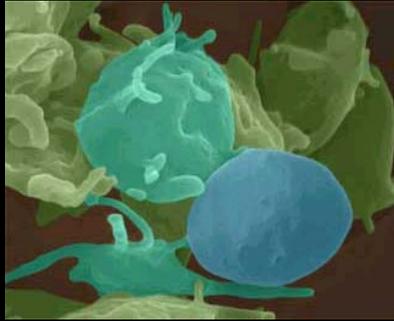


Centro de Citometría y Citómica

Aplicaciones de la Citometría de Flujo en Hemostasia: Citometría y Plaquetas

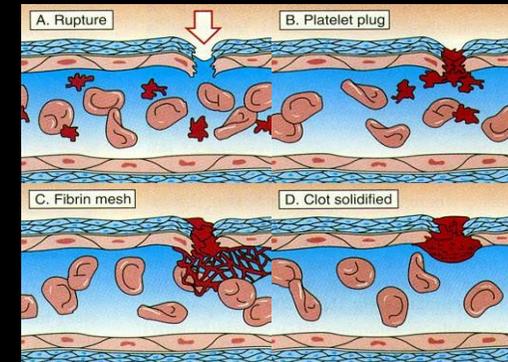


José Enrique O'Connor, María do Céu R. Monteiro, Marcial Martínez

HEMOSTASIA: CONCEPTO

CONCEPTO:

- Proceso complejo que permite:
 - Prevenir de forma continua la pérdida espontánea de sangre
 - Detener la hemorragia causada por daños al Sistema Vascular



HEMOSTASIA: FASES

- Hemostasia primaria:
 - Fase de vasoconstricción parietal:
 - liberación de factores tisulares de coagulación
 - Fase endotelial-trombocitaria:
 - activación de **plaquetas**
- Resultado:
Formación de un tapón inestable de **plaquetas** (3-5 min)

HEMOSTASIA: FASES

- Coagulación:
 - Fase de formación de trombina:
 - Cascada de activación de enzimas y factores
 - Fase de formación de fibrina:
 - Producción de una red insoluble de proteína
- Resultado:
Estabilización y fijación del coágulo (5-10 min)

HEMOSTASIA: FASES

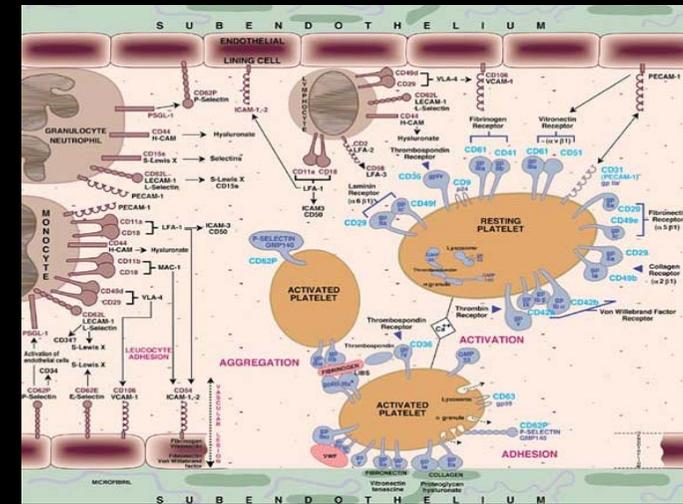
• Fibrinolisis:

- Cicatrización del tejido vascular lesionado
- Destrucción enzimática de la red de fibrina

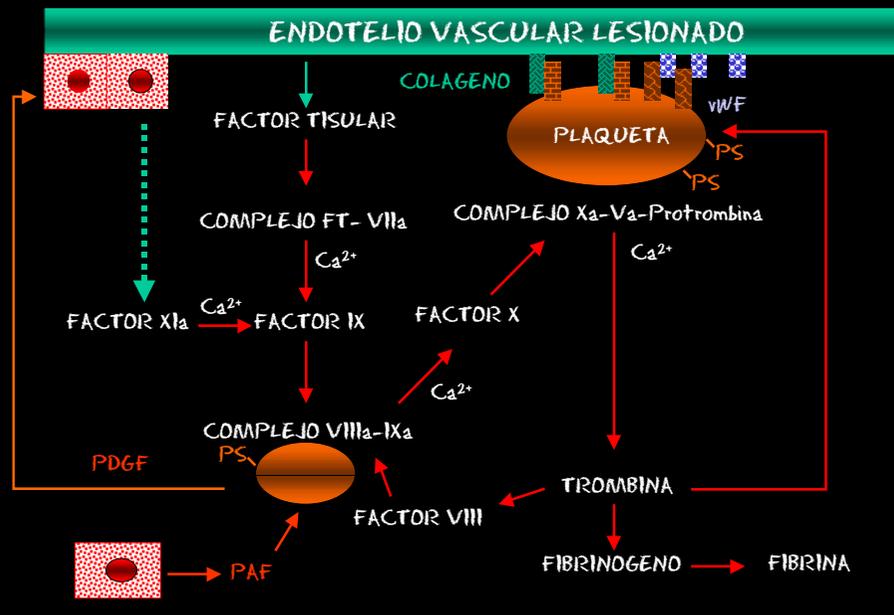
• Resultado:

Situación hemostática normal (48-72 horas)

