



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Influencia de la Hemólisis en la
Hemostasia de Pacientes Sometidos a
Cirugía de Recambio Valvular Aórtico

D. Sebastián Sánchez Cánovas

2021



Influencia de la hemólisis en la hemostasia de pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico

Tesis para optar al grado de Doctor en Medicina

Presentada por:

D. Sebastián Sánchez Cánovas

Dirigida por:

Dr. Faustino García Candell

Dr. David Iyú Espinosa

Dra. Noemí Marín Atucha

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela Internacional de Doctorado

2021

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, David Iyú, Faustino G. Candel y Noemí Marín, por su labor docente, dedicación y paciencia demostrada.

A mi amigo y compañero el Dr. Antonio García Candel. Su ayuda ha hecho posible la realización de este proyecto.

A Guadalupe Ruiz por su magnífica labor con la estadística.

Al equipo quirúrgico que conforma el quirófano de cardíaca por su inestimable y desinteresada colaboración.

A Esther García y Paola Romecín por su entusiasta colaboración en el proyecto, con el trabajo de recogida y análisis de muestras.

Al Dr. García Palenciano, jefe del servicio de Anestesiología, por su apoyo constante.

Al Dr. Cánovas, jefe de servicio de Cirugía Cardíaca, por su confianza en mí.

A mi maestro y amigo el Dr. Antonio Ribó, por compartir conmigo su experiencia y buen hacer en la anestesia cardíaca.

A Jose, mi mujer, el motor de mi vida, por el empuje y energía que me transmite.

A Celia y Alberto, mis hijos, por el tiempo que les he robado.

A mi padre, Sebastián, por inculcar en mí el afán por la lectura y la búsqueda de conocimiento.

A Isabel†, mi madre, porque sé lo mucho que hubiera disfrutado con esto.

ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AT	Antitrombina
ATP	Adenosín trifosfato
Ca²⁺	Calcio
CEC	Circulación extracorpórea
CD40L	Ligando CD40
CFT	Tiempo de formación del coágulo
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
CT	Tiempo de coagulación
CTI	Inhibidor de la tripsina del maíz
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FII	Factor II
FV	Factor V
FVa	Factor V activado
FVI	Factor VI
FVII	Factor VII
FVIIa	Factor VII activado
FVIII	Factor VIII
FIX	Factor IX
FIXa	Factor IX activado
FX	Factor X
FXa	Factor X activado
FXI	Factor XI
FXIII	Factor XIII
Fe	Hierro
FT	Factor tisular

FTR	Factor tisular recombinante
FvW	Factor de Von Willebrand
GMP	Guanosín monofosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GP	Glicoproteína
GSNO	Glutación S-nitrosilado
H₂S	Sulfuro de Hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HNF	Heparina no fraccionada
Hp	Haptoglobina
IMIB	Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria
LTA	Agregometría por transmisión de luz
LPA	Agregados plaquetas-leucocitos
MEA	Multiplate Analyzer
MCF	Máxima firmeza del coágulo
MPO	Mieloperoxidasa
MPV	Volumen plaquetario medio
MSA	Multi-sample agitator
NEM	N-etilmeleimida
NETs	Neutrófilos trampa extracelulares
NO	Oxido nítrico
NONOate	Donante NO en disolución
NOS	Oxido nítrico sintetasa
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PAR	Receptores activados por la proteasa
PAI-1	Inhibidor 1 del activador del plasminógeno
PCC	Concentrado de complejo protrombínico
PCT	Plateletcrit
PDE	Fosfodiesterasas hidrolizadoras de nucleótidos cíclicos
PDE-3	Fosfodiesterasa 3
PDI	Proteína disulfuro isomerasa

PFC	Plasma fresco congelado
PGI2	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKG	Proteína quinasa G
PMV	Microvesículas derivadas de plaquetas
PPACK	Clorometilcetona D-fenilalanil-L-prolyl arginina
PRP	Plasma rico en plaquetas
PS	Fosfatidilserina
PSGL	P-selectina GP ligando
RE	Retículo endoplásmico
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SNARE	Receptores de unión de NSF
SNAP	Proteína soluble de unión NSF
SNC	Sistema nervioso central
SON	S-nitrosiol
t-PA	Plasminógeno tisular
t-SNARE	SNARE localizados en neurotransmisores diana
TAFIa	Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina
TCA	Tiempo de coagulación activado
TFPI	Inhibidor del factor tisular
TP	Tiempo de protrombina
TRAP	Péptido de activación del receptor de trombina
TTPa	Tiempo de tromboplastina parcial activado
TxA2	Tromboxano A2
V-SNARE	SNARE localizados en vesículas
VAMP	Proteína asociada a vesícula
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador
VASP-P	VASP fosforilado

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Principios básicos y nuevos conceptos de hemostasia.....	15
1.2. Cambios en la hemostasia en los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico.....	39
1.3. La importancia de la hemólisis en la hemostasia de los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico.....	46
1.4. El valor estratégico de medir la función plaquetaria. Nuevos métodos y perspectivas clínicas.....	61
1.5. Perspectivas futuras. Propuestas y retos para nuevas investigaciones.....	69
1.5.1. Medición de hemoglobina libre.....	69
1.5.2. Medición de la S-Nitrosilación de proteínas relacionadas con el proceso hemostático y de interés en la función plaquetaria.....	70
1.5.3. Medición de los gasotransmisores para valoración indirecta de hemólisis en cirugía de recambio valvular aórtico.....	72

1.5.4. Conjugados plaquetas-glóbulos rojos. Medición. Interacción trombosis-inflamación.....	75
1.5.5. Medición de microvesículas plaquetarias. Implicaciones de su medida.....	76
1.5.6. Índice Plaquetario: Plateletcrit (PTC). Importancia de la medición del número de plaquetas y el volumen plaquetario medio (MPV).....	77
2. OBJETIVOS.....	79
2.1. Objetivo principal.....	80
2.2. Objetivos secundarios.....	80
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
3.1. Diseño general del estudio realizado.....	82
3.2. Protocolo experimental.....	84
3.3. Parámetros evaluados.....	87
3.3.1. Variables clínicas.....	87
3.3.2. Hemograma.....	88
3.3.3. Bioquímica general.....	89

3.3.4. Bioquímica de indicadores de hemólisis.....	90
3.3.5. Pruebas básicas de coagulación.....	90
• Tiempo de protrombina.	
• Fibrinógeno.	
• Tiempo de tromboplastina parcial activado.	
3.3.6. Tromboelastometría.....	91
3.3.7. Tiempo de coagulación activado.....	95
3.3.8. Función plaquetaria mediante citometría de flujo.....	96
3.3.8.1. Medición de la agregación plaquetaria.....	97
3.3.8.2. Medición de la activación plaquetaria.....	100
3.3.8.3. Medición de los niveles de VASP-P.....	102
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	105
5. RESULTADOS.....	107
5.1. Características de la población de estudio.....	108
5.2. Variables analíticas evaluadas.....	109
5.2.1. Hemograma. Hemoderivados.....	109
5.2.2. Bioquímica general.....	117
5.2.3. Bioquímica de indicadores de hemólisis.....	120
5.2.4. Pruebas básicas de coagulación.....	123
5.2.5. Tromboelastometría.....	126
5.2.6. Tiempo de coagulación activado.....	132

5.2.7. Función plaquetaria mediante citometría de flujo...	133
5.2.8. Resumen de resultados.....	140
6. DISCUSIÓN.....	144
6.1. Contextualización del estudio.....	145
6.2. Características de la población a estudio.....	145
6.3. Variables analíticas.....	147
6.3.1. Hemograma.....	147
6.3.2. Bioquímica general.....	151
6.3.3. Bioquímica de indicadores de hemólisis.....	153
6.3.4. Pruebas básicas de coagulación.....	155
6.3.5. Tromboelastometría y tiempo de coagulación activado.....	156
6.3.6. Función plaquetaria mediante citometría de flujo...	157
7. CONCLUSIONES.....	164
8. BIBLIOGRAFÍA.....	167

9. ANEXOS.....	189
9.1. Comité ético.....	190
9.2. Información al donante.....	191
9.3. Consentimiento informado.....	193
9.4. Escala de riesgo quirúrgico en cirugía cardíaca..	198

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Principios básicos y nuevos conceptos de hemostasia.

El manejo de la hemostasia siempre ha sido un reto en la cirugía, en tanto en cuanto el conocimiento de los mecanismos básicos de trombosis y fibrinolisis han supuesto un factor determinante en el pronóstico de los pacientes que se someten a intervenciones de cirugía mayor.

Conocemos la hemostasia como el conjunto de acontecimientos que protegen al organismo frente a una pérdida sanguínea, bien sea por un trauma fortuito, bien generado por una intervención quirúrgica. Las primeras referencias de la hemostasia datan de hace dos milenios cuando el filósofo Platón ya describió que la sangre formaba “fibras” cuando abandonaba el calor del cuerpo. No fue hasta el siglo diecinueve cuando empezaron a describirse los mecanismos de coagulación de forma similar a como hoy es entendida, gracias al descubrimiento de las plaquetas y su función en la hemostasia. El gran desarrollo de la ciencia en este campo no llegó hasta el siglo veinte, en el que acontecieron la mayoría de los descubrimientos relevantes sobre coagulación, y que sentó las bases del modelo clásico de coagulación. Se empezó a relacionar al factor tisular derivado del endotelio con la conversión de protrombina en trombina en presencia de un ión imprescindible, el calcio, a través de reacciones calcio dependientes en respuesta a las noxas vasculares que generasen agresión al mismo endotelio¹.

De forma clásica la hemostasia ha sido entendida como una vía metabólica efectora encaminada a la obtención de un coágulo estable capaz de ocluir la solución de continuidad del endotelio e impedir la pérdida sanguínea.

En su concepción clásica la hemostasia se divide en dos fases: hemostasia primaria y secundaria, en la cual las principales protagonistas eran las plaquetas. Bajo ese prisma, la hemostasia primaria es la encargada de generar el tapón hemostático plaquetario inicial, mientras que la hemostasia secundaria o fase de coagulación sanguínea, permite la formación de un coágulo estable rico en fibrina que logre controlar la agresión endotelial. La vía de la coagulación ha sido entendida como una cascada de reacciones metabólicas acopladas en la que la activación de un factor implica la activación del sucesivo y permite llevar a cabo la obtención del tapón hemostático estable.

El modelo clásico de coagulación propone una serie de pasos concatenados que formaban una reacción en cascada enzimática. En ésta, la activación de un factor de coagulación activaba al siguiente hasta llegar a la generación de trombina, que convierte el fibrinógeno

(proteína soluble en plasma) en fibrina (proteína insoluble), componente fundamental del coágulo. Esta cascada puede activarse a través de dos vías diferenciadas que confluyen en la etapa final o vía común.

La hemostasia primaria era la encargada de generar el tapón hemostático plaquetario inicial y la hemostasia secundaria el coágulo definitivo. El desequilibrio de la hemostasia, bien sea por falta o ausencia de factores o de activación, predispone a enfermedades por deficiencia como la hemofilia que se traducen en predisposición al sangrado, o por activación exagerada que se manifiesta como fenómenos tromboticos como la trombosis venosa^{2,3}.

Siguiendo la visión clásica, existirían dos vías de activación, la intrínseca iniciada por el factor XII y la extrínseca iniciada a su vez por el complejo factor tisular (FT)/factor VII. Ambas vías desembocarían en un elemento o vía común a nivel del factor X activado (Xa). El complejo protrombinasa (factor Xa-Ca²⁺-factor Va) sería el encargado de favorecer la generación de trombina y la formación de fibrina en superficies fosfolipídicas (figura 1).

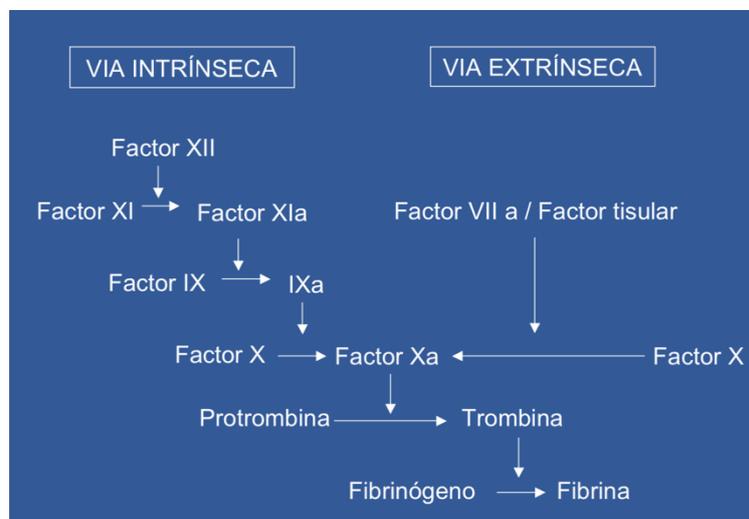


Figura 1. Esquema de la cascada de la coagulación. *Páramo et al 2009.*

Este esquema clásico sigue teniendo vigencia para explicar las pruebas de laboratorio, ya que el tiempo de protrombina (TP) se utiliza para monitorizar la vía extrínseca y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) para la vía intrínseca. No obstante, está demostrado que ambas vías no actúan de forma independiente, entre otras razones por el

hecho de que el complejo FT/VII además de activar el factor X, también activa el factor IX. Este hecho confiere a la vía extrínseca mayor importancia fisiopatológica *in vivo*^{2,4}. Sin embargo, los estudios que se han ido desarrollando a partir del esquema clásico, nos demuestran que, en los mecanismos de coagulación, el componente celular adquiere gran relevancia. Es más, según sugieren las investigaciones posteriores al postulado del modelo clásico, la hemostasia no se concibe como tal sin el concurso de las plaquetas⁵. Siguiendo esta línea de investigación, hemos aprendido que, por ejemplo, el FT, también conocido como tromboplastina o CD142, es una glicoproteína transmembrana que también se expresa en la superficie de células endoteliales y monocitos activados y, a su vez en células ajenas a la coagulación como células musculares, fibroblastos, queratinocitos, células del epitelio glomerular, astrocitos, miocardiocitos, y células del estroma hepático. Este CD142 es un receptor de alta afinidad por el factor VII, que actúa en el inicio de la vía extrínseca. Adicionalmente, ha sido implicado en procesos tan dispares como la etiopatogenia de la sepsis, aterosclerosis o cáncer^{6,7}. Además, hay diversas células en el organismo que expresan proteínas procoagulantes y anticoagulantes, y receptores transmembrana que intervienen en la hemostasia, lo que sugiere que los procesos hemostáticos son muy complejos e incluyen más componentes celulares y proteicos de lo propuestos por el modelo clásico.

En líneas generales, la visión más moderna del proceso de hemostasia incluye tres etapas que, lejos de ser independientes, están conectadas entre sí. Una fase de inicio en la que se genera una pequeña cantidad de factores de coagulación activos, una fase de amplificación en la cual los factores de coagulación activos incrementan su concentración y una fase de propagación donde estos factores se unen a la membrana de las plaquetas¹². La *Fase de iniciación*, clásicamente conocida como vía extrínseca de la coagulación, tiene su inicio cuando el vaso se rompe y algunas células como fibroblastos o células del músculo liso salen al torrente sanguíneo. Éstas expresan FT que actúa como cofactor del factor VII, interviniendo en su activación en forma de VIIa, con la consecuente generación de factor Xa, IXa y trombina, que iniciaría el proceso. Cabe decir, que el factor VIIa carece prácticamente de actividad sin la presencia del FT, es decir, la actividad del factor VIIa depende del FT, conformando un complejo independiente de actuación. Es por ello por lo que el FT es considerado el iniciador de la coagulación. Esta proteína es muy versátil dado que se expresa en la membrana de varios tipos celulares, como

monocitos y células endoteliales, pudiendo tener un papel importante en el proceso de inflamación e incluso en la interacción entre los procesos trombóticos e inflamatorios.

Una vez conformado, el complejo FT/VIIa activa los factores IX y X. El factor Xa combinado con el factor Va (complejo protrombinasa) en la superficie celular produce la conversión de protrombina (Factor II) en una pequeña cantidad de trombina, que serán los impulsores de la activación plaquetaria y factor VIII de la siguiente fase^{8,9}.

Los complejos protrombinasa tienen la capacidad de migrar a distancia, y por tanto extender su actividad procoagulante, sin embargo, existen factores reguladores que controlan e inhiben a dichos complejos, como es el caso de la antitrombina (AT) y de la proteína inhibidora del factor tisular (TFPI), que es un claro ejemplo de proteína inhibidora de proteasa tipo Kunitz (TFPI), que impiden además la migración a distancia de estos complejos^{10,11}. No ocurre así con el FIXa que al no ser objetivo del TFPI sí puede expresarse en otras superficies a distancia para participar más activamente en la fase de propagación.

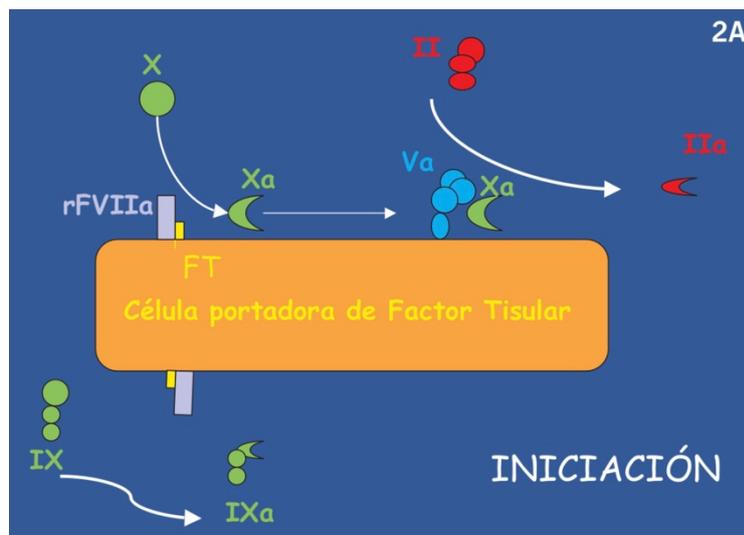


Figura 2A. Fase de iniciación. Páramo et al 2009.

Fase de amplificación: Las plaquetas adheridas al vaso lesionado son activadas por la trombina acumulada, además de convertir el FV (proacelerina) en FVa que tiene como efecto la amplificación de la actividad protrombinasa, convirtiendo el factor VIII en factor VIIIa. El factor VIIIa, en la superficie de las plaquetas, se comporta como cofactor del factor IXa para generar factor Xa. La trombina también ejerce su acción convirtiendo el factor XI en XIa.

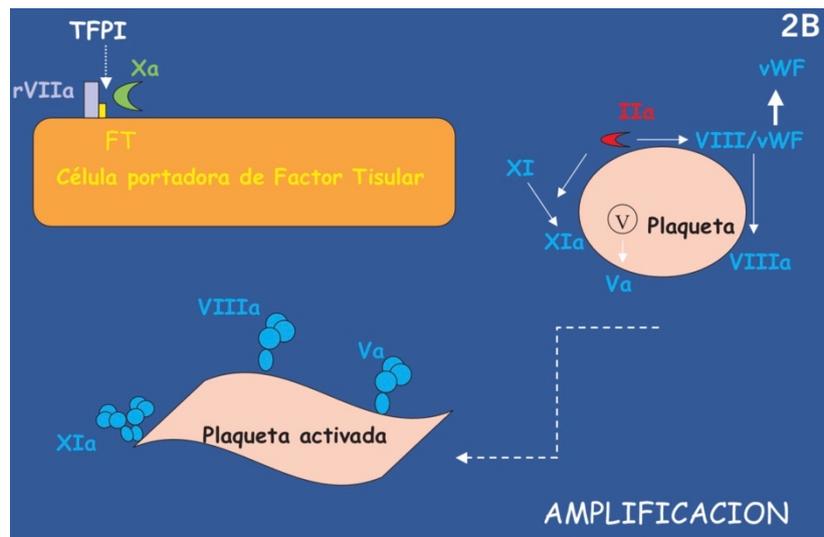


Figura 2B. Fase de amplificación. *Páramo et al 2009.*

Fase de propagación: Si bien, como hemos visto, la fase de inicio se da en las superficies donde se expresa FT, esta fase se caracteriza por desarrollarse en superficies donde existan fosfolípidos procoagulantes, como en la superficie de plaquetas activadas.

En esta fase se cataliza la generación del factor Xa a través del complejo “tenasa” (VIIIa, IXa, Ca^{2+} y fosfolípidos), mientras que el complejo “protrombinasa” (Xa, Va, Ca^{2+} y fosfolípidos), teniendo como soporte estructural y funcional la superficie de las plaquetas, cataliza la conversión de protrombina en trombina en grandes cantidades, necesarias para la generación de un coágulo estable de fibrina. La trombina, asimismo, activaría al factor XIII o factor estabilizador de fibrina y a un inhibidor fibrinolítico (TFPI) necesarios para que el coágulo formado de fibrina sea resistente a la lisis^{9,10}.

A pesar del papel tan decisivo y versátil de la trombina, todos los factores de coagulación que participan en esta fase son muy importantes. Por ejemplo, la ausencia de los factores VIII o IX lleva a que se produzcan enfermedades hemorrágicas tales como la hemofilia A y hemofilia B respectivamente, dato que nos da a entender la tremenda importancia que tienen estos factores en el proceso normal de la hemostasia.

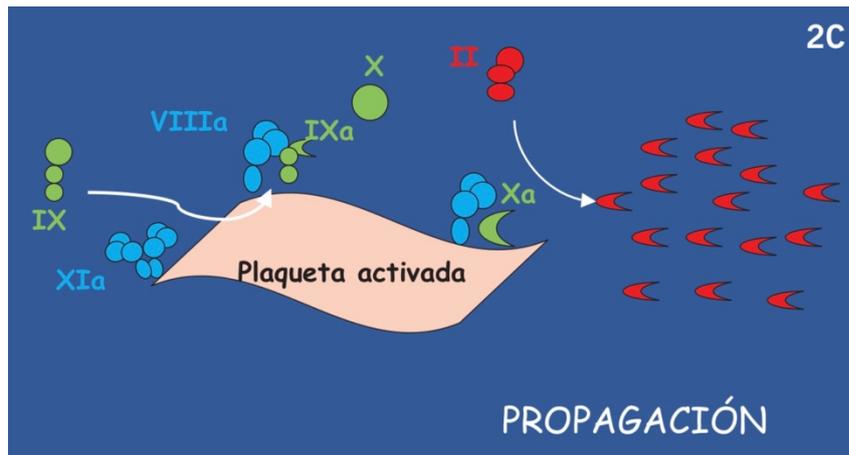


Figura 2C. Fase de propagación. *Páramo et al 2009.*

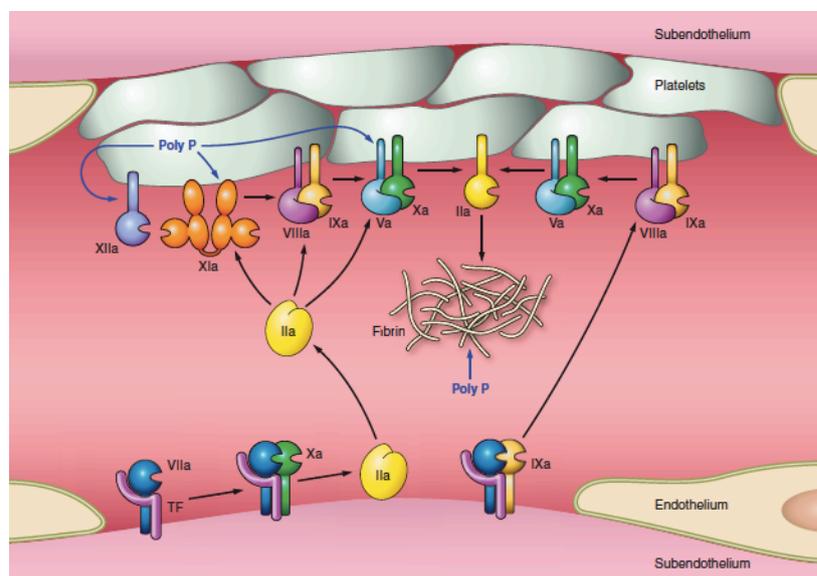


Figura 3. Cascada de la coagulación. Tras el daño endotelial, el FT se expone al torrente sanguíneo y se une al factor VII que se activa al factor VIIa. El complejo TF-VIIa permite la activación posterior del factor X y la protrombina, después de lo cual, pequeñas cantidades de trombina activan el circuito de retroalimentación del factor XI-IX en la superficie de las plaquetas. El factor IXa activará el factor X adicional. Simultáneamente las trazas de trombina activarán los factores VIII (cofactor del X), lo que mejora la actividad catalítica de los factores IX y X. Finalmente, la trombina (IIa) conduce al depósito de fibrina. Paralelamente, la liberación local de polifosfato (poliP) por las plaquetas activadas puede estimular adicionalmente la activación del XII, V y XI e inhibir la lisis del coágulo. *Versteeg et al. 2013.*

Fase de terminación: Una vez se ha formado el coágulo de fibrina, el proceso de coagulación debe ser detenido con vistas a inhibir y evitar la obstrucción vascular completa con un tapón plaquetario del diámetro de la luz vascular. Si no se detuviese, esta respuesta difundiría a través de todo el lecho vascular degenerando en un fallo masivo de aporte vascular y colapso trombótico de todo el árbol vascular arterial.

Por este motivo el organismo dispone de mecanismos naturales que controlan el proceso de coagulación. Dentro de estos mecanismos podríamos destacar tres agentes anticoagulantes que permiten regular la cascada de coagulación una vez se ha obtenido el trombo estable. Uno de ellos es la antitrombina (ATIII), que inhibe la actividad de la trombina y las proteasas que exponen la fosfatidilserina en las superficies celulares como: FIXa, FXa, FXIa y FXIIa. Esta antitrombina es activada tras la unión de ciertas moléculas, que actúan como cofactores (un claro ejemplo es la “heparine-like proteins” por su similitud estructural a la misma), a células endoteliales. Otros agentes anticoagulantes que juegan un papel regulador importante son las proteínas C y S, que actúan inactivando a los factores procoagulantes FVa y FVIIIa.

La proteína C es una glicoproteína plasmática, que depende de la vitamina K, cuya principal función es la anticoagulación mediada por la inhibición del FVa. Su efecto se ve potenciado por la proteína S, que actúa como cofactor. La proteína C es activada mediante el complejo trombina-trombomodulina que se forma en la superficie de las células endoteliales íntegras o no dañadas.

La importancia de la proteína S como cofactor de la proteína C es que hasta el 30% de la misma circula de forma fisiológica en el plasma. El resto, está unida al factor C4b del complemento. Esta circunstancia es de gran interés fisiopatológico ya que durante los procesos inflamatorios puede haber un aumento del factor C4b del complemento (proteína de fase aguda) que se activará con la activación de la vía clásica del complemento, lo que puede llevar a una menor biodisponibilidad de la proteína S y por tanto a un menor control de los procesos de coagulación que puede resultar en un mayor riesgo de desarrollar procesos trombóticos. Esto demuestra nuevamente como la coagulación y agregación plaquetaria están íntimamente relacionadas con la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, es también de vital importancia, dentro de los mecanismos de control de los procesos de coagulación, la proteína inhibidora de la vía del factor tisular (TFPI), proteína también secretada por el propio endotelio y que inactiva la formación de complejos FXa y TF-FVIIa, deteniendo de forma casi inmediata el inicio de la coagulación^{12,13}.

Por todo ello podemos indicar que la interacción del endotelio sano e íntegro con los distintos agentes, tanto celulares como proteicos, que participan en el proceso de la coagulación, constituye el principal mecanismo regulador y que puede evitar una activación masiva, exagerada o sistémica del proceso de la coagulación y de la agregación

plaquetaria, ya que esta situación podría llevar a estados patológicos como la coagulación intravascular diseminada.

FASES DEL PROCESO DE LA HEMOSTASIA			
INICIACIÓN	AMPLIFICACIÓN	PROPAGACIÓN	TERMINACIÓN
Agresión endotelial y activación de células circulantes. Activación mediada por FVIIa y FT.	Las plaquetas son activadas por la trombina. Exposición de FVa, FVIII y FXI como cofactores en la superficie plaquetaria.	Aumento de la producción de la actividad de la trombina. Estabilización del trombo. Cese del sangrado.	La activación de la coagulación está limitada para impedir la obstrucción trombótica de la luz del endotelio y permitir el aporte vascular normal.

Figura 4. Resumen de las cuatro fases de la coagulación según el modelo actual de la teoría de la coagulación basada en la célula. *James P. Riddel et al. 2007.*

De manera que, ahondando en esta última visión de la coagulación, y según recientes estudios en ratones, parece ser que la vía intrínseca (FXI-FXII), se activa prácticamente en paralelo a la vía extrínseca. En este sentido podemos encontrar tres activadores biológicos de la vía intrínseca: el colágeno¹⁵, los polifosfatos¹⁶ y las trampas extracelulares de neutrófilos (TEN)¹⁷.

Los polifosfatos se unen al FXII para activarlo, y éste a su vez estimula a la calicreína, FIX y a otros factores de coagulación.

La activación del FXII por los polifosfatos no parece estar implicada en la velocidad de formación del coágulo sino más bien en la estabilidad del mismo, participando fundamentalmente en la fase de propagación. Por lo tanto, los niveles altos de FXII están relacionados con un aumento del riesgo de trombosis y los niveles bajos con inestabilidad del coágulo que predispone a la embolización. Ejemplo paradójico, en el que tanto el déficit como el exceso del factor tienen efectos procoagulantes o trombóticos y no prohemorrágicos.

También se han asociado los polifosfatos como cofactores para la activación de FV y FXI mediados por protrombina, inhibiendo la fibrinólisis del coágulo.

La no separación de vías intrínseca y extrínseca, como se ha comentado, es debida a la falta de diferenciación en la activación de los factores de la coagulación, pues no se produce de forma estanca, sino más bien de forma sincrónica e interrelacionada.

De esta forma, la concepción actual de la hemostasia es un modelo más dinámico e interrelacionado, de enfoque celular, en el que es de vital importancia la intervención de la función y presencia de las plaquetas, más allá del tapón hemostático inicial tradicionalmente vinculado.

Este nuevo papel de las plaquetas, con un mayor peso o importancia en la regulación de la hemostasia, contrasta con el hecho de que las plaquetas fueron los últimos elementos formes de la sangre en ser descritos. De la historia de las plaquetas, Alfied Donne (1801-1878) es considerado su descubridor, aunque a su coetáneo George Gulliver (1804-1882) también se le vinculó con el descubrimiento. Sin embargo, aunque las primeras descripciones daten del siglo XIX, no fue hasta finales del siglo XIX cuando Giulio Bizzozero (1841-1901) las aisló de los trombos e identificó la hemostasia y la trombosis como procesos análogos.

Las plaquetas son estructuras celulares enucleadas de 1-2 μm , derivadas de la maduración y fragmentación de los megacariocitos, cuyos precursores son originados en la médula ósea, y que se acumulan en áreas de agresión endotelial para la formación del trombo.

El intervalo fisiológico de las plaquetas es de 150-400 $\times 10^9/\text{l}$. Un adulto sano produce cada día una media de alrededor de 1×10^{11} plaquetas. La vida media de las plaquetas es de 7 a 10 días, y en esa secuencia se produce una disminución de los residuos de RNA contenidos además de una disminución de su afinidad, reactividad y función, hasta la senectud y degradación por el sistema fagocítico mononuclear^{14,15}.

Las plaquetas circulan de forma fisiológica en forma no activa y expresan en su superficie pocas de las moléculas que, en estado activo van a facilitar su interacción con otras plaquetas y células. Además, tienen la capacidad de interactuar con patógenos bacterianos e incluso expresar receptores del complemento, interviniendo así en la respuesta inflamatoria y en la inmunogenicidad del organismo. De hecho, las plaquetas expresan y almacenan unas proteínas con función antibacterianas llamadas trombocidinas^{15,16}.

Las plaquetas contienen distintos tipos de gránulos que, en función de su contenido y su ultraestructura, se pueden diferenciar en tres tipos: 1) Los gránulos densos (almacenan mediadores proagregantes); 2) los gránulos α (contienen factores de crecimiento y proteínas de activación); y 3) los lisosomas (elastasas y proteasas que degradan la matriz extracelular).

La liberación de los gránulos densos se produce por exocitosis para la liberación de factores proagregantes tan importantes como: adenosín difosfato (ADP), adenosín

trifosfato (ATP) y serotonina, además de otros agentes que participan en la coagulación como: fosfato inorgánico, polifosfatos y calcio. El ADP es esencial como cofactor de la agregación plaquetaria. El calcio liberado por la plaqueta es necesario para la formación de fibrina, mientras que los polifosfatos actúan como elementos reguladores en la coagulación y en el sistema fibrinolítico reaccionando con el factor XII. La serotonina genera vasoconstricción e interviene en la activación de las propias plaquetas¹⁷.

La secreción de los gránulos α se produce por exocitosis para la liberación de proteínas como la P-selectina, que juega un papel fundamental en la activación de las plaquetas y permite la interacción de estas con los glóbulos blancos, conectando como anteriormente ya hemos comentado, los procesos de agregación plaquetaria, coagulación e inflamación. Los lisosomas, son lugares de almacenamiento de elastasas y otras proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular. Dentro de la plaqueta cumplen una función autofágica eliminando fragmentos citoplasmáticos.

Este modelo además de otorgar un papel muy importante a las plaquetas introduce un nuevo elemento en el proceso de la coagulación, que es el papel de las microvesículas. Por todo ello, este nuevo modelo de hemostasia, o “modelo celular de coagulación”, es considerado el mayor descubrimiento en el campo de la hemostasia de los últimos 30 años¹⁴. Estas microvesículas no son de reciente descubrimiento, ya que fueron descritas anteriormente en la literatura como “micropartículas” con funciones no bien definidas en la hemostasia.

Las microvesículas, son vesículas de membrana de entre 50 y 1000 nm que se pueden liberar desde distintos tipos celulares aumentando la superficie de interacción para la activación de reacciones de coagulación siendo fuente de factores procoagulantes y actuando como punto de inicio de la cascada de coagulación.

Pueden ser entendidas de forma similar a micropliegues de membrana lipídica, que, como las microvellosidades de otras estructuras celulares, aumentan la superficie de interacción en el mismo espacio que el resto de las membranas que carecen de microvesículas, y que encierran en su interior mediadores de la coagulación, preformados, en una especie de analogía a la estructura del botón sináptico de las neuronas.

Las primeras descripciones de las microvesículas datan de 1967¹⁸. En una primera instancia, fueron descritas como “polvo de plaquetas” aunque en realidad son pequeños fragmentos de membrana que se desprenden de casi todas las células eucarióticas durante la activación o apoptosis^{19,20}. Pueden ser reconocidas por la expresión de diferentes marcadores en su superficie, como por la presencia del antígeno CD41+.

Cabe pensar, según diversos estudios, que las microvesículas además de proteínas y lípidos de la membrana de la superficie, contienen ácidos nucleicos (DNA y RNA), incluyendo RNA mensajeros, micros RNAs, pequeños RNA transportadores y RNA largos no codificantes del interior celular^{21,22}.

En las células, los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina sólo se encuentran en el interior de la bicapa lipídica bipolar de la membrana, pero cuando se produce la apoptosis de la célula y la liberación de las microvesículas la fosfatidilserina se traslada al exterior de la membrana plasmática, hecho que como veremos, adquiere una gran importancia en la inducción de cascadas procoagulantes.

Como se ha demostrado, desde las primeras alusiones a su papel biológico y catalizador, existen muchos factores que pueden servir como desencadenantes para la liberación de microvesículas y muchos de ellos están involucrados en procesos morbosos y en la etiopatogenia de enfermedades cardiovasculares y metabólicas²³.

Basándonos en lo anterior, puede entenderse que la liberación de estas microvesículas podría condicionar e intervenir de forma directa en el desarrollo y patogenia de estas enfermedades metabólicas y cardiovasculares. A raíz de la integración de las mismas en la comprensión de estas afecciones tan prevalentes, podrían surgir nuevas dianas terapéuticas que actuaran no sólo como tratamiento ante estadios no tributarios de medidas conservadoras, sino que sirviesen como una vía o forma de atenuar la expresión clínica de las mismas, incidiendo de forma positiva en la disminución del riesgo de mortalidad cardiovascular.

Siguiendo en la línea de la coagulación, las microvesículas derivadas de plaquetas son responsables directas del desarrollo de trombosis, ya que exponen en su superficie glicoproteínas y fosfolípidos, entre ellos fosfatidilserina, GP IIb/IIIa (cuyo déficit es causa de enfermedades prohemorrágicas como la tromboastenia de Glanzmann) y P-selectina. Además las microvesículas derivadas de plaquetas podrían estar asociadas con factores de coagulación como el FT, el FVa, FVIIIa y FIXa, que se expresan en la superficie de la membrana lipídica, sirviendo de desencadenante de la activación de plaquetas y dando origen a la trombosis^{24,25}.

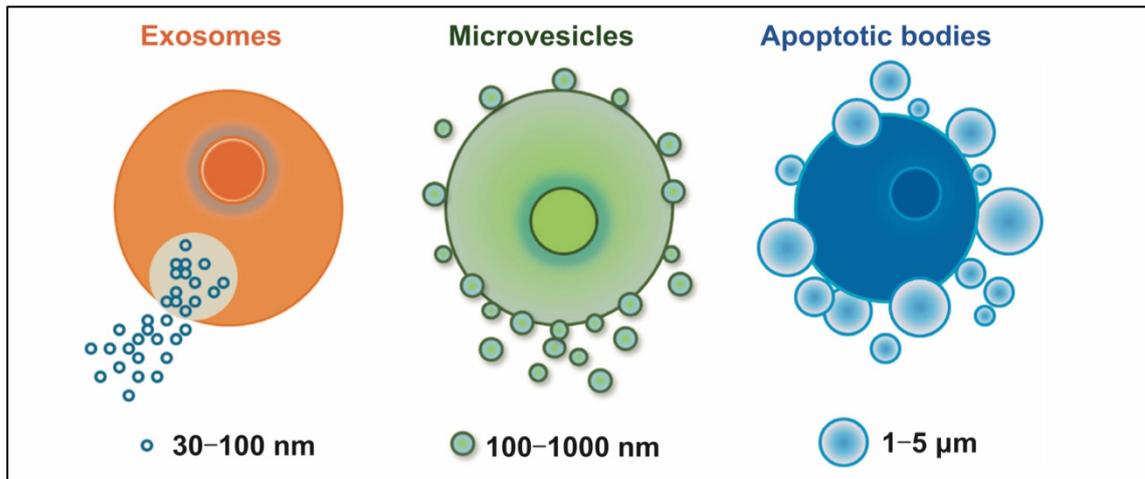


Figura 5. Esquema representando vesículas extracelulares: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Las microvesículas (conocidas anteriormente como micropartículas), son vesículas de membrana de pequeño tamaño que se liberan de la superficie de la membrana celular durante la activación o apoptosis de todas las células eucarióticas. *Chen Y et al. 2018.*

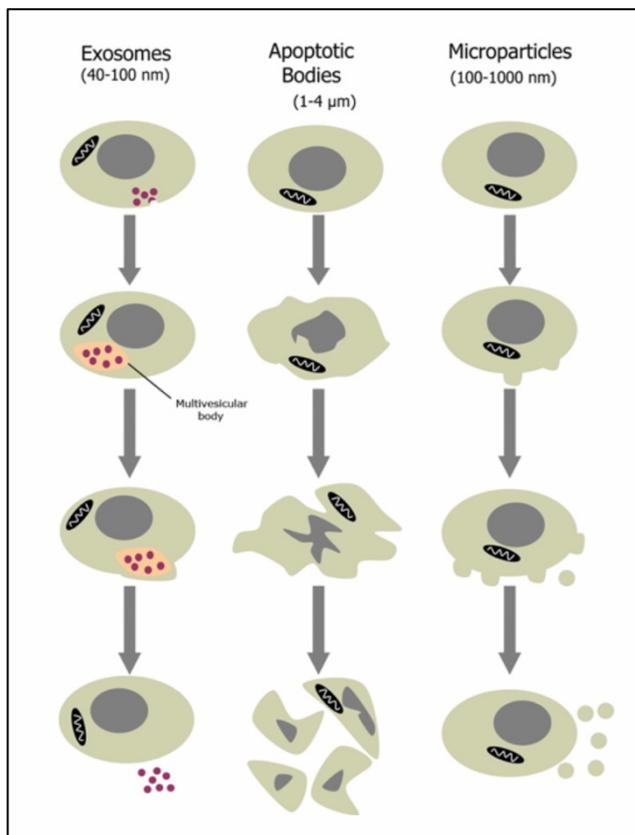


Figura 6. Origen de varias clases de vesículas extracelulares. Los exosomas se forman mediante la gemación de la membrana hacia el interior, formando vesículas intracelulares que se acumulan dentro de cuerpos multivesiculares para su posterior liberación al exterior. Los cuerpos apoptóticos se forman al final de la apoptosis, tras la contracción celular y pueden contener ADN y/o orgánulos. Las MPs se forman a partir de la membrana hacia el exterior. *Burger et al. 2013.*

Existen microvesículas que expresan FT, desencadenante de la activación plaquetaria, que puede proceder de tipos celulares como monocitos, plaquetas y células endoteliales. Este tipo de microvesículas que contienen FT son especialmente importantes, destacando las que derivan de las plaquetas y los neutrófilos, sobre todo las que se generan tras la interacción entre ambos tipos celulares o tras la formación de conjugados plaquetas-neutrófilos, en el que se potencia mucho la generación de dichas microvesículas y la actividad procoagulante.

Estas plaquetas con residuos fosforilados (fostatidilserina), pueden interaccionar con los factores Va, VIII, IXa y IIa que inducen la formación de trombina y ésta, la activación de nuevas poblaciones plaquetarias. De esta forma la interacción con plaquetas portadoras de estas microvesículas aumentan la exposición de nuevas microvesículas que exponen nuevos sitios de unión y participan en la formación de trombina, dando lugar a una respuesta efectora y activadora exponencial²⁶.

La formación de estas microvesículas nos lleva a la definición de otro concepto importantísimo en el conjunto del modelo celular de la coagulación que es lo que Podoplelova (2016) describe como “coated platelets” o plaquetas recubiertas⁵. Estas plaquetas constituyen una subpoblación dentro de las plaquetas activadas entre las que se desarrolla el proceso de la coagulación.

La trombina que se genera en el propio proceso de coagulación ejerce una labor determinante en la creación de las plaquetas recubiertas, de forma que éstas exponen en su superficie una alta concentración de fostatidilserina (que confiere actividad procoagulante y activadora de poblaciones plaquetarias) requerida para la aceleración y el progreso de la coagulación.

La interacción con esta amplia superficie procoagulante procedente de las microvesículas de las plaquetas recubiertas tiene como consecuencia una mayor producción de trombina. Este *feed-back* positivo entre trombina y plaquetas recubiertas, lleva a la producción de fibrina sobre la superficie de la plaqueta donde se expresa fostatidilserina.

La expresión de fostatidilserina es necesaria para la fijación de fibrina. La existencia de una subpoblación de plaquetas que aumenta la concentración y expone más sitios de unión a la misma, las plaquetas recubiertas, y a su membrana rica en evaginaciones procedentes de la degranulación de las microvesículas, permite amplificar de forma exponencial la respuesta procoagulante sin necesidad de un mayor reclutamiento celular⁶.

Siguiendo este modelo celular de la coagulación, y teniendo en cuenta la descripción e importancia de las microvesículas que anteriormente describimos, las microvesículas

derivadas de plaquetas, que se van a formar en las invaginaciones de las plaquetas para aumentar superficie de membrana procoagulante, son fragmentos de tamaño entre 100-1000 nm que se liberan y evaginan en diversas condiciones tanto fisiológicas como patológicas²⁷.

Además, las referencias actuales permiten hablar no sólo de plaquetas activadas y recubiertas, sino que existen diferentes poblaciones de plaquetas asociadas con potenciación de las funciones de estas, entre las que se incluyen las plaquetas abombadas o las recubiertas de fibrina, así como las diferentes características de estas en función del envejecimiento celular.

Las plaquetas abombadas también tienen como característica definitoria la expresión de fosfatidilserina en su superficie. Se componen de *membrane ballooning* o globo de membrana donde las plaquetas adheridas a una superficie de colágeno forman una estructura de membrana con forma de balón que expone residuos de fosfatidilserina tras la entrada de sodio y agua a la misma.

Como ya hemos comentado anteriormente las plaquetas recubiertas de fibrina son una subpoblación de plaquetas que se caracterizan por presentar una fina cubierta rica en fibrina. Tras la exposición a la fosfatidilserina presente en otras plaquetas activadas, se sirven de una transglutaminasa y de una integrina, la $\alpha 2\beta 3$, para mediar la unión de fibrina y fosfatidilserina, adhiriéndose en la superficie de plaquetas ya activadas en respuesta a la agresión tisular.

Por otra parte, además de las subpoblaciones de plaquetas activadas ya descritas, existen algunas publicaciones en las que se alude al concepto de plaquetas aturdidas o “*bewildered*”. Durante la fase aguda de un síndrome coronario, hay plaquetas cuyas propiedades proteicas las presentan como “aturdidas”. Tienen un metabolismo energético reducido y una menor expresión de algunas proteínas del citoesqueleto. El papel fisiológico no se conoce todavía, pero, podrían actuar como limitadoras de la activación plaquetaria tras la rotura de la placa de ateroma. Además, es probable que días antes de romperse la placa, se estén formando desde los megacariocitos, inducidas por señales que estarían relacionadas con la inflamación de la placa que se va a desprender²⁸.

La actividad de las plaquetas y su intensidad también está relacionada con la edad, y en consecuencia con el envejecimiento celular.

En este sentido, con el envejecimiento celular, se aprecia un descenso de ARN circular más estable (Figura 7), comparado con las plaquetas más jóvenes, que son ricas en varias especies de micro ARN que con el tiempo se van degradando^{29,30}. Lo que sí está

comprobado en animales, es que conforme aumenta en edad la plaqueta, ésta va perdiendo la capacidad de secreción y formación de trombos³¹.

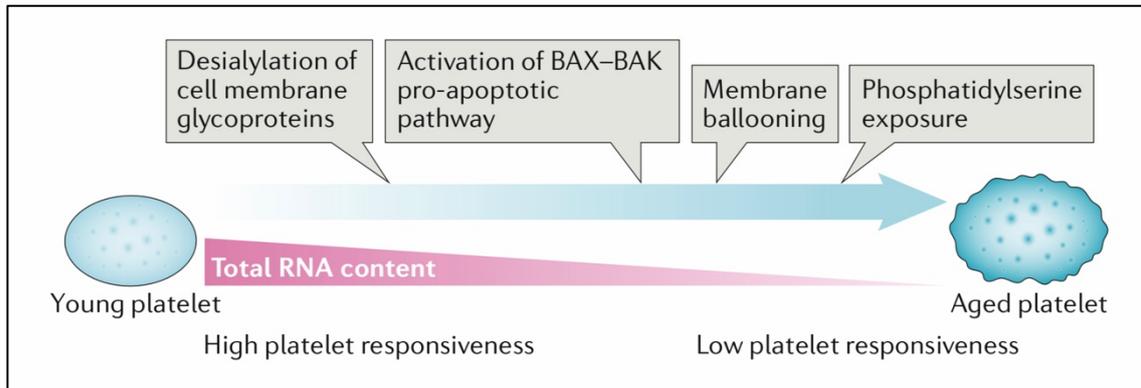


Figura 7. Alteraciones plaquetarias durante el envejecimiento. Durante su tiempo en sangre las plaquetas sufren una disminución de su contenido en ARN y van perdiendo residuos de ácido siálico de las glicoproteínas de membrana celular, hecho que favorece la limpieza hepática de las plaquetas. La activación de la vía BAX-BAK pro-apoptoica en las plaquetas viejas genera la exposición en la superficie de fostatidilserina, que sirve como señal para que las células fagocíticas reconozcan y absorban a las plaquetas. Funcionalmente, las plaquetas mas viejas van perdiendo respuesta de adhesión y agregación. *Van der Meijden 2019.*

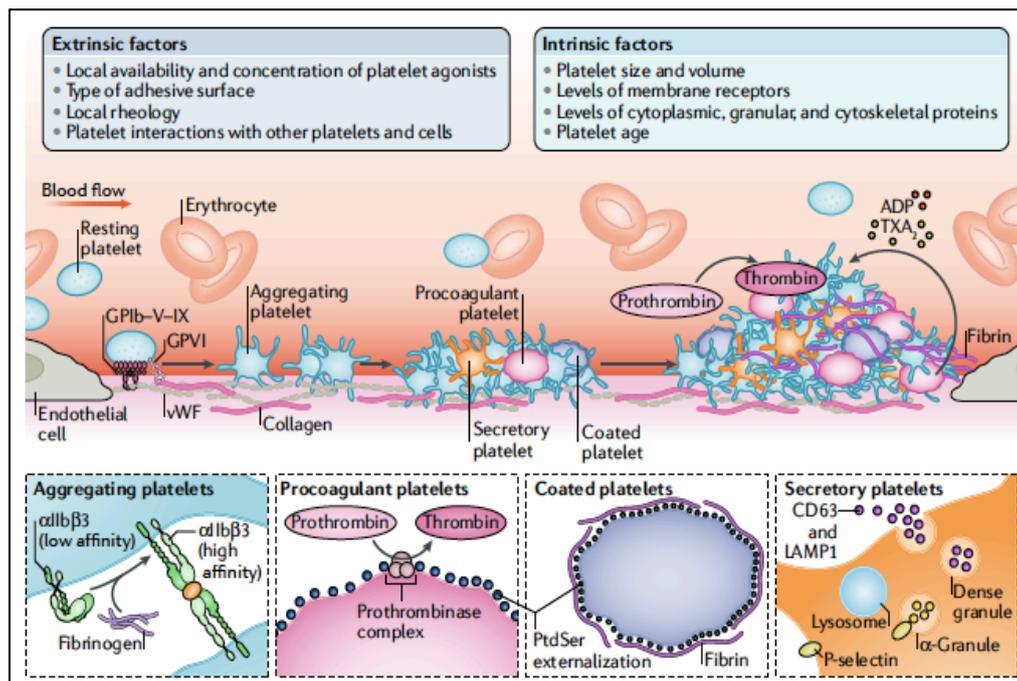


Figura 8. Factores ambientales y plaquetarios que influyen en la heterogeneidad de las plaquetas en el trombo. La heterogeneidad en la formación del trombo está influenciada por factores ambientales tales como la dinámica del flujo sanguíneo, la disponibilidad local de agonistas plaquetarios y el ambiente vascular, así como por factores intrínsecos propios de las plaquetas. El daño endotelial expone las proteínas de la matriz subendotelial del factor de von Willebrand y el colágeno. La formación de trombos se inicia por la unión de la plaqueta al colágeno, concretamente en los receptores de la glicoproteína VI y al factor de von Willebrand a través de las glicoproteínas Ib-V-IX. Agregada la plaqueta, la unión del fibrinógeno a la integrina activada α Ib β 3 desencadena la agregación. Son las plaquetas procoagulantes las que exponiendo la fostatidilserina pueden generar trombina a partir de la protrombina; plaquetas recubiertas han expuesto fostatidilserina y una capa de fibrina en su superficie; las de secreción completa expresan P-selectina y las glicoproteínas CD63 y LAMP1 en la membrana exterior. Las plaquetas activadas se encargan de segregar mediadores (ADP y tromboxano A2) para atraer plaquetas circulantes al trombo que se está formando. Pueden haber cambios ambientales debidos a una enfermedad que afecten a la población de plaquetas y a las respuestas, por ejemplo, por retroalimentación positiva. *Van der Meijden 2009.*

Como vemos parece estar claro que existe una heterogeneidad funcional de las plaquetas, y que, a pesar de ser concebidas con una sola estirpe celular, su acción e incluso su desarrollo y maduración celular va ligado a la expresión local de diferentes factores. Entre estos factores se encuentran las integrinas y otras proteínas como el colágeno o el fibrinógeno.

