

870127  
20  
2ej

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



DISPONIBILIDAD DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

RAMIRO QUEZADA MEDRANO

GUADALAJARA, JALISCO. 1987

FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
<b>CAPITULO 1 <u>GENERALIDADES</u></b>	
1.1 LAS PLAQUETAS	4
1.1.1 Antecedentes Históricos	4
1.1.2 Maduración y Liberación	5
1.1.3 Ultraestructura	7
1.1.4 Constituyentes	11
1.1.5 Papel en la Hemostasia	13
1.1.6 Fisiología de la Hemostasia	19
1.1.7 Mecanismos de Control de la Hemostasia.	24
1.2 FACTOR 3 PLAQUETARIO (F <sub>3</sub> P)	28
1.2.1 Química	28
1.2.2 Acción en la Coagulación	29
1.3 EVALUACION DE LA INTERVENCION DEL F <sub>3</sub> P EN LA HEMOSTASIS.	31
1.3.1 Consumo de Protrombina	31
1.3.2 Tiempo de Protrombina	32
1.3.3 Recuento Plaquetario	32
<b>CAPITULO 2 <u>MATERIAL Y METODO</u></b>	
2.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS	35
2.2 PROCEDENCIA Y SELECCION DE MUESTRAS	36
2.3 TOMA DE MUESTRA	36
2.4 PROCESAMIENTO Y SEPARACION DE MUESTRAS	37
2.5 DETERMINACION DEL CONSUMO DE PROTROMBINA	38
2.6 DETERMINACION DEL TIEMPO DE PROTROMBINA	39
2.7 RECUENTO DE PLAQUETAS	40
2.8 DETERMINACION DEL F <sub>3</sub> P	40

	Página
2.9 TRATAMIENTO ESTADISTICO	41
2.9.1 Valores de referencia	41
2.9.2 Precisión	42
CAPITULO 3 <u>RESULTADOS</u>	43
CAPITULO 4 <u>ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES</u>	51
BIBLIOGRAFIA	54

## I N T R O D U C C I O N

Las plaquetas son la principal fuente de fosfolípidos que son necesarios para la activación eficiente de los factores X y II del mecanismo intrínseco de la coagulación. Estos fosfolípidos están disponibles sólo cuando las plaquetas son activadas por un estímulo apropiado ya sea in vivo o in vitro y se les ha asignado el nombre de Factor 3 Plaquetario.

Una medida directa de la actividad del Factor 3 Plaquetario se puede hacer suministrando un estímulo estándar con caolín y adrenalina a un plasma que contenga una concentración conocida de plaquetas para ser examinadas y saber -- que su actividad en la coagulación es normal.

Las plaquetas intervienen en forma importante en el mecanismo hemostático de dos maneras principalmente: Una es formando aglomerados que constituyen el trombo primario, que taponan de inmediato la pared del vaso lesionado y otra es -- aportando una superficie fosfolípídica, necesaria para la interacción correcta de los factores de la coagulación del mecanismo intrínseco.

Debido a que los trastornos en la coagulación no sólo son debidos a deficiencias en los factores plasmáticos, sino también a deficiencias plaquetarias y alteraciones vasculares, se pretende en este estudio evaluar la función plaquetaria, cuantificando el tiempo en que el Factor 3 Plaquetario activa y promueve la formación del coágulo. Por lo -- que de lo anterior se establece que el objetivo de este estudio es estandarizar una técnica, que nos valore la funcionalidad plaquetaria, para que se incluya dentro del perfil de rutina de pruebas de coagulación y de esta manera valorar la

fase plasmática y plaquetaria conjuntamente.

Además, es importante la determinación del Factor 3 Plaquetario en algunas situaciones en que las plaquetas fa - llan al tratar de hacer disponible fosfolípidos de su membra - na, como en algunas condiciones fisiopatológicas, tal es el caso de insuficiencia renal, uremia, anormalidades en proteí - nas séricas y en la ingestión de algunas drogas como anticon - ceptivos, aspirina y fenilbutazona, ibuprofen (motrin), corticoesteroides, caféina, papaverina, carbenicilina, cloroqui - na, reserpina, fenotiazina.

Para el presente trabajo de investigación, primero se valoró el sistema de coagulación en conjunto, tomando como muestras elegibles aquellas que resultaron normales en la valoración general del sistema de coagulación. La valora - ción se realizó con las pruebas de Consumo de Protrombina, - Tiempo de Protrombina y Recuento Plaquetario; tales pruebas nos valoran el sistema de coagulación en conjunto, la vfa ex - trínseca de la coagulación y el número de plaquetas disponibles, respectivamente.

C A P I T U L O 1

## CAPITULO I

### GENERALIDADES

#### 1.1 LAS PLAQUETAS

##### 1.1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

El descubrimiento de la existencia de las plaquetas en la sangre data desde el siglo XIX en que los investigadores de esa época asociaron unas pequeñas partículas de aspecto globular con la coagulación de la sangre, ya que observaron que al disminuir la cantidad de estas estructuras desconocidas, se desencadenaba un proceso hemorrágico y que al hacer una transfusión sanguínea, con sangre de una persona sana, el proceso hemorrágico se detenía observándose un aumento significativo en la cantidad de estas estructuras.

Corresponde a Brohm y Krauss el mérito de haber establecido en 1833 la relación entre la disminución de plaquetas en sangre y la presentación de cuadros hemorrágicos y en 1842 Donné describió a las plaquetas con el término de globulinas debido a su tamaño y aspecto globular.

En 1882 Bizzozero las describió con el término de "plaquetas" y estableció en forma definitiva su independencia de los otros elementos figurados de la sangre, adhesividad, participación en los trombos y papel en la coagulación sanguínea. En 1906 Wright afirmó que las plaquetas eran porciones desprendidas del citoplasma de los megacariocitos de la médula ósea. Estudios posteriores hechos por Glazman en 1918, demostraron la existencia de un fenómeno hemorrágico - explicable no por disminución en el número de plaquetas sino por una alteración en la función de las plaquetas.

### 1.1.2 MADURACION Y LIBERACION PLAQUETARIAS

En médula ósea se encuentran células primitivas pluripotenciales, es decir, provistas de la capacidad de diferenciarse en múltiples líneas hematopoyéticas; conforme se van diferenciando, esta capacidad se hace cada vez más limitada, de tal forma que su progenie da lugar sólo a líneas más diferenciadas que se limitan a una médula primitiva megacariocítica unilineal. Esta célula prolifera en precursores megacariocíticos diploides que pierden la capacidad de división celular y adquieren la capacidad de endorreproducción del ADN; este fenómeno es exclusivo de la línea megacariocítica, sucesivo y consiste en que el valor ploídico primitivo se duplica hasta que se consigue el valor final. Entonces estas células poliploides aumentan de tamaño hasta el punto de que se transforman en megacariocitos, los cuales sufren una maduración posterior, hasta que llegan a ser células formadoras de plaquetas.

La maduración citoplasmática incluye varias etapas:

**ETAPA CELULAR I:** El sistema membranoso de la célula indiferenciada se demarca y algunos gránulos densos característicos de la línea megacariocítica se hacen presentes. En esta etapa la síntesis protéica es muy activa y son notorios los ribosomas y el retículo endoplásmico rugoso.

**ETAPA CELULAR II:** Esta etapa se caracteriza por una síntesis protéica más pronunciada. Aumenta el tamaño celular y se encuentran presentes todas las estructuras de la célula madura. Al final de esta etapa cesa la síntesis del ADN y se consigue así la ploídía máxima. El núcleo ya es multilobulado.

**ETAPA CELULAR III:** El megacariocito madura. Los organelos citoplasmáticos se distribuyen y organizan, el siste

ma membranoso de demarcación divide al citoplasma en zonas de plaquetas preformadas. La síntesis proteica continúa y aumenta el volumen celular.

Como la megacariopoyesis tiene lugar en la médula ósea, las plaquetas deben atravesar el endotelio medular para poder tener acceso a los sinusoides de la médula que comunican con el torrente circulatorio, para esto las células de sarrollan pseudópodos citoplasmáticos romos que se internan entre las células del revestimiento endotelial y posteriormente cada pseudópodo se fragmenta para formar plaquetas independientes. Este proceso de fragmentación citoplasmática tiene lugar en los sinusoides medulares, en sangre periférica y en menor grado en el sistema vascular pulmonar.

Se ha comprobado que megacariocitos enteros pueden pasar a través de las aperturas endoteliales de 6 mm de diámetro, por lo que se pueden encontrar megacariocitos en sangre periférica.

