

24/7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "ZARAGOZA"

**OBTENCION DE TROMBOPLASTINA
TISULAR**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
ROCIO CORDOVA BUSTAMANTE



MEXICO, D. F.

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

CAPITULO 1.	INTRODUCCION	
1.1.	ANTECEDENTES HISTORICOS	1
1.2.	SISTEMA DE COAGULACION	3
1.3.	TROMBOPLASTINA TISULAR	18
1.4.	FUNDAMENTO DEL METODO DE QUICK	28
1.5.	VALORES NORMALES	29
1.6.	DEFICIENCIAS Y ALTERACIONES EN EL SISTEMA DE COAGULACION	33
1.7.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA	33
CAPITULO 2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
CAPITULO 3.	OBJETIVOS	
3.1.	OBJETIVO GENERAL	41
3.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	41
CAPITULO 4.	HIPOTESIS DE TRABAJO	
	HIPOTESIS DE TRABAJO	42
CAPITULO 5.	MATERIAL Y METODOS	
5.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	43

5.2.	EQUIPO	43
5.3	MATERIAL	43
5.4.	METODOLOGIA	45
CAPITULO 6. RESULTADOS		
6.1.	ESTANDARIZACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR	51
6.2.	VALIDACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR OBTENIDA EN LA E.N.E.P. ZARAGOZA	54
6.3.	ESTABILIDAD ACELERADA	57
CAPITULO 7. DISCUSION DE RESULTADOS		
	DISCUSION DE RESULTADOS	68
CAPITULO 8. CONCLUSIONES		
	CONCLUSIONES	70
CAPITULO 9. BIBLIOGRAFIA		
	BIBLIOGRAFIA	71
APENDICE 1.	74
APENDICE 2.	75

1. INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

Un corto esbozo histórico del estudio de la coagulación, sirve como antecedente para apreciar los descubrimientos concernientes a éste importante proceso fisiológico. Antes de llevarse a cabo los métodos experimentales, la coagulación solo fué vista como la solidificación de la sangre líquida. La primera evidencia de que solo una sustancia de la sangre, es responsable del fenómeno visible de la coagulación, fué dado por Malpighi (1666), quien dió a conocer la existencia de una masa filamentososa de color blanco, que permanece estable, después de efectuar lavados del coágulo de sangre. Hewson y Chaptal (1770) separaron un sólido de la sangre, al que llamaron fibrina. (12, 31).

Aparentemente, el primer suceso para probar el precursor de la fibrina en la sangre, fué dado por Denis (1859), logró precipitar un sólido gelatinoso al que llamó plasmina. Este material fué redisoluto en agua, obteniéndose fibrina y una proteína soluble. De ésta forma, en el transcurso de 100 años la existencia de la fibrina y de su precursor, ahora conocido como fibrinógeno, quedó establecida.

Buchanan (1835) introdujo la importante idea, de que en la sangre existe un agente primordial, que es responsable de la coagulación. Más tarde Alexander Schmidt (1861), descubrió que la fibrina resulta de la interacción del fibrinógeno con fibrinoplastina que es un constituyente del suero, al que llamó para-globulina. Encontró que un tercer factor es necesario, y lo llamó fermento de fibrina; presente en suero y que puede ser obtenido de sangre coagulada. Este factor ahora es conocido como trombina. Al mismo tiempo, Hammarsten (1880) logró el aislamiento del fibrinógeno del plasma y observó que éste coagula con el fermento de Schimdt, con lo que se eliminaba a la fibrinoplastina como un elemento esencial en el mecanismo de coagulación.

Mills (1883) adoptó el término de fibrinógeno tisular, para designar al factor proporcionado por las células; definió su constitución química, basada en los grupos de fosfolípidos e iones calcio. Morawitz (1904) presentó la hipótesis en la que la trombina es formada por la activación de protrombina por la acción de la tromboplastina; esta última, un activador orgánico o también llamado cinasa. Bordet encuentra que el factor tisular o Citozima se combina directamente en diferentes proporciones con -

la protrombina, en presencia de calcio para dar trombina. Howel (1912) encuentra, - que los fosfolípidos del factor tisular son de naturaleza de cefalina y que su actividad tromboplástica es debida a su composición de ácidos grasos en su molécula. Fischer- (1934) descubrió que la actividad tromboplástica es debida a complejos de cefalina y- cerebrósidos. (12, 31, 32).