Así, según recoge Van der Meijden (2009) en su artículo de revisión sobre la biología de las plaquetas y su función, la formación de proplaquetas (precursores de las plaquetas) está inhibida por el colágeno tipo I a través de la glicoproteína VI y la integrina mientras que el colágeno tipo IV, el fibrinógeno y la fibronectina estimulan este proceso³². Mientras que la integrina $\alpha 2\beta 1$ inhibe la formación de plaquetas y proplaquetas, la $\alpha 2\beta 3$ induce la unión de fibrina y fosfatidilserina.

Entre los factores locales que pueden condicionar la actividad de las plaquetas nos encontramos proteínas tan relevantes como fibrinógeno, vimentina, P-selectina (CD62p), sCD40L (marcador de inflamación vascular), que han sido identificadas como agentes proagregantes y procoagulantes, por lo que condicionarían también su actividad.

Algunos datos experimentales apuntan a la posible participación de las plaquetas en la formación de la placa ateromatosa. Es una evidencia que los tratamientos farmacológicos que permiten reducir el riesgo cardiovascular también reducen de manera indirecta, y algunos de ellos directamente y de forma significativa, la activación plaquetaria. Así, los tratamientos hipolipemiantes, antidiabéticos, antihipertensivos, vasodilatadores, etc., e incluso medidas dietéticas de mejora en los hábitos de vida pueden ser vías, en mayor o menor medida, para reducir la activación de las plaquetas en situaciones de riesgo de proagregabilidad³³.

Esta implicación de las plaquetas en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares podría extenderse o ser aplicable a otras condiciones patológicas, en las que la capacidad de las plaquetas para interaccionar y potenciar otros procesos fisiológicos como la inflamación, la activación del sistema del complemento, la activación de glóbulos blancos o su capacidad para liberar sustancias proinflamatorias, les permitiría participar en los procesos patogénicos de otras enfermedades. Un ejemplo de esta versatilidad plaquetaria podría ser la participación en enfermedades autoinmunes, como queda reflejado en la figura 9, de ahí la importancia de controlar y encontrar nuevas dianas terapéuticas que puedan reducir o inhibir la acción de plaquetas hiperreactivas de forma específica, lo que permitiría controlar las consecuencias de estados protrombóticos

asociados, y aumento de riesgo cardiovascular, a este tipo de patologías sistémicas, tanto de tipo autoinmune como de otra naturaleza.

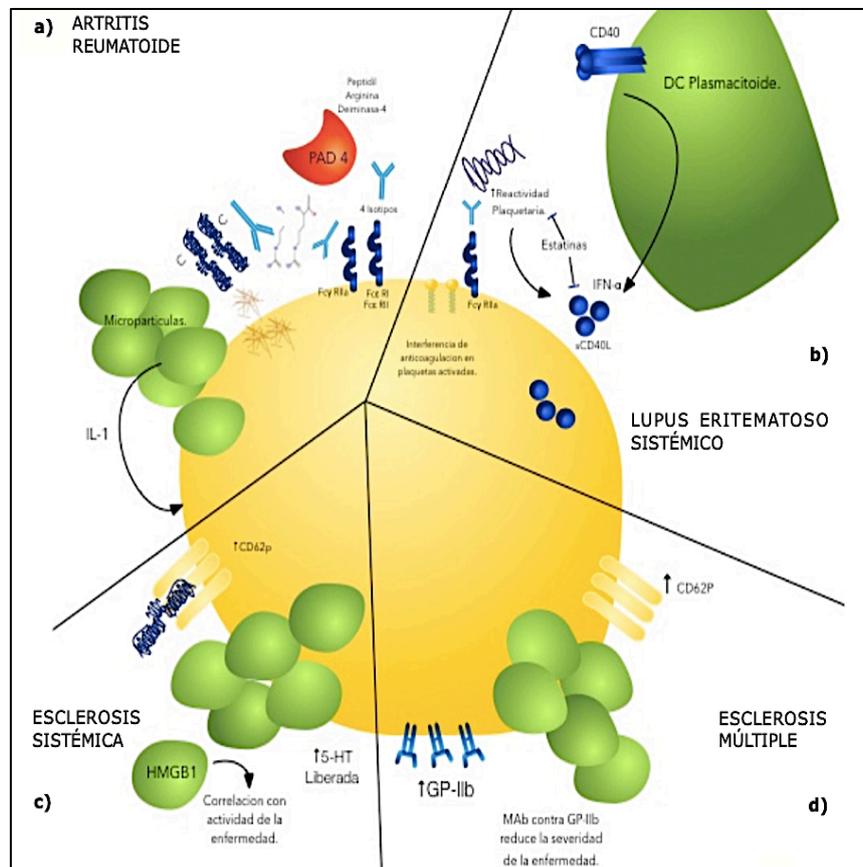


Figura 9. Las plaquetas en las enfermedades autoinmunes. a) ARTRITIS REUMATOIDE: El fibrinógeno, vimentina, colágeno tipo II y enolasa actúan como autoantígenos al ser modificados por la enzima deaminasa de peptidilarginina (PAD4) que conduce a la conversión de residuos de arginina por citrulina, dichos antígenos son blanco de autoanticuerpos antiproteínas citrulinadas (ACPA), éstos son de los 4 isotipos secretados IgM, IgG, IgA, que tienen la capacidad de activar a las plaquetas a través de los receptores FcγRIIA, FcεRIa FcεRII. La plaqueta activada produce fibrinógeno y expresa vimentina, el sinovio hemorrágico puede sinergizar la formación de estas proteínas citrulinadas. Las micropartículas plaquetarias en el líquido sinovial amplifican inflamación articular vía liberación de citosinas proinflamatorias como IL-1. La IL-1 y otras citocinas proinflamatorias promueven la producción de micropartículas plaquetarias. b) LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO: Las plaquetas son la fuente principal de sCD40L (marcador de inflamación vascular) y se traduce en reactividad plaquetaria; las estatinas reducen la reactividad plaquetaria y la producción del sCD40L. El FcγRIIa de las plaquetas reconoce los complejos inmunes circulantes, incrementando la activación plaquetaria. Las plaquetas activadas interactúan con células dendríticas plasmacitoides e incrementan la producción de INF-α por interacción de CD40-sCD40L. Uno de los diferentes mecanismos propuestos para los eventos trombóticos dado por los anticuerpos antifosfolípido es por la unión de los fosfolípidos expresados en las plaquetas activadas, promoviendo aún más la activación de esta. c) ESCLEROSIS SISTÉMICA: Las plaquetas expresan niveles altos de P-selectina (CD62p), que origina una unión a fibrinógeno más fuerte; la activación plaquetaria libera micropartículas que contienen HMGB1, característico de la necrosis, que se correlaciona en esta enfermedad con la actividad de esta. el exceso de 5-HT derivado de plaquetas se ha observado en estos pacientes que se correlaciona con la disminución de la función pulmonar. d) ESCLEROSIS MÚLTIPLE: Las plaquetas tienen expresión de CD62p elevada e incremento en la producción de micropartículas. Existe sobrerregulación del receptor GPIIb. Ramírez Cruz NE et al. 2015.

Por lo que respecta a la fisiología de la activación o bloqueo de la actividad plaquetaria, parece ser una realidad fisiológicamente mas compleja, que la que tradicionalmente se ha asociado a la exposición de colágeno tipo II, III y IV tras la agresión del endotelio.

El daño endotelial expone colágeno endotelial y factor de Von Willebrand (FvW), para mediar la adhesión endotelial. En el proceso de interacción entre plaqueta y colágeno participan dos receptores plaquetarios fundamentales, la GPVI y la integrina $\alpha 2\beta 1$. A la unión de las plaquetas al colágeno sigue la expresión de fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria. La fosfatidilserina proporciona actividad protrombinasa, que aumenta la formación de trombina.

Después de la deposición de las plaquetas sobre el FvW y el colágeno, se requiere el reclutamiento de nuevas plaquetas desde la circulación en la agregación plaquetaria mediada por la glicoproteína GPIIb/IIIa. Entre estos agonistas se incluyen el ADP, el TxA₂, la epinefrina y la trombina. La vía final consiste en la activación de los receptores $\alpha IIb\beta 3$, que posibilitan la unión del fibrinógeno y también del FvW, lo que permite el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas, en el que pueden participar otras moléculas como el ligando de CD40 (CD40L)^{34,35}.

El ligando CD40L tiene un papel clave, pues tanto unido a la plaqueta como soluble, interacciona con el CD40, expresado en la superficie de los linfocitos B, neutrófilos, monocitos, células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos y células de músculo liso vascular, entre otras. La función de esta interacción CD40L-CD40 no está clara, pero sí se sabe que esta interacción en las células endoteliales estimula la expresión y la liberación de moléculas asociadas a la inflamación^{34,35}.

Además, se ha demostrado que la interacción del CD40L expresado en las plaquetas con las células endoteliales de origen coronario reduce la capacidad de estas de liberar óxido nítrico (NO) y aumenta el estrés oxidativo^{35,36}.

Es una realidad que la integridad endotelial es el principal factor inhibidor de la activación plaquetaria. Esto es posible a través de una serie de complejos mecanismos, entre los cuales se encuentran la acción de enzimas y mediadores tan dispares como las ectonucleotidasas, la trombosmodulina (que inactiva la acción procoagulante de la trombina), la prostaciclina y el óxido nítrico²⁶, que son importantes compuestos antiagregantes.

Tanto el NO como la prostaciclina suprimen la adhesión, secreción, formación de pseudópodos, actividad procoagulante y procesos de agregación. Esta inhibición sin

embargo se ve obstaculizada en las zonas de daño vascular. Tras la agresión al endotelio vascular tienen lugar una serie de reacciones y cambios conformacionales que traen consigo la activación del proceso de inflamación vascular per se (liberación de factor de von Willebrand y de citoquinas proagregantes y proinflamatorias).

Parece que el colágeno tipo I y III y las placas ateroscleróticas se encuentran entre las sustancias activadoras más potentes de las plaquetas³⁷. A su vez, la activación de estas plaquetas, inducida por el colágeno y la formación del trombo se ve altamente incrementada por la trombina generada a través del factor tisular.

El factor tisular está presente tanto en el endotelio vascular como en los macrófagos y se considera como hemos dicho un elemento clave de la hemostasia, sintetizado, entre otras células, por las células endoteliales, cuya liberación activa pone en marcha los mecanismos de trombosis.

Las plaquetas que entran en contacto con estos residuos de colágeno expuestos en el endotelio, FvW, o FT sufren una serie de cambios conformacionales y funcionales, que las convierten en plaquetas activadas. Estas plaquetas activadas secretan P-selectina (CD62P), que se desplaza velozmente desde los gránulos de secreción a la superficie plaquetaria para favorecer e inducir la unión entre plaquetas a través del enlace P-selectina glicoproteína ligando-1³⁸.

No obstante, retomando la población de plaquetas recubiertas, se ha demostrado en estudios in vitro, que esta subpoblación se une con mayor afinidad a los residuos de colágeno expuestos por el endotelio, siendo ésta, otra de las razones por las que se desencadena una activación exponencial procoagulante de mayor intensidad a mayor población de plaquetas recubiertas. En paralelo, las plaquetas adyacentes se activan por agonistas secretados reclutando plaquetas adicionales en el lugar de la lesión, lo que lleva a la consolidación del tapón hemostático.

Pero no solo ocurre esto, además, las plaquetas activadas liberan citoquinas y quimioquinas, que actúan como mediadores proinflamatorios, iniciando la respuesta inflamatoria e induciendo el reclutamiento de leucocitos en el lugar de la lesión^{39,40} (figura 10).

Como ya hemos comentado, las plaquetas activadas expresan el ligando CD40L, que interactúa con el CD40 de las células endoteliales para inducir la expresión de moléculas de adhesión celular y la liberación de interleucina y factor tisular⁴¹ perpetuando e intensificando la activación plaquetaria.

Por lo tanto, cada vez está más claro que las plaquetas desempeñan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria.

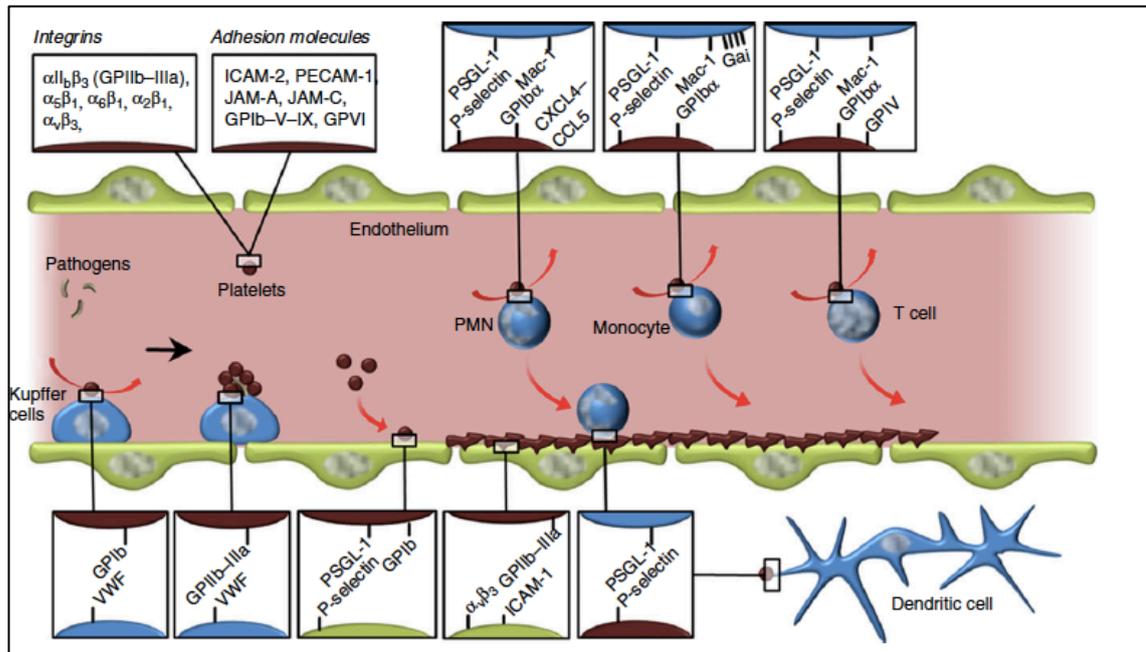


Figura 10. Las plaquetas en la inmunidad. En la parte inferior se observa como las plaquetas se unen a las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos, unión dependiente de factor de Von Willebrand (VWF)/glicoproteína (GPIIb) mientras fagocitan los patógenos a través de VWF/GPIIb/IIIa. Además, las plaquetas se unen y se enrollan en la P-selectina que se presenta en el endotelio activado a través de la P-selectina GP ligando-1 (PSGL)-1 y GPIb, y se unen a través de GPIIb-IIIa y la fibronectina al endotelio $\alpha_v\beta_3$. Las plaquetas unidas al endotelio constituyen una importante fuente de P-selectina para los leucocitos entrantes. La P-selectina plaquetaria es además el principal ligando para el leucocito PSGL-1 en las interacciones plaqueta-leucocito. La GPIIb α permite una segunda forma de contacto dependiente de fibrinógeno a través del leucocito Mac-1.

En la parte superior vemos como para los neutrófilos se ha descrito una tercera vía de liberación plaquetaria del heterodímero CXCL4-CCL5. De forma similar las plaquetas parecen desencadenar una reacción (G α i) a través de una quimiocina actualmente desconocida en los monocitos y GPIV implicada en la reducción de la liberación de citoquinas de células T en condiciones inflamatorias. *Herter et al. 2014.*

En este sentido, resulta clave valorar aquellos elementos implicados en la regulación de la activación plaquetaria. Diferentes agonistas, entre ellos el ADP y el TxA2 y la trombina, actúan como mediadores clave en este proceso, reclutando y activando a más plaquetas para formar parte del trombo. Las plaquetas jóvenes y las microvesículas derivadas de las plaquetas también participan en la formación del trombo.

Sin embargo, de entre todos los factores mediadores de la activación plaquetaria la trombina tiene un papel crucial. La trombina es una serina proteinasa con dos sitios de unión que le aportan diferentes funciones e intensidad de la actividad. Además, presenta sitios de unión a Na⁺ que incrementan la afinidad por sustratos que inducen su función

procoagulante, de forma que en concentraciones fisiológicas el 60% de la trombina presenta estos sitios ocupados y una potencial acción procoagulante aumentada. Este dato puede ser relevante, ya que se ha descrito una variante mutante de la trombina con nula afinidad por el Na⁺ y que son más resistentes a la actividad de la antitrombina.

La formación de trombina desde su forma inactiva, la protrombina, comienza con la exposición de FT (en condiciones fisiológicas se puede detectar en tejidos extravasculares). Tras ello, favorece la obtención de FXa, FV y FVIII que a su vez inducen la activación de mayores concentraciones de trombina, que, una vez conformada su forma activa, pierde los sitios de unión con función reguladora.

La trombina, además, es el agonista plaquetario más potente. La trombina es capaz de actuar sobre las plaquetas al unirse a unos receptores específicos conocidos como receptores activados por la proteasa (PAR) que son receptores plaquetarios para la trombina. El mecanismo de activación de los PAR y las señales que estimula son complejos. En términos generales, cuando la trombina se une a su receptor (PAR), ésta cataliza una reacción proteolítica en la molécula del receptor, lo que produce la activación del mismo y la posibilidad de que se activen hasta cuatro tipos diferentes de proteínas G, que a su vez estimulan diferentes señales intracelulares en las plaquetas.

Por otra parte, también se ha descrito que la trombina puede inducir la expresión del complejo glicoproteico GpIb-IX-V que permite la interacción de los mismos con el FvW y con la propia trombina, lo que puede propiciar la activación del receptor del fibrinógeno y por tanto la agregación de plaquetas.

La trombina cataliza la obtención de fibrina y favorece la formación de una red sólida de plaquetas agregadas para obtener un trombo estable. Además, es capaz de inducir, como ya hemos comentado, una activación de FV y FVIII con un *feed-back* positivo para perpetuar la activación proagregante. De igual forma también es capaz de activar al FXI y al FXIII que induce y promueve la formación de fibrina. En ese mismo sentido, la trombina también participa en la estabilización de la malla de fibrina al activar al inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFIa), que estabiliza el trombo y lo protege frente a la fibrinólisis.

Asimismo, la trombina es responsable de la contrarrespuesta anticoagulante y antiagregante tras su unión con la trombocalmodulina, tal y como hemos descrito en la fase de terminación, y por ello, es capaz de inducir la activación de la proteína C.

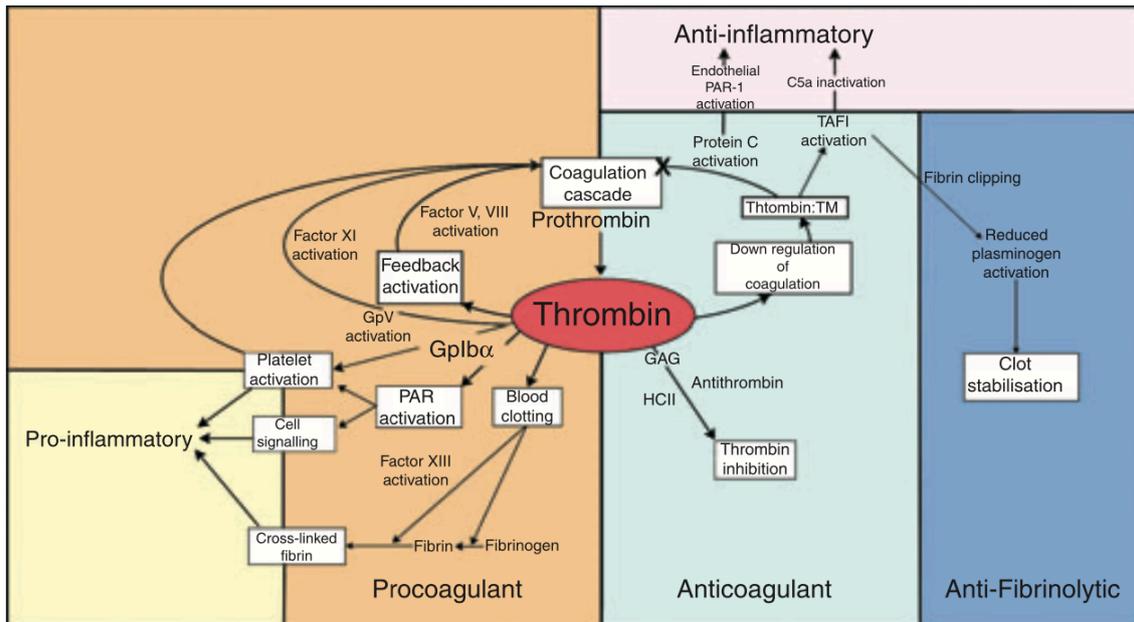


Figura 11. Funciones de la trombina. Una vez iniciada la cascada de la coagulación, la trombina puede desarrollar un papel procoagulante, anticoagulante, antifibrinolítico y anti y proinflamatorio. *Crawley JTB et al. 2007.*

Finalmente, la trombina es inhibida de forma irreversible por el efecto de la antitrombina, que consigue eliminar de la circulación cualquier residuo de trombina que acople en la formación de este complejo. Esta reacción es potenciada por cofactores del tipo heparán sulfato.

En general, cuando se analiza el modo de acción de la trombina, se puede apreciar, de forma paradójica, que la actividad procoagulante de la trombina es ejercida fundamentalmente en ausencia de cofactores, mientras que la anticoagulante es dependiente de éstos para ser efectiva y en gran medida de la interacción trombina-trombomodulina^{36,42}.

Por último, uno de los fundamentos básicos de la hemostasia es el importante papel que juegan los mediadores químicos locales, de origen endotelial, en la regulación de esta. Aunque a lo largo de este apartado se haya podido nombrar alguno de ellos, sería oportuno profundizar en los más importantes y en sus mecanismos de acción.

En esta línea de factores reguladores de la actividad plaquetaria, existen mecanismos endógenos de inhibición, entre los que el principal regulador de la activación es el óxido nítrico (NO)⁴³.

El NO producido por la propia plaqueta interviene en el proceso de inhibición de la agregación plaquetaria y en la reducción del reclutamiento de nuevas plaquetas hacia el trombo formado. Las plaquetas de pacientes con angina inestable o infarto de miocardio

secretan menos NO que las plaquetas de los pacientes con angina estable, además de mostrar menos sensibilidad al efecto de este. Asimismo, el ambiente prooxidante que se produce durante la fase aguda del síndrome coronario favorece una reducción en la biodisponibilidad del NO que generan otras células del entorno plaquetario, reduciendo su efecto inhibitor en las plaquetas. El NO puede inhibir a las plaquetas a través de distintas vías de señalización.

Una de las vías estudiadas es la del segundo mensajero Guanosín-monofosfato cíclico (GMPc). El GMPc previene la activación de las plaquetas a través de al menos tres mecanismos. 1) al aumentar indirectamente la concentración de AMPc al inhibir la actividad de la fosfodiesterasa 3 (PDE-3). Este aumento de AMPc, a su vez, eleva sinérgicamente el GMPc para inhibir la agregación plaquetaria. 2) el GMPc impide el efecto de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) sobre la activación de la GPIIb/IIIa, lo que conduce a una inhibición la agregación plaquetaria; 3) el GMPc favorece la fosforilación del receptor del TxA2 e inhibe su función, lo que conduce a una inhibición de la agregación plaquetaria.

El NO, además, es capaz de inhibir la exocitosis de los gránulos densos, los lisosomas y los gránulos plaquetarios, por tanto, impidiendo la cascada de hiperactivación plaquetaria. Las plaquetas no activas generan menores cantidades de NO. Sin embargo, es muy probable que el NO liberado por la propia plaqueta no sea el que ejerza la mayoría del efecto inhibitor de la regulación. Tanto los leucocitos circulantes, como el endotelio y las células que forman parte del trombo plaquetario, también producen NO. Incluso los fármacos antiplaquetarios utilizan el NO de estas células para inhibir la plaqueta.

La prostaciclina es otro de los mediadores químicos locales de origen endotelial que tiene una implicación directa en la regulación de la actividad plaquetaria. A través del sistema de las ciclooxigenasas (COX) las células endoteliales son capaces de sintetizar prostaciclina (PGI2) a partir del ácido araquidónico. Esta PGI2 tiene un efecto vasodilatador, pero, parece que su principal efecto fisiológico es reducir la activación y agregación de las plaquetas manteniéndolas en un estado no activo. La mayor producción de prostaciclina ocurre en la superficie de la íntima y disminuye según avanza hacia la adventicia. Esta prostaciclina aumenta la concentración de AMPc, lo que permite la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP), que inhibe la GPIIb/IIIa, impide la liberación de calcio y la degranulación^{43,44} y por tanto favorece la inhibición de la agregación plaquetaria.

El conocimiento de todas estas vías es de gran utilidad pues permite establecer dianas terapéuticas que puedan controlar, o inhibir la activación plaquetaria y la coagulación, ya que en condiciones patológicas es la causa de fenómenos tromboticos como los que atañen a la hemólisis implicada en los pacientes quirúrgicos.

Otro factor importante para tener en cuenta en la regulación de la actividad y de la hiperactivación plaquetaria son las microvesículas que hemos comentado anteriormente. La importancia fisiopatológica que se atribuye actualmente a las microvesículas derivadas de plaquetas es su alta capacidad protrombótica e incluso proinflamatoria. Se encuentran en número elevado incluso en sujetos cuyas plaquetas no están activadas. En estos casos, se ha postulado su posible origen en los megacariocitos.

La elevada actividad protrombótica de las microvesículas derivadas de plaquetas se ha asociado inicialmente con su alto contenido en fosfatidilserina como ya hemos señalado varias veces en este apartado, pudiéndose identificar diferentes grados de activación en ellas¹⁴.

Otro factor que considerar es el volumen plaquetario, pues ha sido concebido como un factor predictor independiente del evento vascular. Sin embargo, no se conocen bien aun los mecanismos que favorecen la presencia de plaquetas de mayor tamaño. La existencia de un mayor número de plaquetas de elevado tamaño refleja la existencia de plaquetas reticuladas. Estas son plaquetas jóvenes, con mayor proporción de RNA mensajero, mayor número de gránulos densos y un potencial proagregante y procoagulante aumentado. El número de plaquetas reticuladas parece estar elevado en pacientes con síndrome coronario agudo, por ello se ha propuesto la presencia de éstas como un marcador de mayor recambio plaquetario y de un mayor riesgo protrombótico. De hecho hay estudios que señalan que esta circunstancia puede reducir la eficacia de algunos fármacos antitrombóticos para inhibir la activación plaquetaria⁴⁴⁻⁴⁶.

1.2. Cambios en la hemostasia en los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico.

La particularidad de la cirugía cardíaca respecto al resto de cirugías es la necesidad de la utilización de circulación extracorpórea (CEC), la cual permite un campo quirúrgico sin movimiento y sin sangre. Durante la CEC se hace pasar la sangre del enfermo por una máquina que hace las veces de corazón-pulmón. Mediante canulación venosa, la sangre es drenada y ésta retorna oxigenada al enfermo a través de una cánula arterial, utilizando un sistema de bomba y un oxigenador o intercambiador de gases, lo que asegura la perfusión tisular y permite el equilibrio entre el aporte y consumo de oxígeno. La función de la CEC, por lo tanto, es permitir un campo quirúrgico favorable, con una adecuada homeostasis tisular minimizando los efectos secundarios. Los componentes de la CEC comportan superficies no biológicas, que al contacto con la sangre generan la activación de una respuesta inflamatoria. A su vez, este contacto con los componentes de la CEC requiere la heparinización completa del paciente, además de estrategias de hemodilución e hipotermia, comportamientos terapéuticos que repercuten en la hemostasia del paciente. La cirugía cardíaca es responsable de una gran tasa de transfusión de concentrados de hematíes, además de ser causa de frecuentes complicaciones tromboembólicas tipo accidentes cerebrovasculares e infartos de miocardio, lo que ensombrece el pronóstico de los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico.

Son por tanto muchas las causas que pueden generar el sangrado postoperatorio inmediato de estos pacientes. Según Ranucci (2015) el desequilibrio hemostático es de origen multifactorial e incluye factores relacionados con la cirugía, con los fármacos utilizados y con el paciente. Como consecuencia de todo esto nuestros pacientes muestran una especial predisposición a padecer tanto complicaciones trombóticas como hemorrágicas en el postoperatorio inmediato. Siguiendo la línea de este autor, y con la finalidad de evitar la transfusión innecesaria de hemoderivados y la administración de fármacos de forma empírica, es prioritario identificar los factores que están causando este sangrado. Así, podemos atribuir el sangrado en el postoperatorio de un paciente sometido a CEC a los siguientes mecanismos: reducida generación de trombina; trombocitopenia; efecto de heparina residual; deficiencia de fibrinógeno; disfunción plaquetaria; hiperfibrinólisis y causas quirúrgicas⁴⁷. Cada uno de estos factores puede ser causa única de alteración

hemostática, pero lo que suele suceder, y es lo que hace extraordinariamente complejo el manejo de la coagulación de estos pacientes, es que estos mecanismos interactúen.

Como dijimos, en este tipo de cirugía la sangre entra en contacto con las superficies de los componentes de la máquina de CEC, que, aunque como sabemos son biocompatibles, generan efectos deletéreos. Por ejemplo, parece claro según los estudios, que lo más relevante para la activación de la coagulación durante la CEC es el mecanismo mediado por el FT-FVIIa como respuesta a la agresión quirúrgica en los vasos sanguíneos, y aunque clásicamente se pensaba que la coagulación durante la CEC se atribuía a la activación de la vía intrínseca, es el FT y la activación de la vía extrínseca lo que promueve la formación de trombos durante la CEC^{48,49}.

El TF, por tanto, se libera durante la CEC y se acumula fundamentalmente en el espacio pericárdico y pleural. El aspirado de estos espacios, llevando la sangre a un salvacélulas, garantiza la reinfusión de sangre libre de FT, lo que evita que este acúmulo favorezca la generación de trombina⁴⁸.

Hay sistemas cerrados de circulación extracorpórea mínimamente invasiva que no permiten la reinfusión sin un lavado previo con células protectoras, pero en nuestro caso lo utilizado es el citado salvacélulas que al reinfundir sangre libre ya “lavada”, limita la generación de trombina por la vía extrínseca⁵⁰, de la forma anteriormente citada. En este tipo de cirugía limitar la generación de trombina con estas estrategias es beneficioso en términos de ahorro de sangre y de preservación de factores de coagulación, ya que una generación de trombina continuamente activada altera la hemostasia una vez que la heparina ha sido antagonizada con la protamina. Como ejemplo, la generación de grandes cantidades de trombina podría resultar en la formación excesiva de coágulos que pueden obstruir en el postoperatorio los tubos de drenaje y generar un compromiso de espacio en el tórax ya cerrado después de la cirugía. Esto desencadenaría un cuadro grave de taponamiento cardíaco que obligaría a la reapertura del tórax para drenaje de los coágulos. Además, como consecuencia del consumo de factores de coagulación, se predispone a una mayor probabilidad de sangrado postoperatorio⁵¹.

La trombina durante la cirugía es inactivada por el efecto de la antitrombina (AT) que es liberada gracias a la heparina sódica, y esto condiciona un consumo importante de AT, que se mantiene en niveles de baja actividad durante el postoperatorio, hecho que genera mayor incidencia de transfusión, además de relacionarse con un aumento de las revisiones

quirúrgicas por sangrado, eventos tromboembólicos, disfunción renal, síndrome de bajo gasto y aumento de la estancia en UCI y mortalidad⁵².

Junto a la AT, durante la cirugía cardíaca también se produce un descenso por consumo de las proteínas C y S que actúan como anticoagulantes naturales. Además, por lo que podemos deducir según lo dicho, en la CEC se produce una agresión activando las células endoteliales que generan un sangrado inicial, seguido de un fenómeno trombótico. Estas células endoteliales se activan como respuesta a mediadores inflamatorios circulantes que nos llevan al inicio de proceso de coagulación cuando el TF se expresa en el espacio intravascular. Como consecuencia de esto se produce un importante consumo generalizado de factores de coagulación⁵³.

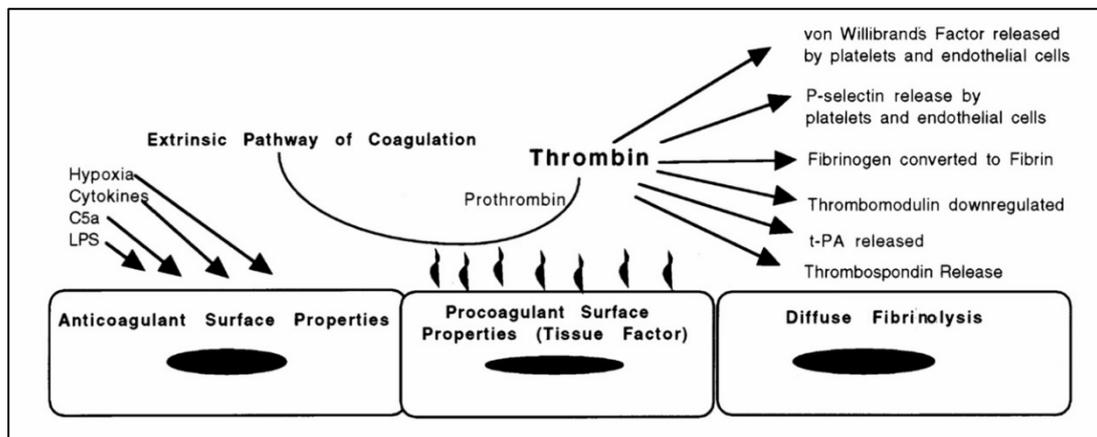


Figura 12. Activación células endoteliales procoagulantes. Activación de células endoteliales procoagulantes. Cuando las células endoteliales están activadas, expresan factor tisular, que convierte la protrombina en trombina. La trombina tiene múltiples acciones biológicas:

- 1) estimula la liberación del factor de von Willebrand y P-selectina, que causan aglutinación de plaquetas y adhesión de plaquetas, neutrófilos y células endoteliales;
 - 2) conversión de fibrinógeno en fibrina;
 - 3) regulación a la baja de los sistemas de trombomodulina/proteína C y S;
 - 4) libera al activador del plasminógeno tisular (t-PA), catalizando la formación de plasmina;
 - 5) la liberación de trombospondina qf, que se une al t-PA, impide su descomposición por el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1), y acelera la formación de plasmina. (Lipopolisacárido LPS).
- Boyle et al. *Endothelium and Coagulation*. 1996; 62:1549-57.

La generación de trombina está estrictamente regulada para producir una hemostasia veloz y controlada sin causar una trombosis sistémica incontrolada. En el postoperatorio inmediato la actividad procoagulante e inflamatoria aumentan, hasta el punto de que es necesario terapia antitrombótica^{53,54}, pero tras la cirugía cardíaca, el déficit de fibrinógeno descende, ya que la trombina directamente actúa generando un estado de hiperfibrinolisis provocado por la conversión de fibrinógeno en fibrina^{55,56}.

Además, los pacientes sometidos a cirugía cardíaca sufren un proceso de hemodilución derivado del cebado de la bomba de CEC. A pesar de que existen diversas estrategias para minimizar la hemodilución de nuestros pacientes como minimizar el volumen de cebado, la hemofiltración y el cebado retrógrado autólogo, la hemodilución sigue siendo un factor de riesgo muy importante para anemia y consumo de factores de coagulación y plaquetas⁵⁷.

El sistema hemostático se ve alterado por la cantidad y calidad de los líquidos hemodiluyentes. Según se ha podido demostrar la hemodilución en la CEC induce una importante prolongación del tiempo de coagulación a la vez que produce una reducción de la firmeza del coágulo⁵⁸. La hemodilución disminuye la marginación plaquetaria en la pared endotelial, con lo que se produce una reducción del efecto hemostático primario de la adhesión de las plaquetas. El protocolo utilizado en nuestra cirugía cardíaca es el purgado de la bomba de CEC con 1000 ml de Plasmalyte® (solución cristalóide con una composición electrolítica que imita las concentraciones fisiológicas de pH y osmolaridad)⁵⁹ acompañado de 100 mg de heparina.

Otro de los factores que alteran la hemostasia de estos pacientes, es la elevada frecuencia con la que son tratados bien sea con fármacos antiagregantes plaquetarios, o bien con anticoagulantes orales. Además, estos pueden ser tratados preoperatoriamente con heparinas de bajo peso molecular (HBPM) o heparina no fraccionada (HNF). Particularmente la HNF se utiliza para mantener al paciente anticoagulado durante el *bypass* a razón de 3 mg/kg del paciente. La situación de anticoagulación del paciente con HNF es revertida por el sulfato de protamina a razón de 1:1, pero debido al carácter impredecible de la heparina, existe la posibilidad de una antagonización incompleta de heparina e incluso un rebote en el efecto de la heparina que predispondría al sangrado y que es relativamente frecuente verlo en la cirugía con CEC. Esto es debido a que los efectos de la heparina no sólo dependen de la generación de trombina, sino también de la disponibilidad de AT, por lo tanto ante la presencia de hemorragia microvascular excesiva

en el postoperatorio de una cirugía con CEC, es de obligado cumplimiento pensar en una heparinización residual⁶⁰.

Los mecanismos de dilución y consumo de los que hemos hablado son responsables de una disminución de los factores de coagulación, excepto de fibrina y FXIII, y, aunque hay estudios que afirman que esta dilución no es determinante de la hemorragia postoperatoria⁶¹, Bosch et al. (2013) en su estudio concluyen que hay una estrecha relación entre la generación de trombina y la hemorragia del postoperatorio inmediato. Hay factores intraoperatorios que inducen de forma directa al consumo de los factores de coagulación. Como ya dijimos, la hemodilución juega un papel importante y a eso hay que añadir el tiempo de CEC. No es extraño encontrar pacientes con alteraciones hepáticas en los que la deficiencia de factores de coagulación vitamina K dependientes hacen que su manejo hemostático sea complicado, al igual que los pacientes con tratamiento preoperatorio con warfarina.

Para el manejo de este tipo de pacientes con déficit de factores de coagulación y sobre todo en situaciones de urgencia, es necesario recurrir a una reposición de estos que puede realizarse con la administración de plasma fresco congelado (PFC). En las situaciones en las que la sobrecarga de volumen puede suponer un problema añadido, el concentrado de complejo protrombínico (PCC) es rico en FII, FIX, FX y algunos incluyen también FVII ha resultado ser exitoso en pacientes sometidos a cirugía con CEC^{63,64}. A veces se hace necesario en alteraciones graves de la hemostasia con sangrado incoercibles, la administración del FVII activado recombinante (rFVII) para buscar generación de trombina, aunque en cirugía cardíaca esto se reserva para situaciones de hemorragia catastrófica por el alto riesgo tromboembólico que entraña su uso^{65,66}.

Otro aspecto importante en la fase hemostática de los pacientes sometidos a recambio valvular aórtico es la interacción de la fibrina con las plaquetas a través del receptor plaquetario IIb/IIIa con la actuación del FXIII como cofactor, que es lo que va a dar la firmeza del coágulo. Tras la cirugía con CEC los niveles de fibrinógeno y de FXIII disminuyen ostensiblemente⁶¹, lo que provoca una importante predisposición al sangrado postoperatorio. De hecho, hay varios estudios referentes a la relación de niveles bajos de fibrinógeno y hemorragia postoperatoria en cirugía cardíaca^{56,67}. Las situaciones en las que nos encontramos niveles bajos de fibrinógeno coinciden con los que generan una deficiente producción de trombina como son tiempos de bomba alargados, individuos con cardiopatías congénitas, etc. Las estrategias de las que disponemos para la reposición de fibrinógeno en cirugía cardíaca incluyen la transfusión de PFC, con el inconveniente de

que para aumentar los niveles de fibrinógeno 1 g/L, se requeriría una importante transfusión de PFC (30 mL/Kg), algo que no todos los pacientes pueden asumir. Otra de las alternativas es la transfusión de crioprecipitados, y la tercera y la que más utilizamos es la administración de concentrado de fibrinógeno, que siguiendo las guías europeas administramos a razón de 25-50 mg/Kg⁶⁸.

La trombocitopenia es otro de los aspectos importantes que encontramos en este tipo de cirugía, y como adelantamos antes, la hemodilución es uno de los desencadenantes de ésta. Pero además de eso, debemos tener en cuenta que la sangre de estos enfermos se expone a superficies extrañas que favorecen la adhesión y agregación, y a esto hay que sumarle que a veces se producen flujos turbulentos que desencadenan estos fenómenos.

Sí que parece más importante de cara a efectos de hemostasia y sangrado, no la trombocitopenia, sino la disfunción plaquetaria. Si bien la disfunción plaquetaria es una constante en los pacientes sometidos a CEC, parece que la mayor influencia en cuanto a sangrado se refiere, es el defecto plaquetario derivado del uso preoperatorio de agentes plaquetarios. Tanto la aspirina como los antiplaquetarios que actúan sobre el receptor plaquetario dependiente del ADP P2Y12 (ticlopidina, clopidogrel, prasugrel y ticagrelor) están asociados a hemorragias postoperatorias y a un aumento de las reintervenciones por sangrado⁶⁹⁻⁷¹, por lo que es juicioso seguir las guías y suspender estos fármacos al menos 5 días previos a la cirugía^{72,73}, aunque incluso con 3 días previos a la cirugía algunos pacientes pueden ser operados, siempre y cuando se disponga de herramientas para medir la función plaquetaria como el PFA-100 o multiplate⁴⁷.

La excesiva producción de trombina deriva a un estado de hiperfibrinólisis, algo bien conocido en la cirugía con CEC⁷⁴. Tanto es así que es una lucha de décadas atenuar esta respuesta de manera profiláctica, mas que terapéutica. En los esfuerzos por controlar esta respuesta en la década de los ochenta comenzó a utilizarse el fármaco aprotinina, que en su momento demostró ser muy eficaz a dosis altas para el control de la hemorragia de los pacientes sometidos a CEC⁷⁵, pero el fármaco se retiró del mercado por investigaciones que la relacionaron con efectos deletéreos a nivel renal, e incremento de la mortalidad⁷⁶. Actualmente la terapia antifibrinolítica en cirugía cardíaca se circunscribe a la administración de los agentes antifibrinolíticos: ácido tranexámico y ácido épsilon aminocaproico. En nuestras cirugías el utilizado es el ácido tranexámico ajustando siempre dosis a la función renal del enfermo y utilizando dosis medias (30 mg/kg), para intentar evitar casos de convulsiones postoperatorias relacionadas con la utilización de dosis altas del mismo⁷⁷.

Adicionalmente a todos los problemas que se generan en la hemostasia durante la cirugía con CEC, debemos nombrar al motivo estrictamente quirúrgico. En ausencia de alteraciones del sistema hemostático documentadas por el arsenal de pruebas diagnósticas de coagulación del que disponemos, hay que pensar en un motivo quirúrgico. De hecho, no es infrecuente las revisiones posquirúrgicas por sangrado en estos pacientes; revisiones que por otro lado deben hacerse de forma precoz, ya que un sangrado quirúrgico excesivo provocará una alteración de la hemostasia por consumo de factores de coagulación y plaquetas, hipofibrinogenemia e hiperfibrinolisis.

Complicaciones tromboembólicas derivadas

Existen dos inhibidores que regulan las respuestas procoagulantes, que como bien sabemos están iniciadas por el TF, que consiguen que el proceso de coagulación no se convierta en una acción descontrolada y no circunscrita al lugar de lesión; uno es el inhibidor del factor tisular (TFPI) que neutraliza el FXa en el complejo FT-FVIIa, y el otro es la AT que neutraliza el FXa y la trombina formadas⁵⁴.

Pero transcurridas varias horas tras la finalización de la cirugía aún encontramos generación de trombina, lo que supone un constante estímulo para la activación de las plaquetas, la formación de fibrina y consecuentemente la generación de trombos.

Además, el endotelio dañado pierde la capacidad de anticoagulación, por consumo de TFPI y proteína C y S, unido al consumo de AT. Si a todo esto añadimos que pueden existir zonas donde la sangre se acumule (aurícula izquierda en fibrilación auricular o flujos bajos por situación de bajo gasto), el riesgo de trombosis y efectos tromboembólicos es importante. Esto obliga a la utilización precoz de antiagregantes plaquetarios como la aspirina y particularmente en pacientes sometidos a cirugía valvular, el tratamiento temprano con HBPM previo a la anticoagulación oral, es de obligado cumplimiento⁷⁸.

En la cirugía de recambio valvular aórtico, intentamos recoger en un protocolo las medidas encaminadas a disminuir el sangrado y a su vez minimizar los riesgos de eventos tromboembólicos postoperatorios. Estas medidas abarcan desde el uso profiláctico de ácido tranexámico como agente antifibrinolítico, hasta la corrección de los disturbios de coagulación guiado por tromboelastograma y pruebas de coagulación básicas (TCA, TTPA, TP, medida de fibrinógeno). A su vez incluimos el uso de salvacélulas como

técnica de ahorro de sangre y realizamos técnicas de purgado retrógrado de la bomba de CEC para minimizar la hemodilución.

1.3. La importancia de la hemólisis en la hemostasia de los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico.

Como señalábamos antes, la CEC ha supuesto un gran avance para la cirugía cardíaca. De hecho, se ha convertido en una técnica esencial por ejemplo para los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico, pero como bien hemos adelantado, es una técnica que tiene como característica inherente el daño a las células sanguíneas o hemólisis. Son muchos los estudios que han demostrado que durante la CEC, los niveles de hemoglobina libre plasmática aumentan, al igual que en el postoperatorio inmediato, al tiempo que los niveles de haptoglobina disminuyen⁷⁹.

La hemólisis en sí puede producirse de tres formas diferentes: por selección natural por el bazo, por desequilibrio generado por un proceso patológico, o exponiendo las células a un estrés mecánico no fisiológico⁸⁰. Cabe esperar que, durante la CEC, el paso de la sangre a través de rodillos o por diferentes superficies y a diferentes velocidades genere este fenómeno.

La hemólisis durante la CEC puede ocurrir por varios factores: bomba de rodillo con oclusión excesiva, fuerza de cizallamiento al pasar la sangre por las superficies que comportan los elementos de la máquina de CEC, interfaz sangre-aire y presión negativa y superficies artificiales⁸¹. Al analizar el sistema de CEC, podemos localizar los diferentes puntos en los que se puede dañar el hematíe. La magnitud y duración de las fuerzas de cizallamiento son diferentes en cada uno de estos puntos, pero siempre estará presente en cierta medida.

Se ha comprobado que el depósito de aspiración de la cardiotoromía es un punto importantísimo de hemólisis, de microembolismos de partículas y gases, formación de émbolos de grasa, agregación y lesión y pérdida de plaquetas. Esto es debido fundamentalmente a la cantidad de aire que se aspira junto a la sangre. La estrategia para evitar esto es mantener la sangre en el reservorio de cardiotoromía el mayor tiempo posible, en lugar de dejarla fluir continuamente hacia el circuito principal, lo que disminuirá la relación aire-sangre en la sangre transferida. La alternativa para evitar el exceso de

hemoglobina libre relacionada con la cardiotoromía durante la CEC es separar la sangre succionada en un reservorio de cardiotoromía separado y desechar esa sangre. En el caso de que se recogieran grandes cantidades de sangre, lo ideal es procesar esa sangre en un salvacélulas y devolverla al paciente⁸².

El cálculo de índice de enfermedad hemolítica se refiere a la hemoglobina liberada por los hematíes rotos en el plasma, que se utiliza principalmente para evaluar y validar las superficies de contacto de la máquina de circulación extracorpórea. El error que llevamos cometiendo los médicos es que una vez estos sistemas están probados y homologados para su uso, la hemoglobina libre en plasma deja de ser una preocupación para nosotros durante el desarrollo de la cirugía con CEC. Sin embargo, aunque los componentes aislados del circuito extracorpóreo pueden considerarse no hemolíticos cuando se usan de acuerdo a las regulaciones, desde la perspectiva de la composición y manejo del circuito de CEC, puede ocurrir un daño celular importante^{79,83}. Como apuntábamos antes, las fuerzas mecánicas en la cirugía sobre la válvula aórtica con CEC pueden producir una destrucción total de los hematíes, al igual que puede degenerar en cambios en las propiedades mecánicas de éstos al reducir su deformabilidad y aumentar su fragilidad y agregación.

Como sabemos el 97% del hematíe está compuesto por hemoglobina, que a su vez está formada por cuatro subunidades de proteína, cada una de las cuales tiene un grupo hemo con una molécula de hierro. Los grupos hemo son capaces de unir una molécula de oxígeno.

Tras la destrucción de la membrana de los hematíes la hemoglobina libre y el grupo hemo entran en circulación. La hemoglobina libre generalmente es eliminada por la haptoglobina y el grupo CD163. La haptoglobina tiene la capacidad de unir aproximadamente de 0,07 a 0,15 g/dl de hemoglobina⁸⁴, pero una vez que la capacidad de esta proteína limpiadora se agota, comienza y se amplifica el consumo de NO. El grupo hemo (componente prooxidante y proinflamatorio de la Hb), se transporta por la hemopexina al hígado y allí es degradado por la hemooxigenasa en monóxido de carbono, biliverdina y hierro. Estos productos, junto con la liberación de interleuquina 10 (IL-10) tienen efectos vasodilatador, anticoagulante y antioxidante que compensan los efectos deletéreos que el grupo hemo y la hemoglobina libre causan.

El hallazgo de un aumento de hemoglobina libre en plasma siempre indica hemólisis, pero es interesante resaltar, que los mecanismos de depuración de productos derivados de hemólisis solo se saturan en caso de que ésta sea excesiva.

Cabe destacar que la haptoglobina existe en tres fenotipos diferentes (Hp 1-1, Hp 1-2 y Hp 2-2). Cada uno de ellos tienen propiedades antioxidantes diferentes y cada uno de ellos presenta diferente habilidad para unirse a la Hb, lo que genera distintos niveles de hemoglobina libre circulante⁸⁵. La distribución de estos fenotipos obedece a diferencias geográficas, siendo el fenotipo Hp 1-2 y Hp 2-2 más prevalente en individuos de raza blanca⁸⁶, y con menor capacidad antioxidante y de eliminación de hemoglobina libre. Podemos asumir que los individuos a los que sometemos a cirugía de recambio valvular aórtico tienen una mayor prevalencia del fenotipo Hp 2-2, con menor protección para el aumento de hemoglobina libre y menor capacidad antioxidante.

Cuando los mecanismos de depuración intravascular se han saturado, los niveles de hemoglobina libre y grupo hemo en plasma aumentan en orina y en sangre, y con ello los síntomas clínicos adversos derivados del proceso de hemólisis.