La regulación de la trombopoyesis es mediada por una hormona similar a la eritropoyetina, llamada trombopoyetina, de la cual dependen diversos aspectos de la maduración megacariocítica y de la liberación plaquetaria de la médula ósea.

No existe evidencia de que exista algún órgano en especial productor de la trombopoyetina o de algún factor estimulante de la producción de la misma, pero se supone que tal factor es producido por un tipo celular común a muchos órganos, como las células endoteliales u otras de la pared vascular que están en constante contacto con las plaquetas circulantes o bien macrófagos que ingieren plaquetas senescentes que pueden estar relacionados con el mecanismo sensor y con el productor de factores estimulantes trombocitopoyéticos como son la UFC-M (Unidad Formadora de Colonias de Megacariocitos) y la UFC-granulocito-macrófago; los cuales inducen los

primeros fenómenos proliferativos de las células progenitoras.

### 1.1.3 ULTRAESTRUCTURA PLAQUETARIA

La ultraestructura celular de la plaqueta se divide en tres regiones distintas: A) ZONA PERIFERICA; B) ZONA SOLGEL; y C) ZONA DE ORGANELOS. (Fig. 1).

#### A) ZONA PERIFERICA

A esta zona la constituyen la pared plaquetaria y las invaginaciones, que comunican el interior con el medio que rodea a la plaqueta, formándose el sistema canalicular abierto o superficie de conexión.

Esta zona está relacionada con el mecanismo de adhesión de las plaquetas a los lugares de alteración vascular. Además, mantiene la integridad de las plaquetas, proporciona receptores para diversos agentes estimulantes o inhibidores, es determinante de la especificidad inmunológica plaquetaria, facilita las interacciones plaqueta-plaqueta y plaqueta-superficie y proporciona la superficie fosfolipídica que acelera la coagulación.

La zona periférica se compone de tres zonas morfológicas: a) Capa exterior (Glucocáliz); b) Unidad de membrana; y c) Area submembranosa.

#### a) Capa exterior (Glucocáliz):

Es el componente de la zona periférica que está en contacto con el plasma. Tiene un grosor de 150-200  $\mu$ . Sirve de protección a la membrana y delimita el sistema canalicular. Es el lugar de adhesión de las plaquetas.

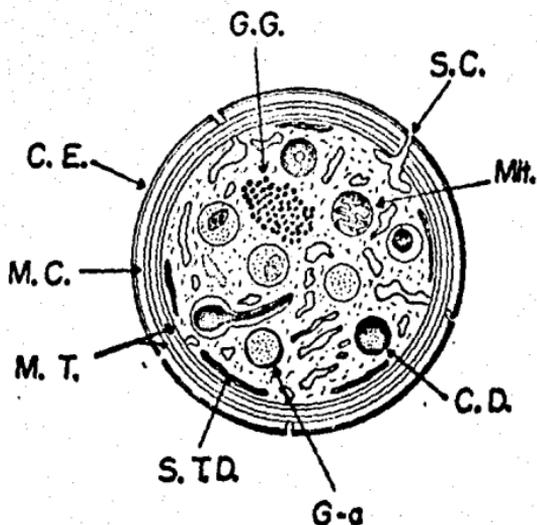


Fig. 1: Diagrama de micrografía electrónica de un corte transversal de una plaqueta. C.E., capa externa; -- M.C., membrana celular; S.C., sistema de conexión superficial; M.T., microtúbulos; S.T.D., sistema tubular denso; G-a, gránulos alfa; C.D., cuerpos densos; Mit., mitocondria; G.G., gránulos de glicógeno.

Está compuesta por mucopolisacáridos ácidos y glucoproteínas, que contienen moléculas de ácido siálico terminal que contribuyen a proporcionar cargas negativas en la superficie que ayudan por repulsión electrostática a evitar la adhesión de plaquetas entre sí o al endotelio vascular intacto.

b) Unidad de membrana:

Es la capa media de la zona periférica y es una típica membrana trilaminar que es esencial para la integridad interna de la célula. Además participa en otras funciones como adhesión, contracción y fuente de fosfolípidos activadores de la coagulación sanguínea.

c) Area submembranosa:

Es el espacio entre la unidad de membrana y la banda circunferencial de microtúbulos que contienen un sistema de elementos filamentosos que son los que dan y mantienen la forma de la plaqueta, forman pseudópodos e intervienen en la retracción del coágulo.

B) ZONA SOL-GEL

Esta zona comprende la matriz viscosa intracelular; está compuesta por proteínas que se agrupan en elementos fibrosos como Microtúbulos y Microfilamentos; difieren unos de otros en su estado de polimerización, agregación y localización en la célula.

Los movimientos orientados de la plaqueta, la contracción de los pseudópodos y la retracción del coágulo, que son esenciales para el funcionamiento normal plaquetario, dependen de los elementos fibrosos de esta zona, por lo que se le considera como la encargada de la función contráctil.

### C) ZONA DE ORGANELOS

En la matriz sol-gel de la plaqueta se encuentran flotando una gran variedad de elementos formes y partículas, como: los gránulos, cuerpos densos, mitocondrias, partículas de glicógeno y sacos aplastados que son los aparatos de Golgi.

Los gránulos son redondeados y envueltos por una membrana, contienen sustancias que son secretadas por la plaqueta durante la metamorfosis viscosa, como: fosfolípidos, enzimas hidrolíticas como la fosfatasa ácida, B-glucuronidasa, catepsina, ATP-asa, además ATP y ADP.

Los cuerpos densos son órganos secretores que durante la transformación interna que ocurre después de la exposición a los agentes agregantes, se mueven a la superficie plaquetaria y liberan sustancias como serotonina ADP, catecolaminas y Factor 4 Plaquetario.

Las mitocondrias son el depósito metabólico de ATP y calcio, se almacena energía para que cuando sea bloqueada la glucólisis enzimática, las funciones celulares no paren.

Además de estos elementos ligados a las tres zonas funcionales, las plaquetas poseen tres sistemas membranosos: El sistema canalicular abierto que consiste en un extenso sistema de canales que comunican con el exterior; estos canales agrandan el área de superficie de la plaqueta, lo que permite que los nutrientes plasmáticos sean más accesibles a la plaqueta. Un segundo sistema es el aparato de Golgi. Y el tercero es el sistema tubular denso, que es el principal lugar de almacenamiento de calcio, que se moviliza para regular el fenómeno contráctil. También el metabolismo de las prostaglandinas se localiza en este sistema.

#### 1.1.4 CONSTITUYENTES BIOQUÍMICOS PLAQUETARIOS

Las plaquetas poseen constituyentes bioquímicos que son sintetizados por ellas mismas, como el glucógeno, adenin nucleótidos, proteínas, aminoácidos y el ortofosfato, que se hallan distribuidos heterogéneamente en las plaquetas y la cantidad de dichos constituyentes varía según la edad de la plaqueta.

Los carbohidratos representan el 1.9% del peso húmedo y están formados principalmente por oligo y polisacáridos, entre ellos el glucógeno, glucosamina, galactosamina, condroitín-4-sulfato, ácido hialurónico y ácido N-acetilneuramínico.

Las proteínas son los principales constituyentes y representan el 12% del peso húmedo y el 52% del peso seco. Las principales proteínas constituyentes son: ATP-asa, trombostefina, miosina, actina, trompomiosina, fibrinógeno, albúmina, Factor XIII y los factores 2 y 4 plaquetarios.

Los lípidos constituyen el 2.9% del peso húmedo total de la plaqueta y los fosfolípidos constituyen el 76% de los lípidos totales y consisten en lecitina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélna y el Factor 3 Plaquetario.

Entre los minerales y vitaminas presentes en las plaquetas en mayor cantidad son el sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, fósforo, ortofosfato, ácido fólico, vitamina B-12 y cantidades elevadas de ácido ascórbico. Estos constituyentes no son sintetizados propiamente por la plaqueta sino que son tomados del plasma.

Además de todos estos componentes antes descritos, las plaquetas poseen concentraciones relativamente elevadas de serotonina y adrenalina. La serotonina es secretada por

las células argentófilas del intestino y es transportada a circulación por las plaquetas, las cuales contienen la mayor parte de la serotonina de la sangre. También captan y transportan adrenalina pero en concentración menor que la serotonina.

Las plaquetas están constituidas además por varios componentes del sistema de coagulación y que forman parte de su estructura interna, entre ellos los más importantes son: el fibrinógeno que forma el 10-15% del total de las proteínas plaquetarias, una parte se localiza en la membrana y otra en los gránulos secretores. Otro constituyente muy importante es el factor estabilizador de fibrina que es esencial en el último paso de la formación del coágulo de fibrina.