HEMOSTASIA: INTERACCIONES CELULARES



HEMOSTASIA: INTERACCIONES MOLECULARES



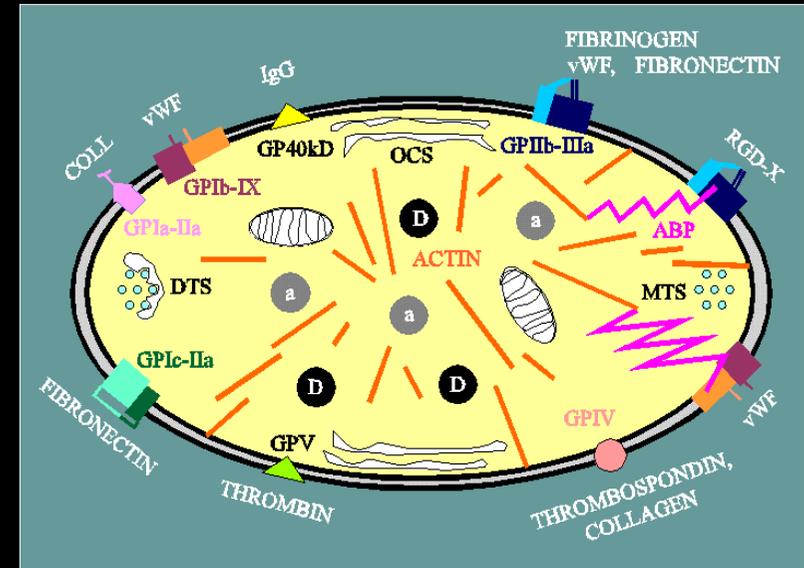
ESTUDIO CLÍNICO DE LA HEMOSTASIA: INTEGRACION DE FUNCION PLAQUETARIA Y COAGULACION

- EL estado actual del conocimiento básico y clínico de la hemostasia, su regulación y su patología exige incluir el análisis de la función plaquetaria en el estudio de los fenómenos prohemorrágicos y protrombóticos.
- El desarrollo conceptual y metodológico de la citometría de flujo la convierten en una tecnología de elección para ese fin.
- La disponibilidad de técnicas citométricas en sangre entera potencia extraordinariamente el valor diagnóstico y pronóstico de la citometría de flujo en el estudio clínico de la hemostasia.

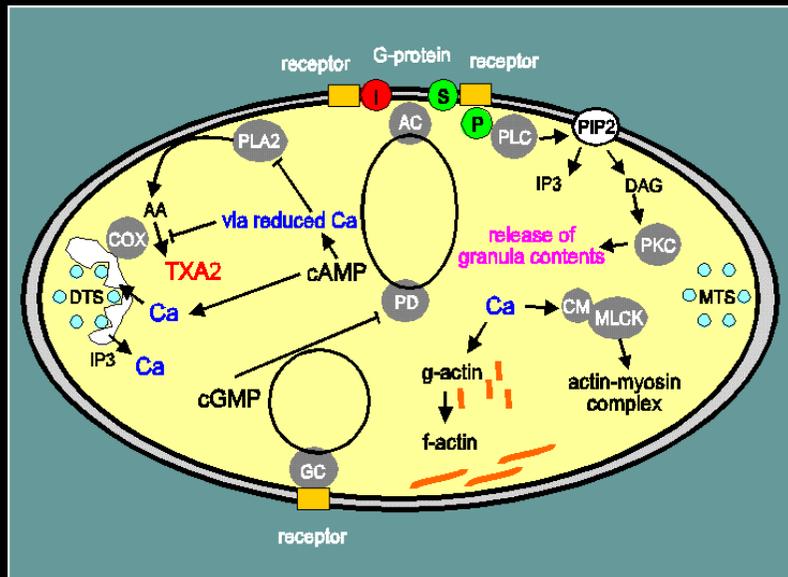
ESTUDIO COMPLETO DE LA HEMOSTASIA: VENTAJAS DE LA CITOMETRIA EN SANGRE COMPLETA

- Permite estudiar la función plaquetaria en condiciones cuasi-fisiológicas
- La manipulación mínima previene la activación artefactual de plaquetas
- Evita la pérdida potencial de subpoblaciones plaquetarias
- Requiere pequeños volúmenes de muestra (pocos microlitros de sangre)
- Permite el análisis simultáneo de plaquetas y otras células sanguíneas

FUNCION PLAQUETARIA: RECEPTORES DE MEMBRANA



FUNCION PLAQUETARIA: TRANSDUCCION DE SEÑAL



Las Múltiples Funciones de las Plaquetas

Procesos Fisiológicos

Procesos Patológicos

Hemostasia y Fibrinólisis

Trombosis y Enfermedad Vascular

Sostenimiento de la función endotelial

Inflamación

Otros

Metástasis

Funciones de la Plaqueta

ALTERACIONES CONGENITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- Anomalías de la adhesión a la lámina basal
- Anomalías de la agregación primaria
- Anomalías de la transducción de señales
- Anomalías de la agregación secundaria
- Anomalías de la superficie procoagulante

ALTERACIONES CONGENITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- Anomalías de la adhesión a la lámina basal:
 - Síndrome de Bernard-Soulier: complejo gp Ib/IX/V
 - Enfermedad de Von Willebrand de tipo plaquetario: gp Ib
 - Defecto de adhesión de plaquetas al colágeno: gp Ia/230

ALTERACIONES CONGENITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- Anomalías de la agregación primaria:
 - Trombastenia de Glanzmann: gp IIb/IIIa

ALTERACIONES CONGENITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- Anomalías de la transducción de señales:
 - Defectos "Aspirin-like":
 - Activación de proteínas G
 - Ciclooxygenasa
 - Tromboxano sintetasa
 - Prostaglandina H1 sintetasa
 - Activación de Fosfolipasa C
 - Liberación de ácido araquidónico
 - Metabolismo de fosfoinositol
 - Liberación de calcio