1.2. SISTEMA DE COAGULACION

1.2.a. MECANISMO DE CONTROL HEMOSTATICO

El mecanismo hemostático comprende una serie de reacciones integradas de las paredes vasculares, plaquetas y factores de coagulación, cuyo único fin es mantener o reestablecer la integridad vascular. Este mecanismo es un sistema de equilibrio influido por el tamaño de los vasos, las alteraciones hereditarias o adquiridas de las concentraciones plasmáticas de los factores de coagulación y también por los inhibidores presentes en el plasma normal o asociados a estados patológicos. Las variaciones de cualquiera de estos factores, pueden llevar a excesiva hemorragia o trombosis. La hemostasia y la trombosis pueden considerarse como la respuesta de la sangre a la injuria vascular. (20, 21, 34).

La serie de reacciones del sistema hemostático incluyen: vasoconstricción local, hemostasia primaria o formación del trombo plaquetario, hemostasia secundaria o formación del coágulo de fibrina y fibrinólisis ó disolución del coágulo de fibrina. Estos mecanismos no son independientes uno de otro y su desarrollo es una secuencia que depende del papel que cada uno desempeña en la hemostasia. (Fig. No. 1).

A. Vasoconstricción local.

Cuando la sangre fluye a través de vasos normales, sus constituyentes entran en contacto con un tapizado continuo de células endoteliales, formando una barrera efectiva para los componentes macromoleculares del plasma para globulos rojos y plaquetas. Este tapizado endotelial puede perturbarse por un trauma mecánico o por acción de agentes circulantes como endotoxinas bacterianas o bien por cambios en la estructura del endotelio. Se supone que las plaquetas desempeñan la función de mantener la integridad vascular cubriendo las pequeñas uniones entre las células endoteliales.

El restablecimiento de la integridad vascular después de un daño en los capilares puede lograrse resellando rápidamente por contracción del vaso. Cuando el tamaño del vaso aumenta, la vasoconstricción viene a ser menos importante entre los factores que limitan la cantidad y llevan a paro de la hemorragia. La vasoconstricción es producida por estímulo químico, provocado por la salida de sustancias vasoconstrictoras de las plaquetas, como la serotonina y prostaglandinas. Al mismo tiempo, en el

