

2 E No. 29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Química**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**OBTENCION DE TROMBOPLASTINA Y  
CEFALINA A PARTIR DE CEREBRO DE  
CONEJO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ELEONORA ESCALANTE RAMIREZ**

**MEXICO, D. F.**

**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# I N D I C E

PAG.

I. Introducci3n . . . . .	1
II. Justificaci3n y objetivos . . . . .	3
III. Generalidades . . . . .	4
IV. Material y m3todos . . . . .	35
V. Tromboplastina	
Resultados y discusi3n . . . . .	45
Conclusiones . . . . .	65
VI. Cefalina	
Resultados y discusi3n . . . . .	66
Conclusiones . . . . .	79
VII. Bibliograffa . . . . .	80

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

Las causas de los desórdenes de la coagulación sanguínea raramente pueden ser diagnosticados sin ayuda del laboratorio. Las evaluaciones por el laboratorio tienen por objetivos: 1) establecer la presencia o ausencia de un trastorno hemorrágico; y 2) identificar específicamente cualquier anomalía encontrada.

Las pruebas usadas para el primer objetivo son el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial (TTP), que son fieles indicadores de las anomalías de los factores que intervienen en la coagulación, y son dos técnicas básicas aplicadas en el estudio de pacientes con diatésis hemorrágica y hepatopatías. Constituyen, además, un auxiliar de gran valor para el control del tratamiento con anticoagulantes, así como pruebas preoperatorias obligatorias para intervenciones quirúrgicas de cualquier índole.

La anomalía de cualquiera de ellas permite detectar en qué vía de la coagulación se encuentra la deficiencia. Por ejemplo, el tiempo de protrombina anormal con un tiempo de tromboplastina parcial también anormal sugieren un defecto en los factores II, V ó X, como resultado de una enfermedad del hígado, terapia con cumarina o deficiencia de vitamina K. También se puede sospechar disfibrinogenemia o hipofibrinogenemia. Un tiempo de tromboplastina parcial alargado con un tiempo de protrombina normal puede ser debido a una deficiencia de los factores VIII, IX, XI ó XII. Para la identificación específica de cualquier factor anormal son necesarias otras pruebas de laboratorio más específicas.

Dada la utilidad e importancia del tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial, es necesario contar en el laboratorio con tromboplastina y cefalina, que son los reactivos necesarios para cada una de estas pruebas respectivamente, que sean capaces de revelar cualquier trastorno de los factores de la coagulación.

## JUSTIFICACION

1. Evitar la dependencia de productos importados.
2. Abaratar costos.
3. Promover su preparación en el Sector Salud.

## OBJETIVOS

1. Obtener reactivos indispensables en la realización de pruebas de coagulación de uso rutinario.
2. Conocer la precisión de los productos preparados.

## GENERALIDADES

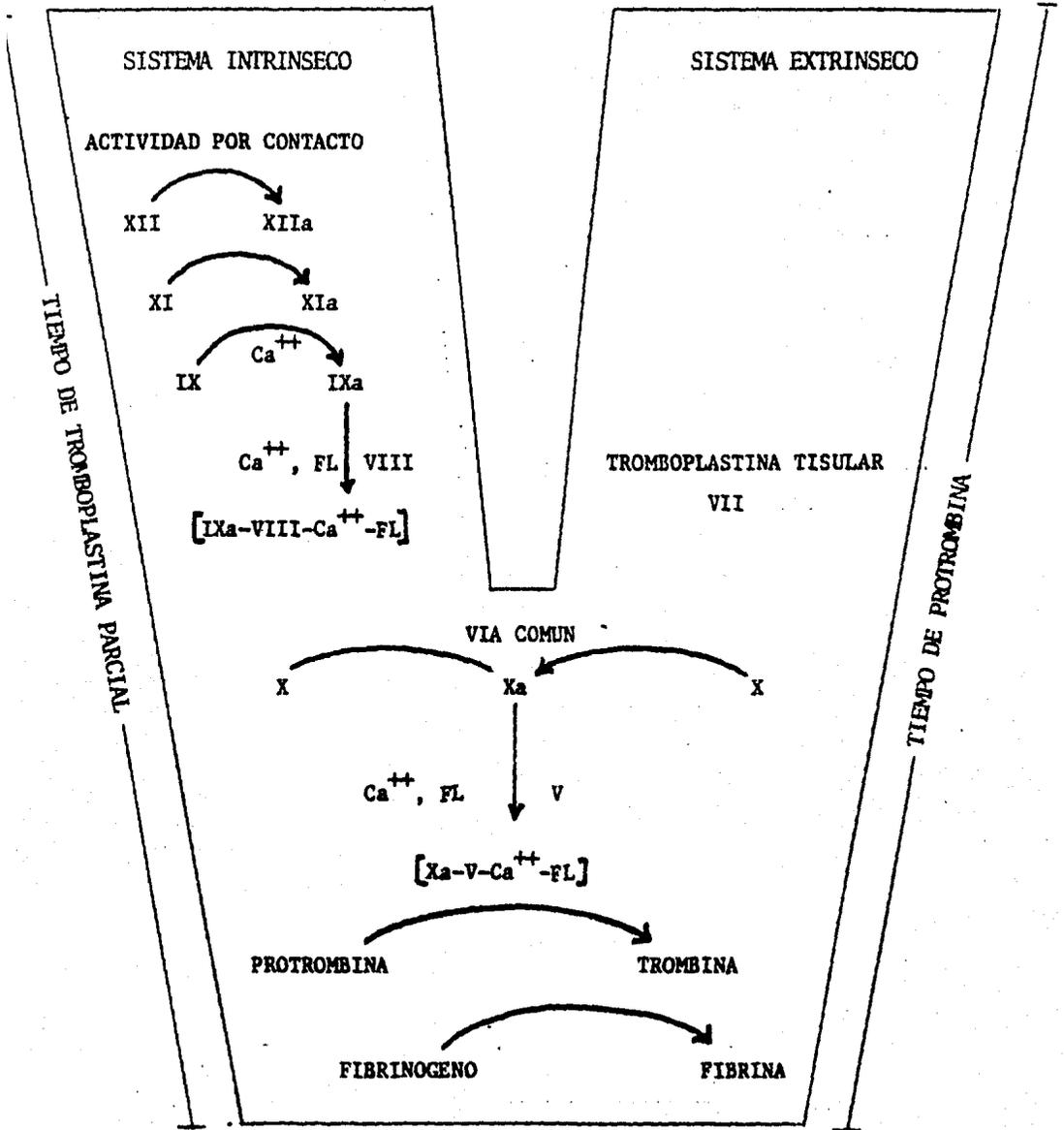
## TEORIA DE LA COAGULACION

La teoría clásica de la coagulación descrita por Morawitz en 1905 (1), postulaba la acción de cuatro factores: protrombina, iones calcio, fibrinógeno y una sustancia derivada de tejidos lesionados. Esta sustancia se designó con diversos nombres como el de tromboquinasa, fermento fibrina, trombasas, indicando una acción enzimática (2), o el de tromboplastina que es un vocablo indeterminado (3). De acuerdo a esta teoría, tras una lesión histica, la tromboplastina liberada por los tejidos y en presencia de iones calcio actúa sobre la protrombina transformándola en trombina, enzima proteolítica, que a su vez actúa sobre el fibrinógeno para formar una malla de fibrina polimerizada o coágulo.

El concepto moderno de la coagulación se basa en la hipótesis de la "cascada" o "salto de agua" (4 y 5), y se puede definir como un proceso de reacciones enzimáticas en las que intervienen varias proteínas plasmáticas, lípidos e iones, que transforma la sangre circulante en un gel insoluble por la conversión de fibrinógeno a fibrina (6).

Las reacciones que llevan a la formación de fibrina pueden ser divididas con fines didácticos en dos partes (fig. 1): las reacciones de la vía extrínseca y las de la vía intrínseca. La última serie de reacciones en ambas vías es igual, por lo que se conoce como vía común.

En la vía extrínseca de la coagulación intervienen el factor VII y el factor tisular. En esta vía la coagulación es iniciada cuando un tejido dañado libera factor tisular que forma un complejo con factor VII y con iones calcio y este complejo activa al factor X.



FL = fosfolípidos

FIGURA 1. EL SISTEMA DE COAGULACION

En la coagulación por la vía intrínseca intervienen los factores: XII, XI, VIII y IX. Aparentemente el proceso de la coagulación en vivo, por esta vía, es iniciada por el contacto del factor XII con una superficie "extraña" como el tejido colágeno (activación por contacto), lo que lo transforma en factor XII activado (XIIa). El factor XIIa activa al factor XI, convirtiéndolo en factor XIa. El factor XIa en presencia de iones calcio activa al factor IX. Los factores IXa y VIII así como iones calcio y fosfolípidos forman un complejo que activa al factor X. In vivo los fosfolípidos son suministrados por las plaquetas (factor 3 plaquetario) (7, 8).

La vía común es una serie de reacciones que siguen a la activación del factor X y conduce a la formación del coágulo de fibrina. El factor Xa forma un complejo junto con el factor V, fosfolípidos e iones calcio que actúa sobre la protrombina transformándola en trombina, que es una enzima proteolítica. El fibrinógeno, por la acción de la trombina, se convierte en monómeros de fibrina que poseen carga negativa lo que permite que estas moléculas se polimericen mediante enlaces de hidrógeno para formar cordones de fibrina.

Tanto el sistema intrínseco como el extrínseco tienen un importante papel fisiológico en la hemostasis de los mamíferos y aparentemente funcionan simultáneamente in vivo (7).

Para evaluar la eficiencia del sistema de coagulación in vitro la vía intrínseca y la vía extrínseca pueden ser separadas haciendo variar las condiciones experimentales.

La prueba del tiempo de tromboplastina parcial (TTP) mide el tiempo que tarda en coagular el plasma recalcificado, después de incubarlo con cefalina, que se utiliza como sustituto del factor 3 plaquetario, y con caolin que actúa como activador del factor XII. Esta prueba detecta deficiencias de los factores de la vía intrínseca (XII, XI, IX y VIII) y de los de la vía común (X, V, protrombina y fibrinógeno).

En la prueba del tiempo de protrombina (TP), se le agrega al plasma una tromboplastina tisular y calcio, observándose luego el tiempo que tarda en formarse el coágulo de fibrina. Esta prueba revela los defectos plasmáticos en la vía extrínseca (factor VII) y en la vía común (factores X, V, protrombina y fibrinógeno).

## PAPEL DE LOS FOSFOLIPIDOS EN LA COAGULACION

La interacción entre los factores de la coagulación y los fosfolípidos juegan un papel crucial en el proceso de la coagulación. In vitro las vesículas de fosfolípidos o liposomas participan en la coagulación proveyendo una interfase lípido/agua para que interactúen los factores de la coagulación, y de este modo aceleran algunas de las reacciones que conducen a la formación del coágulo. In vivo, los lípidos son aportados por las plaquetas (coagulación por vía intrínseca) y el factor tisular, liberado de los tejidos dañados (coagulación extrínseca) (9).

Muchas de las antiguas teorías de la coagulación se enfocaron a la participación de los lípidos (3). Banghan y Dawson (10) describieron bicapas fosfolipídicas y agregados laminares de fosfolípidos, y propusieron que los fosfolípidos principalmente proveen una superficie sobre la cual los factores de coagulación son adsorbidos y pueden interactuar (fig. 2).

Estudios anteriores demostraron que la insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos eran importantes para la aceleración de los procesos de la coagulación, y la actividad biológica estaba relacionada con su estado coloidal (11).

La relación de la insaturación de los ácidos grasos y la potencia de los fosfolípidos en la coagulación es debida principalmente a la facilidad con la que grandes agregados fosfolipídicos, los cuales se forman inicialmente cuando los lípidos son mezclados en soluciones acuosas, se dispersan en pequeñas partículas con el correspondiente aumento de superficie por unidad de masa (12).

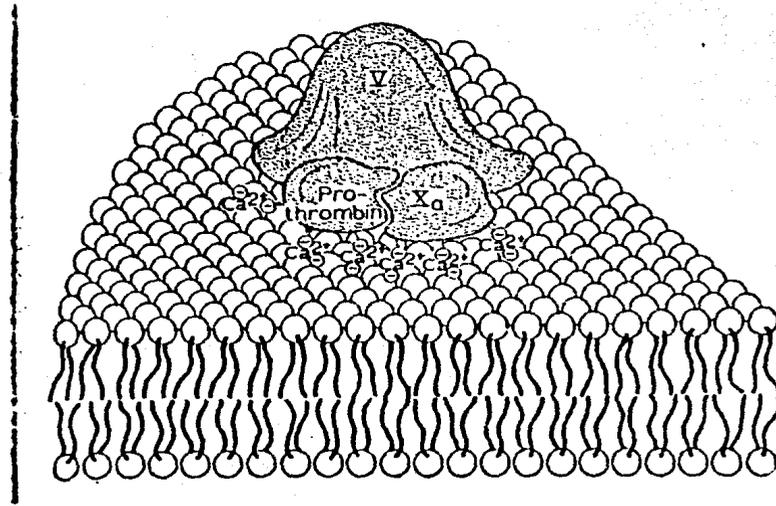


FIG. 2: Representación esquemática de la interacción de factores de coagulación con una bicapa fosfolipídica.

Muchos investigadores han demostrado que las más potentes preparaciones de fosfolípidos son mezclas de fosfatidil-etanolamina y fosfatidil-serina (13, 14, 15, 16).

Bangham (17) y Papahadjopoulos et. al. (14) mostraron que una carga negativa neta sobre la bicapa fosfolipídica era más importante que la estructura química de la molécula fosfolipídica. Estas conclusiones fueron confirmadas en otros laboratorios con una gran variedad de lípidos (13, 16, 18).

En conclusión, las propiedades específicas de la superficie lipídica requerida para la unión de los factores de coagulación en la correcta yuxtaposición parecen ser: I) una carga negativa óptima en la superficie de la interfase lípido/agua, y una homogénea distribución de dicha carga; II) la presencia de un grupo nucleofílico para ayudar a la estabilización de los puentes de hidrógeno entre la superficie del lípido y los residuos-carboxiglutámicos de la protrombina y el factor X-; III) un cierto grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa fosfolipídica para formar una vesícula facilitando la interacción espontánea con el factor V.

## COMPOSICION DEL FACTOR TISULAR

Ha sido demostrado a menudo que la sangre obtenida sin que tenga contacto con la superficie de tejido dañado y manejada de manera de prevenir la destrucción de los glóbulos rojos de la sangre, retrasa considerablemente su coagulación. Sin embargo, si la sangre fluye en tejido dañado o los glóbulos rojos se rompen, la sangre coagula rápidamente. La adición de extractos salinos de tejidos, especialmente de cerebro y pulmón, aceleran la coagulación todavía más. Es posible de este modo acortar el tiempo de coagulación a menos de un minuto. Por lo tanto, es evidente que en tejidos o células en general, hay una sustancia que posee la propiedad de acelerar la coagulación de la sangre.