ALTERACIONES CONGENITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- Anomalías de la agregación secundaria:
 - Defectos en el almacenamiento en gránulos:
 - Síndrome de Hermansky-Pudlak: g. densos
 - Síndrome de Chediak-Higashi: g. densos
 - Síndrome de Plaquetas Quebec: g. alfa
 - Síndrome de Plaquetas grises: mixta
 - Defectos en la secreción de gránulos:
 - Síndrome de Wiskott-Aldrich: proteína WASP

ALTERACIONES CONGENITAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- Anomalías de la superficie procoagulante:
 - Síndrome de Scott: scramblasa

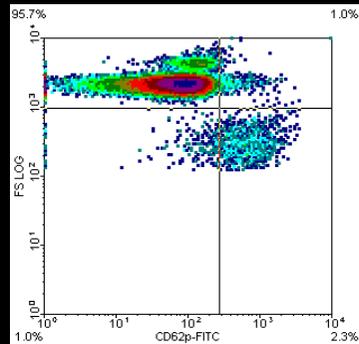
ALTERACIONES ADQUIRIDAS DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- Trombopatías secundarias a:
 - Uremia
 - Mielodisplasias
 - Síndromes mieloproliferativos
 - Disproteinemias
 - Leucemias

HEMOSTASIA: PLAQUETAS Y RIESGO DE TROMBOSIS

Los mismos procesos celulares y moleculares que evitan la hemorragia en condiciones fisiológicas, pueden desencadenar la trombosis en ciertas anomalías cardiovasculares !!!

CITOMETRIA DE FLUJO EN EL ANALISIS DE PLAQUETAS



CITOMETRIA DE FLUJO EN EL ANALISIS DE PLAQUETAS

- La función plaquetaria se puede analizar ampliamente en sangre entera por citometría de flujo
- La citometría de flujo puede aplicarse al estudio de:
 - Reactividad plaquetaria in vitro
 - Plaquetas activadas circulantes
 - Interacciones plaqueta-plaqueta
 - Interacciones entre plaquetas y leucocitos
 - Micropartículas plaquetarias procoagulantes
 - Alteraciones congénitas o adquiridas en la función o el número de plaquetas
 - Maduración normal y patológica de plaquetas
 - Monitorización de tratamiento antiagregante

CITOMETRIA DE FLUJO EN EL ANALISIS DE PLAQUETAS

- El análisis funcional de plaquetas por citometría de flujo es de relevancia en distintos aspectos clínicos:
 - Predicción de riesgo protrombótico
 - Diagnóstico de anomalías congénitas de glicoproteínas de la superficie de la plaqueta
 - Diagnóstico de anomalías congénitas del almacenamiento en gránulos de la plaqueta
 - Control de la terapia con antagonistas de gpIIb/IIIa
 - Diagnóstico de trombocitopenias
 - Estudio de la trombopoyesis
 - Control de la calidad de productos hemoderivados

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- La preparación y el procesamiento de la muestra deben ser cuidadosos para mantener las funciones intrínsecas
- Las condiciones del análisis citométrico se deben adaptar para acotar la población de plaquetas

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- La extracción debe realizarse en reposo y con el mínimo traumatismo
- La sangre entera se debe anticoagular con citrato
- Las muestras se diluyen (1:100) para evitar la formación de agregados plaquetarios
- Se utiliza un anticuerpo monoclonal contra una proteína constitutiva de la superficie de la plaqueta para identificar y seleccionar la población plaquetaria

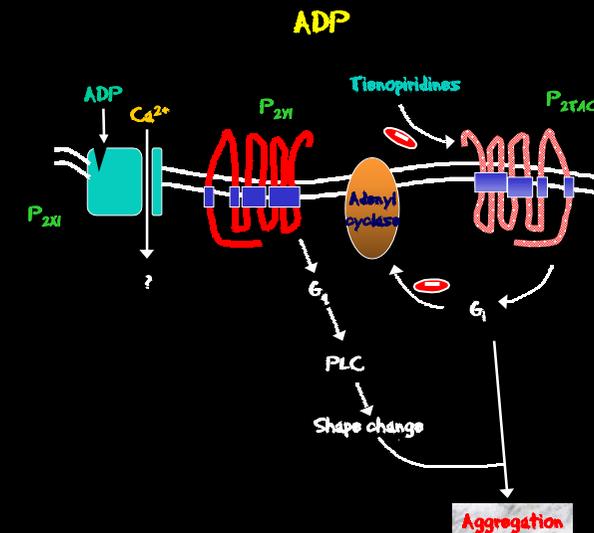
ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- En ausencia de agonistas exógenos, la citometría de flujo en sangre entera permite determinar el estado de activación *in vivo* de las plaquetas circulantes
- La adición de un agonista permite analizar la reactividad *in vitro* de las plaquetas circulantes.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

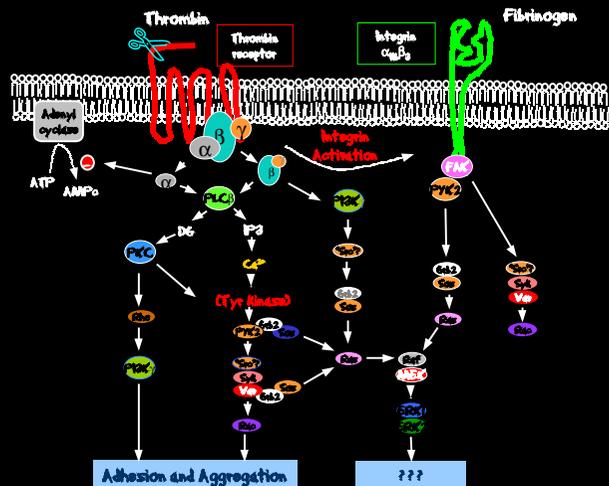
- Los agonistas más utilizados para la estimulación de plaquetas son:
 - Agonistas fuertes: Trombina y TRAP
 - Agonistas débiles: ADP, Colágeno, Tromboxano A2
 - Ionóforos de Calcio: Ionomicina, A23187
 - Esteres de forbol: PMA