El hierro (Fe) liberado por la hemólisis se transporta a las proteínas de almacenamiento (ferritina y hemoferritina) a través de los transportadores de hierro (transferrina y lactoferrina). La transferrina está cargada aproximadamente con un 30% de Fe, manteniendo una importante capacidad de unión más⁸⁴. El aumento de la liberación de hierro durante la CEC se debe en parte a la lisis de los hematíes, lo que lleva a una sobrecarga de Fe aproximada del 20% en adultos. Los niños mayores de 5 años es raro que muestren signos de sobrecarga de Fe, algo que se explica por los niveles elevados de transferrina en plasma^{87,88}.

Gran parte de las consecuencias clínicas de la hemólisis intravascular están explicadas por la depleción de NO mediada por la Hb.

El NO, como sabemos, es un gas radical libre lábil que se produce a partir del aminoácido L-arginina, por acción enzimática de las NO sintetasas (NOS), que funciona como una molécula de señalización muy versátil y que tiene un amplio espectro de influencia reguladora en el sistema cardiovascular y renal, yendo desde el control del tono vascular sistémico y microvascular hasta la función plaquetaria, la contractilidad miocárdica, el ciclo del Ca^{2+} , las respuestas inflamatorias y de crecimiento vascular, la excreción renal de sodio y el metabolismo energético celular⁸⁹.

La hemoglobina libre se une al NO del endotelio de forma rápida e irreversible. El NO, como desarrollaremos más adelante, se considera un regulador muy importante del músculo liso y de la activación y agregación plaquetaria, hasta tal punto que cantidades de hemoglobina plasmática libre mayores de 10 mg/dL pueden inhibir de forma muy potente la vasodilatación del NO in vivo⁹⁰. Las consecuencias clínicas de la depleción de

NO se derivan en un aumento de las resistencias vasculares tanto pulmonares como sistémicas, algo que podría tener mucha relevancia sobre todo en el destete de la circulación extracorpórea de nuestros pacientes, además de favorecer un aumento de la formación de trombina y deposición de fibrina. Asimismo, produce activación y agregación plaquetaria.

La hemólisis causa una deficiencia de óxido nítrico (NO) local y sistémico al liberar hemoglobina al plasma. La reacción entre el NO la hemoglobina libre es rápida e irreversible y en ella se generan productos de oxidación inertes, nitrato y metohemoglobinemia. En condiciones normales, la velocidad de reacción del óxido nítrico y la hemoglobina esta limitada, debido a las múltiples barreras de difusión del NO a lo largo de la membrana de los glóbulos rojos y células endoteliales⁹¹. Según esto la homeostasis vascular depende de que la hemoglobina y el endotelio estén separados físicamente. Pero durante la hemólisis esta separación desaparece, dando lugar a la liberación de NO y a disfunción endotelial^{92,93}.

Además de descomponer la hemoglobina y eliminar el NO, la hemólisis también libera arginasa eritrocitaria, que convierte la L-arginina (un sustrato de la síntesis de NO) en ornitina, lo que reduce aún más el NO^{94,95}.

El exceso de hemoglobina libre está asociada con signos y síntomas clínicos adversos, incluyendo desajustes cardiovasculares, pulmonares, urogenitales, renales y gastrointestinales⁹¹ (figura 13). A su vez está relacionado con la activación plaquetaria y la tendencia a la trombosis⁹¹, aunque las principales causas adversas de hemoglobina libre en las plaquetas están en relación con el NO. Está demostrado que el NO inhibe la adhesión plaquetaria además de inducir la disgregación de las plaquetas ya agregadas, mecanismo mediado por el aumento de los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc)^{96,97}. Por ello podemos deducir que fármacos o mediadores químicos que aumenten los niveles NO inhiben la agregación plaquetaria y viceversa. La captación de NO por la hemoglobina libre o la disminución de su síntesis lleva a un estado de proagregación plaquetaria^{98,99}.

Además de la interacción con las plaquetas, el NO interactúa con los componentes de la cascada de la coagulación para la regulación de la formación del coágulo. Se ha demostrado que el NO modifica e inhibe el FXIII, lo que sugiere que la deficiencia de NO mejora la estabilidad del coágulo y reduce la disolución del mismo¹⁰⁰. En modelos animales, el consumo de NO conduce a un aumento de los productos de escisión de la

fibrina y de los complejos trombina-antitrombina, lo que conduce a un depósito masivo de fibrina y a trombosis¹⁰¹.

En pacientes con deficiencia de L-arginina, la disminución en la producción de NO está relacionada con el aumento del complejo trombina-antitrombina y los productos de escisión de la fibrina, mientras que la reversión del déficit de NO con L-arginina reduce la coagulopatía intravascular¹⁰².

Un ejemplo claro de cómo se genera la hemólisis, extrapolable a nuestra cirugía y las repercusiones que tiene, lo encontramos en la anemia de células falciformes. Así, Kato et al. (2018) señalan que, en esta enfermedad, en la que se produce hemólisis extra e intravascular, la hemoglobina libre en plasma y el grupo hemo en plasma generan estrés oxidativo grave, especialmente en los vasos sanguíneos y en las células sanguíneas. La autooxidación de la hemoglobina libre produce superóxido, que a su vez se disuelve en peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que favorece los fenómenos de vasoconstricción. Por su parte la hemoglobina libre elimina el NO (generado por la enzima *Nitric Oxide Synthase*: NOS) unas mil veces más rápido que la hemoglobina citoplasmática, generando una menor biodisponibilidad del NO⁹². La menor biodisponibilidad del NO genera disfunción vascular, expresada por una respuesta vasodilatadora alterada, activación de las células endoteliales y activación hemostática de las plaquetas que expresan en su superficie celular la P-selectina (mediadora en la interacción leucocito-plaqueta activada) y la activación de α Ib β III selectina¹⁰³. Según el citado autor, serán los marcadores de gravedad hemolítica (hemoglobina baja y láctico deshidrogenasa alta) los que predigan el riesgo de desarrollar complicaciones en esta enfermedad¹⁰⁴.

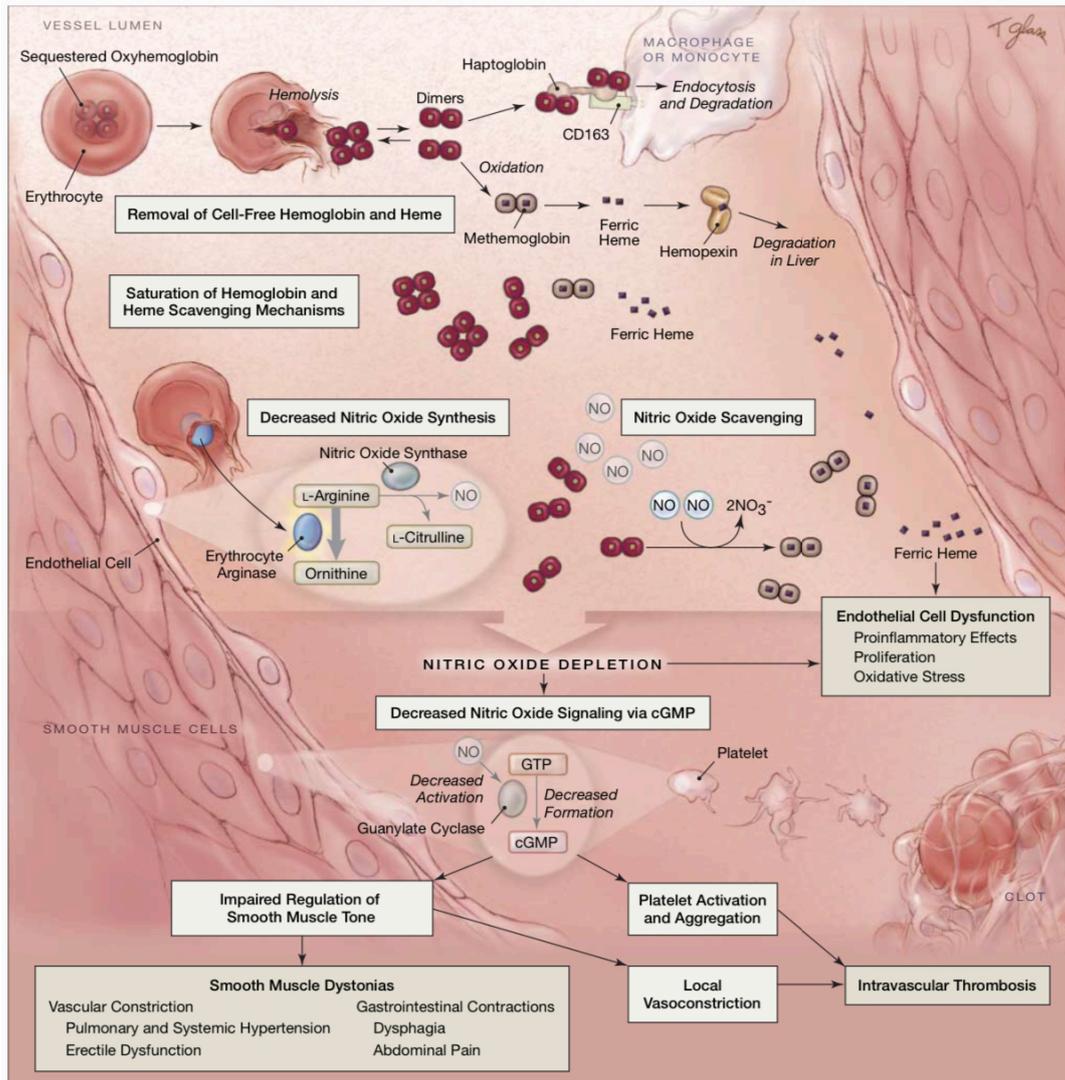


Figura 13. Efectos biopatológicos de la hemoglobina libre en plasma y la depleción del NO durante la hemólisis intravascular. Durante la hemólisis intravascular, la hemoglobina se libera al plasma y normalmente es eliminada por la haptoglobina. El complejo haptoglobina-hemoglobina se une al CD 163 en la superficie de los macrófagos/monocitos iniciando así la endocitosis y degradación del complejo. También se libera hierro que se oxida y se une al grupo hemo que es degradado por los hepatocitos en el hígado. La hemólisis excesiva saturará y agotará estos sistemas de eliminación y hará que la hemoglobina y el grupo hemo se acumulen en el plasma. Estos, acumulados en plasma tienen efectos proinflamatorios, proliferativos y prooxidantes directos sobre células endoteliales vasculares. El NO es generalmente producido por la L-arginina en las células endoteliales vasculares por la óxido nítrico sintasa (NOS). El NO mantiene la relajación del músculo liso e inhibe la activación y agregación plaquetaria, regulando así la tensión de los vasos y promoviendo el equilibrio dinámico del organismo. Durante la hemólisis, la disponibilidad de NO estará limitada por su reacción con la oxihemoglobina (eliminación de NO) y la descomposición de L-arginina sintetizada por NO producido por la arginasa de los glóbulos rojos. El consumo de NO da lugar a una disminución en la activación del guanilato ciclasa, una enzima necesaria para la producción de cGMP. Los niveles disminuidos de cGMP pueden alterar la regulación del músculo liso, lo que lleva a la distonía, hipertensión pulmonar y sistémica, disfunción eréctil, disfagia y dolor abdominal. La disminución de cGMP a través del agotamiento de NO conduce a la activación y agregación plaquetaria, favoreciendo la formación de coágulos. *Rother et al. 2005.*

Debido a la importancia que genera los niveles de NO en la hemólisis y sus posibles implicaciones en la hemostasia, se hace necesario comprender su funcionamiento de forma profunda. El consumo de NO por parte de la hemoglobina libre y la intraerotrocitaria sugiere que únicamente cuando la hemoglobina está físicamente compartimentada dentro de los hematíes, el NO que producen las células endoteliales llega a las concentraciones dentro del músculo liso necesarias para activar la guanilatociclasa y causar vasodilatación^{92,105}. El sistema de eliminación de la hemoglobina se satura aproximadamente cuando se produce una hemólisis intravascular del 30%, por lo tanto, cabe esperar que a partir de ese momento se empiecen a manifestar síntomas y se revelen evidencias significativas de hemólisis, incluyendo niveles altos de bilirrubina y láctico deshidrogenasa (LDH), con anemia y reticulocitosis.

Según la hipótesis de Reiter et al. (2002), la hemoglobina libre de células en el plasma de pacientes con anemia de células falciformes consumiría estequiométricamente el NO siempre que se mantuviera en el estado de oxidación ferroso. Así concluyen que el plasma de pacientes con hemólisis consume más NO que el plasma de los pacientes sanos. En la misma línea de investigación afirman que es la oxihemoglobina ferrosa la responsable de captar o quelar al NO. Siguiendo esta hipótesis, demostraron que la administración inhalada de NO da lugar a la exposición de casi toda la sangre circulante por minuto a través de la vasculatura pulmonar, y dado que la reacción del NO con la hemoglobina libre es mil veces más rápida que con la hemoglobina intraerotrocitaria, cabe esperar que el NO reaccionara con la hemoglobina libre para formar metahemoglobina plasmática y hierro-nitrosilhemoglobina plasmática, hecho que reduciría drásticamente la capacidad para consumir NO⁹² (Figura 14).

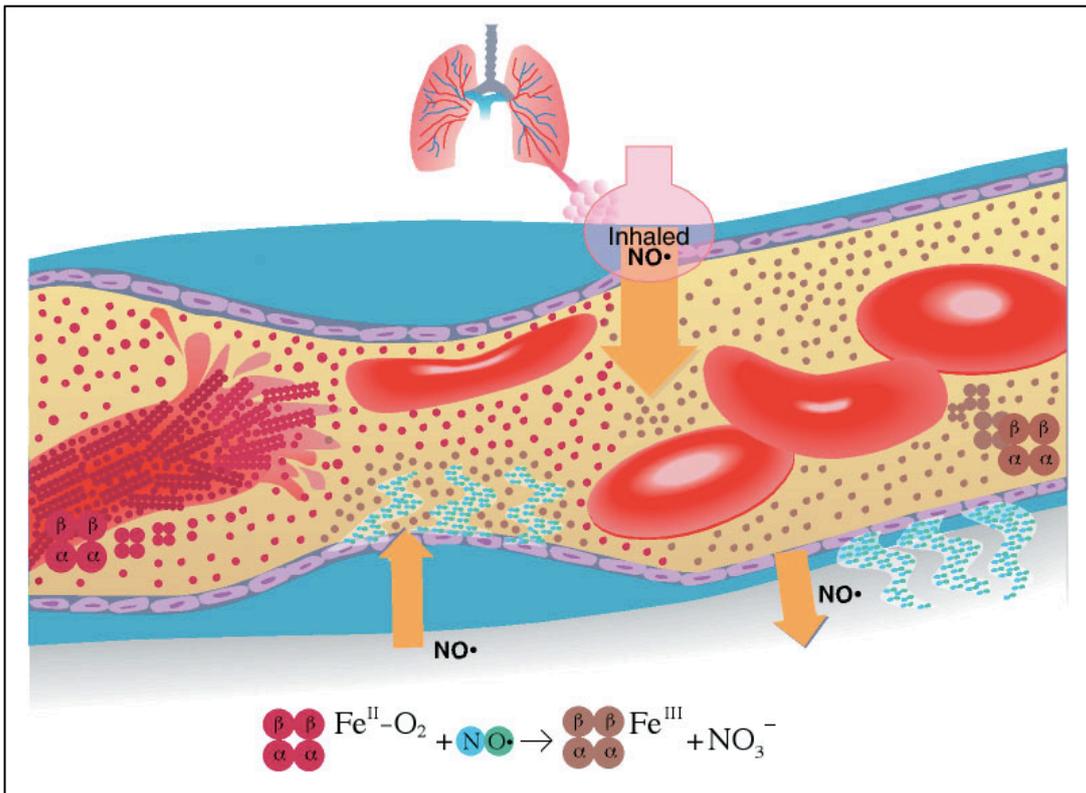


Figura 14. La administración de NO gaseoso por inhalación reacciona con la hemoglobina plasmática para dar lugar a metahemoglobina y hierro-nitrosilhemoglobina, lo que reduce la capacidad del plasma para consumir NO. La hemoglobina ferrosa libre de células (roja) consume el NO producido por la célula endotelial, desviándolo del músculo liso. Los principales productos de esta reacción son la metahemoglobina (marrón) y el nitrato; la ferro-nitrosilhemoglobina se forma como un producto menor. El tratamiento con NO inhalado oxida la oxihemoglobina libre en la vasculatura pulmonar hasta convertirla en metahemoglobina; por lo tanto, el NO producido endógenamente queda libre para poder difundir al músculo liso y ejercer la función de regulador del tono muscular y la expresión de moléculas de adhesión. *Reiter et al. 2002.*

En consonancia con lo visto, parece claro pensar que la hemoglobina libre que se genera en el proceso de hemólisis reduce la biodisponibilidad del NO y limita otras reacciones más lentas que se piensa que conservan la bioactividad del NO, como la reacción de autooxidación necesaria para formar S-nitrosotioles y nitritos¹⁰⁶ que veremos más adelante.

Como anteriormente adelantamos, la principal fuente de NO in vivo es la NOS en sus distintas isoformas: 1) neuronal (nNOS/NOS1), 2) inducible (nNOS/NOS2) y 3) endotelial (nNOS/NOS3). Las NOS son enzimas que contienen hemo y flavina y que utilizan la NADPH, la tetrahydrobiopterina y el O₂ para convertir la L-arginina en L-citrulina con la consiguiente liberación de NO¹⁰⁷.

La señalización basada en el NO: papel del GMPc y de la S-nitrosilación

Una de las primeras proteínas y receptores descritos, y hoy en día ampliamente estudiado y caracterizado, con capacidad para unirse al NO y mediar señales de transducción de la señal intracelular es la guanilato ciclasa soluble (sGC)¹⁰⁸. La unión del NO al grupo hemo de la sGC conduce a una mayor conversión de GTP en GMPc, que a su vez activa la proteína quinasa G (PKG). La señalización del GMPc acaba con la acción de las fosfodiesterasas hidrolizadoras de nucleótidos cíclicos (PDE). Aunque son muchos los estudios sobre el papel que la sGC ejerce sobre la mediación de los efectos biológicos del NO, queda claro que el NO ejerce la mayoría de sus efectos celulares independientemente del GMPc¹⁰⁹. A lo largo de los años muchas investigaciones han puesto de manifiesto la existencia de mecanismos moleculares alternativos a la señalización por medio del GMPc, mediante los cuales el NO puede regular. Uno de estos mecanismos, que está adquiriendo una gran importancia, es el de la modificación de los residuos de cisteína de las proteínas mediado por el NO para generar un S-nitrosotiol (SNO), proceso conocido como S-nitrosilación¹¹⁰. La S-nitrosilación es una modificación postraducional que regula diversos procesos biológicos. La nitrosilación de residuos específicos de tior de cisteína o de centros metálicos es una modificación covalente reversible que modula la actividad de las proteínas⁸⁹.

Se ha demostrado que la S-nitrosilación modula los niveles de GMPc mediante la inhibición de la sGC. La PKG tiene tioles reguladores que también son susceptibles a la S-nitrosilación. Además se ha demostrado que la S-nitrosilación activa la arginasa e inhibe la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa lo que lleva al descenso de los niveles de sustrato de la NOS y al aumento de los niveles de los inhibidores de la NOS metilarginina, respectivamente⁸⁹.

Es de relevancia la reacción redox (transferencia de electrones y el consiguiente cambio en el estado de oxidación atómico) entre el NO y un tior de la cisteína que conduce a la S-nitrosilación generando un SNO proteico. En contrapunto al GMPc que utiliza como efector único la PKG para desencadenar las funciones del NO, la S-nitrosilación genera una amplia gama de efectos celulares del NO mediada por cada una de las SNO proteicas desarrolladas, entre ellos la prevención de la activación plaquetaria (efecto de la *N-ethylmaleimide-sensitive factor* [NSF] sobre las plaquetas)¹¹¹ y la inhibición de la agregación plaquetaria (efecto mediado por la transglutaminasa tisular sobre la superficie del endotelio)¹¹². De hecho, Huang B et al (2009) describen que la activación de las

células endoteliales en respuesta a las fuerzas de cizallamiento, está relacionada con la S-nitrosilación de más de 100 proteínas¹¹³.

El efecto de la NSF tiene un amplio calado en las propiedades antiinflamatorias y antitrombóticas del NO. Durante el estadio primario de la fase inflamatoria, los leucocitos requieren de la interacción de la glicoproteína P-selectina de su superficie con la P-selectina de la superficie de la célula endotelial. La P-selectina se encuentra en el interior de la célula endotelial en reposo almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade. Al activarse la célula endotelial por cualquier estímulo inflamatorio, los cuerpos de Weibel-Palade migran a la superficie celular, exponiendo la P-selectina en la luz del vaso. El NSF es un elemento principal en este proceso exocítico, así, la S-nitrosilación del NSF impide la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade (Figura 15). Por un mecanismo similar se explican los efectos antitrombóticos, al impedir la expresión de la P-selectina, y otras moléculas de adhesión, en las plaquetas, gracias a la S-nitrosilación de la NSF¹¹⁴, que inhibe ese proceso, tal y como se puede ver en la figura 15.

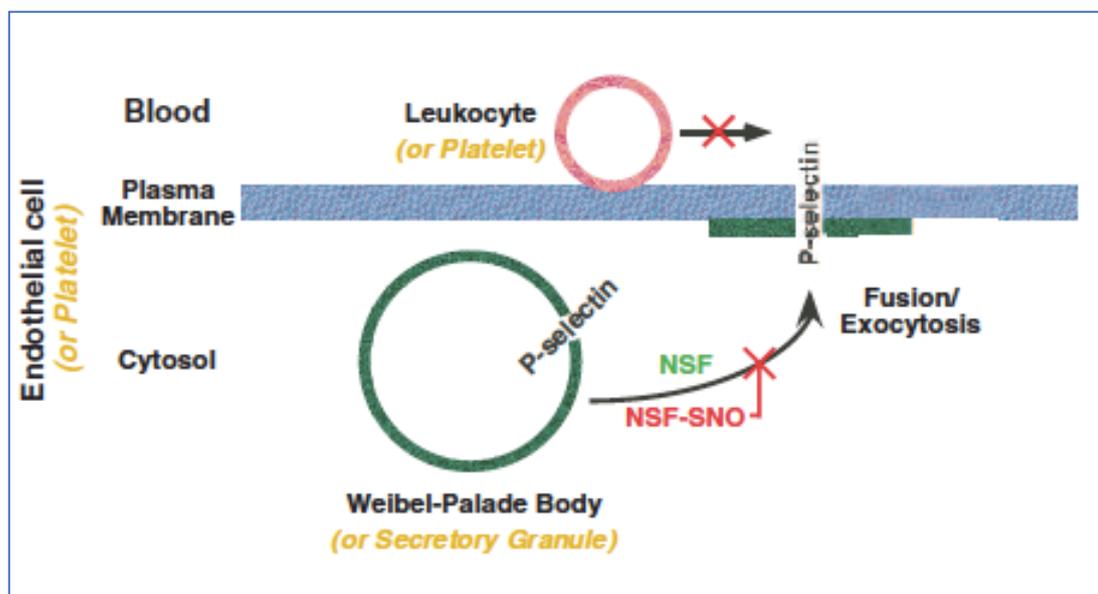


Figura 15. La S-nitrosilación de la NSF es antitrombótica y antiinflamatoria. La S-nitrosilación inhibitoria de la NSF en la célula endotelial, impide la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade y por tanto la externalización de la P-selectina. Esto impide la interacción con los leucocitos y por tanto el mecanismo de inflamación vascular. De igual forma, en las plaquetas, la S-nitrosilación inhibitoria de la NSF impide la exocitosis de los gránulos secretores y, consecuentemente la exposición de la P-selectina (y otras moléculas adhesivas), reduciendo la activación, adhesión y agregación de las plaquetas en el endotelio, favoreciendo los efectos antitrombóticos. Lima *et al.* (2015).

Acción del NO en la función plaquetaria: Mecanismo GMPc y mecanismo S-nitrosilación.

Ya conocemos la importancia del NO en los procesos de inflamación y trombosis al inhibir la adhesión y agregación plaquetaria. Como se adelantaba al inicio de este apartado, existe una vía bien definida de inhibición o regulación de la actividad plaquetaria mediada por NO, a través de la guanilato ciclasa. Sabemos que el NO activa la guanilato ciclasa en las plaquetas lo que produce un aumento del GMPc. Las dianas del GMPc en las plaquetas incluyen a las fosfodiesterasas (PDE) PDE2 y PDE5; proteína quinasa tipo I dependiente de GMPc; y probablemente las proteínas quinasa dependientes de AMPc¹¹⁵. La vía del GMPc media muchos de los efectos del NO sobre la activación plaquetaria, como la inhibición, por tanto, lo consideramos un importante mediador en los fenómenos de hemostasia derivados de plaquetas.

Pero el NO también regula las plaquetas a través de una vía independiente del GMPc. Por ejemplo, ciertos donantes de NO inhiben la agregación plaquetaria de forma independiente¹¹⁶. Además, el NO actúa sobre la ADP-ribosiltransferasa plaquetaria de forma independiente del GMPc¹¹⁷, y finalmente, el NO puede inhibir la migración de Ca²⁺ en las plaquetas independientemente de la citada vía¹¹⁸. Según esto, el NO inhibe la activación de las plaquetas tanto por vías dependiente de GMPc como por vías independientes, aunque estas últimas no estén tan bien caracterizadas como las primeras. Como se apuntó al inicio de la introducción, la exocitosis de los gránulos intracelulares es un proceso importante por el que las plaquetas intervienen en los procesos de trombosis e inflamación. Las plaquetas tienen tres tipos de gránulos: gránulos densos, α -gránulos y gránulos lisosomales. Los gránulos densos, los primeros en ser liberados tras la activación, contienen pequeñas moléculas como serotonina, ATP y ADP, que participan en el reclutamiento y activación plaquetario. El contenido de los α -gránulos incluyen, la P-selectina, el factor de von Willebrand y la β -tromboglobulina, promueven la adherencia, agregación y contacto de las plaquetas con los vasos sanguíneos. Los gránulos lisosomales son los últimos en liberarse y contienen enzimas de degradación. La exocitosis de estos gránulos está mediada por un conjunto de proteínas que regulan el tráfico de microvesículas^{119,120}. Los receptores de unión del NSF solubles (SNARE) determinan la especificidad de la reacción de fusión entre un gránulo y su membrana objetivo. Los SNAREs localizados en las vesículas (v-SNAREs) y en las membranas diana (t-SNAREs), interactúan formando complejos estables. Las SNAREs expresadas

en las plaquetas incluyen syntaxina-2, syntaxina-4, la proteína soluble de unión a la NSF (SNAP)-23, la proteína de membrana asociada a la vesícula (VAMP)-3 y la VAMP-8¹²¹. La NSF y su proteína adaptadora, la α -SNAP también son necesarias para la exocitosis de los gránulos procedentes de las plaquetas¹²².

La NSF interactúa con los complejos SNARE a través de la α -SNAP para hidrolizar ATP y descomponer los complejos SNARE. La NSF se identificó originariamente como una proteína necesaria para el transporte intracisternal del Golgi cuya actividad era sensible a la N-etilmeleimida (NEM). La NEM actúa sobre los residuos de cisteína, que son lugar común de modificación postraducional del NO¹¹⁴.

Morrel et al. (2005) concluyen en su trabajo que el NO inhibe la exocitosis de los gránulos plaquetarios mediante la S-nitrosilación de la NSF y la inhibición de la capacidad de la NSF para desmontar el complejo SNARE. Independientemente de la vía de regulación del NO vía GMPc, este grupo de estudio confirma que la NSF regula la exocitosis de los gránulos plaquetarios y demuestran que el NO, al modificar químicamente el NSF cambia su actividad e inhibe el desensamblaje del complejo SNARE. Con todos estos datos se demuestra que la NSF es diana para el NO en las plaquetas y que por tanto el NO derivado de la eNOS endógena regula la función plaquetaria y la exocitosis de gránulos in vivo¹¹⁴.

Proteína disulfuro isomerasa (PDI), coagulación y su papel en las señales de NO.

Como hemos ido señalando, la activación de las plaquetas es un complejo entramado de interacciones proteolíticas (proteína-proteína, proteína-ligando). Recordamos de forma breve que, para que este proceso se desarrolle, la célula endotelial dañada expone el factor de von Willebrand, para atraer a la plaqueta. La plaqueta produce trombina para la agregación de plaquetas adicionales y así se desencadena todo el proceso de coagulación. Como veíamos, las plaquetas empiezan a secretar otros activadores que unidos a receptores de plaquetas aumentan los niveles de Ca^{2+} favoreciendo la unión a fibrinógeno y con ello la mayor adhesión de plaquetas y formación de trombos². Muchos de los receptores de integrina asociados a la actuación de plaquetas contienen una subunidad rica en cisteína, lo que posiblemente permite a la PDI regular el estado redox de los tioles. La PDI es una de las veinte proteínas perteneciente a la familia PDI¹²³ con tres actividades catalíticas: 1) la redox de los tioles, 2) la que permite el intercambio de grupos disulfuros y 3) la chaperona, actividades, todas ellas, fundamentales para la función del retículo endoplásmico¹²⁴ y que han sido identificadas como un componente funcional crucial de la vía biosintética en la síntesis de proteínas. La PDI es una proteína que se expresa en

todos los tejidos de los mamíferos y aunque parece que a priori se circunscribe al RE, se ha detectado también en el núcleo, el citosol, la superficie celular y de forma extracelular¹²⁵.

Las plaquetas deficientes en PDI muestran una agregación irregular, por lo que vemos que la PDI de la superficie de las plaquetas tiene un importante papel en la formación de agregados plaquetarios y por tanto en la posible generación de trombos. Jurk et al. (2011) aseguran que la PDI desempeña un papel importante en la activación por retroalimentación de la trombina en las plaquetas que ya han sido estimuladas por trombina. Así, demuestran que la PDI puede desempeñar un rol en la interacción de los factores de coagulación con las plaquetas¹²⁶.

Parece que en las células endoteliales, cuando se inhibe la PDI en la superficie celular, la coagulación aumenta, además de que parece que la PDI puede desempeñar un papel en la regulación de la exposición a la fosfatidilserina (PS), a través de la actividad de la flippasa y la floppasa¹²⁷.

Khan and Mutus (2014) demostraron en su trabajo que la PDI de la superficie celular mediaba la entrada de S-nitrosotioles (SNO) en las células. Observaron que la PDI de la superficie celular podía catalizar la liberación de NO del glutatión S-nitrosilado (GSNO), que es uno de los principales transportadores de NO en los tejidos. En ese sentido, se ha observado que la PDI es capaz de regular la nitrosilación del GSNO, en función de los niveles de NO nitrosilando o desnitrosilando según la concentración de este. Esta capacidad de la PDI juega un importante papel en el transporte de NO desde los glóbulos rojos a las células del endotelio, en el que se ha observado que cuando la hemoglobina estaba saturada de oxígeno al 50%, el NO se disociaba de la PDI extracelular y se transfería a las células del endotelio¹²⁷.

Del mismo modo la PDI también puede participar en la transferencia del NO a las plaquetas, de hecho, cuando se bloquea la actividad de la PDI a nivel plaquetario se observa una considerable reducción en el transporte intracelular de NO y por tanto una disminución de la acumulación del mismo en el citosol plaquetario, lo que lleva a una menor síntesis de GMPc, con las repercusiones que ello pueda tener sobre la función plaquetaria y la hemostasia. Además, la transferencia mediada por el PDI del NO producido por el endotelio y transferido al citosol plaquetario podría ayudar a regular la activación de las plaquetas.

También se ha demostrado que la PDI se puede unir a la NADPH oxidasa y facilitar la producción de ROS en las células vasculares^{128,129}. Como sabemos el NO y el ROS desempeñan un papel crucial en la formación del trombo.

Siguiendo la línea de la PDI, podemos decir que en el proceso de la formación del trombo provocada por la lesión vascular, las isomerasas de tiol (PDI y otras isomerasas de tiol), procedentes de las células lesionadas, pueden actuar como una de las señales de inicio más importantes en el desarrollo del proceso trombótico¹²⁹. La localización de las tiol isomerasa en la membrana plasmática es una característica esencial de su participación en la coagulación. Una de las evidencias más importantes que se han encontrado del papel de las tiol isomerasas en la formación y generación de trombos es el hecho de que un inhibidor de la actividad de la PDI, como es el compuesto natural isoquercetina y derivados, es capaz de disminuir la agregación plaquetaria, generación de fibrina, el tamaño de los trombos, e incluso inhibirlos por completo, en modelos animales de lesión vascular. Es objeto de investigación de cara a la creación de nuevos fármacos. Por todo ello, este tipo de compuestos están siendo investigados como serios candidatos para actuar como agentes antitrombóticos, y no sólo en la trombosis arterial, sino también en la venosa, ambas patologías muy recurrentes en el postoperatorio de la cirugía con CEC. Está ampliamente demostrado el papel del NO como efecto antiinflamatorio en la vasculatura, de hecho, los inhibidores de la NOS aumentan la adherencia leucocitaria-endotelial. En este sentido se ha demostrado que la S-nitrosilación es el mecanismo de señalización por el que el NO regula el tráfico de proteínas endoteliales y la supresión de la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión dependiente del factor nuclear κB ¹³⁰. Respecto al tráfico de proteínas en las células endoteliales, la S-nitrosilación del factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF) suprime la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade y por tanto la exposición externa de la molécula de adhesión P-selectina¹¹¹. Esto inhibe la activación de los leucocitos, y, por tanto, el proceso inflamatorio. Un mecanismo similar es lo que sucede con las plaquetas, reduciendo como sabemos la activación, adhesión, agregación y trombosis^{89,114}.

Las acciones del NO mediadas por la S-nitrosilación son importantes en la mediación en procesos tales como la aterosclerosis, la sepsis y los trastornos autoinmunes.

Mannick et al. (1999) ya demostraron que los efectos antiapoptóticos del NO están mediados por la S-nitrosilación de la caspasa-3¹³¹. Un residuo de cisteína en el sitio activo de la caspasa-3 es S-nitrosilado, inhibiendo así sus efectos proapopticos. En la medida en que estos mecanismos son operativos en las células endoteliales, el equilibrio entre la

S-nitrosilación y la desnitrosilación puede desempeñar un papel crucial en la supervivencia de las células endoteliales⁸⁹.

Por todo ello, es de radical importancia comprender los mecanismos mediante los cuales puede ser provocada la hemólisis en la cirugía con CEC, e identificar cuales son los procesos fisiológicos que intervienen cuando la sangre de los pacientes se somete al estrés que supone atravesar todo el circuito de circulación extracorpórea.

Poner de relieve la importancia de los procesos que se desarrollan en este punto, nos ayuda no sólo a comprender qué sucede cuando el proceso de hemólisis está en curso y cuáles son los procesos moleculares que se disparan, sino las consecuencias clínicas que se pueden provocar en el postoperatorio de los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico.

Además, investigar la implicación de la hemólisis en la hemostasia en esta cirugía y saber como cuantificarlo y medirlo, debe servir para evaluar hasta que punto se está protegiendo de la hemólisis a los pacientes.

El conocimiento de estos mecanismos de hemólisis y hemostasia son una herramienta para optimizar los recursos de los que disponemos para minimizar la hemólisis.

Minimización del daño. Estrategias.

El cuidado con los sistemas de aspiración es importante, al mismo tiempo que la utilización de los dispositivos salvacélulas de autotransfusión, que son capaces de eliminar hasta el 90% de la hemoglobina plasmática. Por lo tanto, en pro de minimizar la hemólisis en nuestra cirugía, estaría justificado utilizar el “salvacélulas” de forma protocolaria, ya que este procesa y elimina los hematíes lisados y la hemoglobina libre¹³².

Si la sangre del depósito de cardiotoromía esta muy dañada debe separarse y desecharse.

Menos utilizadas son las estrategias farmacológicas en los pacientes que presentan hemólisis. En caso de agotamiento endógeno de eliminación de hemoglobina libre, existe la posibilidad de administración de haptoglobina adicional. Existen estudios que demostraron en su día que la administración de haptoglobina adicional tiene efecto protector de la función renal¹³³.

Un segundo enfoque farmacológico seria la administración de NO, que compensaría la unión del NO con la hemoglobina libre.

1.4. El valor estratégico de medir la función plaquetaria. Nuevos métodos y perspectivas clínicas.

Una cirugía como la de recambio valvular aórtico exige de un estrecho ajuste hemostático para lograr resultados exitosos. Las plaquetas, son un elemento clave en esta cirugía, ya que deben actuar en el proceso de reparación de los tejidos dañados, y a la vez se ven alteradas al contacto con las superficies y turbulencias de la máquina de CEC y por el influjo que los fármacos antiagregantes generan sobre ellas.

Conocemos la reactividad plaquetaria como un término que expresa el grado de respuesta de las plaquetas a un estímulo externo, generalmente un “agente agregante”.

La reactividad plaquetaria es posible medirla de muchas maneras, desde las formas más clásicas a los enfoques más novedosos.

Como sabemos, las plaquetas son células sanguíneas anucleadas de 2 a 4 μm de diámetro, con múltiples funciones y una vida media corta, entre 7-10 días. Tras este periodo, las plaquetas son eliminadas en el bazo y en el hígado. La producción de plaquetas o trombopoyesis se produce principalmente en la médula ósea. En primer lugar, se produce la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en megacariocitos poliploides, que desprenden numerosas protuberancias citoplasmáticas denominadas proplaquetas. La trombopoyetina hepática es la encargada de inducir la formación de proplaquetas cuando el recuento de plaquetas en sangre es bajo³².

Se establece pues que las proplaquetas se desarrollan y dividen en plaquetas. La activación de las plaquetas inducida por un agonista aumenta su heterogeneidad en cuanto a la capacidad de respuesta, con pruebas que demuestran que pueden surgir poblaciones plaquetarias distintas. Estas poblaciones diferentes incluyen plaquetas con o sin secreción, plaquetas con integrinas activadas o no, plaquetas con capa de fibrina y plaquetas con globo de membrana y fosfatidilserina expuestas³².

Se piensa que los agentes agregantes que se exponen en el tejido alterado o que se liberan a la circulación generan la agregación plaquetaria que contribuye, como ya hemos visto, a la participación de las plaquetas en los procesos de hemostasia y trombosis. Recordamos algunos agentes agregantes como son el colágeno, la trombina, el ADP y el Tromboxano A₂. Las medidas de reactividad plaquetaria estaban enfocadas a cuantificar los efectos de estos y otros agregantes en las plaquetas. De igual forma, también se han utilizado para cuantificar el grado de inhibición de la actividad plaquetaria provocado por los fármacos

antiagregantes plaquetarios, algunos de los cuales son de prescripción muy frecuente en los pacientes sometidos a cirugía cardíaca¹³⁴.

La tendencia general es que se asocia a un mayor riesgo de trombosis a los pacientes con respuesta exagerada a los agentes agregantes, mientras que la baja reactividad está relacionada con la predisposición a hemorragias y hematomas. El conocimiento de los déficits congénitos en la función plaquetaria ayuda a explicar las diátesis hemorrágicas y la importancia de la función plaquetaria en la hemostasia. Si bien una elevada actividad plaquetaria a pesar del tratamiento antiagregante predispone a padecer episodios trombóticos, es de especial relevancia recordar también que la inhibición excesiva de la reactividad plaquetaria puede asociarse a tendencias hemorrágicas excesivas en todas las cirugías y particularmente en la cirugía con CEC. Es de suponer la elevada importancia de las mediciones de reactividad plaquetaria, para establecer una horquilla terapéutica en la cual, los riesgos de sangrado y trombosis sean mínimos¹³⁵.

Enfoques para el estudio de reactividad plaquetaria.

No es un descubrimiento nuevo el hecho de que al añadir ADP al plasma rico en plaquetas (PRP) las plaquetas se agrupan. El PRP se obtiene cuando la sangre, a la que se le añade un anticoagulante (citrato de sodio), se centrifuga durante unos 10 minutos para obtener una muestra libre de glóbulos rojos y blancos. A los segundos de añadir ADP, o cualquier otro agente proagregante a la muestra de PRP, empieza a aclararse la muestra y en pocos minutos se vuelve prácticamente transparente, debido a que las plaquetas de forma individual se agrupan formando agregados de todas las plaquetas presentes en el PRP. Estos agregados pueden ser tan voluminosos como para poder apreciarse a simple vista. Esta agregación plaquetaria se puede presentar con carácter reversible o irreversible, y esto depende de la presencia o ausencia de patología en el paciente de donde se ha extraído la muestra. Así, en pacientes que muestran trastornos hemorrágicos, esta agregabilidad puede estar reducida, del mismo modo que los pacientes que presentan alto riesgo de trombosis generan una agregabilidad excesiva. Pero no solo depende del paciente, sino también del tipo y concentración del agregante utilizado, y de si la muestra está bajo los efectos de algún fármaco antiagregante.

La agregometría por transmisión de luz (LTA) se convirtió en el pilar básico de medida de la agregación plaquetaria. Con ella se controla el “aclaramiento” de la muestra agitada de PRP detectando la cantidad de luz transmitida a través de ésta. El equipo que se utiliza tanto para agitar la PRP como para detectar los cambios en la transmisión de luz se

denomina AGREGÓMETRO. A pesar de los avances que han surgido durante los últimos años para estimar la agregación plaquetaria, el agregómetro, por transmisión de luz, sigue siendo el método “gold estándar”¹³⁶.

Resulta interesante la medición de la agregación plaquetaria para la evaluación de la reactividad, ya que es precisamente la formación de agregados plaquetarios la responsable, en un elevado porcentaje, de la formación del tapón hemostático. Pero, como ya apuntan Algahtani & Heptinstall (2016) en su trabajo de revisión sobre métodos de medida de la reactividad plaquetaria, la medición de la agregación por el método LTA presenta tres tipos de problemas: 1) El primero es que las mediciones se desarrollan sobre PRP, que se considera menos fisiológico que la sangre total; 2) El número de plaquetas en el PRP varía de un paciente a otro. 3) El método requiere un acceso rápido a un laboratorio, con un equipo entrenado para este tipo de mediciones. Hoy en día los métodos para medir la agregación plaquetaria han evolucionado mucho y tenemos una gran variedad de ellos. Los métodos más novedosos incluyen:

1. VERIFYNOW
2. MULTIPLATE
3. RECUENTO PLAQUETARIO POR CITOMETRIA DE FLUJO

La agregación plaquetaria es solo una de las respuestas de las plaquetas a un estímulo externo. Cabe recordar que es posible inducir a la plaqueta a formar agregados por diferentes moléculas como el TxA₂ e incluso a secretar el contenido de los gránulos intracelulares como el ADP o la P-selectina procedente de los gránulos α . La P-selectina aparece en la superficie de la plaqueta al ser activada, y es capaz de mediar la formación del complejo plaqueta-leucocito. Todo ello nos serviría como marcador para medición de activación plaquetaria.

Adicionalmente, la plaqueta tras recibir un estímulo externo genera cambios bioquímicos cuantificables como la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) que también está relacionado con su nivel de actividad y por tanto su medida tiene interés clínico.

La ventaja que presentan este tipo de pruebas es que pueden realizarse en un laboratorio convencional sin la necesidad de equipos excesivamente complejos.

A continuación, pasaremos a describir los distintos métodos mencionados con más profundidad:

Agregómetro. Agregometría por transmisión de luz.

A pesar de no ser una técnica nueva, sigue considerándose el “gold standar” para medir reactividad plaquetaria.

La prueba se basa en añadir un agente agregante a una muestra agitada de PRP en un agregómetro, y la agregación se cuantifica por el aumento que se produce en la transmisión de la luz. Los agentes agregantes típicamente utilizados son el ADP, la epinefrina, el colágeno y la trombina, aunque ésta última a veces se sustituye por un péptido de activación del receptor de trombina (TRAP) cuya ventaja es activar la plaqueta sin iniciar la cascada de coagulación.

Como norma general, la LTA se usa para el análisis de agregación de pequeñas muestras de PRP. Recientemente el ensayo Optimul ha probado con éxito los efectos de múltiples agonistas plaquetarios en paralelo en la PRP de pacientes con trastornos hemorrágicos¹³⁷.

Agregometría por impedancia. Multiplate.

La agregometría por impedancia fue introducida por Cardinal y Flower¹³⁸. El método está basado en la medición de la resistencia eléctrica entre dos electrodos sumergidos en sangre entera agitada. A medida que las plaquetas van agregándose y se unen a los electrodos, se produce un cambio en la impedancia eléctrica que se corresponde con el grado de agregación producida.

La principal ventaja que presenta utilizar sangre entera en lugar de PRP, es que evitamos el proceso de centrifugación, lo que hace que la medición sea más simple.

La versión más utilizada de agregometría por impedancia es la MEA (Multiplate Analyzer, Roche; Múnich, Alemania), que utiliza dos conjuntos de pares de electrodos, de forma que se hace una doble determinación en cada muestra para garantizar la reproducibilidad de la medición. Presenta una desventaja y es que, al igual que en la LTA, sigue siendo necesario un acceso rápido a un laboratorio y éste debe contar con una experiencia adecuada.

La agregometría por impedancia ha sido y es muy valiosa para medir el grado de inhibición plaquetaria producida por aspirina y clopidogrel en los pacientes que van a ser sometidos a cirugía cardíaca electiva.

En relación a la utilidad práctica del MEA, Hazarbasanov et al. (2012) utilizaron este método para identificar a los pacientes sometidos a intervencionismo coronario percutáneo que seguían mostrando una elevada reactividad plaquetaria a pesar del tratamiento con clopidogrel, aportando la conclusión de que si se aumentaba la dosis del fármaco, los resultados eran más favorables¹³⁹.

VerifyNow.

VerifyNow (Accumetrics, Inc, CA, EE. UU.) es un método de prueba utilizado para medición específica de la inhibición de la agregación plaquetaria, por aspirina, antagonistas P2Y₁₂ (clopidogrel) y los antagonistas GPIIb/IIIa. Su particularidad es que se realiza la medición en el punto de atención, donde se realiza la extracción de la muestra. Para controlar la actividad de clopidogrel utiliza el ADP como activador plaquetario, mientras que el AA se utiliza para controlar el tratamiento con aspirina. Para la monitorización de los antagonistas GPIIb/IIIa se utiliza un péptido de activación del receptor de la trombina.

Tras la activación por el agonista, las microvesículas recubiertas de fibrinógeno pueden unirse a la plaqueta activada a través de la GPIIb/IIIa de la superficie plaquetaria para formar un aglutinado, midiéndose el aclaramiento resultante de la muestra por turbidimetría. Todo el proceso está totalmente adaptado para mediciones realizadas en el punto de recogida de sangre, y otra de las ventajas es que no se requiere de laboratorio especializado o personal formado para ello.

Al igual que MEA, VerifyNow ha demostrado ser eficaz para predecir hemorragias en pacientes tratados con clopidogrel que se van a someter a cirugía con CEC, y se ha establecido una relación entre menor actividad plaquetaria y aumento de hemorragias en dos estudios^{140,141}.

Recuento plaquetario.

Cuando las plaquetas se agregan, el número de plaquetas individuales en sangre disminuye, y esta disminución en el número se puede utilizar como índice para medir el grado de agregación plaquetaria¹⁴². Para medir la agregación plaquetaria por recuento plaquetario se pueden utilizar distintos instrumentos como un contador de células sanguíneas para contar plaquetas, utilizando tecnología de recuento de impedancia, o también un citómetro de flujo. Si el dispositivo de recuento de plaquetas no se puede usar para contar inmediatamente, es ventajoso usar un fijador que detenga la agregación en el

punto donde se necesita la medición^{143,144}. La ventaja de este procedimiento, con respecto a otros métodos, es que no es necesario preparar o manipular tanto la muestra, que es muy sensible a la formación de microagregados y que las mediciones se pueden realizar en sangre total.

Además, el recuento plaquetario es un procedimiento rápido y sencillo y los resultados de recuento y agregación están disponibles inmediatamente. Por otro lado, el uso de un fijador para la muestra de sangre en el momento exacto en el que se requiera medir la agregación tiene la ventaja de proporcionar un tiempo entre la experimentación y el recuento, lo que evita la necesidad de tener un dispositivo de recuento de plaquetas inmediatamente. El fijador AGGFix (Platelet Solutions Ltd, Nottingham, Reino Unido) ofrece no solo esta posibilidad, sino también la de poder estudiar las plaquetas semanas después, lo que le hace muy interesante cuando hay que analizar muestras de muchos pacientes, que no se pueden medir en el momento. Este método también se ha utilizado para evaluar el grado de formación de conjugados plaqueta-leucocito, analizados por citometría de flujo¹⁴⁵.

Métodos basados en la medición de marcadores de activación plaquetaria.

Cuando se produce la activación de la plaqueta, se externaliza en su superficie marcadores de activación como la P-selectina, que puede cuantificarse por citometría de flujo. Desde el punto de vista clínico la medición de este marcador es de gran interés porque puede ayudar a monitorizar la eficacia de tratamientos antiagregantes, además de valorar el grado de activación de las plaquetas en muchas situaciones clínicas. A este respecto, en la actualidad existen distintos métodos para medir la expresión de la P-selectina en plaquetas, destacando los desarrollados por la empresa británica Platelet Services (Nottingham, Inglaterra), en los que es posible fijar las muestras y analizarlas a posteriori, con una gran reproducibilidad de los resultados. Además, es un método que no requiere grandes conocimientos técnicos, y que, al poder fijar la muestra, esta puede ser analizada por un laboratorio especializado del propio hospital o por la propia empresa. Uno de los métodos más utilizados para este particular es el que se conoce como PAMFix: Platelets Services (Nottingham, Inglaterra)¹⁴⁵.

Otro marcador que también se puede medir es el TxB₂, producto de degradación del TxA₂ y metabolitos de TxA₂ como medio directo para evaluar la actividad de la ciclooxigenasa en las plaquetas. A su vez, las mediciones de ADP secretado en un dispositivo denominado lumiagregómetro, han resultado útiles en el estudio de los

defectos en la reserva plaquetaria de pacientes con predisposición a hematomas y hemorragias. Eso sí, para la medición de estos dos últimos marcadores de activación plaquetaria (TxA₂ y ADP) se requieren conocimientos técnicos avanzados y equipos especializados.

Métodos basados en la medición de metabolito celular.

Particularmente el que ha demostrado tener gran interés como medio para examinar la activación de las plaquetas es el metabolito VASP (Vasodilatador-Stimulated Phosphoprotein). El nivel de VASP fosforilado (VASP-P) está en función de las Proteínas Kinasas dependientes del nivel de nucleótidos cíclicos en las plaquetas: de manera que la Proteína Kinasa A depende del AMPc y la Proteína Kinasa G depende del GMPc. Por tanto, el nivel de VASP fosforilado (VASP-P) se ha utilizado como medida para determinar los efectos de diversos agentes antiagregantes o proagregantes que regula, ya sean aumentando o disminuyendo, la actividad plaquetaria a través de los niveles de AMP cíclico (AMPc) y GMPc en las plaquetas.

En la clínica, principalmente en cardiología, se ha usado mucho como método de control y valoración de los efectos antiagregantes de los fármacos antiplaquetarios que actúan inhibiendo el receptor purinérgico P₂Y₁₂ que es específico del ADP. Algunos de estos fármacos son: el clopidogrel, el prasugrel y el ticagrelor. Este método es muy útil en estos casos dado que la unión del ADP al receptor P₂Y₁₂ conduce a una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa y por tanto a la imposibilidad de sintetizar AMPc. Sin embargo, en presencia de estos fármacos que inhiben al receptor P₂Y₁₂, éste deja de inhibir a la adenilato ciclasa y es más fácil que se puedan producir aumentos en el nivel de AMPc, especialmente en presencia de mediadores locales como las prostaglandinas que inhiben la agregación plaquetaria precisamente activando a la adenilato ciclasa. Por todo ello, la medición de los niveles de fosforilación de VASP-P es un método muy útil para valorar la acción antiagregante de estos fármacos.