Carpenter en sus "Principles of Human Physiology", 1869, mencionada que en 1834 se sabía qué tejidos cerebrales o una emulsión de ellos, frecuentemente causaban coagulación intravascular de la sangre.

Wooldridge en 1883 (19) comenzó a estudiar la naturaleza química de dicha sustancia activa. Trabajando con extractos acuosos de testículos, timo, glándulas linfoides y células rojas de la sangre, concluyó que esta sustancia activa era un compuesto proteína-fosfolípido, y que la parte fosfolipídica era esencial para la actividad coagulante de esta sustancia, aun que por sí sola no producía tal actividad. Sin embargo, la fracción fosfolipídica sola sí aceleraba la coagulación de plasma peptonado in vitro. Wooldridge llamó lecitina a este fosfolípido.

Wright en 1892 concluyó que la sustancia era una nuclealbúmina, aunque el ácido nucléico solo no poseía actividad coagulante.

En 1898 Brieger y Uhlenhuth estudiaron la toxicidad de extractos de tejidos, descubierta por Wooldridge, pasando por alto la actividad coagulante de dicho material. Llegaron a la conclusión que el material era una toxoalbúmina.

Dold en 1911 estudió este mismo material tóxico notando que su toxicidad decrecía por tratamiento con suero, sin notar su actividad coagulante. Dold y Ogata en 1912 notaron el efecto coagulante de la substancia. Demostraron que la hirudina prevenía la acción tóxica de los extractos de tejidos al igual que una inyección previa de peptona. Notaron también que la extracción con éter y alcohol destruía su actividad por lo que dedujeron que era de naturaleza fermentativa (20).

Howell en 1912 (3) enfatizó que mientras los extractos alcohólicos de los tejidos resistían el calentamiento, los extractos acuosos que eran poderosamente tromboplásticos, perdían su actividad por calentamiento. También sugirió que el componente fosfolipídico del extracto tisular no era la lecitina, sino la cefalina, y que el compuesto activo era un complejo fijado a una proteína.

En 1934 Fisher y Hecht (21) mostraron que, incrementando la pureza de la cefalina, progresivamente decrecía su actividad coagulante.

En 1942 Folch (22) fraccionó la cefalina en tres partes: fosfatidil-serina, fosfatidil-etanolamina y una mezcla de fosfátidos, uno o más de los cuales contiene inositol como constituyente.

La primera preparación purificada de factor tisular se obtuvo por homoge-

neización, precipitación y centrifugación diferencial. Esta preparación sólo contenía lípidos y proteínas (23). Por extracción prolongada con solventes orgánicos se obtuvo una proteína libre de lípidos que no poseía actividad coagulante.

Se reportó posteriormente la purificación del factor tisular de pulmón, cerebro y placenta por homogeneización y centrifugación diferencial (24, 25).

Preparaciones de factor tisular de cerebro, pulmón y riñón purificadas 1000 veces, al ser sometidas a filtración en gel o a electroforesis en gel produjeron dos diferentes proteínas. Una contiene mayor cantidad de lípidos que la otra, y ambas muestran actividad coagulante (26, 27).

Bjorklid et. al. (28) prepararon un antisuero contra el componente proteico purificado del factor tisular de cerebro humano. El antisuero neutralizó al factor tisular obtenido de cerebro, glándula tiroides y pulmón: concluyeron que las proteínas de las diferentes preparaciones tenían una reacción inmunológica cruzada y por lo tanto eran similares o idénticas. De este modo, las evidencias sugieren que la heterogeneidad de las proteínas están en función de los lípidos residuales, y este fenómeno no representa diferencias en el componente proteico del factor tisular.

En preparaciones de factor tisular de pulmón se detectó la actividad de peptidasa. Esencialmente se demostró que estaba presente una actividad de endo y exopeptidasa, y que dicha actividad no podía ser separada de la apoproteína soluble del factor tisular de pulmón (29). Posteriormente se preparó factor tisular de cerebro y de riñón, y la actividad de cada

uno fue comparada con la del factor tisular de pulmón. Las tres preparaciones tenían actividad coagulante y de peptidasa, pero cuantitativamente fueron muy diferentes (30):

	Actividad coagulante (unidades/mg de proteína)	Actividad de peptidasa (unidades/mg de proteína)
Cerebro	8120	12.4
Pulmón	16000	120
Riñón	1470	2035

La actividad coagulante del factor tisular está en función de su contenido de lípidos. Las preparaciones crudas tienen de 38 a 45% en peso de fosfolípidos (31). La separación de los fosfolípidos del factor tisular da como resultado pérdida de actividad coagulante, así como la solubilización del componente proteico (27). Aunque el componente proteico posee residuos de actividad coagulante, la recombinación de la proteína con ciertos fosfolípidos aumenta esta actividad de 500 a 1000 veces (26). Esta recombinación ha sido obtenida por adición de la parte proteica seca con soluciones de lípidos en etanol (32) o piridina (33), seguida por evaporación del solvente y resuspensión del residuo en buffer. La proteína y los lípidos han sido mezclados también en soluciones acuosas de desoxicolato, y el detergente es removido posteriormente por diálisis (34).

La composición de fosfolípidos del factor tisular depende del tejido del cual ha sido preparado (32, 35):

Composición de fosfolípidos del factor tisular

Valores expresados en por ciento en peso de la fracción fosfolipídica total

	<u>Cerebro bovino</u>	<u>Cerebro humano</u>	<u>Pulmón bovino</u>
Fosfatidil-etanolamina	15.1	17.5	14.8
Fosfatidil-colina	30.3	33.5	41.4
Fosfatidil-serina	3.0	6.5	1.5
Fosfatidil-inositol	3.0	Trazas	1.0
Esfingomielina	36.3	8.0	38.3
Lysofosfatidil-colina	12.2	10.5	2.5
Colesterol + ac. grasos libres		17.5	

Tanto la parte hidrofóbica como la hidrofílica de los lípidos parecen ser importantes en la formación del factor tisular con actividad biológica.

Claramente se ha demostrado la importancia de la parte apolar de los fosfolípidos, por la observación de que la hidrogenación catalítica de éstos elimina su habilidad para restaurar la actividad coagulante de la tromboplastina por recombinación con la parte proteica (32). En cuanto a la especificidad del grupo polar, se ha observado que la fosfatidil-etanolamina, cuando se recombina con la proteína tisular, restaura completamente su actividad coagulante (32, 36); recombinaciones menos efectivas se obtuvieron con fosfatidil-colina. La fosfatidil-serina, fosfatidil-inositol y esfingomielina tienen poca o ninguna actividad. La combinación de 2 fosfolípidos y la proteína tisular da como resultado una tromboplastina más activa que la obtenida con un solo fosfolípido: la mezcla de fosfatidil-etanolamina y fosfatidil-serina es la más efectiva. La mezcla de fosfa-

tidil-colina y fosfatidil-serina da una actividad significativa, aunque cada uno de estos fosfolípidos por separado posee una actividad pequeña.

Por otro lado, aún cuando la fosfatidil-etanolamina produce un factor tisular activo al mezclarse con la proteína, su combinación con fosfatidil-colina produce un factor tisular con una actividad casi nula. Cuando se combina la parte proteica del factor tisular con una mezcla de tres fosfolípidos se obtiene una tromboplastina con una actividad coagulante mayor que la obtenida con la mezcla de dos fosfolípidos: el producto más activo se obtiene cuando una pequeña cantidad de fosfatidil-serina (aproximadamente 10% del total de lípidos) se adiciona a la mezcla de fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina (26, 35).

La mezcla de fosfolípidos puede causar una actividad coagulante más alta tal vez porque permite una distribución más efectiva sobre la superficie membranosa de los diferentes grupos que participan en la unión y activación de los substratos, esto es, modulan la unión y conformación de la apoproteína tisular (35).

La actividad del factor tisular no depende de la unión de los fosfolípidos con la parte proteica ya que los fosfolípidos activos e inactivos se unen igualmente a esta parte (36).

El peso molecular del factor tisular es difícil de estimar. La centrifugación por gradiente de sucrosa muestra en el factor tisular la presencia de dos proteínas de pesos moleculares de 220 mil y 330 mil (27). Por otro lado, por filtración en gel de la proteína en desoxicolato, el peso molecular se estima en 50 mil (34). El peso molecular de la proteína del factor tisular derivado de cerebro, pulmón y riñón, por electroforesis en

gel, fue de 20 mil. Se detectaron algunas protefina con pesos moleculares de 60 mil, y en el riñón un material adicional de 120 mil. Debido a la tendencia de la protefina a agregar, no es claro si estas protefina representan diferentes subunidades a la molécula completa o si simplemente hay agregados de una subunidad simple de peso molecular de 20 mil (30).

## LOCALIZACION ANATOMICA E IMPLICACION CLINICA DEL FACTOR TISULAR.

La tromboplastina es diferente a las demás protefmas que intervienen en la coagulación, porque es un componente integral de las células de los tejidos y no existe al menos en forma reconocible, libre en el plasma. Las dificultades que hay en la obtención de muestras que contengan tromboplastina para su estudio, han proporcionado información insuficiente para tener una idea clara de su papel en la función de la célula y su localización citológica.

La tromboplastina está presente en una gran variedad de tejidos, en particular cerebro, pulmón y placenta son ricas fuentes de tromboplastina (24, 25).

Zeldis et. al. (37) observaron altas concentraciones de tromboplastina en la membrana celular del endotelio vascular de varios tejidos, como en la médula y corteza del riñón, en los hepatocitos, en el miocardio, arteria coronaria y en pulmón. La tromboplastina fue particularmente abundante en placas aterosclerosas. Ellos postularon que se podría iniciar la coagulación por un daño endotelial mínimo o por la ruptura de una placa.

La tromboplastina ha sido implicada en la patogénesis de formas severas de coagulación intravascular diseminada (CID) como la que se observa en cáncer, reacciones hemolíticas postransfusionales, embolia por líquido amniótico (30, 38), golpe de calor, embolia grasa (39, 40, 41, 42) y la que sigue a un golpe en la cabeza de suficiente severidad como para causar destrucción del tejido cerebral (43). En estas situaciones la tromboplastina puede inducir coagulación por su liberación a la circulación sanguínea.

Los leucocitos normales no tienen o tienen poca actividad tromboplástica, pero su exposición a endotoxinas incrementa marcadamente su contenido de tromboplastina (44, 45). Este incremento de su actividad tromboplástica podría mediar CID inducida por endotoxinas. Un incremento de tromboplastina de los promielocitos ha sido descubierta en leucemia promielocítica, y se cree que a esto se debe el desarrollo de CID en esta enfermedad en particular (46, 47, 48).

Se ha observado tromboplastina en células mononucleares infiltradas en órganos transplantados que están siendo rechazados, y se ha postulado que la tromboplastina es la responsable de la acumulación de fibrina asociada con la reacción de rechazo (49). Lerner et. al. (50) observaron un incremento en la actividad tromboplastina de leucocitos recobrados de un coágulo in vitro o de un segmento aislado de vena dentro de la cual han emigrado. Como resultado de estas observaciones, postularon que los leucocitos, debido a su habilidad para invadir las paredes de los vasos y a su posibilidad de generar tromboplastina, bajo ciertas circunstancias, podrían estar involucrados en la patogénesis de trombosis venosa.

La actividad coagulante de células malignas ha sido reconocida durante mucho tiempo (51). La identidad precisa de esta actividad coagulante no es enteramente clara, pero ha sido demostrado que es tromboplastina, al menos, en cierto tipo de células malignas. La presencia de esta actividad coagulante en células malignas podría explicar la CID y el incremento de enfermedades tromboembólicas en pacientes con cáncer (46, 52).

Gierscksky (41) encontró que el tejido adiposo humano manifiesta actividad

tromboplástica. Una actividad coagulante similar aparece en el fluido cerebroespinal, lo cual puede ser reflejo de daño del sistema nervioso central (53). Algunos investigadores han estudiado la actividad tromboplástica del fluido amniótico. La actividad coagulante del líquido amniótico aparece junto con el surfactante a las treinta semanas de gestación y se incrementa gradualmente. Se observa que se encuentran niveles altos de actividad tromboplástica en partos postmaduros y niveles bajos en pacientes cuyos bebés desarrollaron posteriormente síndrome de dificultad respiratoria (54, 55). Basándose en estas observaciones se ha desarrollado una técnica para valorar la madurez fetal aprovechando el efecto coagulante del líquido amniótico (56).

## ESPECIFICIDAD DE ESPECIE DEL FACTOR TISULAR

El mecanismo básico de la coagulación sanguínea es el mismo en las diferentes clases de vertebrados: la trombina es la enzima activa y el fibrinógeno es el sustrato. La similitud va más lejos ya que la trombina humana coagula al fibrinógeno de los peces (57). Sin embargo, hay diferencias cuantitativas y cualitativas interespecies: la concentración de ciertos factores de coagulación difieren mucho de una especie a otra. El factor V tiene una concentración 12 veces más alta y es más estable en plasma bovino que en plasma humano. Los mismos factores de coagulación en diferentes especies tienen diferencias en su estructura molecular. Blomback (58) demostró que el fibrinógeno de diferentes especies difieren en sus grupos terminales y en su secuencia de aminoácidos.

La actividad de la tromboplastina tisular es altamente dependiente de la especificidad de especie. Esto es especialmente evidente cuando se trata de usar tromboplastinas tisulares animales para la determinación del tiempo de protrombina de plasmas humanos. Mann y Hurn (59) estudiaron más detalladamente este problema y encontraron que la especificidad de especie del factor tisular desaparece después de su incubación con sueros homólogos. A la sustancia presente en el suero responsable de este efecto la llamaron "cotromboplastina". Hecht (60) comparó tromboplastinas tisulares de mamíferos y aves con sus respectivos "lípidos activadores". La acción de la tromboplastina fue específica de especies; en cambio el "lípidos activador" no mostró esta especificidad. Encontró que la tromboplastina de varios mamíferos sobre plasmas de diferentes mamíferos difieren en su capacidad para acortar el tiempo de coagulación, y en altas concentraciones no inhibía la coagulación; en cambio la tromboplastina de aves da-

ba largos tiempos de coagulación, y en altas concentraciones inhibía la coagulación. Irsigler et. al. (61) probaron preparaciones de tromboplastina tisular bovina, humana y de pollo con plasmas de las mismas tres especies, y sobre protrombina bovina purificada. Sus experimentos mostraron que las tromboplastinas altamente purificadas eran mucho más activas sobre plasmas homólogos que sobre plasmas heterólogos. Estas preparaciones fueron separadas en una parte proteica y una parte lipídica. Se hicieron preparaciones combinando la parte proteica del factor tisular de una especie con la parte lipídica del factor tisular de otra especie. En contraron que estas preparaciones acortaban el tiempo de coagulación de los plasmas que eran homólogos a su parte proteica, y concluyeron que la especificidad de especie depende de la parte proteica de la tromboplastina.

