangre anticoagulada con CTAD comparados con los de EDTA o E/C, y a la pequeña disminución en número de trombocitos observada en la sangre anticoagulada con CTAD. La razón de esto no es inmediatamente aparente, pero parecería que estuviese relacionada con la presencia del EDTA, que es mucho mejor quelante de calcio que el citrato, y se requiere calcio para que se produzca la activación de los trombocitos. Los trombocitos contienen grandes cantidades de bifosfato de adenosina (en adelante ADP), que se libera en presencia de calcio tras la activación; el ADP se puede degradar en adenosina por los leucocitos (Faint, R.W. (1992) Interacciones de trombocitos y neutrófilos: su significación. Revista de la sangre, 6, 83-91 que luego tiene un efecto inhibidor sobre la activación de los trombocitos y de los neutrófilos (Seis, W. (1989). Mecanismos moleculares de la activación de trombocitos, Revista de Psicología, 69, 58-65). Los leucocitos y el endotelio vascular expresan suficientes ectonucleotidasas para metabolizar la mayor parte de los nucleótidos que circulan en sangre fluente. (Coade, S.B., Pearson, J.D. (1989). Metabolismo de nucleótidos de adenina en la sangre humana. Investigación de circulación, 65, 531-537) pero, en las condiciones estáticas de los recipientes de Vacutainer<sup>®</sup>, este metabolismo podría ser sub-óptimo, conduciendo a la presencia de niveles superiores a los normales de ADP. Es sabido que el ADP da lugar al hinchamiento de los trombocitos y aboga a las membranas de los trombocitos a unirse entre sí (Faint, 1992). Por tanto, es posible que las grandes cantidades de ADP aumenten la capacidad de los trombocitos y leucocitos para formar agregados. Podría ser, por tanto, que la aparente inhibición de la activación de los trombocitos medida por la expresión de CD62P, en sangre anticoagulada con CTAD, sea un artefacto debido al hecho de que los trombocitos activados, aunque presentes, no fueran detectables porque estaban unidos a leucocitos. Parece que la formación ex vivo de agregados de leucocitos y trombocitos depende del anticoagulante.

35 Es sabido que el EDTA causa artefactos en la sangre, y se ha demostrado que, en sangre anticoagulada con EDTA a temperatura ambiente, el MPV fue en promedio un 23% mayor que en la sangre anticoagulada con el citrato correspondiente (Threatte y colaboradores, 1984). Este estudio mostró también que el máximo incremento en MPV en sangre anticoagulada con EDTA ocurría en cuestión de minutos de la exposición. Sin embargo, se ha demostrado que el MPV en EDTA, CTAD y una mezcla de EDTA y CTAD cayó entre 0 y 30 minutos. Estos resultados son contrarios a los de averiguaciones anteriores, y ello podría relacionarse con la manera en que se analizó la sangre. En este estudio se usó el sistema hematológico ADVIA 120 (Bayer, Tarrytown, N.Y.), y mide la luz dispersa por los trombocitos en ángulos grandes y pequeños; las primeras mediciones se relacionan con el índice de refracción de los trombocitos, es decir, la medición de la granulación o el grado de activación de los trombocitos,

5 y las segundas son contingentes sobre el volumen de los glóbulos (Zelmanovic y colaboradores, 1998). Mientras, Threatte y colaboradores usaron un analizador de trombocitos en sangre completa Ultra-Flo 100 (Clay-Adams, Parsppany, N.J.), que es un instrumento semiautomático que permite la detección de pequeños cambios de corriente generados por los glóbulos suspendidos en un diluyente conductor, cuando circulan a través de un orificio (Guthrie, D.L., Lam, K.T., Priest, C.J. (1980)- Contador de trombocitos Ultra Flo- 1100-un nuevo concepto para contar trombocitos. Hematología clínica y de laboratorio, 2, 231-242.

10 La comunicación de Macey y colaboradores (1999) a la que se ha hecho referencia anteriormente, demuestra que la estimulación in Vitro de trombocitos en sangre completa conduce a una expresión incrementada de CD62P y a una concurrente disminución en MPC. Los resultados anteriores demuestran claramente que el MPC disminuyó en EDTA más que en CTAD o en una mezcla de DETA y CTAD, confirmando que el EDTA causa la activación de los trombocitos. En sangre anticoagulada con CTAD el valor medio de MPC no cambió con el tiempo, de aquí que los trombocitos fuesen estables, coherentes con la expresión de CD62P estable medida por citometría de flujo fluorescente. En sangre anticoagulada con CTAD y con una mezcla de EDTA y CTAD, los valores de MPC fueron similares durante un período de 180 minutos.

15 El alto MPV y el bajo MPC en muestras que emplean una mezcla de EDTA y CTAD indican que los trombocitos son esféricos, hasta un grado suficiente para que la determinación de MPC sea satisfactoria, sin sufrir desgranulación. Ello se confirma por el bajo nivel de expresión de CD62P en trombocitos en sangre anticoagulada con una mezcla de EDTA y CTAD, que era comparable con la detrombocitos en sangre anticoagulada solamente con CTAD. En contraste, los trombocitos en sangre anticoagulada con EDTA tenían un alto MPV y una alta expresión de CD62P, mostrando que se habían hinchado y desgranulado. Esta última averiguación está de acuerdo con comunicaciones anteriores (McShine y colaboradores, 1990; Kuhne y colaboradores, 1995; Thompson, C.B., Diaz, d.D., Quinn, P.G., Lapins, M., Kurtz, S.R., Valeri, C.R. (1983). El papel de la anticoagulación en la medición de los volúmenes de los trombocitos Revista americana de patología clínica, 80, 327-332; y Macey colaboradores, 1999).