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA



ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

Trombina



ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

- La respuesta plaquetaria se suele estimar con:
 - Un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de superficie indicador de activación
 - Un fluorocromo específico de una función celular
 - Un cambio morfológico

PARAMETROS CITOMETRICOS DE ACTIVACION PLAQUETARIA

Parámetro	Cambio detectado	Marcador Citométrico	Emisión de Fluorescencia
Ca ²⁺ libre citosólico	Aumento reversible	FLUO-3 AM	Aumento reversible
Actina G	Polimerización a Actina F	Falocidina Faloidina	Aumento reversible
Tamaño	Aumento o Disminución	Cambios en FS	---
Granularidad	Desgranulación	Cambios en SS	

PARAMETROS CITOMETRICOS DE ACTIVACION PLAQUETARIA

Parámetro	Cambio detectado	Marcador Citométrico	Emisión de Fluorescencia
Gránulos densos (Número)	Liberación del contenido	Mepacrina	Disminución
Complejos gp I/V/IX (Número)	Disminución en superficie	Anticuerpos específicos	Disminución
Complejos gp IIb/IIIa (Número)	Aumento en superficie	Anticuerpos específicos	Aumento

PARAMETROS CITOMETRICOS DE ACTIVACION PLAQUETARIA

Parámetro	Cambio detectado	Marcador Citométrico	Emisión de Fluorescencia
Complejos gp IIb/IIIa	Conformación alterada	Anticuerpos específicos contra neoeptopos	Aumento
Complejos gp IIb/IIIa	Conformación alterada	Anticuerpos específicos simultáneos	Modificación de la resonancia de fluorescencia FRET
Complejos gp IIb/IIIa	Unión de ligandos	Anticuerpos específicos contra ligandos	Aumento
Complejos gp IIb/IIIa	Expresión de L1BS y R1BS	Anticuerpos específicos	Aumento

PARAMETROS CITOMETRICOS DE ACTIVACION PLAQUETARIA

Parámetro	Cambio detectado	Marcador Citométrico	Emisión de Fluorescencia
Fosfolípidos aniónicos	Aumento	Annexina V	Aumento
Factores de la coagulación	Aumento	Anticuerpos específicos contra V y VIIIa	Aumento
CD62P (P-Selectina)	Aumento	Anticuerpos específicos	Aumento
CD63 (gp53)	Aumento	Anticuerpos específicos	Aumento

PARAMETROS CITOMETRICOS DE ACTIVACION PLAQUETARIA

Parámetro	Cambio detectado	Marcador Citométrico	Emisión de Fluorescencia
CD107a (LAMP-1)	Aumento	Anticuerpos específicos	Aumento
CD 107b (LAMP-2)	Aumento	Anticuerpos específicos	Aumento
Gp40	Aumento	Anticuerpos específicos	Aumento
CD40L	Aumento	Anticuerpos específicos	Aumento

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

Expresión de P-selectina (CD62P):

- Objetivos:
 - Detección de plaquetas activadas circulantes
 - Determinación de la reactividad plaquetaria in vitro
 - Medición del riesgo protrombótico o prohemorrágico
- Aspectos metodológicos:
 - El análisis se efectúa en sangre periférica
 - Identificación con **CD41**, **CD49** o **CD61** con **PE**
 - Cuantificación de P-selectina con **CD62P-FITC**

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

Capacidad de activación:

- **Objetivos:**
 - Estimación del riesgo protrombótico o prohemorrágico
 - Monitorización de tratamientos antiplaquetarios
 - Caracterización del perfil de activación plaquetaria
- **Aspectos metodológicos:**
 - El análisis se efectúa en sangre periférica
 - Activación con agonistas específicos
 - Identificación con **CD41, CD49, CD61 con PE**
 - Cuantificación de P-selectina con **CD62P-FITC**

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

Inducción de la activación:

- **Objetivos:**
 - Medición del riesgo protrombótico o prohemorrágico
 - Monitorización de tratamientos antiplaquetarios
 - Caracterización del perfil de activación plaquetaria
- **Aspectos metodológicos:**
 - El análisis se efectúa en sangre periférica
 - Activación con agonistas específicos
 - Identificación con **CD41, CD49 o CD61 con PE**
 - Medida cinética de la liberación de calcio con **Fluo-3**

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

ANALISIS FUNCIONAL

ANALISIS CITOMETRICO DE LA EXPRESION DE MARCADORES DE ACTIVACION PLAQUETARIA

1. Material:

Sangre entera anticoagulada con citrato
Tampón de Tyrode
PBS (opcional)
Anticuerpos monoclonales CD41-PE y CD62-FITC (Inmunotect)
Agonistas de activación plaquetaria:

- ACP 400 µl
- Trombina 10 U/L Inst

Inhibidor de la coagulación:

- Citrato-Ag-Pre (GPR) 50 U/L/ml

Tubos de polipropileno 12x75 mm
Cilindro de flujo

2. Procedimiento:

1. Diluir 1:10 la sangre entera con tampón Tyrode (25 µl de sangre + 225 µl de tampón).
2. Rotular tubos de 12x75 mm, incluyendo un tubo para el control de activación espontánea (sin agonista).
3. Dispensar en cada tubo 25 µl de sangre diluida y 5 µl de cada anticuerpo.
4. Dispensar 5 µl de GPR sólo en el tubo de activación con trombina.
5. Mezclar el contenido de cada tubo por agitación suave.
6. Añadir a cada tubo el volumen indicado del agonista correspondiente.
7. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos.
8. Añadir a cada tubo 1 ml de tampón Tyrode (o PBS) a temperatura ambiente.
9. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.