## REACCION FACTOR TISULAR - FACTOR VII

En presencia de calcio, el factor VII es activado por el factor tisular. El mecanismo de este proceso podría involucrar la interacción del factor VII con los fosfolípidos del factor tisular, probablemente catalizada por el componente proteico (62).

La activación del factor VII por el factor tisular no involucra cambios irreversibles en la molécula, pero probablemente causa la formación de un complejo fosfolípidos-factor VII, el cual activa al factor X (28). El complejo fosfolípidos-factor VII ha sido aislado por centrifugación; dicho complejo convierte extremadamente rápido al factor X a Xa; por otro lado, el factor tisular sin el factor VII, sólo activa al factor X muy lentamente. Ha sido demostrado que el fosfolípidos-factor VII tiene propiedades que ninguno de sus componentes posee por separado: este complejo es inhibido por el deisopropilfosfluorhidrato y por el inhibidor de la tripsina de las semillas de soya (63).

Pitlick (30) preparó anticuerpos para ambos reactantes: el complejo fosfolípidos-factor tisular sólo fue inhibido por el antisuero contra el factor VII; sin embargo, ambos antisueros inhibieron a sus respectivos antígenos cuando fueron adicionados antes de la formación del complejo. Estos resultados sugieren que el centro activo del complejo reside en el factor VII.

El factor VII ha sido aislado en estado activo después de su incubación junto con factor tisular y calcio, y con subsecuente destrucción de toda actividad del factor tisular por fosfolipasa C. Este estado activo depende de la presencia de los fosfolípidos unidos al factor VII, puesto que

la activación es reversible por tratamiento más prolongado con fosfolipasa C. De esto se deduce que la unión del factor VII al factor tisular no es necesaria para la activación del factor X por el factor VII, siempre y cuando este último haya sido expuesto al factor tisular (62).

Ha sido demostrado por Hvatum et. al. (34) y Bjorklid et. al. (35) que la tromboplastina tisular tiene una estructura membranosa con arreglo concéntrico, y se ha demostrado que esta apariencia permanece casi intacta durante el proceso de coagulación. Hasegawa et. al. (64) mostraron que la tromboplastina que existe en el sedimento que queda después de la disolución del coágulo con uroquinasa, observada a través del microscopio electrónico de barrido, muestra la apariencia de finos gránulos adheridos a la superficie de agregados de partículas. En el microscopio electrónico de transmisión, la tromboplastina del sedimento retiene su arreglo concéntrico idéntico al observado por Hvatum (34).

Cuando las estructuras membranosas fueron separadas tratándolas con fosfolipasa C, se formaron ampúlas por la fusión de algunas membranas. La fosfolipasa C separa los grupos fosforilados de los fosfolípidos unidos a la membrana, e inactiva completamente al factor tisular (64).

El tratamiento del factor tisular con plasmina y urocinasa provoca pérdida de su actividad coagulante; probablemente estas enzimas digieren grupos proteicos unidos a la membrana, y causan un rompimiento de dichas membranas como se observa después del tratamiento con fosfolipasa C (64).

De este modo, la actividad del factor tisular parece depender completamente de la presencia de las estructuras membranosas.

### OBTENCION DE EXTRACTOS TISULARES

Los extractos de tejidos pueden ser preparados a base de moler con arena el tejido ya lavado y libre de sangre, y extrayendo el factor tisular con solución salina. También el tejido puede ser deshidratado con acetona, y del tejido deshidratado se muele para extraer el factor tisular con solución salina. Este último procedimiento es generalmente aplicado al tejido cerebral, ya que se puede limpiar fácilmente de grandes vasos sanguíneos, y se reduce fácilmente a un material granular en mortero (65).

La tromboplastina obtenida de diferentes tejidos varía en su actividad. Las más activas y comúnmente utilizadas son las derivadas de pulmón, placenta y cerebro tanto de humano como de conejos; los extractos cerebrales de otras especies tienen menos actividad tromboplástica (66).

#### TIEMPO DE PROTROMBINA

(SEG)

FUENTE DE TROMBOPLASTINA	PLASMA NORMAL	PLASMA DEFICIENTE DE FACTOR VII
Cerebro de conejo	12"	45"
Cerebro humano	12"	50"
Cerebro de perro	21"	67"
Cerebro de cerdo	23"	68"
Cerebro de pollo	57"	no determinado

Entre las tromboplastinas de cerebro y pulmón, se prefiere la primera, ya que la de pulmón está sujeta a dos variables: a) la cantidad de sangre que queda en el tejido (está altamente contaminado con ésta) lo que altera considerablemente su actividad; b) su susceptibilidad al efecto de un inhibidor existente en el plasma humano. De este modo, una variable tiende a acortar el tiempo de protrombina, y la otra tiende a alargarla. En cambio la tromboplastina obtenida de cerebro contiene muy poca sangre, y no es afectada por el inhibidor existente en el plasma. Además, el cerebro está libre de factor lábil, factor estable, protrombina y calcio (67).

Los extractos de cerebro de conejo y humano tienen una actividad tromboplástica similar. El cerebro de conejo es particularmente adecuado para la obtención de tromboplastina ya que es una especie usual en cualquier bioterio y el producto es satisfactorio para medir el tiempo de protrombina en plasma del humano, perro, conejo, gato y otros mamíferos (68).

## COMPOSICION DE LA CEFALINA

Cuando las plaquetas son removidas de plasma normal citratado, la recalificación de éste produce un coágulo en un tiempo casi normal; sin embargo, el mecanismo de la coagulación no se lleva a cabo normalmente porque muy poca protrombina es convertida en trombina. Este defecto puede ser también demostrado con la prueba de la generación de la tromboplastina, ya que en ausencia de plaquetas esta prueba resulta anormal por la poca cantidad de protrombina que se transforma en trombina, puesto que las plaquetas contienen altas cantidades de fosfolípidos; parece razonable suponer que la conversión de protrombina a trombina podría estar relacionada a algún o algunos fosfolípidos de las plaquetas (65). In vivo, la hemostasis patológica en estados trombocitopénicos es un reflejo, en parte, de un decremento de los fosfolípidos plaquetarios (69).

Howell (3) en 1912, observó que una cefalina derivada de tejido cerebral y timo, insoluble en alcohol termoestable, tenía actividad tromboplástica. Otros autores encontraron una actividad similar a la de las plaquetas en semillas de soya (70). Treinta años después de la observación de Howell, Folch (22) demostró que la cefalina podía ser separada en tres fracciones: fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-serina y fosfatidil-inositol.

En 1955 Bell y Alton (71) mostraron que un extracto de cloroformo de cerebro era capaz de reemplazar a las plaquetas.

Robinson y Poole (72), O'Brien (73), Rouser et. al. (74) y Wallach et. al. (11) postularon que la fosfatidil-etanolamina era la sustancia activa que podía reemplazar a las plaquetas.

Por otro lado, Fisher y Hecht (21) encontraron que la fosfatidil-etanolamina altamente purificada no poseía actividad tromboplástica. Marcus y Spaet (75) observaron que la fosfatidil-serina, aislada de plaquetas y purificada por cromatografía, era el mejor sustituto de las plaquetas. Barkhan et. al. (76) confirmaron la actividad tromboplástica de la fosfatidil-serina, pero afirmaron que bajo algunas condiciones actuaba como inhibidor de la coagulación. Los investigadores mencionados anteriormente, consideraban que sólo un fosfolípido era el responsable de la actividad tromboplástica del "lípidio activador"; pero otros creían que al menos dos producen tal actividad: Rappaport (15), Therniautl et. al. (77), y Troup et. al (78) demostraron que la mezcla de fosfatidil-serina y fosfatidil-colina tenía una actividad tromboplástica mucho más alta que la fosfatidil-serina sola.

Slotta (68) encontró que la fosfatidil-etanolamina y la fosfatidil-colina eran inactivas, pero tenían una alta actividad tromboplástica cuando se mezclaban con fosfatidil-serina. Hecht y Slotta (69) manifestaron que sólo la combinación de fosfatidil-serina y fosfatidil-etanolamina o fosfatidil-colina o ambas, manifestaron la alta actividad del "lípidio activador" de las plaquetas o cerebro.

Por lo tanto, probablemente el "lípidio activador" o cefalina contiene la mejor combinación de fosfatidil-serina, fosfatidil-etanolamina y fosfatidil-colina junto con sustancias inactivas.

## COMPARACION DE EXTRACTOS DE FOSFOLIPIDOS Y FOSFOLIPIDOS PLAQUETARIOS

Los extractos de fosfolípidos (cefalina, tromboplastina parcial) son muy usados en pruebas de coagulación como substitutos de los fosfolípidos plaquetarios, los cuales son esenciales para la hemostasis normal in vivo. Estos fosfolípidos son preparados a partir de varios tejidos, principalmente de cerebro por medio de extracciones con solventes orgánicos como éter en el método de Folch (22), o cloroformo en el método descrito por Beel y Alton (71).

Es generalmente aceptado que las plaquetas ayudan a la hemostasis por los agregados que forman en el sitio en donde hay un daño vascular. Se conoce menos acerca de su contribución a la coagulación sanguínea, pero parecen ser el sitio en donde se activan ciertos factores de la coagulación y proveen una superficie membranosa en donde algunos factores de la coagulación se pueden unir selectivamente (79).

No parece ser que las plaquetas inicien la coagulación, sino que probablemente entren a la secuencia de este proceso después de que ha empezado. Existen evidencias indirectas de su participación en la fase de contacto de la coagulación cuando son estimuladas con ADP o colágeno (80). Una vez estimuladas pueden proveer un sitio para la activación de factor X (81), factor V (82), y protrombina.

La actividad plaquetaria formadora de producto de contacto, la actividad coagulante de las mismas inducida por colágeno y las complejas reacciones para la generación de factor Xa sobre la superficie de las plaquetas, han sido distinguidas de la bien conocida actividad coagulante del factor pla

quetario 3, la cual ha sido definida específicamente como "aquella actividad de las plaquetas que puede ser medida por el acortamiento del tiempo del veneno de víbora de Russell (RVV), para el cual ciertos lípidos pueden ser utilizados, y los cuales probablemente representen la contribución de las plaquetas para la interacción de factor Xa, factor V y calcio en la activación de la protrombina" (83).

El tiempo de recalcificación de plasma en tubo de plástico provee un sistema altamente sensible a la presencia de "activación de contacto". Empleando este sistema, se descubrió en las plaquetas una actividad coagulante no suplida por los fosfolípidos aislados de cerebro humano por el método de Folch (22). La ventaja coagulante de las plaquetas sobre los fosfolípidos de Folch, al menos en parte, es la capacidad de las plaquetas para responder al difosfato de adenosina para activar el factor XII asociado a las plaquetas (84). Vecchione y Zucker (85), usando diferentes fosfolípidos, fueron incapaces de confirmar la ventaja coagulante de las plaquetas sobre los fosfolípidos en la prueba del plasma recalcificado.

En un intento para explicar estas diferencias Walsh y Lipscomb (86) compararon los efectos procoagulantes de plaquetas y varias preparaciones de fosfolípidos utilizando el tiempo de recalcificación de plasma y el tiempo de víbora de Russell. La primera prueba, como ya se mencionó, es altamente sensible a la presencia de "activación por contacto", y el segundo sistema de prueba es muy influenciado por la presencia de fosfolípidos con actividad de factor 3 plaquetario. Concluyeron que los lípidos de Folch tienen una actividad óptima de factor 3 plaquetario al igual que los fosfolípidos de Bell y Alton y las plaquetas ya que las 3 preparacio-

nes provocan acortamiento del tiempo RWV. Por otro lado, las plaquetas y los fosfolípidos de Bell y Alton acortaron el tiempo de recalcificación mientras que los fosfolípidos de Folch no tuvieron esta capacidad. Por lo tanto, los extractos clorofórmicos de cerebro utilizados por Vecchione y Zucker (85), poseen capacidad para activar al factor XII en una "forma similar" a la actividad previamente demostrada en las plaquetas humanas; en cambio, los fosfolípidos de Folch como originalmente se reportó, no de mostraron capacidad para activar al factor XII. Los fosfolípidos de Bell y Alton muestran actividad de factor tisular, la cual no poseen ni los fosfolípidos de Folch ni las plaquetas.

## SENSIBILIDAD Y ACTIVACION DE LA CEFALINA

Los extractos de fosfolípidos (cefalina, tromboplastina parcial) son usados principalmente en la prueba de tiempo de tromboplastina parcial (TTP), el cual es útil en el diagnóstico de hemofilia, en el control de la terapia con heparina, y en forma modificada, provee las bases de la prueba de una fase para el factor VIII y otros factores de coagulación (87).

La cefalina es una mezcla de varias clases de fosfátidos: no están estandarizadas ni su composición química ni su actividad coagulante. De esto se deduce que diferentes extractos varían considerablemente en su sensibilidad (definida como un cambio en el tiempo de coagulación por un cambio en la concentración particularmente del factor VIII y de la heparina) (88). Pollar et. al. (89) demostraron que estas diferencias en sensibilidad disminuyen la habilidad de los reactivos para detectar anomalías en la coagulación, y esto podría tener importantes consecuencias clínicas.

En la mayoría de los estudios que se han hecho, la razón de la diferencia en sensibilidad de los reactivos para el TTP no ha sido investigada. Aparte de la diferencia en la composición de los fosfolípidos, otros factores que pueden ser importantes son el método y el tiempo de activación de contacto, concentración de fosfolípidos y la presencia de contaminantes. En un estudio hecho por Barrowcliffe y Gray (87) con diferentes extractos de fosfolípidos, concluyeron que la concentración de fosfolípidos no parece ser un factor que influya en la sensibilidad de los reactivos al factor VIII; en cambio, la sensibilidad a la heparina incrementó con la disminución de la concentración de fosfolípidos (88). Esto parece deberse a que la heparina,

a diferencia del factor VIII, no interactúa directamente con los fosfolípidos, y el efecto de la heparina sobre el TTP es mediante la inhibición de la fase de contacto, en la cual no se requieren los fosfolípidos.

El método de activación tiene una clara importancia en la determinación de TTP en muestras normales y anormales. Los activadores usados en los reactivos de fosfolípidos son caolín, celite y ácido elálgico. Aunque el tiempo de incubación de 1 a 2 minutos con caolín puede dar buena sensibilidad a heparina y a factor VIII, este tiempo sólo causa una subóptima activación.

El grado de activación con 1-2 minutos varía entre individuos, y con diferentes concentraciones de heparina (87); por lo tanto parece preferible, para la reproducibilidad, un tiempo más prolongado de activación (10 minutos) lo cual da una completa activación con cualquier agente activante (89).