#### Ejemplo 2 : Comparación de E/C con EDTA/ácido cítrico, EDTA/adenosina, EDTA/dipiridamol y EDTA/teofilina

##### 25 Materiales y métodos

##### Preparación de fármacos de trombocitos

30 Se usaron fármacos de control de la activación de los trombocitos en combinación con ácido cítrico 0,11M (Sigma, Steinheim, Alemania) y fueron los siguientes: 3,7 mM de adenosina (Sigma, Steinheim, Alemania), 0,198 mM de dipiridamol (Sigma, Bélgica) y 15 mM de teofilina (Sigma, Steinheim, Alemania) El pH de cada solución se ajustó lo necesario a un pH de 5,0. Las soluciones se esterilizaron con filtro y se almacenaron a - 20°C hasta que se necesitasen. El anticoagulante CTAD (Becton Dickinson, Plymouth, Gran Bretaña) se almacenó en cajas de protección contra la luz y se retiró antes de su uso.

##### Materiales

Como en el ejemplo 1.

##### 35 Antisueros

Como en el ejemplo 1

##### Extracción sanguínea

40 Se extrajo sangre de la vena antecubital de 5 voluntarios (edad media 38, 3 mujeres y 3 hombres) en cuatro recipientes Vacutainer® de EDTA (Beckton Dickinson, Plymouth, Gran Bretaña) usando una aguja del calibre 21. Se añadieron tres muestras de EDTA a los recipientes Vacutainer® que contenían ácido cítrico con adenosina o dipiridamol o teofilina. La muestra final de EDTA se añadió a un Vacutainer® que contenía el anticoagulante CTAD

##### Valoración de la activación de los trombocitos en el ADVIA 120

45 Se tomaron muestras de sangre completa en recipientes Vacutainer® (Becton Dickinson) que contenían EDTA y mezcladas con los antagonistas de trombocitos antes mencionados, o con CTAD ( a esta mezcla se hace referencia como E/C). Se analizaron las muestras como en el ejemplo 1.

##### Medición de la expresión de CD62P y del número de agregados de leucocitos y trombocitos (PLA)

Como en el ejemplo 1.

##### Citometría de flujo

Como en el ejemplo 1.

## ES 2 372 810 T3

### Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de t pareada para determinar las diferencias entre las cuatro mezclas de anticoagulantes estudiadas.

### Resultados

#### 5 Número de trombocitos

Tiempo en minutos	Número de trombocitos en sangre anticoagulada con E/A/10 <sup>9</sup> /l	Número de trombocitos en sangre anticoagulada con E/D/10 <sup>9</sup> /l	Número de trombocitos en sangre anticoagulada con E/T/10 <sup>9</sup> /l	Número de trombocitos en sangre anticoagulada con E/C/10 <sup>9</sup> /l
0	269 ± 17,58	246 ± 15,18	241 ± 12,10	267 ± 21,84
30	266 ± 16,51	262 ± 15,69	257 ± 13,09	264 ± 20,41
60	270 ± 18,55	269 ± 21,18	262 ± 17,20	268 ± 18,68
90				
120	267 ± 14,70	260 ± 18,08	256 ± 18,77	257 ± 20,23
150				
180	266 ± 16,74	262 ± 19,61	253 ± 13,00	259 ± 20,57

Los números de trombocitos fueron similares y dentro del intervalo normal en cada una de las cuatro combinaciones de anticoagulantes.

### Volumen medio de trombocitos

#### 10

Tiempo en minutos	MPV en sangre anticoagulada con E/A/10 <sup>9</sup> /fl	MPV en sangre anticoagulada con E/D/10 <sup>9</sup> /fl	MPV en sangre anticoagulada con E/T/10 <sup>9</sup> /fl	MPV en sangre anticoagulada con E/C/10 <sup>9</sup> /fl
0	9,4 ± 0,36	9,6 ± 0,56	10,0 ± 0,47	8,9 ± 0,37
30	9,2 ± 0,42	9,1 ± 0,33	10,0 ± 0,35	8,8 ± 0,43
60	8,6 ± 0,30	8,2 ± 0,38	9,4 ± 0,34	9,1 ± 0,36
90				
120	8,5 ± 0,45	8,3 ± 0,38	9,5 ± 0,37	9,4 ± 0,42
150				
180	8,6 ± 0,46	8,4 ± 0,41	9,6 ± 0,38	9,6 ± 0,38

En sangre anticoagulada con E/C, el MPV disminuyó en los primeros 30 minutos y luego aumentó. En contraste, en la sangre anticoagulada con E/A, E/D y E/T, el MPV disminuyó en los primeros 60 minutos y luego permaneció estable.

#### 15

Componente medio de trombocitos

Tiempo en minutos	MPC en sangre anticoagulada con E/A /g/dl	MPC en sangre anticoagulada con E/D /g/dl	MPC en sangre anticoagulada con E/T /g/dl	MPC en sangre anticoagulada con E/C /g/dl
0	24,0 ± 0,53	23,6 ± 0,73	22,8 ± 0,55	25,4 ± 0,47
30	25,0 ± 0,65	25,3 ± 0,63	23,4 ± 0,41	25,8 ± 0,57
60	25,5 ± 0,39	26,6 ± 0,26	23,9 ± 0,16	25,0 ± 0,38
90				
120	26,2 ± 0,26	26,5 ± 0,31	23,9 ± 0,13	24,4 ± 0,28
150				
180	26,0 ± 0,27	26,3 ± 0,23	23,6 ± 0,12	23,9 ± 0,15

- 5 En sangre anticoagulada con E/C se produjo un aumento en el MPC en los primeros 30 minutos, seguido por una disminución. En sangre anticoagulada con E/D y E/T, el MPC continuó aumentando hasta 60 minutos después de la venopunción, y en sangre anticoagulada con E/A, el aumento en el MPC continuó hasta 120 minutos después de la venopunción.