Supervención:

1. La determinación de la activación plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (Desta 2 hora aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de torquetos y desechando los primeros mililitros.
3. El flujo incrementa la activación plaquetaria por lo que la dilución final (paso 8) debe hacerse con tampón a temperatura ambiente.
4. Si no se puede analizar inmediatamente la muestra, se puede fijar la suspensión diluida (paso 7) con paraformaldehído 2% en PBS y mantener en reversa durante 24-48h.

ANALISIS FUNCIONAL

ANALISIS CITOMETRICO DE LA LIBERACION DE CALCIO CITOSOLICO EN PLAQUETAS

1. Material:

Sangre entera anticoagulada con citrato
Tampón de Tyrode con 0.3% BSA
Fluo-3 AM (Sigma) 1ml en DMEM
Anticuerpo monoclonal CD41-PE (Inmunotect)
Agonistas de activación plaquetaria:

- ACP
- Trombina
- Citogeno

Inhibidor de la coagulación: GPR
Baño termostático a 37°C
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Cilindro de flujo

2. Procedimiento:

1. Rotular un tubo de 12x75 mm por muestra. Dispensar 50 µl de sangre + 450 µl de tampón (dilución 1:10).
2. Añadir 2.5 µl de Fluo-3 AM a cada tubo.
3. Incubar 15 minutos a 37°C en oscuridad.
4. Rotular 3 tubos por muestra.
5. Dispensar 10 µl de sangre diluida marcada con Fluo-3.
6. Añadir 5 µl de CD41-PE a cada tubo.
7. Dispensar 4 µl de GPR sólo en el tubo de activación con trombina.
8. Incubar a 37°C y en oscuridad durante 15 minutos.
9. Añadir a cada tubo 500 µl de tampón Tyrode a 37°C.
10. Analizar en un citómetro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.
11. Introducir el tubo de la muestra en el citómetro y comenzar a adquirir eventos.
12. A los 15 segundos, iniciar la adquisición (FACS), iniciar el tubo y añadir el volumen del agonista correspondiente.
13. Colocar rápidamente el tubo en el citómetro y reiniciar la adquisición (CONT) hasta que finalice el tiempo programado.

Supervención:

1. La determinación de la activación plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (Desta 2 hora aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de torquetos y desechando los primeros mililitros.
3. Para evitar el error de dilución activada entre dos análisis consecutivos, se recomienda intercalar tubos de sangre diluida entre muestras activadas, adquiriendo durante 15-20 segundos y desechando el análisis.

ANALISIS CITOMETRICO DE LA ACTIVACION PLAQUETARIA

PRODUCTOS RELACIONADOS:

- **CD41-FITC: 10Test IM0649**
- **CD41-PE: 10Test IM1416**
- **CD41-PC5: 10Test 660716**
- **CD62P-FITC: 10Test IM1164**
- **CD62P-PE: 10Test IM1759**

ANÁLISIS CITOMÉTRICO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Medida de la expresión de superficie procoagulante:

- **Objetivos:**
- Cuantificación de la expresión de fosfatidilserina en la superficie de la plaqueta activada
- Evaluación de la contribución plaquetaria a la coagulación

Aspectos metodológicos:

- El análisis se efectúa en sangre periférica
- Identificación con CD41 o CD61 con PE o PC5
- Medida de fosfatidilserina con Anexina V-FITC

ANÁLISIS CITOMÉTRICO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Análisis cuantitativo de micropartículas plaquetarias:

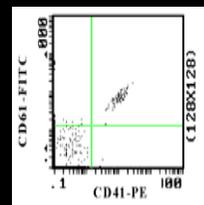
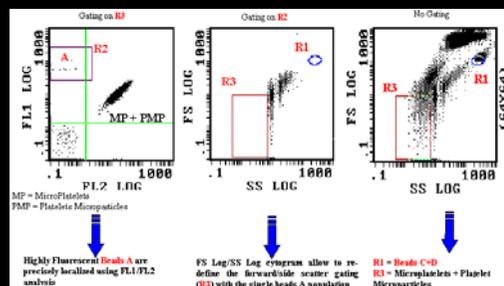
- **Objetivos:**
- Detección y cuantificación de fragmentos circulantes de membrana plaquetaria que expresan fosfatidilserina
- Diferenciar micropartículas activadas y no activadas
- Evaluación de la contribución plaquetaria a la coagulación

Aspectos metodológicos:

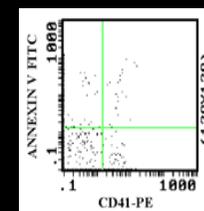
- El análisis se efectúa en sangre periférica
- Identificación con CD41 o CD61 con PE o PC5
- Medida de fosfatidilserina con Anexina V-FITC
- Método normalizado en preparación por Biocytex

ANÁLISIS CITOMÉTRICO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Análisis cuantitativo de micropartículas plaquetarias:



Micropartículas plaquetarias



Micropartículas activadas

Number of Pathological Samples : n = 22

	Test A	Test B
	CD61/CD41	Annexin V/CD41
Mean	7745	1362
SD	3474	570
Range	1839 - 13620	400 -
	2280	

Results expressed in number of events / μ l whole blood

MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE SUPERFICIE PROCOAGULANTE Y MICROPARTÍCULAS:

ANÁLISIS FUNCIONAL

ANÁLISIS CITOMÉTRICO DE LA EXPRESIÓN DE SUPERFICIE PROCOAGULANTE EN PLAQUETAS

1. Material:
Sangre anticoagulada con citrato
Kit Annexin V-FITC (Bioss) (Bioss)
Anticuerpo monoclonal CD41-PE (Bioss) (Bioss)
Agente de activación plaquetaria (Sigma)
- Ionóforo de calcio 32187
- Iononina
Baño termostático a 37°C
Tubos de polipropileno 12x75 mm
Cilindro de flujo