La plaqueta también posee cuatro constituyentes sintetizados por ella misma y que tienen importante actividad en la coagulación, son los llamados factores plaquetarios.

#### Factor 1 Plaquetario:

Se le llama así al factor plasmático V que ha sido absorbido en la membrana plaquetaria y tiene características y función idénticas.

#### Factor 2 Plaquetario:

Es una proteína relativamente de bajo peso molecular y termoestable que acelera la reacción catalizada por la trombina, es decir, aumenta el grado de liberación de péptidos desde el fibrinógeno, para formar el monómero fibrinógeno-fibrina. Actúa como una enzima proteolítica que convierte el fibrinógeno en más sensible a la acción de la trombina. Además, contrarresta los efectos inhibidores de la antitrombina III. Agrega las plaquetas del plasma y potencializa el

efecto agregante del ADP.

### Factor 3 Plaquetario:

Es un fosfolípido constituyente de la membrana plaquetaria que es esencial para que se lleve a cabo el mecanismo intrínseco de la coagulación. Este factor es descrito en la sección 1.2.

### Factor 4 Plaquetario:

Se le da este nombre a la actividad neutralizadora de heparina de las plaquetas. Es una protefna liberada por los gránulos de bajo peso molecular. Además, neutraliza los efectos inhibidores de los productos de degradación del fibrinógeno y potencializa la agregación plaquetaria.

## 1.1.5 PAPEL EN LA HEMOSTASIA

Las plaquetas son importantes para contener el sangrado desde los vasos sanguíneos lesionados. Su función es principalmente en la hemostasis donde taponan literalmente - hablando, cualquier agujero en la pared vascular y proporcionan fosfolípidos que son esenciales para la coagulación sanguínea.

Se entiende por hemostasis "el conjunto de mecanismos y procesos que mantienen la integridad vascular, evitan las extravasaciones sanguíneas espontáneas, cohiben las hemorragias, mantienen la sangre líquida en circulación y circunscriben el proceso de la coagulación estrictamente al área donde se produjo la lesión del endotelio vascular". La hemostasis es un fenómeno complejo en que participan:

a) La pared vascular y sus propiedades de reactivi -

dad y contractilidad (Factor Vascular).

- b) La cantidad y capacidad funcional de las plaquetas (Factor Plaquetario).
- c) La integridad del sistema de coagulación plasmático con su sistema de inhibidores y el sistema fibrinolítico (Factor Plasmático).

El papel de las plaquetas en la hemostasia puede subdividirse en las siguientes fases: (Fig. 2).

FASE I) Vasoconstricción localizada a nivel del área afectada.

Después de un traumatismo vascular, se produce una vasoconstricción inicial, como resultado de una estimulación por el mecanismo reflejo de terminaciones simpáticas en la musculatura lisa de la pared de los vasos. Este fenómeno que dura aproximadamente 30 segundos, tiene como finalidad lograr una éstasis en la circulación y favorecer la formación de un trombo plaquetario. Después de la vasoconstricción refleja inicial ocurre una vasoconstricción secundaria producida por adrenalina, serotonina, tromboxano  $A_2$  que son sustancias liberadas por las plaquetas una vez que se han adherido al tejido conjuntivo subendotelial.

FASE II) Formación de un trombo de plaquetas sobre la superficie vascular lesionada.

Las plaquetas además de aportar sustancias vasoconstrictoras, forman un tapón o trombo que evita un sangrado profuso. En la formación del trombo plaquetario ocurren dos fenómenos muy importantes: La adhesión de plaquetas al subendotelio y la agregación entre las mismas plaquetas.

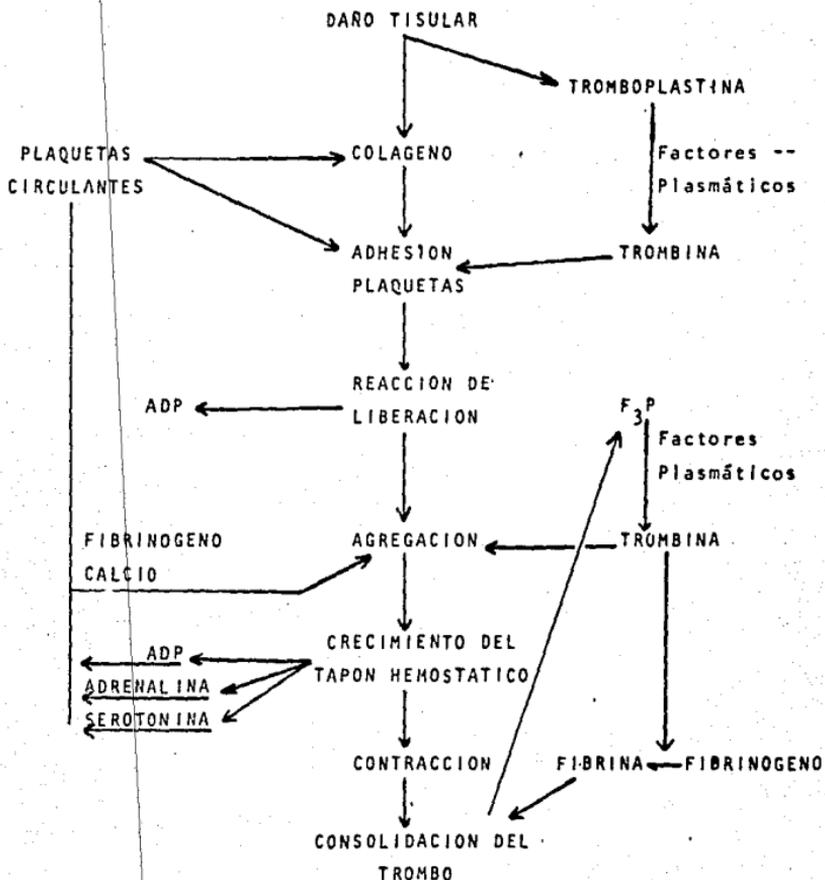


Fig. 2: Diagrama de la acción de las plaquetas en la Hemostásis.

La adhesión de las plaquetas al colágeno expuesto por la pared vascular después de un trauma se explica por la interacción de la carga positiva del colágeno con la negativa de las plaquetas y por la fibronectina, que es una proteína que actúa como receptor plaquetario superficial del colágeno. Además de adherirse al colágeno, las plaquetas también pueden adherirse a las microfibrillas asociadas con la elastina (pero no a la elastina), a la membrana basal de los vasos pequeños y a la sustancia amorfa de los vasos grandes.

Las plaquetas una vez adheridas a las estructuras de la pared vascular, cambian rápidamente de forma discoidal a esférica y emiten pseudópodos; este cambio de forma es importante para la agregación ya que aumenta la frecuencia de colisión entre las plaquetas, disminuye la repulsión electrostática y facilita un contacto más estrecho entre las plaquetas adyacentes, para de esta manera lograr una máxima superficie de adhesión a la pared vascular dañada.

Para que tenga lugar una adecuada adhesión se requieren varias sustancias como son: la glucoproteína I de la membrana plaquetaria, el factor Willebrand del plasma y los eritrocitos circulantes. La glucoproteína I es la más externa de las proteínas de la membrana plaquetaria y es rica en ácido silícico que proporciona una carga negativa a la plaqueta. El factor Willebrand es el llamado factor VIII que junto con la glucoproteína I contribuyen a que el tiempo de sangrado no sea prolongado. El papel o la necesidad de los eritrocitos en el proceso de adhesión es que ocupan el centro de la luz vascular en la sangre circulante por su mayor peso, lo que desplaza a las plaquetas hacia la pared de los vasos promoviendo así la adhesión y también a que el ADP proveniente de los eritrocitos lisados en el lugar de la lesión, actúa a las plaquetas y las transforma en adhesivas.

El otro fenómeno posterior a la adhesión y que no se

lleva a cabo si no sucede la adhesión, es la agregación plaquetaria. El término "agregación" es el fenómeno inducido -- por varias sustancias o agentes químicos, y se le llama -- agregación primaria o de primera fase a la inducida por ADP, adrenalina, serotonina, trombina y ristocetina; y de la se - gunda fase o agregación secundaria a la determinada por el - ADP procedente de las plaquetas que participaron primero en este fenómeno. De esta manera las plaquetas forman el pri - mer tapón que impide la salida de sangre y que será reforza - do por el coágulo de fibrina.