Hoy en día hay varios métodos en el mercado, disponibles para que se puedan utilizar en clínica. Uno de ellos es el que ha desarrollado la empresa Biocytex (Marsella, Francia) para determinar la eficacia del clopidogrel. En este método la medición de la VASP-P implica la permeabilización de la plaqueta seguida de la evaluación por citometría de flujo del nivel de fosforilación al medir la presencia de un anticuerpo fluorescente dirigido a la VASP-P dentro de la plaqueta. Esta medición requiere también el acceso directo a un laboratorio altamente especializado. Posteriormente a este ensayo, la empresa británica

Platelet Services (Nottingham, Inglaterra) ha desarrollado otro enfoque para medir el grado de fosforilación de VASP-P que utiliza el método conocido como VASPFix, que proporciona un enfoque de un solo paso y que conlleva la lisis celular para llevar a cabo dicha medición¹⁴⁶. VASPFix incluye un agente de lisis celular, microesferas de vidrio (“beads”) que unen la VASP de las plaquetas lisadas y un anticuerpo fluorescente apropiado para determinar el nivel de VASP-P en las “beads”. Otra ventaja de este método es que le confiere una gran estabilidad a la muestra, ya que la fija, lo que permite que tras añadir VASPFix a la sangre o a la PRP, el nivel de VASP-P se puede determinar directamente mediante citometría de flujo o congelar y analizar posteriormente, con una gran reproducibilidad de los resultados.

Otros métodos para evaluar la reactividad de las plaquetas.

Analizador de función plaquetaria (PFA)-100. El fundamento es someter a la sangre total a una tensión de cizallamiento elevada al pasarla a través de un tubo capilar hacia una abertura en una membrana recubierta de colágeno, que contiene ADP o epinefrina. El tiempo que tarda en ocluirse esa abertura se denomina tiempo de cierre. La sensibilidad de esta prueba se ve influida por la naturaleza del anticoagulante utilizado en la obtención de la sangre para su análisis. Aunque aún es tema de debate, parece que se recomienda la hirudina frente al citrato, ya que el citrato parece reducir el grado de inhibición de la reactividad plaquetaria, provocada por ejemplo por los antagonistas de la P2Y₁₂¹⁴⁷.

Tromboelastografía (TEG; Haemonetics Corporation, MA, EE. UU). Prueba global de trombosis que mide aspectos de la formación de coágulos en un dispositivo especialmente diseñado. De fácil acceso, se puede encontrar en la antesala de un quirófano, requiere de cierto entrenamiento para su manejo, es de utilidad para una visión global de la coagulación de los pacientes sometidos a CEC, aunque no se utiliza de forma generalizada para los estudios de reactividad plaquetaria.

Aggreguide (AggreDyne, Inc., TX, EE. UU). Nuevo procedimiento de análisis en el punto de atención basado en la tecnología de dispersión de la luz. Fácil de usar, pero un estudio publicado en pacientes sometidos a cirugía con CEC mostró escasa reproducibilidad con otras pruebas de reactividad plaquetaria¹⁴⁸.

1.5. Perspectivas futuras. Propuestas y retos para nuevas investigaciones.

Es una evidencia el hecho de que la hemólisis continúa siendo un reto para todos los profesionales que están implicados en la cirugía con circulación extracorpórea, entre la que se encuentra la cirugía de recambio valvular aórtico. A pesar de todos los esfuerzos enfocados a minimizar los efectos deletéreos que la bomba de circulación extracorpórea tiene sobre los pacientes, ésta continúa siendo responsable de múltiples mecanismos que al final desarrollan morbilidad a corto y largo plazo, como son la hipoperfusión, el fenómeno de isquemia-reperusión o la inducción de la respuesta inflamatoria. A la hemólisis, que ha sido considerada un efecto secundario de la CEC prácticamente inevitable, se la ha catalogado como relativamente inofensiva en cuanto al pronóstico postoperatorio del enfermo. Nada más lejos de la realidad, cuando se ha empezado a demostrar que la hemoglobina libre en plasma, priva de la biodisponibilidad del NO, el vasodilatador endógeno más importante. Si se produce una reducción importante del NO aparecerán deterioros de la perfusión tisular. Además, la hemoglobina libre contribuye al daño renal, una de las batallas pendientes en el postoperatorio de los pacientes sometidos a CEC.

A ello tenemos que unir la influencia que tiene el NO en la hemostasia, fundamentalmente en las plaquetas, por lo tanto, los puntos de interés sobre los que habría que incidir para optimizar el grado de hemólisis y la hemostasia en estos pacientes deberían estar enfocados a los siguientes puntos:

1.5.1. Medición de hemoglobina libre.

Clásicamente la medición de la hemólisis en la cirugía cardíaca se hace “de visu”, valorando el color de la orina. Si bien una orina hematúrica o una orina con hematuria franca nos indica que la hemólisis es importante y nos obliga a medir parámetros de hemólisis como la LDH y la haptoglobina, no es hasta ese momento que se decide realizar un estudio de hemólisis, presumiblemente porque no se ha considerado importante o necesario.

Por lo anteriormente mencionado, sabemos que la hemoglobina libre aparece en cantidades importantes en plasma cuando la haptoglobina hepática ha sido saturada por la hemoglobina libre. Sabemos que la LDH aumenta ostensiblemente cuando la hemoglobina libre aparece en plasma. Ambos parámetros (haptoglobina y LDH) son

medidos mediante bioquímica como parámetros de hemólisis en laboratorio. Quizás sea interesante disponer de una medición de hemoglobina libre, de forma rápida y sencilla. Un método que de forma bastante precisa nos aporte información rápida sobre los niveles de hemoglobina libre. Para este propósito sería interesante un dispositivo como el HEMOCUE[®], que te permite tenerlo en el quirófano y cuya finalidad es analizar una muestra sanguínea de forma rápida y sencilla. El dispositivo te permite una aproximación bastante exacta de la hemoglobina, y te ayuda a tomar decisiones tempranas, siempre con la posibilidad de contrastar con los datos de laboratorio.

Si lográramos ya en el quirófano una medición de este tipo de la hemoglobina libre, podríamos valorar de forma bastante exacta en qué momento o con qué niveles de hemoglobina libre comienza la orina a teñirse hematúrica. Además, supondría una medida indirecta pero rápida de la biodisponibilidad del NO que presumiblemente podríamos correlacionar con eventos trombóticos en el postoperatorio.

1.5.2. Medición de la S-nitrosilación de proteínas relacionadas con el proceso hemostático y de interés en la función plaquetaria.

En esta misma introducción hemos visto la importante función de la PDI en la hemostasia y en la función plaquetaria. Recordando, la PDI nitrosilada inhibe la función plaquetaria; y según Bekendam et al. (2018) en su trabajo plantean la posibilidad de que el NO bloquee la generación de trombina dependiente de las plaquetas, al menos en parte mediante la actividad plaquetaria de la PDI¹⁴⁹.

Además este mismo grupo, indicó en sus conclusiones que la PDI nitrosilada inhibe la activación plaquetaria, mediada por la agregación y la liberación de sus gránulos¹⁴⁹. De esto se desprende la sugerencia de que una de las funciones de la PDI es transferir NO a las plaquetas. La nitrosilación de la PDI resultó en una reducción significativa de la acumulación máxima de plaquetas y de la formación máxima de fibrina en un modelo experimental.

La formación del trombo requiere de la actividad de otras tiol isomerasas vasculares distintas de la PDI, que se ha demostrado que están sujetas a nitrosilación y que sus formas nitrosiladas inhiben la función plaquetaria.

Como sabemos, el NO es un importante mediador de la permeabilidad vascular. Previene la oclusión vascular al inhibir la función plaquetaria y la activación de células endoteliales.

Las tiol isomerasas vasculares son objetivos de NO en el mantenimiento de la quiescencia vascular, pero, ¿cómo interactúan el NO y las tiol isomerasas?:

La producción de NO conduce a la S-nitrosilación de las isomerasas. Como las tiol isomerasas desempeñan un papel muy importante en la formación de trombos, la inhibición de la actividad de las tiol isomerasas por el NO es antitrombótica. A eso hay que añadirle que, tras su reacción con el NO, las tiol isomerasas pueden actuar como agentes S-nitrosilados, transfiriendo el NO a las plaquetas.

Siguiendo estas mismas investigaciones, los autores demuestran que la PDI plaquetaria está regulada por la S-nitrosilación¹⁴⁹. La neutralización de la actividad de la tiol isomerasa de la superficie de las plaquetas observada tras la S-nitrosilación de la PDI por los portadores de NO⁺ bloquea la función protrombótica de las plaquetas, ya que la generación de trombina dependiente de éstas, depende a su vez de la PDI¹⁵⁰. Este hecho apoya la teoría de que el NO generado en el endotelio se transfiere a las plaquetas a través de la PDI.

Con todo lo visto, sería un interesante acercamiento poder medir la S-nitrosilación de la PDI y otras tiol isomerasas en los pacientes sometidos a CEC, en tanto en cuanto nos ayudaría a enfocar de forma indirecta diferentes variables: en primer lugar, nos hablaría sobre el estado protrombótico de la plaqueta y por supuesto nos aproximaría a conocer la biodisponibilidad del NO, hablándonos del grado de hemólisis, y cómo esta biodisponibilidad influye en la actividad plaquetaria y si esta influencia tiene repercusión o no en la hemostasia de los pacientes sometidos a la cirugía de recambio valvular aórtico. Además, como sabemos que el NO regula el tráfico de leucocitos, el conocimiento del nivel de la S-nitrosilación de las proteínas que regulan estos procesos nos podrían ayudar a explicar las leucocitosis reactivas que generan las reacciones inflamatorias de los pacientes sometidos a este tipo de cirugía. Sería de interés, y motivo de discusión e investigación valorar los niveles de S-nitrosilación de proteínas clave y la modificación de estos por si nos pudieran ayudar a entender y a amortiguar los disturbios inflamatorios y hemostáticos, cuando estos aparecen de forma exagerada, tanto en el intraoperatorio como en el postoperatorio de los pacientes sometidos a CEC.

1.5.3. Medición de los gasotransmisores para valoración indirecta de hemólisis en cirugía de recambio valvular aórtico.

Cada vez es mayor el interés que los mediadores gaseosos o gasotransmisores han despertado en la comunidad científica, por su papel, aún no aclarado del todo, en la

fisiología y fisiopatología animal. El papel del NO lleva estudiándose más de tres décadas¹⁵¹, pero en los últimos años se ha intensificado la investigación realizando importantes avances también en la farmacología del monóxido de carbono (CO) y del sulfuro de hidrógeno (H₂S).

De forma individual, los estudios sobre H₂S revelan su papel en muchas funciones biológicas, aunque los mecanismos moleculares subyacentes de sus acciones no están bien definidos. Lo que sí parece estar claro es la función del sulfuro de hidrógeno en la inflamación según se desprende del trabajo de Palinkas et al. (2014), en el que estudian las interacciones entre éste y la mieloperoxidasa (MPO) y sugieren que el consumo de H₂S como resultado del estrés oxidativo inducido por la inflamación, puede reactivar a la MPO unida al H₂S, lo que podría exacerbar el daño producido por la inflamación. Por el lado contrario, el sulfuro de hidrógeno administrado exógenamente podría restituir la inhibición de la MPO en los sitios de inflamación lo que explicaría alguno de los efectos antiinflamatorios¹⁵². Además se ha demostrado su acción en distintos ámbitos, pasando por ser señalizador en el SNC, regulador del tono del músculo liso, metabolismo y crecimiento celular, y estar implicado en procesos como cáncer, aterosclerosis y cardioprotección¹⁵³.

Por su parte, el monóxido de carbono (CO) es otra pequeña molécula de señalización endógena en el cuerpo humano, producida por la hemo-oxigenasa (HO) que al catalizar las reacciones de metabolización del grupo hemo, produce biliverdina, Fe⁺² y monóxido de carbono (CO), proceso que se conoce con precisión y detalle. Sin embargo, no se conocen tanto los efectos biológicos directos del CO generado¹⁵⁴.

Los tres gasotransmisores se interrelacionan entre sí, hasta tal punto que los estudios apuntan que niveles elevados de CO inhiben la actividad de las NOS y la generación de NO. Del mismo modo la depleción de NO tiene efectos sobre los otros gases, e igualmente la reducción del CO aumenta tanto los metabolitos del NO como la producción de H₂S; e incluso se ha puesto de manifiesto que la reducción del H₂S redujo los metabolitos del NO al aumentar la producción de CO (Figura 16).

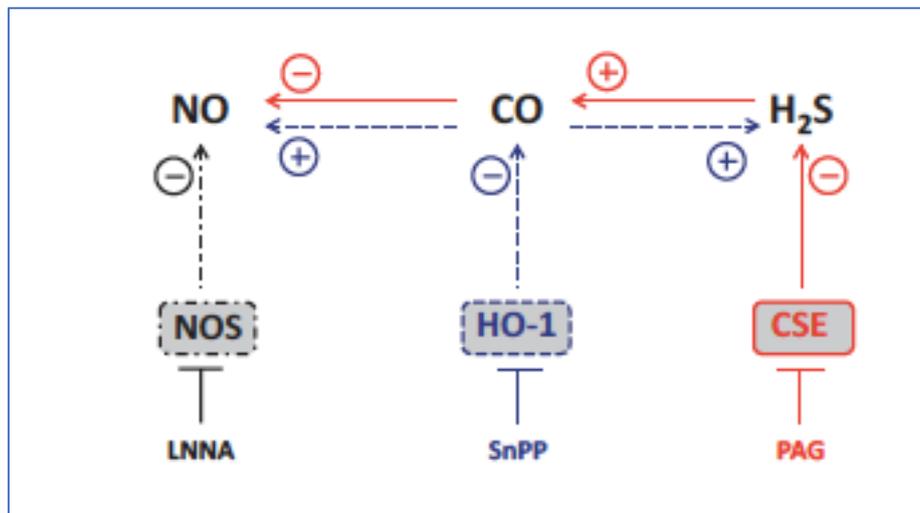


Figura 16. La interacción completa entre los gases se basa en la inhibición simple y combinada. El efecto de un inhibidor sobre el producto directo del enzima objetivo y los efectos sobre los otros gases. Donde LNNA (L-nitroarginina), SnPP (Dicloruro de protoporfirina IX), PAG (DL-proparglicina), NOS (NO sintetasa), HO-1 (hemoxigenasa 1), CSE (cistationina γ -liasa). *Wesseling S et al. (2015)*.

En conjunto, según Wesseling et al. (2015) el CO parece ser el elemento de conexión entre el NO y el H₂S, al menos a nivel renal, que fue el órgano diana de estudio en este trabajo. El mismo autor abre una línea de análisis sobre el efecto antihipertensivo que puedan tener el CO y el H₂S en animales¹⁵⁵.

Pero no sólo se circunscribe a su efecto renal esta interrelación entre los gasotransmisores, sino que también se ha observado en otras patologías como la cardiopatía isquémica. Por otra parte se ha recogido su influencia en las lesiones que aparecen en los procesos de isquemia reperusión: así en el sistema cardiovascular inducen la vasodilatación y la cardioprotección¹⁵³.

Una propuesta interesante sería profundizar en los efectos sobre la hemostasia de los gasotransmisores, y como los procesos de hemólisis pueden influir en su biodisponibilidad e interrelación entre ellos, para de tal forma extrapolarlo a los pacientes sometidos a CEC. Siguiendo esta línea de investigación, B. Olas (2015) en su trabajo relaciona los procesos de pro- y anticoagulación con la intervención de los gasomediadores, incluida la acción de las plaquetas y los procesos de coagulación y fibrinólisis¹⁵⁶.

Se ha demostrado que el CO reduce la activación de las plaquetas, mediado por la vía de la guanilato ciclasa y por otros mecanismos como la modulación de los canales de Ca^{2+} . Y no sólo puede afectar a la hemostasia a través de la inhibición de la activación de las plaquetas, sino también a través de la modulación de la coagulación y la fibrinólisis¹⁵⁶.

Por su parte, el H_2S , aunque no se conoce bien su acción en la hemostasia, si se ha evidenciado y publicado sobre sus propiedades antiplaquetarias y actividad anticoagulante¹⁵⁷. Además puede inhibir la proliferación de las células lisas vasculares¹⁵⁶.

Por lo tanto, la interacción entre los distintos gasotransmisores, tal y como se demuestra en la figura 17, y sus posibles efectos sobre la activación de las plaquetas y la trombosis supone un campo de investigación importante, y puede suponer una herramienta de apoyo más a la hora de estudiar las alteraciones en la coagulación y la influencia que la hemólisis ejerce sobre éstas en los pacientes sometidos a CEC. El posible potencial clínico que tengan los gasotransmisores deberá ser investigado más profundamente.

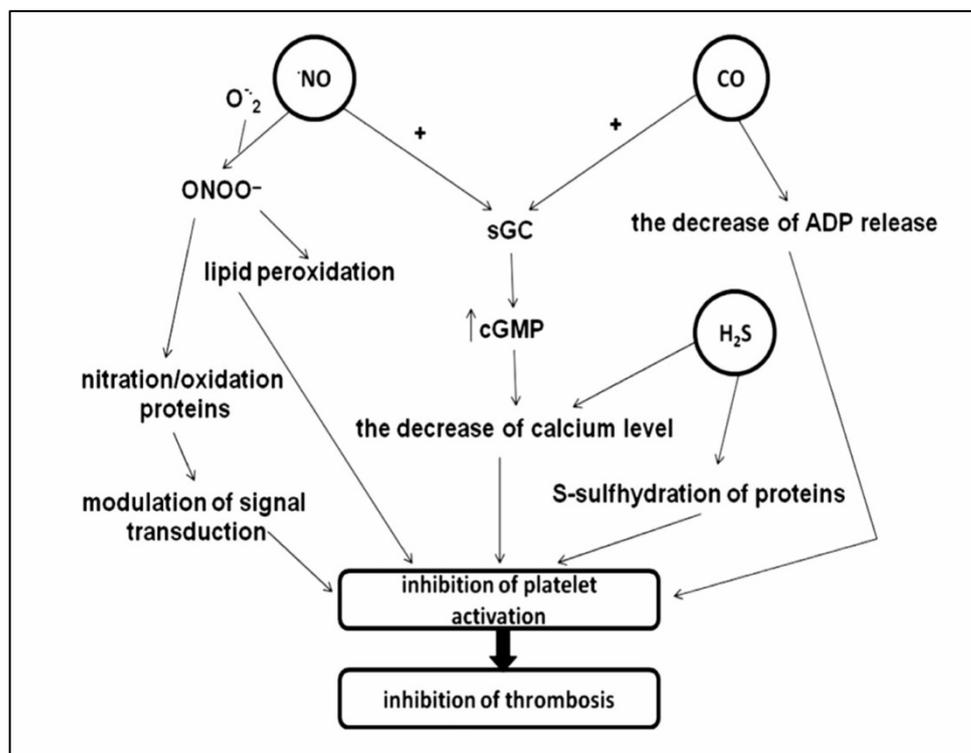


Figura 17. Modelo propuesto para la función reguladora de los gasotransmisores NO, CO y H_2S en las plaquetas. *B. Olas (2015)*.

1.5.4. Conjugados plaquetas-glóbulos blancos. Medición. Interacción trombosis-inflamación.

Debido a la gran sensibilidad que muestran las plaquetas a los factores trombóticos e inmunológicos, están preparadas para expresar respuestas inmunitarias potentes. La activación de las plaquetas y la degranulación concomitante les permiten relacionarse con los leucocitos a través de una variedad de receptores¹⁵⁸. Los receptores más importantes que participan en esta interacción son la P-selectina plaquetaria (CD62) y el ligando CD40 (CD40L), así como el CD40, PSGL-1 y Mac-1 en los leucocitos¹⁵⁹. Las interacciones plaqueta-leucocito facilitan el reclutamiento de los leucocitos al sitio de inflamación, promueven la liberación de mediadores de la inflamación por parte de los leucocitos, el estallido oxidativo, la fagocitosis, la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), y también pueden amortiguar la inflamación en algunas condiciones patológicas^{158,160}. Se han encontrado niveles elevados de agregados plaquetas-leucocitos (LPA) medidos por citometría de flujo y técnicas avanzadas de microscopía, en varias patologías tromboinflamatorias agudas, por ejemplo, artritis reumatoide o ictus. Esto convierte la medición de los LPA en un parámetro de gran interés, dado que podría ser una manera de medir la interacción entre los procesos trombóticos e inflamatorios.

Se desconoce si los niveles de LPA se ven afectados por cambios hematológicos, como la alteración en el recuento de plaquetas o el hematocrito, o si la trombocitopenia está causada por una elevada activación plaquetaria, secuestro y formación de LPA.

Los enfoques microscópicos y de citometría de flujo avanzados ya han aportado datos sobre la interacción directa de las plaquetas con los leucocitos, algo que resulta interesante para la evaluación del pronóstico a corto y medio plazo de los pacientes sometidos a CEC. Ya sabemos que la CEC comporta una reacción inflamatoria per se y dado que existen numerosas enfermedades inflamatorias que se asocian a un aumento de las LPA, la unión de las plaquetas a diferentes subtipos de leucocitos podría utilizarse como biomarcador para evaluar intraoperatoriamente a los pacientes que presentan más predisposición a desarrollar fracaso renal o pulmonar, por ejemplo. Quizás estas LPA medidas en el postoperatorio inmediato, como evolución del proceso quirúrgico, nos ayuden a enfocar tratamientos precoces para prevenir una mayor progresión del proceso inflamatorio, que pueda ensombrecer el pronóstico de estos pacientes.

La citometría de flujo es el enfoque más sencillo y rápido para determinar los PLA en sangre, y esta medición se puede convertir en la base de investigación para objetivos terapéuticos enfocados a amortiguar de forma precoz la respuesta inflamatoria. Incluso

nos ayudaría a clasificar a enfermos con predisposición a desarrollar una respuesta inflamatoria mayor en función de la densidad de biomarcadores que presenten en su análisis.

1.5.5. Medición de microvesículas plaquetarias. Implicaciones de su medida.

Como sabemos las microvesículas se pueden generar, entre otras células, a partir de la membrana de las plaquetas y conservar ciertas proteínas de la superficie de la membrana de la que se desprenden. Además, muchos estudios han puesto de manifiesto que estas microvesículas desempeñan un importantísimo papel en diversos procesos fisiopatológicos.

Las microvesículas se pueden utilizar como marcadores de la activación plaquetaria. Estas pueden proceder de la plaqueta o de los megacariocitos.

Es importante recordar que las microvesículas derivadas de plaquetas (PMV) están involucradas en importantes acciones de comunicación debido a su superficie procoagulante rica en PS, y a su capacidad para interactuar con los leucocitos y células endoteliales²⁷.

Además de estas funciones se les ha encontrado en un recuento elevado en enfermedades tipo infarto agudo de miocardio, embolismo venoso o accidente cerebro vascular, entidades éstas de aparición frecuente en el postoperatorio de pacientes sometidos a CEC. Debido a su pequeño tamaño, es necesario aplicar técnicas y conocimientos especiales para su estimación. No existe actualmente una técnica capaz de analizar por sí sola todos los parámetros relacionados con las microvesículas, por lo tanto, el reto para futuras investigaciones es la elaboración de un protocolo con recomendaciones específicas y reproducibles que ayudaran a estandarizar la estimación y caracterización de éstas.

Sin embargo, y a pesar de las limitaciones que aún existen, parece que la citometría de flujo es la técnica más utilizada para el estudio de PMV. Ha demostrado ser adecuada para fenotipar, pero no es excesivamente precisa en el análisis de la distribución del tamaño por lo que debe apoyarse en métodos como microscopia electrónica, a pesar de ser válida para el análisis de múltiples parámetros. Estos son sólo dos ejemplos de los métodos utilizados, pero uno de ellos, la cuantificación de PMV por biosensor, es especialmente esperanzador y más adecuado para nuestro entorno, ya que es una prueba rápida, rentable, sensible y fácil de usar en el punto de atención²⁷. Es necesaria más investigación para su desarrollo y aplicación generalizada en el entorno clínico.

Dada la relevancia que tienen en la cirugía con CEC los procesos patológicos de trombosis e inflamación y la nada despreciable incidencia de infarto agudo de miocardio, accidentes cerebrovasculares y episodios tromboembólicos en el postoperatorio, deberíamos considerar la estimación y cuantificación de las PMV como un biomarcador, como una herramienta de evaluación más del riesgo de desarrollar estos eventos y tenerla en consideración en el enfoque perioperatorio de los pacientes que se someten a recambio valvular aórtico.

1.5.6. Índice plaquetario: Plateletcrit (PCT). Importancia de la medición del número de plaquetas y el volumen plaquetario medio (MPV).

Los analizadores hematológicos modernos de uso rutinario, que miden los índices plaquetarios, utilizan técnicas de recuento de impedancia o de dispersión de luz óptica. Los índices plaquetarios son biomarcadores de la actividad plaquetaria (Figura 18). Permiten realizar amplias investigaciones clínicas centradas en los valores de diagnóstico y pronóstico en una variedad de entornos sin suponer costes añadidos. Entre estos índices plaquetarios, el índice plaquetario (PCT) y el volumen plaquetario medio (MPV) son dos parámetros plaquetarios que se determinan conjuntamente en los perfiles de hemograma automáticos; están relacionados con la morfología y la cinética de proliferación de las plaquetas¹⁶¹.

El MPV se determina en el megacariocito de la médula ósea. El volumen plaquetario se encuentra asociado a las citoquinas (trombopoyetina, interleuquina-6 e interleuquina-3) que regulan la ploidía de los megacariocitos y el número de plaquetas y dan lugar a la producción de plaquetas más grandes. Cuando la producción de plaquetas disminuye, las plaquetas jóvenes se hacen más grandes y activas, y el MPV aumenta. El aumento del MPV indica un mayor diámetro de las plaquetas, que puede utilizarse como marcador de la tasa de producción y de la activación de estas. Durante la activación, la forma de las plaquetas cambia de discos bicóncavos a esféricos, y se produce una pronunciada formación de pseudópodos que conduce al aumento del MPV durante la activación plaquetaria¹⁶¹.

Por su parte, el PCT es el volumen ocupado por las plaquetas en la sangre en forma de porcentaje y se calcula según la fórmula $PCT = \text{recuento de plaquetas} \times MPV / 10.000$ ^{162,163}. En condiciones fisiológicas, la cantidad de plaquetas en la sangre se mantiene en un estado de equilibrio por regeneración y eliminación. El rango normal de la PCT es de 0,22-0,24%. En los sujetos sanos, la masa plaquetaria está estrechamente

regulada para mantenerla constante, mientras que la MPV está inversamente relacionada con el recuento de plaquetas. Los factores genéticos y adquiridos, como la raza, la edad, el tabaquismo, el consumo de alcohol y la actividad física, modifican el recuento de plaquetas y el MPV.

La medición simultánea de los índices plaquetarios nos proporcionaría un instrumento válido para medir alteraciones inflamatorias y trastornos de coagulación y una idea de la posible etiología que ha provocado los cambios en los índices plaquetarios. La heterogeneidad del volumen de las plaquetas se produce durante su producción y aumenta comparativamente el MPV, lo que sugiere que la médula ósea produce plaquetas y las libera rápidamente en la circulación. Una reducción simultánea del recuento de plaquetas y de la PCT indica que las plaquetas se han consumido en exceso. Numerosos grupos de investigación han encontrado una relación entre los cambios en los índices plaquetarios y la activación del sistema de coagulación, la infección grave, el traumatismo, el síndrome de reacción inflamatoria sistémica y las enfermedades trombóticas¹⁶⁴. Se ha demostrado que los índices plaquetarios tienen valor diagnóstico en ciertas enfermedades inflamatorias, como las enfermedades inflamatorias del intestino, la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, la colitis ulcerosa y la aterosclerosis¹⁶¹.

Parameter	Description	Unit
Mean platelet volume (MPV)	Analyser-calculated measure of thrombocyte volume	femtoliters (fL)
Platelet volume distribution width (PDW)	Indicator of volume variability in platelets size	percentage (%)
Plateletcrit (PCT)	Volume occupied by platelets in the blood	percentage (%)
Mean platelet component (MPC)	Measure of mean refractive index of the platelets	gram/decililitre (g/dL)
Mean platelet mass (MPM)	MPM is calculated from the platelet dry mass histogram	picogram (pg)
Platelet component distribution width (PCDW)	Measure of the variation in platelet shape	gram/decililitre (g/dL)
Platelet larger cell ratio (P-LCR)	Indicator of larger (> 12 fL) circulating platelets	percentage (%)
Immature platelet fraction (IPF)	Percentage of immature platelets	percentage (%)

Figura 18. Índices plaquetarios. *Ustundag Budak Y. et al. (2016)*

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.

Estudiar la influencia de la hemólisis en la hemostasia de pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular.

2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

2.2.1. Valorar los efectos de la cirugía de recambio valvular sobre los parámetros básicos del hemograma y de la bioquímica general.

2.2.2. Investigar los efectos de la cirugía de recambio valvular sobre los parámetros bioquímicos indicadores de hemólisis.

2.2.3. Estudiar los efectos de la cirugía de recambio valvular sobre los valores básicos de coagulación y tiempo de coagulación activado.

2.2.4. Medir la generación, firmeza y descomposición/rotura del coágulo sanguíneo durante la cirugía de recambio valvular.

2.2.5. Dilucidar los efectos de la hemólisis sobre la función plaquetaria en los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño general del estudio realizado.

Para desarrollar el proyecto, realizamos un estudio prospectivo, longitudinal y de cohortes observacional, que transcurrió durante el periodo comprendido entre noviembre de 2016 a diciembre de 2018 en nuestro hospital, el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

Antes del inicio del estudio, el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica con fecha de 25 de Julio de 2016. Desde el principio, se han cumplido los estándares de Buenas Prácticas Clínicas en Investigación y el proyecto se ha atendido a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983. Los pacientes que forman parte del estudio fueron informados verbalmente sobre el estudio al que iban a ser sometidos, y cuales eran los objetivos por los cuáles se realizaba. A los pacientes se les dejaba absolutamente claro que la metodología del estudio no interfería en la práctica clínica habitual, y que el estudio en sí estaba enfocado a mejorar los resultados de la cirugía a la que iban a ser sometidos.

Tras la información verbal, y resueltas todas las dudas que podía generar nuestra información en los pacientes, estos firmaban el documento de consentimiento informado, accediendo con su firma a formar parte del estudio.

Del mismo modo se garantizó el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, para proteger el derecho a la intimidad de los pacientes; el Real Decreto 1720/2007, del 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, del 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información, documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

Aplicamos la Ley de Investigación Biomédica de 3 de Julio de 2007: La donación y la utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, cualquiera que sea su origen específico, sin que en ningún caso las compensaciones que se prevén en la ley tengan un carácter lucrativo o comercial. La donación implica, así mismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los

resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas.

Por lo tanto, los datos obtenidos de las muestras de sangre en esta investigación y de la historia clínica son totalmente confidenciales, y fueron utilizados exclusivamente para el estudio. Dichos datos solo fueron manejados por los investigadores implicados en este estudio.

Así, los voluntarios que forman parte de la población a estudiar son pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico con CEC, a los cuales se les extrae una muestra de sangre periférica con la finalidad de analizar la influencia de la hemólisis en la hemostasia de éstos.

Los criterios de inclusión de nuestros pacientes son los siguientes:

- Cirugía cardíaca programada para sustitución valvular aórtica con CEC.
- Pacientes con edad igual o superior a 18 años.
- Pacientes cuyo tratamiento excluya los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los antiagregantes plaquetarios durante los 15 días previos a la cirugía.

Los motivos de exclusión del estudio son:

- Negativa del paciente a formar parte del estudio.
- Cirugías complejas que incluyan: Doble recambio valvular, recambio valvular y bypass aorto-coronario.
- Cirugía sobre pacientes con cardiopatías congénitas.
- Pacientes con enfermedades hematológicas: Hemofilia, Trombocitopenias, Crioglobulinemias, ...

El muestreo fue consecutivo y no probabilístico, donde se recogieron un total de 33 pacientes que cumplían los requisitos pautados.

El protocolo perioperatorio habitual de cirugía cardíaca de nuestro hospital no se alteró en ningún momento para los pacientes que formaban parte del estudio. Por lo tanto, se realizó el cebado autólogo de la máquina de CEC según este protocolo, para minimizar la hemodilución que se produce cuando el paciente es conectado a la circulación extracorpórea. El objetivo del cebado autólogo es sustituir los cristaloides con los que se purga la máquina de CEC con sangre del paciente, para optimizar el hematocrito de entrada a la circulación extracorpórea.

Dentro de los dos sistemas de asistencia cardiotorácica con circulación extracorpórea, bomba de rodillo y bomba centrífuga, en nuestro hospital utilizamos la máquina

centrífuga, con menor impacto en la hemólisis y alteración de la hemostasia de los pacientes.

Dentro del protocolo de anestesia, y encaminado también a minimizar alteraciones de la hemostasia, utilizamos como fármaco antifibrinolítico el ácido tranexámico, con una dosis de carga previo a la inducción anestésica y seguida de una perfusión continua, que se mantiene durante toda la cirugía.

Continuando con la tendencia de minimización de riesgo de alteraciones hemostáticas, el protocolo incluye la realización de la cirugía en normotermia y la restricción hídrica en cuanto a la reposición de volemia, pero siempre siguiendo una terapia guiada por objetivos, fundamentalmente mantenimiento de diuresis mayor de 0,5 ml/Kg/hora.

3.2. Protocolo Experimental.

Metodología para la obtención de la muestra:

Una vez obtenido el consentimiento informado del paciente y ya en la sala de operaciones, se procede a la extracción sanguínea, según el protocolo de quirófano. Se informa al personal de quirófano de la necesidad de extremar el cuidado con las muestras con la finalidad de no dañar los elementos sanguíneos, ni iniciar, por mala manipulación, el proceso de activación plaquetaria.

Número y momento de la recogida de muestra (M):

M1: Muestra basal. Previo a la inducción anestésica, una vez canalizada la arteria radial ya en el quirófano, se extrae sangre de arteria radial para tubos de hemograma, bioquímica, coagulación, TCA e hirudina.

M2: Segunda muestra. El paciente ya está conectado a la máquina de CEC y por lo tanto heparinizado. Se extrae la muestra aproximadamente 5 minutos antes del despinzamiento aórtico. Sangre de arteria radial para tubos de hemograma, bioquímica, coagulación e hirudina.

M3: Tercera y última muestra. Paciente destetado de CEC y heparina revertida con sulfato de protamina. A los 10 minutos de concluir la infusión de protamina. Sangre de arteria radial para tubos de hemograma, bioquímica, coagulación, TCA e hirudina.

Como hemos visto, cada toma de muestras se compone de diferentes tubos:

- TUBO DE HEMOGRAMA: Tubo con EDTA para recuento de plaquetas y hemoglobina, con el dispositivo SYSMEX XN-20[®]. Son necesarios 3 mL de sangre para esta muestra.
- TUBO DE BIOQUÍMICA: Tubo con SS II Advanced (gel separador). Estudio de marcadores de hemólisis (LDH y Haptoglobina), bilirrubina total y lactato. Son necesarios 3 mL de sangre para esta muestra.
- TUBO DE COAGULACIÓN 1: Tubo con citrato al 10%. Estudio básico de coagulación donde medimos tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y fibrinógeno. Para el estudio de agregación (20 μ L de agonista [TRAP 10 μ M, concentración final] + 480 μ L de sangre) y la activación plaquetaria (P-selectina), para el calcio citosólico mediante citometría de flujo con el sistema FACSCanto[™] (BD Biosciences) y uso de anticuerpos monoclonales (BD Biosciences). Los datos de citometría se procesaron con el programa Kaluza[®] (Beckman Coulter). Son necesarios 3 mL de sangre para esta muestra.
- TUBO DE COAGULACIÓN 2: Tubo con citrato al 10%. Muestra para análisis de la hemostasia global del paciente por tromboelastometría con sistema ROTEM Delta[®] (ROTEM, Tem International GmbH, Munich, Germany). Son necesarios 2 mL de sangre para esta prueba.
- TUBO DE HIRUDINA: Estudio sobre las plaquetas por impedancia con el Multiplate Analyzer Roche[®]. Para su realización es necesario 20 μ L de agonistas (TRAP, RISTO, COL, ADP, EPI) en 300 μ L de sangre. Son necesarios 3 mL de sangre para este estudio.
- TCA: Tiempo de coagulación activado con una muestra de 0,5 mL de sangre.

Las muestras fueron tomadas por el cualificado personal del quirófano de cirugía cardíaca, atendiendo a las precauciones habituales para evitar estropear la sangre recogida, que fue un total de 14 mL por cada muestra.

Para los estudios Multiplate[®] y citometría de flujo mantenemos la sangre en reposo durante 15 minutos para estabilizar la muestra.

Para el estudio es muy importante tener en cuenta que el análisis de la función plaquetaria debe hacerse antes de transcurridas tres horas de la extracción de la muestra.



Figura 19. Tubos de hemograma, coagulación, bioquímica e hirudina.



Figura 20. Material para canalización de arteria radial.



Figura 21. Extracción de muestra.

3.3. Parámetros evaluados.

3.3.1. Variables clínicas.

Para nuestro estudio analizamos lo siguiente:

- Variables demográficas:
 - Sexo
 - Edad
- Variables antropométricas:
 - Peso (Kg)
 - Altura (metros)
 - Superficie corporal (metros cuadrados, m²)
- Antecedentes personales médicos y factores de riesgo cardiovascular:
 - Fumador/a
 - Diabetes mellitus
 - Arritmia tipo fibrilación auricular
 - Hipertensión arterial
 - Patología vascular periférica (claudicación intermitente, isquemia arterial...)
 - Accidente cerebro vascular previo (isquémico y/o hemorrágico)
 - Disfunción del ventrículo izquierdo con fracción de eyección < 40%
 - Insuficiencia renal crónica
 - Escalas de riesgo quirúrgico: EuroSCORE II y EuroSCORE Logístico (evaluación del riesgo de mortalidad a los 30 días)

	BAJO RIESGO	RIESGO INTERMEDIO	ALTO RIESGO
EuroSCORE I	<10%	10-20%	>20%
EuroSCORE II	<4%	4-8%	>8%

Tabla 1. EuroSCORE.

- Variables perioperatorias:
 - Tiempo de CEC y de pinzamiento aórtico.
 - Niveles de hemoglobina basal y al alta (g/dL).
 - Transfusión de hemoderivados y factores de coagulación en forma de unidades de concentrado de hematíes, unidades de plasma fresco congelado, unidades de plaquetas (5 unidades equivalen a 1 pool) y gramos de fibrinógeno.
 - Volumen de sangre reinfundida tras ser recuperada en el *cell-saver*.
 - Shock cardiogénico tras destete de CEC.
 - Niveles de creatinina basal y tras el alta del paciente.
 - Cantidad de sangre acumulada durante las primeras 24 horas en los drenajes (mL).
 - Horas de ventilación mecánica tras llegada a UCI.
 - Reintervención quirúrgica.
 - Aparición de arritmias postoperatorias.
 - Accidentes cerebrovasculares (ACVs).
 - Éxito.

3.3.2. Hemograma.

Con el hemograma vamos a medir hematocrito en tanto por ciento, niveles de hemoglobina y recuento en número de plaquetas.

Recordamos que el tubo de hemograma lleva EDTA (anticoagulante) y en él recogemos 3 mL de muestra.

La muestra es analizada en un sistema multiparamétrico que en nuestro estudio es el Sysmex XN-20[®]. El conteo de hematíes se realiza según el principio de impedancia eléctrica (utiliza la propiedad de las células de ser malas conductoras de la electricidad).

Uno de los reactivos usados en el contador es una solución isotónica, sin partículas y conductora de la electricidad. La sangre diluida en este reactivo hace que se produzca un aumento de la resistencia eléctrica; ante el paso de un elemento que corta la corriente eléctrica, se genera un pulso eléctrico medido por el software del equipo que nos permite obtener lo siguiente:

- Recuento de glóbulos rojos.
- Recuento de plaquetas.
- Recuento de glóbulos blancos y su diferenciación en subpoblaciones.

Para la lectura de la concentración de hemoglobina se emplea la espectrofotometría de absorción (medición de la energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación y las características de la sustancia absorbente).

El resto de los parámetros de los que disponemos se deducen (hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media y hematocrito).

Describimos los valores estándar que se manejan en el H.C.U.V.A. (Tabla 2):

<i>PARÁMETROS</i>	<i>VALORES NORMALES</i>
Hemoglobina (g/dL)	11,5-15,5
Hematíes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,0-5,2
Hematocrito (%)	35-45
VCM (fL)	75-95
HCM (pg/célula)	25-33
CHCM (g/dL)	31-37
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	150-350

Tabla 2. Valores de Referencia tomados de PNT Hematimetría Laboratorio Hematología. Servicio de Hematología y Hemoterapia H.C.U.V.A. Edición 6, 01-01-2017.

3.3.3. Bioquímica General.

Dentro de la bioquímica general mediremos:

- Lactato (medida indirecta de hipoperfusión periférica)
- Creatinina (función renal)

Ambos parámetros se evalúan con el dispositivo COBAS C702[®], de Roche Diagnosis.

3.3.4. Bioquímica de indicadores de hemólisis.

Como parámetros de evaluación de hemólisis medimos:

- LDH y bilirrubina: Dispositivo COBAS C702[®], de Roche Diagnostics.
- Niveles de haptoglobina: Dispositivo BNPProSpec[®] de Dade Behring, distribuido por Siemens.

3.3.5. Pruebas básicas de coagulación.

Para la evaluación de los métodos de coagulación, se utiliza la conversión de fibrinógeno en fibrina como punto final para la determinación del tiempo de coagulación.

Los analizadores detectan la conversión de fibrinógeno en fibrina y se basan en la detección óptica. La aparición de la coagulación se determina tomando como base el aumento de la turbidez.

El dispositivo utilizado para el estudio de coagulación es el ACL TOP 750CTS®.

La evaluación se realiza por fotometría o por nefelometría.

Los diferentes parámetros evaluados para el estudio básico de coagulación son los siguientes:

Tiempo de Protrombina (TP):

Método de evaluación del tiempo de coagulación de la vía extrínseca.

Para su análisis el sistema extrínseco se activa añadiendo al plasma citrado calcitromboplastina, hasta formarse un coágulo de fibrina.

Con este parámetro valoramos la actividad de los factores de coagulación II, V, VII y X. La valoración se realiza midiendo el tiempo que transcurre desde que se añade la calcitromboplastina hasta la formación del coágulo y se expresa bien en segundos, o en tanto por ciento respecto a un plasma calibrador.

Para la medición de TP se utiliza el kit *RecombiPlasTin*, cuyo reactivo es un preparado que contiene Factor Tisular Recombinante (FTR) humano, cuya alta sensibilidad lo convierte en referencia para la monitorización de la terapia anticoagulante oral. La adición del reactivo al plasma del paciente en presencia de calcio inicia la activación de la vía extrínseca. El kit muestra una sensibilidad muy elevada para detección de deficiencias de los factores de coagulación de la vía extrínseca, además su formulación hace que los niveles terapéuticos de heparina no interfieran en la medición.

Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa):

El TTPa es el método clásico de evaluación de la vía intrínseca de la coagulación. También denominado *Tiempo de Cefalina*, es el tiempo que tarda en coagular el plasma citrado descalcificado al añadirle calcio en presencia de un sustituto del fosfolípido coagulante.

Su implicación clínica radica en el diagnóstico de déficit de factores de coagulación implicados en la vía intrínseca y como seguimiento y control de la terapia con heparina no fraccionada.

El fundamento básico del TTPa es activar el paso del factor XII al XIIa. Para ello se utiliza como activador la sílica, que tiene como particularidad proporcionar una superficie de contacto que permite que el factor XIIa, la calicreína y el quinínogeno actúen.

Fibrinógeno:

Componente esencial del proceso hemostático. Su determinación es básica para detectar defectos cuanti y cualitativos.

La determinación del fibrinógeno que realizamos es la del fibrinógeno derivado, basado en el TP, y se realiza automáticamente por el coagulómetro tomando como referencia los valores de TP y fibrinógeno tomados en la curva de coagulación. Otro método utilizado es la lectura del cambio de absorbancia a 450 nm durante la formación del coágulo cuando se realiza el TP en un coagulómetro de lectura foto-óptica.

Se obtienen los valores de fibrinógeno al mismo tiempo que el TP.

Así la obtención del fibrinógeno derivado nos aporta una aproximación real de fibrinógeno, que expresaremos en mg/dL.

3.3.6. Tromboelastometría.

La tromboelastometría es un método de medida viscoelástico que nos proporciona un análisis general de la coagulación. Con él analizamos los cambios en las propiedades viscoelásticas durante la formación del coágulo y la lisis de éste (figura 22).

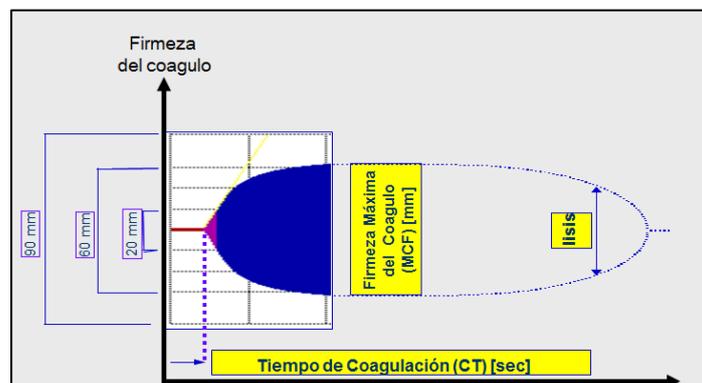


Figura 22. Tromboelastometría. Duque González. 2016.

Funcionamiento: La muestra de sangre completa se introduce en una cubeta y se activa in vitro por la vía extrínseca con factor tisular o por la vía intrínseca con ácido eláxico. Se genera un coágulo que crea una resistencia sobre un pin en función de sus propiedades viscoelásticas. Estos datos se detectan en un procesador, que proporciona una figura del trombo que llamamos EXTEM si fue activado por la vía extrínseca o INTEM si se activó la vía intrínseca.

Este método también nos permite añadir un reactivo, la citocalasina D, que inhibe la acción plaquetaria. El trombo que obtenemos lo denominamos FIBTEM y lo que nos indica es la aportación del fibrinógeno a la firmeza del coágulo y se debe asociar a las medidas del EXTEM.

Otro reactivo que podemos añadir es la heparinasa (inhibidor de la heparina). El trombo que obtendremos con este reactivo se denomina HEPTTEM.

Por último, cuando es aprotinina lo que añadimos, el trombo que obtenemos se denomina APTEM. La aprotinina inhibe la plasmina, responsable de la fibrinólisis.

Con el ROTEM delta® (figura 23) podemos analizar los siguientes parámetros:

- Tiempo de coagulación (CT): Tiempo de inicio de formación del coágulo. El tiempo que transcurre desde el principio de la muestra hasta alcanzar 2 mm del coágulo. Refleja la formación inicial del coágulo, que depende de la pequeña cantidad de trombina liberada inicialmente.
- Firmeza máxima del coágulo (MCF): Es la amplitud máxima de formación del coágulo. Representa la fuerza de la malla de fibrina que depende de la interacción de plaquetas activadas y fibrinógeno funcional.
- A 10 min. Amplitud del coágulo a los 10 minutos de inicio de la formación de este.
- Tiempo de formación del coágulo (CFT): Tiempo desde los 2mm hasta que el coágulo alcanza 20 mm. Representa la estabilización del trombo con las plaquetas y el XIIIa.
- Ángulo alfa (figura 24): Representa la velocidad de formación del coágulo sólido. Indica la calidad del fibrinógeno y las plaquetas.
- LY30: Fibrinólisis a los 30 minutos tras el CT.

El análisis de la muestra debe realizarse a la temperatura de 37° C y no se debe exceder el tiempo máximo de cuatro horas desde la extracción de la muestra.



Figura 23. ROTEM delta[®]. Cortesía TEM-Innovations-GmbH.

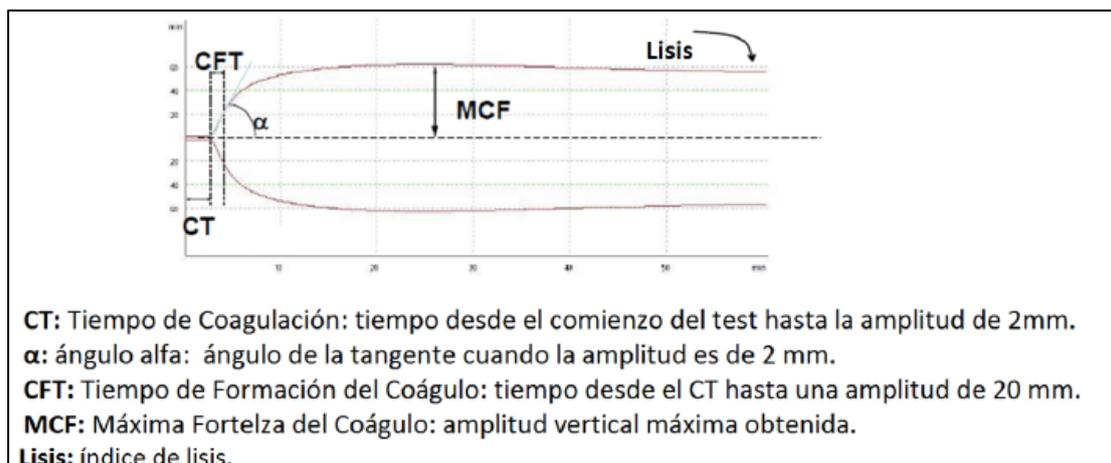


Figura 24. Esquema coagulación y fibrinólisis mediante tromboelastometría.

	CT (seg)	A10 (mm)	MCF (mm)	ML_{60 min} (%)
EXTEM	38-79	43-65	50-72	<15%
INTEM	100-240	44-66	50-72	<15%
FIBTEM		7-23	9-25	
APTEM	38-79		50-72	
HEPTEM	100-240		50-72	

Tabla 3. Valores de normalidad del ROTEM.