Se ha demostrado que los reactivos activados con caolín diferencian los plasmas medianamente hemofílicos de los plasmas normales; en contraste, los reactivos activados con ácido elálgico no diferencian los plasmas hemofílicos medios de los plasmas normales (87), lo que confirma los resultados de Hathaway et. al. (90) de que estos reactivos no son muy sensibles a deficiencias medias.

La contaminación de los extractos de fosfolípido con factor tisular no parece ser mayor problema. Aunque la mayoría de estos extractos tienen cantidades medibles de actividad de factor tisular, la cantidad es tan pequeña que no interfiere en la coagulación intrínseca (91). La presencia de productos de autoxidación de ácidos grasos (aldehídos, cetonas y epóxidos), es potencialmente uno de los más serios problemas: se ha mostrado que tales productos tienen un marcado efecto inhibitorio sobre las pruebas de coagulación.

La variabilidad en el comportamiento de las diferentes preparaciones de fosfolípidos podría deberse en parte a la presencia de estos productos de oxidación (92).

## MATERIAL Y METODOS

1. PREPARACION DE REACTIVOS PROPIOS.
2. REACTIVOS COMERCIALES USADOS.
3. METODOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR: TIEMPO DE PROTROMBINA (TP) Y TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL (TTP).
4. METODOS DE EVALUACION.

### PREPARACION DE TROMBOPLASTINA INNSZ

Se prepara a partir de cerebros obtenidos de conejos adultos sanos sacrificados por inyección de aire. Los cerebros fueron extraídos de inmediato para facilitar la remoción de vasos sanguíneos. El procedimiento usado fue el siguiente:

1. Se hizo con bisturí una incisión longitudinal en la zona central de la piel que cubría la cabeza y el cuello, y con unas pinzas se apartó la piel dejando el cráneo al descubierto.
2. Con unas pinzas fuertes se incidió la articulación occipital alantoi-dea, se cortó y se separó la calota craneana.
3. Se cortó la duramadre y se extrajo el cerebro con el mango de las pinzas. Tan pronto como se extrajo, se colocó en hielo sobre papel aluminio.
4. Para limpiar los cerebros se desechó la piamadre, el bulbo raquídeo y se eliminaron todos los vasos sanguíneos posibles con la ayuda de pinzas y bisturí. Este procedimiento se llevó a cabo sobre hielo.
5. Se colocaron los cerebros en un vaso de precipitados y se lavaron con solución salina fisiológica hasta eliminar todos los residuos de san-gre.
6. Los cerebros ya limpios se pasaron a un mortero y se les adicionó 10 ml de acetona por cerebro; para remover las posibles trazas de calcio, se agregó 0.1 ml. de citrato de sodio al 3.8% por cada 3 cerebros.

7. El material se maceró con el pilón de mortero y después se desechó la acetona por decantación; se agregó otra porción igual de acetona y se siguió macerando el material; se desechó también esta segunda acetona y se agregó una tercera fracción: en este paso el material empezó a adquirir una apariencia escamosa y la acetona estaba prácticamente limpia ya que las primeras dos porciones salen opalescentes por la disolución de lípidos. Se desechó la tercera acetona y se agregó una nueva porción y se molió el material hasta que se obtuvo una sustancia granulosa.
  
8. Se desechó la cuarta acetona por filtración en un embudo de filtración rápida. El polvo de tromboplastina que se obtuvo se esparció sobre un papel filtro en una charola, y se colocó en una estufa a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se colocó a temperatura ambiente por 24 horas, y finalmente se guardó en refrigeración en un frasco tapado.

Nos referiremos a ella como tromboplastina INNSZ en los experimentos subsecuentes descritos en este trabajo.

### PREPARACION DE CEFALINA INNSZ

La cefalina se obtuvo a partir de la tromboplastina INNSZ de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. A 3 g de tromboplastina INNSZ colocados en un frasco con tapón, se les adicionaron 62.5 mL de acetona, y se agitó por inversión durante 2 minutos.
2. Se dejó reposar la suspensión tapada durante dos horas a temperatura ambiente, y se centrifugó 5 minutos a 200 G.
3. Se decantó el sobrenadante, y se dejó secar el residuo a temperatura ambiente sobre un papel filtro.
4. Se transfirió el residuo a un vaso de precipitados de 250 mL, se adicionaron 62.5 mL de cloroformo, y se mantuvo en agitación continua por dos horas en un agitador magnético.
5. Se filtró la mezcla a través de un embudo de filtración rápida. El filtrado se colectó en un vaso de precipitados de 250 mL y se dejó evaporar a temperatura ambiente (aproximadamente 3 días). En el fondo del vaso quedó un residuo gomoso amarillo oscuro.
6. Se pasó el precipitado, con ayuda de aplicadores, a un homogeneizador de tejidos y con 34.7 mL de solución salina fisiológica se homogeneizó hasta que se obtuvo una suspensión lechosa de color amarillo pálido.

7. Se dividió la suspensión en alícuotas de 1 mL y se congelaron.

La designadernos cefalina INNSZ en el resto de este documento.

**BUFFER DE VERONAL**

Pesar y poner en un matraz volumétrico de 1000 mL:

Dietilbarbiturato de sodio	5.87 g
Cloruro de sodio	5.33 g
HCl 0.1 N	215 ml

Aforar con agua destilada.

Guardar en refrigeración.

## REACTIVOS COMERCIALES USADOS

### TROMBOPLASTINA

En varios experimentos se utilizó con fines de comparación con la trombo-  
plastina INNSZ una tromboplastina comercial (Difco Laboratories), que es  
una tromboplastina obtenida de cerebro de conejo y envasada en ampolletas  
de 150 mg que permiten aproximadamente 35 determinaciones. Se debe alma-  
cenar entre 2° y 8°C, y para reconstituirla se adicionan 4 mL de solución  
salina a la ampolleta; se incuba en baño maría a 46°C por 10 minutos  
(cuando han transcurrido 5 minutos de incubación se resuspende la trombo-  
plastina cuidadosamente con pipeta pasteur). Después de la incubación se  
le añade 0.1 mL de citrato de sodio al 3.8% como conservador. Se mezcla  
y se deja sedimentar en el refrigerador 24 horas. En el momento de usar-  
se, el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio con una pipeta pasteur.  
El sobrenadante es estable por 7 días. Los valores de referencia de tiem  
po de protrombina en nuestro laboratorio con esta tromboplastina son de  
11.0 a 15.2 segundos.

Nos referiremos a ella como tromboplastina comercial en el resto del tra-  
bajo.

### CEFALINA

En varios experimentos la <sup>2</sup>cefalina INNSZ se comparó con la Tromboplastina  
Parcial Activada Lafón que es un extracto clorofórmico obtenido de cere-  
bro de conejo que contiene un activador plasmático insoluble. Cada fras-

co del reactivo contiene 4.2 mL, lo cual es suficiente para aproximadamente 40 determinaciones. Se recomienda guardar entre 2° y 8°C mientras no esté en uso. Este reactivo se presenta en forma líquida, está listo para usarse, y se debe agitar antes de emplearlo. Los valores de referencia de este reactivo para la prueba de tiempo de tromboplastina parcial son de 22 a 42.5 segundos en nuestro laboratorio.

#### PLASMA CONTROL COMERCIAL (PCC)

En muchos experimentos se usó para la realización de las pruebas de tiempo de protrombina (TP) y de tiempo de tromboplastina parcial (TTP) un plasma liofilizado comercial (Plasma Control Normal, Ortho Diagnostic) que es un plasma humano citratado que debe ser almacenado entre 2° y 8°C. Para reconstituirlo, se adiciona 1 mL de agua destilada y se agita hasta lograr solubilizar todo el liofilizado. Debe usarse fresco (no más de 8 horas después de reconstituido).

Nos referiremos a este plasma como PCC (Plasma Control Comercial) en todos los experimentos subsecuentes de este trabajo.

## MÉTODOS PARA DETERMINAR TP Y TTP

Las determinaciones de las pruebas de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial (TTP) se llevaron a cabo en un fibrómetro (Fibro System BBL). Los procedimientos fueron los siguientes:

### TP

En una microcopa de plástico se pipetea 0.1 mL de tromboplastina y 0.1 mL de plasma. Se incuba durante 1 minuto en el bloque de calentamiento del fibrómetro (37°C); al cabo de este tiempo se añade 0.1 mL de cloruro de calcio 0.02 M precalentado a 37°C. Simultáneamente a esta adición se echa a andar el cronómetro del fibrómetro; el fibrómetro automáticamente determina el tiempo que tarda en coagular el plasma.

### TTP

En una microcopa pipetear 0.1 mL de tromboplastina parcial (cefalina). Incubar 1 minuto a 37°C en el bloque de calentamiento, añadir 0.1 mL de plasma e incubar la mezcla 2 minutos más; al cabo de este tiempo adicionar 0.1 mL de cloruro de calcio 0.02 M precalentado a 37°C; al mismo tiempo hacer funcionar el cronómetro del fibrómetro, el cual registra automáticamente el tiempo que tarda en coagular el plasma.

Las determinaciones tanto de TP como de TTP, a menos que se indique, se hicieron por duplicado y se informa el promedio.

## METODOS DE EVALUACION

Las estrategias de evaluación de TP y TTP son diferentes ya que el TP puede ser evaluado a base de curvas de TP en función de la concentración variable de plasma diluido con solución salina, en cambio, el plasma diluido con suero o con solución salina arroja curvas de TTP inconsistentes y erráticas. Consecuentemente la estandarización y evaluación de la tromboplastina INNSZ para TP se presenta separadamente de la cefalina INNSZ para TTP.

## EVALUACION DE LA TROMBOPLASTINA INNSZ

Se hicieron dos tipos de estudios:

1. Estandarización del reactivo por medio de curvas de TP en plasma diluido siguiendo un protocolo que se describe en la sección de Resultados y Discusión. En esta parte se evaluó:
  - a) Concentración óptima de tromboplastina.
  - b) Estabilidad de la tromboplastina reconstituida.
  - c) Comportamiento de la tromboplastina en función del sustrato.
  - d) Efecto de citrato de sodio sobre la estabilidad de la tromboplastina.
  
2. Una vez estandarizada la tromboplastina INNSZ se comparó versus una tromboplastina comercial importada (Difco, lote 684823) en 135 plasmas de la rutina en un periodo de 23 días hábiles (7 de febrero a 30 de marzo de 1983). Estos estudios comparativos fueron pocos debido a que

sólo se contaba con un remanente pequeño de tromboplastina comercial\*.

En esta parte se evaluó:

- a) Precisión intralote.
- b) Correlación inter-tromboplastinas.
- c) Frecuencia de congruencias e incongruencias inter-tromboplastinas.
- d) Estabilidad a largo plazo.

#### EVALUACION DE LA CEFALINA INNSZ

Se hicieron dos tipos de estudios:

1. Estandarización de la cefalina por el método que se describe en la sección de Resultados y Discusión.
2. Una vez estandarizada la cefalina INNSZ, se comparó con una cefalina comercial (Lafón, lote 132) en plasmas de la rutina. En estas comparaciones se evaluó:
  - a) Precisión intralote.
  - b) Correlación inter-cefalinas.
  - c) Frecuencia de incongruencias inter-cefalinas.
  - d) Estabilidad a largo plazo.

\* Su importación está prohibida actualmente en México por la SECOFIN.

La incongruencia de datos obligó a realizar cinco periodos de comparación los cuales fueron:

MES	FECHAS DE 1983	No. DE PLASMAS COMPARADOS
MARZO	8/2 a 4/3	92
ABRIL	11/4 a 18/4	119
MAYO	16/5 a 24/5	107
JUNIO	16/6 a 27/6	120
JULIO	4/7 a 20/7	223

T R O M B O P L A S T I N A

## RESULTADOS Y DISCUSION

### EVALUACION DE LA TROMBOPLASTINA.

Como se dijo en la sección de material y métodos, la tromboplastina INNSZ se evaluó usando dos tipos de estudios que tenían como finalidad: 1) estandarizar el reactivo; y 2) comparar la tromboplastina INNSZ versus una tromboplastina comercial. En ambos estudios se utilizó un mismo lote de tromboplastina comercial (Difco 684823) así como un sólo lote de tromboplastina INNSZ (lote 1) que se almacenó en un frasco tapado mantenido en refrigeración. De este frasco se tomaba el reactivo según se iba utilizando.

Para lograr el primer objetivo se efectuaron cuatro experimentos:

1. El primer paso para estandarizar la tromboplastina INNSZ fue determinar la concentración a que debía usarse para tener resultados satisfactorios.
2. Una vez establecida la concentración óptima del reactivo, se observó su estabilidad a corto plazo después de reconstituirlo.
3. Posteriormente se analizó el comportamiento de la tromboplastina INNSZ con substratos distintos.
4. Por último, se observó el comportamiento comparativo del reactivo reconstituido en presencia y ausencia de citrato de sodio.

Los cuatro experimentos anteriores se hicieron siguiendo un mismo protocolo de evaluación: el protocolo, así como los experimentos y sus resultados, se describen y discuten a continuación.

## PROTOCOLO DE EVALUACION DE TROMBOPLASTINA INNSZ

En todas las evaluaciones de la tromboplastina INNSZ se siguió un mismo sistema operativo. El protocolo de cada día de trabajo fue el siguiente:

1. Preparar 7 diluciones de PCC con solución salina a concentraciones de 100%, 60%, 40%, 30%, 20%, 15% y 10% (100% es el PCC reconstituido de acuerdo a las instrucciones del fabricante).
2. Iniciar las mediciones del TP por duplicado en cada una de las 7 diluciones utilizando tromboplastina INNSZ, comenzando con la concentración de 100%, y finalizando con la de 10%.