La bioquímica de la agregación plaquetaria se resume así:

Cualquier estímulo mecánico o químico de la membrana plaquetaria activa a una enzima de esta estructura, la fosfo lipidasa  $A_2$ , esta enzima cataliza la hidrólisis del ácido -- araquidónico de la posición 2 de la fosfatidilcolina y de la fosfatidilinositina plaquetarias, así el ác. araquidónico li - berado, bajo la acción de la ciclooxigenasa plaquetaria, da lugar a la formación de los endoperóxidos cíclicos llamados prostaglandinas  $PGG_2$  y  $PGH_2$ . En los microsomas de las pla - quetas se encuentra una enzima, la tromboxano sintetasa la - cual determina la transformación de la  $PGG_2$  y de la  $PGH_2$  en un compuesto inestable que es el tromboxano  $A_2$ , que además - de ser un poderoso agregante plaquetario es un vasoconstric - tor muy activo.

El fenómeno de agregación plaquetaria es escaso o nu - llo cuando la concentración de plaquetas es muy inferior a -- 50,000 plaquetas por  $mm^3$  de sangre, debido a que la libera -- ción de sustancias agregantes es inferior a la requerida pa - ra que se lleve a cabo este fenómeno.

La agregación plaquetaria es independiente de los fac - tores de coagulación plasmáticos ya que los anticoagulantes

no la inhiben.

El control de la agregación plaquetaria está regulado por la cantidad de AMPcíclico, esto es, si se incrementa la cantidad de AMPcíclico en la plaqueta, de inmediato se inhibe el proceso de agregación plaquetaria, con tendencia a la disgregación. También la adherencia de las plaquetas a la colágena es inhibida por el aumento de AMPcíclico. En cambio un nivel bajo de AMPcíclico significa la aparición de -- agregación plaquetaria y adhesión de las plaquetas al colágeno.

El nivel de AMPcíclico depende de un equilibrio entre la actividad de la enzima ciclasa de adenilo que cataliza la transformación de ATP en AMP 3'5'cíclico y la fosfodiesterasa que permite que la reacción continúe hasta obtener AMP cíclico.

Las plaquetas sintetizan y liberan prostaglandinas -- cuando son sensibilizadas por algún estímulo, una de las --- prostaglandinas secretadas, la PGE<sub>1</sub>, ejerce un profundo efecto inhibitorio sobre la agregación y adherencia plaquetaria aumentado la concentración del AMPc, debido a que estimula la actividad de la enzima ciclasa de adenilo. Los endoperóxidos cíclicos plaquetarios (PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>), son transformados -- enzimáticamente en prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que es un potente inhibidor de agregación plaquetaria. Este inhibidor de la producción de ácido araquidónico tiende a aumentar automáticamente el nivel de AMPcíclico por estimulación de la actividad de adenilciclasa, con lo que disminuye o mejor dicho, se mantiene en equilibrio el proceso de agregación.

El contacto de las plaquetas con el colágeno estimula la secreción de constituyentes intraplaquetarios que están -- almacenados en los gránulos densos y tipo alfa. Este fenómeno llamado "Reacción de Liberación" no es sólo inducido por

el colágeno, sino que puede ser inducido también por ADP, --adrenalina, trombina, tromboxano  $A_2$  (TXA $_2$ ), virus, complejos inmunes, vasopresina y cristales de ácido úrico.

Las sustancias liberadas de los gránulos densos son principalmente ADP, ATP, serotonina, calcio y prostaglandinas y de los gránulos alfa el factor 4 plaquetario y un estimulante de crecimiento de músculo liso. Inicialmente se ---creía que la salida del factor 3 plaquetario era parte de la reacción de liberación, pero estudios recientes demostraron que la acción de este factor se efectúa en la membrana plaquetaria y se vuelve disponible por cambios de permeabilidad de la misma.

La salida de sustancias de los gránulos se debe a la fusión de la membrana de los gránulos con la membrana plaquetaria y/o con la membrana del sistema canalicular abierto; - fusión en la que el calcio es esencial, el cual es determinante de la formación de soluciones de continuidad que comunican a los organelos con el medio que rodea a la plaqueta.

#### 1.1.6 FISILOGIA DE LA HEMOSTASIA

Al existir un daño en la pared vascular, de inmediato surge una hemorragia, que es controlada primero por una vasoconstricción del músculo liso y por un tapón de plaquetas, - que bastan para detener tal hemorragia de capilares y pequeñas venas, pero la cohesión del trombo plaquetario es insuficiente para detener la hemorragia en flujos mayores o para - resistir la elevada presión intravascular del sistema arterial, y es en este momento cuando el tapón plaquetario requiere un reforzamiento, rápido y eficaz de fibrina, que es aportado por el sistema plasmático de coagulación, por lo que al - trombo plaquetario se le considera como un nido para la generación local de fibrina.

La coagulación sanguínea es un proceso enzimático y -secuencial, por lo que se le ha llamado cascada de la coagulación. La coagulación sanguínea es el resultado final de una serie de reacciones que involucran proteínas plasmáticas, llamadas factores plasmáticos de la coagulación, que circulan en la sangre como proenzimas que son activadas y convertidas a enzimas durante el proceso, siendo su función la de activar a la proenzima que le sigue en secuencia.

El resultado final de la fase plasmática de la coagulación es la conversión de una proteína soluble, el fibrinógeno, en una insoluble que es la fibrina. Esta reacción es catalizada por una enzima, la trombina, que es generada a partir de la protrombina por dos vías diferentes: la vía o sistema intrínseco, llamada así porque los factores que intervienen en esta vía se encuentran en la sangre circulante; y la vía o sistema extrínseco, así llamada porque el paso inicial, necesario para la activación de esta vía, requiere de un factor externo héptico, el factor III o tromboplastina tisular.

Se pueden distinguir tres pasos importantes en la formación del coágulo:

- 1) La activación del factor X,
- 2) La generación de la trombina, y
- 3) La formación y estabilización de la fibrina.

Para la activación del factor X existen dos diferentes vías, la intrínseca y la extrínseca, que terminan en una vía común, que es la activación del factor X.

La vía intrínseca es activada por el contacto de la sangre con una superficie extraña o que tenga carga eléctrica negativa como el colágeno, ácidos grasos, caolín, celite, vidrio, etc. Esta vía requiere de la participación de seis

factores coagulantes: XII (Hageman), XI (Antecedente Tromboplastínico del Plasma), Precalificina (Fletcher), Cininógeno de alto peso molecular (Fitzgerald), IX (Christmas) y VIII (Antihemofílico):

Los pasos iniciales de la vía intrínseca son llamados fase de contacto ya que son disparados por el contacto con una superficie extraña, y está constituido por cuatro proteínas plasmáticas: el factor XII, XI, Precalificina y Cininógeno de alto peso molecular. Esta fase de contacto se inicia con la activación del F. XII por su exposición a una superficie extraña, este factor es una serinoproteasa con una superficie cargada negativamente que sufre un cambio conformacional que da lugar a una estructura más sensible a la activación proteolítica de la calificina, que convierte al F. XII en activado, que junto con el Cininógeno y la Precalificina activan el F. XI el cual activa al F. IX en presencia de iones calcio. El factor IX es una glicoproteína sintetizada en hígado en presencia de vitamina K.

Una vez activado el F. IX y en presencia de calcio, Factor 3 Plaquetario (fosfolípidos) y el F. VIII, activan al F. X y continúa la vía común final de la coagulación.

El paso único en la vía extrínseca es la reacción del Factor tisúico (F. III) con el F. VII, y este complejo actúa enzimáticamente con el calcio como cofactor para convertir el F. X en F. X activado.

El factor X es una glucoproteína que depende de la vitamina K y se sintetiza en hígado, ocupa un lugar primordial en la coagulación ya que es el sitio de intersección de ambas vías. Es el responsable, como enzima activada, de convertir la protrombina en trombina, y el factor V, el Factor 3 Plaquetario y el calcio sirven como aceleradores de la reacción, a este complejo se le conoce como protrombinasa, -

que actúa en la catálisis de la conversión de protrombina a trombina, en esta reacción casi toda la protrombina se consume de tal manera que el suero está desprovisto de este factor.

La trombina formada por ambas vías, actúa como una enzima proteolítica que ataca al fibrinógeno y lo transforma en fibrina. En la formación de fibrina se distinguen tres pasos:

- A) La separación de cuatro péptidos de la molécula del fibrinógeno, que son los fibrinopéptidos A y B. Esta separación es mediada por la trombina. A la molécula del fibrinógeno que se le han separado los fibrinopéptidos A y B, se le denomina monómero de fibrina.
- B) Consiste en la polimerización de la fibrina que es inestable ya que puede ser disuelto por urea o plasmina.
- C) Es la producción de un polímero de fibrina estable e insoluble y se requiere de la participación del F. XIII e iones calcio. El F. XIII que es activado por la trombina produce enlaces covalentes entre los polímeros inestables de fibrina. La reacción del F. XIII activado con la fibrina es el paso final de la coagulación y da origen a un coágulo fuerte y efectivo. (Fig. 3).

