



12
21

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"

VALOR PRONOSTICO DE LAS ALTERACIONES
EN LAS PRUEBAS DE LA TERCERA FASE DE LA
COAGULACION EN LOS PACIENTES SEPTICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A ;
ROSA MARIA DIEGUEZ SUAREZ

Director de Tesis
Dr. José González Llaven

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

ABREVIATURAS	1
I.- INTRODUCCION	2
II.- GENERALIDADES	3
II.1.- MECANISMO FIBRINOLITICO	9
II.2.- INHIBIDORES NATURALES DE PROTEASAS	9
III.- OBJETIVOS	12
IV.- HIPOTESIS	12
V.- MATERIAL Y METODOS	13
VI.- RESULTADOS	49
VI.1.- TABLAS DE RESULTADOS	53
VI.2.- GRAFICAS DE RESULTADOS	62
VII.- DISCUSION	67
VIII.- CONCLUSIONES	75
IX.- BIBLIOGRAFIA	76

ABREVIATURAS

Absorbancia	Abs.
Acido épsilon amino caproico	EACA.
Adenosindifosfato	ADP.
Antitrombina-III	AT-III.
∞_2 -Antiplasmina	∞_2 -AP.
∞_1 -Antitripsina	∞_1 -AT.
∞_2 -Macroglobulina	∞_2 -macro
Centro Médico La Raza	GMR.
Decilitro	dl.
Factor 3 plaquetario	F ₃ P.
Factor V coagulable	F.V:C
Factor VIII coagulable	F.VIII:C
Factor VIII relacionado al antígeno	F.VIII R: Ag
Femenino	F.
Fibrinopéptido A	F _D A.
Fosfolípidos	PL.
Inhibidor Cl	Inh. Cl
Inhibidor de la proteína C	Inh. PC.
Masculino	M.
Microgramos por mililitro	μ g/ml.
Miligramos	mg.
Milímetros cúbicos	mm ³ .
Molar	M.
Nanómetros	nm.
Plasma normal	P.N.
Productos de fragmentación	
-Fibrina-Fibrinógeno-	PFF.
Revoluciones por minuto	rpm.
Solución salina	S.S.
Trombomodulina	TM.
Unidades por mililitro	U/ml.

I
INTRODUCCION.

Se ha observado que en pacientes con sepsis grave, se presentan diversas alteraciones hemostáticas que tienen expresión clínica y de laboratorio. Una de ellas la coagulación intravascular diseminada se asocia en el 30% de los casos con la muerte del enfermo. Las pruebas de laboratorio que se encuentran generalmente alteradas son las siguientes:

- 1.- Alargamiento en los tiempos de coagulación: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPa), Tiempo de Protrombina (TP), Tiempo de Trombina (TT).
- 2.- Determinación de un fibrinógeno bajo.
- 3.- La cuenta de plaquetas está disminuida.

Sin embargo, se ha encontrado un grupo de pacientes con alteraciones diferentes a las anteriores cuyo dato común, es la observación de un acortamiento progresivo en el tiempo de trombina con una falta de respuesta al tratamiento con heparina y terapia de sustitución (plasma, crioprecipitados, etc.). Este trabajo se hizo con el objeto de aclarar la posible causa del acortamiento del tiempo de trombina, así como establecer si tiene un valor pronóstico en los pacientes con sepsis, el cual cuando está por debajo de tres segundos respecto a su testigo, precede generalmente a la muerte del enfermo.

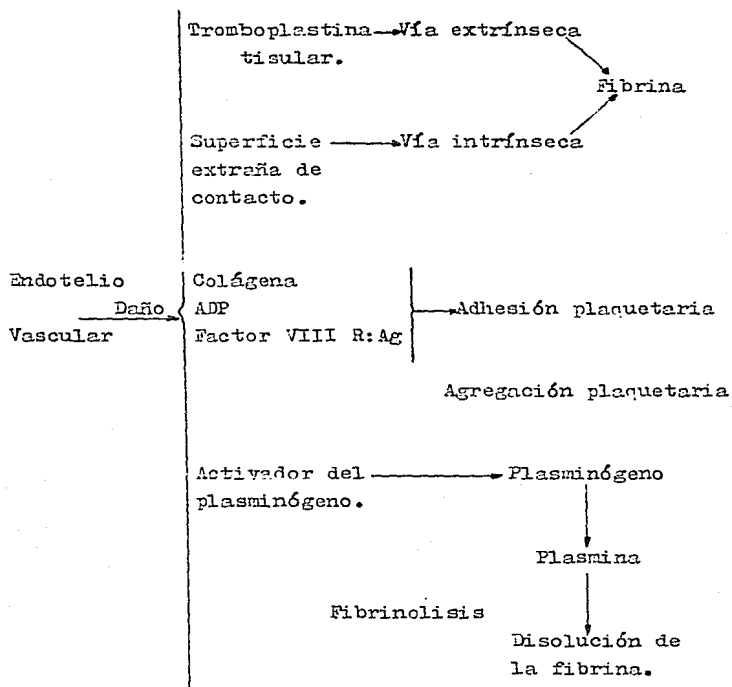
II GENERALIDADES

La hemostasia es el mecanismo biológico encargado de la -
detención de un sangrado. En él se encuentran implicados prin-
cipalmente cuatro sistemas:

- a) Vascular
- b) Placuetario
- c) Coagulación
- d) Fibrinolisis

Al haber un daño en el endotelio vascular, se exponen subs-
tancias que inician una serie de acontecimientos cuya finali-
dad es la formación de un trombo plaquetario y posteriormente
la consolidación de él, al formarse una malla de fibrina a su
alrededor. Este trombo plaquetario es formado gracias a que -
las plaquetas son activadas por compuestos secretados por el
endotelio, adheriéndose y agregándose a la superficie dañada;
al mismo tiempo, el tejido vascular expone y secreta ciertos-
compuestos que inician las reacciones enzimáticas de la llama-
da cascada de la coagulación, que culminan con la formación -
de la malla de fibrina alrededor del trombo plaquetario. El
endotelio vascular activa también el sistema de la fibrinoli-
sis, el cual regula el crecimiento del trombo y es el encarga-
do de disolverlo por medio de una serín proteasa la plasmina.
Evitando de esta manera la oclusión del vaso y por lo tanto -
un evento trombótico.

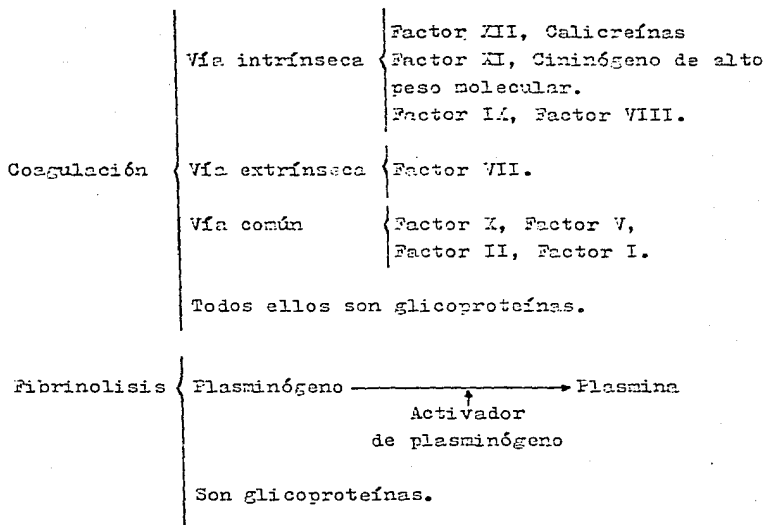
En el siguiente esquema se resume éste evento:



En la actualidad se han determinado la mayoría de los factores vasculares, plaquetarios y plasmáticos involucrados en el mecanismo hemostático.

En las siguientes tablas se enlistan los componentes principales de cada sistema:

Vascular	{	Tromboplastina tisular
		Superficie con cargas negativas
		Colágena
		Prostaciclina
		ADP
		Factor VIII R:Ag
		Activador tisular del plasminógeno
Plaquetario	{	Receptores específicos de membrana (son glicoproteínas)
		Tromboxano A ₂ (principal inductor de agregación)
		Gránulos α { Factor VIII R:Ag
		{ Factor 4 plaquetario
		{ Beta-Tromboglobulina
		Gránulos densos { ADP
		{ Serotonina
		Factor 3 plaquetario.



La pared vascular está estrechamente relacionada con el proceso de hemostasis, por contener mecanismos de activación tanto del sistema de la coagulación como del de la fibrinolisis (1).

Se sabe que al surgir una ruptura en la capa endotelial de los vasos sanguíneos se inicia una reacción de factores cuya finalidad es la formación de una malla de fibrina. Este proceso se puede llevar a cabo por dos vías, siendo estas la intrínseca y la extrínseca. Aunque " in vivo " no es posible que exista una división en el mecanismo intrínseco de la coagulación por el hecho de que consta de una serie de reacciones muy relacionadas entre sí, en donde la activación de un factor ocasionará la del siguiente, con fines metodológicos -

" in vitro " y didácticos, prevalece la división en vía in --
trínseca y extrínseca.

La vía intrínseca tiene tres fases:

- 1.- La activación de contacto, que es realizada por los -
Factores XII, XI, precalicreínas y cininógenos de alto p_g
so molecular.
- 2.- La generación de trombina.
- 3.- La formación de fibrina.

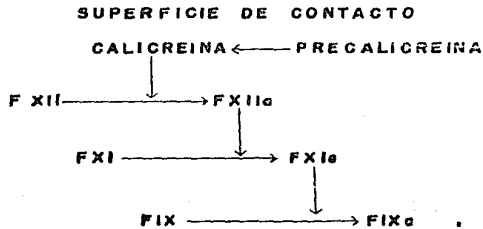
Después de la activación de contacto, el factor XIIa acti
va al factor XI a XIa, el cual activa al factor IX en IXa enzi
ma procoagulante, la cual propaga la vía intrínseca. Posteri
ormente se forma un complejo de factores IXa y VIIIa con --
fosfolípidos plaquetarios (F_2F), Ca^{2+} que convierten el fac--
tor X en Xa que tiene actividad de protrombinasa, y cuya velo
cidad de reacción sobre la protrombina (Factor II) se acelera
por la presencia de factor Va y fosfolípidos de plaquetas pa
ra formar la trombina la cual produce la fragmentación del --
fibrinógeno (fibrinopéptidos A y B y el monómero de fibrina).
La polimerización de estos últimos mediada por cargas electros
táticas forman la fibrina soluble en urea y por ello llamada--
inestable. Con la acción de factor XIIIa y calcio se forman -
ligaduras covalentes estables que hacen a la fibrina insolu--
ble en urea.

Por otro lado, el sistema extrínseco es mucho más corto -
que el anterior ya que solamente requiere la activación de --
factor X en Xa por la formación de un complejo entre factor -
VIIa, fosfolípidos tisulares y calcio (2).

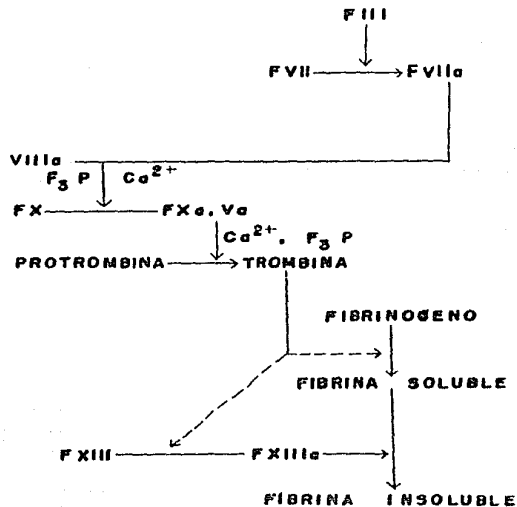
Las dos vías se ilustran en el esquema n. 1 :

COAGULACION

INTRINSECA



EXTRINSECA



Esquema I

II.1

Mecanismo Fibrinolítico

El sistema de la fibrinólisis (esquema n.2) tiene importancia en el proceso hemostático, ya que su principal sustrato es la fibrina intravascular y así impide el crecimiento -- del trombo y favorece la recanalización del vaso. Este sistema involucra la conversión de plasminógeno en plasmina por -- una serie de rupturas peptídicas específicas originadas por -- el activador del plasminógeno.

La plasmina actúa fragmentando la fibrina, el fibrinógeno y también hidroliza otras proteínas del plasma (1,3).