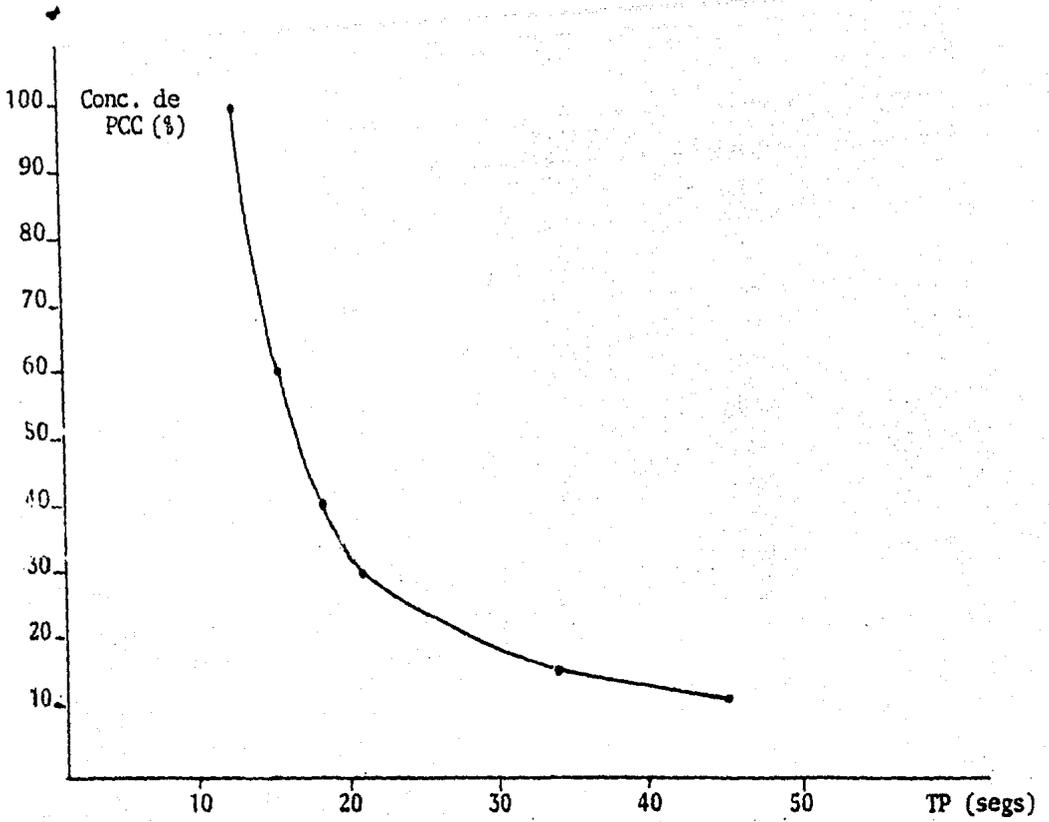
La gráfica de los datos reales de TP (en X) versus % de PCC (en Y) es una curva hiperbólica (gráfica 1.1), por lo que es preferible usar la recíproca de % de PCC (1/y) en la gráfica (gráfica 1.2). Con ello se obtiene una recta cuya ecuación tiene la siguiente forma general:

$$1/y = ax - b$$

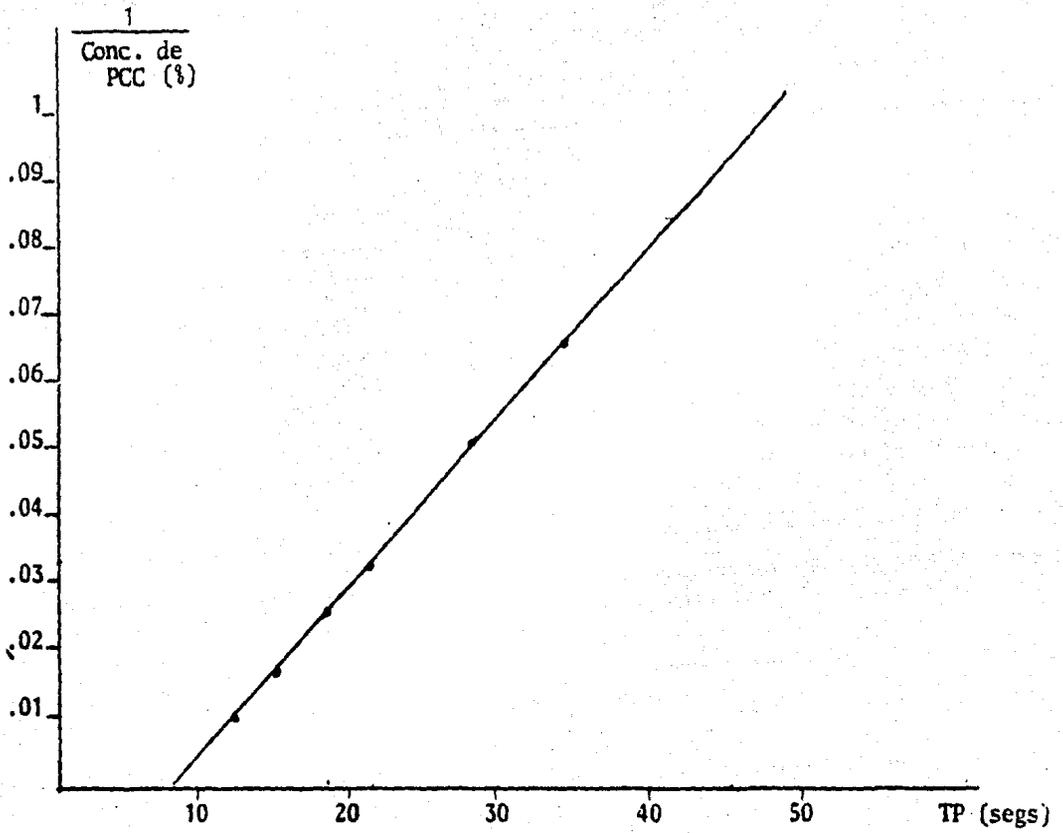
Donde:

- y = concentración de PCC en %
- a = pendiente de la recta
- b = intercepto de la recta
- x = tiempo de protrombina en segundos

Los datos de la ecuación de la recta que se presentan en cada una de las evaluaciones de la tromboplastina INNSZ son las siguientes:



GRAFICA 1.1. Curva que se obtiene al graficar TP versus concentración de PCC.



GRAFICA 1.2. Curva que se obtiene al graficar TP versus 1/concentración de PCC.

1. La correlación como un índice de la bondad de ajuste de los 7 datos experimentales a la ecuación obtenida: el ajuste es tal, que una correlación por debajo de 0.98 la consideramos de mal ajuste. Se designa como r en las tablas.
2. La pendiente y el intercepto de la ecuación, ya que son los parámetros que caracterizan totalmente a una recta, que se designan a y b, respectivamente, en las tablas.
3. Finalmente se dan los TP calculados de la ecuación para  $y = 100\%$  y para  $y = 15\%$ , ya que son dos concentraciones importantes en la evaluación de una tromboplastina. La de TP 100% representa el comportamiento del plasma sin diluir, y la de TP 15% corresponde a un TP de 25 a 35 segundos, el cual es el tiempo en el que se trata de estabilizar a los casos que reciben terapia con anticoagulantes.

Pasaremos a mostrar los resultados de los experimentos hechos con este protocolo:

### 1. CONCENTRACION OPTIMA DE TROMBOPLASTINA INNSZ

Con el objeto de determinar la concentración óptima de tromboplastina INNSZ que debe utilizarse para la determinación del tiempo de protrombina (TP), se hicieron experimentos en cuatro días de trabajo. Usando el protocolo de evaluación y PCC como sustrato se obtuvieron los siguientes resultados:

DIA DE TRABAJO	CONC. DE TROMBO PLASTINA INNSZ (mg/mL)*	r	a (X10 <sup>-4</sup> )	b (X10 <sup>-4</sup> )	TP 100% (segs.)	TP 15% (segs.)
3	5	0.95	40.7	-700	19.8	33.7
3	10	0.92	33.2	-450	16.6	33.6
3	15	0.99	36.2	-500	16.7	32.3
3	20	0.98	28.4	-300	14.2	34.2
1	25	0.99	28.4	-220	11.3	31.3
4	27.5	0.99	26.8	-200	11.3	32.4
1	30	0.99	25.5	-180	11.0	33.2
4	32.5	0.99	26.9	-190	10.9	32.0
1	37.5	0.99	23.0	-140	10.6	32.5
1	42.5	0.99	25.6	-170	10.5	32.5
2	47.5	0.99	23.5	-140	10.1	34.2
2	52.5	0.99	19.6	-80	9.0	37.9

\* Concentración del reactivo de trabajo en mg de polvo de tromboplastina INNSZ por mL de solución salina.

Como se observa, los datos de la tabla anterior se pueden dividir en tres grupos con las siguientes características:

CONC. DE TROMBOPLASTINA  
INNSZ

CARACTERÍSTICAS

5 a 20 mg/mL

Los TP del PCC al 100% son muy alargados (14.2 a 19.8 segs versus 10.5 a 12.5 de la trombo-plastina comercial con este PCC). Además, las concentraciones de 5 y 10 mg/mL no se ajustan bien a una recta (la r es baja).

47.5 y 52.5 mg/mL

Los TP del PCC al 100% son muy cortos (menos de 10.5 segs.).

25 a 42.5 mg/mL

No tienen inconvenientes: los TP del PCC al 100% son de 10.5 a 11.3 segs.; se ajustan a una recta ( $r = 0.99$ ); y las pendientes e interceptos son poco variables. La ecuación promedio para estas seis concentraciones es:

$$1/y = 0.0026x - 0.018$$

Por lo tanto, se decidió tomar como concentración óptima de la trombo-plas-tina INNSZ la de 32.5 mg/mL (intermedia entre 25 y 40 mg/mL) lo cual da un margen de seguridad de  $\pm$  23% al pesar el reactivo sin que se afecten substancialmente los parámetros de la recta.

Como se observa, los datos de la tabla anterior se pueden dividir en tres grupos con las siguientes características:

CONC. DE TROMBOPLASTINA  
INNSZ

CARACTERÍSTICAS

5 a 20 mg/mL

Los TP del PCC al 100% son muy alargados (14.2 a 19.8 segs versus 10.5 a 12.5 de la trombo-plastina comercial con este PCC). Además, las concentraciones de 5 y 10 mg/mL no se ajustan bien a una recta (la r es baja).

47.5 y 52.5 mg/mL

Los TP del PCC al 100% son muy cortos (menos de 10.5 segs.).

25 a 42.5 mg/mL

No tienen inconvenientes: los TP del PCC al 100% son de 10.5 a 11.3 segs.; se ajustan a una recta ( $r = 0.99$ ); y las pendientes e interceptos son poco variables. La ecuación promedio para estas seis concentraciones es:

$$1/y = 0.0026x - 0.018$$

Por lo tanto, se decidió tomar como concentración óptima de la tromboplastina INNSZ la de 32.5 mg/mL (intermedia entre 25 y 40 mg/mL) lo cual da un margen de seguridad de  $\pm 23\%$  al pesar el reactivo sin que se afecten substancialmente los parámetros de la recta.

### 3. COMPORTAMIENTO DE LA TROMBOPLASTINA INNSZ EN FUNCION DEL SUBSTRATO.

Para observar el comportamiento de la tromboplastina INNSZ con diferentes substratos, se siguió el protocolo de evaluación usando un substrato diferente en cada uno de 4 días de trabajo. El substrato de cada día de trabajo era un pozal de los plasmas frescos seleccionados de la rutina del día en base a que llenaran los siguientes requisitos: a) que el plasma tuviera TP y TTP normales con los reactivos de la rutina, y que no estuviera icterico o lipémico; b) que no procediera de un sujeto con algún diagnóstico en que se sabe se afectan los factores de coagulación. Unos 8-10 plasmas formaron el pozal en cada uno de los días de trabajo. Los resultados fueron:

DIA	SUBSTRATO	r	$a^{-4}$ ( $\times 10^{-4}$ )	$b^{-4}$ ( $\times 10^{-4}$ )	TP 100% (segs.)	TP 15% (segs.)
1	Pozal 1	0.99	31.2	-260	11.6	29.7
2	Pozal 2	0.99	31.6	-320	13.4	31.2
3	Pozal 3	0.99	30.5	-320	13.7	32.3
4	Pozal 4	0.99	30.2	-240	11.4	30.0
	Media	0.99	30.88	-285.0	12.53	30.80
	DE	0	0.64	41.2	1.19	1.19
	CV%	0	2.1	14.5	9.5	3.9

Puede observarse que, si bien los resultados son similares en los 4 pozales, hay mayor variabilidad en pendiente, intercepto y TP 100% en estos 4 pozales que los que se observan cuando el substrato no varía (ver la tabla del inciso anterior).

La mayor variabilidad de los pozales puede deberse a que en ellos no es constante la concentración de los diferentes factores de coagulación. Además intervienen otros factores como es el manejo de la muestra desde que se toma hasta que se procesa en el laboratorio, v. gr., venopunción, proporción sangre: anticoagulante, forma de agitar la muestra (formación de espuma) y tiempo que tarda cada muestra en llegar al laboratorio. Todos estos son factores que no operan en el PCC, y que por ende pueden contribuir a su menor variabilidad en el sistema de evaluación.

4. EFECTO DEL CITRATO DE SODIO (UTILIZADO COMO CONSERVADOR) SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA TROMBOPLASTINA RECONSTITUIDA.

El efecto del citrato de sodio sobre la tromboplastina KNSZ reconstituida se analizó de la siguiente manera: se reconstituyeron dos fracciones del reactivo de 260 mg cada una (8 mL), y a una de ellas se le adicionó 0.2 mL de citrato de sodio al 3.8% (0.2 mL a los 8 mL de reactivo) y a la otra alícuota se le adicionó 0.2 mL de salina. Se siguió el protocolo de evaluación con cada una de las fracciones en tres días de trabajo utilizando PCC como sustrato. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

DIA POST-RECONSTITUCION	CITRATO DE SODIO AL 3.8%	r	a ( $\times 10^{-4}$ )	b ( $\times 10^{-4}$ )	TP 100% (segs.)	TP 15% (segs.)
1	SI	0.99	21.5	-160	12.0	38.4
	NO	0.99	21.0	-140	11.5	38.5
4	SI	0.99	28.1	-240	12.0	32.1
	NO	0.99	29.7	-249	11.7	30.8
8	SI	0.99	27.1	-230	12.2	33.6
	NO	0.99	25.3	-190	11.3	33.7
PROMEDIOS	SI	0.99	25.6	-210	12.1	34.7
	NO	0.99	25.3	-193	11.5	34.3

El único efecto del citrato fue un TP 100% ligeramente superior al que se observa en ausencia de éste (12.1 vs. 11.5 segs.), pero sin que la diferencia alcance significancia (t pareada) posiblemente porque sólo son tres comparaciones.

Creemos que el citrato de sodio en el reactivo tiene un papel similar al que tiene en la deshidratación del cerebro de conejo (ver preparación de la tromboplastina), esto es, para eliminar residuos de calcio que pudiera tener todavía el reactivo, lo que provocaría el alargamiento que se observa en el TP 100%.

Una vez estandarizada la tromboplastina INNSZ, se procedió a efectuar el segundo tipo de estudio: compararla versus una tromboplastina comercial en plasmas de la rutina. En esta fase se evaluó lo siguiente:

1. Precisión intralote.
2. Correlación inter-tromboplastinas.
3. Frecuencia de incongruencias inter-tromboplastinas.
4. Estabilidad a largo plazo. Como complemento a los estudios hechos se ofrece una comparación inter-tromboplastinas en el programa interno de control de calidad de TP durante una parte del periodo en que se compararon las tromboplastinas así como en los meses siguientes.

Las evaluaciones se llevaron a cabo haciendo determinaciones simultáneas de TP utilizando la tromboplastina INNSZ y la tromboplastina comercial en 135 plasmas de la rutina. A continuación se dan y discuten los resultados de estas evaluaciones.