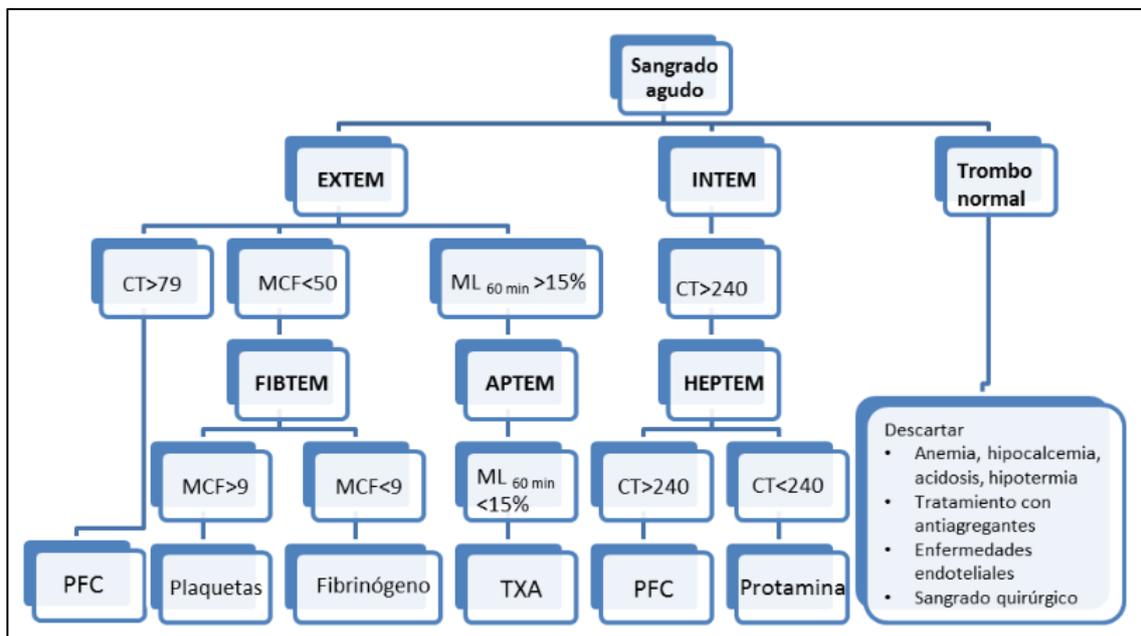


Figura 25. Algoritmo basado en los datos de tromboelastometría. Donde CT: Tiempo de coagulación. MCF: amplitud máxima del coágulo. ML: lisis máxima. PFC: plasma fresco congelado. TXA: ácido tranexámico. *Duque González. 2016.*

3.3.7. Tiempo de coagulación activado (TCA).

El TCA es la prueba mas comúnmente usada para valorar la anticoagulación en la cirugía cardíaca. Es una variante automatizada del tiempo de coagulación de Lee-White. El TCA es una prueba específica para medir la actividad/inhibición de la cascada intrínseca de la coagulación. Los recipientes tienen caolín (silicato de aluminio) o celite (tierra de diatomeas) como activador. La actividad del coágulo se detecta cuando un dispositivo mecánico deja de girar al magnetismo a 37° C. El resultado se lee en segundos, con valores basales normales entre 80 y 140. Es necesario obtener la muestra basal antes del estímulo quirúrgico para que no interactúen las tromboplastinas hísticas y otros hipercoagulantes liberados con la cirugía.

El sencillo método de análisis permite una lectura rápida y en el quirófano: 0,5 mL de sangre se aplican al recipiente conectado al dispositivo Hemochron® Jr. Signature. El analizador mezcla en un canal la sangre con los reactivos y la muestra se agita en el canal hacia delante y atrás a una velocidad preestablecida. Cuando la sangre se coagula, el movimiento dentro del canal se hace imposible, con lo que la velocidad del flujo desciende. Este descenso de velocidad es recogido por unos detectores ópticos, hasta pararse y es cuando el analizador emite un pitido avisando de que la prueba ha finalizado. El analizador muestra una cifra en segundos, que es el tiempo transcurrido entre el inicio de la prueba y la formación del coágulo.



Figura 26. TCA. Hemochron® Jr. Signature de IL. Distribuido por Werfen.

3.3.8. Función plaquetaria mediante citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica de gran potencial analítico, en la que es posible medir diversos parámetros en decenas de millares de células individuales en pocos segundos. Como sabemos, el citómetro de flujo mide propiedades de absorción y dispersión de la luz por la célula o partícula subcelular, y fluorescencia emitida por fluorocromos unidos a componentes celulares de interés, inducidas por la iluminación apropiada.

El pequeño tamaño de las plaquetas las hace detectables solo por sus características de dispersión frontal/lateral, pero en el entorno clínico, donde pueden aparecer células alteradas de otros orígenes, la inclusión de un marcador de identificación de plaquetas está más que justificada.

Utilizamos el citómetro de flujo FACSCanto® II de BD Biosciences para determinar la reactividad plaquetaria in vitro y el grado de activación plaquetaria. También mediante citometría de flujo monitorizaremos la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) en las plaquetas.

La particularidad de la citometría de flujo nos permite un estudio de función plaquetaria en sangre completa, lo que evita el proceso de centrifugación de las plaquetas. Esto ofrece una serie de ventajas, por ejemplo, la capacidad de poder medir durante cierto tiempo entre 5.000 y 10.000 plaquetas. Además, eso nos permite analizar las plaquetas interactuando con eritrocitos y leucocitos (al no ser separados de ellos), los cuales también afectan a la activación plaquetaria.

Para la extracción de la sangre las recomendaciones son utilizar una estasis mínima y una aguja grande (calibre 19-21) para asegurar un flujo sanguíneo suave y desechar la primera porción de sangre (al menos 2 mL) para evitar la activación de las plaquetas y la inclusión de material de la pared del vaso. Hay que evitar la agitación vigorosa y los cambios de temperatura para impedir la preactivación plaquetaria.

Para realizar un análisis por citometría de flujo, además del citómetro, necesitamos una serie de material, que destacamos a continuación:

- Tubos con citrato al 3,2%.
- Marcadores de citometría: CD61 PERCP, CD62P APC (MCA 796F), CD45 FITC, CD63 FITC.
- FACS flow buffer citómetro.
- Multi-Sample Agitator (MSA). Equipo que calienta y agita los tubos individualmente a una temperatura de 37°C. Los tubos (que pueden ser de

distinto tamaño) se someten a un campo magnético que te permite regular la velocidad y agitación de estos (figura 27).



Figura 27. Multi Sample Agitator. *Cortesía de David Iyú.*

3.3.8.1. Medición de la agregación plaquetaria.

La opción más común para la anticoagulación de la sangre sigue siendo el citrato de sodio (3,2 o 3,8%), pero el uso de otros anticoagulantes va en aumento, como la hirudina, la clorometilcetona D-fenilalanil-L-prolyl-arginina (PPACK), el inhibidor de la tripsina del maíz (CTI) y otras opciones que no interfieren en los niveles de calcio de la sangre. Deben evitarse los quelantes de calcio fuertes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ya que disocia el receptor de fibrinógeno GPIIb/IIIa de forma irreversible y, por tanto, impide la unión del fibrinógeno.

La agregación plaquetaria es medida tras ser estimuladas al añadirles un agonista, que en este caso es TRAP o ADP. La muestra se mezcla y se coloca en el MSA.

El tiempo de estimulación estimado es entre 4-6 minutos, tras los cuales la sangre es fijada por fijadores específicos: en este proceso, primero la sangre se mezcla con un primer fijador, el AGGFixA (proporción 1:3) dejándose en reposo entre 15-30 minutos, tras los cuales, se coge una proporción de dicha mezcla para a su vez mezclarla con un segundo fijador, el AGGFixB (proporción 1:9). Para la medida de agregación normalmente se mezclan 15 μ L de AGGFixA con 45 μ L de sangre total o PRP en el punto en el que se requiere la fijación, y posteriormente se diluyen 15 μ L de la muestra tratada con AGGFixB hasta 150 μ L.

Las muestras se almacenan a 4° C para ser analizadas por citometría.

Para cuantificar el grado de agregación plaquetaria, se mide el cambio en el número de plaquetas individuales en la muestra. Esto se puede realizar porque previamente las plaquetas han sido marcadas con FITC O PerCp que se unen a proteínas plaquetarias como CD42a o CD61. El número de plaquetas se cuantifica tomando como referencia interna un número fijo de glóbulos rojos, en este caso 50.000.

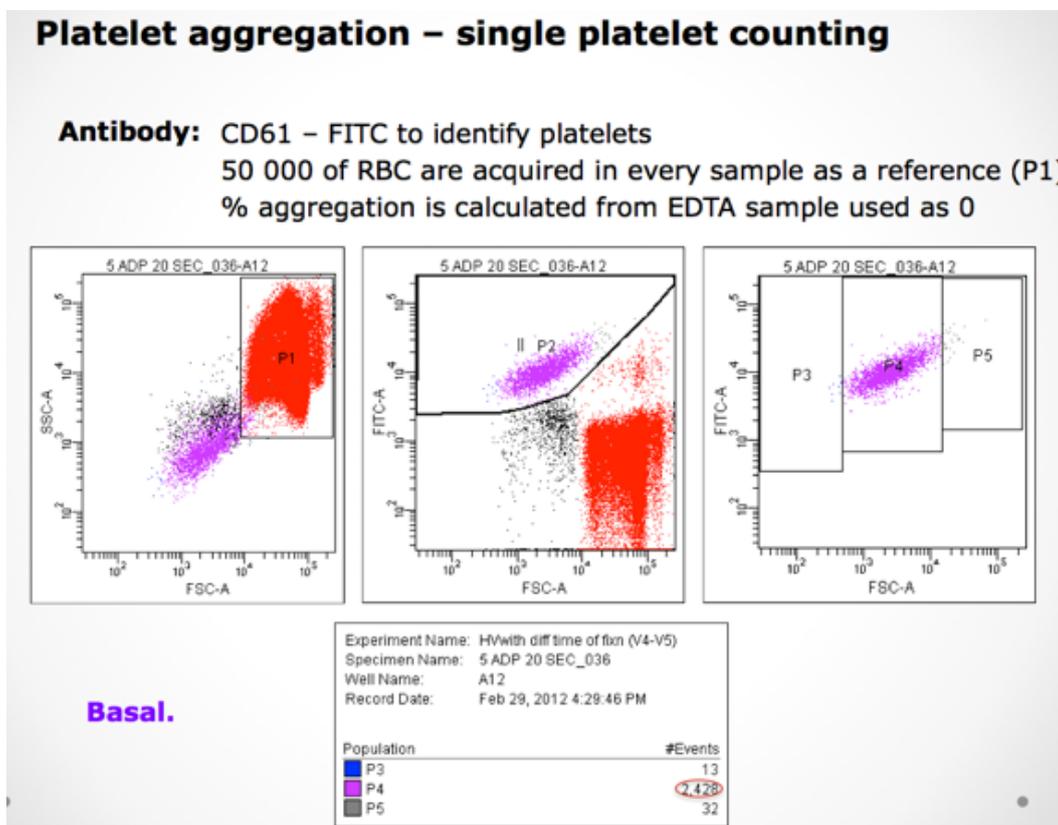


Figura 28. Agregación plaquetaria. Medición basal. Cortesía de David Iyú.

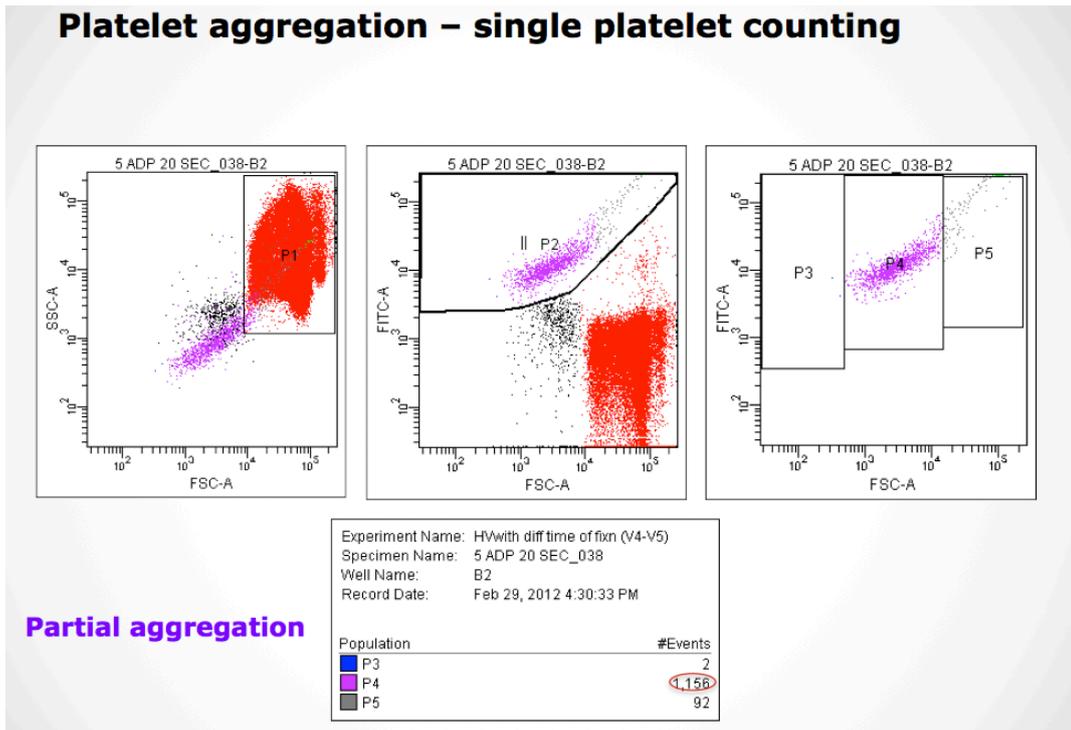


Figura 29. Agregación plaquetaria. Medida de agregación parcial. *Cortesía de David Iyú.*

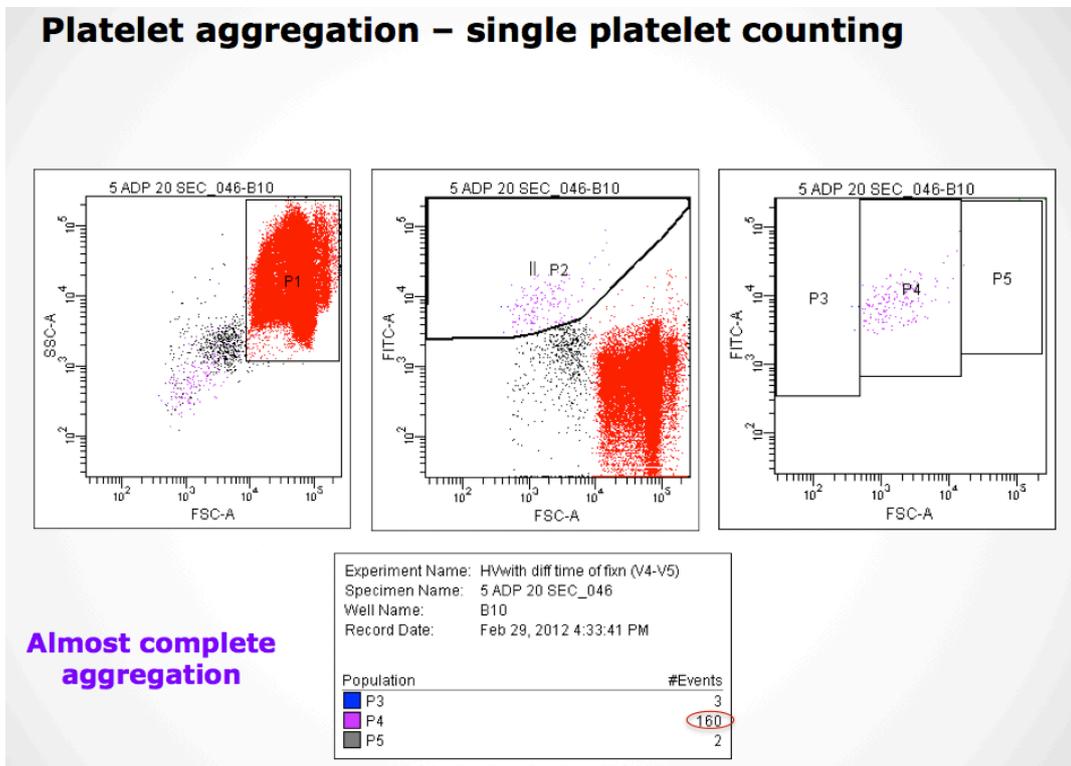


Figura 30. Agregación plaquetaria. Medida de agregación completa. *Cortesía de David Iyú.*

3.3.8.2. Medición de la activación plaquetaria. Expresión del CD62.

Cuando se activan las plaquetas, la P-selectina presente en los gránulos alfa migra hacia la superficie de la plaqueta. La cantidad presente de P-selectina en la superficie plaquetar supone una medida del grado de activación de la plaqueta. No obstante, la expresión de la P-selectina en la superficie puede ser transitoria, y si no se fija, puede escindirse o migrar de nuevo al interior.

El PAMFix fue desarrollado para la medición de la P-selectina, cuya intención era fijarla en las plaquetas activadas para poder analizar las muestras entre uno y nueve días posteriores a la fijación. Este procedimiento permite procesar y fijar las muestras de sangre a distancia y enviarlas a un laboratorio central donde se cuantifica la P-selectina mediante tinción de inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo.

En cuanto al procedimiento, es preciso saber que cuando se añade PAMFix a la sangre total o al PRP, la proporción debe ser 2:1. En este caso las muestras pueden almacenarse bien a temperatura ambiente o bien en nevera, antes de la citometría de flujo.

Antes del análisis, las muestras son marcadas con un anticuerpo con fluoresceína contra la P-selectina.

Con el PAMFix se mide la expresión de P-selectina en las plaquetas usando CD62P-FITC de Serotec. Asimismo, puede utilizarse un anticuerpo adicional marcado con un fluorocromo diferente contra otra proteína específica de las plaquetas cuando se considere necesario identificar las plaquetas por separado de otras células sanguíneas. Cuantificamos la expresión de la P-selectina como el % de plaquetas que son selectivas para P-selectina o bien cómo la fluorescencia media de toda la población de plaquetas.

Como alternativa a la P-selectina como marcador de activación plaquetaria, se puede medir la expresión de CD63. CD63 es una medida de secreción de los cuerpos densos de las plaquetas, a diferencia de la P-selectina que surge de los gránulos alfa. Esta medida del CD63 también nos la proporcionaría el PAMFix, aunque con lo que más experiencia existe es con la medición de la expresión de la P-selectina.

Para la medida en sí, el reactivo PAMFix debe utilizarse sin diluir con una proporción 2:1 con la suspensión de células que se van a fijar. Generalmente se añade 1 mL a 0,5 mL de sangre entera o PRP tras la estimulación de las plaquetas con un agonista.

En cuanto al procedimiento para la activación plaquetaria, la sangre anticoagulada puede estimularse con uno o varios agonistas plaquetarios a temperatura ambiente o

a 37° C. Si vamos a trabajar a 37° C será necesario precalentar durante al menos 10 minutos todos los tubos, muestras y reactivos. Después de mezclar la muestra con el agonista, debe dejarse sin alterar entre dos y seis minutos y luego fijarse añadiendo el PAMFix. Se aconseja realizar la estimulación plaquetaria en sangre total o PRP en presencia de EDTA para evitar la formación de agregados plaquetarios, dado que la P-selectina se mide en la superficie de las plaquetas individuales. En ausencia de EDTA, otra forma de ayudar a evitar la formación de agregados plaquetarios es la dilución de la sangre entera o PRP en al menos un 50 % (por ejemplo, con solución salina).

Las muestras fijadas pueden almacenarse a temperatura ambiente o a 4° C hasta la tinción y el análisis, y se deben analizar entre las 24 horas hasta nueve días después de la fijación.

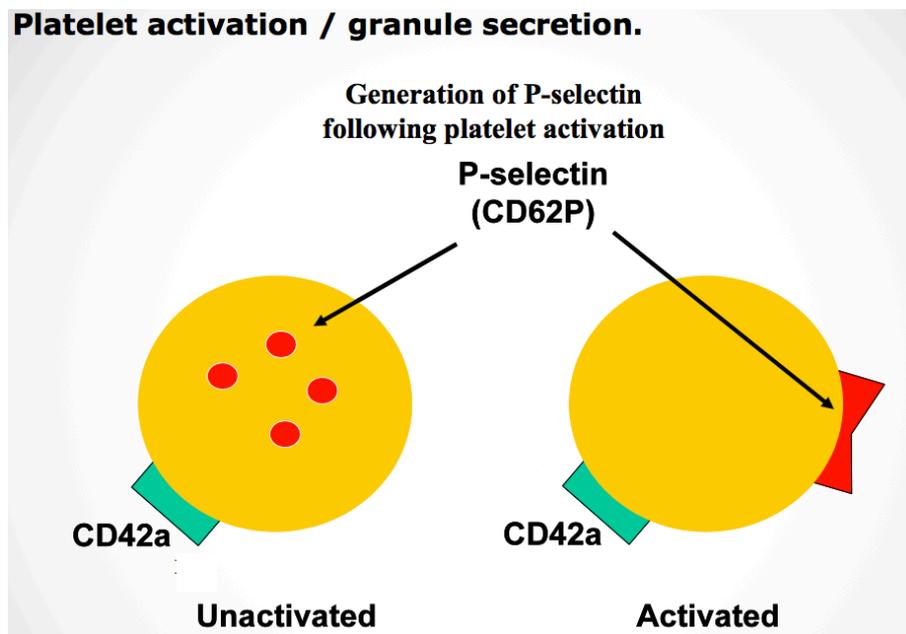


Figura 31. Expresión de la P-selectina. *Cortesía de David Iyú.*

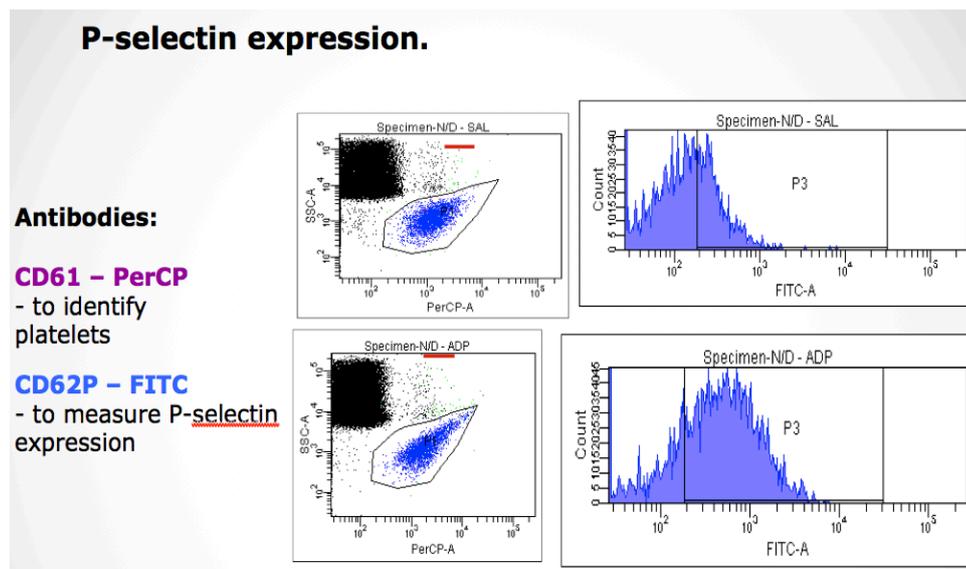


Figura 32. Citometría de la P-selectina. Cortesía de David Iyú.

3.3.8.3. Medición de los niveles de VASP-P.

Los niveles de fosforilación de la proteína VASP en plaquetas están regulados, entre otros mecanismos, por los niveles intracelulares de los segundos mensajeros AMPc y GMPc, que aumentan el grado de fosforilación de dicha proteína. En este contexto, muchos mediadores químicos locales, como prostaglandinas, adenosina o gases como el NO y el CO son conocidos por su capacidad para elevar los niveles intracelulares de AMPc y GMPc, consiguiendo con ello un aumento de los niveles de fosforilación de la proteína VASP. Este mecanismo es uno de los cuales por los que dichos mediadores pueden inhibir la función plaquetaria.

Para el análisis de la fosforilación de la VASP utilizaremos un procedimiento estandarizado, que se basa en la tecnología de los *beads* para citometría, el VASPFix, preparado para dicho análisis tanto en sangre entera como en plasma rico en plaquetas. La sangre es tratada igual que la descrita para la activación plaquetaria. Cuando las plaquetas han sido sometidas al tratamiento adecuado, en presencia del agonista utilizado, se añade la solución VASPFix en relación 5:1 con respecto a la sangre. La solución consigue que la muestra se fije y permite que las células se lisen (es necesario utilizar el vórtex para asegurar una buena lisis celular), liberándose la proteína VASP y la VASP-P (Versión más o menos fosforilada). La proteína VASP es captada por anticuerpos que están pegados a la superficie de los *beads*.

Posteriormente, otro anticuerpo marcado con una sonda fluorescente (FITC) va a reconocer y se va a unir a residuos aminoacídicos fosforilados de la proteína VASP, que está pegada a las *beads* y fosforilada ((VASP-P), pudiendo cuantificar de esa forma la cantidad de VASP-P, mediante citometría de flujo (figura 33).



Figura 33. Protocolo VASP. Universidad de Nottingham.

Además, para facilitar la detección, las propias *beads* están marcadas con el indicador fluorescente APC con lo que pueden ser muy bien diferenciadas de restos celulares, utilizando un citómetro con láser azul y láser rojo. Adicionalmente, las *beads* pueden ser también detectadas en función de su tamaño y complejidad interna. En cada muestra se analizan unas 300 *beads*.

Para el correcto análisis, la muestra debe ser incubada durante 2 horas, en oscuridad, a temperatura ambiente, antes del análisis en el citómetro de flujo. Otra posibilidad es congelar las muestras, y utilizarlas posteriormente (hasta seis meses después, sin pérdida de actividad), utilizando el mismo procedimiento comentado con anterioridad.

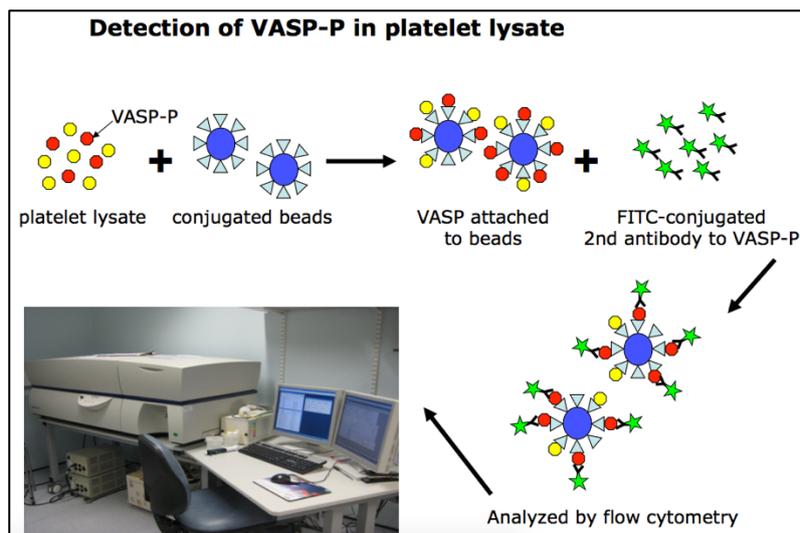


Figura 34. Monitorización fosforilación VASP. Cortesía David Iyú.

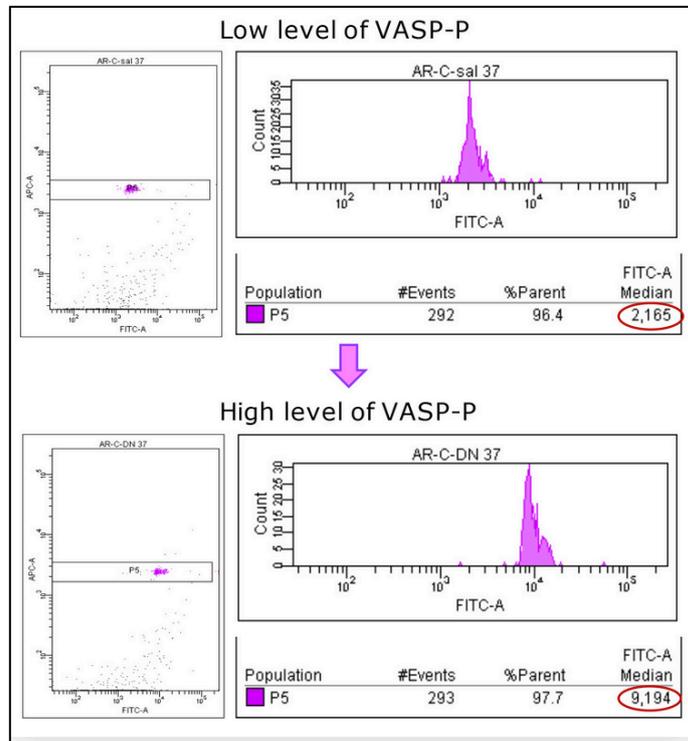


Figura 35. Niveles de fosforilación de la proteína VASP. *Cortesía de David Iyú.*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La estadística del estudio fue analizada por el servicio de estadística del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB).

Cálculo del tamaño muestral: Se aplicó un riesgo alfa de 0,05, una precisión de 4,5 % y una potencia estadística del 80 %, por lo que se precisaron 30 pacientes.

Asumiendo unas pérdidas de muestra del 10%, para considerar la muestra estadísticamente significativa se necesitarán para el estudio 33 pacientes.

Se realiza un estudio descriptivo en el que las variables numéricas se resumieron como media, desviación típica y rango, las variables cualitativas como frecuencias y porcentajes.

Para el estudio de las relaciones entre las variables continuas utilizamos un análisis de correlación, tanto para estudiar las asociaciones lineales (Pearson) como no lineales (Spearman).

Todos los resultados se considerarán significativos para un nivel $\alpha < 0.05$.

Los análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS v. 19.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Características de la población de estudio.

Forman el estudio 33 pacientes que cumplían los requisitos de inclusión y todos convinieron a él, dando su consentimiento con la firma del consentimiento informado.

Su media de edad fue de 68, 27 años, siendo mayoritariamente pacientes varones.

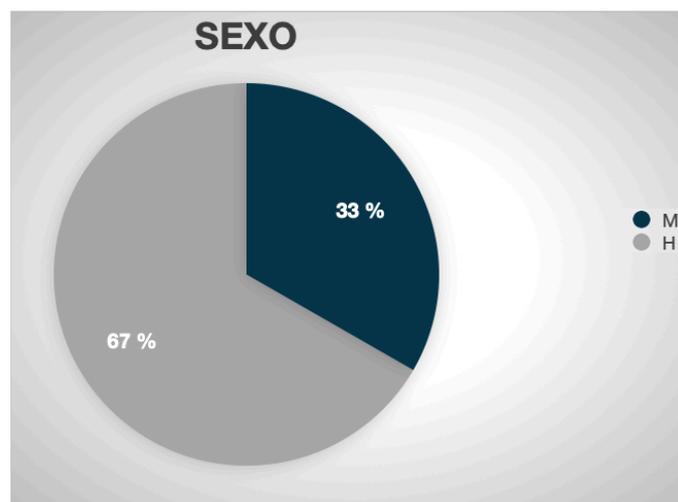


Figura 36. Porcentaje hombres/mujeres del estudio.

La media de la superficie corporal de los pacientes, calculada según la fórmula de Dubois y Dubois expresada en m^2 fue de 1,83, parámetro utilizado por los enfermeros perfusionistas para adecuar los flujos de la CEC y suministrar al paciente un adecuado gasto cardíaco.

En cuanto a la comorbilidad de los pacientes sometidos a estudio, cabe destacar que 7 de los 33 pacientes presentaron arritmia cardíaca basal (fibrilación auricular) suponiendo un 21,21% de los pacientes afectados seguido en igual porcentaje por la vasculopatía periférica y el accidente cerebrovascular (ACV), 12,12% ambos.

FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	PROPORCIÓN DE PACIENTES AFECTADOS
Hipertensión arterial	75,76%
Dislipemia	67%
Diabetes mellitus 2	30,3%
Fumador/a	27,27%

Tabla 4. Factores de riesgo cardiovascular de los pacientes a estudio. En %.

De los pacientes propuestos para estudio solo el 6,06% presentaron disfunción sistólica basal, expresada como una Fracción de Eyección (FE) < 40%.

5.2. Variables analíticas evaluadas.

5.2.1. Hemograma. Hemoderivados.

Los pacientes que se sometieron al estudio presentaron una hemoglobina basal media de 13,39 g/dL, estableciéndose un rango entre 9,4 g/dL la menor cifra y 16,6 g/dL el mayor. La hemoglobina postcirugía se cifró en una media de 10,75 g/dL.

De todos los pacientes sometidos al estudio necesitaron transfusión de concentrado de hematíes (CH) 11 de ellos (figura 37), suponiendo un 33%. La media de transfusión de concentrado de hematíes fue de $0,81 \pm 1,26$, con un rango que osciló entre 4 y 1 CH.

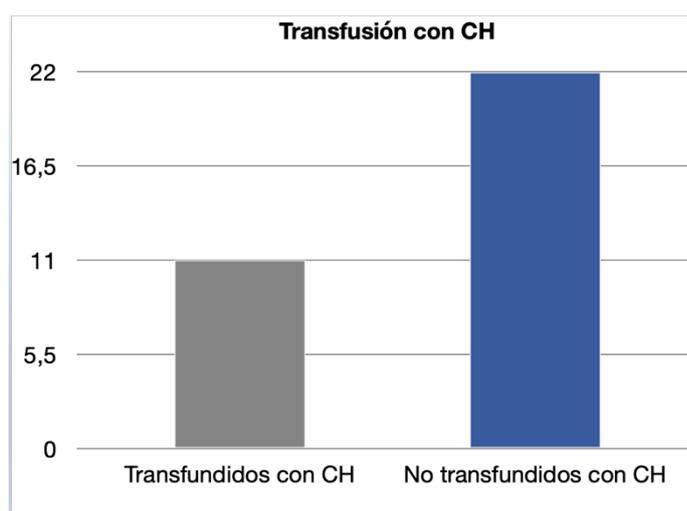


Figura 37. Pacientes transfundidos con CH.

En cuanto al resto de hemoderivados, 8 pacientes precisaron transfusión de plaquetas (figura 38).

En nuestro centro, la transfusión de plaquetas la realizamos en forma de *pool* (1 *pool* equivale a 5 unidades de plaquetas). La mayoría de los pacientes transfundidos con plaquetas necesitaron únicamente de 1 *pool* exceptuando 2 pacientes que necesitaron 2 *pools*.

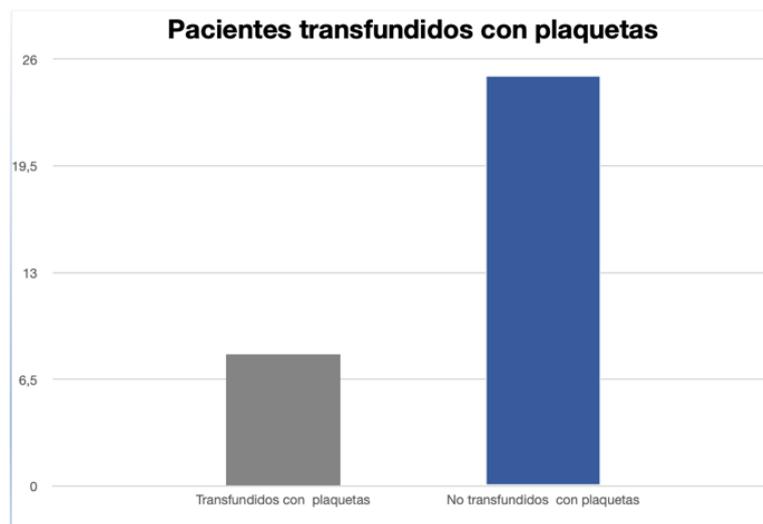


Figura 38. Pacientes con requerimiento de plaquetas.

Las necesidades de plasma fresco congelado se cifraron en una media de $0,39 \pm 0,86$ unidades. De todos los pacientes, un 18.18% requirió de PFC (figura 39).

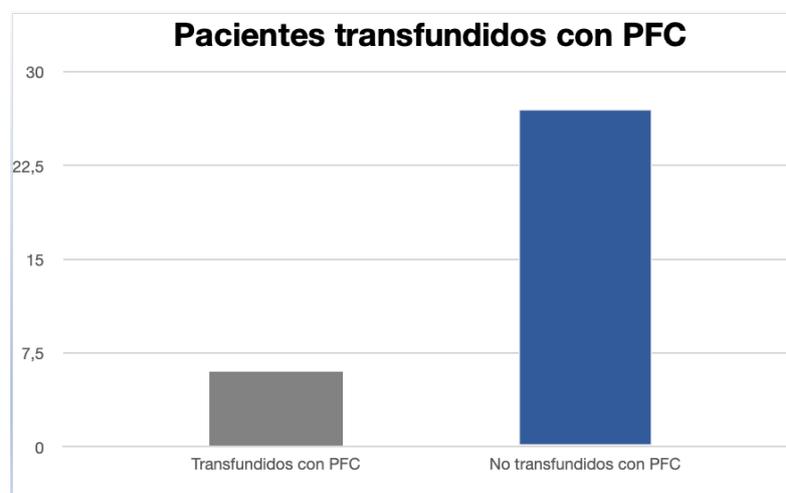


Figura 39. Pacientes con transfusión de PFC (6). No transfundidos (27).

En un alto porcentaje, hasta un 84,85%, se suplementó la hemostasia con la administración de fibrinógeno (figura 40). Como media se administraron $2,64 \pm 1,87$ gramos, llegando hasta 10 gramos de fibrinógeno en uno de los pacientes, aunque la mayoría no excedían de la administración de 3 gramos.

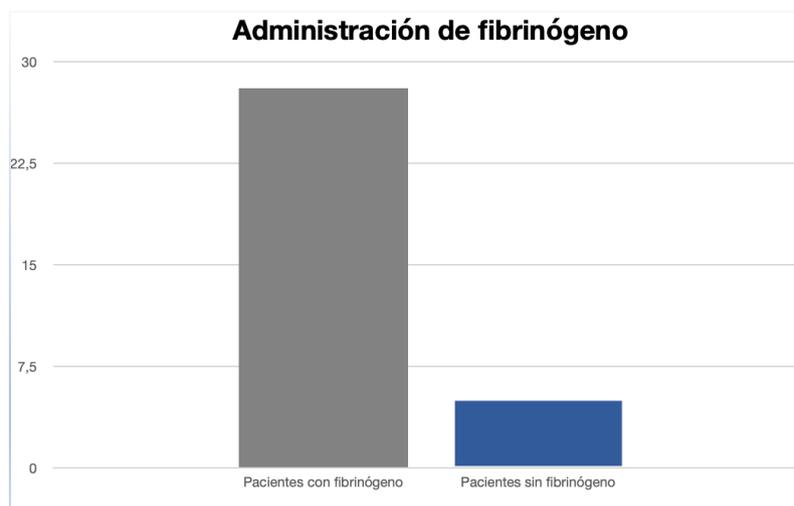


Figura 40. Pacientes tratados con fibrinógeno.

Cumpliendo el protocolo de cirugía cardíaca en nuestro hospital, todos los pacientes se beneficiaron del uso del salvacélulas, del cual se recuperaron una media de $292,30 \pm 118,18$ mL. Antes del cierre torácico y tras haber comprobado la estabilidad en cuanto a hemodinámica y sangrado, este volumen se reinfundía al enfermo para optimizar hemoglobina y replantear la necesidad de transfusión de CH.

Dentro de los tiempos quirúrgicos, destacamos como medias un tiempo de CEC de $74,27 \pm 25,73$ min, con un tiempo de pinzamiento aórtico (corazón parado) de $58,67 \pm 16,62$.

Ya fuera de quirófano, refiriéndonos los siguientes datos a la unidad de cuidados intensivos destacamos lo siguiente (tabla 5):

<i>ESTANCIA MEDIA EN UCI</i>	2,03±0,85 días
<i>DRENAJES 24 HORAS</i>	299,57±205,72 mL
<i>VENTILACIÓN MECÁNICA</i>	5,95 horas
<i>CREATININA AL ALTA</i>	0,99±0,77 (basal 0,98±0,58) mg/dL
<i>ICTUS</i>	0
<i>SHOCK CARDIOGÉNICO</i>	0
<i>ESTANCIA GLOBAL HOSTIPAL</i>	7±3,72 días

Tabla 5. Datos en cuidados intensivos y al alta.

La tasa de arritmia postoperatoria en forma de fibrilación auricular fue del 30,3%. Todos los pacientes que la desarrollaron volvieron a su ritmo sinusal (figura 41).

La mortalidad postoperatoria de nuestra muestra ascendió al 3% (figura 42). La escala de riesgo EuroSCORE II fue de 4 (3-5) y logistic EuroSCORE de 7 (5-9).

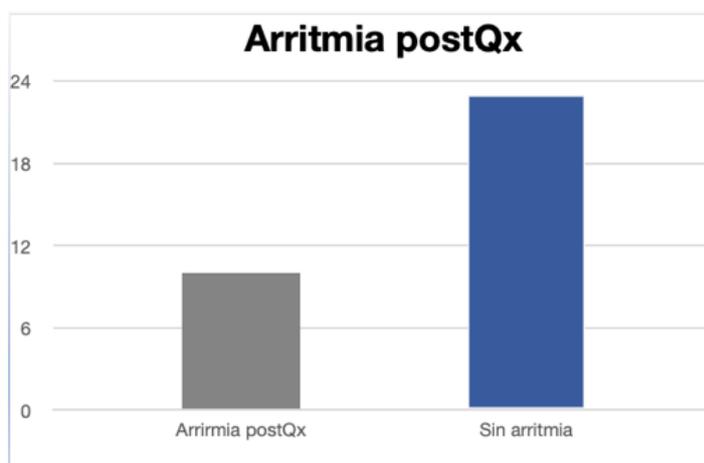


Figura 41. Fibrilación auricular postoperatoria.

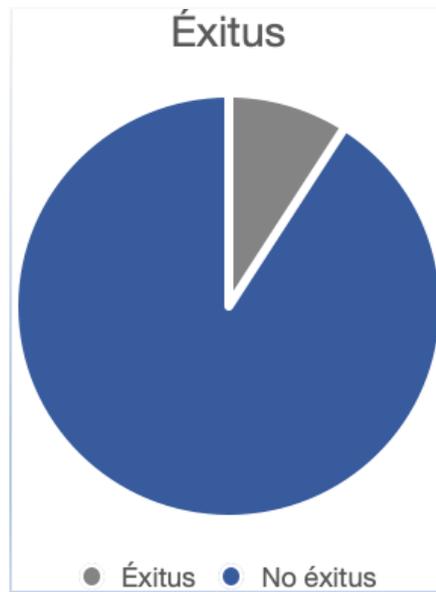


Figura 42. Éxitus tras cirugía.

Dentro del análisis de hemoderivados comparamos los niveles de hemoglobina y plaquetas recogidos en las tres muestras (figuras 43 y 44):

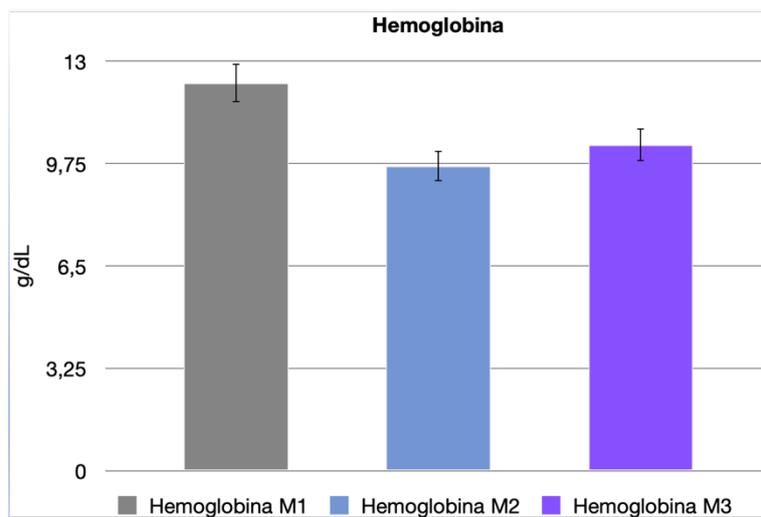


Figura 43. Niveles de hemoglobina M1-M2-M3.

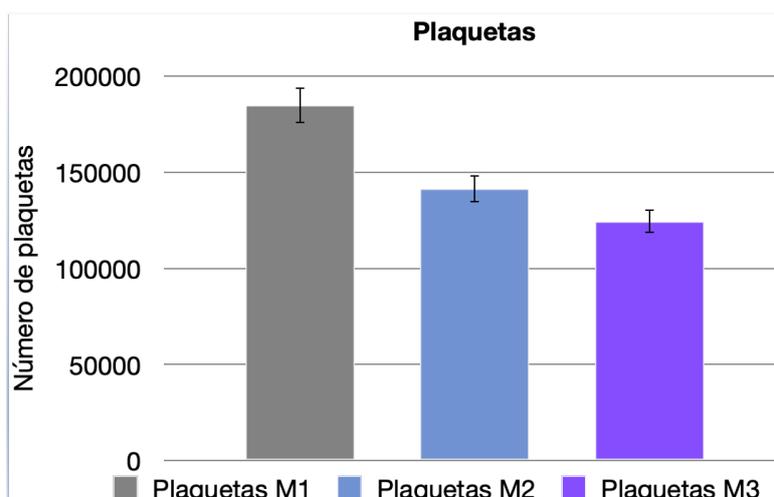


Figura 44. Número de plaquetas en las distintas muestras.

Por lo que se desprende de las gráficas existe un descenso importante en los niveles de hemoglobina en CEC y después de la circulación extracorpórea (M2 y M3 respectivamente).

Lo mismo ocurre con el número de plaquetas. Las muestras M2 y M3 cuentan con un número de plaquetas ostensiblemente menor, pero en ambos casos no se producen descensos por debajo de los niveles mínimos establecidos por nuestro laboratorio de hematología.

Estos descensos, que ambos son estadísticamente significativos, tienen su explicación en la hemodilución que se produce con el cebado de la bomba y en las pérdidas sanguíneas por el procedimiento quirúrgico en sí.

En cuanto a la recuperación del nivel de hemoglobina de M3, respecto a M2, son varias las situaciones que lo pueden justificar. Como dijimos, las técnicas de purgado retrógrado y hemofiltración posterior durante la CEC pueden minimizar y favorecer la recuperación de niveles de hemoglobina perdidos durante la hemodilución. Además, no es infrecuente que pacientes con anemia previa a la cirugía, sean transfundidos durante el periodo de CEC.

De los resultados del análisis de correlación (tablas 6, 7, 8 y 9) destacamos lo siguiente:

		Hb basal	Hb postcirugía	C. Hematíes
Hb basal	Correlación de Pearson	1	,390*	-,488**
	Sig. (bilateral)		,025	,004
	N	33	33	33
Hb postcirugía	Correlación de Pearson	,390*	1	-,096
	Sig. (bilateral)	,025		,593
	N	33	33	33
C. Hematíes	Correlación de Pearson	-,488**	-,096	1
	Sig. (bilateral)	,004	,593	
	N	33	33	33

Tabla 6. Correlación de datos clínicos, donde Hb es hemoglobina, C. hematíes es concentrado de hematíes y Sig. es significación.

El análisis de correlación de la tabla 6 nos muestra una fuerte correlación negativa entre la hemoglobina basal y la transfusión de concentrado de hematíes. Es evidente pensar y los resultados estadísticos lo avalan que, ante una hemoglobina basal menor, las necesidades de transfusión de concentrados de hematíes son mayores.

		Drenajes (ml) tras 24 h	C. Hematíes	Plasma FC
Drenajes (ml) tras 24 h	Correlación de Pearson	1	-,013	-,091
	Sig. (bilateral)		,942	,613
	N	33	33	33
C. Hematíes	Correlación de Pearson	-,013	1	,096
	Sig. (bilateral)	,942		,593
	N	33	33	33
Plasma FC	Correlación de Pearson	-,091	,096	1
	Sig. (bilateral)	,613	,593	
	N	33	33	33
Fibrinógeno	Correlación de Pearson	,130	,396*	,247
	Sig. (bilateral)	,472	,023	,167
	N	33	33	33
Plaquetas	Correlación de Pearson	-,195	,162	,313
	Sig. (bilateral)	,278	,369	,076
	N	33	33	33
Volumen salvacélulas	Correlación de Pearson	,039	-,102	,185
	Sig. (bilateral)	,828	,571	,303
	N	33	33	33

Tabla 7. Correlación datos clínicos. Abreviaturas: Sig. Significación. C. hematíes. Concentrado de hematíes.

		Fibrinógeno	Plaquetas	Volumen salvacélulas
Drenajes (ml) tras 24 h	Correlación de Pearson	,130	-,195	,039
	Sig. (bilateral)	,472	,278	,828
	N	33	33	33
C. Hematíes	Correlación de Pearson	,396*	,162	-,102
	Sig. (bilateral)	,023	,369	,571
	N	33	33	33
Plasma FC	Correlación de Pearson	,247	,313	,185
	Sig. (bilateral)	,167	,076	,303
	N	33	33	33
Fibrinógeno	Correlación de Pearson	1	,190	,212
	Sig. (bilateral)		,291	,237
	N	33	33	33
Plaquetas	Correlación de Pearson	,190	1	,439*
	Sig. (bilateral)	,291		,011
	N	33	33	33
Volumen salvacélulas	Correlación de Pearson	,212	,439*	1
	Sig. (bilateral)	,237	,011	
	N	33	33	33

Tabla 8. Correlación datos clínicos. Abreviaturas: C. hematíes: concentrado de hematíes. Sig.: significación

		Días estancia UCI	C. Hematíes	Plasma FC
Días estancia UCI	Correlación de Pearson	1	,122	-,017
	Sig. (bilateral)		,498	,926
	N	33	33	33
C. Hematíes	Correlación de Pearson	,122	1	,096
	Sig. (bilateral)	,498		,593
	N	33	33	33
Plasma FC	Correlación de Pearson	-,017	,096	1
	Sig. (bilateral)	,926	,593	
	N	33	33	33
Fibrinógeno	Correlación de Pearson	-,151	,396*	,247
	Sig. (bilateral)	,402	,023	,167
	N	33	33	33
Plaquetas	Correlación de Pearson	,359*	,162	,313
	Sig. (bilateral)	,040	,369	,076
	N	33	33	33

Tabla 9. Correlación datos clínicos. Abreviaturas: C. hematíes: concentrado de hematíes. Sig.: significación.

Las tablas 6, 7 y 8 confirman la línea de transfusión. En la tabla 7, encontramos una correlación estadísticamente significativa entre la transfusión de concentrado de hematíes, y las necesidades de fibrinógeno. Es decir, interpretamos que, a mayor sangrado, los requerimientos de concentrados de hematíes van asociados a una mayor necesidad de fibrinógeno debido a que con el citado sangrado se consume fibrinógeno. En la misma línea, la tabla 8 nos muestra una correlación significativa entre volumen de salvacélulas y necesidades de transfusión de plaquetas: el mayor volumen en el salvacélulas indica mayor volumen de sangrado, y consecuentemente mayor consumo de plaquetas, por lo que es obvio que las necesidades de transfusión de plaquetas aumenten. Continuando con la significación relacionada con las plaquetas, en la tabla 9 observamos que los pacientes a los que se les transfunde plaquetas tienen mayor tiempo de ingreso en UCI.

5.2.2. Bioquímica General.

Dentro de los datos obtenidos en la bioquímica general, destacamos las medidas de creatinina como marcador de función renal y los niveles de lactato cuyo aumento nos indicaría la presencia de hipoperfusión periférica.

En nuestro hospital, los niveles de creatinina normal son para hombres de 0,7 a 1,3 mg/dL y para mujeres de 0,6 a 1,1 mg/dL. Los niveles más bajos en mujeres se deben a que frecuentemente tienen menor masa muscular.

En nuestro estudio la creatinina basal media fue de $0,98 \pm 0,58$ mg/dL y la creatinina alta fue de $1 \pm 0,77$ mg/dL (figura 45).