Masa media de trombocitos (en adelante MPM)

Tiempo en minutos	MPM en sangre anticoagulada con E/A/pg	MPM en sangre anticoagulada con E/D/pg	MPM en sangre anticoagulada con E/T/pg	MPM en sangre anticoagulada con E/C/pg
0	2,02 ± 0,07	2,01 ± 0,07	1,99 ± 0,07	2,01 ± 0,08
30	2,07 ± 0,07	2,06 ± 0,07	2,04 ± 0,07	2,06 ± 0,07
60	2,01 ± 0,06	2,02 ± 0,06	2,00 ± 0,06	2,01 ± 0,06
90				
120	2,06 ± 0,08	2,01 ± 0,07	2,02 ± 0,07	2,02 ± 0,07
150				
180	2,02 ± 0,08	2,03 ± 0,07	2,01 ± 0,07	2,00 ± 0,07

- 10 Las variaciones en la MPM con el tiempo fueron muy similares en las cuatro combinaciones de anticoagulantes

% de trombocitos positivos en CD62P

Tiempo en minutos	% positivo de CD62P en sangre anticoagulada con E/A	% positivo de CD62P en sangre anticoagulada con E/D	% positivo de CD62P en sangre anticoagulada con E/T	% positivo de CD62P en sangre anticoagulada con E/C
0	0,92 ± 0,47	1,53 ± 0,64	1,91 ± 0,71	2,11 ± 0,96
30	2,65 ± 1,53	2,85 ± 1,17	3,11 ± 1,50	2,32 ± 1,06
60	3,75 ± 1,86	4,62 ± 1,51	4,14 ± 1,66	5,14 ± 1,34
90				
120	5,52 ± 1,89	6,80 ± 2,11	9,81 ± 3,62	10,41 ± 1,54
150				
180	8,72 ± 2,48	9,25 ± 2,35	14,48 ± 3,62	13,44 ± 1,88

El número de trombocitos positivos de CD 62P aumentó con el tiempo durante el período de 180 minutos en los cuatro anticoagulantes.

Formación de agregados de leucocitos y trombocitos

Tiempo en minutos	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con E/A	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con E/D	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con E/T	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con E/C
0	2,54 ± 0,91	3,14 ± 0,72	2,77 ± 0,92	2,40 ± 0,61
30	3,08 ± 0,89	3,76 ± 1,13	2,95 ± 0,52	3,6 ± 0,72
60	3,22 ± 0,50	4,41 ± 1,52	3,00 ± 0,70	4,10 ± 1,13
90				
120	4,46 ± 0,6	5,55 ± 1,02	5,54 ± 0,80	5,26 ± 1,00
150				
180	7,57 ± 1,36	6,53 ± 0,99	8,16 ± 1,20	5,72 ± 0,97

- 5 El número de agregados de leucocitos y trombocitos aumentó con el tiempo en la sangre anticoagulada con las cuatro combinaciones de anticoagulantes. El mínimo porcentaje de agregados de leucocitos y trombocitos a los 180 minutos se encontró en la sangre anticoagulada con E/C.

Conclusiones

- 10 En sangre anticoagulada con E/C, hubo una disminución en el MPV y un incremento en el MPC en los primeros 30 minutos después de la venopunción. Se cree que estos cambios están en relación de asociación con la conversión de los trombocitos en esferas. Se produjeron cambios similares en sangre anticoagulada con E/A, E/T y E/D, pero durante un período más prolongado de tiempo. Como se requiere la conversión en esferas de los trombocitos para determinar el MPV y el MPC en el ADVIA 120, es conveniente que esto ocurra tan rápidamente como sea posible después de la venopunción. Por tanto, para este fin es preferible el uso de E/C a los de E/A, E/D ó E/T.

- 15 Ejemplo 3. Mezcla previa de componentes, efecto de la baja temperatura, hemograma completo

Materiales y métodos

*Materiales*

- 20 La solución salina de Tyrodes (TS; CaCl 2H<sub>2</sub>O 0,265 g/l MgCl 6 H<sub>2</sub>O 0,214 g/L, KCl 0,2 g/L, Na H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 1,0 g/L, Na Cl 8,0 g/L, Na PO<sub>4</sub> 0,05 g/L, glucosa 1,0 g/L) y la trombina humana eran de Sigma Poole, Dorset, Gran Bretaña). K3EDTA y CTAD en recipientes Vacutainer<sup>®</sup> eran de BD BioSciences (Cowley, Oxford, Reino Unido); éste se almacenó en cajas de protección contra la luz y se retiró justo antes de usarlo.

*Antisueros*

Como en el ejemplo 1

*Muestras de sangre*

- 25 Se extrajo sangre de la vena antecubital de siete individuos sanos (edad media 35 años) que no habían tomado ninguna medicación incluyendo aspirinas o productos que contuviesen aspirinas en las 48 horas anteriores.

*Valoración de la activación de trombocitos en el ADVIA<sup>®</sup> 120*

- 30 Se introdujeron muestras de sangre completa en recipientes Vacutainer<sup>®</sup> que contenían o bien K<sub>3</sub> EDTA, o CTAD, o una mezcla de K<sub>3</sub> EDTA y CTAD (E/C). Para ésta última, la sangre se recogió primero en K<sub>3</sub> EDTA y luego se transfirió inmediatamente a un Vacutainer<sup>®</sup> que contenía CTAD. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, se analizaron inmediatamente y a los 30, 60, 120 y 180 minutos después de la venopunción. El análisis del número de trombocitos (PLT), volumen medio de trombocitos (MPV) y concentración de componente medio de trombocitos (MPC) se realizó usando el sistema hematológico ADVIA<sup>®</sup> 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY). Las cuentas de trombocitos realizadas en sangre anticoagulada con CTAD y E/C se corrigieron por dilución (los factores de dilución eran 1,11 y 1,25, respectivamente). El sistema se calibró y normalizó antes de usarlo con el
- 35

control hematológico ADVIA®-SET point y ADVIA®OPTI point, respectivamente (Bayer Corporation). En una serie de experimentos, (n = 4) estos análisis se realizaron en muestras de sangre anticoagulada con E/C, pero se mantuvieron a temperatura ambiente y a 4° C para investigar el efecto del enfriamiento sobre la activación de los trombocitos.