En la tabla 1.1 se muestra la precisión intralote que se obtuvo al hacer determinaciones duplicadas de cada plasma, con la tromboplastina INNSZ y con la tromboplastina comercial. Como se puede observar, la precisión intralote de la tromboplastina INNSZ en plasmas con TP menor de 30 segundos es igual a la de la tromboplastina comercial. A niveles de TP por arriba de 30 segundos, la precisión de ambos reactivos se deteriora, pero es más marcado este deterioro en la tromboplastina comercial, por lo que se obtiene una mejor precisión global con la tromboplastina INNSZ. En vista de que a niveles de TP 30 segundos la imprecisión aumenta, se deci-

dió excluir a los 8 plasmas con TP alto de los cálculos del coeficiente de correlación y de los parámetros de la recta de regresión inter-tromboplastinas que se muestran en la tabla 1.2: de los datos de la tabla se puede concluir que se obtuvo una buena correlación inter-tromboplastinas, ya que tanto el coeficiente de correlación como la pendiente de la recta de regresión se aproximan al valor ideal de uno. Por otro lado, el intercepto de la recta de regresión se aleja un poco del valor ideal de cero lo cual es debido a que los valores obtenidos de TP obtenidos con la tromboplastina INNSZ fueron, en general, un segundo más altos que los obtenidos con la tromboplastina comercial. Por esta razón, el límite superior de 15.2 segundos de TP de la tromboplastina comercial en nuestro laboratorio se cambió a 16.2 segundos para la tromboplastina INNSZ. Tomando en cuenta los límites anteriores, la tabla 1.3 muestra las incongruencias que se obtuvieron entre ambos reactivos en las determinaciones de TP en los 135 plasmas de la rutina: las incongruencias fueron 11 (8.1%), pero la diferencia entre ellas fue mínima (menos de dos segundos) y a niveles de anormalidad muy ligera. Fueron infructuosos los intentos de establecer, por clínica, cuáles de los dos resultados incongruentes era válido: eran datos que apenas rebasan el límite normal, y ninguno de los pacientes tenía un problema clínico obvio de trastorno de coagulación.

Para complementar los estudios hechos a la tromboplastina INNSZ se observó su estabilidad a largo plazo, para lo cual se analizaron los datos obtenidos en el control de calidad interno (promedio de TP y CV%) durante una parte y después del periodo en que se evaluó la tromboplastina INNSZ.

El control de calidad interno se lleva a cabo haciendo determinaciones de TP con la tromboplastina, utilizando como substrato PCC entero (100%) y

diluido con solución salina al 25%, esto se hace con el fin de observar el comportamiento del reactivo a niveles normales y anormales.

En la tabla 1.4 se muestran los datos del promedio de TP y CV% del control de calidad interno que se obtuvieron con el lote 1 de la tromboplastina INNSZ en el periodo de marzo-abril, así como los obtenidos con la tromboplastina comercial en marzo y los de la tromboplastina INNSZ, lote 2 en abril-junio.

En el periodo marzo-abril se observó una elevación gradual y constante en el promedio de los TP obtenidos con la tromboplastina INNSZ tanto en PCC 100% como en el PCC 25% (gráfica 1.3), lo cual se reflejó en un deterioro de la precisión interlotes. Se concluyó que la elevación de los promedios de TP y el aumento de la imprecisión interlotes era debido al deterioro del reactivo, por lo que se decidió preparar un nuevo lote de tromboplastina INNSZ (lote 2). Este nuevo lote se almacenó en alcuotas de 130 mg en frascos sellados y mantenidos en refrigeración.

El lote 2 de la tromboplastina INNSZ mantuvo un promedio de TP y una precisión interlotes similar a la de la tromboplastina comercial por un periodo más prolongado que el lote 1 (ver tabla 1.4). Creemos que la mejor conservación del lote 2 de la tromboplastina INNSZ puede obedecer al hecho de haberla almacenado dividida en alcuotas, lo cual evitaba destapar y sacar del refrigerador el lote completo de tromboplastina cada vez que se iba a utilizar. Esto nos había sucedido en el caso del lote 1, el cual se había almacenado en un solo frasco. Irrelevante de la causa, lo que surge de estos datos es que la forma de almacenamiento tiene un papel importante en el comportamiento del reactivo.

T A B L A 1.1

PRECISION INTRALOTE DE TP EN 135 PLASMAS DE LA RUTINA EN FUNCION DE  
TROMBOPLASTINA

TP (segs)	TROMBOPLASTINA DIFCO		TROMBOPLASTINA INNSZ		DIF. DE VARIANCIAS	
	n	CV%	n	CV%	F	p
15	42	2.7	24	2.3		
15-19.9	68	2.8	76	2.6		
20-29.9	17	2.4	25	2.7		
SUBTOTAL	127	2.69	125	2.65	1.10	NS
30-39.9	6	8.8	8	4.7		
40+	2	18.5	2	3.8		
SUBTOTAL	8	15.95	10	4.54	13.54	0.001
GLOBAL	135	9.33	135	3.46	6.34	0.001

T A B L A 1.2

CORRELACION Y PARAMETROS DE LA RECTA DE REGRESION  
(X=TP DIFCO; Y=TP INNSZ)  
EN 127 PLASMAS DE LA RUTINA\*

N	COEFICIENTE DE CORRELACION	RECTA DE REGRESION	
		PENDIENTE	INTERCEPTO
127	0.93	1.01	1.08

\*Se excluyeron 8 plasmas con TP arriba de 30 segundos.

T A B L A 1.3

FRECUENCIA DE INCONGRUENCIAS DE LOS REACTIVOS  
INNSZ Y DIFCO EN EL TP DE 135  
PLASMAS DE LA RUTINA

TOTAL	N/N	A/A	SOLO DIFCO ANORMAL*	SOLO INNSZ ANORMAL**	INCONGRUENCIAS***
135	41	83	8	3	11/135 = 8.1%

\* Más de 15.2 segs.

\*\* Más de 16.2 segs.

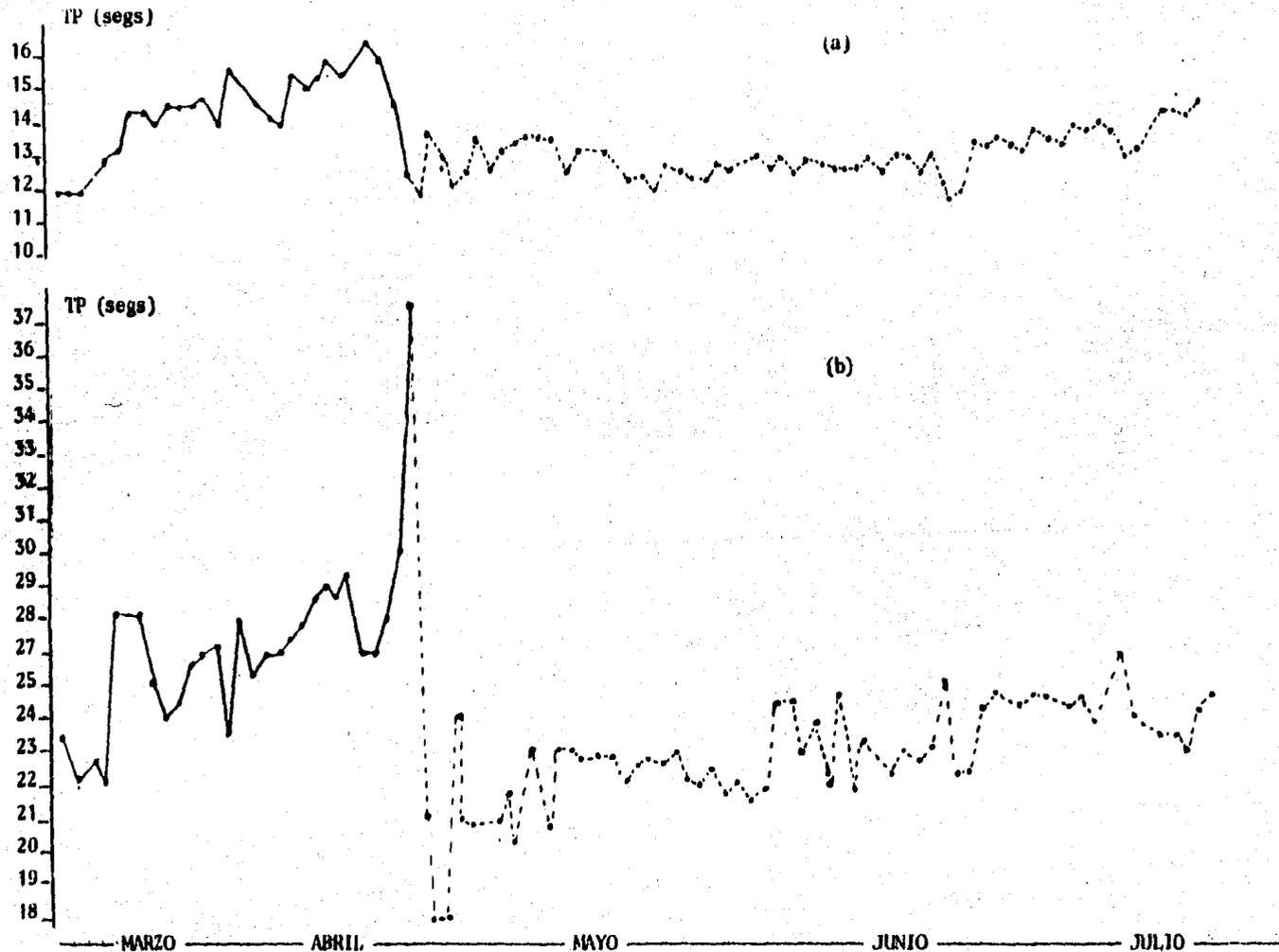
\*\*\* Siempre hubo menos de 2 segs. de diferencia entre Difco e INNSZ en las 11 incongruencias (Dif. 1.2 segundos).

T A B L A 1.4

C O N T R O L

PERIODO	TROMBOPLASTINA	N	- X	TP 100% CV% INTRALOTE	CV% INTERLOTE	N	- X	TP 25% CV% INTRALOTE	CV% INTERLOTE
MARZO	DIFCO	21	12.6	1.4	6.3	9	24.7	2.5	7.4
*MARZO-ABRIL	INNSZ-1	29	14.2	1.0	8.7	28	26.7	2.5	11.4
ABRIL-JUNIO	INNSZ-2	63	13.0	1.6	6.1	60	23.8	1.7	8.9

\* Fechas con inestabilidad de tromboplastina INNSZ-1 (ver texto)



GRAFICA 1.3. Control de calidad interno de TP en el periodo marzo-julio usando tromboplastina INNSZ (lote 1 —; y lote 2 ----); a) utilizando como sustrato PCC al 100%; b) utilizando como sustrato PCC al 25%.

## CONCLUSIONES

La tromboplastina INNSZ es estable cuando menos 7 días después de ser reconstituida, lo que permite prepararla para varios días de trabajo sin que se deteriore.

Aunque se pueden utilizar pozales de plasma frescos para el control de la estabilidad de la tromboplastina INNSZ, es recomendable usar PCC u otro plasma liofilizado para no tener más de una variable que afecte el comportamiento del reactivo.

La adición de citrato de sodio a la tromboplastina ya reconstituida no influye en su estabilidad y el alargamiento que provoca en el TP 100% no es significativo, por lo que puede usarse o no sin que se afecten apreciablemente los valores obtenidos o la estabilidad de la tromboplastina.

La tromboplastina INNSZ es estable aproximadamente tres meses almacenada en frascos viales tapados y mantenidos en refrigeración.

La tromboplastina INNSZ mostró precisiones interlote e intralote similares a las obtenidas con el reactivo comercial y, el número normal/anormal en plasmas de enfermos entre ambos reactivos fue bajo. Estos datos sugieren que logramos obtener un reactivo de calidad comparable a la de una tromboplastina comercial importada.

C E F A L I N A

## RESULTADOS Y DISCUSION

### EVALUACION DE LA CEFALINA.

La evaluación de la cefalina INNSZ, al igual que la de la tromboplastina INNSZ, se hizo en dos partes:

1. Estandarización de la cefalina INNSZ.
2. Comparación de la cefalina INNSZ contra una cefalina comercial.

Estos estudios se hicieron con un solo lote de cefalina INNSZ que se almacenó en alícuotas de 1 mL de cefalina sin diluir, en tubos de ensayo tapados con "parafilm", y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cada alícuota se congeló y descongeló unas diez veces, ya que el reactivo de trabajo se prepara, inmediatamente antes de utilizarlo, diluyendo 0,1 mL de la cefalina.

Enseguida se describe la estandarización de la cefalina INNSZ y posteriormente su comparación con la cefalina comercial.

### ESTANDARIZACION DE LA CEFALINA

La proporción de cefalina y caolín más conveniente en la preparación de un reactivo adecuado para la prueba del tiempo de tromboplastina parcial (TTP), se determinó de la siguiente manera: se hicieron diluciones del reactivo de cefalina en buffer de veronal a concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 y 10% de cefalina (V/V). Cada una de estas diluciones se mezcló con volúmenes variables de una suspensión de caolín al 4% (P/V):

Mezcla A = 1 mL de cefalina + 0.5 mL de caolín

Mezcla B = 1 mL de cefalina + 1 mL de caolín

Mezcla C = 1 mL de cefalina + 4 mL de caolín

Con las preparaciones anteriores se hicieron determinaciones replicadas (n=20 y n=6) de TTP al PCC sin diluir.

Se obtuvieron los siguientes resultados en este experimento cruzado:

CONC. ORIGINAL CEFALINA	n POR CASILLA	MEZCLA A		MEZCLA B		MEZCLA C	
		media	CV	media	CV	media	CV
10%	20	45.8	5.3%	41.4	4.5%	44.9	3.2%
4%	20	38.6	3.6%	39.3	3.6%	45.1	3.1%
2%	20	40.0	3.6%	39.9	7.6%	47.9	4.8%
1%	6	46.7	-	48.5	-	-	-
0.5%	6	48.7	-	52.5	-	-	-

La selección de la mejor combinación se hizo bajo los siguientes criterios:

- a) Que el resultado fuera "normal" ya que se usó el PCC que debe dar valores normales de TTP según el fabricante, v. gr., menos de 42.5 segundos de TTP.
- b) Que la imprecisión intralote, juzgada por el CV, fuera la menor posible.
- c) Que los costos fueran lo más bajo posible.

Los valores normales ( < 42.5 seg. de TTP) se concentran en las cuatro casillas en que cruzan las cefalinas de 4 y 2% con las mezclas A y B: la imprecisión es de 3.6% en 3 de estas 4 casillas. La menor imprecisión (3.1 y 3.2%) ocurre en las dos casillas superiores derechas, pero los TTP son anormalmente largos por lo que fueron descartadas.