II.2

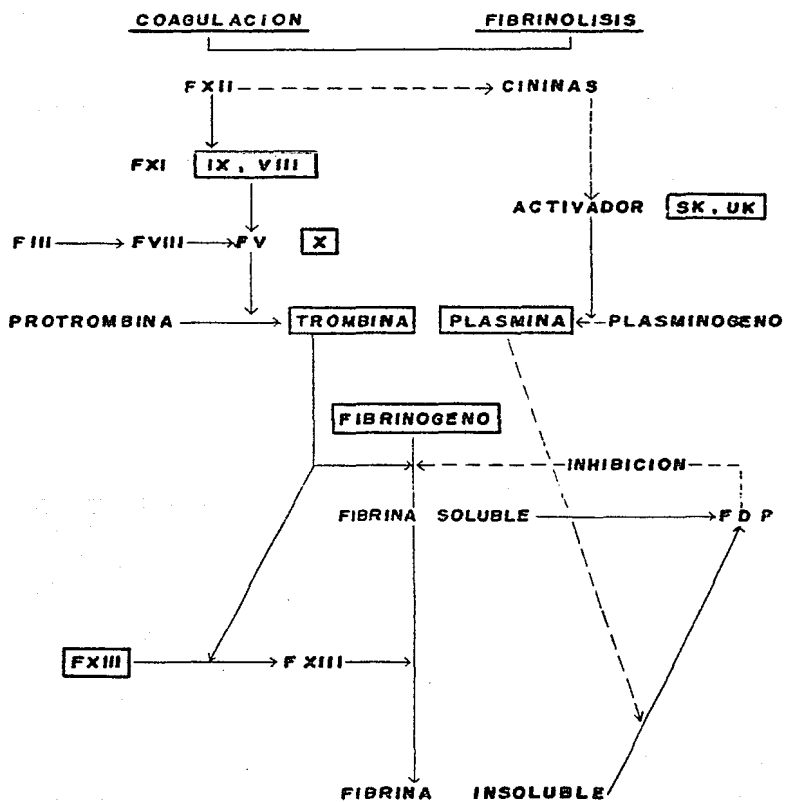
Inhibidores Naturales de Proteasas

Para que exista un balance entre los mecanismos de coagulación y de fibrinólisis, que ayuden a mantener en equilibrio el proceso hemostático existen inhibidores naturales, que son proteínas del plasma que pueden neutralizar o inactivar diferentes proteasas cuyos sustratos son factores activados relacionados con la formación o destrucción de la fibrina (4,5).

En la tabla número 1 son enlistados, agregando su efecto sobre las enzimas de la coagulación.

Existen algunas causas por las que el mecanismo de la coagulación se ve afectado, una de ellas la septicemia, definida como la invasión y multiplicación de microorganismos en la -- sangre, se presenta cuando disminuye notablemente la defensa inmunológica del organismo por la presencia de estos microorganismos, o bien a la falla en el mecanismo de depuración del sistema retículo endotelial, lo que permite que estos microorganismos se multipliquen, trayendo como consecuencia una gran producción de toxinas y marcadas manifestaciones sistémicas -- de infección (6).

FIBRINOLISIS



Esquema 2

Tales productos bacterianos como endotoxinas pueden producir daño endotelial; provocando la activación del factor XII, el cual actúa directamente sobre precalicreína convirtiéndola en la enzima proteolítica activa calicreína, activándose de esta manera el sistema intrínseco de la coagulación (7).

Tabla No. 1

El Efecto de Varios Inhibidores sobre el Sistema de la Coagulación <u>in vitro</u> .						
ENZIMAS	INHIBIDORES					
	AT-III	α_2 -macro	α_1 -AT	Inh.Cl	Inh.PC	α_2 -AP
Trombina	+	+	+	-	-	-
Factor Xa	+	-	-	-	-	-
Factor IXa	+	-	-	-	-	-
Factor VIIa	-	-	-	-	-	-
Factor XIa	+	-	+	+	-	-
Factor XIIa	+	-	-	+	-	-
Calicreína	+	+	+	+	-	-
Proteína Ca	-	-	-	-	+	-
Plasmina	+	+	+	-	-	+

III OBJETIVOS.

- 1) Conocer las causas del acortamiento de los tiempos de trombina en los pacientes sépticos.
- 2) Determinar si los tiempos de trombina cortos tienen valor pronóstico en los pacientes con sepsis.

IV HIPOTESIS.

Los tiempos de trombina cortos observados en la fase final de pacientes sépticos pueden deberse a diferentes factores:

- 1) A anomalías estructurales de fibrinógeno
- 2) A alteraciones en la interacción trombina inhibidor, ya sea porque se encuentren niveles plasmáticos bajos de los inhibidores naturales de la antitrombina III o bien que estos inhibidores presenten defectos funcionales que limiten su interacción con el sustrato.
- 3) Otros factores, independientes de los mencionados pueden ser la causa del acortamiento en el tiempo de trombina como son, las alteraciones metabólicas que presentan estos enfermos (variaciones en la concentración de calcio plasmático, pH, etc.).

V
MATERIAL Y METODOS

V.1 Material

V.1.a. Biológico

20 pacientes sépticos (infección generalizada) hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos y en Hematología del Hospital de Especialidades en el Centro Médico La Raza.

A cada uno de ellos se les llevó un control de los siguientes datos:

- Edad
- Sexo
- Tipo de padecimiento
- Terapia sustitutiva (crioprecipitados, plasma fresco, etc.)

A cada paciente después de confirmada la infección por datos clínicos y pruebas de laboratorio, se les tomó diariamente por punción venosa 7 mililitros de sangre que fué distribuida en dos trombotubos de 2.5 ml. cada uno, los cuales contenían citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante que fué adicionado en una proporción de 9 partes de sangre por una parte de anticoagulante. Los 2 ml. restantes de sangre, fueron adicionados a un tubo especial del equipo "Fibrotec" para la determinación de productos de fragmentación de fibrina-fibrinógeno.

En el momento en el que se identificaron en el laboratorio los tiempos de trombina acortados, se le tomó al paciente un volumen de 100 ml. de sangre con la finalidad de realizar las pruebas de coagulación complementarias a las basales que se mencionarán posteriormente.

V.2 Métodos

A todos los pacientes se les practicó diariamente las siguientes pruebas de coagulación de acuerdo con las referencias que se señalan entre paréntesis:

- 1.- TTPa (Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada) (8).
- 2.- TP (Tiempo de Protrombina) (8).
- 3.- TT (Tiempo de Trombina) (8).
- 4.- Fibrinógeno por técnica de Claus (8).
- 5.- Productos de fragmentación fibrina-fibrinógeno (9).

Aquellos pacientes con TT cortos a 15 segundos o menos, - con acortamientos progresivos, para descartar posibles anomalías en la molécula de fibrinógeno se realizaron pruebas - tales como:

- a) Fibrinógeno por Termoprecipitación (10).
- b) Fibrinógeno por Inmunodifusión Radial Simple (11).
- c) Agregación de monómeros de fibrina con trombina (12).
- d) Purificación de fibrinógeno (13) para realizar:
 - Prueba de coagulación (14).
 - Agregación de monómeros de fibrina con trombina.

Por otra parte para demostrar que existen o no alteraciones en la concentración o funcionalidad de los inhibidores de la trombina se llevaron a cabo:

- A) Métodos cromogénicos (funcionalidad) (15) para:
 - Antitrombina III
 - α_2 -Antiplasmina rápida.
- B) Métodos inmunológicos (Inmunodifusión Radial Simple)
 - Antitrombina III
 - α_1 -Antitripsina
 - α_2 -Macroglobulina

También se determinó plasminógeno por las dos técnicas -- anteriores.

Existen otros factores independientes de los mencionados que pudieran ser la causa del acortamiento en el tiempo de -- trombina, tales como variaciones en la concentración calcio, -- pH, etc. por lo que para descartar esta posibilidad se tom-- ron en cuenta los resultados obtenidos en las siguientes prue-- bas de laboratorio:

- Electrolitos incluyendo la determinación de calcio y -- calcio iónico.
 - Gasometría (como valor de pH).
 - Depuración de creatinina.
- Datos complementarios como:
- Biometría hemática completa.
 - Pruebas de funcionamiento hepático.

TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (TTPa)

Principio

En la sangre, el calcio es enlazado por el anticoagulante lo que impide la coagulación. Después de centrifugación el plasma contiene todos los factores intrínsecos de la coagulación excepto calcio y plaquetas. Se añade entonces al plasma calcio, un sustituto fosfolipídico de las plaquetas (la tromboplastina parcial) y caolin (activador de contacto) activándose la vía intrínseca de la coagulación dando por resultado la formación de un coágulo.

Material

- 1.- Baño maria a 37°C.
- 2.- Tubos de 12 x 75 mm.
- 3.- Cronómetro.
- 4.- Pipetas de vidrio graduadas de 0.1, 1.0 ml.
- 5.- Centrifuga Damon/IEC Division.

Reactivos

- 1.- CaCl_2 0.025 M
- 2.- Patromthin
- 3.- Plasma testigo normal.
- 4.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.

Método

- 1.- La sangre obtenida en relación 1/10 con citrato de sodio; se centrifuga a 2500 rpm. durante 10 min.
- 2.- Separar el plasma en tubos de plástico, conservar en baño hielo-agua o bien en el refrigerador.
- 3.- Se incuba una cantidad suficiente de CaCl_2 0.025 M a 37°C.
- 4.- Se mezcla a partes iguales la suspensión de caolin --

con el patromthin (tromboplastina parcial). Esta mezcla se -- mantiene en hielo.

5.- Se pipetea 0.1 ml. de plasma testigo normal (o plasma problema) en un tubo de 12 x 75 mm.

6.- Se mezcla bién la suspensión del paso 4 y se pipetea inmediatamente 0.1 ml. de esta mezcla dentro del tubo 5.

7.- Se mezcla con rapidéz el contenido del tubo y se coloca en el baño maria a 37°C. durante 2 min.

8.- Después se añade en el tubo 0.1 ml. de CaCl_2 precalentado y se pone en marcha el cronómetro.

9.- Se mezcla y se deja en el baño, después de 30 seg. se saca el tubo del baño y se observa la formación del coágulo. Momento en el que se detendrá el cronómetro.

10.- Deben efectuarse por duplicado con un margen de variación de ± 1.5 seg. Si después de 2 min. no se observa formación del coágulo puede detenerse la prueba.

11.- Valor Normal: 25 - 46 seg.

TIEMPO DE PROTROMBINA (TF)

Principio

En la sangre, el calcio es enlazado por el citrato o el oxalato sódico, lo que impide la coagulación. La tromboplastina tisular, a la cual se ha añadido calcio se mezcla con el plasma, se activa la vía extrínseca de la coagulación, llevando a la formación del coágulo. Se mide el tiempo de coagulación.

Material

- 1.- Baño maria a 37°C.
- 2.- Baño hielo-agua.
- 3.- Tubos de 12 x 75 mm.
- 4.- Cronómetro.
- 5.- Pipetas de vidrio graduadas de 0.1, 0.2 y 1.0 ml.

Reactivos

- 1.- Plasma testigo normal.
- 2.- CaCl_2 0.025 M
- 3.- Tromboplastina Tromborel
- 4.- NaCl 0.85%

Método

- 1.- Se centrifuga la sangre no coagulada a 2500 rpm. lo más rápidamente posible después de la extracción.
- 2.- Se extrae el plasma y se coloca en el refrigerador o bien en baño hielo-agua.
- 3.- Se pipetea 0.2 ml. de la mezcla de tromboplastina calcio en cada uno de los tubos necesarios y se colocan estos en baño maria durante 1 min. como mínimo. hasta que alcancen la temperatura de 37°C. El tiempo de incubación no es crítico -- una vez que se ha obtenido la temperatura deseada.

4.- Se incuba 0.1 ml. de plasma durante 2 ó 3 min. aprox. hasta que alcance los 37°C. despues de lo cual no debe dejarse en el baño maria durante más de 3 min.

5.- Se pipetea enérgicamente 0.2 ml. de la mezcla de tromboplastina y calcio preincubada 7 min. a 37°C. y se pone en marcha el cronómetro.

6.- Se mezcla el contenido del tubo, si esta operación se hace por agitación manual, se extrae el tubo del baño maria - se seca la parte exterior y se agita suavemente hasta que se forme el coágulo, momento en el cual se detendrá el cronómetro.

7.- Cada prueba debe llevarse a cabo por duplicado, cuando el TP es inferior a 30 seg. ambos resultados deben coincidir con un margen de variación de ± 0.5 seg. Este margen puede aumentar si el TP es superior a 30 seg.

8.- Se calcula la media entre los dos resultados y se anotan los valores del TP , asi como los valores del TP del plasma testigo normal.

9.- Valor Normal: 12 - 15 seg.

TIEMPO DE TROMBINA (TT)

Principio

El TT valora la tercera fase de la coagulación es decir, la transformación de fibrinógeno en fibrina y mide la disponibilidad del fibrinógeno activo.

Material

- 1.- Baño maria a 37°C.
- 2.- Baño de hielo-agua.
- 3.- Tubos de vidrio de 12 x 75 mm.
- 4.- Cronómetro.
- 5.- Pipetas de 1.0 ml graduadas en décimas.
- 6.- Pipetas de 0.2 ml. graduadas en centésimas.
- 7.- Tubos de plástico graduados en 15 ml.

Reactivos

- 1.- Plasma testigo normal.
- 2.- Fibrindex (trombina bovina de 50 U.).
- 3.- Solución salina isotónica.
- 4.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.

Método

- 1.- La sangre obtenida en relación 1/10 con citrato de sodio, es centrifugada a 2500 rpm. durante 10 min.
- 2.- Separar el plasma en tubos de plástico, conservar en hielo-agua.
- 3.- A partir de la solución madre de trombina (50 U/ml)- tomar 0.5 ml. y diluir en 10 ml. de solución salina en un tubo de plástico, estandarizar la trombina de tal manera que se obtenga con un plasma normal tiempos de coagulación entre 18-20 seg.