2. Procedimiento:

1. Rotular un tubo de 12x75 mm por muestra. Dispensar 50 μ l de sangre + 950 μ l de tampón de unión del kit de anexina (dilución 1/10).
2. Añadir 5 μ l de reactivo anexina V-FITC a cada tubo.
3. Incubar 15 minutos a 37°C en oscuridad.
4. Anular en un cilindro de flujo siguiendo el protocolo correspondiente.
5. Introducir el tubo de la muestra en el citómetro y comenzar a adquirir eventos.
6. A los 15 segundos, detener la adquisición (PAUSE), extraer el tubo y añadir el estímulo correspondiente en un volumen de 5 μ l.
7. Colocar rápidamente el tubo en el cómetro y reiniciar la adquisición (CONT) hasta que finalice el tiempo programado.

Suplementos:

1. La determinación de la activación plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (Nota 2 horas aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de tornejete y desechando los primeros mililitros.
3. Para evitar el artefacto de plaquetas activadas entre dos análisis consecutivos, se recomienda intervalar tubos de sangre diluida entre muestras activadas, adquiriendo durante 10-30 segundos y abortando el análisis.

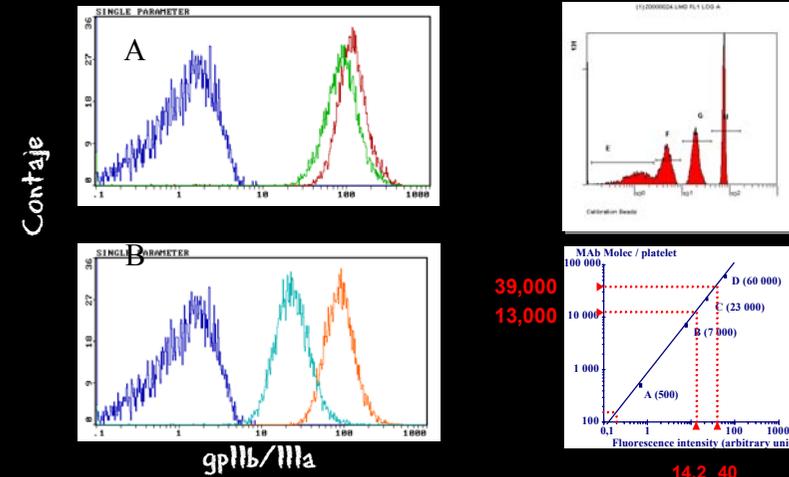
CENTRO DE CITOMETRÍA Y CITOMÍA
DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLÓGIA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE VALENCIA
9102 01 011 | jma.uv@ccm@uv.es

MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE SUPERFICIE PROCOAGULANTE Y MICROPARTICULAS:

PRODUCTOS RELACIONADOS:

- CD41-PE: IOTest IM1416
- CD41-PC5: IOTest 6607116
- CD61-PE: IOTEST IM3605
- Annexin V-FITC Kits: IM2375, IM3546, IM3614

ANALISIS CITOMETRICO DE LA TERAPIA PLAQUETARIA



Cuantificación de receptores gpIIb/IIIa (CD41) en plaquetas en sangre entera. (A) Sujeto normal, en el que los **receptores totales** (línea roja) se encuentran **mayoritariamente libres** (línea verde). (B) Paciente tratado con anticuerpo anti-gpIIb/IIIa en el que la mayor parte de los **receptores totales** (línea naranja) se encuentran **ocupados** (línea azul).

ANALISIS CITOMETRICO DE LA TERAPIA PLAQUETARIA

Medida de la ocupación de receptores gpIIb/IIIa:

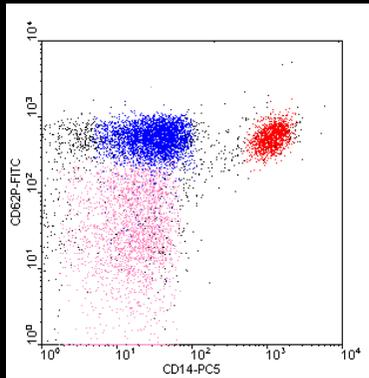
- Objetivos:
 - Monitorización de las terapias antiagregantes
 - Determinación del número de receptores GPIIb/IIIa:
 - Totales: CD61 (A)
 - No ocupados por el anticuerpo antiGPIIb/IIIa: CD61 (B)
 - Optimización del tratamiento en pacientes individuales
- Aspectos metodológicos:
 - El análisis se efectúa en sangre periférica
 - Cuantificación con el kit Platelet gpIIb/IIIa Occupancy Kit

ANALISIS CITOMETRICO DE LA TERAPIA PLAQUETARIA

PRODUCTOS RELACIONADOS:

- kit Platelet gpIIb/IIIa Occupancy Kit:
 - PN BX7001
 - anti-GPIIIa (CD61) Mab1
 - anti-GPIIIa (CD61) Mab2
 - anti-Mouse IgG-FITC

INTERACCION DE PLAQUETAS CON CELULAS SANGUINEAS



INTERACCION DE PLAQUETAS CON MONOCITOS

- Objetivos:
- Cuantificación de la adhesión de plaquetas activadas a la superficie de los monocitos
- Medición del riesgo protrombótico

- Aspectos metodológicos:
- El ensayo se realiza en sangre periférica
- Identificación de monocitos con **CD14-PC5**
- Identificación de plaquetas activadas: **CD41-PE/CD62P-FITC**