Consecuentemente se seleccionó la combinación de 4% de cefalina con un punto intermedio entre las mezclas A y B, o sea, que el reactivo de trabajo se prepara con 1.5 mL de cefalina más 1.0 mL de caolín, ambas al 4%.

La segunda fase de la evaluación, una vez estandarizada la cefalina INNSZ, fue la comparación con una cefalina comercial (Lafón 132) en plasma de la rutina. En esta etapa se evaluó lo siguiente:

1. Precisión intralote.
2. Correlación inter-cefalinas.
3. Frecuencia de incongruencias inter-cefalinas.
4. Estabilidad a largo plazo. Como complemento, se hizo una comparación inter-cefalinas en el programa interno de control de calidad de TTP durante la época en que se compararon las cefalinas con objeto de establecer la precisión interlotes y la estabilidad a largo plazo de la cefalina INNSZ.

Las evaluaciones se llevaron a cabo haciendo determinaciones duplicadas simultáneas de TTP con la cefalina comercial y con la cefalina INNSZ durante cinco periodos (marzo a julio de 1983) en un total de 661 plasmas de la rutina. El número de periodos se alargó debido a que, para comprobar los resultados obtenidos en el primer periodo (marzo) y ya que se contaba con suficiente cantidad del reactivo comercial, se decidió realizar un segundo periodo de comparación (abril) el cual no mostró concordancia de resultados con el primero. Por ello se hizo una tercera comparación (mayo) en la cual se obtuvieron resultados que discrepaban con los periodos anteriores. Esta variabilidad de resultados llevó a prolongar los periodos de evaluación a cinco. A continuación se dan y discuten los resultados de estos cinco periodos de evaluación.

En la tabla 2.1 se muestra la precisión intralote global de la cefalina INNSZ y de la cefalina comercial, obtenida en los cinco periodos, al hacer determinaciones duplicadas de cada plasma. Como se puede observar, la precisión

intralote que se obtuvo con la cefalina INNSZ fue mejor que la que se obtuvo con la cefalina comercial a cualquier nivel de TTP.

En la tabla 2.2 se dan los coeficientes de correlación y los parámetros de las rectas de regresión que se obtuvieron en los cinco periodos de evaluación. Para calcular estos datos se excluyeron los plasmas con TTP mayor de 150 segundos. De los datos de la tabla 2.2 se puede concluir que, en los periodos de marzo y mayo, la correlación inter-tromboplastinas fue mala, pero en los periodos de abril, junio y julio se obtuvieron correlaciones inter-cefalinas aceptables ya que el coeficiente de correlación y la pendiente e intercepto de la recta de regresión se aproximaron a los valores ideales (1, 1 y 0 respectivamente), sobre todo en abril. El intercepto en abril, junio y julio fue superior a cero, lo que obedecía a que los valores de TTP con la cefalina INNSZ eran superiores a los obtenidos con la cefalina comercial. Por ello se fijó el límite superior normal de la cefalina INNSZ en 45 segundos para evaluar las incongruencias inter-cefalinas.

El número de incongruencias entre ambos reactivos fue distinto en los cinco periodos de evaluación (tabla 2.3), lo cual no es sino un reflejo de la variabilidad de la correlación inter-cefalinas en los cinco periodos: como era esperable, el más bajo porcentaje de incongruencias entre ambos reactivos se obtuvo en los periodos con mejor correlación inter-cefalinas (abril, junio y julio), y las más altas incongruencias en los de mala correlación inter-cefalinas (marzo y mayo). Los intentos por establecer las posibles causas que explicaran las discrepancias inter-periodos fueron infructuosos.

Para complementar los estudios se observó la estabilidad de la cefalina INNSZ a largo plazo, para lo cual se analizaron los datos obtenidos en el control

de calidad interno durante la época de las evaluaciones. El control de calidad interno se llevó a cabo haciendo determinaciones duplicadas de TTP, con ambas cefalinas, utilizando como sustrato PCC (gráfica 2.1 y 2.2). La tabla 2.4 muestra el promedio de TTP y CV% obtenidos con la cefalina INNSZ y con la cefalina comercial usando PCC como sustrato durante los meses de marzo a julio de 1983; aquí se confirma que la cefalina INNSZ tiene mejor precisión intralote que la cefalina comercial en el PCC, pero la precisión interlote fue similar con ambos reactivos. No apareció fenómeno de inestabilidad en las cefalinas.

La tabla 2.5 muestra el promedio de TTP y el CV% obtenidos por Sibley y Col. (93) con seis diferentes cefalinas. Se observa que a pesar de que en este estudio se utilizó un mismo plasma normal liofilizado los promedios de TTP que se obtuvieron varía de un reactivo a otro, siendo de 33.0 seg el menor y de 49.1 el mayor. La precisión tanto intra como inter-lote de la cefalina INNSZ son semejantes a las obtenidas por Sibley con dos de las cefalinas que utilizó: una casera y una comercial (las de menor precisión inter e intralote en su estudio). Por otro lado la imprecisión de la cefalina comercial utilizada en el presente trabajo fue mayor que la obtenida tanto con la cefalina INNSZ como la obtenida con las cefalinas evaluadas por Sibley.

De lo anterior se puede concluir que si bien la cefalina INNSZ no es comparable con los reactivos de mejor precisión utilizados por Sibley, sí tiene una precisión semejante a la obtenida con una cefalina casera y una comercial, creemos que se puede substituir por la comercial local con una mejoría en la precisión.

T A B L A 2.1

PRECISION INTRALOTE DE TTP\*

NIVEL TTP	LAFON		INNSZ	
	N	CV%	N	CV%
42.5	532	7.3	459	5.5
42.5-49.9	68	7.3	75	4.5
50.0-74.9	40	5.3	88	5.2
75.0-99.9	6	25.0	17	9.9
100.0-149.9	7	16.8	14	8.4
<b>G L O B A L</b>	<b>653</b>	<b>7.7</b>	<b>653</b>	<b>5.5</b>

\* Excluidos 8 plasmas con TTP arriba de 150 segs.

T A B L A 2.2

CORRELACION Y PARAMETROS DE LAS RECTAS DE REGRESION  
(X=TTP COMERCIAL; Y=TTP INNSZ)  
EN LOS CINCO PERIODOS DE 1983

PERIODO	N	COEFICIENTE DE CORRELACION.	RECTA DE REGRESION	
			PENDIENTE	INTERCEPTO
MARZO	92	0.97	1.4	-7
ABRIL	118*	0.92	0.9	5
MAYO	105**	0.68	0.6	-40
JUNIO	118***	0.88	1.0	3
JULIO	220***	0.79	0.9	5

\* Cada asterisco representa un caso en que tanto INNSZ como comercial dieron más de 150 seg. de TTP, y que se excluyeron del análisis estadístico.

T A B L A 2.3

FRECUENCIA DE CONGRUENCIAS E INCONGRUENCIAS DE LOS REACTIVOS  
INNSZ Y COMERCIAL EN EL TTP DE LOS PLASMAS DE LA RUTINA  
DURANTE 5 PERIODOS DE 1983

PERIODO	TOTAL	CONGRUENCIAS		INNSZ ANORMAL *	COMERCIAL ANORMAL**	INCONGRUENCIAS
		N/N	A/A			
MARZO	92	35	35	20	2	24%
ABRIL	119	93	19	5	2	6%
MAYO	107	61	26	14	6	19%
JUNIO	120	93	15	11	1	10%
JULIO	223	187	25	8	3	5%
<b>TOTAL</b>	<b>661</b>	<b>469</b>	<b>120</b>	<b>58</b>	<b>14</b>	

\* TTP mayor de 45 segundos.

\*\* TTP mayor de 42.5 segundos.

T A B L A 2.4

PRECISION INTERLOTE E INTRALOTE DE TTP EN PCC

CEFALINA	PERIODO	N	X	INTRALOTE CV%	INTERLOTE CV%
INNSZ	MARZO-JUNIO	81	41.4	4.9	8.6
COMERCIAL	MARZO-JUNIO	96	38.8	8.2	8.2

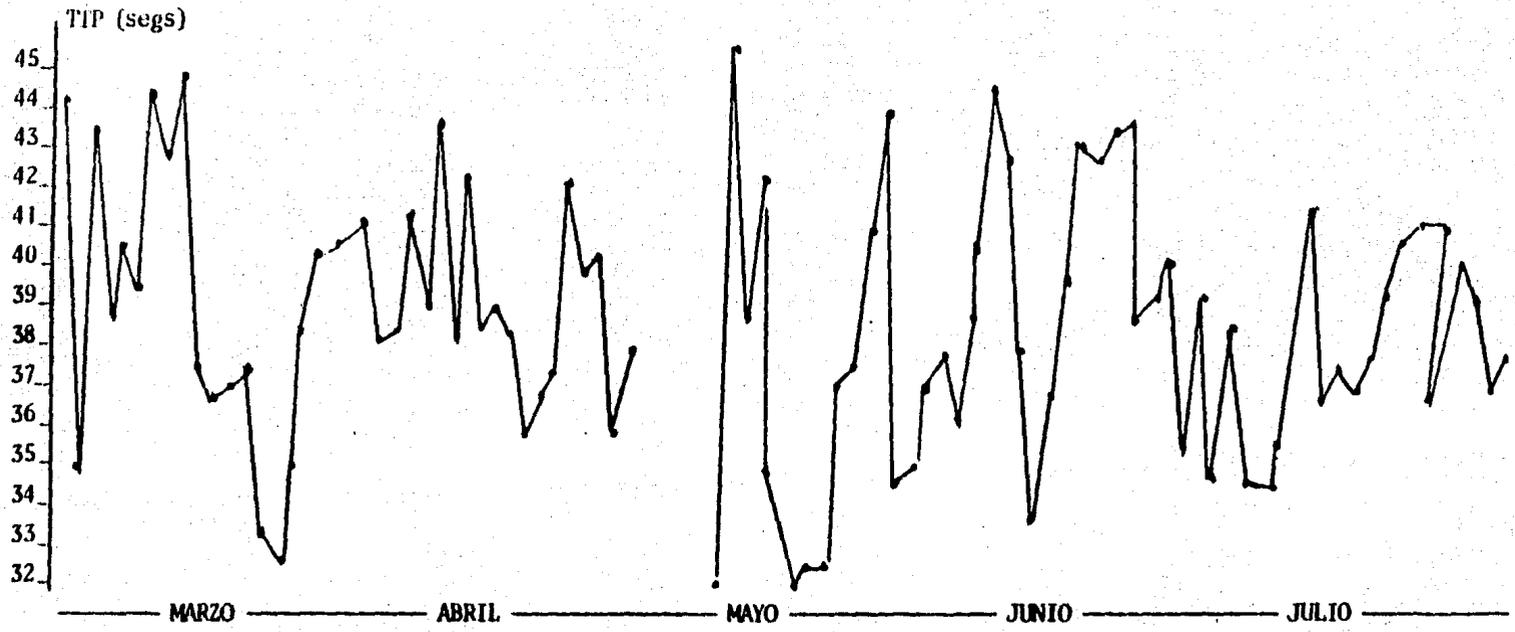
T A B L A 2.5

	NOMBRE COMERCIAL DE LA CEFALINA	N	$\bar{x}$	CV% INTRALOTE	CV% INTERLOTE
ESTUDIO DE SIBLEY Y COL <sup>+</sup>  SUBSTRATO = UN MISMO PLASMA NORMAL LIOFILIZADO	FIBROLET	5	33.0	1.0	1.2
	THROMBOFAX	5	35.9	4.0	4.1
	HYLAND	5	35.7	3.0	4.2
	PLATELIN	5	49.1	2.7	4.3
	ACTIVATED CEFHALOPLASTIN	5	39.2	5.1	5.1
	CEFALINA CASERA	5	38.8	5.1	5.1
ESTE ESTUDIO SUBSTRATO = PCC	INNSZ	5*	41.1	5.1 (2.6-8.2)	5.4 (2.3-8.0)
	CEFALINA COMERCIAL	5*	38.8	8.3 (4.2-11.7)	6.2 (3.0-10.1)

+ La media se obtuvo de 5 días de prueba.

\* Promedio de 14 semanas de 5 datos. Entre paréntesis se da la horquilla del CV% durante las 14 semanas.





GRAFICA 2.2. Control de calidad interno de TTP con la cefalina comercial utilizando como substrato PCC.

## CONCLUSIONES

Quando se utiliza PCC, o bien, plasmas de la rutina como sustrato, la precisión intralote obtenida con la cefalina INNSZ (5.5% de CV) fue mejor que la obtenida con la cefalina comercial (7.7% de CV). La precisión obtenida con la cefalina INNSZ (5.36% de CV) fue superior a la obtenida con la cefalina comercial (6.68% de CV).

En los periodos (abril, junio y julio), de los 5 periodos de comparación, se obtuvo una correlación inter-cefalina aceptable: el número de incongruencias normal/anormal entre ambos reactivos en plasmas de enfermos en estos tres periodos fue bajo (10% de incongruencias). Pero no encontramos explicación para la mala comparatividad de los reactivos en los otros 2 periodos intercalados (marzo y mayo).

Los datos del control de calidad interno indican que la cefalina INNSZ, sin diluir y almacenada en tubos de ensayo tapados con "parafilm", es estable cuando menos 5 meses, y se puede congelar y descongelar aproximadamente 10 veces sin que pierda actividad.

Se concluye que, aunque los dos reactivos no tienen un comportamiento uniforme a lo largo del tiempo, la cefalina INNSZ es superior a la comercial en lo que concierne a una mejor precisión inter e intralote.

BIBLIOGRAFIA

1. Morawitz P:  
Die chemie der blutgerinnung.  
Ergeb Physiol 4:307, 1905.
  
2. Mellanby J:  
Thrombase-its preparation and properties.  
Proc Roy Soc London Ser B 113:93, 1933.
  
3. Howell WH:  
The nature and action of sustances of tissue.  
Am J Physiol 31:1, 1912-1913.
  
4. Macfarlane MG:  
An enzyme cascade in the blood clotting mechanism  
and its function as a biochemical amplifier.  
Nature 202:498, 1964.
  
5. Davie EW, Ratnoff OD:  
Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.  
Science 145:1310, 1964.
  
6. Harker AL:  
Coagulation.  
In Hemostasis Manual  
F.A. Davis Company, Philadelphia, PA., pp. 19, 1974.

7. Davie EW, Fujikawa K:  
Basic mechanisms in blood coagulation.  
Ann Rev Biochem 44:799, 1975.
8. Esnouf MP:  
Biochemistry of blood coagulation.  
Brit Med Bull 33:213, 1977.
9. Zwall RFA:  
Membrane and lipid involvement in blood coagulation.  
Biochim Biophys Acta 515:163, 1978.
10. Bangham A.D:  
A correlation between surface charge and coagulant  
action of phospholipids.  
Nature 192:1197, 1961.
11. Wallach DFH, Maurice PA, Steele MB, Surgenor DM:  
Studies on the relationship between colloidal state  
and clot promoting activity of pure phosphatidylethan-  
olamine.  
J Biol Chem 234:2829, 1959.
12. Suttie JW, Jackson CM:  
Prothrombin structure, activation and biosynthesis.  
Physiol Rev 57:1, 1977.
13. Daemen FJM, Van Arkel C, Hart HCH, Vander Drecht C,  
van Deenen LLM:  
Activity of synthetic phospholipids in blood  
coagulation.  
Thromb Diath Haemorrh 13:194, 1965.