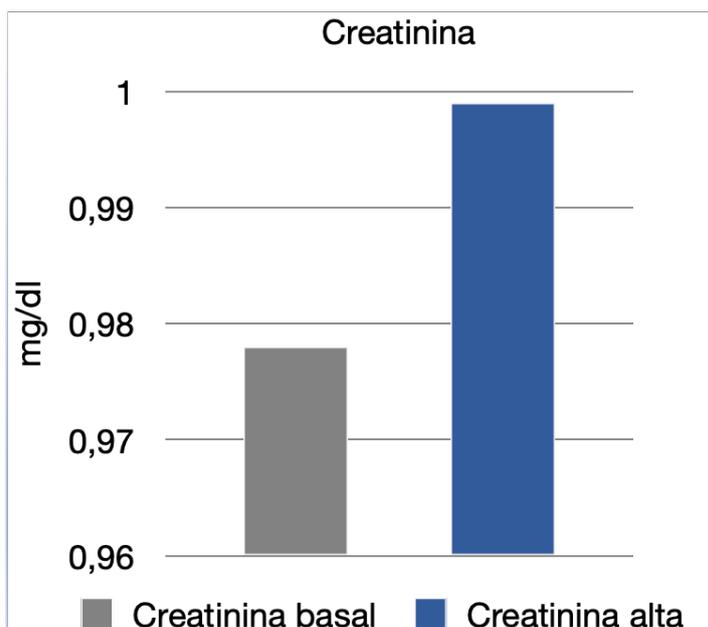


Figura 45. Cifras de creatinina basal y al alta.

Respecto a los niveles de creatinina cabe destacar varios aspectos. Hay un ligero ascenso del nivel de creatinina media al alta respecto al basal, pero manteniéndose dentro de los niveles normales, lo que indica que la función renal en los pacientes de nuestro estudio se mantuvo estable. De forma individual, los niveles oscilaron entre una creatinina de 4 y una creatinina de 0,36 mg/dL. Respecto al paciente que presentó una creatinina de 4 mg/dL, ya estaba diagnosticado de insuficiencia renal. Sus niveles en UCI alcanzaron los 5 mg/dL, y se convirtió en el único paciente que precisó de técnicas de depuración renal (hemofiltro) en UCI, suponiendo un 3,03%. Cabe destacar que este mismo paciente fue el que más horas de ventilación mecánica precisó y terminó siendo Éxitus.

Los niveles de lactato, como marcador indirecto de hipoperfusión se midieron durante la cirugía en forma de M1 (basal), M2 (CEC), M3 (tras salida de CEC) con los siguientes resultados: La media de lactato basal (M1) fue de 0,867 mmol/L, en M2 fue de 1,461 mmol/L y M3 de 1,491 mmol/L (figura 46). En nuestro hospital, los niveles de lactato normales se toman por debajo de 2 mmol/L.

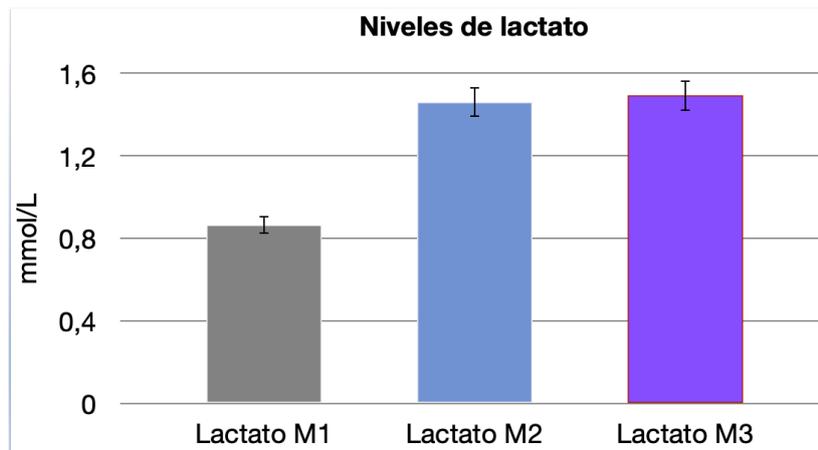


Figura 46. Evolución de los niveles de lactato.

La evolución de los niveles de lactato la reflejamos en la figura 46 con la significación estadística en la tabla 10:

	Sig. (bilateral)
Par 1 Lactato M1 - Lactato M2	,002
Par 2 Lactato M1 - Lactato M3	,001
Par 3 Lactato M2 - Lactato M3	,723

Tabla 10. Prueba de muestras relacionadas de lactato.

Las diferencias entre el lactato basal y el lactato a la entrada en CEC son estadísticamente significativas ($p=0,002$), al igual que lo son entre el lactato basal y el lactato tras la salida de CEC ($p=0,001$), lo que nos haría pensar en hipoperfusión relacionada con la CEC, pero si analizamos la figura 46 vemos que los niveles de lactato se mueven en las tres muestras dentro de los valores normales. La lectura que se desprende de estos resultados es que, durante todo el procedimiento, la perfusión de los órganos fue adecuada.

5.2.3. Bioquímica de indicadores de hemólisis.

Para estudiar la destrucción de los hematíes de la sangre, evaluamos los resultados de las mediciones fundamentalmente de la láctico deshidrogenasa (LDH), haptoglobina y bilirrubina.

Medimos la haptoglobina en 17 de nuestros pacientes, sabiendo que la hemoglobina libre generada por la hemólisis capta la haptoglobina, hasta que la reserva de haptoglobina se agota, es decir, que lo esperable, es que, como medida indirecta de hemólisis, interpretáramos que, a menor haptoglobina, mayor grado de hemólisis. Los valores normales de haptoglobina que nuestro hospital maneja oscilan en el rango entre 41 a 165 mg/dL.

En nuestro estudio, la media de M1 fue de 99,71 mg/dL, M2 64,06 mg/dL y M3 52,71 (figura 47, tabla 11).

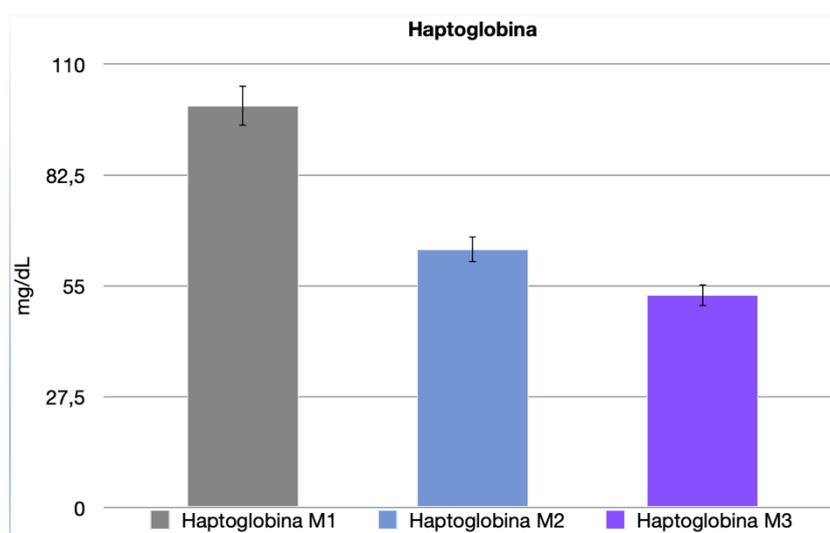


Figura 47. Niveles de haptoglobina.

En la figura se observa un descenso importante en los niveles de haptoglobina de M2 Y M3 con respecto a M1, y también de M3 a M2.

En la tabla 12, observamos que el descenso de haptoglobina entre las tres muestras es estadísticamente significativo (en las tres correlaciones relacionadas la $p=0,000$), lo que demuestra cierto grado de hemólisis, pero los niveles de haptoglobina se mantienen dentro de los límites normales.

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	Haptoglobina M1	99,71	17	55,566	13,477
	Haptoglobina M2	64,06	17	41,171	9,985
Par 2	Haptoglobina M1	99,71	17	55,566	13,477
	Haptoglobina M3	52,71	17	37,543	9,105
Par 3	Haptoglobina M2	64,06	17	41,171	9,985
	Haptoglobina M3	52,71	17	37,543	9,105

Tabla 11. Estadística de haptoglobina.

		N	Correlación	Sig.
Par 1	Haptoglobina M1 y Haptoglobina M2	17	,963	,000
	Haptoglobina M1 y Haptoglobina M3	17	,924	,000
Par 3	Haptoglobina M2 y Haptoglobina M3	17	,978	,000

Tabla 12. Correlación muestras relacionadas.

Respecto a la LDH, sus niveles normales en plasma se sitúan entre 105-333 UI/L. Esta enzima aparece en plasma en niveles elevados cuando se libera de los glóbulos rojos debido a su destrucción. Los resultados obtenidos de la evaluación de 17 pacientes demuestran que existe un aumento de los niveles de LDH en CEC y sobre todo después de la CEC (M3), respecto a los niveles basales (figura 48). En el análisis de correlación (tabla 13), vemos que tanto el aumento entre M1-M2 y M1-M3 son estadísticamente significativos ($p=0,003$ y $p=0,007$ respectivamente). A pesar de que el aumento en sangre es importante, al igual que ocurre con la haptoglobina, los valores de la LDH se mantienen en las tres muestras dentro del rango de la normalidad.

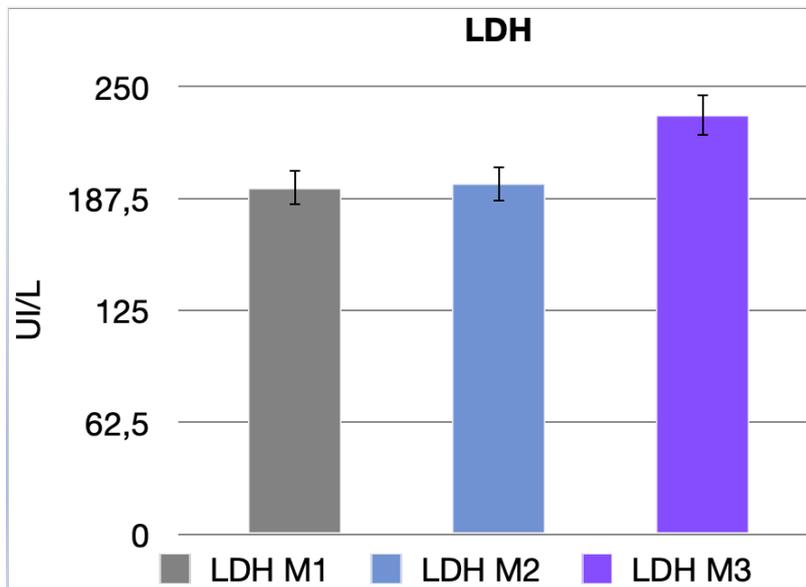


Figura 48. Niveles de LDH.

	Sig. (bilateral)
Par 1 TP M1 - TP M3	,000
Par 2 TTPA M1 - TTPA M3	,986
Par 3 Fibrinógeno derivado M1 - Fibrinógeno derivado M3	,000
Par 4 Hemoglobina M1 - Hemoglobina M3	,000
Par 5 Plaquetas M1 - Plaquetas M3	,000
Par 6 LDH M1 - LDH M2	,782
Par 7 LDH M1 - LDH M3	,003
Par 8 LDH M2 - LDH M3	,007
Par 9 Haptoglobina M1 - Haptoglobina M2	,000
Par 10 Haptoglobina M1 - Haptoglobina M3	,000
Par 11 Haptoglobina M2 - Haptoglobina M3	,000

Tabla 13. Análisis correlación LDH.

Con respecto a la bilirrubina como medida indirecta de hemólisis, partimos de unos niveles de normalidad de referencia entre 0,3 y 1,9 mg/dL. La media de M1 se situó en 0,78 mg/dL, en M2 0,68 mg/dL y M3 0,72 mg/dL (figura 49). En el análisis de correlación entre M1 y M2 la diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,019$), pero dentro de los límites normales establecidos. Además, no se detectó aumento respecto a M1 en ninguna de las dos muestras restantes. De los 17 pacientes a los que se les analizó los niveles de bilirrubina, destaca un paciente con una bilirrubina basal alterada (3,03 mg/dL) pero en cuanto a los cambios respecto a la basal, se comportó como el resto de los pacientes, es decir, no experimentó aumento de la bilirrubina ni en CEC, ni tras la CEC.

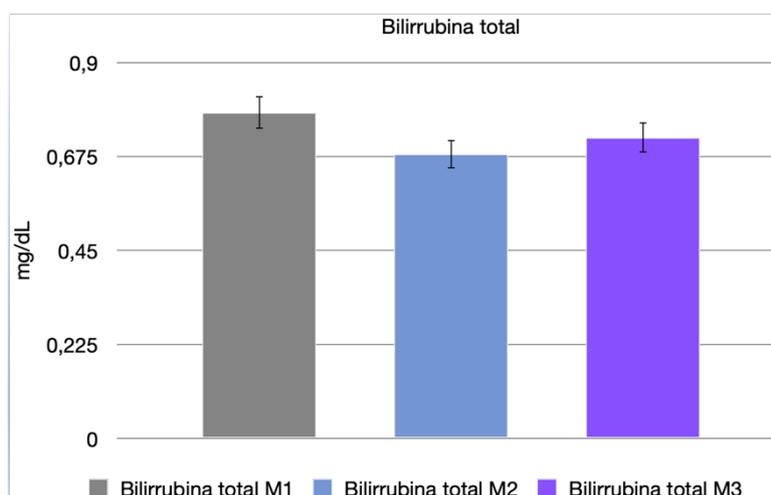


Figura 49. Niveles de bilirrubina.

5.2.4. Pruebas básicas de coagulación.

Respecto a las pruebas básicas de coagulación analizamos TP como medida clásica de la coagulación extrínseca, el TTPa como medida de la coagulación intrínseca y el fibrinógeno como componente esencial de tapón hemostático.

En este punto de los resultados cabe aclarar respecto a las muestras que no analizamos M2. Debido a que para poder iniciar la CEC es necesario la anticoagulación completa del paciente y mantenerlo anticoagulado mientras dure la CEC, durante ese periodo y hasta que no se revirtieron los efectos de la heparina con sulfato de protamina, no se realizaron pruebas básicas de coagulación.

Las figuras 50, 51 y las tablas 14 y 15 muestran los datos mas significativos del análisis básico de coagulación, que describimos más adelante.

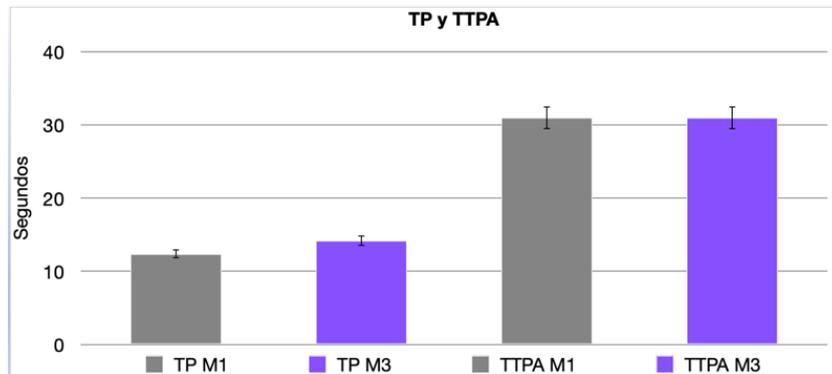


Figura 50. Valores basales y tras CEC. TP y TTPa.

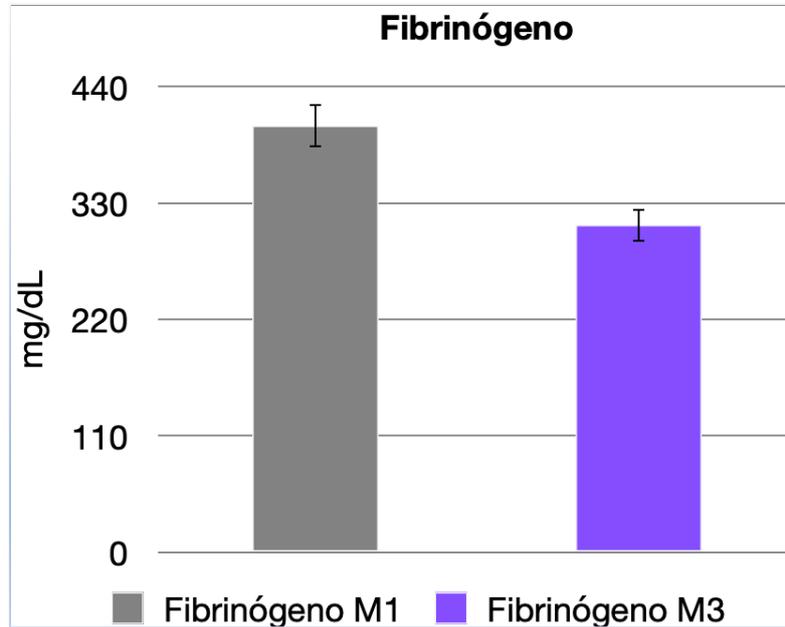


Figura 51. Evolución niveles de fibrinógeno.

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	TP M1	12,376	33	1,3551	,2359
	TP M3	14,164	33	2,4030	,4183
Par 2	TTPA M1	30,982	33	2,6306	,4579
	TTPA M3	31,000	33	5,2950	,9217
Par 3	Fibrinógeno derivado M1	403,27	33	79,139	13,776
	Fibrinógeno derivado M3	309,00	33	71,966	12,528

Tabla 14. Valores estadísticos TP, TTPA y Fibrinógeno.

		N	Correlación	Sig.
Par 1	TP M1 y TP M3	33	,638	,000
Par 2	TTPA M1 y TTPA M3	33	-,011	,953
Par 3	Fibrinógeno derivado M1 y Fibrinógeno derivado M3	33	,867	,000

Tabla 15. Correlaciones de las muestras.

Según nuestro laboratorio tomamos como valores normales de TP los comprendidos entre 11 y 13,5 segundos y los de TTPA entre 25 y 35 segundos. Los valores normales de fibrinógeno se encuentran entre 200 y 450 mg/dL.

Tras la CEC existe un aumento del tiempo de protrombina, y un descenso de los niveles de fibrinógeno significativamente estadísticos (ambos $p=0,000$). Cabría esperar que la bomba de circulación extracorpórea tenga efectos deletéreos en la coagulación de los pacientes, de ahí el aumento del TP y descenso de los niveles de fibrinógeno, pero como vemos en las tablas los valores se mantienen dentro de los niveles normales establecidos por nuestro laboratorio.

Es cierto que un descenso de media de 100 mg/dL en los niveles de fibrinógeno, nos empuja a reponer casi de forma protocolaria los niveles de fibrinógeno y llevarlos a los niveles basales de cada enfermo, aunque a pesar de la caída, los niveles no desciendan por debajo de los valores normales.

5.2.5. Tromboelastometría.

Previo a la interpretación de los resultados de la tromboelastometría, hay que recordar que en la muestra M2, correspondiente al tiempo durante la circulación extracorpórea, no es posible medir los parámetros derivados del INTEM, EXTEM y FIBTEM, debido a que durante ese tiempo el paciente se encuentra completamente anticoagulado.

Comenzando por el INTEM (tabla 16 y 17, figura 45) encontramos diferencias significativas tanto en la amplitud del trombo a los 10 minutos (A10) como en la máxima fuerza del coágulo (MFC), entre las muestras analizadas, aunque cabe destacar que tanto en M1 como en M3 los valores se encuentran dentro de los estándares de normalidad.

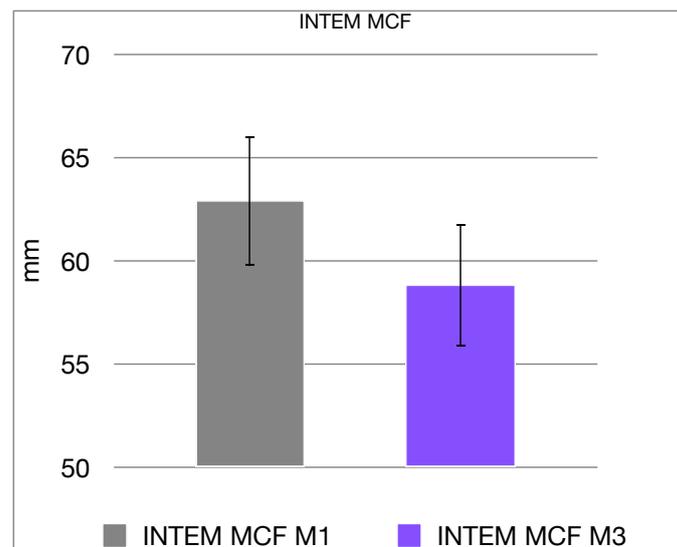


Figura 45. MFC en M1 y M3.

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	INTEM CT M1	173,06	33	20,834	3,627
	INTEM CT M3	174,06	33	18,985	3,305
Par 2	INTEM CFT M1	75,55	33	42,178	7,342
	INTEM CFT M3	91,06	33	40,998	7,137
Par 3	INTEM α M1	74,85	33	9,007	1,568
	INTEM α M3	73,09	33	6,802	1,184
Par 4	INTEM A10 M1	57,91	33	8,582	1,494
	INTEM A10 M3	51,33	33	7,582	1,320
Par 5	INTEM MCF M1	62,88	33	7,343	1,278
	INTEM MCF M3	58,82	33	6,361	1,107
Par 6	INTEM ML M1	,21	33	,650	,113
	INTEM ML M3	,24	33	,708	,123

Tabla 16. Estadístico de muestras relacionadas.

INTEM A10 M1 - INTEM A10 M3	,000
INTEM MCF M1 - INTEM MCF M3	,001

Tabla 17. Correlación de las muestras.

Respecto al EXTEM, como recogemos en las tablas 18 y 19 y en la figura 53, existen diferencias estadísticamente significativas en A10 y en el tiempo de inicio del trombo (CT), pero como ocurre con el INTEM, los datos reflejan que tanto en M1 como en M3 los valores se mantienen dentro de los límites normales, por lo que, aunque haya cambios, no existe alteración de la vía extrínseca que justificara una clínica de sangrado.

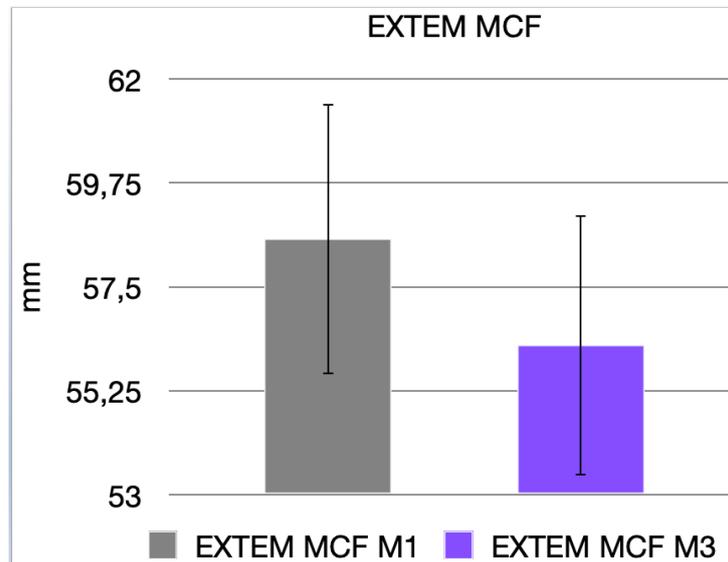


Figura 53. MFC en M1 y M3.

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	EXTEM CT M1	56,30	33	9,951	1,732
	EXTEM CT M3	65,48	33	12,050	2,098
Par 2	EXTEM CFT M1	126,00	33	56,933	9,911
	EXTEM CFT M3	134,06	33	51,031	8,883
Par 3	EXTEM α M1	68,27	33	10,927	1,902
	EXTEM α M3	68,33	33	9,698	1,688
Par 4	EXTEM A10 M1	53,21	33	9,079	1,580
	EXTEM A10 M3	48,73	33	8,140	1,417

Tabla 18. Estadística de la muestra.

	Sig. (bilateral)
Par 1 EXTEM CT M1 - EXTEM CT M3	,000
Par 2 EXTEM CFT M1 - EXTEM CFT M3	,348
Par 3 EXTEM α M1 - EXTEM α M3	,972
Par 4 EXTEM A10 M1 - EXTEM A10 M3	,001

Tabla 19. Correlación de las muestras de la vía extrínseca.

En cuanto al FIBTEM, no encontramos diferencias estadísticamente significativas tanto en CT como en CMF y A10, siempre manteniéndose dentro de los parámetros normales tanto en M1, como en M3 (Tablas 20 y 21). De los datos obtenidos del FIBTEM, entendido como una extensión del papel del fibrinógeno en la coagulación el que más nos interesa es el FIBTEM CMF (figura 54), cuya alteración en M3 respecto a M1 nos estaría indicando la necesidad de añadir fibrinógeno.

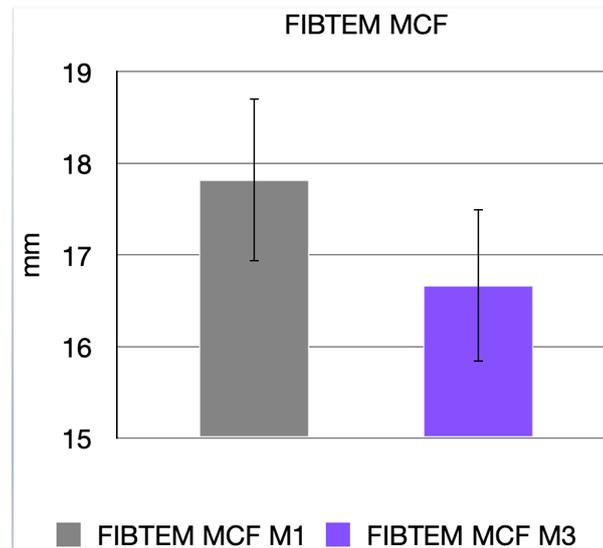


Figura 54. MFC del FIBTEM. Diferencia entre M1 y M3.

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	FIBTEM CT M1	56,39	33	15,108	2,630
	FIBTEM CT M3	61,12	33	11,895	2,071
Par 2	FIBTEM α M1	66,88	33	17,598	3,063
	FIBTEM α M3	67,42	33	14,433	2,512
Par 3	FIBTEM A10 M1	15,82	33	7,667	1,335
	FIBTEM A10 M3	14,76	33	5,362	,933
Par 4	FIBTEM MCF M1	17,82	33	7,772	1,353
	FIBTEM MCF M3	16,67	33	5,464	,951
Par 5	FIBTEM ML M1	,30	33	,810	,141
	FIBTEM ML M3	,24	33	,867	,151

Tabla 20. Estadísticos de muestras relacionadas.

		Sig. (bilateral)
Par 1	FIBTEM CT M1 - FIBTEM CT M3	,087
Par 2	FIBTEM α M1 - FIBTEM α M3	,766
Par 3	FIBTEM A10 M1 - FIBTEM A10 M3	,236
Par 4	FIBTEM MCF M1 - FIBTEM MCF M3	,189
Par 5	FIBTEM ML M1 - FIBTEM ML M3	,677

Tabla 21. Significación bilateral muestras relacionadas.

La medición del HEPTEM refleja diferencias estadísticamente significativas en las muestras, manteniéndose los parámetros dentro del rango de la normalidad (Figura 55 y tablas 22 y 23).

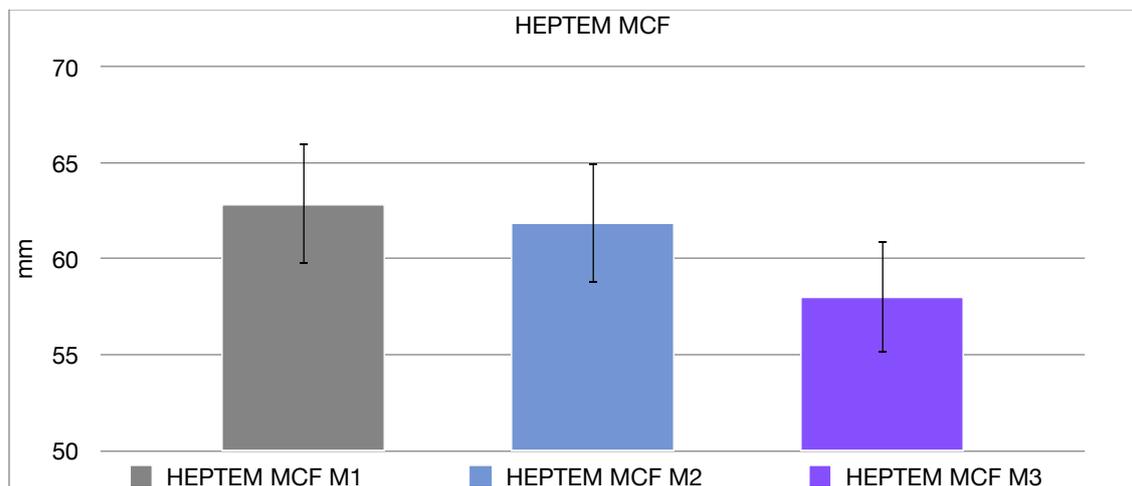


Figura 55. MCF en M1, M2 y M3.

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	HEPTEM CT M1	165,67	33	36,824	6,410
	HEPTEM CT M2	212,39	33	25,091	4,368
Par 2	HEPTEM CFT M1	88,21	33	67,434	11,739
	HEPTEM CFT M2	79,21	33	26,151	4,552
Par 3	HEPTEM α M1	74,06	33	10,040	1,748
	HEPTEM α M2	74,76	33	5,038	,877
Par 4	HEPTEM A10 M1	56,82	33	9,309	1,620
	HEPTEM A10 M2	54,06	33	7,018	1,222
Par 5	HEPTEM MCF M1	61,33	33	12,399	2,158
	HEPTEM MCF M2	61,85	33	7,579	1,319
Par 6	HEPTEM ML M1	1,18	33	1,776	,309
	HEPTEM ML M2	,15	33	,508	,088

Tabla 22. Estadístico de muestras seleccionadas.

		N	Correlación	Sig.
Par 1	HEPTEM CT M1 y HEPTEM CT M2	33	,229	,199
Par 2	HEPTEM CFT M1 y HEPTEM CFT M2	33	,460	,007
Par 3	HEPTEM α M1 y HEPTEM α M2	33	,546	,001
Par 4	HEPTEM A10 M1 y HEPTEM A10 M2	33	,600	,000
Par 5	HEPTEM MCF M1 y HEPTEM MCF M2	33	,224	,210
Par 6	HEPTEM ML M1 y HEPTEM ML M2	33	,003	,986

Tabla 23. Correlaciones de muestras seleccionadas.

Como dijimos, según el análisis estadístico no existen diferencias significativas, y los valores están dentro de los límites normales, pero el descenso en mm del MCF, junto con el descenso de las cifras de fibrinógeno, en la mayoría de los casos nos ha llevado a la administración de fibrinógeno exógeno con la finalidad de volver a los valores basales.

5.2.6. Tiempo de coagulación activado (TCA).

Realizamos la medición del TCA como monitorización de la heparinización del paciente previo a entrar en CEC (requerimos un TCA > 400 para el inicio de la circulación extracorpórea), y para confirmar la antagonización de la heparina con sulfato de protamina una vez ha finalizado el periodo de circulación extracorpórea. Para ello realizamos una muestra basal M1, y otra muestra M3 que recogemos a los diez minutos de haber administrado protamina, a razón 1:1.

Los datos arrojados demuestran una media de M1 de $108,63 \pm 7,01$ y de M3 $113,06 \pm 6,63$, estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Ambos valores dentro de los límites normales.

El valor de M3 refleja la antagonización correcta de la heparina tras la circulación extracorpórea (figura 56).

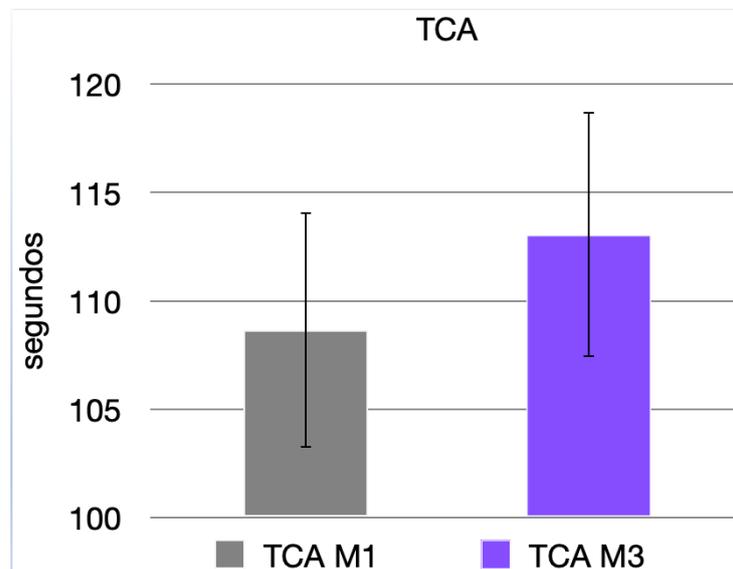


Figura 56. Valores TCA.

5.2.7. Función plaquetaria mediante citometría de flujo.

Por citometría de flujo hemos medido la agregación plaquetaria, utilizando anticuerpos marcados como marcadores fluorescentes para poder reconocer las plaquetas. Para medir cuánta agregación se ha producido hemos recurrido al método de recuento plaquetario (contar cuántas plaquetas) en cada momento, primero sin ningún estímulo y tras la estimulación con un agonista denominado TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide).

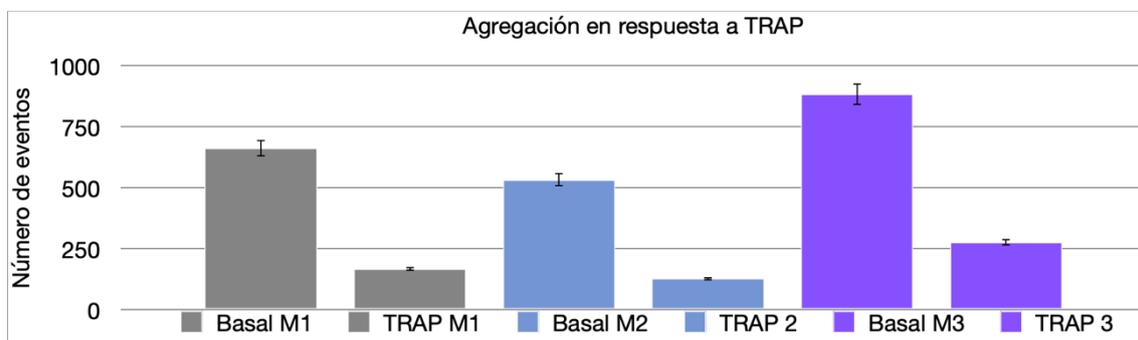


Figura 57. Agregación en respuesta a TRAP.

En la figura 57 observamos como el número de plaquetas disminuye tras la estimulación con TRAP: Lo que ocurre es que tras la estimulación las plaquetas forman agregados que no pueden ser detectados por la citometría de flujo, de manera que no se cuentan como eventos compatibles con plaquetas y por tanto el número de eventos disminuye.

Esta figura nos permite a su vez elaborar e interpretar la figura 58.

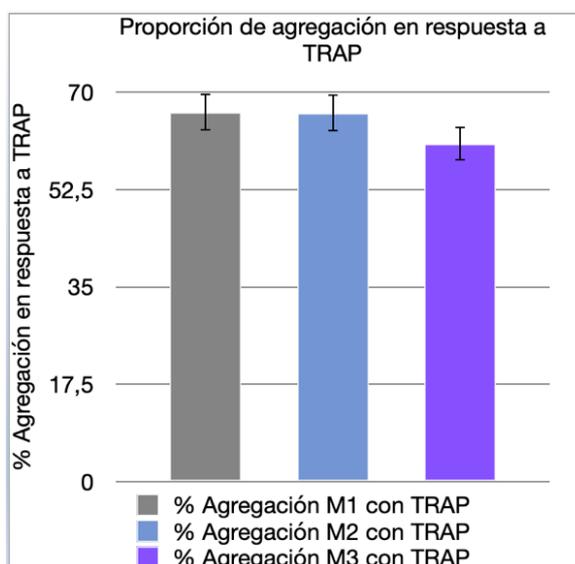


Figura 58. Porcentaje de agregación con TRAP.

En base a la diferencia de conteo hemos calculado el porcentaje de agregación plaquetaria, interpretando los datos en “bruto” de la figura 57. Como vemos en la figura 58 no hay diferencias significativas en la agregación plaquetaria, en respuesta a TRAP en ninguna de las muestras analizadas (M1-M3).

Siguiendo la misma línea metodológica, la figura 59 refleja la agregación plaquetaria en presencia de NONOate (dona NO cuando está en disolución).

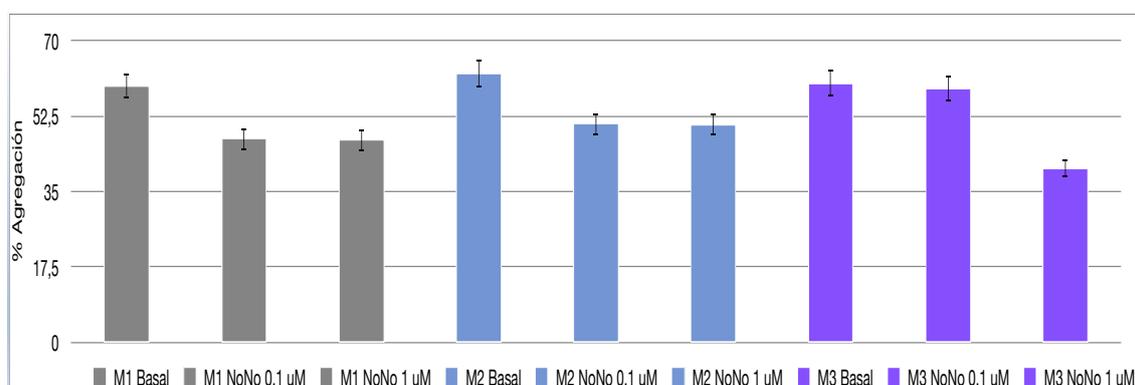


Figura 59. Porcentaje de agregación en presencia de NO.

Como observamos en la gráfica inmediatamente superior, la presencia de NONOate (que cede óxido nítrico cuando está en disolución) es capaz de inhibir la agregación plaquetaria en las tres muestras experimentales.

	Sig. (bilateral)
Par 1 Con NONO 0,1 uM M1 - Con NONO 0,1 uM M2	,633
Par 2 Con NONO 0,1 uM M1 - Con NONO 0,1 uM M3	,087
Par 3 Con NONO 0,1 uM M2 - Con NONO 0,1 uM M3	,278
Par 4 Con NONO 1 uM M1 - Con NONO 1 uM M2	,617
Par 5 Con NONO 1 uM M1 - Con NONO 1 uM M3	,415
Par 6 Con NONO 1 uM M2 - Con NONO 1 uM M3	,176

Tabla 23. Estadístico inhibición de agregación plaquetaria.

En la figura 59 se refleja que el tanto por ciento de agregabilidad prácticamente no varía, al meno significativamente, en M1, M2 y M3, en ausencia de NONOate (59,46%, 62,32% y 60,12% respectivamente). Por otra parte, esta misma figura refleja que en presencia de NONOate se muestra una inhibición de la agregación plaquetaria, que es muy clara en las tres muestras, especialmente a la concentración de NONOate 1uM en las tres muestras (46,88%, 50,57% y 40,43%).

Del mismo modo, y de forma complementaria, utilizamos los resultados de la prueba VASP-P para valorar el grado de hemólisis durante la CEC (figura 60):

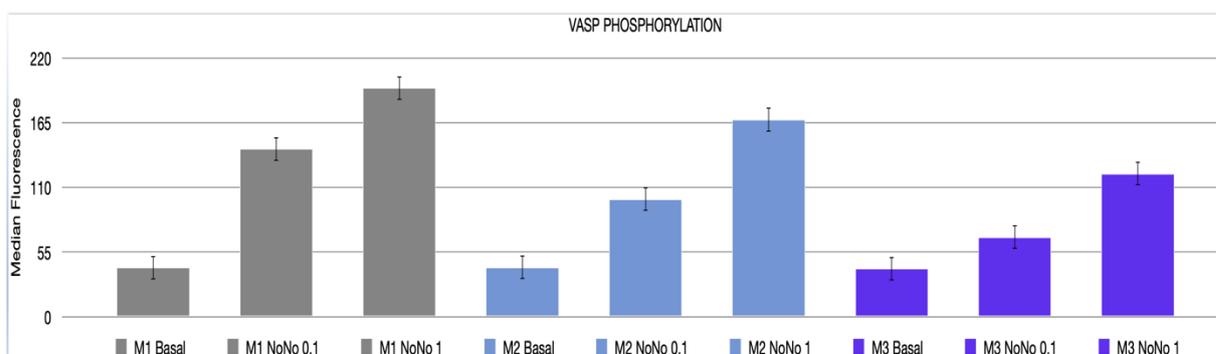


Figura 60. VASP Phosphorylation

MUESTRAS	VASP PHOSPORYLATION. MEDIAN FLUORESCENCE
M1 Basal	41,75
M1 NoNo 0,1	142,75
M1 NoNo 1	194,375
M2 Basal	42
M2 NoNo 0,1	99,9375
M2 NoNo 1	167,5625
M3 Basal	40,9375
M3 NoNo 0,1	67,625
M3 NoNo 1	121,62

Tabla 24. Datos VASP-P

La fosforilación de la proteína VASP, depende como sabemos de la actividad de la proteína Kinasa (PKG), que a su vez depende de los niveles de NO, ya que el NO es capaz como hemos dicho, de elevar los niveles intracelulares del segundo mensajero GMPc, que es el que activa a la PKG, que es la que fosforila a la proteína VASP. Esto no es más que otra vía para valorar la cantidad de NO libre y por tanto de forma indirecta, la cantidad de hemoglobina libre y el grado de hemólisis.

En la VASP-P medimos la fluorescencia, concretamente la median fluorescence, que consiste en marcar con marcadores fluorescentes anticuerpos específicos de las plaquetas de forma que cuanto más se activen las plaquetas, más anticuerpos marcados expresarán en la superficie y por tanto más fluorescencia detectará el citómetro de flujo. Por tanto, la median fluorescence es la mediana de la fluorescencia que emiten todas las plaquetas que están siendo analizadas en las muestras.

Como vemos en la figura 60 y en la tabla 24, la administración de NONOate da lugar a un aumento de la fosforilación de la proteína VASP en todas las muestras, lo que indicaría que la biodisponibilidad del NO es alta. Además, este aumento depende, de una forma proporcional, de la concentración de NONOate empleada en las tres muestras evaluadas. Otro aspecto que destacar tanto en la figura 60 como en la tabla 24, es que los valores de fosforilación de VASP van disminuyendo de M1 en adelante: M1 con respecto a M2 y este con respecto a M3. Este resultado podría reflejar la disminución en el número de plaquetas que ya hemos señalado previamente, donde hay una disminución de dichas plaquetas de M1 en adelante: M1 respecto a M2 y este con respecto a M3.

Continuando con el concepto de median fluorescence lo utilizamos para medir la expresión de la P-selectina, utilizando el agonista TRAP (Thrombin Receptor Activating Protein). Figuras 61 y 62.

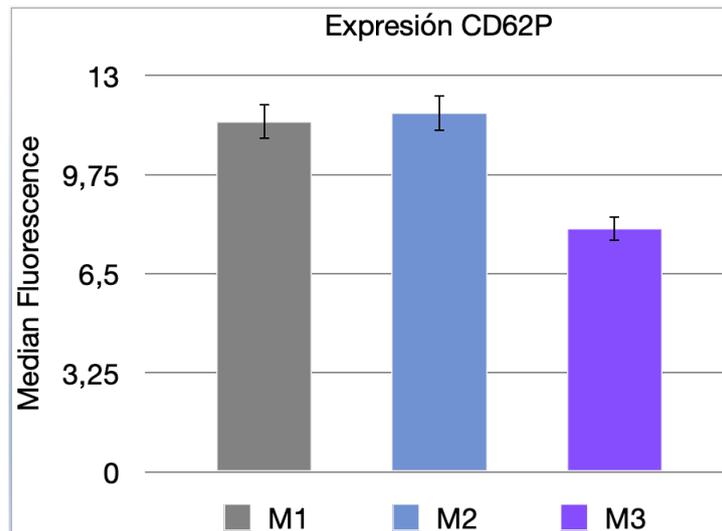


Figura 61. Expresión CD62P.

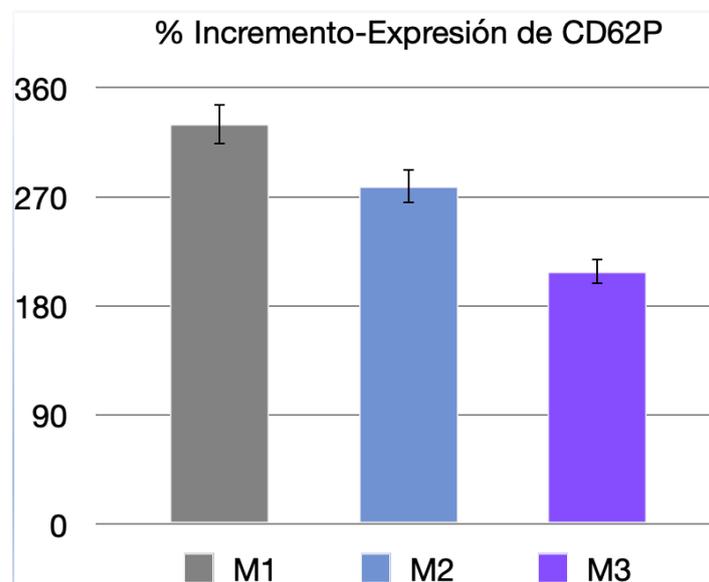


Figura 62. Tanto por ciento de incremento de expresión de CD62P.

En la figura 61 vemos un descenso progresivo de la activación plaquetaria desde M1 a M3, de manera que esto nos puede sugerir que el procedimiento empleado para esta cirugía, en el que incluimos la circulación extracorpórea, no aumenta la activación plaquetaria, e incluso se observa un pequeño descenso en M3.

La figura 62 nos expresa los resultados en tanto por ciento de incremento de P-selectina. En esta figura se aprecia con más claridad una tendencia a la baja en la expresión de P-selectina, que podría sugerir también, que la técnica quirúrgica que empleamos para esta cirugía no solo no aumenta la activación de las plaquetas, sino que podría disminuirla. De igual forma utilizamos la median fluorescence para evaluar la expresión de P-Selectina en presencia de NO. Figuras 63 y 64.

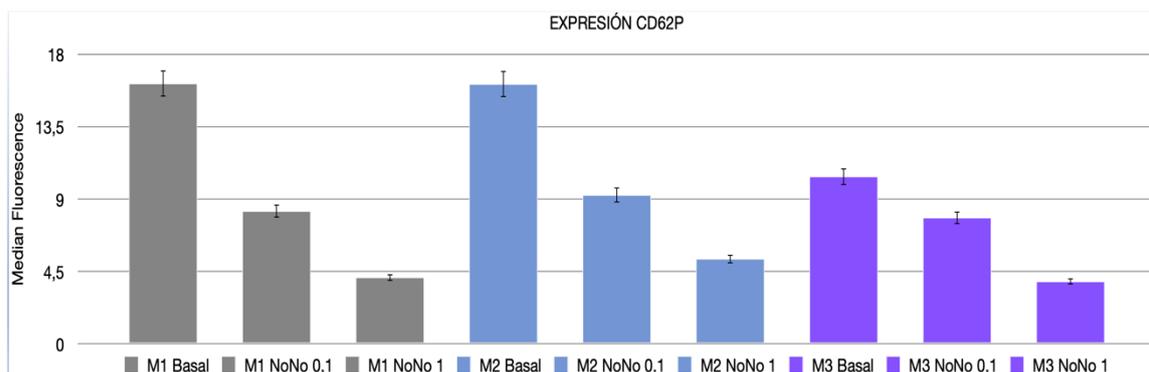


Figura 63. Expresión de CD62P con NONOate.

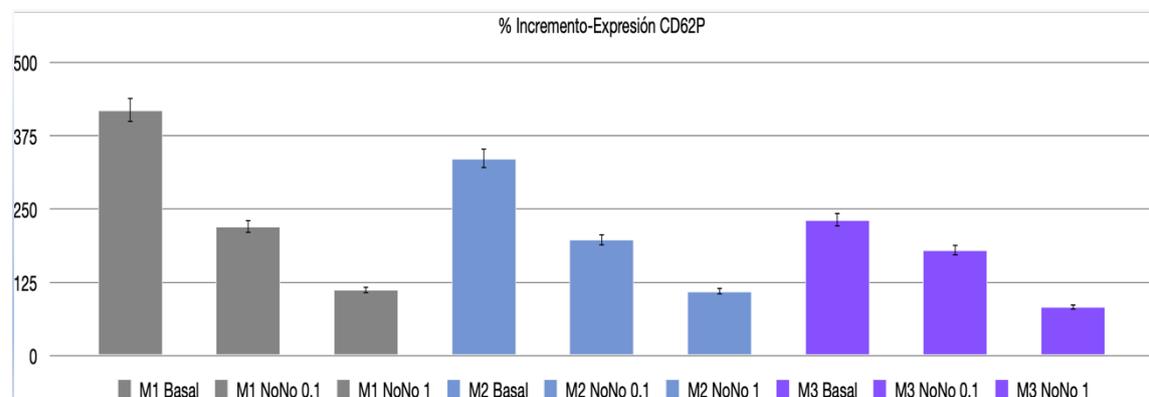


Figura 64. Proporción de incremento-expresión de CD62P con NONOate.

		Sig. (bilateral)
Par 1	M1-CD62P MF - M2-CD62P MF	,790
Par 2	M1-CD62P MF - M3-CD62P MF	,054
Par 3	M3-CD62P MF - M2-CD62P MF	,008
Par 4	M1-CD62P % incremento MF - M2-CD62P % incremento MF	,235
Par 5	M1-CD62P % incremento MF - M3-CD62P % incremento MF	,028
Par 6	M2-CD62P % incremento MF - M3-CD62P % incremento MF	,020
Par 7	M1-CD62P MF con NONO 1 uM - M2-CD62P MF con NONO 1 uM	,569
Par 8	M1-CD62P MF con NONO 1 uM - M3-CD62P MF con NONO 0,1 uM	,053
Par 9	M2-CD62P MF con NONO 0,1 uM - M3-CD62P MF con NONO 0,1 uM	,262
Par 10	M1-CD62P % incremento MF con NONO 0,1 uM - M2-CD62P % incremento MF con NONO 0,1 uM	,726
Par 11	M1-CD62P % incremento MF con NONO 0,1 uM - M3-CD62P % incremento MF	,887
Par 12	M2-CD62P % incremento MF con NONO 1 uM - M3-CD62P % incremento MF	,021

Tabla 25. Estadístico activación.

	Sig. (bilateral)
Par 1 M1-CD62P % incremento MF con NONO 1 uM - M2- CD62P % incremento MF con NONO 1 uM	,965
Par 2 M1-CD62P % incremento MF con NONO 1 uM - M3- CD62P % incremento MF con NONO 1 uM	,424
Par 3 M2-CD62P % incremento MF con NONO 1 uM - M3- CD62P % incremento MF con NONO 1 uM	,433

Tabla 26. Estadístico agregación plaquetaria.