4.- Ensayar los plasma problema igual que el normal incubando 0.1 ml. de plasma por 60 seg. a 37°C.

5.- Después de incubar, añadir 0.2 ml. de trombina a temperatura ambiente.

6.- Cronometrar e informar en segundos: SEG. Prob/SEG test.

7.- Toda determinación debe hacerse por duplicado.

8.- Interpretación: el tiempo se considera prolongado -- cuando el problema tiene más de 2 seg. que el testigo. Se encuentran tiempos prolongados en pacientes con hipofibrinogemias hereditarias o adquiridas, generalmente cuando el fibrinógeno esta por abajo de 100 mg/dl. También se prolonga por-- acción de antitrombinas (heparina exógena, productos de frag-- mentación de fibrinógeno y fibrina y disfibrinogemias fami-- liares .

9.- Valor Normal: 18 - 20 seg.

FIBRINOGENO (TECNICA DE CLAUSS)

Principio

Se sabe que el tiempo de coagulación del plasma diluido - al adicionar trombina es inversamente proporcional a la concentración del fibrinógeno. Usando este principio Clauss elaboró un ensayo cuantitativo para fibrinógeno. El tiempo de coagulación obtenido se compara con la curva patron previamente preparada con una cantidad de fibrinógeno conocida.

La trombina convierte el fibrinógeno soluble a un polímero insoluble llamado fibrina.

Material

- 1.- Baño maria a 37°C.
- 2.- Baño de hielo-agua.
- 3.- Cronómetro, papel logaritmo.
- 4.- Tubos de vidrio de 12 x75 mm.
- 5.- Pipetas de vidrio graduadas de 0.2, 1.0 y 2.0 ml.

Reactivos

- 1.- Trombina Humana (100 U/ml.) de Multifibren.
- 2.- Amortiguador veronal pH 7.6
- 3.- Standard de fibrinógeno de concentración conocida.
- 4.- Mezcla de plasmas normales.

Método

- 1.- Diluir los plasmas a ensayar 1:10 con amortiguador.
- 2.- Depositar en un tubo de 12 x 75 mm. 0.2 ml. de la mezcla.
- 3.- Incubar por 30 seg y añadir 0.2 ml. de trombina, cronometrar e interpolar en la curva de calibración.

4.- Curva de calibración:

a) preparar diluciones 1:5, 1:10, 1:20 de plasma --- standard de concentración conocida, con amortiguador veronal.

b) Determinar el tiempo de coagulación por duplicado para cada dilución.

5.- Si la concentración de fibrinógeno es muy baja, hacer dilución 1:5.

6.- Si la concentración de fibrinógeno es muy alta, hacer dilución 1:20.

7.- La concentración óptima requerida en la cinética de la reacción se obtiene usando una solución muy concentrada de trombina y diluyendo el plasma, de manera a obtener baja concentración de sustrato. (evitando la interferencia de otros factores).

8.- Valor Normal: 250 - 450 mg/dl.

PRODUCTOS DE FRAGMENTACION DE FIBRINA-FIBRINOGENO
(METODO DE AGLUTINACION DEL STAPHYLOCOCCO)

Principio

El fibrinógeno, monómeros de fibrina y productos de fragmentación "x" y "y", aglutinan ciertas cepas de staphylococcus (D_2^C Newman). Es una reacción específica y sensible que puede ser utilizada para la identificación de monómeros de fibrina y productos de fragmentación "x" y "y" séricos.

Material

- 1.- Tubos de vidrio de 12 x 75 mm.
- 2.- Matríz aforado de 100 ml.
- 3.- Pipetas de 0.1, 0.2, 1.0 y 2.0 ml.
- 4.- Placas con fondo negro para prueba de aglutinación.
- 5.- Aplicadores de madera.

Reactivos

- 1.- Equipo "Fibrotec" (conteniendo):

a) Tubos especiales para la toma de muestra los cuales -- llevan la cantidad apropiada de trombina y aprotinina para un volúmen de 2 ml. de sangre.

b) Suspensión de staphylococco D_2^C Newman coagulasa negativo.

c) Dos controles : positivo (10 μ g/ml.) y negativo.

d) Buffer Tris pH 7.4

Método

- 1.- En los tubos de toma de muestra colocar 2.0 ml. de -- sangre total, incubar 30 min. a 37°C.

- 2.- Centrifugar por 10 min. a 3000 rpm.

3.- El suero obtenido se diluye con amortiguador tris ---
1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.

4.- En una placa para aglutinación depositar 0.05 ml. de
cada dilución y añadir 0.05 ml. de suspensión de staphyloco-
cco, mezclar por 2 min. y leer aglutinación.

5.- La máxima dilución que dé aglutinación se multiplica-
por el factor respectivo de sensibilidad, generalmente impre-
so en el frasco de la suspensión de staphylococco y el valor-
se reporta en $\mu\text{g/ml}$.

6.- Valor Normal: negativo (no aglutinación) o hasta ---
2.4 $\mu\text{g/ml}$.

FIBRINOGENO
(TERMOPRECIPITACION)

Principio

Técnica rápida basada en la precipitación de fibrinógeno por el calentamiento en un capilar de una pequeña cantidad de plasma a 56°C. seguida de centrifugación.

Material

- 1.- Baño maria a 56°C.
- 2.- Tubos capilares de 67 mm.
- 3.- Ocular de microscopio 10x.
- 4.- Microescala de 50 mm.
- 5.- Mechero Bunsen.

Reactivos

- 1.- Plasma problema pobre en plaquetas.
- 2.- Plasma testigo normal.

Método

- 1.- Los capilares de 67 mm. se marcan a 40 mm. y se llenan con el plasma, se cierran al calor por el extremo opuesto al llenado.
- 2.- Centrifugar por 30 seg. para empaclar el plasma a --- 1500 rpm.
- 3.- Cerrar con calor el extremo por donde se hizo el llenado. Introducir el capilar a baño maria a 56°C por 15 min.
- 4.- Centrifugar a 3000 rpm. por 10 min., el fibrinógeno precipitado se empacla en el fondo.
- 5.- Para leer el paquete de fibrinógeno se hace coincidir el cero de la escala con el fondo del tubo.
- 6.- Hacer la lectura con el ocular 10x invertido.

7.- Se mide la lectura del plasma (HP) y la del fibrinógeno precipitado (HF), se obtiene la expresión porcentual de fibrinógeno precipitado y centrifugado al que por analogía con el hematocrito se designó fibrinocrito.

Fórmula:
$$\frac{HF}{HP} \times 100 = \text{fibrinocrito}$$

8.- Para convertir el fibrinocrito a miligramos por 100 mililitros se multiplica por un factor obtenido previamente en nuestras condiciones es de 75.4. El factor es obtenido con concentraciones conocidas de fibrinógeno determinadas por otro método.

9.- Factor: determinar en 20 muestras la cantidad de fibrinógeno por técnica colorimétrica, simultáneamente se determina fibrinocrito en cada muestra, se suman los factores así obtenidos, los resultados de la suma se dividen entre 20 (número de determinaciones realizadas) para obtener el factor de calibración.

INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE

Principio

Cuando un antígeno es colocado en el orificio circular -- practicado en la caja de agar, la cual contiene un anticuerpo específico contra él, difunde en forma radial hasta encontrar su zona de equivalencia. El diámetro del halo de precipitación está en relación directa a su concentración.

Curva de referencia

Preparar el plasma standard como lo indica el instructivo dejar reposar 15 min. para que disuelva el liofilizado . Efectuar las siguientes diluciones con cloruro de sodio 0.85% ; 1:2, 1:4, 1:8.

- a) Cargar por duplicado la muestra sin diluir.
- b) Cargar la muestra diluida 1:2 por duplicado.
- c) Cargar por duplicado la muestra diluida 1:4
- d) Cargar por duplicado la muestra diluida 1:8.
- e) En papel milimétrico graficar en el eje de las ordenadas el diámetro del halo de precipitación fibrinógeno-antifibrinógeno medido en mm. En el eje de las abscisas graficar los valores que muestra el plasma de referencia sin diluir y diluido.

FIBRINOGENO
(INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE)

Material

- 1.- Placas para inmunodifusión radial con antifibrinógeno
- 2.- Micropipetas de 5 lambdas.
- 3.- Regla para medir halo de precipitación.
- 4.- Tubos de 12 x 75 mm.
- 5.- Gradilla.

Reactivos

- 1.- Plasma standard de referencia para fibrinógeno.
- 2.- Cloruro de sodio 0.85%.
- 3.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.
- 4.- Agua destilada.

Método

- 1.- Colocar 5 microlitros de plasma problema en uno de -- los orificios circulares de la caja para inmunodifusión. La cantidad depositada debe ser igual a 5 lambdas.
- 2.- Repetir la operación llenando otro orificio de la plca para inmunodifusión.
- 3.- La lectura se hace a las 48 horas de mantener la caja en un lugar sin vibraciones a temperatura ambiente.
- 4.- Se mide el halo de precipitación con la regla y el valor obtenido en mm. se interpola en la curva de referencia.
- 5.- Se saca un promedio de las dos lecturas y se reporta en mg%.

ANTITROMBINA III
(IMMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE)

Material

- 1.- Placas para inmunodifusión radial con antisuero mono-específico para antitrombina III.
- 2.- Micropipetas de 5 lambdas.
- 3.- Regla para medir halo de precipitación.
- 4.- Tubos de 12 x 75 mm.
- 5.- Pipetas de vidrio graduadas de 1.0 y 2.0 ml.
- 6.- Gradilla.

Reactivos

- 1.- Plasma de referencia standard para antitrombina III.
- 2.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.

Método

- 1.- Depositar por duplicado en las perforaciones de la --placa para inmunodifusión radial, 5 lambdas de la muestra problema y 5 lambdas del plasma de referencia sin diluir.
- 2.- Incubar a temperatura ambiente por 48 horas.
- 3.- Después de la incubación medir el halo de precipitación usando la escala diseñada para dicho fin.
- 4.- El valor del diámetro obtenido se interpola en la curva patron ya trazada para valores conocidos de antitrombina - III.
- 5.- Los valores se reportan en mg %.
- 6.- Valor Normal: 22 - 39 mg.%.

α_1 - ANTITRIPSINA
(INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE)

Material

- 1.- Placa para inmunodifusión radial con anti α_1 -antitripsina.
- 2.- Micropipeta de 5 lmbdas.
- 3.- Regla para medir halo de precipitación.
- 4.- Tubos de 12 x 75 mm.
- 5.- Pipetas de vidrio graduadas de 1.0 y 2.0 ml.
- 6.- Gradilla.

Reactivos

- 1.- Plasma standard de referencia para α_1 -antitripsina.
- 2.- Cloruro de sodio al 0.85 %.
- 3.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.
- 4.- Agua destilada.

Método

- 1.- Depositar en cada una de las perforaciones y por duplicado 5 lmbdas de plasma problema y de referencia sin diluir.
- 2.- Incubar a temperatura ambiente por 48 horas.
- 3.- Después de incubación medir el diámetro de precipitación.
- 4.- El valor del diámetro de precipitación se interpola en la curva trazada para valores conocidos de α_1 -antitripsina.
- 5.- Valor Normal: 190 - 350 mg/dl.

∞_2 - MACROGLOBULINA
(INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE)

Material

- 1.- Placa de inmunodifusión radial para ∞_2 -macroglobulina
- 2.- Micropipeta de 5 lambdas.
- 3.- Regla para medir halo de precipitación.
- 4.- Pipetas de vidrio graduadas de 1.0 y 2.0 ml.
- 5.- Tubos de 12 x 75 mm. y gradilla.

Reactivos

- 1.- Suero de referencia para ∞_2 -macroglobulina.
- 2.- Cloruro de sodio al 0.85 %.
- 3.- Suero problema
- 4.- Agua destilada.

Método

1.- Depositar 5 lambdas de suero problema y control en cada una de las perforaciones de la placa para ∞_2 -macroglobulina.

2.- Si es necesario, hacer diluciones del suero problema y del control con solución de NaCl al 0.85 %.

3.- Tanto el suero sin diluir como las diluciones de este se montan por duplicado.

4.- Las placas se incuban durante 48 horas.

5.- Se mide el halo de precipitación y éste se busca en la tabla de valores que trae el equipo y se reporta en mg %, o bien el halo de precipitación se interpola en la curva trazada para valores conocidos de ∞_2 -macroglobulina.

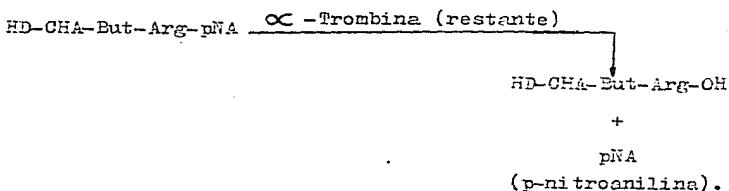
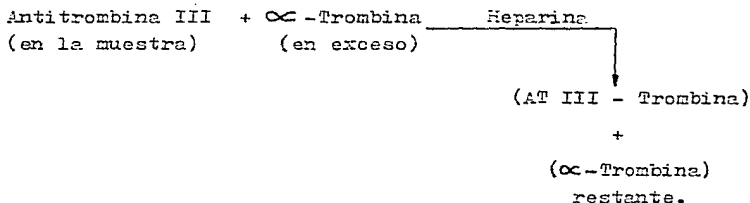
6.- Valor Normal: Hombre = 150 - 350 mg/dl.