Una vez formado el coágulo estable se desencadena el mecanismo fibrinolítico, cuya principal función es la de remover el exceso de fibrina del vaso taponado y también ayuda a la cicatrización vascular. Este sistema está compuesto por un zimógeno circulante (Plasminógeno), activadores, cofactores e inhibidores. La proteína más importante de este sistema enzimático es la Plasmina, que es una serinproteasa, liberada del plasminógeno por proteólisis.



La activación del plasminógeno puede ser por tres diferentes mecanismos:

- A) Intrínseco, en donde todos los componentes se encuentran circulando en sangre y son el factor XII, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y un proactivador plasmático;
- B) Extrínseco, en donde el activador es liberado a la circulación por tejidos como pulmón, próstata, útero, tiroides y la orina; y
- C) Exógeno, en donde las sustancias activadoras son administradas parenteralmente con fines terapéuticos como urokinasa y estreptocinasa, que difieren de los anteriores en que éstos activan al plasminógeno en fase líquida, es decir, en circulación, y no tienen que unirse a la fibrina para su activación.

La plasmina una vez formada a partir del plasminógeno, hidroliza a la fibrina y al fibrinógeno. La disolución de la fibrina ocurre en varios pasos: primero ocurre una ruptura en los polímeros de la fibrina dando lugar a un fragmento, el X, que en una segunda etapa se degrada dando los fragmentos Y y D y posteriormente la degradación del fragmento Y da lugar a un nuevo fragmento D y E. (Fig. 4).

#### 1.1.7 MECANISMOS DE CONTROL DE LA HEMOSTASIA

Cuando un vaso sanguíneo es lesionado se forma un trombo plaquetario inicialmente y posteriormente un coágulo de fibrina; sin embargo, este coágulo no progresa ni se extiende a otras zonas ajenas a la lesión, este fenómeno es promovido y controlado por varios mecanismos de control que incluyen: El flujo de sangre, la depuración hepática, los meca-

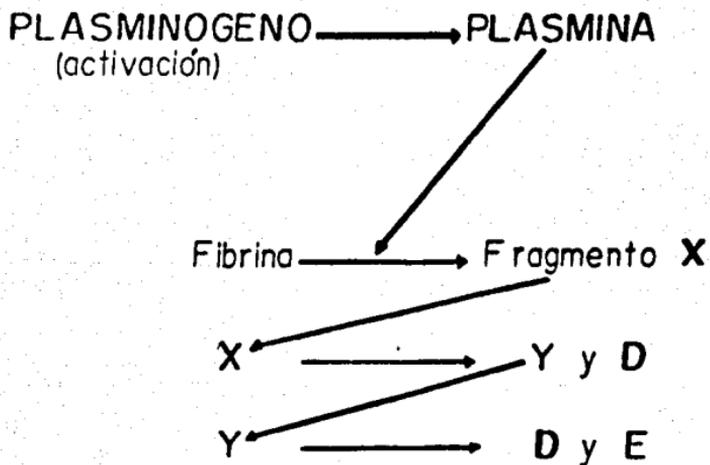


Fig. 4: Esquema secuencial del fenómeno de fibrinólisis.

nismos de retroalimentación en la coagulación, la fibrinólisis y los mecanismos de anticoagulantes naturales.

El movimiento rápido de la sangre dentro de los vasos sirve para diluir y "lavar" los factores activados durante la coagulación; además estos factores activados y los activadores del plasminógeno son retirados de la circulación por el sistema reticuloendotelial del hígado y en menor grado -- por el bazo.

El sistema fibrinolítico es esencial para disolver y remover el exceso de fibrina depositado en el área de la lesión vascular. Además, los productos de degradación de la fibrina interfieren con la polimerización de la fibrina y -- con la agregación de las plaquetas.

El plasma humano contiene una serie de agentes bioquímicos que inhiben la actividad de los factores de la coagulación activados, la concentración de estos agentes es mayor -- que la de los factores hemostáticos y del plasminógeno. Se piensa que estos factores limitan la trombosis, la fibrinólisis y el proceso inflamatorio. Entre los factores o agentes inhibidores se incluyen una serie de proteínas de las cuales las más importantes son la antitrombina III (AT-III), la alfa-2-macroglobulina y la proteína C.

La AT-III es una proteína plasmática sintetizada en el hígado, inhibe a la trombina formando un complejo estable y su acción es aumentada cientos de veces por la heparina, -- además también inhibe a los factores activados XII, XI, X, -- IX y a la plasmina.

La alfa-2macroglobulina es producida en el hígado y -- tiene como principal función inhibir a la trombina, aunque -- en menor proporción que la AT-III.

La protefna C es dependiente de la vitamina K. Circula en forma de proenzima y es convertida a su forma activa - por acción de la trombina, para su activación requiere de la presencia de la trombomodulina (protefna producida por el endotelio vascular) y su principal función es la de inactivar a los factores activados V y VIII.

## 1.2 FACTOR 3 PLAQUETARIO

### 1.2.1 QUIMICA

Las plaquetas proporcionan una superficie activa en la que interactúan los factores plasmáticos de la coagulación y que además acelera la reacción entre éstos, tal superficie está constituida principalmente por fosfolípidos. A esta actividad procoagulante provista por las plaquetas se le conoce con el nombre de "FACTOR 3 PLAQUETARIO" ( $F_3P$ ).

El  $F_3P$  es una fosfolipoproteína termoestable asociada con la membrana y los gránulos de la plaqueta, que pasa a disposición de las enzimas coagulantes y de los cofactores del plasma después de la agregación o traumatismo de las plaquetas.

Los fosfolípidos de membrana involucrados con esta actividad plaquetaria son la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina.

La plaqueta en reposo posee una asimetría en la distribución de los fosfolípidos en su bioestrato lipídico, pero si las plaquetas son estimuladas por colágeno o adrenalina, se lleva a cabo un flip-flop de fosfolípidos en la membrana, lo que origina un marcado aumento de fosfolípidos en el estrato lipídico exterior, los cuales proporcionan una superficie catalítica para la activación de factores plasmáticos.

El  $F_3P$  puede ser substituído por algunas sustancias extraídas de algunos tejidos como los eritrocitos. También una variedad de sustancias extraídas de fracciones crudas de cefalina o fosfátidos de frijol de soya purificadas, pueden tener una actividad comparable, pero ninguno de éstos puede actuar idénticamente que el  $F_3P$ .

La disponibilidad del  $F_3P$  es proporcional al número de plaquetas, esto es, cuando las plaquetas están en menor cantidad que  $50,000/mm^3$ , el tiempo de coagulación se alarga, ya que el efecto fosfolipídico es escaso o nulo a esta concentración de plaquetas.

### 1.2.2. ACCION DEL $F_3P$ EN LA COAGULACION

Normalmente el  $F_3P$  no está disponible en circulación pero puede ser aportado por las plaquetas cuando éstas han sido alteradas o activadas por algún estímulo apropiado que puede ser in vivo o in vitro. Puede ser provisto in vitro por la incubación de plasma rico en plaquetas con caolín, -- adrenalina o colágeno, por repetidas congelaciones y descongelaciones y por fragmentación mecánica de las plaquetas.

El  $F_3P$  es requerido en al menos dos pasos en el proceso de la coagulación sanguínea:

- 1) En la interacción de los factores IXa (Christmas) y VIII (Antihemofílico); los cuales dan por resultado la activación del factor X (Stuart);
- 2) En la interacción entre los factores Xa (Stuart) y el V (Proacelerina), lo que conduce a la formación de protrombinasa. Ambas reacciones requieren de iones calcio.

A la reducción de la cantidad del  $F_3P$  disponible en la coagulación se le ha denominado con el término "Trombopatía". La deficiencia de  $F_3P$  alarga el tiempo de coagulación y se ha demostrado en una variedad de condiciones congénitas y adquiridas, tales como: en pacientes con daño renal, pacientes urémicos por diversas causas, en pacientes con terapia de fenilbutazona y aspirina (fármacos antiinflamatorios), así como los estabilizadores de membrana, como la imitripti-

lina y la imipramina. Los alcaloides de la pervinca parecen actuar sobre la función de los microtúbulos, inhibiendo la liberación por este mecanismo.