En las figuras 63 y 64 se observa una inhibición de la activación plaquetaria (al disminuir la expresión de la P-selectina), en presencia de NONOate, que depende de la concentración del mismo, en las tres muestras experimentales (disminuye la expresión de la P-selectina), sugiriendo como en los resultados previos de este mismo apartado, que la hemólisis producida en la cirugía que estamos estudiando no es significativamente alta, porque no está siendo capaz de secuestrar NO liberado por el NONOate, ya que este tiene la suficiente biodisponibilidad para conservar la capacidad de inhibir la actividad plaquetaria.

5.2.8. Resumen de resultados.

- Población a estudio:
 - Predominio del sexo masculino, con un 67%, y una media de edad de 68 años.
 - El factor de riesgo cardiovascular mas prevalente fue la HTA, presente en el 75,76%.
 - 2 pacientes presentaron disfunción cardíaca representada por una FE del VI <40%.
 - La arritmia completa por fibrilación auricular estuvo presente en un 21,21%, frente al 12,12% de vasculopatía periférica y 12,12% de ACV.
 - Los tiempos de CEC fueron de 74,27 min y de clampaje aórtico 58,67 min.
 - La mortalidad fue del 3,03%.

- Uso de hemoderivados:
 - 33% de los pacientes necesitaron transfusión de CH, algo que se correlacionó con una menor hemoglobina basal.
 - 8 pacientes necesitaron la transfusión de plaquetas (2 de ellos 2 pool, el resto 1 pool). Los pacientes que recibieron transfusión de plaquetas mostraron mayor estancia en UCI.
 - el 84,85% de los pacientes recibieron fibrinógeno exógeno. Encontramos una fuerte relación entre la transfusión de CH y los requerimientos de fibrinógeno.
 - En nuestra cirugía utilizamos de forma protocolaria el salvacélulas con una recogida de 292,30±118,18 mL reinfundidos al paciente. Observamos que, a mayor recogida en el salvacélulas, mayor necesidad de transfusión de plaquetas.

- Bioquímica general:
 - las cifras de creatinina, a pesar de subir tras la cirugía, respecto a las basales, se mantienen dentro de los límites normales. Esto explica la excepcional necesidad de hemofiltro en UCI por deterioro de la función renal.
 - Los niveles de lactato aumentaron en CEC y tras la cirugía respecto a los niveles basales, lo que haría pensar en cierto grado de hipoperfusión, pero en todas las muestras los niveles de lactato se mantuvieron dentro de los niveles normales.

- Bioquímica de indicadores de hemólisis:
 - La haptoglobina sufre un descenso importante con respecto a la muestra basal, lo que hablaría a favor de cierto grado de hemólisis, pero se mantiene dentro de los límites normales en las tres muestras.
 - La LDH muestra un ligero aumento en la muestra de CEC y tras CEC respecto a la basal, manteniéndose también dentro de los niveles normales.
 - Bilirrubina sin grandes cambios.

- Pruebas básicas de coagulación:
 - El TP se encuentra alargado tras la circulación extracorpórea, si bien los valores se encuentran dentro de la normalidad.
 - El TTPA apenas varía respecto al basal y se mantiene en todas las muestras en niveles normales.
 - Descenso significativo de fibrinógeno tras la circulación extracorpórea respecto al basal, que, aunque se mantiene en niveles normales si induce a su corrección con la administración de fibrinógeno exógeno para recuperar niveles basales.

- Tromboelastometría:
 - INTEM: Diferencias estadísticamente significativas en la CMF de M3 respecto a M1, sin que los datos se extralimiten de los normales.
 - EXTEM: Diferencias en A10 y CT que son significativas por lo que cabría esperar alteración de la vía extrínseca, pero los datos se mantienen dentro de los límites normales, por lo que no cabe esperar que esta alteración sea clínicamente significativa.
 - FIBTEM: Diferencias tanto en A10 como en CT y CMF. Clínicamente la diferencia mas interesante es la alteración de CMF respecto al basal, que, aunque se mantiene en límites normales, va en consonancia con el descenso del fibrinógeno que los pacientes experimentan en las pruebas básicas de coagulación.

- TCA: Diferencias estadísticamente significativas entre TCA basal y TCA post CEC, siempre en valores normales, dando por correcta la reversión de la heparinización con sulfato de protamina.

- Agregación plaquetaria:
 - En respuesta a TRAP no hay diferencia significativa entre los grupos experimentales.
 - En presencia de NONOate se observa una clara inhibición de la agregación de los tres grupos experimentales.
 - Inhibición de la P-selectina en aumento de M1 a M3. En presencia de NONOate observamos clara inhibición de la activación en los tres grupos. El grado de inhibición depende de la concentración de NONOate utilizado.
 - Aumento claro de la fosforilación del VASP en las tres muestras, que va en función de la concentración de NONOate utilizada.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Contextualización del estudio.

La cirugía de recambio valvular aórtico está enmarcada en la especialidad de cirugía cardíaca. Nuestro hospital es el único de la región en realizar este tipo de cirugía por lo tanto es la referencia y se reciben pacientes de toda la región. El circuito de selección de los pacientes de este estudio se inicia con el servicio de cardiología, que diagnostica la estenosis aórtica severa en función de criterios clínicos y ecocardiográficos. Los pacientes se someten a discusión en sesión clínica ante un equipo multidisciplinar y se decide qué pacientes se someten a cirugía y qué pacientes no son tributarios de ésta por alto riesgo, por lo que se derivan al tratamiento de implante percutáneo de válvula.

La cirugía de los pacientes del estudio se lleva a cabo siempre en el mismo quirófano en el que todo el personal está entrenado y cualificado para la cirugía con circulación extracorpórea.

El postoperatorio de los pacientes sometidos a recambio valvular aórtico corre a cargo de la subunidad de extracorpóreas de la UCI de nuestro hospital.

6.2. Características de la población de estudio.

La incidencia de la estenosis aórtica aumenta con la edad, afectando hasta al 10% de la población en la octava década. Una vez que se desarrollan los síntomas, la estenosis aórtica es rápidamente mortal. Con el aumento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población, la estenosis aórtica es ahora una de las cardiopatías valvulares más comunes. El reconocimiento y el tratamiento tempranos de la estenosis aórtica son de suma importancia, ya que la enfermedad grave sintomática no tratada es como hemos dicho, mortal¹⁶⁵.

El tratamiento adecuado requiere un conocimiento de la fisiología y de los criterios utilizados para definir la gravedad de la enfermedad. No existe un tratamiento

farmacológico eficaz. La sustitución quirúrgica de la válvula aórtica ha sido el tratamiento de referencia durante décadas.

La sustitución de la válvula aórtica está indicada para la EA sintomática grave. Los síntomas clásicos de la EA son la angina de pecho, el síncope y la insuficiencia cardíaca; sin embargo, la mayoría de los pacientes sometidos a seguimiento prospectivo presentan síntomas más sutiles, normalmente una disminución de la tolerancia al ejercicio o disnea de esfuerzo. No es infrecuente que los pacientes disminuyan su nivel de actividad por debajo de su umbral de síntomas, por lo que se necesita una historia cuidadosa que compare los niveles de actividad actuales y los del último año para reconocer que estos pacientes, de hecho, son sintomáticos. El riesgo de muerte súbita es alto una vez que se presenta cualquier síntoma, por lo que la cirugía valvular es apropiada incluso con síntomas leves¹⁶⁶. Según los resultados de las pruebas complementarias, definimos estenosis aórtica severa como la que presenta un área valvular $< 1 \text{ cm}^2$ y una velocidad pico $> 4 \text{ m/s}$ ¹⁶⁶.

La edad media de los pacientes sometidos a estudio es 68,27 años, algo que concuerda con la edad promedio de los pacientes sometidos a sustitución valvular aórtica, aunque cabe decir que a partir de los 75 años la prevalencia se dispara al 26%. La distribución por sexo y las comorbilidades asociadas se asemejan a la bibliografía consultada¹⁶⁷.

Los pacientes sometidos a estudio presentan como comorbilidad más frecuente la HTA, estando presente en más del 75% de los pacientes de nuestro estudio. De hecho, la estenosis aórtica y la hipertensión suelen coexistir y tienen un impacto significativo en el diagnóstico y la clasificación de la gravedad y los síntomas de la estenosis aórtica¹⁶⁸. Tampoco es despreciable la prevalencia de la diabetes en nuestra población de estudio, ascendiendo al 30%, patología que suele evolucionar de forma tórpida en el postoperatorio inmediato de estos pacientes.

Según G. Cuerpo et al. (2019) el procedimiento valvular aislado más frecuente continúa siendo la sustitución valvular aórtica estándar, con 4.962 procedimientos en 2018, lo que representa el 51,8% del total de cirugía valvular aislada, siendo la mortalidad del 3,8%¹⁶⁹, cifra similar a la nuestra (3,03%).

6.3. Variables analíticas.

6.3.1. Hemograma.

Conocemos la anemia preoperatoria como un factor de riesgo independiente para el aumento de la morbilidad y la mortalidad perioperatorias tras la cirugía cardíaca y no cardíaca. En concreto, se ha demostrado que la anemia preoperatoria se asocia de forma independiente con los principales acontecimientos adversos cardíacos y no cardíacos, como el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular, la insuficiencia renal, la ventilación prolongada, la infección profunda de la herida esternal, el mayor riesgo de transfusiones de glóbulos rojos y el aumento de la mortalidad tanto intrahospitalaria como a largo plazo¹⁷⁰.

Definimos anemia como una cifra menor de 13 g/dL en hombres y menor de 12 en mujeres.

Los datos que presentaron nuestros pacientes fueron de una hemoglobina media basal de 13,39 g/dL, y una hemoglobina al alta de 10,75 g/dL.

Según esto, la hemoglobina basal media de nuestros pacientes era aceptable, pero encontramos que casi un 25% de nuestros pacientes presentaban anemia basal.

En este sentido, existe una fuerte relación positiva entre la hemoglobina basal y las necesidades transfusionales, resultando que la anemia basal es determinante en nuestro estudio para la posterior transfusión de concentrados de hematíes.

Hallward et al. (2016) han demostrado que a medida que las concentraciones de hemoglobina preoperatoria son más bajas, se asocian a un mayor uso de los recursos hospitalarios y a medida que disminuía la concentración de hemoglobina preoperatoria, se producía un aumento de las necesidades de transfusión de productos sanguíneos y prolongación de la estancia en la UCI en el postoperatorio¹⁷⁰. En nuestro caso, la necesidad de transfusión aumenta según descenden los niveles de hemoglobina basal, pero no hemos encontrado una relación clara entre la anemia preoperatoria y mayor estancia en la unidad de cuidados intensivos o el hospital.

Bell et al. (2008) investigan la relación entre el nivel de hemoglobina preoperatoria de 10 g/dL y la mortalidad y la morbilidad perioperatorias a los 30 días de pacientes sometidos a cirugía de revascularización coronaria. Concluyeron que, aunque la hemoglobina preoperatoria era significativa en el análisis univariante, no era un factor predictivo independiente de los resultados adversos¹⁷¹. Sin embargo, hay otros estudios que, al igual

que Hallward han postulado que la hemoglobina preoperatoria está fuertemente relacionada con efectos adversos. En un análisis multivariante retrospectivo de pacientes sometidos a cirugía cardíaca, en este caso a cirugía coronaria, se concluyó que había mayores probabilidades de muerte, insuficiencia renal y duración de estancia postoperatoria por cada disminución del 5% en el hematocrito preoperatorio¹⁷².

En nuestro caso no encontramos ni hemos evaluado a los pacientes a los 30 días del postoperatorio, pero durante el postoperatorio inmediato no ha habido relación entre la hemoglobina basal y efectos adversos, probablemente porque durante este periodo los descensos de hemoglobina, aunque hayan existido, se han tratado con técnicas de recuperación de sangre, hemoconcentración y por la propia transfusión intraoperatoria.

Pero si está claro que el descenso de hemoglobina preoperatorio conduce al uso de recursos sanitarios, con el aumento de necesidad de transfusión. Del consumo de recursos y de los posibles efectos deletéreos de la transfusión surge la tendencia restrictiva transfusional que en nuestro caso seguimos. Nuestro umbral transfusional lo marcamos en 8 gr/dL de hemoglobina, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan. A pesar de que hay estudios que nos dicen que una estrategia de transfusión restrictiva con un hematocrito del 24% es tan segura como una estrategia liberal con un hematocrito del 30%, con respecto a un criterio de valoración combinado de mortalidad a los 30 días y complicaciones clínicas de los pacientes¹⁷³, otros autores abogan por una actitud más conservadora a la hora de la transfusión, con el fin de minimizar los efectos deletéreos de esta en el postoperatorio, incluido el aumento de mortalidad e infección¹⁷⁴.

El descenso de la hemoglobina basal durante la circulación extracorpórea es una constante en las revisiones sobre los niveles de hemoglobina y CEC, al igual que la recuperación de esta caída de niveles, al concluir la circulación extracorpórea. Esto puede estar justificado por las estrategias de hemoconcentración como el purgado retrógrado y la ultrafiltración¹⁷⁵. Algunos ensayos concluyen que el cebado autólogo retrógrado no proporcionó un beneficio clínico en la reducción del número de unidades transfundidas de concentrados de hematíes intraoperatorios¹⁷⁶. Olmos et al. (2015) en su estudio estudian los efectos del cebado con coloides, cristaloides y manitol asociado a hemofiltración durante el periodo de CEC y coinciden en que no disminuyen el sangrado ni el número de pacientes transfundidos, pero si se produce una menor positividad en el balance hídrico y secundariamente se reduce la hemodilución, los requerimientos transfusionales y acorta la estancia en UCI¹⁷⁷. En nuestro caso asociamos no sólo el purgado retrógrado con sangre autóloga, sino la utilización del recuperador de sangre.

A este respecto, Wang et al. en su metaanálisis de 2009, concluyen de forma general que el uso intraoperatorio de un aparato recuperador de sangre disminuye las probabilidades de exposición a cualquier transfusión de sangre alogénica en un 37%. En este estudio, se hace referencia al momento de utilización del recuperador. El recuperador de sangre muestra un claro beneficio utilizado durante todo el procedimiento, como es nuestro caso, frente a su utilización solo durante la CEC para la sangre de succión de cardiectomía¹⁷⁸. En nuestro caso la sangre recuperada es no solo sangre residual de la bomba, sino la sangre que surge en el campo quirúrgico tras la CEC, y quizás ese sea uno de los motivos por los que algunos estudios obtienen como resultado un menor beneficio. Más recientemente, Khabori et al. (2019) en su revisión sistemática y metaanálisis encuentran que existe un beneficio muy importante al disminuir el riesgo de transfusión de concentrado de hematíes en un 31% en cirugías no cardíacas, lo que hace que se generalice su uso en la cirugía cardíaca, pero en ésta no ha demostrado disminuir la tasa de transfusión¹⁷⁹. De hecho, este mismo estudio presenta gran heterogeneidad entre los grupos estudiados, encontrando efecto beneficioso en los primeros estudios entre los que se incluye el metaanálisis de Wang et al., mientras que los estudios más recientes muestran menos beneficios, quizás por la mejora del procedimiento quirúrgico, la protección miocárdica, el manejo en cuidados críticos y/o la mejor adherencia a las directrices de transfusión. En nuestro caso valoramos el uso del salvacélulas durante toda la cirugía como una estrategia más de ahorro de sangre, de la que obviamente se benefician más los pacientes que pierden más volumen, aunque de las últimas publicaciones se desprende que la utilización del salvacélulas de forma rutinaria en cirugía cardíaca debe ser objeto de análisis en nuevos estudios.

Otro punto a destacar respecto al manejo de la hemoglobina perioperatoria nos lleva a analizar el trabajo de Peels et al. (2021) en el que recomiendan utilizar dosis preoperatorias de hierro y epo α para el tratamiento de la anemia antes de la cirugía cardíaca, consiguiendo aumentos significativos de la hemoglobina y reduciendo así la probabilidad de transfusión y la transfusión de menos cantidad de concentrados de hematíes¹⁸⁰, actitud que sería interesante valorar dentro del protocolo perioperatorio de los pacientes que sometemos a nuestra cirugía.

Dentro de las necesidades transfusionales de plaquetas, PFC y fibrinógeno, destacamos que los niveles de plaquetas muestran diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, pero los valores se mantienen dentro del rango de normalidad en cuanto a

número. El 24,24% precisó de transfusión de plaquetas, mientras que el 18,18% recibieron PFC.

Zhou et al. (2019) analizan retrospectivamente los datos de más de diez mil pacientes sometidos a cirugía cardíaca para comparar la transfusión plaquetaria y analizar la asociación de transfusión de plaquetas, mortalidad y complicaciones postoperatorias. Según el análisis las tasas de transfusión varían entre centros, entre 4,4% y 24,7%¹⁸¹. En nuestro caso estaría en torno al 24%. Los mismos autores asocian la transfusión a mayor mortalidad a los 30 días, neumonía postoperatoria, intubación prolongada y reingreso, aunque debido a la alta variabilidad en las tasas de transfusión entre los centros podría justificar el aumento de la mortalidad y la duración de la estancia en UCI. Más recientemente Yanagawa et al. (2021) en una revisión sistemática y metaanálisis no encontraron diferencias en cuanto a mortalidad y complicaciones postoperatorias entre los pacientes transfundidos y los no transfundidos, una vez tenidas en cuenta las diferencias basales entre los pacientes. Datos estos que hay que tomar con cautela dado el reducido número de estudios observacionales¹⁸². Sin embargo, Ming et al. (2020) sí asocia mayor mortalidad y complicaciones con la transfusión de plaquetas, encontrando un 6,5% de transfundidos en cirugía cardíaca¹⁷⁴.

En nuestro caso no hemos evaluado la mortalidad a los 30 días por no ser objeto de nuestro estudio, pero si encontramos una relación estadísticamente significativa entre la administración de plaquetas y el aumento de estancia en UCI, pero no con mayor número de complicaciones postoperatorias. En cuanto a la administración de PFC en nuestro estudio encontramos más del 18% de transfundidos frente al 12,5% de Ming et al. (2020). El aumento de la administración de PFC en nuestro estudio, si bien supone un consumo considerable de recursos en forma de transfusión de hemoderivados, obedece a la necesidad de ajustar la hemostasia cuidadosamente con el fin de evitar sangrados postoperatorios que derivan en muchas ocasiones en la reintervención del paciente. Las reintervenciones no sólo suponen un aumento en la morbimortalidad, también generan un aumento en el consumo de recursos sanitarios. En nuestro caso, solo un paciente tuvo que ser reintervenido suponiendo el 3,03%.

El ajuste hemostático de los pacientes también depende del control y administración exógena de fibrinógeno. En este sentido es destacable que el 84,85% de los pacientes sometidos al estudio recibieron fibrinógeno, quizás con el afán de recuperar los niveles basales de cada enfermo, además de encontrar una clara relación entre las necesidades de fibrinógeno y las necesidades de transfusión de sangre, lo que explicaría su depleción a

mayor sangrado. La administración de fibrinógeno en la cirugía cardíaca se mueve en rangos bastantes variables. Erdoes et al. (2019) en su revisión concluye que es necesario guiarse por pruebas viscoelásticas para dirigir el tratamiento con fibrinógeno, pero que se necesitan más estudios para definir mejor los umbrales de transfusión. La evidencia actual indica que el concentrado de fibrinógeno puede reducir las necesidades de transfusión de glóbulos rojos en la cirugía cardíaca y que el restablecimiento de los niveles de fibrinógeno plasmático y la actividad en un paciente con potencial peligro de sangrado pueden mejorar la hemostasia¹⁸³. El mismo autor pone en duda la medición Clauss del fibrinógeno en este tipo de cirugía cardíaca, no por fiabilidad, sino por no ser lo suficientemente dinámica a la hora de la toma de decisiones en un ambiente tan cambiante como es la cirugía con CEC¹⁸³. Por nuestra parte, la guía para reponer el fibrinógeno estaba basada fundamentalmente en las pruebas viscoelásticas, quizás con una política de administración de fibrinógeno menos restrictiva, pero con la finalidad de reducir el sangrado y las reintervenciones derivadas de éste. Por otro lado, Li et al. (2018) concluyen en su estudio que la evidencia actual sigue siendo insuficiente para apoyar o refutar la administración perioperatoria rutinaria de concentrados de fibrinógeno al paciente sometido a CEC, y aunque está claro que reduce la necesidad de transfusión de productos sanguíneos en este tipo de cirugía, no encuentra evidencia de reducción del riesgo de mortalidad¹⁸⁴, en contrapunto con el estudio de Waldén et al. (2020), que concluye que la administración de concentrado de fibrinógeno a pacientes de cirugía con hemorragia no se asocia con un mayor riesgo de complicaciones tromboembólicas o muerte¹⁸⁵. En nuestro caso, no hemos encontrado complicaciones tromboembólicas en el postoperatorio inmediato de los pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico, pero si hemos tenido una muy baja tasa de reintervenciones, donde solo uno de los pacientes ha tenido que ser revisado en el quirófano por sangrado.

6.3.2. Bioquímica general.

Dentro de los parámetros bioquímicos analizados, destacamos la creatinina y el lactato. Ambos representan una medida de hipoperfusión; en el caso de la creatinina asumimos que su aumento está indicándonos daño renal agudo.

En este sentido nos hemos encontrado que existen diferencias entre la creatinina basal y la creatinina al alta. Pero en nuestro caso las cifras de creatinina se han mantenido dentro de los niveles normales, lo que se ha traducido en una estabilidad de la función renal de

nuestros pacientes. Kumar et al. en su metaanálisis de 2012 encontraron que el deterioro de la función renal estaba íntimamente relacionado con la duración de la CEC, implicándose esta como factor de riesgo independiente para el desarrollo de insuficiencia renal aguda¹⁸⁶. Además, Takaki et al. (2015) consideran que la creatinina es un buen indicador diagnóstico para detectar la lesión renal aguda en una etapa temprana¹⁸⁷. Los enfermos sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico requieren de menos tiempo de CEC y clampaje aórtico; en nuestros pacientes los tiempos medios son sensiblemente inferiores que los pacientes sometidos, por ejemplo, a la cirugía de revascularización coronaria, al igual que los tiempos quirúrgicos totales también lo son, algo que explica que en nuestros pacientes haya menos alteración de las cifras de creatinina y menos lesión renal aguda. De hecho solo uno de los pacientes presentó necesidad de técnicas de reemplazo renal en el postoperatorio, pero este paciente ya presentaba disfunción renal con cifras de creatinina preoperatorias elevadas, hecho que coincide con las conclusiones de Barboza de Oliveira et al. en 2019 que destaca que los pacientes con cifras elevadas de creatinina preoperatoria tienen peor pronóstico y mayor mortalidad, en su caso en pacientes no valvulares, sino sometidos a cirugía de revascularización coronaria¹⁸⁸. La mortalidad a largo plazo relacionada con la creatinina en nuestro estudio la desconocemos, pues no era objetivo de este.

Respecto a los niveles de lactato, existen diferencias estadísticamente significativas entre el lactato basal y el lactado medido al entrar en circulación extracorpórea, y entre el lactato basal y tras la circulación extracorpórea. Los niveles entre el lactato en CEC y el lactato tras CEC prácticamente no varían. Esto nos puede llevar a pensar en cierto grado de hipoperfusión a la entrada en CEC, que se mantiene hasta su salida, si bien, los niveles de lactato no sobrepasan los límites de la normalidad establecidos por nuestro laboratorio. Está claro que la CEC en sí se utiliza para mantener la perfusión y oxigenación durante la cirugía a corazón abierto, pero también es ampliamente conocido que la hipoperfusión tisular con generación de acidosis láctica resultante durante la CEC puede producirse durante la hipotermia, la hemodilución extrema, la CEC de bajo flujo y la activación neurohormonal excesiva¹⁸⁹. Así, Shinde et al. (2005) demuestran cambios significativos en los niveles de lactato a la entrada en circulación extracorpórea y durante los primeros minutos de CEC, valores que vuelven a sus niveles normales durante las primeras horas tras la CEC. El claro aumento de lactato se relaciona con la hipotermia a la que inducen a sus pacientes, algo que a lo largo de los últimos años se ha ido modificando hasta conseguir realizar este tipo de cirugía prácticamente en condiciones de normotermia,

como es nuestro caso. Esto, añadido a la menor hemodilución, quizás expliquen que las variaciones de lactato sean algo menores que en este estudio, y que se mantengan siempre dentro de los niveles normales. Otros autores han encontrado que la elevación de los niveles de lactato por encima de 4 mmol/L se asocian con aumento de la mortalidad y de las complicaciones pulmonares y neurológicas en UCI¹⁹⁰, cifras que en ningún caso hemos tenido en los pacientes de nuestro estudio, si bien cabe decir que el citado trabajo se realizó en pacientes sometidos a trasplante cardíaco, procedimiento de más complejidad que el recambio valvular aórtico y que comporta más tiempo de CEC, hipotermia y pacientes con mayor tendencia a la hipoperfusión basal por la condición terminal de su enfermedad cardíaca.

Como decíamos hemos utilizado como signos de hipoperfusión la creatinina y el lactato, algo que Noguchi et al. (2016) ya adelantaban en su trabajo como importante factor predictivo del resultado postoperatorio en los pacientes sometidos a cirugía cardíaca¹⁹¹. Este autor además incluye las diferencias entre PAM preoperatoria y la PAM en CEC, algo que nosotros no hemos medido, ya que hemos asumido la estabilidad hemodinámica preoperatoria del paciente, al tratarse de una cirugía programada. Por otra parte, al encontrar niveles de lactato normales durante la CEC, consideramos que durante la misma se mantuvo una PAM adecuada que aseguraba la correcta perfusión periférica del paciente.

6.3.3. Bioquímica de indicadores de hemólisis.

Dentro de los marcadores indirectos de hemólisis, hemos analizado la haptoglobina, la LDH y la bilirrubina.

Los niveles de haptoglobina sufren un descenso estadísticamente significativo, tanto en el periodo de CEC como en el periodo post CEC. El análisis de este dato nos lleva a pensar que durante la entrada en CEC se produce cierto grado de hemólisis ya que asumimos que este descenso de la haptoglobina viene determinado por un aumento de la hemoglobina libre, producto de la lisis de los hematíes. Al aumentar la hemoglobina libre en plasma, capta la haptoglobina, de tal forma que el complejo hemoglobina libre-haptoglobina es degradado en el hígado. Dado que la haptoglobina se sintetiza en el hígado, debemos tener en cuenta que pacientes con disfunción hepática pueden presentar niveles bajos de haptoglobina sin hemólisis¹⁹², pero en nuestros pacientes los niveles de haptoglobina basales estaban dentro del rango de la normalidad. Los niveles dentro de la

normalidad de haptoglobina (a pesar del alto rango de valores de ésta) condicionan que no tenga significación clínica este descenso. Cabría esperar, sobre todo alteraciones de la función renal en forma de lesión renal aguda, producto de la hemólisis producida. No ha sido nuestro caso, aunque hay algunos autores que aún encontrando niveles bajos de haptoglobina producto de la hemólisis producida por la CEC, no han encontrado relación entre esto y la lesión renal aguda en el postoperatorio¹⁹³.

En cuanto a la lactato deshidrogenasa (LDH) encontramos un aumento en CEC respecto al basal, aumento que se convierte en más llamativo después de la circulación extracorpórea (M3). Como dijimos, la determinación de la LDH tiene una gran variedad de aplicaciones clínicas, ya que, al ser un enzima intracelular, su elevación es índice de daño tisular con la consecuente liberación de ésta a la circulación. En nuestro estudio en particular, la elevación de la LDH sería fruto de la liberación de ésta al torrente sanguíneo, tras la destrucción de los hematíes consecuencia de la supuesta hemólisis producida por la CEC. Lo que hace interesante la medición de la LDH en nuestro estudio es la sensibilidad que tiene como marcador de hemólisis, incluso algunos autores la defienden como marcador más sensible que la propia hemoglobina libre, en tanto en cuanto aparece de forma precoz respecto a la hemoglobina libre¹⁹⁴. Gordon et al. (2020) sin embargo, postulan que a pesar de que la hemólisis medida por los niveles elevados de la LDH cuando existe la sospecha clínica de trombosis inducida por la bomba es una medida ampliamente aceptada, la consideran como un hallazgo relativamente inespecífico¹⁹⁵. Quizás sea interesante medir las distintas isoenzimas de la LDH para diferenciar hemólisis asociada a trombosis, por ejemplo, de otras condiciones fisiológicas y patológicas, pero en nuestro caso, no evaluamos trombosis en asistencias ventriculares izquierdas como motivo de hemólisis, sino hemólisis como consecuencia de destrucción de hematíes producto de la CEC, por lo que consideramos la medida de LDH como un marcador fiable, asociado a haptoglobina y bilirrubina.

A pesar del aumento que experimenta la LDH, sobre todo tras la circulación extracorpórea, es importante subrayar, que, al igual que los otros parámetros de medida de hemólisis, los niveles se mantuvieron dentro del rango de la normalidad, por lo tanto, consideramos que no tendrían implicaciones clínicas importantes.

Respecto a los niveles de bilirrubina, partíamos de una bilirrubina basal normal en todos los pacientes, excepto en uno que presentó una bilirrubina >3 mg/dL, pero todos los pacientes se comportaron igual en cuanto a las variaciones en las distintas muestras. El resultado es que en ningún caso hubo aumento significativo de la bilirrubina ni en CEC

ni después de CEC, a pesar de que Sharma et al. (2015) concluyen que la hiperbilirrubinemia tras la CEC es frecuente y se asocia a una elevada mortalidad hospitalaria¹⁹⁶. Los factores asociados a su aparición son el aumento del nivel de bilirrubina preoperatorio, el tiempo de protrombina preoperatorio, el tiempo de CEC y clampaje aórtico y las unidades de transfusión de sangre. Además, la hiperbilirrubinemia persistente se asocia a un peor resultado que la hiperbilirrubinemia transitoria temprana¹⁹⁶. Basándonos en esto, la razón de ser de la poca variación de la bilirrubina en nuestros pacientes estaría explicada por partir de una bilirrubina basal normal, unido a los tiempos cortos tanto de CEC como de clampaje aórtico. Además, el uso del recuperador de sangre comportó una menor transfusión de concentrado de hematíes, factor también predisponente a sufrir aumento de la bilirrubina basal. Otros autores achacaron como causas de posible hiperbilirrubinemia postoperatoria tras CEC a la disfunción hepática debido a insuficiencia cardíaca avanzada y a disminución del flujo hepático durante la CEC¹⁹⁷. En nuestro caso, ningún paciente presentó insuficiencia cardíaca previa a la cirugía y los flujos de CEC aseguraron una adecuada perfusión durante todo el procedimiento.

6.3.4. Pruebas básicas de coagulación.

Las pruebas básicas de coagulación que realizamos incluyen análisis del tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboelastograma parcial activado (TTPa) y fibrinógeno, y las utilizamos como apoyo al tromboelastograma para un análisis completo y detallado de la coagulación sobre todo como enfoque postoperatorio para, en la medida de lo posible, evitar sangrado excesivo y reintervenciones que sean debidas a alteraciones de ésta.

Al heparinizar al paciente, las pruebas básicas de coagulación se ven totalmente alteradas y su medición en el periodo de CEC (M2) carece de valor, por lo que únicamente realizamos y comparamos las muestras basales (M1) con las del periodo post CEC (M3). De los resultados se desprende que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de TP y fibrinógeno basales y post CEC. Analizando los valores de TTPa observamos que prácticamente no hay diferencias entre los valores basales y los valores post CEC, lo cual resulta lógico ya que al ser una medida de vía intrínseca que se ve alterada por la heparina, al revertir de forma precoz los efectos de la heparina, los valores

deben ser similares basal y post CEC, siempre y cuando la reversión de la heparina se haga de forma correcta.

En nuestro protocolo quirúrgico, tenemos el tromboelastograma como herramienta fundamental para la evaluación de la coagulación y no lo utilizamos de forma independiente, algo que se ve apoyado en la literatura por autores que postulan que para el manejo de la hemorragia, es indispensable una adecuada monitorización hemostática perioperatoria, y que las pruebas de coagulación estándar consumen mucho tiempo y no pueden utilizarse indistintamente a la tromboelastometría y confiar en sus resultados de forma unitaria para decidir actitudes como la transfusión sanguínea¹⁹⁸. Esto ya lo adelantaron en 2012 Ogawa et al. refiriéndose a una mayor rentabilidad del FIBTEM respecto a las pruebas básicas, sobre todo por la rapidez en medir el fibrinógeno.

En nuestro caso, como hemos dicho, nunca utilizamos éstas como pruebas únicas, y respecto a los resultados, cabe decir que aunque existan diferencias significativas, tanto el TP como el fibrinógeno se mantuvieron en M3 dentro de los valores normales¹⁹⁹. A estos resultados le damos explicación por los tiempos cortos de CEC que se emplean en la cirugía de recambio valvular aórtico y porque de forma protocolaria reponemos de forma precoz los niveles de fibrinógeno para llevarlos lo más cercanos a los valores basales.

6.3.5. Tromboelastometría y tiempo de coagulación activado (TCA).

Como adelantábamos en el apartado anterior, la Tromboelastometría es la piedra angular en el manejo de la coagulación y sus alteraciones, no solo en la cirugía de recambio valvular aórtico, sino en toda la cirugía cardíaca. Esta actitud viene avalada por pautas similares en la cirugía de este tipo. Aunque Meesters et al. (2018) concluye que la tromboelastometría no predice que pacientes tienen riesgo de sufrir una hemorragia importante, probablemente porque en el estudio incluyen pacientes con antiagregantes, sin antifibrinolíticos, y cirugías urgentes, hay varios autores que si consideran la tromboelastometría como la prueba principal a la hora de predecir el riesgo de sangrado asociado a coagulopatía²⁰⁰⁻²⁰².

De los parámetros tromboelastométricos analizamos HEPTM, INTEM, EXTEM Y FIBTEM. Al igual que en las pruebas básicas de coagulación, no analizamos resultados del tromboelastograma en el periodo de CEC (M2), por lo tanto, comparamos niveles basales y niveles post CEC.

Los resultados que arrojan estas mediciones nos indican que en el INTEM existen diferencias estadísticamente significativas entre M1 y M3 en A10 y en MFC, aunque los valores se mantienen dentro del rango de la normalidad.

Algo similar ocurre con las medidas del EXTEM, en las que las diferencias son significativas en CT y A10, sin que estas sean clínicamente relevantes ya que los valores vuelven a mantenerse dentro de la normalidad.

De especial importancia consideramos los resultados del FIBTEM, que nos revelarían datos de una posible hipofibrinogenemia, y no obtenemos diferencias estadísticamente significativas a pesar de observar un descenso de la MFC entre M1 y M3, manteniéndose también dentro de los niveles normales.

En ninguno de los casos encontramos un tromboelastograma sugestivo de hiperfibrinolisis, algo que se explica porque de forma protocolaria incluimos el tratamiento con ácido tranexámico en nuestro protocolo anestésico.

La ausencia de alteraciones significativas tanto en las pruebas básicas de coagulación como en el tromboelastograma las justificamos porque al tratarse de una cirugía con tiempo de circulación extracorpórea corto y realizada en normotermia los disturbios de coagulación son menores. A ello se une la depuración de la técnica quirúrgica con hemostasia cuidadosa, y el tratamiento precoz de la coagulopatía. En este sentido destacamos el tratamiento que realizamos con fibrinógeno. Erdoes et al. en 2019 elaboran el documento de consenso de la asociación europea de anestesiología cardiotorácica en el que concluyen que la evaluación de la actividad del fibrinógeno mediante las pruebas viscoelásticas (tromboelastometría) después de la retirada de la CEC es una estrategia racional. Asimismo este mismo consenso postula que está indicada la administración de fibrinógeno para mantener la actividad fibrinógena fisiológica en caso de hemorragia microvascular post bypass cardiopulmonar¹⁸³. Si bien es cierto que Kwapisz et al. (2020) en su trabajo concluyen que el tratamiento profiláctico y guiado en el punto de atención con fibrinógeno no reduce la transfusión de productos sanguíneos en un entorno de tasa de transfusión baja (como es el nuestro), si postulan que puede mejorar los parámetros de coagulación en el entorno de la cirugía de alto riesgo²⁰³. Nuestra cirugía no es una cirugía considerada de alto riesgo dentro de las cirugías cardíacas, pero nuestra política de tratamiento de coagulación nos lleva a buscar los límites basales en cuanto a cifras de fibrinógeno, de forma protocolaria. Sería necesario un estudio mas exhaustivo para comprobar si realmente esta actitud clínica reduce las necesidades de concentrados de hematíes en esta cirugía concretamente.

Mención aparte le debemos al tiempo de coagulación activado (TCA). El TCA es la medida universalmente extendida para evaluar, primero los efectos de la administración de heparina, previo a la entrada en CEC, y posteriormente los efectos de reversión derivados de la administración de protamina, en nuestro caso a razón 1:1 con la heparina, una vez ha concluido el periodo de circulación extracorpórea. El TCA es un método bastante eficaz y sobre todo rápido en la evaluación del estado de coagulación del paciente derivado de la administración de heparina. La rapidez en la obtención de resultados permite tomar decisiones de forma precoz, si bien es una medición que no está exenta de limitaciones y que depende en cierto modo, del dispositivo utilizado, ya que cada dispositivo presenta una reproducibilidad y unos sesgos individuales, lo que puede repercutir en el manejo perioperatorio de la heparina²⁰⁴.

El dispositivo que incluimos en nuestro protocolo es el Hemochron® Signature Elite, un dispositivo de uso común, de fácil manejo y reproducibilidad²⁰⁵, si bien es cierto que te obliga a revertir la heparina con dosis fija de protamina (1:1). Sería interesante tener en cuenta que ya hay dispositivos que, tras una muestra de sangre entera permiten estimar la dosis óptima de heparina para alcanzar el TCA adecuado, y a su vez optimizar la dosis de protamina de forma individualizada para revertir de forma precisa la acción de la heparina administrada²⁰⁶.

Los resultados que hemos obtenido en cuanto al valor del TCA basal con respecto al TCA post CEC, aunque son estadísticamente significativos, demuestran que ambos valores están dentro de los límites normales, por lo tanto, al alcanzar un TCA post CEC dentro de los límites normales, interpretamos que la reversión del efecto de la heparina con la administración de protamina ha sido correcta.

6.3.6. Función plaquetaria mediante citometría de flujo.

Como adelantamos en apartados anteriores, la citometría de flujo es una técnica de gran potencial analítico que nos permite, en nuestro caso, determinar la reactividad plaquetaria y el grado de activación plaquetaria. Ya Linden en 2013 postula que la citometría de flujo es una herramienta poderosa y versátil que además de proporcionar datos fenotípicos sobre las plaquetas, arroja información cuantitativa de sus propiedades físicas y antigénicas, incluyendo la expresión superficial de los receptores funcionales, la expresión de los componentes de sus gránulos, la interacción de las plaquetas con otras plaquetas a través de la agregación, o la interacción de otros componentes de la sangre,

como los leucocitos o el sistema de coagulación del plasma²⁰⁷. Pasalic et al. (2017) no solo utilizan la citometría para la evaluación rápida de los receptores de membrana plaquetaria expresado de forma constitutiva para el diagnóstico de trastornos hemorrágicos plaquetarios heredados, medida similar a las que realizamos en nuestro estudio, sino que además incluyen la investigación de las respuestas funcionales plaquetarias basales e inducidas por agonistas, incluyendo la generación de agregados plaquetarios-leucocitarios²⁰⁸, algo que ciertamente no hemos incluido en nuestro estudio, pero que consideramos como una potencial e interesante línea de investigación.

En nuestro estudio hemos incluido el citómetro de flujo FACSCanto® de BD Biosciences, que realiza medidas cumpliendo protocolos estandarizados y reproducibles²⁰⁹.

Como ya adelantamos en los resultados, lo primero que valoramos con la citometría de flujo es el grado de agregación plaquetaria sin estímulo y después añadiendo un agonista denominado TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide). De nuestros resultados se desprende que no hay diferencias significativas en la agregación plaquetaria en respuesta a TRAP, entre los tres grupos experimentales, lo que nos lleva a pensar que el procedimiento de la CEC por sí misma no está alterando la respuesta de las plaquetas al estímulo proagregante de TRAP. Petzold et al. (2020) observan una reducción de las respuestas de agregación plaquetaria para la estimulación con TRAP, probablemente relacionada a que al establecer la derivación cardiopulmonar se produce una hemodilución con caída de hematocrito más acusada que en nuestro caso. En este mismo trabajo encuentran que en el postoperatorio, tras 45 minutos del desclampaje aórtico los niveles de agregación plaquetaria experimentan aumento²¹⁰, a diferencia de nuestra muestra M3 en la que los niveles de agregación se mantienen estables, con la diferencia que en nuestro estudio la muestra de M3 se recoge de forma más temprana.

Otra de las medidas a evaluar es la variación de la agregación plaquetaria y relacionar esta con la hemólisis. Para ello, como se refleja en el apartado de los resultados, medimos la agregación plaquetaria en presencia de NO. Los resultados demuestran que, en presencia de NO, se produce inhibición de la agregación plaquetaria en las tres muestras, es decir, existe NO disponible para ejercer su función antiagregante.

Kobsar et al (2014) en su trabajo demuestran que NONOate conduce a una activación rápida y transitoria de los sistemas inhibidores de las plaquetas, acompañado de una disminución de la agregación plaquetaria inducida por agonistas a dosis bajas²¹¹. Si bien este artículo ratifica la disminución de la agregación que nosotros encontramos en los resultados, no pone en relación la biodisponibilidad del NO y la hemólisis. En este

sentido, Kato et al. (2017) en sus estudios sobre hemólisis en la fisiopatología de la enfermedad de células falciformes, sientan las bases de la “hipótesis de la hemólisis”, en la que observan que en presencia de hemólisis intravascular, el NO plasmático se agota, porque es captado por la hemoglobina libre plasmática¹⁰³. Extrapolando a nuestros resultados vemos un claro descenso de la agregación plaquetaria en los tres grupos experimentales en presencia de NONOate; dato que interpretamos como que la biodisponibilidad del NO durante la CEC como posteriormente a la misma es lo suficientemente alta para ejercer su inhibición en la agregación plaquetaria. De manera que, si existe disponibilidad del NO, significa que la cantidad de hemoglobina libre no es lo suficientemente importante como para captar el NO en su totalidad, signo de que la hemólisis generada por la circulación extracorpórea no está siendo significativa.

Siguiendo con la valoración de la hemólisis utilizamos el método de la fosforilación de la proteína VASP medido por fluorescencia (median fluorescence). Los resultados en presencia de NO expresan un aumento muy importante de fosforilación de la proteína VASP (dependiente como dijimos de la PKG, que a su vez depende del NO²¹²), dato que refleja una vez más la alta disponibilidad de NO. Este resultado apoya que la hemólisis producida durante la cirugía de recambio valvular aórtico no es significativa, ya que no se genera hemoglobina libre suficiente para captar el NO. La fosforilación de la proteína VASP ha sido utilizada para investigar el valor del índice de reactividad plaquetaria, incluso para predecir los eventos cardíacos adversos tras la angioplastia, evaluando la respuesta individual a la dosis de carga del clopidogrel²¹³. De hecho, algunos autores sugieren que la monitorización plaquetaria mediante el índice de VASP es seguro para el ajuste de la dosis de carga de clopidogrel en pacientes sometidos a ICP²¹⁴, sin embargo no era nuestro objeto de estudio, sino valernos de una herramienta que es un excelente monitor plaquetario, para de forma indirecta valorar la hemólisis, evaluando sus resultados en presencia de NO.

La medida por median fluorescence nos permite también medir la expresión de la P-selectina, utilizando el agonista TRAP. Con respecto a los resultados obtenidos analizamos dos apartados: 1) En respuesta al agonista, la expresión de P-selectina se mantiene en M2 e incluso presenta un ligero descenso en M3, algo que se puede interpretar como que la cirugía con CEC no solo no aumenta la activación de las plaquetas, sino que podría disminuirla. Sobre este tema encontramos referencias antiguas como por ejemplo Rinder et al. (1991) que aseguran que el by pass cardiopulmonar provoca una constelación de defectos plaquetarios, que incluyen activación y deterioro

de agregación, algo que no ocurre en nuestro estudio, probablemente por la depuración en las técnicas de CEC en las que se ha optimizado la hemodilución y sobre todo las técnicas de perfusión. Además, la cirugía de recambio valvular aórtico, suele ser de menor duración y complejidad que la cirugía coronaria, que era mayoritaria en el citado estudio. Un estudio en niños concluye que el aumento de la función plaquetaria que se observa en niños sometidos a cirugías cardíacas por malformaciones congénitas podría ser un mecanismo de compensación ante la disminución del recuento de plaquetas que observan en la CEC²¹⁵. Si bien la población infantil merece mención aparte, en nuestro caso los niveles de plaquetas se mantuvieron en el rango de la normalidad. 2) La expresión de la P-selectina en presencia de NO. Observamos que los niveles de expresión de P-selectina disminuyen tanto en M2 como en M3, reflejando una gran disponibilidad del NO para ejercer su efecto inhibitor de la activación de las plaquetas, lo que viene a ratificar la idea de que el grado de hemólisis generado por la CEC en nuestra cirugía es mínimo, en tanto en cuanto no existe suficientemente hemoglobina libre para captar el NO.

Un aspecto muy importante dentro de la cirugía cardíaca es el grado de hemólisis que se genera, durante la cirugía con la circulación extracorpórea, y las implicaciones que la hipotética hemólisis generada tiene sobre la hemostasia y sus implicaciones clínicas. De hecho se han hecho muchos esfuerzos por minimizar la hemólisis, mejorando las condiciones, así, Tan et al. (2020) en su reciente estudio, en un afán por mejorar la hemólisis, demostraron que la CEC pulsátil con bombas de rodillo da lugar a un mayor grado de hemólisis, sin concretar su importancia clínica²¹⁶. En nuestro caso dentro de la técnica de CEC utilizamos bomba centrífuga y flujo continuo.

La hemólisis como tal es determinada por la medición de los conocidos como marcadores de hemólisis: hemoglobina libre, haptoglobina, LDH y bilirrubina. Los marcadores más utilizados son hemoglobina libre y haptoglobina, de hecho Dafour (2020) utiliza la medida de hemoglobina libre para evaluar la gravedad de la hemólisis, apreciada directamente por la concentración de esta en plasma, ya que puede expresarse con distinta intensidad, desde una hemólisis no alarmante y tolerable hasta una altamente tóxica en pacientes con asistencia ventricular²¹⁷. En este estudio no hemos medido hemoglobina libre de forma directa, sí el resto de los marcadores de hemólisis, incluido LDH, la cual hay autores que defienden como medición más sensible y más rápida que la hemoglobina libre, como ya se adelantó en el apartado de marcadores bioquímicos.

Una de las herramientas importantes y que nos ha aportado mucha información sobre hemólisis y comportamiento de las plaquetas con relación a la CEC, ha sido la utilización

del NO. Hay varios estudios que asocian los mecanismos de hemólisis y la activación plaquetaria evaluando el comportamiento del nítrico, de hecho, Helms et al. (2013), con el objetivo de dilucidar el mecanismo de la activación plaquetaria mediada por la hemólisis, concluyen que la liberación de hemoglobina libre potencia la activación plaquetaria al disminuir la biodisponibilidad del NO²¹⁸. Nosotros hemos utilizado, junto con las medidas tradicionales de hemólisis, la mayor o menor activación plaquetaria en presencia de NO, para valorar su biodisponibilidad y así de forma indirecta estimar los niveles de hemoglobina libre. Dado que ya hay autores que destacan que la hemólisis parece contribuir de forma importante a alteraciones postoperatorias, al limitar la biodisponibilidad del NO²¹⁹, estas mediciones adquieren importancia de cara a mejorar los resultados en la cirugía con CEC.

Los datos derivados de la biodisponibilidad del NO y del resto de mediciones relacionadas con la hemólisis, nos informan de que la cirugía valvular aórtica en nuestros pacientes no genera un grado de hemólisis suficientemente alto como para que sea clínicamente significativa.

A su vez, estos resultados abren nuevas líneas de investigación: los agregados plaquetas-leucocitos, que ya representan marcadores de muchas enfermedades tromboembólicas, como las enfermedades cardiovasculares, la lesión pulmonar aguda y la lesión renal y cerebral¹⁵⁸, podrían tener un papel interesante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria inducida por la CEC y su medición podría ayudarnos a entender mejor dicha respuesta y su relación con los fenómenos trombóticos postoperatorios. Por otro lado, de gran interés sería el papel de los gasotransmisores en el contexto de la cirugía con CEC. Hemos visto que el NO tiene importante implicación en la agregación plaquetaria, y que esta se puede ver afectada en presencia de hemólisis. Está demostrado que los gasomediadores CO, y H₂S, junto con el NO tienen su papel en la hemostasia, y además tienen otros posibles mecanismos de acción sobre las plaquetas, activándolas²²⁰. Parece bastante claro la relación sinérgica del NO con el H₂S y además hay que unirle la posibilidad existente de que el NO induzca la producción de CO²²¹. De forma general podríamos decir que los gasomediadores interactúan entres sí, por lo que sería una interesante línea de investigación, averiguar hasta qué punto están los gasotransmisores implicados en los mecanismos de hemostasia implicados en la CEC y como influyen estos en el pronóstico de los pacientes sometidos a cirugía con circulación extracorpórea.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. En términos generales, durante la cirugía de recambio valvular aórtico con CEC, no se han registrado alteraciones de la hemostasia, ya que los parámetros analizados se han mantenido dentro de los rangos de normalidad, aunque hayan tenido variaciones estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.
2. Durante la cirugía de recambio valvular aórtico con CEC, la hemólisis que se produce no es lo suficientemente importante como para que se produzcan alteraciones de la hemostasia, entendida como tal como alteraciones de las plaquetas y la coagulación, que se han mantenido dentro de los rangos de normalidad, aunque hayan tenido variaciones estadísticamente significativas.
3. La cirugía valvular aórtica con circulación extracorpórea produce un descenso en la hemoglobina basal que es estadísticamente significativo si bien se mantiene dentro de los niveles normales. Dentro de los parámetros bioquímicos analizados (creatinina y lactato), han existido diferencias estadísticamente significativas respecto a las medidas basales, pero ambos parámetros se han mantenido dentro de los niveles normales, descartando, por tanto, alteraciones renales y derivadas de hipoperfusión periférica.
4. Los valores de TP y fibrinógeno, dentro de los valores del básico de coagulación, sufren diferencias estadísticamente significativas tras la CEC, respecto a los basales, pero se mantienen dentro de los niveles normales. El TCA, a su vez, presenta cambios estadísticamente significativos, pero manteniéndose en los niveles normales, por lo que concluimos que la reversión de la heparina es completa.
5. Los valores corregidos de la tromboelastometría muestran alteración de éstos en la cirugía con CEC, sin que dichos cambios supongan alteraciones clínicamente significativas de la coagulación ya que los datos analizados, a pesar de los cambios, se mantuvieron en el rango de la normalidad.