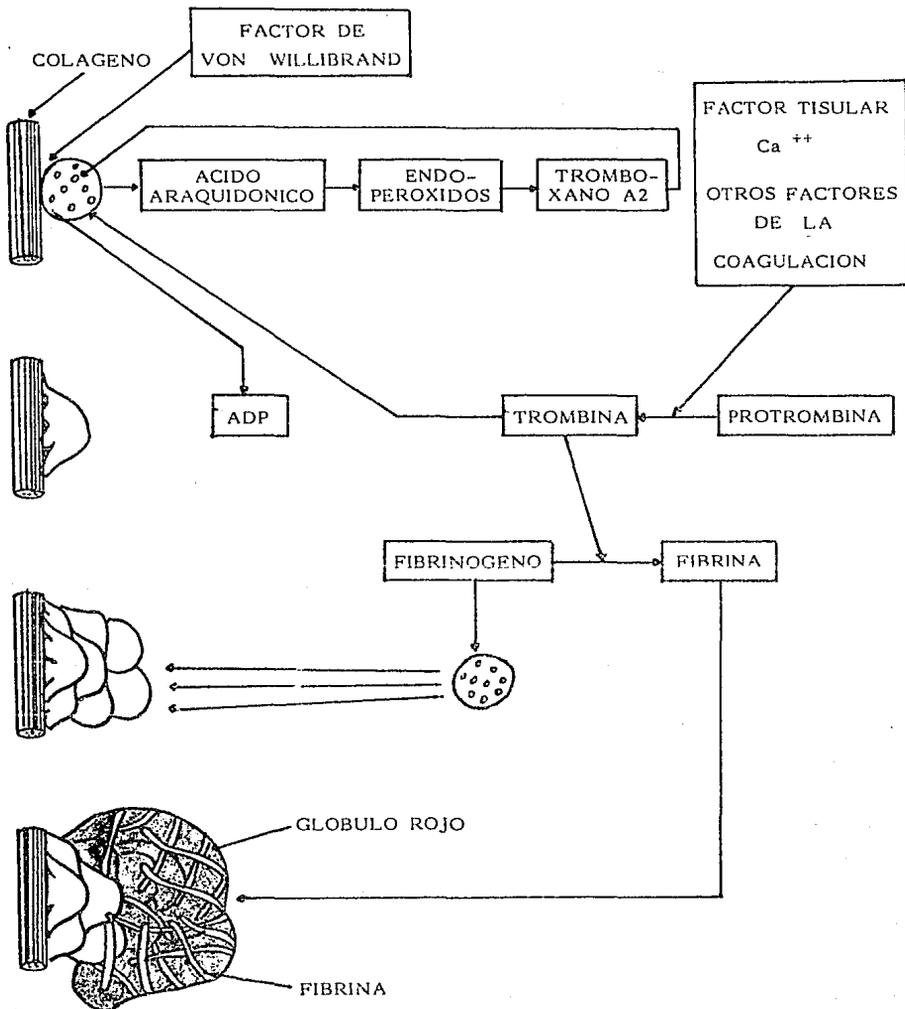


Fig. No. 1 Interacciones complejas del mecanismo de coagulación

endotelio vascular se sintetiza una prostaglandina, la prostaciclina (PG12), que posee acción vasodilatadora.

La síntesis de las prostaglandinas en las plaquetas es producida al estimular la membrana con inductores como la trombina, se activa una enzima en la membrana que libera el ácido araquidónico y tromboxano A2. (Fig. No. 1). (34, 37).

B. Hemostasia primaria

Es también llamada formación del trombo plaquetario; si un vaso está dañado y hay interrupción del tapizado endotelial, las plaquetas se adhieren a estructuras como microfibrillas, la membrana basal y al colágeno del tejido conjuntivo. Esta reacción se asocia a un cambio de forma de las plaquetas de discooidal a esférica y formación de pseudopodos; seguida de la liberación de sustancias de almacenamiento como adeninucleótidos (ATP y ADP), aminas vasoconstrictoras, enzimas lisosomales e intermediarios del metabolismo de plaquetas (endoperóxidos de prostaglandinas, tromboxano A2). Estas modificaciones hacen que plaquetas vecinas sufran el cambio de forma y se adhieran a las plaquetas ya adheridas al vaso dañado, provocando el cierre del defecto vascular y el fin de la hemorragia por formación del tapón hemostático de plaquetas. (Fig. No. 2) (19, 34, 37).

C. Hemostasia secundaria

La placa inicial de plaquetas se estabiliza más tarde por activación del proceso de coagulación, tanto por vía intrínseca:

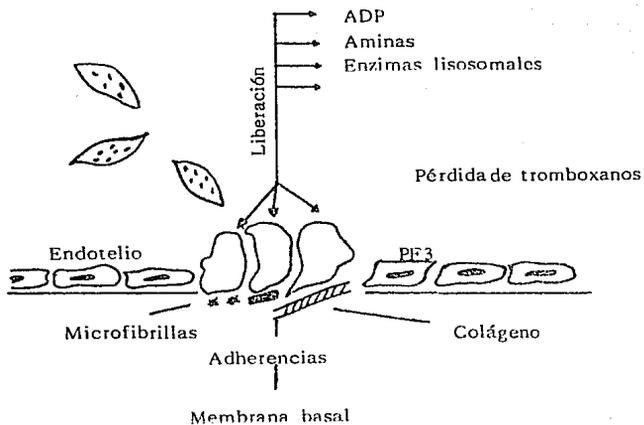
Colágeno → factor XII, plaquetas → factores XII y XI

y en vía extrínseca / común:

Factor tisular → factor VII, plaquetas → fosfolípidos PF3

Este mecanismo activado de coagulación, lleva a la formación de una pared de fibrina que rodea a las plaquetas adheridas. La pared hemostática queda así firmemente anclada a los bordes de la pared del vaso lesionado. (Fig. No. 2).