5 *Medición de la expresión de CD62P y del porcentaje de leucocitos que tenían trombocitos fijados (agregados de leucocitos y trombocitos).*

Como en el ejemplo 1.

*Citometría de flujo*

10 Como en el ejemplo 1. Los agregados de leucocitos y trombocitos se trasladaron luego a un histograma ( C) de dispersión de luz (ordenadas a escala logarítmica) y de fluorescencia naranja (abcisas a escala logarítmica) para identificar, por su SLS característico, qué leucocitos formaban PLA,

*Investigación del efecto inhibidor de la CTAD en trombocitos activados por trombina*

15 En una serie de experimentos (n= 3) se investigó el efecto de la CTAD sobre la activación de los trombocitos en sangre anticoagulada con K<sub>3</sub> EDTA que se había incubado con una concentración sub-óptima (determinada previamente por valoración) de trombina humana. Se eligió una concentración de trombina, para estimular un nivel bajo de activación de trombocitos determinado por la expresión de CD62P. Se añadió trombina (15 µl) a sangre (210 µl) que se había anticoagulado con K<sub>3</sub>EDTA para dar una concentración final de 0,0012 U/ml e incubado a la temperatura ambiente con FITC-CD62P (25 µl). A los 10 minutos se retiró una muestra (40 µl), se añadió a la CTAD (5 µl) y se incubó durante otros 20 minutos. Las muestras de sangre de control anticoaguladas con K<sub>3</sub>EDTA o CTAD a las que no se había añadido trombina se incubaron también con FITC-CD62P durante 30 minutos. Se retiraron partes alícuotas (5 µl) de sangre de cada tubo de reacción a los 0, 10, 20, 40 y 60 minutos, se diluyeron con TS (995 µl), y se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

*Análisis estadístico.*

25 Los resultados de la citometría de flujo y del sistema hematológico ADVIA ® 120 se compararon usando la prueba de t pareada para probar las diferencias significativas entre la misma muestra analizada en tiempos diferentes. Para tenerlo en cuenta, se consideraron significativos múltiples valores de comparación de p < 0,01. Los resultados se compararon también para análisis de varianza (en adelante ANOVA) para probar diferencias significativas entre los valores medios y se aplicó la prueba post hoc de Scheffe para múltiples comparaciones.

Resultados

30 *Número de trombocitos (PLT)*

Los números de trombocitos en los tres anticoagulantes inmediatamente después de la venopunción no diferían significativamente y estaban en el intervalo normal. No se produjeron cambios significativos en el número de trombocitos durante 180 minutos en la sangre mantenida con los diferentes anticoagulantes a la temperatura ambiente ((Tabla 1) ni cuando la sangre anticoagulada con E/C se mantuvo a 4° C.

35 Tabla 1. Números de trombocitos en sangre mantenida con diferentes anticoagulantes.

Tiempo en minutos	Anticoagulante	Anticoagulante	Anticoagulante	Anticoagulante
	*EDTA	*CTAD	*E/C	**E/C a 4° C
0	235 ± 13	229 ± 14	230 ± 14	243 ±33
30	246 ±14	229 ± 14	238 ± 14	243 ± 30
180	246 ± 5	246 ± 5	225 ± 10	256 ± 30

• Media de 7; \*\* Media de 4

• *Volumen medio de trombocitos (MPV)*

Tiempo en minutos	MPV en sangre anticoagulada con EDTA a temp <sup>a</sup> amb./fl	MPV en sangre anticoagulada con CTAD a temp <sup>a</sup> amb. /fl	MPV en sangre anticoagulada con E/C a temp <sup>a</sup> amb./fl	MPV en sangre anticoagulada con E/C a 4° C/fl
0	8,0 ± 0,37	9,1 ± 0,24	9,0 ± 0,24	8,8 ± 0,47
30	7,7 ± 0,27	8,4 ± 0,24	8,6 ± 0,32	8,4 ± 0,52
60	7,7 ± 0,24	8,5 ± 0,27	8,7 ± 0,30	8,1 ± 0,45
90				
120	8,0 ± 0,30	8,9 ± 0,28	9,0 ± 0,28	8,22 ± 0,34
150				
180	8,1 ± 0,21	9,2 ± 0,20	9,2 ± 0,28	

5 Los valores para MPV cayeron inicialmente en todos los anticoagulantes y luego volvieron a subir. Cuando la sangre se mantuvo a temperatura ambiente, el nadir fue a los 30 minutos en todos los anticoagulantes, pero fue a los 60 minutos cuando la sangre anticoagulada con E/C se mantuvo a 4° C. Cuando se almacenaron a temperatura ambiente, los valores de MPV en todos los tiempos fueron significativamente más bajos ( $p < 0,04$ ) en la sangre que se había anticoagulado con K<sub>3</sub>EDTA que en sangre anticoagulada con CTAD o E/C.

*Componente medio de trombocitos (MPC)*

Tiempo en minutos	MPC en sangre anticoagulada con EDTA a temp <sup>a</sup> amb./pg/l	MPC en sangre anticoagulada con CTAD a temp <sup>a</sup> amb./pg/l	MPC en sangre anticoagulada con E/C a temp <sup>a</sup> amb./pg/l	MPC en sangre anticoagulada con E/C a 4° C./pg/l
0	28,0 ± 0,87	25,2 ± 0,62	25,6 ± 0,54	25,1 ± 0,78
30	29,1 ± 0,52	27,1 ± 0,40	26,6 ± 0,66	27,0 ± 0,25
60	28,8 ± 0,42	26,7 ± 0,40	26,4 ± 0,64	27,4 ± 0,19
90				
120	27,9 ± 0,48	26,3 ± 0,67	25,4 ± 0,67	27,0 ± 0,21
150				
180	27,1 ± 0,36	25,2 ± 0,40	25,0 ± 0,67	