Mujer = 175 - 420 mg/dl.

ANTITROMBINA III
(METODO CROMOGENICO)

Principio

En la presencia de heparina, la actividad inhibitoria de la antitrombina III sobre la trombina se ve potencializada. La trombina se inactiva en proporción a la cantidad de antitrombina III presente en la muestra y la cantidad restante de trombina es medida con un sustrato cromogénico a 405 nm. de acuerdo con el siguiente principio:



Material

- 1.- Tubos de plástico de 12 x 75 mm.
- 2.- Pipetas automáticas de 50,100,1000 lambdas o bien pipetas de vidrio de 1 ml. graduadas en décimas y en centésimas.

- 3.- Puntas de plástico para las pipetas automáticas.
- 4.- Pipetas de vidrio de 5.0, 2.0 y 1.0 ml.
- 5.- Cronómetro, gradilla, papel parafilm.
- 6.- Un matraz de 250 ml.

Reactivos

- 1.- NaCl isotónico.
- 2.- Agua destilada.
- 3.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.
- 4.- Equipo Berichrom para Antitrombina III, conteniendo:
 - a) α -Trombina (humana liofilizada); concentración de la solución de trabajo: α -Trombina (humana) 0.3 UI/ml ; Heparina 2.5 USP-U/ml. ; Aprotinina de 2.0 KIU/ml.

b) Reactivo sustrato, liofilizado: concentración de la solución de trabajo: 2 mmol/l de D-ciclohexilalanil- α -aminobutiril-arginil-p-nitroanilida (HD-CHA-But-Arg-pNA).

c) Solución Buffer : 100 mmol/l Tris/HCl, 150 mmol/l. - de NaCl pH 8.2 ; esta solución buffer tiene azida de sodio como un preservativo.

Método

1.- Medida cinética: semi-microensayo; incubar la α -Trombina y el reactivo sustrato a la temperatura de prueba seleccionada antes del ensayo.

Pipetear en tubos de plástico a temperatura controlada.

	Valor de la enzima trombina	Muestra
NaCl isotónico	0.05 ml.	---
Plasma	---	0.05 ml.
α -Trombina (humana)	1.00 ml.	1.00 ml.
Mezclar e incubar 5 min. a la temperatura de prueba seleccionada.		

Sustrato reactivo	0.10 ml.	0.10 ml.
Mezclar y determinar $\Delta A/\text{min.}$: leer absorbancias dentro de los primeros 30 seg. cronometrar y leer absorbancia dos veces más a intervalos de 1 min. Calcular $\Delta A/\text{min.}$ y el valor promedio de las dos determinaciones.		

Cálculos

Método 1: para cada serie es requerido un valor de la enzima trombina ($\Delta A/\text{min.}_{TEV}$)

$$(\Delta A/\text{min.}_{TEV} - \Delta A/\text{min.}_{\text{muestra}}) \times F_{O_C} = \text{Nivel de AT-III en la muestra. (\% de normal)}$$

$$F_{25^{\circ}\text{C}} = 1648$$

$$F_{30^{\circ}\text{C}} = 1129$$

$$F_{37^{\circ}\text{C}} = 713$$

Método 2:

$$(\Delta A/\text{min.}_{TEV} - \Delta A/\text{min.}_{\text{muestra}}) \times F_L = \text{Nivel de AT-III en la muestra. (\% de normal)}$$

$$F_L = \frac{\text{Valor actual de AT-III en \% de normal}}{(\Delta A/\text{min.}_{TEV} - \Delta A/\text{min.}_{\text{plasma control}})}$$

$\Delta A/\text{min.}$ = Absorbancia en cada minuto.

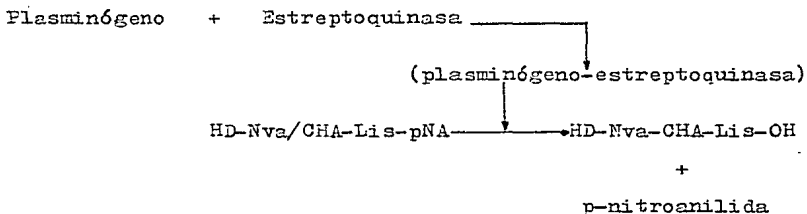
TEV = Valor de la enzima trombina.

Valor Normal de AT-III en el plasma: 77 a 125 % de normal.

PLASMINOGENO
(METODO CROMOGENICO)

Principio

El plasminógeno de la muestra forma con la estreptoquinasa existente un complejo, que se mide mediante un sustrato -- cromógeno a 405 nm. según el siguiente principio:



Material

- 1.- Tubos de plástico de 12 x 75 mm.
- 2.- Pipetas automáticas de 20,100,1000 lambdas o bien pipetas de vidrio graduadas en décimas y centésimas.
- 3.- Funtas de plástico para las pipetas automáticas.
- 4.- Pipetas de vidrio de 5.0, 10.0, 2.0 ml.
- 5.- Un matrás de 250 ml.
- 6.- Cronómetro, gradilla, papel parafilm.

Reactivos

- 1.- Agua destilada.
- 2.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.
- 3.- Plasma normal de Berichrom.
- 4.- Equipo Berichrom para plasminógeno conteniendo:
 - a) reactivo de estreptoquinasa, liofilizado, concentra -- ción de la solución de trabajo:

Estreptoquinasa: 1000 SK-U/ml. ; 100 mmol/l de KH_2PO_4 con pH 7.5

b) Reactivo sustrato, liofilizado. Concentración de la solución de trabajo: 3 mmol/l de D-Norvalilciclohexilalanil-lisil-p-nitroanilida (HD-Nva-CHA-Lis-pNA).

Método

Medición cinética: semi-microensayo; incubar previamente la solución de estreptoquinasa y la solución de sustrato a la temperatura de ensayo elegida.

Pipetear en tubos de plástico atemperados	
Muestra de plasma	0.02 ml.
Reactivo de estreptoquinasa	1.00 ml.
Mezclar e incubar durante 10 min. Si se emplea agitador de plástico: te toda la operación.	a la temperatura elegida. - dejarlo en la cubeta duran
Reactivo sustrato	0.10 ml.
Mezclar inmediatamente y pasar el contenido en la celda del - fotómetro y determinar $\Delta E/\text{min.}$: fotómetro, cronómetro : antes de 30 seg. leer la extinción y simultaneamente poner en - marcha el cronómetro. Al cabo de 60 y 120 seg. exactamente re - petir la lectura: calcular la $\Delta E/\text{min.}$ y el promedio de las -- dos determinaciones.	

Cálculos

Método 1:

$\Delta E/\text{min. muestra} \times F_{0C} = \text{Contenido de plasminógeno en la - muestra (\% de normal).}$

$$F_{25^{\circ}\text{C}} = 775$$

$$F_{30^{\circ}\text{C}} = 550$$

-37-

$$F_{37^{\circ}\text{C}} = 408$$

Método 2:

Por serie de medición se precisan como mínimo un valor con un plasma de referencia valorado para plasminógeno p. ej. plasma control N 6 P para Berchrom con indicación de valor analítico para el plasminógeno en % del normal.

$\Delta E/\text{min. muestra} \times F_L = \text{Contenido de plasminógeno en la muestra (\% del normal)}.$

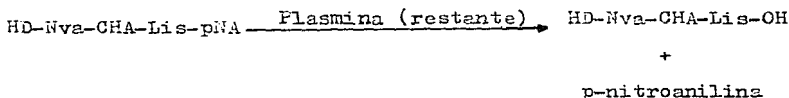
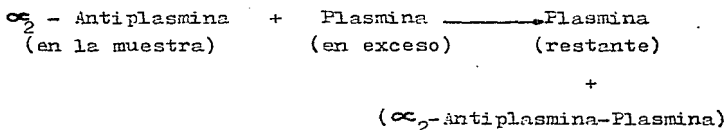
$$F_L = \frac{\text{Valor del plasminógeno en \% de normal}}{\Delta E/\text{min. plasma control}}$$

Rango Normal = 77 - 125 % del normal.

α_2 - ANTIPLASMINA
(MÉTODO CROMOGENICO)

Principio

La α_2 -antiplasmina en la muestra inactiva a la plasmina en proporción a la cantidad de α_2 -antiplasmina. La cantidad restante de plasmina es medida con un sustrato cromogénico a 405 nm. de acuerdo con el siguiente principio:



Material

- 1.- Tubos de plástico de 12 x 75 mm.
- 2.- Pipetas automáticas de 20, 100, 1000 lmbdas o bien pipetas de vidrio graduadas en décimas y centésimas.
- 3.- Puntas de plástico para las pipetas automáticas.
- 4.- Pipetas de vidrio de 5.0, 10.0, 2.0 ml.
- 5.- Un matrás de 250 ml.
- 6.- Cronómetro, gradilla, papel parafilm.

Reactivos

- 1.- Agua destilada
- 2.- Plasma problema citratado pobre en plaquetas.

3.- Equipo Berchrom para α_2 -Antiplasmina conteniendo :

a) Plasmina (humana), liofilizada: concentración de la solución de trabajo: 0.1 CTA-U/ml.

b) Reactivo sustrato, liofilizado: concentración de la solución de trabajo: 3 mmol/l D-Norvalil-ciclohexil-alanil-lisil-p-nitroanilida (HD-Nva-CHA-Lis-pNA).

c) Solución buffer : 100 mmol/l KH_2PO_4 : 150 mmol/l NaCl 25% de glicerina : pH 7.5 . La solución buffer contiene azida de sodio como preservativo.

Método

Medida cinética: semi-microensayo; incubar la plasmina y la solución sustrato a la temperatura de prueba seleccionada, antes del ensayo.

Pipetear en tubos de plástico atemperados		
	Valor de la enzima plasmina	Muestra
Cloruro de sodio isotónica	0.02 ml.	---
Muestra de plasma	---	0.02 ml.
Plasmina (humana)	1.00 ml.	1.00 ml.
Mezclar e incubar 1 min. a la temperatura de prueba seleccionada. Si se usa un agitador de plástico deberá permanecer en la cubeta durante todo el periodo de incubación.		
Reactivo sustrato	0.10 ml.	0.10 ml.
Mezclar y determinar $\Delta A/\text{min}$. Espectrofotómetro, detener el cronómetro: leer la absorbancia antes de 30 seg. y detener el cronómetro simultaneamente. Leer la absorbancia 2 veces más a intervalos de 1 min. Calcular $\Delta A/\text{min}$. y el valor promedio de las dos determinaciones.		

Cálculos

Método 1: Medición cinética; para cada serie un valor de la enzima plasmina es requerido ($\Delta A/\text{min. PEV}$).

$$(\Delta A/\text{min. PEV} - \Delta A/\text{min. muestra}) \times F_{0C} = \text{Nivel de } \alpha_2\text{-antiplasmina en la muestra (\% de normal)}$$

$$F_{25^{\circ}\text{C}} = 1114$$

$$F_{30^{\circ}\text{C}} = 793$$

$$F_{37^{\circ}\text{C}} = 541$$

Medición cinética.

Método 2:

$$(\Delta A/\text{min. PEV} - \Delta A/\text{min. muestra}) \times F_L = \text{Nivel de } \alpha_2\text{-antiplasmina en la muestra. (\% de normal).}$$

$$F_L = \frac{\text{Valor actual de } \alpha_2\text{-antiplasmina en \% de normal}}{\Delta A/\text{min. PEV} - \Delta A/\text{min. plasma control}}$$

$\Delta A/\text{min.}$ = Absorbancia por minuto.

PEV = Valor de la enzima plasmina.

Rango Normal = 77 - 125 % del normal.

PURIFICACION DE FIBRINOGENO HUMANO

Principio

Método que se basa en la precipitación con glicina de fibrinógeno humano a partir de un plasma adsorto con sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) y sulfato de bario ($BaSO_4$). El fibrinógeno obtenido es de alta coagulabilidad y estabilidad a temperatura ambiente y solo requiere un mínimo de equipo especializado para su obtención.

Material

- 1.- Vaso de precipitado de 100, 250 ml.
- 2.- Un vaso de precipitado de 1000 ml.
- 3.- Un vaso de precipitado de 4 litros.
- 4.- Un matrás aforado de 250 ml.
- 5.- Un matrás aforado de 50 ml.
- 6.- Una pipeta de vidrio graduada en 10 ml.
- 7.- Una probeta de 100 ml.
- 8.- Un agitador magnético Thermolyne tipo 1000 y 2 magnetos.
- 9.- Varillas de vidrio.
- 10.- Tubos de centrifuga de plástico con tapon de 50 ml.
- 11.- Un homogenizador de vidrio.
- 12.- Papel para bolsas de dialisis.
- 13.- Papel parafilm.