Hemostasia Primaria



Hemostasia secundaria

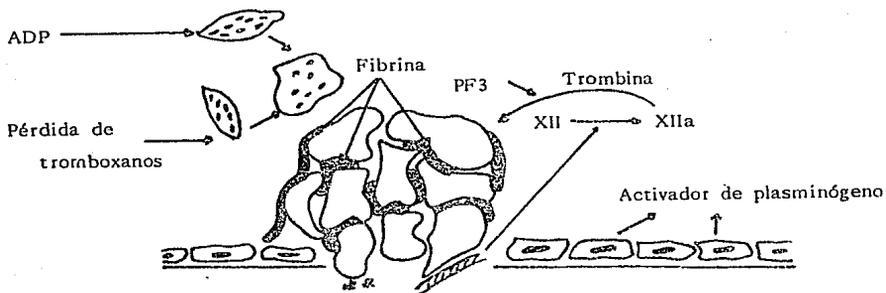


Fig. No. 2 Esquema de los eventos que intervienen en la hemostasia primaria y secundaria. (36)

D. Fibrinólisis

El sistema fibrinolítico es el mecanismo responsable de la degradación enzimática del coágulo de fibrina. Es importante que exista un balance entre el sistema de coagulación y el sistema de fibrinólisis. El mecanismo fibrinolítico está representado por la transformación de plasminógeno en plasmina, una enzima proteolítica. (8, 19, 20).

La plasmina digiere tanto al fibrinógeno como a la fibrina. La acción sobre el fibrinógeno es progresiva y los productos iniciales son grandes moléculas que todavía coagulan bajo la influencia de la trombina; apareciendo más adelante moléculas más pequeñas que la trombina ya no puede coagular. Estos productos impiden la conglomeración, adherencia y metamorfosis de las plaquetas; además se ejerce un efecto inhibitorio potente sobre la polimerización de la fibrina. Al incorporarse el polímero de fibrina disminuye su ritmo y da lugar a un coágulo de fibrina sumamente frágil. (5, 8, 19, 20, 34, 36).

El sistema fibrinolítico se esquematiza en la Fig. No. 3

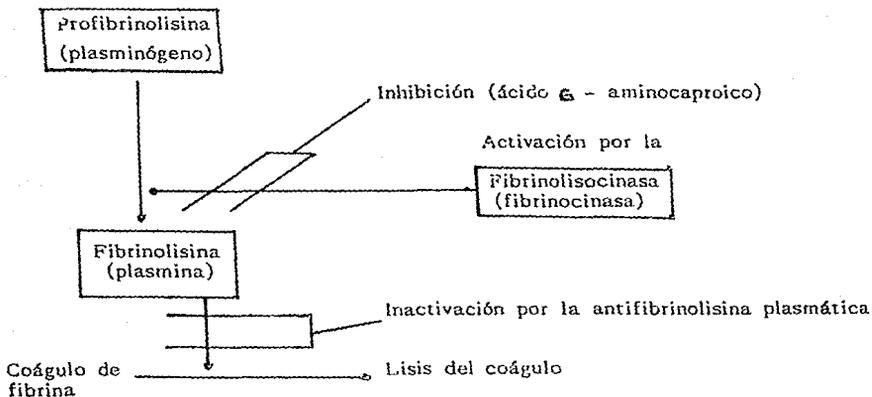


Fig. No. 3. Sistema fibrinolítico. (8)

1.2.b. FISILOGIA DE LA COAGULACION

Nos cortamos y sangramos, pero la hemorragia se detiene, la sangre se coagula. Los fragmentos celulares denominados plaquetas tienen la propiedad de adherirse al punto donde existe la solución de continuidad, cerrando parcialmente la abertura. Las plaquetas poseen otra importante función, en su superficie se concentra un ejército enzimático cuyo producto final será una proteasa llamada trombina. El blanco de tal proteasa es el fibrinógeno.

Se pone en marcha además, un segundo proceso. La pared del vaso seccionado (al igual que otros tejidos lesionados), contiene un factor tisular que inicia la coagulación sanguínea. La exposición de la sangre a dicho factor, dispara una compleja serie de reacciones en virtud de las cuales, una proteína plásmatica, la protrombina, se convierte en trombina. Bajo la acción de la trombina, el fibrinógeno experimenta una notable transformación: sus moléculas alteradas se encadenan espontáneamente formando un polímero fibrilar, denominado fibrina, principal constituyente del coágulo sanguíneo. Los haces de fibrina se originan en una red; este trenzado, que surge sólo en las proximidades de las plaquetas adheridas, donde se genera la trombina, transforma localmente el plasma sanguíneo en un gel.