10 En contraste directo a los resultados para los valores de MPV (anteriormente expuestos) los valores de MPC subieron inicialmente y luego cayeron. Los valores máximos se alcanzaron a los 30 minutos en todos los anticoagulantes cuando la sangre se mantuvo a temperatura ambiente y a los 60 minutos cuando se mantuvo en el E/C a 4° C. Los valores del componente medio de trombocitos fueron significativamente más altos en todos los tiempos en sangre mantenida a temperatura ambiente con K<sub>3</sub>EDTA que con CTAD ( $p < 0,04$ ) o con E/C ( $p < 0,02$ )

15

*Expresión de CD62P en trombocitos*

Tiempo en minutos	% de trombocitos positivos de CD62P en sangre anticoagulada con EDTA a temp <sup>a</sup> ambiente	% de trombocitos positivos de CD62P en sangre anticoagulada con CTAD a temp <sup>a</sup> ambiente	% de trombocitos positivos de CD62P en sangre anticoagulada con E/C a temp <sup>a</sup> ambiente	% de trombocitos positivos de CD62P en sangre anticoagulada con E/C a 4° C
0	1,10 ± 0,24	1,22 ± 0,26	1,28 ± 0,37	0,53 ± 0,12
30	3,71 ± 1,04	1,42 ± 0,37	2,01 ± 0,61	
60	11,27 ± 1,60	3,09 ± 0,84	5,94 ± 2,90	0,38 ± 0,17
90				
120	18,94 ± 2,53	2,38 ± 0,29	6,98 ± 1,48	0,61 ± 0,34
150				
180	23,05 ± 2,79	4,14 ± 0,61	8,45 ± 0,86	1,07 ± 0,57

5 Solamente los porcentajes bajos de trombocitos expresaron CD62P poco después de la venopunción (1,10 ± 0,61%, 1,22 ± 0,62 y 1,26 ± 0,85, (media + SE) en K<sub>3</sub> EDTA, CTAD y E/C respectivamente), pero los porcentajes subieron cuando la sangre se mantuvo a temperatura ambiente. Las subidas a los 180 minutos fueron mayores en sangre anticoagulada con K<sub>3</sub>EDTA (23,05 ± 1,54%) que con E/C (8,45 ± 0,79%), y fueron los más bajos en sangre anticoagulada con CTAD (4,14 ± 0,79%). A los 180 minutos, el porcentaje de trombocitos positivos de CD62P en sangre anticoagulada con K<sub>3</sub>EDTA fue significativamente más alto (p<0,01) que en sangre anticoagulada con CTAD o con E/C. Cuando las muestras de sangre anticoagulada con E/C se mantuvieron a 4° C, hubo solamente mínimos y no significativos incrementos en el número de trombocitos positivos de CD62P desde 0,53 ± 0,12% a 0 minutos hasta 1,07 ± 0,57% a los 180 minutos.

*Formación de agregados de leucocitos y trombocitos (PLA)*

Tiempo en minutos	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con EDTA a temp <sup>a</sup> ambiente	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con CTAD a temp <sup>a</sup> ambiente	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con E/C a temp <sup>a</sup> ambiente	% de agregados de leucocitos y trombocitos en sangre anticoagulada con E/C a 4° C
0	3,30 ± 0,5	3,95 ± 0,73	2,82 ± 0,67	2,82 ± 0,65
30	4,16 ± 0,86	5,57 ± 1,36	3,13 ± 0,86	3,13 ± 0,67
60	8,87 ± 1,54	9,64 ± 1,41	4,48 ± 0,94	3,29 ± 0,57
90				
120	8,50 ± 0,44	15,80 ± 2,5	6,18 ± 2,28	3,61 ± 1,25
150				
180	13,50 ± 1,74	18,88 ± 2,06	7,81 ± 1,43	3,91 ± 1,40

15 Inmediatamente después de la venopunción, se pudo encontrar un pequeño porcentaje de leucocitos que estaban en relación de asociación con trombocitos en la sangre de todos los donantes independientemente de en qué anticoagulante se hubiesen recogido (3,50 ± 0,71%, 3,95 ± 0,97%, y 2,82 ± 0,5% (media ± SE) en K<sub>3</sub>EDTA, CTAD y E/C respectivamente). En todos los anticoagulantes, el porcentaje de agregados de leucocitos y trombocitos subió notablemente cuando la sangre se mantuvo a temperatura ambiente. Los incrementos a los 180 minutos fueron mayores en sangre anticoagulada con CTAD (18,88 ± 2,06%) que con K<sub>3</sub>EDTA (13,50 ± 1,74%) y fueron los más bajos en sangre anticoagulada con E/C (7,81 ± 1,43%). Sin embargo, cuando las muestras de sangre anticoagulada con E/C se incubaron a 4° C, solamente hubo unos mínimos incrementos en el porcentaje de agregados de leucocitos y trombocitos durante 180 minutos.



*El efecto de la CTAD sobre los trombocitos activados con trombina*

5 Para asegurarse de si la CTAD podía inhibir eficazmente respuestas adicionales por trombocitos que ya hubiesen encontrado un agonista, la sangre que se había recogido en K<sub>3</sub>EDTA se incubó sola o con una concentración sub-óptima de trombina. A los 10 minutos se añadió una parte alícuota de sangre estimulada por trombina a la CTAD. La activación de los trombocitos, monitorizada por la expresión de CD62P, se inhibió completamente por la adición de la CTAD, mientras que se produjo una activación progresiva en sangre que se había anticoagulado solamente con K<sub>3</sub>EDTA y, como se esperaba, fue mayor en estas muestras cuando se había añadido trombina que cuando se había omitido.