Reactivos

- 1.- Cristales de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ grado reactivo.
- 2.- $BaSO_4$ polvo grado analítico.
- 3.- Glicina.
- 4.- EDTA al 1 %.
- 5.- Citrato de sodio 0.055 M pH 7.4

- 6.- Buffer de citrato de sodio 0.055 M pH 7.4 /EACA
EACA = ácido epsilon amino caproico 0.056 ml/ml de ci
trato de sodio.
- 7.- Agua destilada.

Método

- 1.- Plasma (sin glóbulos rojos) + 5 mg de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ -
por mililitro de plasma.
- 2.- Agitación constante evitando la formación de espuma.
- 3.- Adicionar 90 mg de $BaSO_4$ /ml. de plasma.
- 4.- Agitar lentamente durante 30 min.
- 5.- Centrifugar a 1800 rpm. /15 min.
- 6.- Este procedimiento de adsorción es repetido una vez -
más.
- 7.- Plasma adsorto + 0.056 ml. de EACA/ ml. de plasma.
+ Glicina al 65 %
- 8.- Agitación constante durante 50 min. evitando la forma
ción de espuma.
- 9.- Centrifugar a 1800 rpm./15 min. o una centrifugación-
adicional de 2000 rpm. /10 min. si el sobrenadante no
está claro.
- 10.- Descartar sobrenadante.
- 11.- Se obtiene la primera pastilla de fibrinógeno.
- 12.- Redissolver la primera pastilla de fibrinógeno en --
buffer de citrato de sodio-EACA = primer volúmen.
- 13.- Adicionar glicina al 65 %.
- 14.- Agitación constante durante 50 min.
- 15.- Centrifugar a 1800 rpm./15 min. y descartar sobrena-
dante.
- 16.- Se obtiene la segunda pastilla de fibrinógeno.

- 17.- Redissolver la segunda pastilla de fibrinógeno en un-
buffer de citrato de sodio-EACA = 1/2 del volúmen --
inicial.
- 18.- Adicionar glicina al 65 %.
- 19.- Agitar constantemente durante 50 min.
- 20.- Centrifugar a 1800 rpm./15 min. y descartar el sobre-
nadante.
- 21.- Se obtiene la tercera pastilla de fibrinógeno.
- 22.- Redissolver la tercera pastilla de fibrinógeno en un-
buffer de citrato de sodio-EACA = 1/3 del volúmen --
inicial.
- 23.- Dializar contra buffer de citrato de sodio 0.055 M -
pH 7.4 durante 18 horas.
- 24.- Centrifugar a 1800 rpm./15 min. y eliminar el preci-
pitado.
- 25.- Separar en alícuotas de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 ml. pos-
teriormente congelar a -20 °C.

PRUEBA DE COAGULACION DEL FIBRINOGENO

Principio

La trombina convierte el fibrinógeno soluble a un polímero insoluble llamado fibrina. Usando este principio se elaboró una técnica en la que se valora la coagulabilidad de un fibrinógeno utilizando para esto trombina de 50 U/ml. y una solución amortiguadora. El valor de coagulabilidad se obtiene de una manera indirecta.

Material

- 1.- Tubos de vidrio de 12 x 75 mm.
- 2.- Pipetas de vidrio de 1 ml. graduadas en décimas.
- 3.- Pipetas de vidrio de 1 ml. graduadas en centésimas.
- 4.- Pipetas de vidrio de 5 ml.
- 5.- Baño maria a 37°C.
- 6.- Aza de platino.
- 7.- Gradilla, gasas y papel parafilm.

Reactivos

- 1.- Trombina humana de 50 U/ml.
- 2.- Buffer de fosfatos 0.025 M pH 7.4 , Fi = 0.15
- 3.- NaOH al 10 %.
- 4.- Agua destilada.
- 5.- Fibrinógeno control.
- 6.- Fibrinógeno problema.

Equipo

- 1.- Centrífuga Damon /IEC Division.
- 2.- Espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL.
- 3.- Celdillas de cuarzo de 1 cm. de paso de luz.

Método

1.- Marcar 10 tubos de vidrio para fibrinógeno control y 10 para el fibrinógeno problema.

2.- Los dos primeros tubos tanto para el fibrinógeno control como para el problema solo llevan 2.25 ml. de buffer de fosfatos y 0.25 ml. de trombina con 2.5 ml. más de agua destilada.

3.- Los ocho tubos restantes de cada serie se les adiciona 4.5 ml. de buffer de fosfatos mas 0.5 ml. de fibrinógeno - (control o problema según sea el caso) con 0.25 ml. de trombina.

4.- Se agitan ligeramente y se tapan con papel parafilm.

5.- Se mantienen por 45 min. en baño maria a 37°C.

6.- Después de este tiempo se le quita el coágulo formado con el aza de platino y se centrifugan por 15 min. a 3000 rpm

7.- Posteriormente se toman 2 ml. del sobrenadante de cada tubo y se lee en el espectrofotómetro a 280 nm. la absorbancia correspondiente.

Cálculos

Absorbancia corregida = Absorbancia del sobrenadante - ab
sorbancia del blanco del problema

% Proteína no coagulable = $\frac{\text{Absorbancia corregida}}{\text{Absorbancia del sobrenadante}}$ x 100
(del tubo 3 al 10)

% Proteína coagulable = 100 - % Proteína no coagulable.

AGREGACION DE MONOMEROS
DE FIBRINA CON TROMBINA

Principio

La medición de la agregación de monómeros de fibrina fué estimada por un método modificado de Ferry y Morrison (1947). El cual se basa en que una solución de monómeros de fibrina - preparada a partir de plasma, con ciertas variaciones de pH - se ve favorecida su agregación.

Material

- 1.- Pipetas de vidrio de 10 ml.
- 2.- Pipetas de vidrio de 1 ml. graduadas en décimas.
- 3.- Pipetas de 0.1 ml. graduadas en centésimas.
- 4.- Vaso de precipitados de 4 litros.
- 5.- Baño maria a 37°C.
- 6.- Gradilla, papel parafilm.

Reactivos

- 1.- Solución buffer I que contiene : Amicar 0.04 M, EDTA 0.0025 M, NaCl 0.85 %.
- 2.- NaCl 0.85 %
- 3.- Trombina Humana de 30 U/ml.
- 4.- Urea 5 M
- 5.- Buffer de fosfatos 0.016 M, pH 4.5
- 6.- Buffer de fosfatos 0.2 M, pH 4.5
- 7.- CaCl 332 meq/l
- 8.- Buffer de fosfatos 0.8 M, pH 9.7
- 9.- Buffer de citrato de sodio 0.055 M, pH 7.4 para diluir el fibrinógeno y medir su absorbancia a 280 nm.

Equipo

- 1.- Espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL.
- 2.- Celdillas de cuarzo de 1 cm. de paso de luz.

Método

- 1.- Diluir el plasma problema y el plasma control 1:5 con buffer I.
- 2.- Incubar el plasma diluido, con trombina 1.5 U/ml. a -- 37°C. durante 30 min. y posteriormente a 4°C. por 24 horas.
- 3.- Centrifugar y lavar con NaCl 0.85 % tres veces.
- 4.- Disolver el sedimento con urea 5 M.
- 5.- Dializar contra agua destilada por 24 horas.
- 6.- Lavar el nuevo precipitado tres veces con NaCl 0.85 % Disolver con urea 5 M, dializar por 72 hrs. contra un buffer de fosfatos 0.016 M, pH 4.5
- 7.- Centrifugar restos de fibrina desnaturalizada.
- 8.- A 2.0 ml. de solución de monómeros, cuya absorbancia a 280 nm. dió 0.026 se le añaden 0.5 ml. de buffer de fosfa--
tos 0.2 M, pH 4.5 ; más 0.05 ml. de CaCl_2 de 332 meq/l ; ade--
más 0.3 ml. de buffer de fosfatos 0.8 M, pH 9.7
- 9.- Posteriormente medir la absorbancia a 350 nm. cada --
minuto durante 25 min.
- 10.- Graficar absorbancia contra tiempo (en seg.), tanto--
el problema como el control.

VI RESULTADOS

Del 13 de septiembre de 1985 al 3 de abril de 1986, se estudiaron 20 pacientes que ingresaron a la Unidad de Cuidados-Intensivos (UCI). En la tabla I se anotan los antecedentes y datos clínicos de interés durante su evolución: 18 de ellos tenían antecedentes de una o más cirugías; en 12 de los 18 hubo una infección quirúrgica. La relación cronológica en días de estos dos antecedentes con el tiempo de trombina más corto (TTC) se expresan con signo negativo (-); el promedio de días que la cirugía precedió al TTC fué de -6.1 días, 16 de los 20 pacientes iniciaron estado de choque unos días antes o el mismo día del TTC. Solamente dos de ellos no tenían insuficiencias orgánicas asociadas al estado de choque. Este fué mixto en ocho pacientes (séptico y hemorrágico), en siete fué solo séptico y en uno hemorrágico.

Los pacientes en promedio estuvieron 17 días en observación en la UCI con un rango de 1 a 124, la edad fluctuó entre 19 y 70 años y fueron de ambos sexos.

Durante estos días de evolución los pacientes se distribuyeron en tres grupos:

- I.- Los que tuvieron TT acortados a 15 seg. o acortamientos progresivos.
- II.- Los que tuvieron los TT cortos menores a 3 seg. del testigo sin progresar.
- III.- Los que tuvieron TT prolongados.

En la tabla II se anotan los datos correspondientes a los tres grupos. En la tabla III se incluyen los datos de los estudios de laboratorio de coagulación del grupo I, el día que se tomó la muestra para realizar el estudio completo. Todos los pacientes demostraron hipocoagulabilidad con TTPa prolongado que corrigió con diluciones de plasma normal excepto uno

(caso 16) que aún con dilución 1:4 de plasma normal el TTPa - persistió con 21.4". Los casos del grupo I, números 9,13,16 y 19 resultaron con factores disminuidos caso 9 (II y IX); caso 13 (V,VIII y IX); caso 16 (II,V y VIII); caso 19 (II,VII), -- además se encuentran fibrinógenos elevados y trombocitopenia -- excepto en el paciente No. 9. El paciente No.12 tiene TTPa -- alargado con corrección de plasma normal y no se midieron los factores de la fase de contacto.

En los pacientes del grupo II (tabla IV) se observaron -- TTPa y TP prolongados con corrección de ellos cuando se diluyeron con plasma normal. Las plaquetas estuvieron bajas con -- una media de 63,200 y fibrinógenos elevados (rango de 290 --- 940) con una media de 505.5 mg/dl estos pacientes tuvieron hipocoagulabilidad por falta de factores, con trombocitopenia : nueve de los pacientes tuvieron infección grave postquirúrgica y trombocitopenia; cuatro por abajo de $50,000/\text{mm}^3$ (se excluye a un paciente con Leucemia Promielocítica Aguda). Los niveles de fibrinógeno estuvieron en concentraciones normales el día del estudio, sin embargo cinco pacientes (se excluyó -- al paciente con Leucemia Promielocítica aguda) tuvieron de--- scensos progresivos del fibrinógeno antes o después del estudio, en algunos hasta de un 66 %, cinco pacientes tuvieron -- PFF elevados, en un caso hasta de 53.7 g/ml. (rango de 3.36- a 53.7 Mg/ml.).

El grupo III (tabla V) con cinco pacientes, uno de ellos con TT normal y los otros con TT prolongado, el caso No. 4 y No. 6 no se les identificó actividad heparínica ni PFF y la -- concentración de fibrinógeno por técnica de Clauss resultó -- normal, el caso No. 11 tiene TT prolongado por hipofibrinogenemia y el No. 14 el día del estudio resultó con efecto heparínico, PFF elevados y la determinación de fibrinógeno por -- dos técnicas (Clauss 580 mg/dl y por inmunodifusión radial -- 906 mg/dl.) lo que sugiere una disfibrinogenemia. El resto de

determinaciones (antiproteasas, factores y plasminógeno) son muy similares a los grupos I y II con Ttc. Los factores VIII y IX resultaron disminuídos. Cuatro de los cinco pacientes -- fallecieron.

En la tabla No. III se anotan los resultados del estudio inicial del grupo I. Todos tuvieron hipocoagulabilidad en tanto algunos (9, 12 y 19) corrigieron con diluciones de plasma normal, hubo otros que no (caso 13, 16). La interpretación de las pruebas completas en cada uno de los casos fué: paciente No. 9 con déficit de factores (II y IX); el paciente No. 12 con TTP prolongado que corrige con plasma normal, con PFF elevados, trombocitopenia y actividad de factores en un límite inferior normal, que no justifican las prolongaciones, excepto que faltaron las determinaciones de los factores de contacto. Este paciente seguramente tuvo coagulopatía de consumo; -- el paciente No. 13 (con leucemia aguda) tuvo cierta actividad inhibitoria en su plasma, con niveles de factores muy disminuídos (VIII, IX y V) con elevación de productos de fragmentación; el paciente No. 16 no obstante tener concentraciones bajas de II, V y VIII que sugieren consumo; tiene un inhibidor en el plasma, el fibrinógeno resultó como en todos los casos elevado; finalmente el paciente No. 19 tuvo hipocoagulabilidad sugestiva de deficiencia de vitamina K, por disminución de factores II y VII con trombocitopenia y PFF elevados.