### 1.3 EVALUACION DE LA INTERVENCION DEL FACTOR 3 PLAQUETA - RIO EN LA HEMOSTASIS.

#### 1.3.1 CONSUMO DE PROTROMBINA

La prueba del Consumo de Protrombina evalúa el mecanismo de la coagulación en general y depende de la determinación de la actividad procoagulante de los factores restantes del suero después de que la coagulación ha tenido lugar.

Durante la coagulación se consumen los factores V, -- VIII, Protrombina y Fibrinógeno, así como las plaquetas; por lo tanto el suero normal carece de dichos factores.

El tiempo de protrombina en este caso, se puede hacer utilizando el suero como un sustrato, en lugar del plasma, y se le agrega el fibrinógeno y el factor V; si consideramos que el suero problema contiene los factores V y VII, entonces la única variable a estudiar es la protrombina presente en ese suero.

El fibrinógeno y el factor V pueden agregarse al suero problema por medio de un plasma adsorto con sulfato de bario, que sustrae del plasma los factores VII, IX, X y Protrombina.

Para tener la seguridad de que el suero del paciente (suero problema), contiene los factores VII y X, se determina el tiempo de protrombina en el plasma y debe resultar normal, lo cual elimina la posibilidad de una deficiencia del factor V como causa de un mal consumo de protrombina. Por lo tanto, esta prueba estudia solamente deficiencias de los factores XII, XI, IX, VIII y Factor 3 Plaquetario.

Si la cantidad de protrombina presente en el suero es

baja (que es lo normal), la coagulación del suero se efectuará en más de 30 segundos; y si es alta (anormal), el tiempo de coagulación será menor a los 20 segundos.

### 1.3.2 TIEMPO DE PROTROMBINA

El Tiempo de Protrombina (TP), es una prueba que evalúa el mecanismo de la coagulación iniciada por la vía intrínseca. Esta prueba se ve afectada por la concentración de los factores V, VII, X, Protrombina y Fibrinógeno.

El Tiempo de Protrombina es el tiempo necesario para que el plasma coagule después de la adición de calcio y factor hístico (extracto de cerebro o cerebro-pulmón). Así el complejo formado por el factor VII del plasma y el factor hístico, en presencia de calcio, activa de forma directa el factor X. Por lo que, como anteriormente se señaló, el Tiempo de Protrombina determina la integridad del sistema extrínseco del mecanismo de la coagulación plasmática.

Los valores de referencia para esta determinación varían de acuerdo al origen de la tromboplastina y el sistema sensor utilizado. En general, los valores de referencia correspondientes al Tiempo de Protrombina varían de 12 a 15 segundos.

### 1.3.3 RECUENTO PLAQUETARIO

El recuento plaquetario es una prueba útil para evaluar a la coagulación en general, debido a que la mayor parte de los trastornos en la coagulación son por trombocitopenia, más que por otras causas.

Además, es importante su determinación debido a que -

las plaquetas actúan como la primera línea de taponamiento, después de la vasoconstricción y al existir en poca cantidad no interactúan debidamente y el efecto de los fosfolípidos - (Factor 3 Plaquetario) es escaso o nulo, produciéndose un tiempo de sangrado prolongado.

Los valores de referencia son de 150,000 a 350,000 -- plaquetas por  $\text{mm}^3$  de sangre. (11).

CAPITULO . 2

## C A P I T U L O . 2

### M A T E R I A L Y M E T O D O

#### 2.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

##### a) MATERIAL

- Aguja para sistema Vacutainer 21x32 mm
- Capuchón para sistema Vacutainer
- Tubo de vidrio siliconizado Vacutainer
- Tubo de vidrio con EDTA Vacutainer
- Tubo de vidrio sin anticoagulante Vacutainer
- Tubo de plástico 13x75 mm
- Cubetas de plástico para fibrómetro
- Puntas de plástico para pipeta automática

##### b) EQUIPO

- Pipetas automáticas de 100, 200 y 500  $\mu$
- Centrífuga con graduación de revoluciones
- Baño María
- Sistema de calentamiento por calor seco (Thermo block).
- Cronómetro
- Fibrómetro electrónico BBL Mod. 5
- Contador automático Coulter Counter Mod. S-880

##### c) REACTIVOS

- Adrenalina 1:1000 (PISA)
- Citrato de Sodio al 3.8%
- Cloruro de Calcio 0.020 M
- Oxalato de Sodio al 3.8%

- Sulfato de Bario (BAKER)
- Suspensión de Kaolín al 1.5%
- Equipo de diagnóstico para la determinación de Tiempo de Protrombina: Tromboplastina (ORTHO).

## 2.2. PROCEDENCIA Y SELECCION DE MUESTRAS

El presente estudio se llevó a cabo en 42 personas voluntarias, tomadas al azar y de edad variable, de ambos sexos, aparentemente sanas y sin antecedentes de trastornos en la coagulación, en base al examen físico e interrogatorio clínico hecho en cada paciente.

A cada persona se le determinó el Consumo de Protrombina, Tiempo de Protrombina, Recuento Plaquetario y la Disponibilidad del Factor 3 Plaquetario. Realizándose sólo tres estudios completos por día en el Laboratorio Clínico del Hospital Dr. Angel Leño.

## 2.3 TOMA DE MUESTRA

Después de haber practicado una asepsia sobre el área de punción en el antebrazo, con alcohol etílico de 96°, se extranjeron mediante el sistema Vacutainer, cuatro tubos de vidrio con diferentes anticoagulantes, requeridos para las pruebas específicas, en la forma siguiente:

TUBO*	ANTICOAGULANTE	ml SANGRE	P R U E B A
1	---	3	CONSUMO DE PROTROMBINA
2	EDTA (2.5%)	3	RECUENTO PLAQUETARIO
3 (Siliconizado)	CITRATO DE SODIO (3.8%)	4,5	TIEMPO DE PROTROMBINA Y F <sub>3</sub> P
4	OXALATO DE SODIO (3.8%)	3	PLASMA ADSORTO

\* El número del tubo indica el orden de la extracción durante la toma de muestra.

Al emplear en la extracción de sangre el sistema Vacu-tainer, se implementa la técnica de la doble jeringa, que es la indicada para las pruebas de coagulación, ya que elimina las sustancias liberadas durante el trauma al epitelio vascular, como el colágeno; así de esta manera eliminamos la posibilidad de una agregación plaquetaria en el momento de la punción.

NOTA: Se debe tener un cuidado especial en tubo 3 de que no haya lisis de eritrocitos porque liberan fosfolípidos, lo que nos daría resultados falsos positivos en la de term.  $F_3P$ .

#### 2.4 PROCESAMIENTO Y SEPARACION DE LAS MUESTRAS

##### Tubo # 1

- a) Colocarlo en Baño María a 37°C por 1 hora.
- b) Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos.
- c) Separar el suero y colocarlo en tubo de vidrio.

##### Tubo # 2

- a) Deberá ser procesado después de la extracción, debido a que el EDTA afecta a las plaquetas aumentando de tamaño, lo que podría afectar la cuenta de plaquetas en el contador automático.

##### Tubo # 3

- a) Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos.
- b) Separar aproximadamente 0.8 ml del plasma sobrenadante con una pipeta automática de 500  $\lambda$  y colocarlos en un tubo de plástico de 13x75 mm; identificar este tubo con PRP (Plasma Rico en Plaquetas).

- c) Centrifugar sangre restante a 4500 rpm por 20 minutos.
- d) Separar el plasma sobrenadante con una pipeta automática de 500  $\lambda$  y colocarlo en un tubo de plástico de 13x75 mm; identificar este tubo con PPP - (Plasma Pobre en Plaquetas).

NOTA: Se recomienda el uso de los tubos de plástico para evitar la adhesión de las plaquetas a la superficie del tubo, como es el caso del vidrio.

#### Tubo # 4

- a) Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos.
- b) Separar 1 ml de plasma sobrenadante y añadir 100 mg de Sulfato de Bario; mezclar y colocarlo en un Baño María a 37°C por 15 minutos, mezclando cada 5 minutos, para una mejor adsorción de los factores.
- c) Centrifugar a 4500 rpm por 15 minutos.
- d) Separar 0.5 ml del sobrenadante con una pipeta automática de 500  $\lambda$  y colocarlo en un tubo de plástico de 13x75 mm.

## 2.5 DETERMINACION DEL CONSUMO DE PROTROMBINA

### PROCEDIMIENTO:

- a) Separar 0.9 ml del suero con una pipeta automática de 500  $\lambda$  y otra de 200  $\lambda$  y colocarlos en un tubo de vidrio de 13x100 mm.
- b) Agregar 0.1 ml de Citrato de Sodio con una pipeta automática de 100  $\lambda$ . Incubar la mezcla en un Baño María a 37°C por 15 minutos.