*Investigación de la estabilidad del EDTA y de la CTAD cuando se mezclaron antes de usarlos*

10 Como los resultados sugeridos hasta entonces sugerían que el E/C podría ser un anticoagulante mejor para estudios de trombocitos que o bien el K<sub>3</sub>EDTA o la CTAD solos, se investigó el efecto de mezclar previamente los dos componentes. Se recogió sangre en mezclas de K<sub>3</sub> EDTA y CTAD que se habían preparado, o bien 14 días o justo inmediatamente antes del uso, y en K<sub>3</sub>EDTA que luego se mezcló con CTAD (como se había hecho anteriormente al largo de todo el estudio). Todas las mezclas se mantuvieron subsiguientemente a 4° C. Los  
15 valores para los parámetros hematológicos habituales, y de activación de trombocitos, medidos en el ADVIA®120 poco después de la venopunción fueron similares, independientemente de si los dos anticoagulantes se habían mezclado antes o después de la extracción de la sangre. Además, los valores permanecieron esencialmente invariables cuando se analizaron también a las 3, 6 y 24 horas. Los ensayos de inmunofluorescencia demostraron que el porcentaje de leucocitos involucrados en agregados con trombocitos subió ligeramente (incrementos < 5% a las 24 horas) en todas las muestras (no se han mostrado los resultados) durante 24 horas.

*Comparación de los resultados hematológicos del ADVIA®120 en sangre anticoagulada con EDTA, CTAD y E/C.*

25 Para investigar si la sangre anticoagulada con E/C se podía usar para análisis habituales de parámetros hematológicos, se compararon los resultados obtenidos en el ADVIA®120 de 7 muestras de control anticoaguladas con EDTA, CTAD y E/C. No hubo diferencias significativas en la medición de los números de leucocitos (en adelante WBC), de los números de eritrocitos (en adelante RBC) y de la concentración de hemoglobina (en adelante HGB) en muestras de sangre anticoaguladas con los tres anticoagulantes. Sin embargo, el hematocrito y una cantidad de los parámetros de los trombocitos fueron significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) en sangre anticoagulada con CTAD y E/C comparados con la sangre anticoagulada con EDTA (Tabla 2).

30 Tabla 2. Comparación de los resultados hematológicos del ADVIA®120 en sangre anticoagulada con EDTA, CTAD y E/C.

Parámetro	Unidad sistema internacional	EDTA	CTAD (X1,11)	E/C (X1,25)
		Media ( $\pm$ S.E.) a los 30 minutos		
PLT	109/L	246 (14)	229 (14)	238 (14)
MPV	FL	7,7 (0,27)	*8,4 (0,24)	*8,6 (0,32)
PDW	%	58,9 (3,24)	*53,8 (2,40)	55,6 (2,24)
PCT	%	0,19 (0,01)	*0,17 (0,01)	0,18 (0,01)
MPC	G/dL	29,1 (0,52)	*27,1 (0,40)	*26,6 (0,66)
PCDW	G/DL	5,00 (0,09)	*7,2 (0,13)	*6,9 (0,38)
WBC	109/L	5,35 (0,40)	5,27 (0,42)	5,36 (0,40)
NEUTRÓFILO	109/L	3,13 (0,24)	3,07 (0,24)	3,10 (0,22)
LINFOCITO	109/L	1,61 (0,20)	1,65 (0,23)	1,69 (0,24)
MONOCITO	109/L	0,32 (0,04)	0,28 (0,03)	0,30 (0,04)
EOSINÓFILO	109/L	0,11 (0,04)	0,12 (0,04)	0,11 (0,03)
BASÓFILO	109/L	0,06 (0,01)	0,03 (0,01)	0,04 (0,01)
RBC	106/microlitros	4,77 (0,20)	4,82 (0,21)	4,87 (0,21)
HGB	G/dL	14,7 (0,40)	14,8 (0,40)	15,1 (0,44)

HCT	L/L	0,421 (0,01)	*0,434 (0,01)	*0,438(0,01)
MCV	fl	88,7 (1,82)	*90,5 (1,89)	*90,4 (1,93)
MCH	Pg	30,9 (0,56)	30,9 (0,63)	*31,1 (0,56)
MCHC	G/dl	34,9 (0,20)	*34,2 (0,20)	*34,4 (0,23)
RDW	%	12,5 (0,10)	12,6 (0,11)	12,6 (0,12)

\*Indica diferencias significativas  $P < 0,01$  entre EDTA un anticoagulante

### Discusión

5 Los datos presentados en la presente memoria muestran claramente que el MPV en el EDTA, CTAD y E/C cayó entre los 0 y los 30 minutos, pero luego volvió a subir. Los resultados para el EDTA están muy de acuerdo con los de los estudios anteriores, en los que el MPV se determinó por procedimientos ópticos (Trowbridge, E.A., Reardon, D.M., Hutchinson, D., Pickering, C. (1985) "La medición habitual del volumen de los trombocitos. Una comparación de las tecnologías de dispersión de la luz y de impedancia de abertura". Clin.Phys. Physiol.Meas ,6, 221-238).

10 De un modo coherente con las recientes comunicaciones, la CTAD inhibió ampliamente los incrementos en la expresión de CD62P que ocurrían en trombocitos mantenidos durante 180 minutos a la temperatura ambiente en sangre anticoagulada con  $K_3EDTA$ . (Kuhne y colaboradores, 1995; Macey y colaboradores, 1999; Mody y colaboradores, 1999). Además, cuando la sangre que se había anticoagulado con  $K_3EDTA$  se estimuló con trombina, la adición subsiguiente de CTAD inhibió la desgranulación de los trombocitos y los incrementos en la expresión de CD62P que de no ser así ocurrían en sangre mantenida con solamente  $K_3EDTA$ . Se ha demostrado anteriormente que, siguiendo a la estimulación in vitro de sangre completa anticoagulada con  $K_3EDTA$ , los incrementos en la expresión de CD62P van acompañados por una disminución concurrente en el MPC (Macey y colaboradores, 1999). Ahora se muestra que a temperatura ambiente, el MPC disminuyó en  $K_3EDTA$  más que en EDTA o en E/C, confirmando que el EDTA causa activación de trombocitos. Los valores del MPC en sangre anticoagulada con CTAD o E/C eran similares durante 180 minutos, y significativamente más bajos que en  $K_3EDTA$ . Tomados juntos, los cambios en el MPV y en el MPC a la temperatura ambiente sugieren que, en sangre anticoagulada con E/C, los trombocitos se convierten en esféricos ( aunque quizás no de un modo máximo), sin sufrir desgranulación. Esto se confirma por el bajo nivel de la expresión de CD62P sobre trombocitos en sangre anticoagulada con E/C, que era comparable al de los trombocitos en sangre anticoagulada sólo con CTAD.