Estos pasos de la coagulación pueden esquematizarse de la siguiente manera ---
Fig. No. 4.

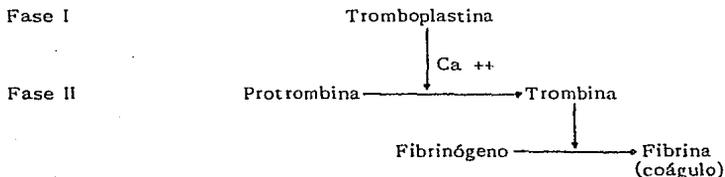


Fig. No. 4. Principales pasos de la Coagulación. (8)

La coagulación de la sangre ha sido considerada como un proceso enzimático, recibiendo diferentes expresiones como "cascada" o "manantial", hipótesis propuestas por MacFarlane y por Davie y Ratnoff (1944). La coagulación se percibe como una

secuencia de reacciones estrechamente acopladas en las cuales los factores de coagulación que circulan como precursores enzimáticos inactivos se convierten en enzimas activas, actuando cada factor primero como sustrato y después como enzimas. Un esquema de esta cascada se ilustra en la Fig. No. 5.

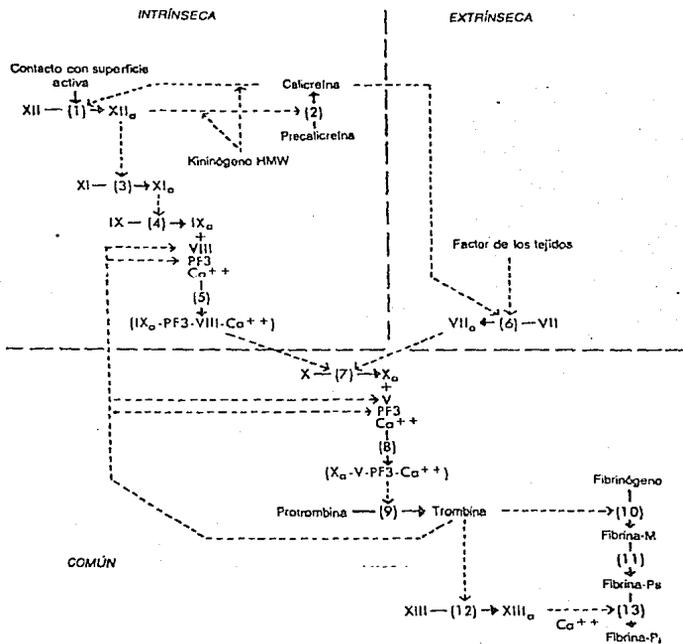


Fig. No. 5 Esquema modificado de la hipótesis de "cascada" del mecanismo de coagulación. (36)

En este proceso enzimático, la coagulación es activada por dos vías diferentes un sistema intrínseco iniciado por activación de contacto con el factor XII, de - - - Fletcher, de Williams, XI, IX, VIII y fosfolípidos (factor 3 de las plaquetas) y un sistema extrínseco, desencadenado por activación del factor tisular y del factor VII. - Ambas vías desembocan en una vía común que concluyen los factores X, V, 3 de plaquetas, protrombina y fibrinógeno.

A. VIA INTRINSECA

A.1. Fase de contacto

El primer paso que desencadena la coagulación por vía intrínseca, incluye la unión del factor XII a una superficie activa o extraña, como el colágeno y otros activadores como endotoxinas. La unión a estas superficies se considera asociada a un cambio conformacional de la molécula del factor XII, que puede exponer el sitio activo de la enzima (reacción 1). El factor XIIa generado convierte la precalicreína en calicreína (reacción 2), que parece requerir un cofactor, el kininógeno KMW (factor de Williams) y llega a la activación directa del factor XII por un mecanismo de retroalimentación positiva. El factor XIIa convierte el factor XI en la enzima activa XIa (reacción 3), que también requiere kininógeno KMW. Esta activación parece tener un papel importante en la activación de otros tres sistemas enzimáticos biológicos:

- a. El sistema plasminógeno-plasmina que es capaz de la degradación proteolítica y remoción de depósitos vasculares de fibrina.
- b. El sistema calicreína-bradikina que desempeña un papel importante en el sistema inflamatorio.
- c. El sistema de complemento, que interviene en el sistema de defensa inmunológico.