- c) Después de transcurridos los 15 min. de incubación, practicar el Tiempo de Protrombina en el suero de la forma siguiente:
- Colocar en diferentes cubetas de plástico (del fibrómetro) el plasma adsorto, la tromboplastina y el cloruro de calcio, e incubarse a 37°C por 5 min. en el termoblock.
  - Colocar el suero, el plasma adsorto y la tromboplastina, en este orden, en una cubeta del fibrómetro en cantidades de 0.1 ml de cada uno, con una pipeta automática de 100  $\lambda$  y tomar el tiempo de coagulación de esta mezcla en el fibrómetro.
  - Realizar la prueba por duplicado y el resultado final será el promedio de las dos determinaciones.

## 2.6 DETERMINACION DEL TIEMPO DE PROTROMBINA

### PROCEDIMIENTO:

- a) Tomar 0.1 ml del PPP (Plasma Pobre en Plaquetas), con una pipeta automática de 100  $\lambda$  y colocarlos en una cubeta del fibrómetro e incubar a 37°C en un termoblock por 1 minuto.
- b) Al término del minuto, agregar 0.2 ml de tromboplastina, previamente incubada a 37°C, con una pipeta automática de 200  $\lambda$ ; e inmediatamente tomar el tiempo de coagulación del plasma en el fibrómetro.
- c) Realizar cada prueba por duplicado y el resultado final será el promedio de las dos determinaciones.

## 2.7 RECUENTO PLAQUETARIO

El recuento de plaquetas se llevó a cabo en el contador automático Coulter Counter Mod. S-880.

## 2.8 DETERMINACION DEL FACTOR 3 PLAQUETARIO

Para la determinación del  $F_3P$ , usamos una técnica que hace la medición directa de la actividad del  $F_3P$ , en la que se suministra un estímulo estándar con caolín y adrenalina, a un plasma que contiene una concentración conocida de plaquetas, al cual se le determina el tiempo de recalcificación, tal tiempo dependerá de la disponibilidad del  $F_3P$ .

### PROCEDIMIENTO:

- a) Una vez separados el PRP y el PPP, practicar un recuento de plaquetas a cada uno, por medio del Coulter Counter Mod. S-880.
- b) Una vez conocida la concentración de plaquetas en ambos plasmas, diluir el PRP con el PPP, hasta obtener una cuenta aproximadamente de 50,000 plaquetas/mm<sup>3</sup> t se desecha el PRP y el PPP.
- c) Tomar 0.1 ml del Plasma con 50,000 plaquetas/mm<sup>3</sup>, con una pipeta automática de 100  $\mu$ l y se colocan en una cubeta de plástico del fibrómetro, en un termoblock a 37°C por 5 minutos.
- d) Después de 5 min. de incubación, adicionar 0.1 ml de una suspensión de caolín y 10  $\mu$ l de Adrenalina, previamente incubadas, con pipetas automáticas de 100  $\mu$ l y 10  $\mu$ l respectivamente. Mezclar perfectamente y dejar incubar a 37°C, exactamente 10 minutos, en el termoblock. El tiempo deberá ser tomado con un cronómetro.

- e) La prueba se realiza por duplicado y el resultado final será el promedio de las dos determinaciones.

NOTA: Se recomienda que el tiempo sea lo más exacto posible, para evitar variaciones considerables en las determinaciones.

## 2.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la determinación de los valores de referencia y de la precisión de la medida de la actividad del  $F_3P$ , los resultados se evaluaron estadísticamente para demostrar que la medición de la actividad del  $F_3P$  por este método es preciso y confiable.

### 2.9.1 VALORES DE REFERENCIA

Antes de evaluar los resultados cabe describir los parámetros empleados para este estudio:

MEDIA ( $\bar{x}$ ) . Es el promedio aritmético de un grupo de observaciones o mediciones experimentales.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Donde:  $x_i$  = Valor de la  $i$  observación  
 $n$  = Número de observaciones

DESVIACION ESTANDAR (s) Es un índice muy útil de variación

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Donde:  $x_i$  = Valor de la  $i$  observación  
 $\bar{x}$  = Media de la población  
 $n$  = Número de observaciones

### 2.9.2 PRECISION

La precisión del método se exterioriza en la reproducibilidad de sus resultados. Para tal determinación, se repite 10 veces la medición, en la misma muestra y bajo las mismas condiciones de trabajo.

CAPITULO 3

PRUEBA	CONSUMO DE	TIEMPO DE	PLAQUETAS
	PROTROMBINA	PROTROMBINA*	CEL/mm <sup>3</sup> (X1000)
	(SEGUNDOS)	(SEGUNDOS)	
1	140	13.0	270
2	36	10.5	400
3	40	10.7	274
4	35	12.7	286
5	38	11.7	332
6	30	13.4	290
7	115	12.5	350
8	31	10.5	220
9	41	12.0	225
10	28	12.5	260
11	102	12.4	305
12	90	11.0	251
13	72	12.5	250
14	40	13.5	310
15	50	12.0	480
16	105	13.0	411
17	70	13.5	248
18	125	11.0	320
19	77	11.5	272
20	90	12.1	298
21	87	10.5	339
22	140	11.3	255
23	60	11.0	305
24	75	12.5	220
25	65	11.5	393
26	139	11.5	289
27	90	12.0	390
28	70	11.0	342
29	37	11.4	251
30	69	12.1	300
31	76	10.9	250
32	47	12.4	325
33	55	11.0	307
34	41	10.5	298
35	49	12.0	386
36	70	11.0	291

\* TP Control = 12 segundos.

CUADRO 1: Valores obtenidos de Consumo de Protrombina, Tiempo de Protrombina y Recuento de Plaquetas, para las 36 muestras que resultaron normales en las tres determinaciones.

PRUEBA	CONSUMO DE PROTROMBINA (SEGUNDOS)	TIEMPO DE PROTROMBINA (SEGUNDOS)	PLAQUETAS CEL/mm <sup>3</sup> (X1000)
37	---	----	142
38	16	11.0	197
39	15	10.5	231
40	18	23.4	189
41	47	12.0	245
42	38	10.9	210

CUADRO 1a: Muestras descartadas por anomalías en alguna de las tres determinaciones.

CUADRO 2: Valores obtenidos del Factor 3 Plaquetario.

PRUEBA	F <sub>3</sub> P (SEGUNDOS)	PRUEBA	F <sub>3</sub> P (SEGUNDOS)
1	35	19	42
2	36	20	42
3	37	21	43
4	37	22	43
5	38	23	43
6	38	24	44
7	39	25	44
8	39	26	44
9	39	27	45
10	40	28	45
11	40	29	46
12	41	30	46
13	41	31	47
14	41	32	48
15	41	33	49
16	42	34	50
17	42	35	50
18	42	36	53

$$\bar{x} = 42.55$$

$$D.S. = 4.20$$

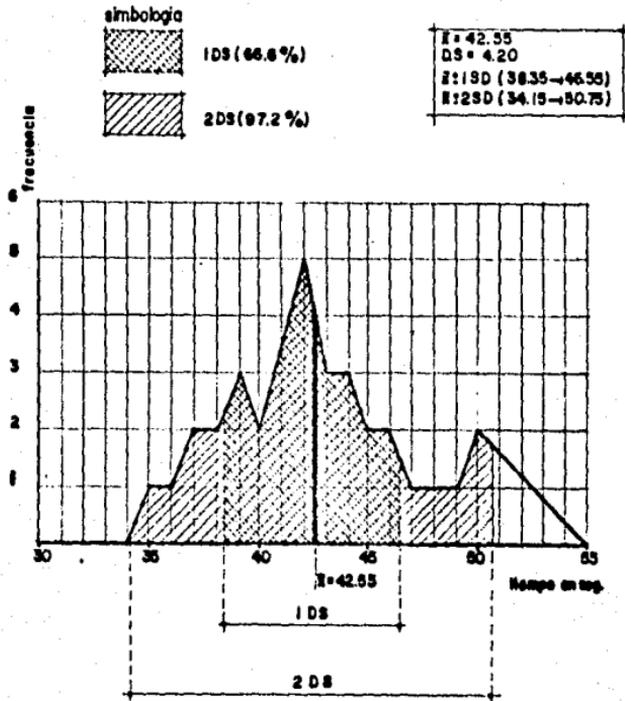
## CUADRO 3: Precisión.