25 Todavía no está claro porqué a la temperatura ambiente el porcentaje de trombocitos que expresan CD62P en sangre anticoagulada con CTAD cayó ligeramente entre los 60 y los 120 minutos, pero una explicación posible es que algunos trombocitos activados se habían adherido a la pared del tubo o a otros leucocitos de la sangre. De hecho, la sangre anticoagulada con CTAD contenía números más altos de agregados de leucocitos y trombocitos que la sangre que se había anticoagulado con  $K_3EDTA$  o E/C. Las razones de lo anterior no resultan inmediatamente aparentes, pero parecen depender de la presencia de EDTA. De un modo un poco paradójico, El EDTA ha demostrado afectar a los receptores ligados a la membrana de los trombocitos de una manera que aumenta, más bien que disminuye, la secreción y agregación de gránulos (Golanski, J., Pietruha, T., Baj, Z., Greger, J., Watala, C (1996) "Investigaciones moleculares en la activación espontánea inducida por anticoagulante de trombocitos en sangre completa-varios anticoagulantes no son iguales". Investigación sobre trombosis, 83, 199-216). Sin embargo, se requiere  $Ca^{2+}$  externo para la agregación, y como el EDTA es un quelante mejor de  $Ca^{2+}$  que el citrato, podría tener un efecto inhibitor mejor en estos aspectos. Si esta explicación es cierta, entonces es posible que la CTAD podría no inhibir completamente los incrementos en la expresión de CD6P, porque los trombocitos activados podrían estar presentes pero permanecer indetectados, porque estaban fijados a leucocitos. Estos resultados sugieren que la formación de agregados de leucocitos y trombocitos debería monitorizarse durante los estudios de activación de trombocitos en sangre completa, y también resaltar el hecho de que la formación ex vivo de agregados de leucocitos y trombocitos depende del anticoagulante

45 El hallazgo crucial de este estudio es, que cuando la sangre se anticoaguló con E/C y se mantuvo a  $4^\circ C$ , hubo cambios mínimos en los parámetros de activación de trombocitos durante al menos 180 minutos. Este hallazgo será importante para estudios clínicos, porque tres horas es un tiempo suficiente para que una muestra tomada en las instalaciones de la clínica llegue al laboratorio para su análisis. De hecho, estudios preliminares indican que este período de tiempo se podría extender con seguridad hasta seis horas. Presumiblemente, los efectos inhibidores de la CTAD sobre la movilización de calcio intracelular previenen la liberación de gránulos y la formación subsiguiente de PLA..

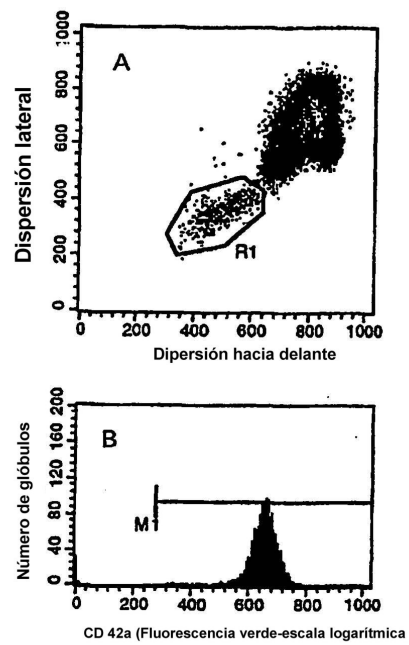
50 Es sabido que los efectos inhibidores de los antagonistas de trombocitos en la CTAD comienzan a disiparse a las 3-4 horas cuando la sangre se mantiene a la temperatura ambiente y, si es necesario, los tiempos de almacenamiento podrían prolongarse aumentando su concentración (2) (Mody y colaboradores, 1999). En las condiciones descritas en la presente memoria (de tiempo y temperatura) , el E/C convierte eficazmente en esferas a los trombocitos sin

causar simultáneamente desgranulación, permitiendo de ese modo la medición precisa del MPC en el ADVIA®120. La capacidad del E/C para inhibir también la formación de agregados de leucocitos y trombocitos ex vivo, indica que este anticoagulante combinado es adecuado para la investigación de estas interacciones en estudios clínicos. De hecho, recientemente se ha averiguado que en muestras de sangre anticoagulada con E/C hay números significativamente mayores de agregados de leucocitos y trombocitos ( $5,16 \pm 1,48$ , media  $\pm$  SE) en la sangre de pacientes (n = 62) con enteropatía inflamatoria que en los controles normales (n = 20), ( $3,43 \pm 0,82$ , media  $\pm$  SE, p = 0,03) (datos no publicados, de los que se ha ilustrado un ejemplo en la Figura 3) Parece también que el anticoagulante combinado E/C sería adecuado para el análisis habitual de la mayoría de los parámetros hematológicos en el ADVIA®120. Sin embargo, desde un punto de vista clínico, no es práctico recoger sangre en un Vacutainer® y luego verterla en un segundo Vacutainer®, o mezclar el contenido de los dos recipientes Vacutainer®. Por esta razón, son preferibles tubos que contengan ambos anticoagulantes.