Esta fase se esquematiza en la Fig. No. 6.

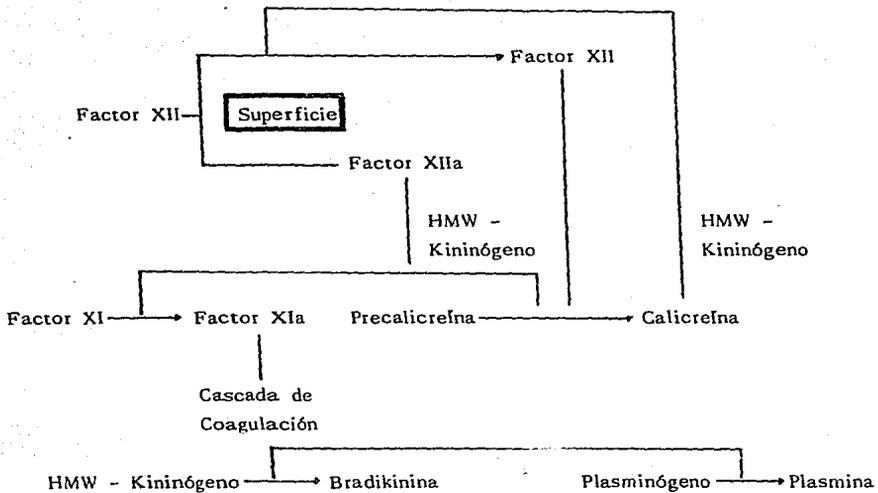


Fig. No. 6 Reacciones de la fase de contacto de la coagulación sanguínea. (37)

A.2. Formación de complejos de activador del factor X.

El factor XIa actúa sobre su sustrato natural, el factor IX para formar IXa (reacción 4), que requiere de iones calcio. La última reacción de la vía intrínseca (reacción 5), consiste en una interacción no enzimática entre el factor IXa, PF3 (fosfolípido en forma de plaquetas activadas) el factor VIII y los iones de calcio para formar un complejo muy activo (complejo activador del factor X), que es capaz de activar al factor X.

B. VIA EXTRINSECA

El mecanismo extrínseco empieza cuando la sangre entra en contacto con tejidos traumatizados, este tejido libera dos factores que inician el proceso de coagulación. Estos factores son: el factor tisular y fosfolípidos tisulares; éstos, activan la proenzima factor VII (reacción 6). Aunque el factor de los tejidos forma un complejo compacto con factor VII durante éste proceso de activación, el factor VIIa separado de la actividad del factor tisular, activa probablemente el factor X. La conversión del factor - - VII en factor VIIa puede inducirse con calicreína, reacción que puede ser un eslabón entre el sistema intrínseco y el extrínseco. (Fig. No. 7)

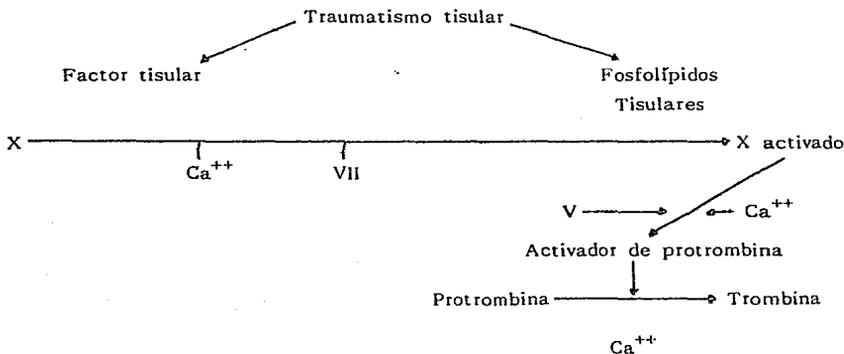


Fig. No. 7 Vía extrínseca de la coagulación. (20)

C. VIA COMUN DEL MECANISMO DE COAGULACION

C.1. Formación del complejo conversor de protrombina

La primera reacción de la vía común incluye la conversión del factor X en el factor Xa (reacción 7) en presencia de iones calcio, que puede lograrse por complejo de activación del factor X formado en la reacción 5 de la vía intrínseca, o por el factor VIIa formado en la reacción 6 de la vía extrínseca. El factor Xa forma un complejo reversible con el factor V (reacción 7) y iones de calcio (complejo conversor de protrombina), que es un poderoso activador de la protrombina.