Valores obtenidos para una sola muestra (segundos) :

1)	44	6)	43
2)	43	7)	42
3)	43	8)	42
4)	43	9)	41
5)	43	10)	41

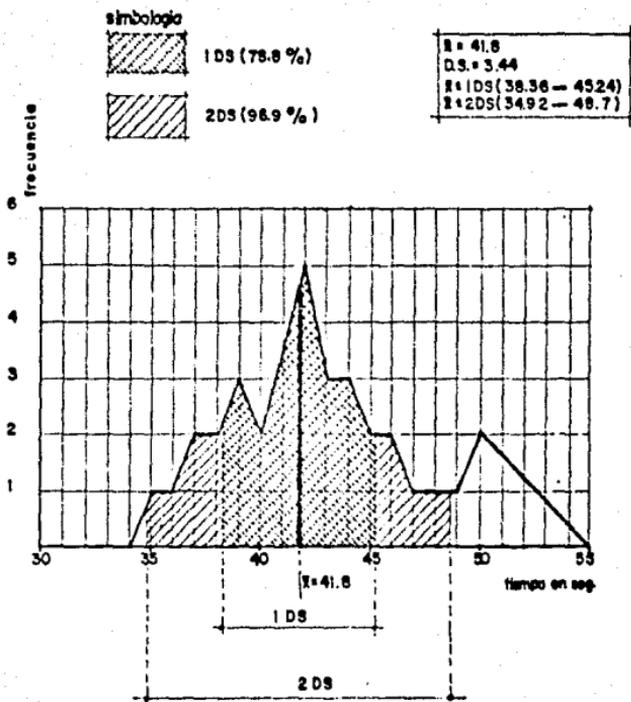
$$\bar{x} = 42.4$$

$$D.S. = 0.84$$



GRAFICA "A": CURVA DE DISTRIBUCION NORMAL EN LA CUAL SE GRAFICARON LOS 36 VALORES OBTENIDOS.

ESTA TESTS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



GRAFICA "B": CURVA DE DISTRIBUCION NORMAL EN LA CUAL SE GRAFICAN SOLO LOS 33 VALORES TOMADOS EN CUENTA PARA EL ESTUDIO.

CAPITULO 4

## ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

## ANALISIS DE RESULTADOS:

En el cuadro #1 se presentan los resultados obtenidos de Consumo de Protrombina, Tiempo de Protrombina y Recuento de Plaquetas (Pruebas de selección), en 36 Individuos que resultaron normales en estas pruebas y que se sometieron a la determinación de la actividad del  $F_3P$ .

El cuadro #1a presenta las muestras del estudio que no se tomaron en cuenta para el análisis estadístico debido a que resultaron con un Consumo de Protrombina menor a los 30 seg. o un Tiempo de Protrombina mayor a los 15 seg. y/o un Recuento Plaquetario inferior a las 200,000/mm<sup>3</sup>. Descartándose las muestras 37, 38 39 y 40 por esta causa.

Dos de las muestras, la #41 y #42, se descartaron debido a que, a pesar de haber pasado las "pruebas de selección", resultaron con un tiempo de recalcificación superior a los 55 seg. en la determinación de la actividad del  $F_3P$ .

El cuadro # 2 muestra los resultados de los tiempos de recalcificación para la medición de la actividad del  $F_3P$ . Sólo se realizaron 36 determinaciones, en base a que estadísticamente tiene validez el estudio y para la curva de distribución normal una población mayor a las 30 muestras resulta confiable.

La medida obtenida fue de 42.55 con una desviación estándar de 4.20.

Los resultados para el  $F_3P$  junto con su  $\bar{X}$  y su desvia

ción estándar están representados en la gráfica "A". Se observa que la media no coincide exactamente con el mayor número de frecuencias y además la presencia de un pico al final de la gráfica, altera la distribución normal de los valores.

Se descartaron los últimos tres valores mayores (muestras #34, 35 y 36) para evitar el pico, y se observa claramente en la gráfica "B" que la media se acerca mucho más al valor de mayor frecuencia y que además la desviación estándar disminuyó en una unidad, resultando una media de 41.8 y una desviación estándar de 3.44, siendo los valores de referencia de 35 a 49 segundos.

El cuadro #3 presenta las 10 determinaciones hechas en la misma muestra, obteniendo una desviación estándar de 0.84.

## CONCLUSIONES

En base al análisis anterior, se concluye que:

- A) Los valores de referencia para la determinación de la actividad del  $F_3P$ , por la técnica de caolín y adrenalina son de 35 a 49 segundos.
- B) El método es preciso.
- C) El método es sencillo, no requiere de mucho tiempo y disponiendo del contador automático de plaquetas y -- del fibrómetro electrónico, la confiabilidad del método y de los valores de referencia, apoyan que deberá ser una prueba de rutina obligatoria, junto con el -- Tiempo de Protrombina, Consumo de Protrombina y Re -- cuento Plaquetario, para obtener un perfil de coagulación, en el que resalte cualquier anomalía en las diferentes fases de la coagulación.

En caso de no contar con el equipo automático y electrónico utilizados para este estudio, de acuerdo con los resultados preliminares (no reportados), puede apoyarse que -- igualmente confiable será la determinación del  $F_3P$  por técnicas manuales, y se recomienda que cada laboratorio determine sus propios valores de referencia.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto se propone -- que las investigaciones subsecuentes a este estudio, estén -- encaminadas a evaluar la utilidad y especificidad de este -- grupo de pruebas en los diferentes síndromes patológicos de coagulación.

## B I B L I O G R A F I A

1. CLERCK DE F.; GOOSSENS J.; BEERENS M.: Lack of Platelet Factor 3 Activation after incubation of Platelet-Rich -- Plasma with Kaolin in Rat. *Experientia*, 1976; 32: 1602.
2. HARDISTY R.M.; HUTTON R.A.: The Caolin Clotting Time of Platelet Factor-3 Availability. *Brit. J. Haemat.*, 1965; 2:258.
3. HARDISTY, R.M.; HUTTON, R.A.: Platelet Agregation and - the Availability of Platelet Factor 3. *Brit. J. Haemat.*, 1966; 12:764.
4. RABINER, S.F.; HRODEK, K.O.: Platelet Factor 3 in Normal Subjects and Patients with Renal Failure. *J. Clin. Invest.*, 1968; 47:901.
5. WEISS HARVEY J.: Platelet Aggregation, Adhesion and --- Adenosine Diphosphate Release in Thrombopathia. *American Journal of Medicine*, 1967; 43:570.
6. BAUGH, F. ROBERT; HOUIGIE CECIL: Trastornos Congénitos - de la Coagulación, España, Salvat. 1980. Vol. 7 N<sup>o</sup> 1.
7. HARKER, L.A.; Zimmerman T.S.: Trastornos Plaquetarios, España, Salvat. 1985. Vol. 11 N<sup>o</sup> 1.
8. HARDISTY R.M.; WEATHERALL D.J.: Blood and its Disorders, Oxford London, Blackwell Scientific Publications. 1974, 1a. Ed.
9. LEAVELL BYRD S.; THORUP OSCAR A.: Hematología Clínica, - México, Interamericana. 1984, 4a. Edición.

10. WINTROBE M. MAXWELL: *Clinical Hematology*, EUA, Lea and Febiger, 1974, 7a. Edición.
11. RAPAPORT SAHUEL I.: *Introducción a la Hematología*, España, Salvat, 1977. 1a. Edición.
12. SANS J.; SABAFREN: *Hematología Clínica*, España, Doyma, 1982. 3a. Edición.
13. WILLIAMS J. WILLIAM; BELTEER ERNEST; ERSLEV J ALLAN; -- LIGHTMAN A. MARISCAL: *Hematology*, EUA, McGraw-Hill --- Book Co., 1983. 3a. Edición.
14. WAYNE W. DANIEL; *Bioestadística*, México, LIMUSA, 1984. 5a. Edición.
15. WILLIAM J. WILLIAM; BEUTLER ERNEST; ERSLEV J. ALLAN; -- WAYNE RUNDLES R.: *Hematología*, España, Salvat, 1983. - 2a. Edición.
16. MALPASS T.W.; HARKER L.A.: *Acquired disorders of platelet function*. *Semin. Hematol.* 1980; 17:245.
17. MARFIL RIVERA JAVIER; MARES RAMIREZ MARTHA A.: *Manual de Banco de Sangre y Coagulación*, México, Universidad - Autónoma de Nuevo León, 1987. 1a. Edición.
18. SIRRIDGE M.S.: *Effects of antiplatelet drugs on platelet function test*, *Mo. Med.* 1979, 96:212.
19. RICHTERICH R.; COLOMBO J.P.: *Química Clínica*, España, SALVAT, 1983.