En conclusión, los resultados anteriores muestran que la mezcla de CTAD y EDTA aporta ventajas significativas para medir la activación de los trombocitos ex vivo y para medir la activación de los leucocitos ex vivo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de medir la activación de los leucocitos, que comprende medir un indicador de activación de leucocitos de los leucocitos suspendido en una composición anticoagulante de sangre que comprende uno o más componentes para efectuar la conversión en la forma esférica de los trombocitos o plaquetas de la sangre que comprende EDTA o EGTA o una combinación de los mismos, y al menos un antagonista de trombocitos o plaquetas de la sangre.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que los antagonistas de trombocitos o plaquetas de la sangre incluyen
  - a)teofilina,
  - 10 b)adenosina o 2-cloroadenosina, y
  - c)dipiridamol.
3. Un método según la reivindicación 2, en el que la composición anticoagulante de sangre además comprende citrato.
- 15 4. Un método según la reivindicación 3, en el que la composición anticoagulante de sangre comprende una mezcla de EDTA y CTAD.



**Figura 1**

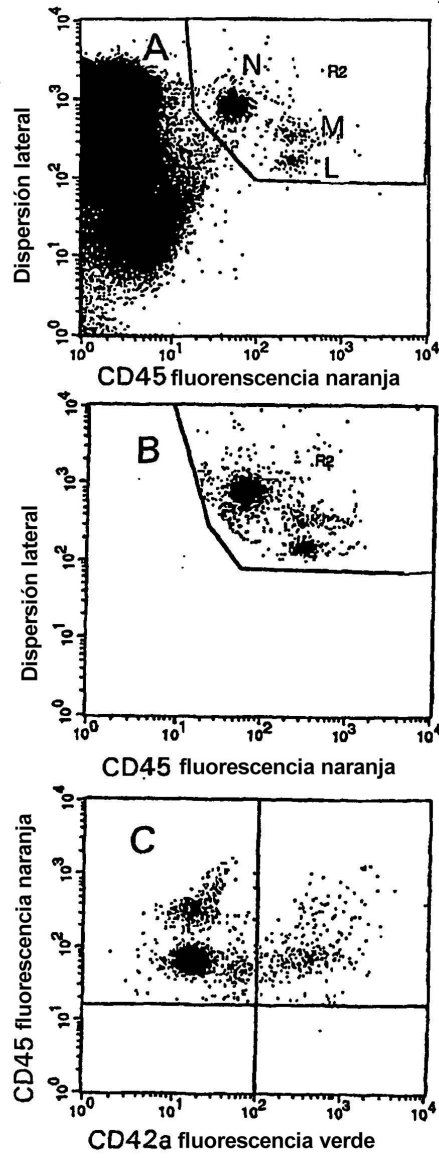


Figura 2

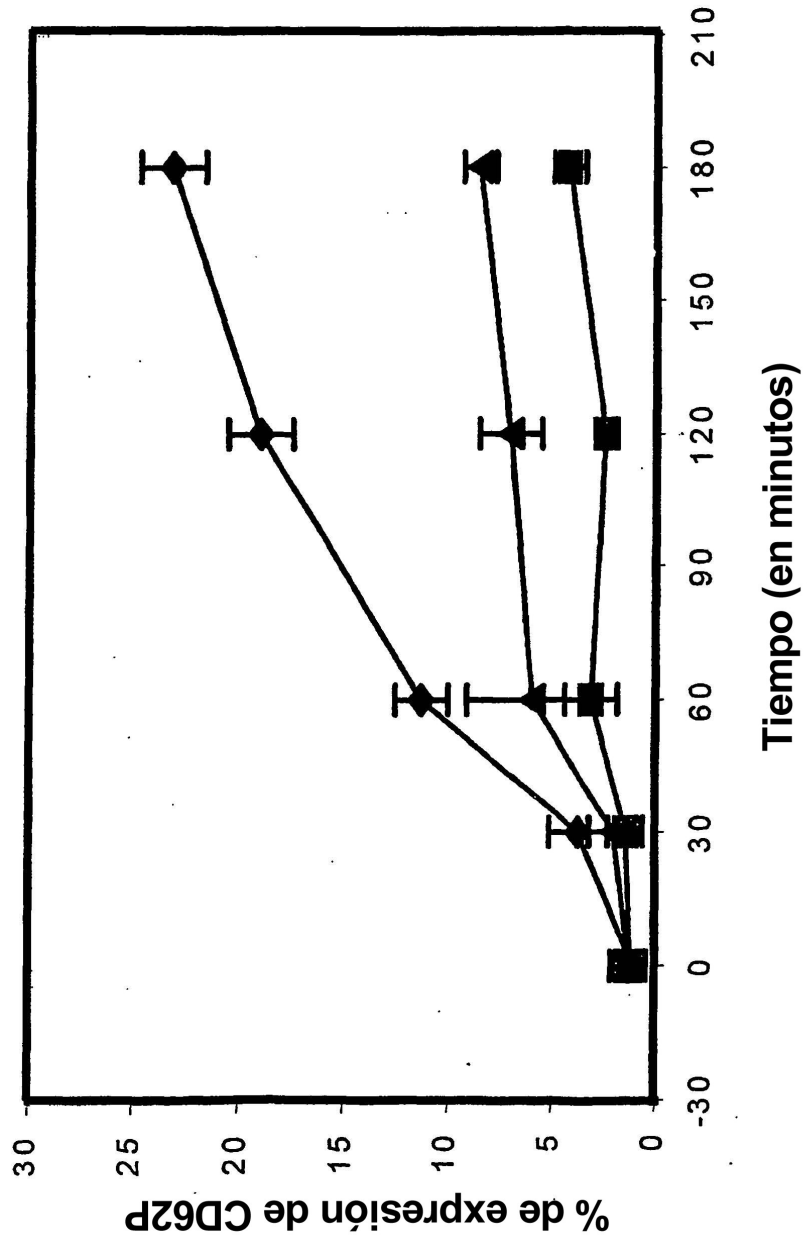


Figura 3