14. Papahadjopoulos D, Hougie C, Hanahan DJ:  
Influence of surface charge of phospholipids  
on their clot promoting activity.  
Proc Soc Exp Biol Med 111:413, 1962.
  
15. Rapaport MM:  
Activation of phospholipid thromboplastin by  
lecithin.  
Nature 178:591, 1956.
  
16. Gisdale PJ, Okany A:  
Phospholipids. II. A correlation of chemical  
structure with thromboplastic activity.  
Can J Biochem 43:1465, 1965.
  
17. Bangham AD:  
A correlation between surface charge and coagulant  
action of phospholipids.  
Nature 192:1197, 1961.
  
18. Janssen UL, Wijngaards, van Leeuwen WH:  
The influence of the surface charge of phospholipids  
on the activity of the prothrombin converting complex.  
Thromb Res 2:525, 1973.
  
19. Wooldridge LC:  
On the chemistry of the blood and other scientific  
papers.  
The croonian lecture on the coagulation of the blood,  
London 1893.

20. Mills CA:  
Chemical nature of tissue coagulins.  
J Biol Chem 46:135, 1921.
  
21. Fischer A, Hecht E:  
Uber die chemische natur des lipoid faktors bei  
der blutgerinnung.  
Biochem 269:115, 1934.
  
22. Folch I:  
Brain cephalin, a mixture of phosphatides, separ-  
ation from it of phosphatidyl serina, phosphatidyl  
ethanolamine and a fraction containing an inositol  
phosphatide.  
J Biol Chem 140:35, 1942.
  
23. Chargaff E, Bendich A, Cohen SS:  
The thromboplastin protein: esturcture, proprieties,  
desintegration.  
J Biol Chem 156:161, 1944.
  
24. Williams WJ:  
The activity of lung microsomes in blood coagulation.  
J Biol Chem 239:933, 1964.
  
25. Williams WJ:  
The activity of human placenta microsomes and brain  
particles in blood coagulation.  
J Biol Chem 241:1840, 1966.

26. Nemerson G:  
Characteristics and lipid requirements of coagulant proteins extracted from lung and brain: the specificity of the protein component of tissue factor.  
Clin Invest 48:422, 1969.
  
27. Nemerson G, Pitlick AF:  
Purification and characterization of the protein component of tissue factor.  
Biochem 9:5100, 1970.
  
28. Bjørklid E, Otnaess AB, Storm E, Prydz H, Johansen BV, Frholm LO:  
Treatment of tissue thromboplastin membranes with phospholipase C.  
Thromb Diath Haemorrh 30:509, 1973.
  
29. Pitlick FA, Nemerson G, Gottlieb AJ, Gordon RG, Williams WJ:  
Peptidase activity associated with the tissue factor of blood coagulation.  
Biochem 10:2650, 1971.
  
30. Nemerson G, Pitlick FA:  
The tissue factor pathway of blood coagulation.  
In Progress in Hemostasis and Thrombosis, ed. T.H. Spaet. Grune and Stratton, New York, N.Y., pp. 1, 1972.

31. Nemerson G:  
Phospholipid requirement of tissue factor in blood coagulation.  
J Clin Invest 47:72, 1968.
  
32. Liu DT, McCoy LE:  
Tissue extract thromboplastin quantitation, fraction and characteritaton of protein components.  
Thromb Res 7:199, 1975.
  
33. Deutsch E, Irsigler K, Lomoschetz H:  
Studen uber gewebthromboplastin I. Reinigung, chemische charakterisierung and trennung in einen liweis-und lipoidantell.  
Thromb Diath Haemorrh 12:12, 1964.
  
34. Hvatum M, Hovig T, Prydz H:  
Studies on tissue thromboplastin-electron micrography.  
Thromb Diath Haemorrh 21:217, 1969.
  
35. Bjørklid E, Storm E:  
Purification and some properties of the protein component of tissue thromboplastin from human brain.  
Biochem J 165:89, 1977.
  
36. Pitlick AF, Nemerson G:  
Binding of the protein component of tissue factor to phospholipids.  
Biochem 9:5105, 1970.

37. Zeldis SM, Nemerson G, Pittlick FA, Lenz TL:  
Tissue factor (thromboplastin): localization  
of plasma membranes by peroxidase conjugated  
antibodies.  
Science 175:766, 1972.
  
38. Owen CA, Bowie EJW, Didisheim P, Thompson JH:  
In the diagnosis of bleeding disorders.  
Little Brown. Boston MA, 1969.
  
39. Cornell CJ, Fein SH, Reilly B, Cornwell GG:  
III. Heparin therapy for heat stroke.  
Ann Int Med 81:702, 1974.
  
40. Dines DE, Linsheid RL, Didier EP:  
Fat embolism syndrome.  
Mayo Clin Proc 47:237, 1972.
  
41. Gierscksky KE:  
The procoagulant activity of adipose tissue.  
Scand J Haematol 19:385, 1977.
  
42. Perchick JS, Winkelstein A, Shaddwik RK:  
Disseminated intravascular coagulation in heat  
stroke. Respose to heparin therapy.  
JAMA 231:480, 1975.
  
43. Goodnight SH, Kenoyer SI, Rapaport MJ, Lie JA,  
Kurse T:  
Defibrination after brain tissue destruction  
serious complication of head injury.  
New Engl J Med 290:1043, 1974.

44. Lerner RG, Goldstein R, Cummings G:  
Stimulation of human leucocyte thromboplastic activity by endotoxin.  
Proc Soc Exp Biol Med 138:145, 1971.
  
45. Rickles FR, Rick PD, Van Why M:  
Structural features of salmonella typhimurium lipopolysaccharide required for activation of tissue factor in human mononuclear cells.  
J Clin Invest 59:1188, 1977.
  
46. Govault-Heilmann M, Chardon E, Sultan C, Josso F:  
The procoagulant factor of leukaemic promyelocytes: demonstration of immunologic cross-reactivity with Human brain tissue factor.  
Br J Haematol 30:151, 1975.
  
47. Pollick A:  
Acute promyelocytic leukemia with disseminated intravascular coagulation.  
Am J Clin Path 56:155, 1961.
  
48. Quigley HS:  
Peripheral leukocytes thromboplastin in promyelocytic leukemia.  
Fed Proc 26:648, 1967.
  
49. Hattler BG, Rocklin RE, Ward PA, Rickles FR:  
Funcional features of lymphocytes recovered from a human renal allograft.  
Cell Immunol 9:289, 1973.

50. Lerner RG, Nelson JC, Corines P, del Guercis LRM:  
Intravascular coagulation complicating peritoneo-  
atrial shunts.  
Blood 50:274, 1977.
  
51. Zackarski LR, Henderson WG, Rickles FR, et al:  
Rationale and experimental design for the VA  
Cooperative study of anticoagulation (warfarin)  
in the treatment of cancer.  
Cancer 44:732, 1979.
  
52. Sakurawa N, Takahashi K, Hoshiyama M, Jimbo C,  
Ashizawa K, Matusuoka M, Yashidisa O:  
Pathologic cells as procoagulant substance of  
disseminated intravascular coagulation syndrome  
in acute promyelocytic leukemia.  
Thromb Res 8:263, 1976.
  
53. Graeber JE, Stuart MJ:  
Spinal fluid procoagulant activity: a sensitive  
indicator of central nervous system damage.  
Lancet 2:285, 1978.
  
54. Suzuki S, Wake N, Yoshiaki K:  
New neonatal problems of blood coagulation and  
fibrinolysis.  
J Perinat Med 4:221, 1976.
  
55. Yaffe H, Eldor A, Hornshtein E, Sadovsky E:  
Thromboplastic activity in amniotic fluid during  
pregnancy.  
Br J Obstret Gyn 50:454, 1977.

56. Winer CP, et al:  
A modified activated partial thromboplastin time  
with the use of amniotic fluid.  
Am J Obstet Gyn 144:734, 1982.
57. Russel F, Doolittle RF, Surgenor DM:  
Blood coagulation in fish.  
Am J Physiol 203:964, 1962.
58. Blomback B:  
Chemical aspects of fibrinogen and fibrin in:  
fibrinogen and fibrin turnover of clotting  
factors.  
Suppl ad Thromb Diath Haemorrh 1963.
59. Mann FD, Hurn M:  
Co-thromboplastin a probable factor in coagula-  
tion blood.  
Amer J Physiol 164:105, 1951.
60. Hecht E:  
Studien über den lipoiden aktivator der  
blutgerinnung.  
Thromb Diath Haemorrh 1:380, 1957.
61. Irsigler K, Lechner K, Deutsch E:  
Studies on tissue thromboplastin  
II. Species specificity.  
Thromb Diath Haemorrh 14:18, 1965.

62. Osterud B, Berre A, Otnaess B, Bjoklid E,  
Prydz H:  
Activation of the coagulation factor VII by  
tissue thromboplastin and calcium.  
Biochem 11:2853, 1972.
63. Nemerson G:  
The reaction between bovine brain tissue factor  
and factors VII and X.  
Biochem 5:601, 1966.
64. Hasegawa H, Nagata H, Murao M:  
Studies on the tissue thromboplastin during the  
coagulation-fibrinolytic process-ultrastructural  
changes.  
Thromb Haemostas 37:541, 1977.
65. Esnouf MP:  
Extrinsic prothrombin activation  
In Human Blood Coagulation, Haemostasis and  
Thrombosis, ed RM Biggs  
Blackwell Scientific Publications,  
London, pp. 54, 1972.
66. Izarn P, Hussey CV, Quick AJ:  
Comparative thromboplastin activity of acetona  
dehidrated in rabbit and human brain.  
Proc Soc Exp Biol & Med 91:193, 1956.
67. Weiss HJ, Eichlberger WJr, Crosby WH:  
Studies on the differences in activity of lung  
and brain thromboplastin.  
J Clin Invest 40:205, 1961.

68. Craig JM:  
Blood coagulation.  
Ann Rev Biochem 49:765, 1980.
  
69. Hecht E, Slotka KH:  
The chemical nature of the lipid activator in  
blood coagulation  
Am J Clin Pathol 37:126, 1962.
  
70. White SG, Lagen JB, Aggeler PM, Geger RP:  
The effect of soybean phosphatides on blood  
coagulation defect following total body X-  
irradiation in the dog.  
Proc Soc Exper Biol & Med 83:384, 1953.
  
71. Bell WN, Alton HG:  
A brain extract as a substitute for platelets  
suspensions in the thromboplastin generation  
tests.  
Nature London 174:880, 1954.
  
72. Robinson DS, Poole JCF:  
The similar effect of chylomicra and ethanol-  
amine phosphatides on the generation of  
thrombin during coagulation.  
J Exper Physiol 41:36, 1956.
  
73. O'Brien JR:  
The similarity of the action of phosphatidyl  
ethanolamine and platelets in blood coagulation.  
J Clin Path 9:37, 1956.

74. Rouser G, White SG, Schloredt D:  
Phospholipid structure and thromboplastic activity I. The phosphatide fraction active in recalcified normal human plasma.  
Biochem et Biophys Acta 28:71, 1958.
75. Marcus AJ, Spaet TH:  
Platelet phosphatides: their separation, identification and clotting activity.  
J Clin Invest 37:1836, 1958.
76. Barkhan P, Silver MJ, DaCosta PG, Tocantis LM:  
Phosphatidylserine and blood coagulation.  
Nature London 182:1031, 1958.
77. Therriault D, Nichols T, Jensen H:  
Purification and identification of brain phospholipids associated with thromboplastic activity.  
J Biol Chem 233:1061, 1958.
78. Troup SB, Reed CF, Marinetti GV, Swisher SN:  
Thromboplastic factors in platelets and red blood cells: observations on their chemical nature and function in vitro coagulation.  
J Clin Invest 39:342, 1960.
79. Sixma JJ:  
Platelet coagulant activities.  
Thromb Hemostas 40:163, 1978.

80. Walsh PN:  
The effects of collagen and kaolin on the  
intrinsic coagulant activity of platelets.  
Br J Haematol 22:393, 1972.
81. Walsh PN, Biggs R:  
The role of platelets in intrinsic factor  
Xa formation.  
Br J Haematol 22:743, 1972.
82. Osterud B, Rapaport SI, Lavine KK:  
Factor V activity of platelets: evidence for  
an activated factor V molecule and for plate-  
lets activator.  
Blood 49:819, 1977.
83. Walsh PN:  
The effect of dilution of plasma on coagulation:  
the significance of the dilution-activation  
phenomenon for the study of platelets coagulant  
activities.  
Br J Haematol 22:219, 1972.
84. Walsh PN:  
The role of platelets in the contact phase of  
blood coagulation.  
Br J Haematol 22:392, 1972.
85. Vecchione J, Zucker MB:  
Procoagulant activity of platelets in recalcified  
plasma  
Br J Haematol 31:423, 1975.

86. Walsh PN, Lipscomb MS:  
Comparison of the coagulant activities of platelets  
and phospholipids.  
Br J Haematol 33:9, 1976.
  
87. Barrowcliffe TW, Gray E:  
Studies of phospholipid reagents used in coagulation.  
I. Some general properties and their sensitivity to  
factor VIII.  
Thromb Haemostas 46:629, 1981.
  
88. Barrowcliffe TW, Gray E:  
Factors affecting the sensitivity to heparin.  
Thromb Haemostas 46:634, 1981.
  
89. Poller L, Thomson JM:  
The partial thromboplastin (cephalin) time test.  
J Clin Pathol 25:1038, 1972.
  
90. Hathaway WE, Essmus SL, Montgomery RR, Dubansky AS:  
Activated partial thromboplastin time and minor  
coagulopathies.  
Amer J Clin Pahtol 71:22, 1979.
  
91. Poller L, Thomson JM, Palmer MK:  
Measuring partial thromboplastin time. An interna-  
tional collaborative study.  
Lancet 1:842, 1976.
  
92. Barrowcliffe TW, Gutteridge JMC, Dormandy TL:  
The effect of fatty acid autoxidation products  
on blood coagulation.  
Thromb Diathes Haemorrh 33:271, 1975.

93. Sibley C, Singer JW, Ross J:  
Comparison of activated partial thromboplastin  
reagents.  
Am J Clin Pathol 59:581, 1973.