6. En los parámetros bioquímicos de hemólisis encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de haptoglobina y LDH respecto a los basales, datos que indican cierto grado de hemólisis producido por la CEC y tras la finalización de la CEC. A pesar de ello, los valores tanto de haptoglobina como de LDH se mantienen dentro de los límites normales. Los niveles de bilirrubina no experimentan cambios. Estos resultados apoyan la conclusión de que la hemólisis de la población estudiada sometida a recambio valvular aórtico no es clínicamente significativa.
7. En presencia de NONOate se observa una clara inhibición de la reactividad plaquetaria, así como un aumento de la fosforilación de VASP en los tres grupos experimentales, lo que nos lleva a concluir que la biodisponibilidad del NO es lo suficientemente alta como para ejercer su efecto inhibitorio sobre las plaquetas. Este hallazgo apoya la conclusión de que la hemólisis de la población estudiada sometida a recambio valvular aórtico no es clínicamente significativa.
8. A partir del análisis de todos los resultados de nuestro estudio podemos concluir que, durante la cirugía de recambio valvular aórtico con CEC, la hemólisis que se produce no es lo suficientemente importante como para que se generen alteraciones de la hemostasia en los pacientes estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Riddel JP, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2007;24(3):123-131. doi:10.1177/1043454206298693
2. Furie B, Furie BC. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med.* 2008;359(9):938-949. doi:10.1056/NEJMra0801082
3. *Furie B, Furie BC. Molecular Basis of Blood Coagulation. En: Hematology. Basic Principles and Practice. 5th Edition. Hoffman R et Al (Eds). Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, USA 2009;Pp 1819-1836.No Title.*
4. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):958-965. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434702>.
5. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kotova YN, et al. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood.* 2016;128(13):1745-1755. doi:10.1182/blood-2016-02-696898
6. Gravastrand CS, Steinkjer B, Halvorsen B, et al. Cholesterol Crystals Induce Coagulation Activation through Complement-Dependent Expression of Monocytic Tissue Factor. *J Immunol.* 2019;203(4):853-863. doi:10.4049/jimmunol.1900503
7. Davison GM, Nkambule BB, Mkandla Z, et al. Platelet, monocyte and neutrophil activation and glucose tolerance in South African Mixed Ancestry individuals. *Sci Rep.* 2017;7. doi:10.1038/srep40329
8. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. 2007. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141911
9. Rao LVM, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):47-56. doi:10.1161/01.ATV.0000151624.45775.13
10. Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 71:33.
11. Jesty J. The inhibition of activated bovine coagulation factors X and VII by antithrombin III. *Arch Biochem Biophys.* 1978;185(1):165-173. doi:10.1016/0003-

- 9861(78)90156-X
12. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1504-1514. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00298.x
 13. Riddel JP, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2007;24(3):123-131. doi:10.1177/1043454206298693
 14. Crawley JTB, Zanardelli S, Chion CKNK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2007;5(SUPPL. 1):95-101. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x
 15. Senzel L, Gnatenko D V., Bahou WF. The platelet proteome. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(5):329-333. doi:10.1097/MOH.0b013e32832e9dc6
 16. Yeaman MR, Norman DC, Bayer AS. Platelet microbicidal protein enhances antibiotic-induced killing of and postantibiotic effect in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(8):1665-1670. doi:10.1128/AAC.36.8.1665
 17. Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: Bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007;100(1):27-40. doi:10.1161/01.RES.0000252802.25497.b7
 18. P. W. The nature and significance of platelets products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13:269-288.
 19. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010;78(9):838-848. doi:10.1038/ki.2010.278
 20. Microvesicles - potential biomarkers for the interrelations atherosclerosis/type 2 diabetes mellitus - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25607382/>. Accessed December 15, 2020.
 21. Sluijter JPG, Verhage V, Deddens JC, Van Den Akker F, Doevendans PA. SPOTLIGHT REVIEW Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. doi:10.1093/cvr/cvu022
 22. Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(10):1171-1182. doi:10.1016/j.bcp.2011.02.011
 23. Liu ML, Williams KJ, Werth VP. Microvesicles in Autoimmune Diseases. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Vol 77. Academic Press Inc.; 2016:125-175.

- doi:10.1016/bs.acc.2016.06.005
24. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost.* 2007;97(3):425-434. doi:10.1160/TH06-06-0313
 25. Chen Y, Li G, Liu ML. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* 2018;16(1):50-62. doi:10.1016/j.gpb.2017.03.006
 26. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-358. doi:10.1152/physrev.00016.2011
 27. Kailashiya J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Anal Biochem.* 2018;546:78-85. doi:10.1016/j.ab.2018.01.030
 28. Lopez Farre A MC. No Title. *rev esp cardiol.* 2013;enero(13):2-7.
 29. Alhasan AA, Izuogu OG, Al-Balool HH, et al. e-Blood Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation. 2016. doi:10.1182/blood-2015-06
 30. Schubert S, Weyrich AS, Rowley JW. A tour through the transcriptional landscape of platelets. 2014. doi:10.1182/blood-2014-04-512756
 31. Pleines I, Lebois M, Gangatirkar P, et al. *Intrinsic Apoptosis Circumvents the Functional Decline of Circulating Platelets but Does Not Cause the Storage Lesion.*; 2018. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/132/2/197/1407750/blood816355.pdf>.
 32. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(3):166-179. doi:10.1038/s41569-018-0110-0
 33. Tirnaksiz E, Pamukcu B, Oflaz H, Nisanci Y. Effect of high dose statin therapy on platelet function; statins reduce aspirin resistant platelet aggregation in patients with coronary heart disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2009;27(1):24-28. doi:10.1007/s11239-007-0154-1
 34. Chen C, Chai H, Wang X, et al. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood.* 2008;112(8):3205-3216. doi:10.1182/blood-2008-03-143479
 35. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3378-3384. doi:10.1172/JCI27196
 36. Tselepis AD, Gerotziafas G, Andrikopoulos G, Anninos H, Vardas P. Mechanisms

- of platelet activation and modification of response to antiplatelet agents. *Hell J Cardiol.* 2011;52(2):128-140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21478123/>. Accessed January 11, 2021.
37. De Witt SM, Swieringa F, Cavill R, et al. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation. *Nat Commun.* 2014;5. doi:10.1038/ncomms5257
 38. Ferroni P, Martini F, Riondino S, et al. Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation. *Clin Chim Acta.* 2009;399(1-2):88-91. doi:10.1016/j.cca.2008.09.018
 39. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):264-274. doi:10.1038/nri2956
 40. Herter JM, Rossaint J, Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1764-1775. doi:10.1111/jth.12730
 41. Santilli F, Basili S, Ferroni P, Davì G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern Emerg Med.* 2007;2(4):256-268. doi:10.1007/s11739-007-0076-0
 42. Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J.* 2010;31(1). doi:10.1093/eurheartj/ehp504
 43. Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davì G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2012;13(1):27-42. doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00930.x
 44. Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 1999;18(1):37-48. doi:10.1093/emboj/18.1.37
 45. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost.* 2007;5(3):490-496. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02387.x
 46. Vizioli L, Muscari S, Muscari A. The relationship of mean platelet volume with the risk and prognosis of cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract.* 2009;63(10):1509-1515. doi:10.1111/j.1742-1241.2009.02070.x
 47. Ranucci M. Hemostatic and thrombotic issues in cardiac surgery. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41(1):84-90. doi:10.1055/s-0034-1398383
 48. Chung JH, Gikakis N, Rao AK, Drake TA, Colman RW, Edmunds LH. Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary

- bypass. *Circulation*. 1996;93(11):2014-2018. doi:10.1161/01.CIR.93.11.2014
49. Boisclair MD, Lane DA, Philippou H, et al. Mechanisms of thrombin generation during surgery and cardiopulmonary bypass. *Blood*. 1993;82(11):3350-3357. doi:10.1182/blood.v82.11.3350.bloodjournal82113350
50. De Somer F, Van Belleghem Y, Caes F, et al. Tissue factor as the main activator of the coagulation system during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123(5):951-958. doi:10.1067/mtc.2002.120334
51. Ranucci M, Baryshnikova E. Inflammation and coagulation following minimally invasive extracorporeal circulation technologies. *J Thorac Dis*. 2019;11(Suppl 10):S1480-S1488. doi:10.21037/jtd.2019.01.27
52. Ranucci M, Frigiola A, Menicanti L, Ditta A, Boncilli A, Brozzi S. Postoperative antithrombin levels and outcome in cardiac operations. *Crit Care Med*. 2005;33(2):355-360. doi:10.1097/01.CCM.0000153409.55645.58
53. Verrier ED, Boyle EM, Spiess BD. *Endothelial Cell Injury in Cardiovascular Surgery: The Procoagulant Response*. Vol 62.; 1996.
54. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: Hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg*. 2009;108(5):1433-1446. doi:10.1213/ane.0b013e31819bcc9c
55. Yang L, Vuylsteke A, Gerrard C, Besser M, Baglin T. Postoperative fibrinogen level is associated with postoperative bleeding following cardiothoracic surgery and the effect of fibrinogen replacement therapy remains uncertain. *J Thromb Haemost*. 2013;11(8):1519-1526. doi:10.1111/jth.12304
56. Kindo M, Hoang Minh T, Gerelli S, et al. Plasma fibrinogen level on admission to the intensive care unit is a powerful predictor of postoperative bleeding after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Thromb Res*. 2014;134(2):360-368. doi:10.1016/j.thromres.2014.05.008
57. Raphael J, Mazer CD, Subramani S, et al. Society of Cardiovascular Anesthesiologists Clinical Practice Improvement Advisory for Management of Perioperative Bleeding and Hemostasis in Cardiac Surgery Patients. *Anesth Analg*. 2019;129(5):1209-1221. doi:10.1213/ANE.0000000000004355
58. Ranucci M, Baryshnikova E, Ciotti E, Ranucci M, Silvetti S. Hemodilution on Cardiopulmonary Bypass: Thromboelastography Patterns and Coagulation-Related Outcomes. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2017;31(5):1588-1594. doi:10.1053/j.jvca.2017.04.014

59. Rizoli S. PlasmaLyte. *J Trauma - Inj Infect Crit Care*. 2011;70(5 SUPPL.). doi:10.1097/TA.0b013e31821a4d89
60. Galeone A, Rotunno C, Guida P, et al. Monitoring incomplete heparin reversal and heparin rebound after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013;27(5):853-858. doi:10.1053/j.jvca.2012.10.020
61. Ternström L, Radulovic V, Karlsson M, et al. Plasma activity of individual coagulation factors, hemodilution and blood loss after cardiac surgery: A prospective observational study. *Thromb Res*. 2010;126(2). doi:10.1016/j.thromres.2010.05.028
62. Bosch YPJ, Al Dieri R, Ten Cate H, et al. Measurement of thrombin generation intra-operatively and its association with bleeding tendency after cardiac surgery. *Thromb Res*. 2014;133(3):488-494. doi:10.1016/j.thromres.2013.12.017
63. Tanaka KA, Mazzeffi MA, Grube M, Ogawa S, Chen EP. Three-factor prothrombin complex concentrate and hemostasis after high-risk cardiovascular surgery. *Transfusion*. 2013;53(4):920-921. doi:10.1111/trf.12110
64. Arnékian V, Camous J, Fattal S, Rézaiguia-Delclaux S, Nottin R, Stéphan F. Use of prothrombin complex concentrate for excessive bleeding after cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012;15(3):382-389. doi:10.1093/icvts/ivs224
65. Gill R, Herbertson M, Vuylsteke A, et al. Safety and efficacy of recombinant activated factor VII: A randomized placebo-controlled trial in the setting of bleeding after cardiac surgery. *Circulation*. 2009;120(1):21-27. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.834275
66. Levi M, Peters M, Büller HR. Efficacy and safety of recombinant factor VIIa for treatment of severe bleeding: A systematic review. *Crit Care Med*. 2005;33(4):883-890. doi:10.1097/01.CCM.0000159087.85970.38
67. Faraoni D, Willems A, Savan V, Demanet H, De Ville A, Van Der Linden P. Plasma fibrinogen concentration is correlated with postoperative blood loss in children undergoing cardiac surgery: A retrospective review. *Eur J Anaesthesiol*. 2014;31(6):317-326. doi:10.1097/EJA.0000000000000043
68. Ranucci M, Solomon C. Supplementation of fibrinogen in acquired bleeding disorders: Experience, evidence, guidelines, and licences. *Br J Anaesth*. 2012;109(2):135-137. doi:10.1093/bja/aes227
69. Ferraris VA, Brown JR, Despotis GJ, et al. 2011 update to the society of thoracic surgeons and the society of cardiovascular anesthesiologists blood conservation

- clinical practice guidelines. *Ann Thorac Surg.* 2011;91(3):944-982. doi:10.1016/j.athoracsur.2010.11.078
70. Pickard AS, Becker RC, Schumock GT, Frye CB. Clopidogrel-associated bleeding and related complications in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Pharmacotherapy.* 2008;28(3):376-392. doi:10.1592/phco.28.3.376
71. Berger JS, Frye CB, Harshaw Q, Edwards FH, Steinhubl SR, Becker RC. Impact of Clopidogrel in Patients With Acute Coronary Syndromes Requiring Coronary Artery Bypass Surgery. A Multicenter Analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(21):1693-1701. doi:10.1016/j.jacc.2008.08.031
72. Ferraris VA, Ferraris SP, Saha SP, et al. Perioperative Blood Transfusion and Blood Conservation in Cardiac Surgery: The Society of Thoracic Surgeons and The Society of Cardiovascular Anesthesiologists Clinical Practice Guideline. *Ann Thorac Surg.* 2007;83(5 SUPPL.). doi:10.1016/j.athoracsur.2007.02.099
73. Fitchett D, Eikelboom J, Fremes S, et al. Dual antiplatelet therapy in patients requiring urgent coronary artery bypass grafting surgery: A position statement of the Canadian Cardiovascular Society. *Can J Cardiol.* 2009;25(12):683-689. doi:10.1016/S0828-282X(09)70527-6
74. Early activation of hemostasis during cardiopulmonary bypass: evidence for thrombin mediated hyperfibrinolysis - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1440486/>. Accessed January 16, 2021.
75. Levi M, Cromheecke ME, Jonge E De, et al. Pharmacological strategies to decrease excessive blood loss in cardiac surgery: A meta-analysis of clinically relevant endpoints. *Lancet.* 1999;354(9194):1940-1947. doi:10.1016/S0140-6736(99)01264-7
76. Mangano DT, Miao Y, Vuylsteke A, et al. Mortality associated with aprotinin during 5 years following coronary artery bypass graft surgery. *J Am Med Assoc.* 2007;297(5):471-479. doi:10.1001/jama.297.5.471
77. Murkin JM, Falter F, Granton J, Young B, Burt C, Chu M. High-dose tranexamic acid is associated with nonischemic clinical seizures in cardiac surgical patients. *Anesth Analg.* 2010;110(2):350-353. doi:10.1213/ANE.0b013e3181c92b23
78. Hill J, Treasure T. Reducing the risk of venous thromboembolism (deep vein thrombosis and pulmonary embolism) in inpatients having surgery: Summary of NICE guidance. *Br Med J.* 2007;334(7602):1053-1054. doi:10.1136/bmj.39174.678032.AD

79. Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: A review in search of a treatment algorithm. *J Extra Corpor Technol.* 2008;40(4):257-267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19192755/>. Accessed December 3, 2020.
80. Sutura SP, Mehrjardi MH. Deformation and fragmentation of human red blood cells in turbulent shear flow. *Biophys J.* 1975;15(1):1-10. doi:10.1016/S0006-3495(75)85787-0
81. Vieira FU, Antunes N, Vieira RW, Álvares LMP, Costa ET. Hemólise na circulação extracorpórea: Correlação com tempo e procedimentos realizados. *Brazilian J Cardiovasc Surg.* 2012;27(4):535-541. doi:10.5935/1678-9741.20120095
82. Pierangeli A, Masieri V, Bruzzi F, et al. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: How to reduce the free haemoglobin by managing the suctioned blood separately. *Perfusion.* 2001;16(6):519-524. doi:10.1177/026765910101600612
83. Ashraf S. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass. In: *Techniques in Extracorporeal Circulation, Fourth Edition.* Vol 112. CRC Press; 2004:117-132. doi:10.1378/chest.112.3.676
84. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem.* 1996;42(10):1589-1600. doi:10.1093/clinchem/42.10.1589
85. Na N, Ouyang J, Taes YEC, Delanghe JR. Serum free hemoglobin concentrations in healthy individuals are related to haptoglobin type [5]. *Clin Chem.* 2005;51(9):1754-1755. doi:10.1373/clinchem.2005.055657
86. Carter K, Worwood M. Haptoglobin: A review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol.* 2007;29(2):92-110. doi:10.1111/j.1751-553X.2007.00898.x
87. Mumby S, Koh TW, Pepper JR, Gutteridge JMC. Risk of iron overload is decreased in beating heart coronary artery surgery compared to conventional bypass. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2001;1537(3):204-210. doi:10.1016/S0925-4439(01)00070-9
88. Mumby S, Chaturvedi RR, Brierley J, et al. Iron overload in paediatrics undergoing cardiopulmonary bypass. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2000;1500(3):342-348. doi:10.1016/S0925-4439(00)00003-X
89. Schulman IH, Hare JM. Regulation of cardiovascular cellular processes by S-

- nitrosylation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2012;1820(6):752-762. doi:10.1016/j.bbagen.2011.04.002
90. Jeffers A, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Computation of plasma hemoglobin nitric oxide scavenging in hemolytic anemias. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(10):1557-1565. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.017
91. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *J Am Med Assoc.* 2005;293(13):1653-1662. doi:10.1001/jama.293.13.1653
92. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002;8(12):1383-1389. doi:10.1038/nm1202-799
93. Gladwin MT, Lancaster JR, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: A view through the SNO-storm. *Nat Med.* 2003;9(5):496-500. doi:10.1038/nm0503-496
94. Schnog JJB, Jager EH, van der Dijs FPL, et al. Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2004;83(6):371-375. doi:10.1007/s00277-004-0856-9
95. Azizi E, Dror Y, Wallis K. Arginase activity in erythrocytes of healthy and ill children. *Clin Chim Acta.* 1970;28(3):391-396. doi:10.1016/0009-8981(70)90063-X
96. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987;92(3):639-646. doi:10.1111/j.1476-5381.1987.tb11367.x
97. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. ENDOGENOUS NITRIC OXIDE INHIBITS HUMAN PLATELET ADHESION TO VASCULAR ENDOTHELIUM. *Lancet.* 1987;330(8567):1057-1058. doi:10.1016/S0140-6736(87)91481-4
98. Schäfer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid Regulation of Platelet Activation in Vivo by Nitric Oxide. *Circulation.* 2004;109(15):1819-1822. doi:10.1161/01.CIR.0000126837.88743.DD
99. Broekman MJ, Eiroa AM, Marcus AJ. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: Blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive

- mechanism. *Blood*. 1991;78(4):1033-1040. doi:10.1182/blood.v78.4.1033.1033
100. Catani MV, Bernassola F, Rossi A, Melino G. Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;249(1):275-278. doi:10.1006/bbrc.1998.9130
 101. Shao J, Miyata T, Yamada K, et al. Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(10):2088-2097. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11562407/>. Accessed January 19, 2021.
 102. Kayanoki Y, Kawata S, Yamasaki E, et al. Reduced nitric oxide production by L-arginine deficiency in lysinuric protein intolerance exacerbates intravascular coagulation. *Metabolism*. 1999;48(9):1136-1140. doi:10.1016/S0026-0495(99)90127-0
 103. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017;127(3):750-760. doi:10.1172/JCI89741
 104. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4. doi:10.1038/nrdp.2018.10
 105. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*. 1998;273(30):18709-18713. doi:10.1074/jbc.273.30.18709
 106. Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:585-600. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.092501.104328
 107. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: A physiological messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:175-195. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.001135
 108. Kots AY, Martin E, Sharina IG, Murad F. A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;191(191):1-14. doi:10.1007/978-3-540-68964-5_1
 109. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res*. 2010;106(4):633-646. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.207381
 110. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*. 2003;9(4):160-168. doi:10.1016/S1471-4914(03)00028-5
 111. Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, et al. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell*. 2003;115(2):139-150. doi:10.1016/S0092-8674(03)00803-1

112. Lai TS, Hausladen A, Slaughter TF, Eu JP, Stamler JS, Greenberg CS. Calcium regulates S-nitrosylation, denitrosylation, and activity of tissue transglutaminase. *Biochemistry*. 2001;40(16):4904-4910. doi:10.1021/bi002321t
113. Huang B, Chen SC, Wang DL. Shear flow increases S-nitrosylation of proteins in endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2009;83(3):536-546. doi:10.1093/cvr/cvp154
114. Morrell CN, Matsushita K, Chiles K, et al. Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(10):3782-3787. doi:10.1073/pnas.0408310102
115. Feil R, Lohmann SM, De Jonge H, Walter U, Hofmann F. Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases and the Cardiovascular System: Insights from Genetically Modified Mice. *Circ Res*. 2003;93(10):907-916. doi:10.1161/01.RES.0000100390.68771.CC
116. Beghetti M, Sparling C, Cox PN, Stephens D, Adatia I. Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy human volunteers. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2003;285(2 54-2). doi:10.1152/ajpheart.00622.2002
117. Brüne B, Lapetina EG. Properties of a novel nitric oxide-stimulated ADP-ribosyltransferase. *Arch Biochem Biophys*. 1990;279(2):286-290. doi:10.1016/0003-9861(90)90493-I
118. Pernollet MG, Lantoine F, Devynck MA. Nitric Oxide Inhibits ATP-Dependent CA²⁺ Uptake into Platelet Membrane Vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;222(3):780-785. doi:10.1006/bbrc.1996.0821
119. Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: The molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. In: *Thrombosis and Haemostasis*. Vol 86. Schattauer GmbH; 2001:214-221. doi:10.1055/s-0037-1616219
120. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11071625/>. Accessed January 25, 2021.
121. Polgár J, Chung SH, Reed GL. Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood*. 2002;100(3):1081-1083. doi:10.1182/blood.V100.3.1081
122. Polgár J, Reed GL. A critical role for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) in platelet granule secretion. *Blood*. 1999;94(4):1313-1318.

- doi:10.1182/blood.v94.4.1313
123. Kozlov G, Määttänen P, Thomas DY, Gehring K. A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J.* 2010;277(19):3924-3936. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07793.x
 124. Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJM, Thomas DY. Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(5):500-511. doi:10.1016/j.semcdb.2010.03.006
 125. Noiva R. Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(5):481-493. doi:10.1006/scdb.1999.0319
 126. Jurk K, Lahav J, Van Aken H, Brodde MF, Nofer JR, Kehrel BE. Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2278-2290. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04509.x
 127. Khan HA, Mutus B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front Chem.* 2014;2(AUG). doi:10.3389/fchem.2014.00070
 128. Laurindo FRM, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CXC. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: Pathophysiological implications in vascular diseases. *Antioxidants Redox Signal.* 2008;10(6):1101-1113. doi:10.1089/ars.2007.2011
 129. Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res.* 2014;114(7):1162-1173. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301808
 130. Lowenstein CJ. Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2007;75(2):240-246. doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.024
 131. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, et al. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science (80-).* 1999;284(5414):651-654. doi:10.1126/science.284.5414.651
 132. Lau K, Shah H, Kelleher A, Moat N. Coronary artery surgery: Cardiomy suction or cell salvage? *J Cardiothorac Surg.* 2007;2(1). doi:10.1186/1749-8090-2-46
 133. Tanaka K, Kanamori Y, Sato T, et al. Administration of haptoglobin during cardiopulmonary bypass surgery. *ASAIO Trans.* 1991;37(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1721515/>. Accessed January 22, 2021.
 134. Algahtani M, Heptinstall S. Novel strategies for assessing platelet reactivity.

- Future Cardiol.* 2017;13(1):33-47. doi:10.2217/fca-2016-0054
135. Campo G, Fileti L, Valgimigli M, et al. Poor response to clopidogrel: Current and future options for its management. *J Thromb Thrombolysis.* 2010;30(3):319-331. doi:10.1007/s11239-010-0457-5
136. Frontroth JP. Light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2013;992:227-240. doi:10.1007/978-1-62703-339-8_17
137. Lordkipanidzé M, Lowe GC, Kirkby NS, et al. Characterization of multiple platelet activation pathways in patients with bleeding as a high-throughput screening option: Use of 96-well Optimul assay. *Blood.* 2014;123(8). doi:10.1182/blood-2013-08-520387
138. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods.* 1980;3(2):135-158. doi:10.1016/0160-5402(80)90024-8
139. Hazarbasanov D, Velchev V, Finkov B, et al. Tailoring clopidogrel dose according to multiple electrode aggregometry decreases the rate of ischemic complications after percutaneous coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;34(1):85-90. doi:10.1007/s11239-012-0684-z
140. Rosengart TK, Romeiser JL, White LJ, et al. Platelet activity measured by a rapid turnaround assay identifies coronary artery bypass grafting patients at increased risk for bleeding and transfusion complications after clopidogrel administration. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;146(5). doi:10.1016/j.jtcvs.2013.06.029
141. Reed GW, Kumar A, Guo J, et al. Point-of-care platelet function testing predicts bleeding in patients exposed to clopidogrel undergoing coronary artery bypass grafting: Verify pre-op TIMI 45 - A pilot study. *Clin Cardiol.* 2015;38(2):92-98. doi:10.1002/clc.22357
142. Fox SC, Sasae R, Janson S, May JA, Heptinstall S. Quantitation of platelet aggregation and microaggregate formation in whole blood by flow cytometry. *Platelets.* 2004;15(2):85-93. doi:10.1080/09537100310001645979
143. Iyú D, Glenn JR, White AE, Fox SC, Heptinstall S. Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of a P2Y12 antagonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(2):416-422. doi:10.1161/ATVBAHA.110.219501
144. Iyú D, Glenn JR, White AE, et al. Mode of action of P2Y12 antagonists as inhibitors of platelet function. *Thromb Haemost.* 2011;105(1):96-106.

- doi:10.1160/TH10-07-0482
145. Algahtani M, Heptinstall S. Novel strategies for assessing platelet reactivity. *Future Cardiol.* 2017;13(1):33-47. doi:10.2217/fca-2016-0054
 146. Glenn JR, Dovlatova N, White AE, Dhillon K, Heptinstall S, Fox SC. "VASPFix" for measurement of VASP phosphorylation in platelets and for monitoring effects of P2Y12 antagonists. *Thromb Haemost.* 2013;111(3):539-548. doi:10.1160/TH13-07-0581
 147. Johnson A, Dovlatova N, Heptinstall S. Multiple electrode aggregometry and P2Y12 antagonists. *Thromb Haemost.* 2008;99(6):1127-1129. doi:10.1160/TH08-01-0054
 148. Berger PB, Kirchner HL, Wagner ES, et al. Does preoperative platelet function predict bleeding in patients undergoing off pump coronary artery bypass surgery? *J Interv Cardiol.* 2015;28(3):223-232. doi:10.1111/joic.12200
 149. Bekendam RH, Iyu D, Passam F, et al. Protein disulfide isomerase regulation by nitric oxide maintains vascular quiescence and controls thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2018;16(11):2322-2335. doi:10.1111/jth.14291
 150. Stopa JD, Neuberg D, Puligandla M, Furie B, Flaumenhaft R, Zwicker JJ. Protein disulfide isomerase inhibition blocks thrombin generation in humans by interfering with platelet factor V activation. *JCI Insight.* 2017;2(1). doi:10.1172/jci.insight.89373
 151. Papapetropoulos A, Foresti R, Ferdinandy P. Pharmacology of the "gasotransmitters" NO, CO and H₂S: Translational opportunities. *Br J Pharmacol.* 2015;172(6):1395-1396. doi:10.1111/bph.13005
 152. Pálinkás Z, Furtmüller PG, Nagy A, et al. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *Br J Pharmacol.* 2015;172(6):1516-1532. doi:10.1111/bph.12769
 153. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *Br J Pharmacol.* 2015;172(6):1587-1606. doi:10.1111/bph.12811
 154. Schatzschneider U. Novel lead structures and activation mechanisms for CO-releasing molecules (CORMs). *Br J Pharmacol.* 2015;172(6):1638-1650. doi:10.1111/bph.12688

155. Wesseling S, Fledderus JO, Verhaar MC, Joles JA. Beneficial effects of diminished production of hydrogen sulfide or carbon monoxide on hypertension and renal injury induced by NO withdrawal. *Br J Pharmacol.* 2015;172(6):1607-1619. doi:10.1111/bph.12674
156. Olas B. Gasomediators (\cdot NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis. *Clin Chim Acta.* 2015;445:115-121. doi:10.1016/j.cca.2015.03.027
157. Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. *Eur J Pharmacol.* 2007;559(1):65-68. doi:10.1016/j.ejphar.2006.12.011
158. Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets.* 2018;29(7):677-685. doi:10.1080/09537104.2018.1430358
159. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood.* 2010;116(20):4317-4327. doi:10.1182/blood-2010-01-261206
160. Ando Y, Oku T, Tsuji T. Platelets attenuate production of cytokines and nitric oxide by macrophages in response to bacterial endotoxin. *Platelets.* 2016;27(4):344-350. doi:10.3109/09537104.2015.1103369
161. Ustundag Budak Y, Polat M, Huysal K. The use of platelet indices, plateletcrit, mean platelet volume and platelet distribution width in emergency non-traumatic abdominal surgery: a systematic review. *Biochem Medica.* 2016;26(2):178-193. doi:10.11613/BM.2016.020
162. Adibi P, Faghieh Imani E, Talaei M, Ghanei M. Population-based platelet reference values for an Iranian population. *Int J Lab Hematol.* 2007;29(3):195-199. doi:10.1111/j.1751-553X.2006.00843.x
163. [Platelet count and mean platelet volume in the Spanish population] - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9666418/>. Accessed February 7, 2021.
164. Thachil J. Platelets in Inflammatory Disorders: A Pathophysiological and Clinical Perspective. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41(6):572-581. doi:10.1055/s-0035-1556589
165. Kanwar A, Thaden JJ, Nkomo VT. Management of Patients With Aortic Valve Stenosis. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(4):488-508. doi:10.1016/j.mayocp.2018.01.020
166. Otto CM. Valvular Aortic Stenosis. Disease Severity and Timing of Intervention.

- J Am Coll Cardiol.* 2006;47(11):2141-2151. doi:10.1016/j.jacc.2006.03.002
167. Coffey S, Cairns BJ, Lung B. The modern epidemiology of heart valve disease. *Heart.* 2016;102(1):75-85. doi:10.1136/heartjnl-2014-307020
168. A R, F Z. Hypertension and Aortic Stenosis: A Review. *Curr Hypertens Rev.* 2018;14(1). doi:10.2174/1573402114666180416161326
169. Cuerpo G et al. No Title. *cir cardiov.* 2019;26(6):248-264.
170. Hallward G, Balani N, McCorkell S, Roxburgh J, Cornelius V. The Relationship Between Preoperative Hemoglobin Concentration, Use of Hospital Resources, and Outcomes in Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2016;30(4):901-908. doi:10.1053/j.jvca.2016.02.004
171. Bell ML, Grunwald GK, Baltz JH, et al. Does Preoperative Hemoglobin Independently Predict Short-Term Outcomes After Coronary Artery Bypass Graft Surgery? *Ann Thorac Surg.* 2008;86(5):1415-1423. doi:10.1016/j.athoracsur.2008.07.088
172. Williams ML, He X, Rankin JS, Slaughter MS, Gammie JS. Preoperative hematocrit is a powerful predictor of adverse outcomes in coronary artery bypass graft surgery: A report from the society of thoracic surgeons adult cardiac surgery database. In: *Annals of Thoracic Surgery.* Vol 96. Ann Thorac Surg; 2013:1628-1634. doi:10.1016/j.athoracsur.2013.06.030
173. Hajjar LA, Vincent J-L, B G Galas FR, et al. *Transfusion Requirements After Cardiac Surgery The TRACS Randomized Controlled Trial.* <https://jamanetwork.com/>.
174. Ming Y, Liu J, Zhang F, et al. Transfusion of red blood cells, fresh frozen plasma, or platelets is associated with mortality and infection after cardiac surgery in a dose-dependent manner. *Anesth Analg.* 2020;130(2):488-497. doi:10.1213/ANE.0000000000004528
175. McNair ED, McKay WP, Mondal PK, Bryce RDT. Transfusion Use and Hemoglobin Levels by Blood Conservation Method After Cardiopulmonary Bypass. In: *Annals of Thoracic Surgery.* Vol 110. Elsevier Inc.; 2020:1520-1526. doi:10.1016/j.athoracsur.2020.03.029
176. Saczkowski R, Bernier PL, Tchervenkov CI, Arellano R. Brief communication - Cardiopulmonary bypass Retrograde autologous priming and allogeneic blood transfusions: A meta-analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;8(3):373-376. doi:10.1510/icvts.2008.195354

177. Olmos Rodríguez M, Ballester Hernández JA, Arteta Bárcenas MT, Rodríguez Cerezo A, Vidarte Ortiz de Artiñano MA, Veiga Alameda C. Repercusión del cebado con coloides y la ultrafiltración sobre el sangrado posoperatorio y la transfusión sanguínea en cirugía cardíaca. Ensayo clínico aleatorizado. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 2015;62(2):81-89. doi:10.1016/j.redar.2014.04.008
178. Wang G, Bainbridge D, Martin J, Cheng D. The efficacy of an intraoperative cell saver during cardiac surgery: A meta-analysis of randomized trials. *Anesth Analg.* 2009;109(2):320-330. doi:10.1213/ane.0b013e3181aa084c
179. Al Khabori M, Al Riyami A, Siddiqi MS, Khan Sarfaraz Z, Ziadinov E, Al Sabti H. Impact of cell saver during cardiac surgery on blood transfusion requirements: a systematic review and meta-analysis. *Vox Sang.* 2019;114:553-565. doi:10.1111/vox.12824
180. Peel JK, Trudeau J, Tano R, et al. Determining Optimal Treatment to Correct Preoperative Anemia and Reduce Perioperative Allogeneic Blood Transfusions in Cardiac Surgery: A Retrospective Cohort Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2021. doi:10.1053/j.jvca.2020.12.044
181. Zhou X, Fraser CD, Suarez-Pierre A, et al. Variation in Platelet Transfusion Practices in Cardiac Surgery. *Innov Technol Tech Cardiothorac Vasc Surg.* 2019;14(2):134-143. doi:10.1177/1556984519836839
182. Yanagawa B, Ribeiro R, Lee J, et al. Platelet Transfusion in Cardiac Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Thorac Surg.* 2021;111(2):607-614. doi:10.1016/j.athoracsur.2020.04.139
183. Erdoes G, Koster A, Meesters MI, et al. The role of fibrinogen and fibrinogen concentrate in cardiac surgery: an international consensus statement from the Haemostasis and Transfusion Scientific Subcommittee of the European Association of Cardiothoracic Anaesthesiology. doi:10.1111/anae.14842
184. Li JY, Gong J, Zhu F, et al. Fibrinogen concentrate in cardiovascular surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Anesth Analg.* 2018;127(3):612-621. doi:10.1213/ANE.0000000000003508
185. Waldén K, Jeppsson A, Nasic S, Karlsson M. Fibrinogen Concentrate to Cardiac Surgery Patients with Ongoing Bleeding does not Increase the Risk of Thromboembolic Complications or Death. *Thromb Haemost.* 2020;120(3):384-391. doi:10.1055/s-0039-3402759
186. Kumar AB, Suneja M, Bayman EO, Weide GD, Tarasi M. Association between

- postoperative acute kidney injury and duration of cardiopulmonary bypass: A meta-analysis. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;26(1):64-69. doi:10.1053/j.jvca.2011.07.007
187. Takaki S, Shehabi Y, Pickering JW, Endre Z, Miyashita T, Goto T. Perioperative change in creatinine following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass is useful in predicting acute kidney injury: A single-centre retrospective cohort study. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015;21(4):465-469. doi:10.1093/icvts/ivv184
188. de Oliveira MAB, Dos Santos CA, Brandi AC, et al. Effect of preoperative creatinine levels on mortality after coronary artery bypass grafting surgery: An observational study. *Brazilian J Cardiovasc Surg.* 2019;34(2):149-155. doi:10.21470/1678-9741-2018-0261
189. Shinde SB, Golam KK, Kumar P, Patil ND. Blood lactate levels during cardiopulmonary bypass for valvular heart surgery. *Ann Card Anaesth.* 2005;8(1):39-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823485>. Accessed April 8, 2021.
190. Noval-Padillo JA, Serra-Gomez C, Gomez-Sosa L, et al. Changes of lactate levels during cardiopulmonary bypass in patients undergoing cardiac transplantation: Possible early marker of morbidity and mortality. *Transplant Proc.* 2011;43(6):2249-2250. doi:10.1016/j.transproceed.2011.06.046
191. Noguchi S, Saito J, Hashiba E, Kushikata T, Hirota K. Lactate level during cardiopulmonary bypass as a predictor of postoperative outcomes in adult patients undergoing cardiac surgery. *JA Clin Reports.* 2016;2(1). doi:10.1186/s40981-016-0064-3
192. Körmöczi GF, Säemann MD, Buchta C, et al. Influence of clinical factors on the haemolysis marker haptoglobin. *Eur J Clin Invest.* 2006;36(3):202-209. doi:10.1111/j.1365-2362.2006.01617.x
193. Wetz AJ, Richardt EM, Schotola H, Bauer M, Bräuer A. Haptoglobin and free haemoglobin during cardiac surgery - Is there a link to acute kidney injury? *Anaesth Intensive Care.* 2017;45(1):58-66. doi:10.1177/0310057x1704500109
194. Li D, Wu Q, Liu S, et al. Lactic Dehydrogenase in the In Vitro Evaluation of Hemolytic Properties of Ventricular Assist Device. *Artif Organs.* 2017;41(11):E274-E284. doi:10.1111/aor.12943
195. Gordon JS, Wood CT, Luc JGY, et al. Clinical implications of LDH isoenzymes in hemolysis and continuous-flow left ventricular assist device-induced

- thrombosis. *Artif Organs*. 2020;44(3):231-238. doi:10.1111/aor.13565
196. Sharma P, Ananthanarayanan C, Vaidhya N, Malhotra A, Shah K, Sharma R. Hyperbilirubinemia after cardiac surgery: An observational study. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2015;23(9):1039-1043. doi:10.1177/0218492315607149
 197. Mastoraki A, Karatzis E, Mastoraki S, Kriaras I, Sfirakis P, Geroulanos S. Postoperative jaundice after cardiac surgery. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007;6(4):383-387. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17690034/>. Accessed April 9, 2021.
 198. Khalaf- Adeli E, Alavi M, Alizadeh-Ghavidel A, Pourfathollah AA. Comparison of Standard Coagulation Testing with Thromboelastometry Tests in Cardiac Surgery. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2019;11(4):300-304. doi:10.15171/jcvtr.2019.48
 199. Ogawa S, Szlam F, Chen EP, et al. A comparative evaluation of rotation thromboelastometry and standard coagulation tests in hemodilution-induced coagulation changes after cardiac surgery. *Transfusion*. 2012;52(1):14-22. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03241.x
 200. Sarrais Polo C, Alonso Morenza A, Rey Picazo J, Álvarez Mercadal L, Beltrao Sial R, Aguilar Lloret C. Tromboelastometría como guía de administración de hemoderivados en cirugía cardíaca. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*. 2018;65(3):129-134. doi:10.1016/j.redar.2017.10.004
 201. Gozdzik W, Adamik B, Wysoczanski G, et al. Preoperative thromboelastometry for the prediction of increased chest tube output in cardiac surgery. *Med (United States)*. 2017;96(30). doi:10.1097/MD.00000000000007669
 202. Ghavidel AA, Toutounchi Z, Shahandashti FJ, Mirmesdagh Y. Rotational thromboelastometry in prediction of bleeding after cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2015;23(5):525-529. doi:10.1177/0218492314566330
 203. Kwapisz MM, Kent B, DiQuinzio C, et al. The prophylactic use of fibrinogen concentrate in high-risk cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2020;64(5):602-612. doi:10.1111/aas.13540
 204. Li H, Serrick C, Rao V, Yip PM. A comparative analysis of four activated clotting time measurement devices in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Perfus (United Kingdom)*. 2020. doi:10.1177/0267659120949351
 205. Dirkmann D, Nagy E, Britten MW, Peters J. Point-of-care measurement of activated clotting time for cardiac surgery as measured by the Hemochron

- signature elite and the Abbott i-STAT: Agreement, concordance, and clinical reliability. *BMC Anesthesiol.* 2019;19(1). doi:10.1186/s12871-019-0846-z
206. Vonk ABA, Veerhoek D, Van Den Brom CE, Van Barneveld LJM, Boer C. Individualized heparin and protamine management improves rotational thromboelastometric parameters and postoperative hemostasis in valve surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2014;28(2):235-241. doi:10.1053/j.jvca.2013.09.007
207. Linden MD. Platelet flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2013;992:241-262. doi:10.1007/978-1-62703-339-8_18
208. Pasalic L, Pennings GJ, Connor D, Campbell H, Kritharides L, Chen VM. Flow cytometry protocols for assessment of platelet function in whole blood. In: *Methods in Molecular Biology.* Vol 1646. Humana Press Inc.; 2017:369-389. doi:10.1007/978-1-4939-7196-1_28
209. Glier H, Heijnen I, Hauwel M, et al. Standardization of 8-color flow cytometry across different flow cytometer instruments: A feasibility study in clinical laboratories in Switzerland. *J Immunol Methods.* 2019;475. doi:10.1016/j.jim.2017.07.013
210. Petzold T, Bagaev E, Herzog H, et al. Whole blood platelet aggregation kinetics under cardiopulmonary bypass: A pilot study. *Int J Artif Organs.* 2020;43(3):208-214. doi:10.1177/0391398819882440
211. Kobsar A, Simonis S, Klinker E, et al. Specific inhibitory effects of the NO donor MAHMA/NONOate on human platelets. *Eur J Pharmacol.* 2014;735(1):169-176. doi:10.1016/j.ejphar.2014.04.027
212. Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1343-1352. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03806.x
213. Bonello L, Paganelli F, Arpin-Bornet M, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of postprocedural major adverse cardiovascular events. *J Thromb Haemost.* 2007;5(8):1630-1636. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02609.x
214. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al. Adjusted Clopidogrel Loading Doses According to Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation Index Decrease Rate of Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Clopidogrel Resistance. A Multicenter Randomized Prospective Study. *J Am Coll*

- Cardiol.* 2008;51(14):1404-1411. doi:10.1016/j.jacc.2007.12.044
215. Ignjatovic V, Than J, Summerhayes R, et al. The quantitative and qualitative responses of platelets in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Cardiol.* 2012;33(1):55-59. doi:10.1007/s00246-011-0079-5
216. Tan Z, Besser M, Anderson S, et al. Pulsatile versus nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass: Extent of hemolysis and clinical significance. *ASAIO J.* 2020;66(9):1025-1030. doi:10.1097/MAT.0000000000001154
217. Dufour N, Radjou A, Thuong M. Hemolysis and plasma free hemoglobin during extracorporeal membrane oxygenation support: From clinical implications to laboratory details. *ASAIO J.* 2020;66(3):239-246. doi:10.1097/MAT.0000000000000974
218. Helms CC, Marvel M, Zhao W, et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2013;11(12):2148-2154. doi:10.1111/jth.12422
219. Vermeulen Windsant IC, de Wit NCJ, Sertorio JTC, et al. Hemolysis during cardiac surgery is associated with increased intravascular nitric oxide consumption and perioperative kidney and intestinal tissue damage. *Front Physiol.* 2014;5 AUG. doi:10.3389/fphys.2014.00340
220. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets. *Pharmacol Ther.* 2011;132(2):196-203. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.07.001
221. Olas B. Gasomediators (\cdot NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis. *Clin Chim Acta.* 2015;445:115-121. doi:10.1016/j.cca.2015.03.027

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Comité ético

	<p><i>Arrixaca</i> Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca" Ctra. Madrid - Cartagena - Telf. 968 36 95 00 30120 El Palmar (Murcia)</p>
<p>Dr. D. Antonio Piñero Madrona Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca</p>	
<p>CERTIFICA</p>	
<p>Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 25/07/2016, acta 07/16 ha evaluado la propuesta del investigador Dr. Faustino García Candel referida al estudio:</p>	
<p>Título: Influencia de la hemólisis en la hemostasia de pacientes sometidos a cirugía de recambio valvular aórtico</p>	
<p>Código Interno: 2016-7-3-HCUVA</p>	
<p>1º. Considera que</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente. - Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto. - Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio. - El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos. - La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio. 	
<p>2º. Por lo que este CEIC emite un DICTAMEN FAVORABLE.</p>	
<p>3º. Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado en el <i>Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca</i> por el Dr. Faustino García Candel como investigador principal.</p>	
<p>Lo que firmo en Murcia, a 25 de julio de 2016</p>	
<p>Fdo:</p> 	
<p>Dr. D. Antonio Piñero Madrona Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca</p>	

9.2. Información al donante



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

En el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios

Solicitamos su autorización para incorporar al *Biobanc-Mur Nodo Área I* del hospital el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

¿Qué es un biobanco?: Institución para favorecer la investigación y la salud.

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco *Biobanc-Mur Nodo Área I* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* hasta su extinción. Este Biobanco forma parte como nodo de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III con la referencia *RD09/0076/00065*, y está en proceso de Registro con el desarrollo de la normativa regional de Biobancos que aplica la normativa nacional.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el comité científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Protección de datos y confidencialidad: *Las muestras se conservarán codificadas.*

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizados, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

*Responsable del fichero : Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.
 Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia*

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
 Responsable del nodo Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia
 Tel: 968359757 E-mail: juanp.serna@carm.es

Carácter altruista de la donación. *La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca es gratuita.*

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

Revocación del consentimiento: si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

Información sobre los resultados de la investigación: se le proporcionará información si usted desea recibirla

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos - ISCIII Versión julio 2012

9.3. Consentimiento informado

	BIOBANC-MUR Biobanco en Red de la Región de Murcia				
CONSENTIMIENTO INFORMADO					
UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO					
Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....				
Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con <i>Biobanc-Mur Nodo Área I</i> en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja					
<p>El abajo firmante autoriza al <i>Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca</i> a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el <i>Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área I</i>, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.</p> <p>Confirmando que:</p> <p>1. Autoriza al <i>Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca</i> a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el <i>Biobanc-Mur Nodo Área I</i>, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta. <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO</p> <p>2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO Teléfono o E-mail de contacto.....</p> <p>3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO Teléfono o E-mail de contacto:</p> <p>4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones: </p>					
<table border="1" style="width: 100%; height: 100px;"> <tr> <th style="text-align: left;">DONANTE</th> <th style="text-align: left;">PERSONA QUE INFORMA</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: bottom;">Firma</td> <td style="text-align: center; vertical-align: bottom;">Firma</td> </tr> </table>	DONANTE	PERSONA QUE INFORMA	Firma	Firma	
DONANTE	PERSONA QUE INFORMA				
Firma	Firma				
En....., a.... de..... de.....					
					
Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012					



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del testigo que firma..... DNI.....

Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante confirma que el donante:

1. Autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.
 SI NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto:.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TESTIGO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a.... de..... de.....



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII Versión julio 2012



BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

Nombre y Apellidos (donante)..... Etiqueta Identificativa Paciente Edad: Sexo: DNI:.....	Persona del centro que informa DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del tutor legal que firma..... DNI.....
 Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

El abajo firmante confirma que:

- Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.
 SI NO
- Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia SI NO Teléfono o E-mail de contacto.....
- Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales
 SI NO Teléfono o E-mail de contacto:
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

- Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma





BIOBANC-MUR
Biobanco en Red de la Región de Murcia



En....., a..... de..... de.....

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.

POR EL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI anulo el consentimiento prestado en fecha..... de.....de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**, que doy por finalizada al día de hoy.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:

Yo, D./Dña. con DNI, Como representante legal de D./Dña....., con DNI....., anulo el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco **Biobanc-Mur Nodo Área I**, que doy por finalizada al día de hoy.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....



Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia
 Red Nacional de Biobancos - ISCHL Versión julio 2012

9.4. Escala de riesgo quirúrgico (EUROSCORE)

EUROSCORE I

Factores dependientes del paciente	Puntuación
Edad (sexo). Por cada 5 años en >60 años	1
Sexo (femenino)	1
Creatinina > 200 $\mu\text{mol/L}$	2
Arteriopatía extracardíaca	2
Enfermedad pulmonar crónica (con esteroides o inhaladores)	1
Disfunción neurológica con afectación a la deambulación o a la vida diaria	2
Cirugía cardíaca previa con apertura de pericardio	3
Endocarditis activa	3
Situación preoperatoria crítica: taquicardia ventricular, muerte súbita abortada, uso de inotrópicos, balón de contrapulsación...	3
Factores cardíacos	
Angina inestable que requiere de nitratos intravenosos	2
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo 30-50%	1
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo <30%	3
Infarto agudo de miocardio reciente <90 días	2
Presión sistólica pulmonar >60 mmHg	2

Factores quirúrgicos	
Emergencia	2
Cirugía distinta a coronaria aislada	2
Cirugía sobre aorta torácica	3
Rotura septal postinfarto	4

EUROSCORE II

- Edad en años cumplidos.
- Sexo.
- Insuficiencia renal basada en el aclaramiento de creatinina calculada con la fórmula de Cockcroft-Gault.
 - a. Aclaramiento normal (> 85 ml/min).
 - b. Aclaramiento moderadamente disminuido (50-85 ml/min).
 - c. Aclaramiento severamente disminuido (<50 ml/min).
 - d. En tratamiento de diálisis, independientemente del aclaramiento.
- Afectación arterial extracardiaca definida como:
 - a. Claudicación.
 - b. Ateromatosis carotídea con estenosis $>50\%$.
 - c. Amputación de miembros inferiores por arteriopatía.
 - d. Intervención previa o planeada sobre la aorta abdominal, arterias de extremidades o carótidas.
- Importante dificultad de movilidad por severa afectación neurológica o musculoesquelética.
- Cirugía cardíaca previa.
- Enfermedad pulmonar crónica definida como necesidad de tratamiento con esteroides o broncodilatadores.
- Endocarditis activa (paciente con tratamiento antibiótico en el momento de la cirugía).
- Estado preoperatorio crítico, definido como la presencia de muerte súbita resucitada, arritmia ventricular sostenida, necesidad de masaje cardíaco preoperatorio, ventilación mecánica preoperatoria, necesidad de inotropos o balón de contrapulsación aórtica preoperatorio, anuria u oliguria preoperatoria (aclaramiento de creatinina <10 ml/h).
- Diabetes en tratamiento con insulina.
- Clase funcional de la New York Heart Association.
- Angina en reposo.

- Función ventricular izquierda clasificada en cuatro categorías según la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI):
 - a. FEVI >50%.
 - b. FEVI 31-50%.
 - c. FEVI 21-30%.
 - d. FEVI <21%.
- Infarto de miocardio en los 90 días previos.
- Hipertensión arterial pulmonar clasificada en tres categorías:
 - a. PSAP <31 mmHg.
 - b. PSAP 31-55 mmHg.
 - c. PSAP > 55 mmHg.
- Prioridad de la intervención quirúrgica:
 - a. Electiva (ingreso rutinario para intervención).
 - b. Urgente (pacientes no ingresados específicamente para la intervención pero que necesitan la operación en el mismo ingreso por motivos clínicos y no pueden ser dados de alta sin una intervención definitiva).
 - c. Emergente (operación antes del inicio del siguiente día laborable).
 - d. De salvamento (pacientes con masaje cardíaco antes de llegar al quirófano; no incluye las maniobras de resucitación tras la inducción anestésica).
- Complejidad de la intervención quirúrgica
 - a. Cirugía de revascularización coronaria aislada.
 - b. Una sola intervención diferente a la revascularización coronaria.
 - c. Dos procedimientos.
 - d. Tres o más procedimientos.
- Cirugía de la aorta torácica.

Tomado de Nashef SA, Roques F, Michel P, et al. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999; 16: 9–13.