En las cifras promedio de los estudios de coagulación de los cinco pacientes se encuentra con prolongación de TTPa con corrección parcial al diluir con plasma normal, disminución de factores II y IX y en límite inferior normal el VIII y V, plaquetas elevadas, PFF altos y fibrinógeno elevado.

En los estudios especiales (tabla VI) se encontró que la antitrombina III (AT-III) por técnica inmunológica y funcional estuvo disminuída. El grado de reducción fué mayor con la técnica funcional, que dió valores de 59 %, la α_2 -macroglobu

lina resultó normal. En dos casos la α_2 -antiplasmina resultó baja y en dos normal. Los cinco pacientes tuvieron plasminógeno disminuido, aunque solo dos de ellos (9 y 19) tuvieron alteraciones moderadas en la función hepática. Los cinco pacientes tuvieron ascensos de α_1 -antitripsina, casi al doble del valor normal alto (gráfica No. 1). Las determinaciones de fibrinógeno por técnica inmunológica y por técnica funcional (Clauss) en promedio dió de 85 mg la diferencia en favor de la técnica funcional (tabla VII).

Los estudios de coagulación del fibrinógeno (gráfica No.2 así como la agregación de monómeros con fibrinógeno purificado y en plasma fueron normales excepto en el paciente No.16 - en el que la coagulación del fibrinógeno fué baja (41.5 %) pero con una agregación de monómeros normal.

En la tabla VIII se anotan los resultados de los TT realizados con alícuotas de la mezcla de cinco normales, los que se diluyeron con amortiguador veronal Owren para conocer la relación del TT con las diferencias de pH. En ella se aprecia que los tiempos de trombina se acortan, si se modifica el pH hacia el lado ácido o alcalino y que los acortamientos del TT son de poca cuantía aún modificando hasta tres décimas hacia el lado ácido (pH 7.3 a 7.0). En general no hay correlación entre el pH in vivo y el acortamiento del TT (gráfica No. 5).

En la tabla No. IX se anotan los resultados de los TT cuando se hicieron variaciones en la concentración de calcio - los tiempos de trombina cortos que se obtuvieron del plasma testigo se lograron con concentraciones de calcio dos veces mayor que las fisiológicas.

TABLA I
ANTECEDENTES, DATOS CLINICOS Y RELACION CRONOLOGICA DEL TTC

PACIENTES No.	N No.	CIRUGIAS DIAS ANTES DE TTC	INFECCION QUIRURGICA	INSUFICIENCIA ORGANICA		CHOQUE		VIVE	TT
					DIAS AN- TES DE- TTC.	TIPO	DIAS AN- TES DE TTC.		
1	2	-8	+	-				NO	(-)
2	2	-9	+	+				NO	(+)
3	1	-11	+	+				NO	(-)
4	3	-3	+					SI	(+)
5	4	-5	+	+	- 4	h	- 3	NO	(-)
6	3	-11	-	+	- 6	s	- 4	NO	(+)
7	3	-7	+	+	- 7	m	- 6	SI	(-)
8	1	-4	-	+	- 1	m	- 7	NO	(-)
9	4	-16	+	+	- 4	s	- 2	NO	(-)
10	1	- 2	+	+	- 2	m	0	NO	(-)
11	5	- 1	+	+	-14	m	- 2	NO	(-)
12	4	- 3	-	+	- 1	m	-14	NO	(-)
13	0		-	+	- 1	s	- 1	NO	(-)
14	1	- 3	-	+	- 3	s	- 1	NO	(+)
15	0		-	+		m	3	NO	(-)
16	1	- 7	+	+	0	s	0	NO	(-)
17	1	- 1	+	-				PROB.	(-)
								SI	
18	4	-10	+			s	-10	NO	(-)
19	1	- 4	+	+	0	s	0	SI	(-)
20	1		-	-				PROB.	(-)
								SI	
FRECUENCIA	18/20		12/20	14/20		16/20		6/20	15/20
- X		-6.1			-3.5		-4		

TTC = Tiempo de tromblina corto.

m= mixto s= séptico h= hipovolémico

(-) = corto (+) = prolongado.

TABLA II
 CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS I, II, III.

CONDICIONES	I		II		III	
	1	2	1	2	1	2
PANCREATITIS	1/5	- 16	2/10	- 6.5	2/5	- 20
ANTECEDENTE QUIRURGICO	4/5	-7.5	9/10	- 6.0	5/5	-5.4
INFECCION QUIRURGICA	2/5	- 9	7/10	- 6.2	3/5	-4.3
INSUFICIENCIA ORGANICA	5/5	-1.2	5/10	- 3.5	4/5	-7.6
CHOQUE	4/5	-0.3	7/10	- 4.1	5/5	-6.5
DIAS DE EVOLUCION DESDE TTC HASTA DEFUNCION		1.3		1.8		15.5

1.- Relación de pacientes + / total pacientes del grupo.

2.- X de días que precedió al TTC.

TABLA III

GRUPO I. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE COAGULACION CON Ttc.

PRUEBA	PACIENTE No.					
	9	12	13	16	19	X
JTPa (seg)	+ 12.1	+ 18.6	+ 19.5	+ 58	+ 120	+ 45.6
corrección con P.N. 1:2	+ 8.3	+ 6.6	+ 12.3	+ 34.7	+ 13.7	+ 15.1
1:4	+ 1.6	+ 3.7	+ 9.6	+ 21.4	+ 2.3	+ 7.7
TP (seg)	+ 4.6	+ 2.3	+ 4.2	+ 5.1	+ 25.3	+ 8.3
TT (seg)	- 5.1	- 2.5	- 4.5	- 1.4	- 4.9	- 3.68
dilución con S.S. 1:2	- 8.4	-	- 5.9	- 6.0	- 10.5	- 7.7
1:4	- 14.1	-	- 11.9	- 11.5	- 13.5	- 12.75
FACTORES %						
II	33	45	50	25	10.5	32.7
V	73	46	45	27.5	46	47.5
VII	110	84	68	50	5.8	63.5
VIII	58	110	15.5	11	74	53.7
IX	26.5	64	19.5	49		39.7
X	110	94	80	72		89
FIBRINOGENO EN mg/dl	690	550	960	820	520	708
PLAQUETAS /mm ³	332000	32000	50000	24000	69500	101500
PRODUCTOS DE FRAGMENTACION Atg/ml	2.4	13.4	9.6	6.7	13.4	9.7

TABLA IV
GRUPO II. PACIENTES CON Ttc.

PACIENTES No.	TTPa (seg)	CORRECCION CON P. N.		TP (seg)	TT (seg)	DILUCION CON S. S.		FIBRI NOGE- NO mg/dl	PLAQUE TAS mm ³	PPF μg/ml
		1:2	1:4			1:2	1:4			
1	+ 5.1			+ 1.4	- 0.7			505	52000	
3	+10			+ 0.9	- 2.7			505	30000	3.36
5	+10			+ 3.4	- 2.1			620	77500	1.68
7	+18.1	+12.7		+ 2.7	- 1.0			470	110000	2.4
8	+ 5.6			+ 3.7	- 3.3			940	7000	19.2
10	+21	+ 0.2	-0.1	+ 3.7	- 2.5	-4.9	-9.7	315	19000	0
15	+50.5	+17.5	+7.5	+ 7.4	- 4.3	-1.2	-6.2	290	23000	0
17	+42.2	+20.5	+5.7	+ 1.5	- 0.4			470	86000	13.4
18	+ 4.1	+ 2.5		+ 1.7	- 0.2	+0.5	-1.5	520	46000	53.7
20	+ 2.4			+ 3.2	- 3.0			420	181500	2.4
- X	+16.9	+10.6	+6.6	+ 2.9	- 2.0	-3.0	-5.8	505	63200	10.6

TABLA V

GRUPO III. PACIENTES CON TT NORMAL O PROLONGADO.

PRUEBA	PACIENTES No.					
	2	4	6	11	14	X
TTPa (seg)	+35.5	+4.1	+20.1	+120	+120	+59.9
CORRECCION CON						
P. N. 1:2	+9.7		+8.7	+25.5	+38.6	+20.6
1:4	+7.0		+6.9	+8.8	+8.7	+7.8
TP (seg)	+3.7	+1.8	+3.5	+14.9	+8.7	+6.52
TT (seg)	+0.1	+1.2	+5.8	+12.2	+5.3	+4.9
FIBRINOGENO mg/dl	460	390	390	35	740	403
Plaquetas mm ³	87500	216000	22500	44000	26000	79200
PRODUCTO DE FRAGMENTACION mg/ml.	6.72	3.36	2.4			4.16

TABLA VI
DETERMINACION DE INHIBIDORES Y PLASMINOGENO DEL GRUPO I

PACIENTE	I N H I B I D O R E S					PLASMINOGENO	
	ANTITROMBINA III		MACROGLOBULINA	ANTIPLASMINA	ANTITRIPSINA		
No.	Immunológica mg/dl	Funcional %	Immunológica mg/dl	Funcional %	Immunológica mg/dl	Immunológica mg/dl	Funcional %
VALOR NORMAL	22-39	77-125	HOMBRE 150-350 MUJER 175-420	77-125	190-350	7-15	77-125
<u>SEXO</u>							
9 M	19.2	56	164	59.2	551	4.6	49.2
12 F	23.1	59	236	-	502	6.1	53.9
13 M	21.8	73	-	50.6	637	5.5	59.6
16 F	25.8	61.3	-	83.6	366	5.9	63.9
19 F	15.6	50.6	129	98.2	551	5.2	55.6
-							
X	21.1	59.9	182.5	72.9	521.4	5.46	56.4

I= Immunológica
F= Funcional

TABLA VII
RESULTADOS DEL FIBRINOGENO DE LOS PACIENTES DEL GRUPO I

PACIENTE N o .		FIBRINOGENO					
		I mg/dl	F clauss %	Purificación	Coagulabilidad %	Agregación de monome- ros de fibrina con -- trombina	
VALOR NORMAL		200-450			90.15	En fibrino- geno puri- ficado	En plas- ma
	SEXO						
9	M	655	690	SI	85.2	N	N
12	F	561	550	SI	86.3	N	N
13	M	735	960	SI	75.9	N	N
16	F	-	820	SI	41.5	-	N
19	F	543	520	SI	79.9	N	N
-							
X		623.5	708		73.7	N	N

N= NORMAL

I= INMUNOLOGICA

F= FUNCIONAL

TABLA VIII

VARIACION DE TT CON CAMBIOS EN EL pH

VARIACIONES DE pH IN VITRO	7.0	7.1	7.2	7.3	7.4
VALOR DEL TT CON DILUCION 1:1.5 DE PLASMA NORMAL(seg)	17.3	18.2	20.3	19.5	22.0
DIFERENCIA ENTRE EL TT PRO BLEMA CON EL \bar{x} DEL TESTIGO	-2.4	-1.5	+0.6	-0.2	+2.3
PACIENTES DEL GRUPO I CON SU VALOR DE pH	9	12	13	16	19
VALOR DEL TT EN SEG.	7.34	7.32	7.48	7.38	7.31
	<u>15.3</u> 20.4	<u>15.8</u> 18.3	<u>15.1</u> 19.6	<u>16.9</u> 18.3	<u>13.4</u> 18.3
DIFERENCIA ENTRE EL TT DEL PACIENTE CON EL TESTIGO	-5.1	-2.5	-4.5	-1.4	-4.9
VALOR PROMEDIO DEL TT DEL TESTIGO:	19.7 seg.				

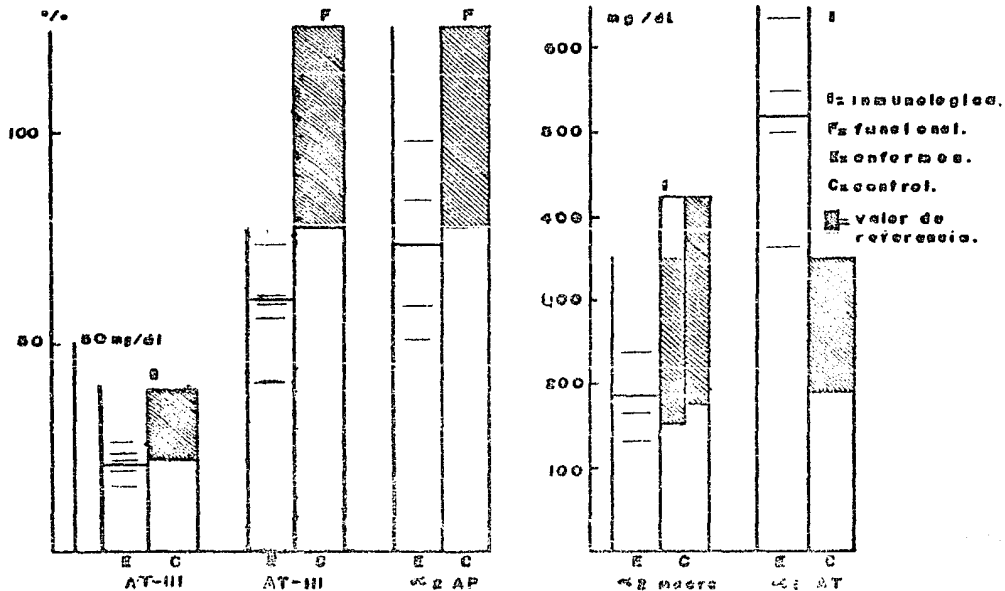
TABLA IX

VARIACIONES DE CALCIO IN VITRO PARA CONOCER SU RELACION CON EL TT.