INTERACCION DE PLAQUETAS CON GRANULOCITOS

- Objetivos:
- Cuantificación de la adhesión de plaquetas activadas a la superficie de los granulocitos
- Medición del riesgo protrombótico

- Aspectos metodológicos:
- El ensayo se realiza en sangre periférica
- Identificación de granulocitos con **CD15-PC5** o **CD16-PC5**
- Identificación de plaquetas activadas: **CD41-PE/CD62P-FITC**

INTERACCION DE PLAQUETAS CON ERITROCITOS

- Objetivos:
- Cuantificación de la adhesión de plaquetas activadas a la superficie de los eritrocitos
- Medición del riesgo protrombótico

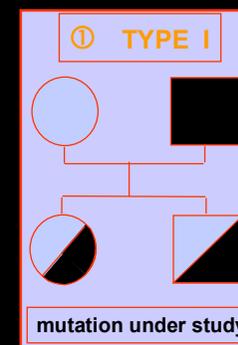
- Aspectos metodológicos:
- El ensayo se realiza en sangre periférica
- Identificación de eritrocitos con **glicoforina A-PE**
- Identificación de plaquetas activadas: **CD41-PC5/CD62P-FITC**

INTERACCION DE PLAQUETAS CON CELULAS SANGUINEAS

PRODUCTOS RELACIONADOS:

- CD14-PC5: IOTest IM2640
- CD15-PC5: IOTest IM2641
- CD16-PC5: IOTest IM2642
- anti Glycophorin A-FITC (CD235): IOTest IM2212
- anti Glycophorin A-PE (CD235): IOTest IM2211
- CD41-FITC: IOTest IM0649
- CD41-PE: IOTest IM1416
- CD41-PC5: IOTest 6607116
- CD62P-FITC: IOTest IM1164
- CD62P-PE: IOTest IM1164

ANALISIS CITOMETRICO DE LA PATOLOGIA PLAQUETARIA CONGENITA



ANALISIS CITOMETRICO DE LA PATOLOGIA PLAQUETARIA CONGENITA

- **Deficiencias de glicoproteínas de superficie:**
 - Trombastenia de Glanzmann: CD41, CD61
 - Síndrome de Bernard-Soulier: CD42a, CD42b, CD41
 - Otras: CD49b, CD49e, CD51
- **Deficiencias de almacenamiento en los gránulos:**
 - CD62P, CD41
- **Deficiencias de la expresión de fosfatidilserina:**
 - Síndrome de Scott: Annexina V, CD41
- **Hemoglobinuria paroxística nocturna:**
 - Deficiencia en CD55 y/o CD59: CD55, CD59, CD41

ANALISIS CITOMETRICO DE LA PATOLOGIA PLAQUETARIA CONGENITA

ANÁLISIS FUNCIONAL

ANÁLISIS CITOMETRICO DE LA EXPRESION DE MOLECULAS DE SUPERFICIE EN PLAQUETAS

1. Material:
Sangre entera anticoagulada con citrato
Tampón de Tyrode
PBS (opcional)
Anticuerpos conjugados con FITC o PE (ImmunoStat) contra moléculas de adhesión de la familia de las integrinas (CD18, CD11a, CD11b, CD11c) o selectinas (CD62P),
Tubos de polipropileno de 12x75 mm
Citrato de Sodio

2. Procedimiento:
1. Diluir 1/10 la sangre entera con tampón Tyrode (25 µl de sangre + 225 µl de tampón).
2. Rotular tubos de 12x75 mm.
3. Dispensar en cada tubo 25 µl de sangre diluida y 5 µl de cada uno de los anticuerpos correspondientes, de acuerdo con la combinación de moléculas de superficie que se desea investigar.
4. Añadir a cada tubo 1 ml de tampón Tyrode (o PBS) a temperatura ambiente.
5. Analizar por citometría de flujo, siguiendo el protocolo correspondiente.

Supervisión:

1. La determinación de la función plaquetaria debe hacerse lo más pronto posible tras la extracción de la muestra (hasta 2 horas aprox.).
2. La extracción de la muestra debe hacerse evitando en lo posible la utilización de tornavientos y desactivando los primeros filitros.
3. El finis incrementa la activación plaquetaria por lo que la dilución final (paso 4) debe hacerse con tampón a temperatura ambiente.

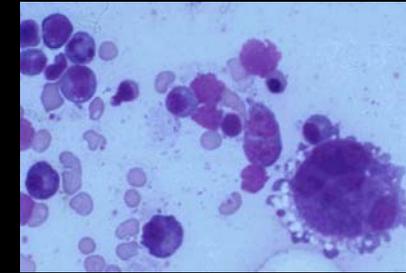
CENTRO DE CITOMETRIA Y CITOMETRIA
DPTO. DE BIQUINICA Y BIQUINICA MOLECULAR
FACULTAD DE BIQUINICA, UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
9103 00 41 04 / 2004-01-01-01-01

ANALISIS CITOMETRICO DE LA PATOLOGIA PLAQUETARIA CONGENITA

PRODUCTOS RELACIONADOS:

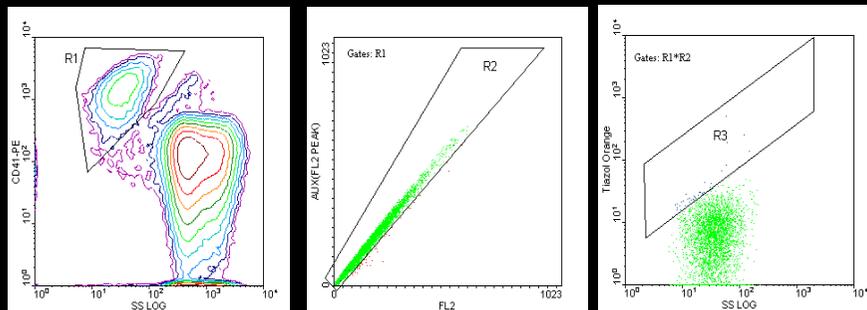
- CD41-FITC: 10Test IM0649
- CD41-PE: 10Test IM1416
- CD41-PC5: 10Test 6607116
- CD42a-FITC: 10Test IM1757
- CD42b-FITC: 10Test IM0648
- CD42b-PE: 10Test IM1417
- CD49b-FITC: 10Test IM1425
- CD49e-FITC: 10Test IM1854
- CD55-FITC: 10Test IM2725
- CD55-PE: 10Test IM2726
- CD59-FITC: 10Test IM3457
- CD61-FITC: 10Test IM1758
- CD61-PE: 10Test IM3605
- CD62P-FITC: 10Test IM1164
- Annexin V-FITC Kits:
 - IM2375, IM3546, IM3614

ANALISIS CITOMETRICO DE LA MADURACION DE LAS PLAQUETAS



ANALISIS CITOMETRICO DE PLAQUETAS RETICULADAS

Naranja de tiazol y CD41-PE: Recuento normal

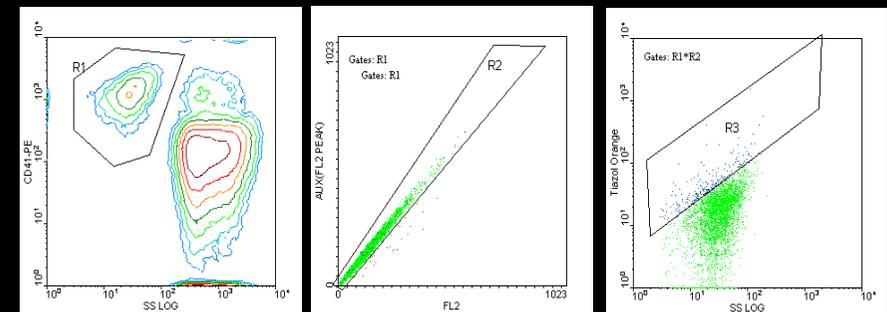


File: Z0010492.LMD
 Sample ID: N67 PROT2 S/TO S/COMP
 Gates: R1*R2
 Gated Events: 12083
 SS LOG (2) vs Tiazol Orange (3)

Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated	Params	X Range	Y Range
R0	40.6	5.7	12083	3.83	100.00	2.3	10000	10000
R1	40.6	1518.9	12083	3.83	100.00	2.4	10000	10000
R2	155.8	170.8	12083	3.83	100.00	5.6	1024	1024
R3	31.7	51.0	126	0.04	1.04	2.3	10000	10000

ANALISIS CITOMETRICO DE PLAQUETAS RETICULADAS

Naranja de tiazol y CD41-PE: Recuento elevado



File: Z0010495.LMD
 Sample ID: N68 PROT2 S/TO S/COMP
 Gates: R1*R2
 Gated Events: 8879
 SS LOG (2) vs Tiazol Orange (3)

Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated	Params	X Range	Y Range
R0	34.3	18.8	8879	6.08	100.00	2.3	10000	10000
R1	34.3	1362.9	8879	6.08	100.00	2.4	10000	10000
R2	139.7	154.1	8879	6.08	100.00	5.6	1024	1024
R3	29.4	61.2	536	0.37	6.04	2.3	10000	10000

ANALISIS CITOMETRICO DE LA MADURACION DE LAS PLAQUETAS

PRODUCTOS RELACIONADOS:

- CD41-FITC: 10Test 1M0649
- CD41-PE: 10Test 1M1416
- CD41-PC5: 10Test 6607116
- ReticONE Reagent Kit (Retic-STAT dye): 7547059



KITS DE BIOCYTEX UTILES EN EL ANALISIS CITOMETRICO DE PLAQUETAS

- PLATELET GpIIb/IIIa Occupancy:
- Cuantificación de sitios ocupados por anticuerpos anti-GP IIb/IIIa
- PLATELET HPA-1:
- Detección de polimorfismos plaquetarios P1A1 / P1A2
- PLATELET Gp:
- Identificación y caracterización de defectos congénitos
- PLATELET GelSep®:
- Separación de plaquetas por centrifugación/filtración en gel



KITS DE BIOCYTEX UTILES EN EL ANALISIS CITOMETRICO DE PLAQUETAS

- PLATELET P1P:
- Expresión de proteína priónica normal en plaquetas activadas
- PLATELET Gp Screen:
- Expresión de glicoproteínas en la superficie plaquetaria
- PLATELET Calibrators:
- Calibración de proteínas en la superficie plaquetaria
- PLATELET Fibrinogen:
- Determinación de la unión de fibrinógeno a plaquetas activadas

ANALISIS CITOMETRICO DE LA FUNCION PLAQUETARIA

The European Working Group on Clinical Cell Analysis.
Consensus protocol for flow cytometric characterization of platelet function.
Thromb. Haem. 79: 885-896 (1998)

Michelson, AD et al.
Evaluation of platelet function by flow cytometry.
<http://www.platelets.org>

O'Connor, J.E., et al. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis.
IOBMB Life 51: 231-239. (2001)

Monteiro, M.C., et al. La citometría de flujo en el análisis de las plaquetas (I)
Aspectos estructurales y funcionales de las plaquetas.
Rev Diag. Biol. 50: 111-136. (2001)

Monteiro, M.C., et al. La citometría de flujo en el análisis de las plaquetas (II)
Aplicaciones en el análisis funcional.
Rev Diag. Biol. 51: 87-99. (2002)