% DE CALCIO	TT PROMEDIO DEL PROBLEMA (seg)	DIFERENCIA ENTRE EL TT DEL TESTIGO Y PROBLEMA
20	14	- 5.5
16.66	14	- 5.5
12.48	15	- 4.5
9.91	16	- 3.5
4.99	18	- 1.5
TESTIGO	19.5	

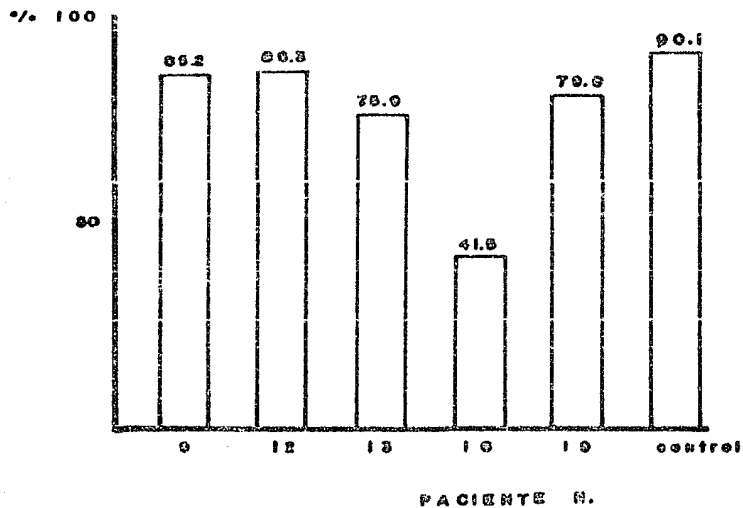
GRAFICA N.1

Resultados de la Cuantificación de Antiproteasas.



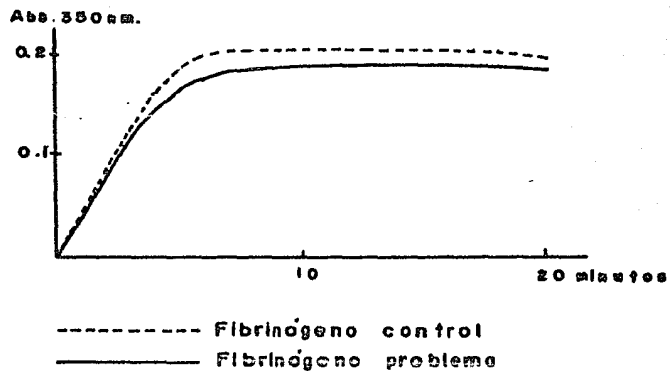
GRAFICA N.º 2

Coagulabilidad del Fibrinogeno Purificado
en enfermos



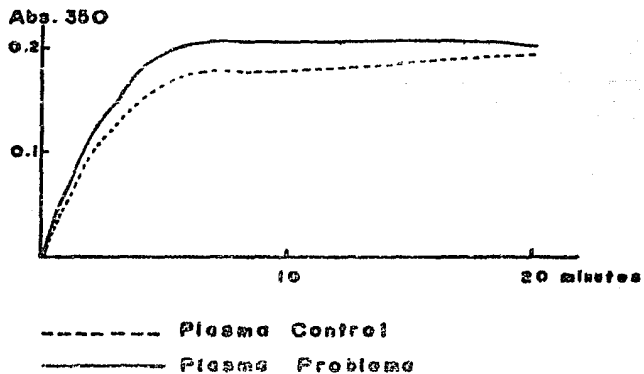
GRAFICA N.3

Agregacion de Monomeros de Fibrina con Trombina a partir de Fibrinogeno Purificado.



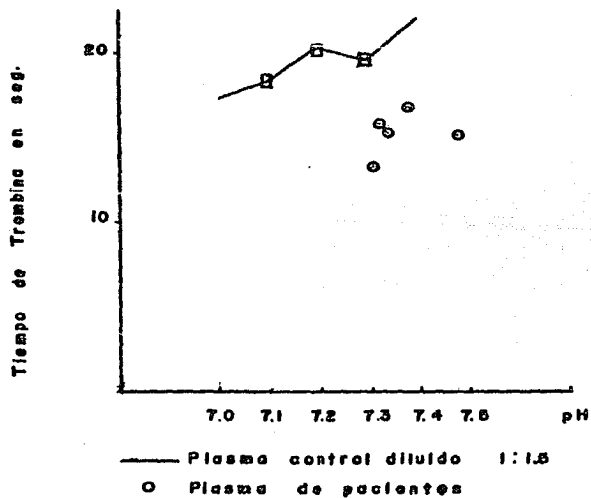
G R A F I C A N. 4

**Agregación de Monómeros de Fibrina
con Trombina a partir de plasma.**



GRAFICA N.º 5

Variación del tiempo de Trombina con cambios en el pH.



VII DISCUSION

El acortamiento del TT se puede observar, durante cualquier tiempo dentro de la evolución de los pacientes con sepsis, pero muy frecuentemente éste evento coincidió con el día de mayor gravedad del enfermo y en algunos casos el mismo día de la muerte.

Durante los periodos de observación prolongados, algunos pacientes tuvieron TT más cortos que el testigo casi siempre en días aislados, o que no llegaron al grado de acortamiento observado en el grupo I. En todo caso lo importante es aclarar la etiología de éste fenómeno que refleja una alteración profunda en uno de los mecanismos de la homeostasis más importante como es el de la coagulación sanguínea. Estas alteraciones acontecen en un enfermo con profundos cambios fisiopatológicos secundarios a insuficiencias orgánicas, particularmente cardiorrespiratorio, renal y hepático o a mecanismos de compensación y a tratamiento intensivo, en post-operatorios complicados con sepsis. La interpretación de los resultados debe ser muy objetiva, ya que en un sujeto con tales cambios dinámicos, solamente tenemos un estudio de coagulación completo. Cada uno de estos factores por si solo puede modificar la coagulación sanguínea, por ello el punto de análisis para el estudio se lleva enfocado al acortamiento del tiempo de trombina .

Conocemos que cualquier reacción enzimática depende de varias constantes entre ellas el pH. También es conocido que los pacientes con hipoperfusión tisular o en estado de choque tienen metabolismo tisular anaerobio, con mayor producción de ácido láctico y modificación del pH sanguíneo hacia la acidosis. Por los mecanismos de coagulación a través de los amortiguadores sanguíneos, las variaciones de pH no son mayores, ya

que desviaciones de una o dos décimas de pH comprometerían la vida del paciente. Los resultados in vivo demuestran que para que el TT se acorte por cambios en el pH, estos deben ser del orden de 3 a 4 décimas por abajo o arriba del fisiológico y éstos pH nunca se alcanzaron en la sangre de los pacientes -- los días que tuvieron los acortamientos menores. El otro elemento que se investigó por su relación con la coagulación sanguínea fué el calcio. Las concentraciones de calcio fisiológicas de 5.3 meq/l ó 9-10 mg/100 ml. son las necesarias para la coagulación. La ausencia de calcio en el plasma impide la coagulación y el aumento en la concentración favorece la misma. Para que el TT se acorte a valores próximos a los vistos en estos pacientes se requiere que su concentración se eleve a aproximadamente dos veces la fisiológica, valores que serían incompatibles con la vida. Las determinaciones de calcio sérico de estos pacientes (no se midió calcio iónico) estuvieron en rangos normales, por lo tanto; los acortamientos en los tiempos de trombina no los podemos atribuir a cambios individuales de pH ni de calcio de los pacientes.

Los acortamientos del TT son una característica de los fibrinógenos anormales que producen trombosis generalizada y -- que han sido descritas como alteraciones hereditarias (16,17) sin embargo cada vez más frecuentemente, se identifican alteraciones funcionales adquiridas del fibrinógeno. En el síndrome nefrótico nosotros identificamos una disfibrinogenemia consistente en resistencia a la digestión con plasmina (18) pues en ese caso los TT resultaron prolongados. En los pacientes diabéticos se informaron de TT cortos supuestamente debidos a glucosidación de la molécula (19,20); los acortamientos del TT fueron del orden de tres décimas con desviación standard de 0.5" para la determinación de TT. Por otra parte la mayor cantidad de carbohidratos como ácido siálico en el fibrinógeno produce prolongaciones del TT como lo ha demostrado el ---

Dr. Martínez en disfibrinogenemias por hepatopatías (21,22). También se ha descrito un fibrinógeno anormal en recién nacidos con sepsis (23) y con púrpura trombocitopénica trombótica. En los recién nacidos la evaluación de una disfibrinogenemia resulta más difícil porque existe un fibrinógeno con características diferentes al del adulto (24) y que se reconoce como fetal, se manifiesta con TT prolongados y cambios de movilidad electroforética.

En nuestros pacientes las determinaciones de fibrinógeno por dos técnicas una con principio inmunológico y otra con técnica funcional, al igual que las disfibrinogenemias, generalmente muestran diferencias de concentración muy importantes. La diferencia entre estas técnicas en sujetos normales es de alrededor de 15 mg/dl. En los pacientes con disfibrinogenemias la concentración de fibrinógeno por la técnica funcional resulta muy baja y por las técnicas que utilizan principio que determina el fibrinógeno como proteína (inmunológicas o precipitación con calor) resulta normal (10) (11).

En los cinco pacientes del grupo I no se observaron diferencias en este sentido, más bien fué en el contrario es decir, que con técnica funcional se lograron cifras más altas que por la inmunológica.

Las pruebas más específicas para estudiar una disfibrinogenemia, como son la coagulabilidad del fibrinógeno (13,14) y la agregación de monómeros de fibrina, tanto en fibrinógeno purificado como en plasma (12), resultaron normales excepto en un caso, donde el fibrinógeno purificado tuvo una coagulabilidad baja, pero la agregación de monómeros en plasma resultó normal, lo que hace pensar que hubo un error metodológico en la preparación de fibrinógeno o en su conservación.

En el TT existen tres factores que intervienen: 1) La cantidad y calidad del sustrato que es el fibrinógeno o sus fragmentos coagulables por trombina; 2) La concentración de la --

trombina y 3) de la actividad antitrombínica del plasma. La--
concentración del fibrinógeno modifica el TT. A cantidades --
constantes de trombina el TT es inversamente proporcional a -
la concentración de fibrinógeno: como una parte de trombina -
coagula mil partes de fibrinógeno(peso/peso), se debe buscar--
una concentración suficientemente sensible, que refleje los -
cambios de la concentración de fibrinógeno. Como está estanda-
rizado en el TT 0.5 U de trombina coagulan 300 mg. de fibrinó-
geno, conforme aumenta la concentración del sustrato el tiem-
po de trombina se acorta (reacción de 2do. orden) hasta un lí-
mite. Los acortamientos por ésta razón no exceden de 2", esta
no fué la causa de los acortamientos, ya que al diluir el ---
plasma problema con solución salina isotónica (1:2 y 1:4) el
acortamiento se incrementó, no obstante que la concentración-
del sustrato bajó más de un 50%. El tercer factor que puede -
afectar el TT son los inhibidores antitrombínicos, se han des-
crito seis y en la actualidad se reconocen dos principales :
La antitrombina III y la antitrombina VI (5), esta última re-
presenta a los productos de fragmentación por la fibrinolisis
especialmente los fragmentos X e Y. La antitrombina III a con-
centraciones normales en el plasma, es el principal inhibidor
de la trombina. La mayor parte de la actividad antitrombínica
del plasma lo realiza la AT-III y ello es por la gran afinidad
que existe entre AT-III - Trombina. La disminución de su con-
centración limita la neutralización de la trombina en el sis-
tema TT y en un momento dado, existe una trombina libre para-
coagular el fibrinógeno. La función tiempo está en relación -
inversa a la concentración de trombina, así una disminución -
de AT-III puede acortar el TT.

El aumento de la generación de trombina como causa del TT .
corto, fué otra opción que se planteó en la hipótesis. Dada -
la dificultad que existe para demostrar la trombina en circu-
lación se tiene que hacer indirectamente a través de sus efec-

tos específicos. En el cuadro No.1 se relacionan estos. En el laboratorio estas acciones se pueden manifestar por:

- 1.- Elevación de $F_p A$ de cadena corta.
- 2.- Disminución de la AT-III con técnicas que midan su función. No siempre que hay complejo AT-III - Trombina disminuye su concentración, medida por técnica inmunológica. Por cromatografía es posible identificar el complejo AT-III-Trombina.
- 3.- Incremento en la concentración de monómeros de fibrina y el dímero " D ".
- 4.- Incremento de productos de fragmentación por la fibrinolisis.
- 5.- Presencia de fibrina insoluble en urea por acción de factor XIII.
- 6.- Productos de secreción de plaquetas como son: Beta-Tromboglobulina, F_4 plaquetario.
- 7.- Proteína C activada.
- 8.- Trombomodulina activada.
- 9.- Disminución de factor VIII:C y V:C.
- 10.- Demostración del complejo Trombina-Antitrombina III en circulación.

En los pacientes del grupo I encontramos, algunas de estas pruebas positivas: disminución de factor V en 4/5 pacientes : factor VIII en 3/5 : productos de fragmentación elevados en 4/5 : Antitrombina-III disminuida en 5/5. Dados los antecedentes que tienen los pacientes, la activación de la coagulación puede ser por ambas vías, sin embargo por acompañarse de estado de choque o de hipoperfusión con sepsis lo más probable es el predominio de la activación por vía intrínseca de factores de contacto activados, consumo de factores XI, IX VIII, V y II, formación de trombina, consumo de AT-III, activación de factor XIII, así como de trombomodulina, proteína c, - S (28); la activación de estos disminuye su actividad funcional y predispone a los pacientes a mayor activación de la coa

gulación ya que la proteína C activada parece inhibir los factores V y VIII activados (25,26,27).

Por otra parte, la disminución en los inhibidores como --AT-III que tienen una amplia actividad antiproteasa (contra factores XIIa, IXa, Xa, trombina, cinina, etc.) coadyuva a la mayor activación de la coagulación. La baja de la concentración de la AT-III funcional limita el efecto anticoagulante de la heparina. La activación de contacto producto de la lesión endotelial, la endotoxemia, la hipoperfusión tisular, -- las heridas amplias y cruentas, etc. generan la formación de calicreína que activan el factor XI y por otra parte al plasminógeno; dando lugar al consumo de éste y formación de plasmina circulante, la que debe ser inhibida por la α_2 -antiplasmina.

El inhibidor natural de la calicreína es el llamado inhibidor C1 cuya acción se potencializa por la AT-III. La baja de ésta y el consumo del inhibidor C1 por su combinación con su sustrato incrementa la activación de contacto con reducción o desaparición total del cininógeno de alto peso molecular el que por otra parte se ha demostrado estar bajo o ausente en pacientes con choque séptico irreversible convirtiéndose así en un dato con valor pronóstico.

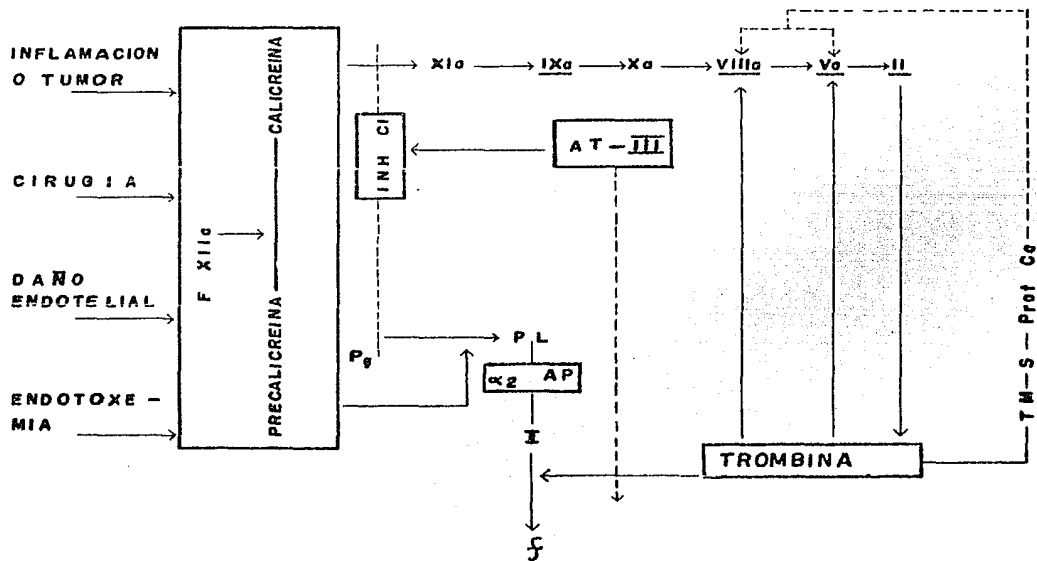
La plasmina circulante generada por la activación del --- plasminógeno por la calicreína puede ser la responsable de la fibrinogenolisis, independientemente que la formación de trombina, va a dar consumo de fibrinógeno. La reducción en la concentración de fibrinógeno que se observó en forma progresiva en la mayoría de los pacientes del grupo I puede ser explicada en base a estos antecedentes: 1) consumo por trombina, 2) fragmentación por plasmina.

La técnica utilizada para medir los PFF no discrimina el origen de estos y se tendrían que emplear técnicas para medir el dímero " D ", el fibrinopéptido de cadena corta formado --

por acción de trombina, del fibrinopéptido de cadena larga -- formado por acción de plasmina para conocer en que medida participa cada uno de estos mecanismos en las manifestaciones de la coagulopatía. El efecto inhibitorio de las proteasas naturales no involucra solo a la trombina, sino también a la reptilasa ya que la mayoría de las veces que encontramos trombinas cortas, también se observó utilizando reptilasa. Desconocemos cual es su explicación, pero como otros venenos de serpiente es posible que se involucre el sistema fibrinolítico y algún otro inhibidor.

Por otra parte, la manera lógica de comprobar la hipótesis planteada en este trabajo, es con estudios prospectivos de este grupo de pacientes, en los que en forma seriada se hagan los estudios de coagulación, concentración de inhibidores de factores de la coagulación y de productos de fragmentación. La compensación de estos fenómenos pudiera hacerse con la administración de medicamentos anticoagulantes y fracciones de sangre ricas en inhibidores que permitan la obtención de niveles adecuados, para ejercer su efecto fisiológico, o bien combinando anticoagulantes (Heparina con AT-III) in vitro ya que la administración separada de cada uno de los componentes podría limitar su uso. La actividad del sistema retículo endotelial mediado por la fibronectina puede ser un factor determinante en la evolución que tengan los pacientes.

FASE DE CONTACTO E INHIBIDORES



CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en éste trabajo - acerca de las causas del acortamiento del tiempo de trombina, se puede concluir lo siguiente:

- El acortamiento en el tiempo de trombina no se debe a anomalías en la molécula de fibrinógeno puesto que las pruebas que la valoran resultaron normales.

- Factores tales como pH y calcio séricos no están relacionados con el acortamiento en el tiempo de trombina de los pacientes sépticos, ya que se necesitarían variaciones grandes de los dos factores para que pudieran acortarlo.

- La disminución de la actividad funcional de la AT-III puede por sí sola explicar el acortamiento del tiempo de trombina, ya que de ella depende la neutralización de la enzima - trombina en un 80 %.

- La disminución de la AT-III seguramente es por consumo ya que la determinación inmunológica estuvo en concentraciones normales. Esto necesariamente apoya la mayor generación de trombina. Para ello se enuncia una hipótesis en la que se relaciona la activación del sistema de contacto a través de la endotoxemia, daño vascular y tisular operatorio con incremento de calicreína, disminución de inhibidores de contacto, activación y consumo de plasminógeno y disminución de la α_2 -antiplasmina.

- No puede afirmarse que el acortamiento del TT sea de valor pronóstico debido a que no se sabe la causa exacta que lo provoca, aunque se halla notado que algunos pacientes tuvieron TT corto el día de su mayor gravedad o incluso el día de su muerte. Otra de las causas por las que no puede concluirse el valor pronóstico del Ttc es el hecho de que los pacientes estudiados no son homogéneos, sino que cursan con diferentes fallas orgánicas múltiples que deben tomarse en cuenta.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bloom, Arthur L. and Duncan, P. Thomas. (1981).
The fibrinolytic system. Hemostasis and Thrombosis.
Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne and
New York. p. 193.
- 2.- Bloom, Arthur L. and Duncan, P. Thomas. (1981).
The contact phase of blood coagulation. Hemostasis and
Thrombosis. Churchill Livingstone. Edinburgh London --
Melbourne and New York. p. 84.
- 3.- Bowie, Walter and Sharp, A.A. (1985). Fibrinolysis: --
mechanism and clinical aspects. Hemostasis and Thrombosis
Butterworths, London, p. 237.
- 4.- Rosenberg, Robert D. and Rosenberg, Judith S. (1984).
Natural Anticoagulant Mechanisms. J. Clin. Invest. 74:1
- 5.- Mammen. (1983). Inhibitor Abnormalities. Seminars in ---
Thrombosis and Hemostasis. 9:1:42.
- 6.- Kolmer, John A. (1981). Diagnóstico Clínico por los ---
Análisis de Laboratorio. Nueva Editorial Interamericana -
S.A. de C.V. Tercera Edición México, D.F. p. 302.
- 7.- Mason, John J., Klecberg, Ulrich., Dolan Patricia and --
Colman, Robert W. (1970). Plasma Kallikrein and Hageman
Factor in Gram-Negative Bacteremia. Annals of Internal --
Medicine. 75:545.
- 8.- Brown, Barbara A. (1976). Técnicas de Laboratorio en ---
Hematología. Editorial JIMS. p. 144.
- 9.- Hawiger, J., et. al. (1978). Interacción of human fibrino
gen derivatives. Blood. 51:799.
- 10.- Ruiz Reyes, G. y Jiménez, V.T. (1965). Técnica rápida de
microprecipitación en tubo capilar para determinación de-
fibrinógeno. Rev. Mex. Lab. Clin. 17:204.
- 11.- Roitt, Ivan. (1984). Essential Immunology. Blackwell ---
Scientific Publications. Fifth Edition. p. 147.

- 12.- Von Felten, A., Duckert, F., Frick, P.G. (1966).
 Familial disturbance of fibrin monomer aggregation.
 Br. J. Haematol. 12:667.
- 13.- Silverstein, Eduard B., Ingraham III, Samuel C. and ---
 Kereiakes, James G. (1973). The Determination of Optimum
 Glycine Concentration for the Preparation of Human Fibrin-
 ogen at Ambient Temperatures. Thrombos. Diathes. ---
 Haemorrh. (Stuttg). 29:572.
- 14.- Forman, W.B., Boyer, M.H., Ratnoff, O.D. (1968). An inhe-
 rited qualitative abnormality in plasma fibrinogen Cleve-
 land. J. Lab. Clin. Med. 72:455.
- 15.- Frantzen, Handeland G., et. al. (1983). Simplified ---
 assay for antithrombin III activity using chromogenic --
 peptide sustrate. Manual and automated method.
 Scand. J. Haematol. 45:607.
- 16.- Al-Mondhiry. (1975). Fibrinogen " New York " : An abnor-
 mal fibrinogen associated with thromboembolism. Functio-
 nal evaluation. Blood. 45:607.
- 17.- Carrel, N., et. al. (1983). Hereditary dysfibrinogenaee--
 mia in a patient with thrombotic disease. Blood. 62:439.
- 18.- Vargas Linarcs, M.E., González Llaven, J., Díaz Maqueo.
 H. Grel. C.M. La Raza. IMSS. " Cathodic mobility, abnor-
 mal ultrastructure and resistance to plasmin digestion -
 fibrinogen characteristics in a nephrotic syndrome.
 XVII Congress of the International Society of Hematology
 Paris. Abstract. p. 693.
- 19.- Amado, J., et. al. (1982). Mechanism responsable for ---
 hyperfibrinogenemia in the diabetics. Sangre (Barc.). --
 27:145.
- 20.- Ruiz Arguelles, G., et. al. Alteraciones hemostáticas en
 diabétes mellitus idiopática. Memorias de la XXI Jornada
 Anual de la Asociación Médica al Estudio de la Hematolo-
 gía. Acapulco: 26-31 de Oct. y lo. de Nov. (1980).

- 21.- Martínez, J., Palascak, J. (1977). Role of sialic acid - in the dysfibrinogenemia associated with liver disease. Abstracts Vith. International Congress on Thrombosis and Hemostasis. Thromb. Haemost. 38:169.
- 22.- Martínez, Jose., Karen, A.Mc.D. (1983). The role of --- sialic acid in the dysfibrinogenemia associated with -- liver disease: distribution of sialic acid on the constituents chains. Blood. 61:1196.
- 23.- Torres, Manuel., Lucia, Jose Felix., et. al. (1976). Disfibrinogenemia adquirida en un neonato afecto de -- sepsis bacteriana. Sangre. 22:2:399.
- 24.- Colman, Robert W., Hirsh, Jack. (1982). Hemostasis and - Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. J.B. Lippincott Company. p. 192.
- 25.- Esmon, Charles T. (1983). Protein-C : Biochemistry, --- Physiology and Clinical Implications. Blood. 62:1155.
- 26.- Comp, Philip C., Nixon, Randal R., Esmon, Charles T. -- (1984). Determination of functional levels of Protein C an antithrombotic protein, using thrombin-thrombomodulin complex. Blood. 63:1:15.
- 27.- Bertina, R.M., Broekmans, A.W. (1982). Protein-C defi-- ciency in a dutch family with thrombotic disease. Thromb. Haemost. (Stuttgart). 48:1-
- 28.- Schwarz, Hans Peter., et. al. (1984). Plasma Protein S deficiency in familial thrombotic disease. Blood. 64:1297.