C.2. Activación de la Protrombina

El complejo conversor de protrombina (reacción 8), actúa sobre su sustrato, protrombina (reacción 9). La activación de protrombina a trombina parece ocurrir en varios pasos, con tres productos proteolíticos intermedios. La trombina es una serina-proteasa que consiste en una cadena pesada con un peso molecular de 32 000. Se ha observado que trazas de trombina provocan activación de factores V y VII; por esta razón, la trombina puede tener un papel fundamental de amplificador o autocatalizador del sistema de coagulación.

C.3. Formación y polimerización de fibrina

Después de la activación de la protrombina, la trombina convierte al fibrinógeno en fibrina monómera (reacción 10). El monómero de fibrina está formado por el 97% de los residuos de aminoácidos del fibrinógeno original, constituido por péptidos de bajo peso molecular (fibrinopéptido A y B) de cada uno de los pares de cadenas A- α y B- β en el extremo N-terminal de la molécula. Una vez formado el monómero de fibrina (fibrina M) se polimeriza espontáneamente con aparente agregación extremo a extremo y lado a lado (reacción 11). Los monómeros están unidos por ligaduras no covalentes relativamente débiles que pueden disociarse fácilmente por exposición del polímero a urea 5M, de donde viene el nombre de polímero de fibrina soluble (fibrina Ps). La fibrina M formada en la sangre puede también unirse al fibrinógeno para formar complejos de fibrina solubles (SFC).

C.4. Estabilización de fibrina

La fibrina formada en la sangre normal se convierte rápidamente en polímero de fibrina insoluble (fibrina Pi) (reacción 13) que incluye la unión cruzada covalente de las cadenas γ (y en grado menor las cadenas α) de los monómeros de fibrina adyacentes. Esta reacción está catalizada por una enzima, el factor XIIIa, que se forma con un precursor inactivo por trombina (reacción 12) y requiere la presencia de iones calcio. La fibrina Pi es mucho más resistente que la fibrina Ps a la proteólisis de la plasmina, es entonces el producto final de la vía común de la cascada de la coagulación. (Fig. No. 8)

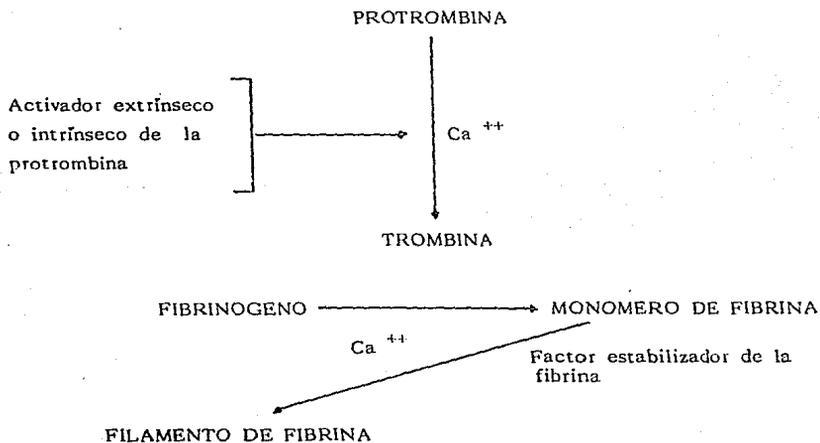


Fig. No. 8 Estabilización de fibrina. (9)

1.2.c. BIOQUIMICA DE LOS FACTORES DE COAGULACION

Excepto por el calcio, los factores plasmáticos de la coagulación son todos proteínicas. La nomenclatura usada para estos factores ha presentado muchos problemas; resolviendo esta dificultad la Comisión Internacional de Nomenclatura, les ha designado números romanos, según el orden en que fueron descubiertos y no indicando el lugar que ocupan en el mecanismo de coagulación. Estos factores se presentan en la tabla No. 1.

Tabla No. 1

Nomenclatura internacional y sinónimos para los factores de coagulación. (7).		
Números Romanos	Nombre Preferido	Sinónimos
I	Fibrinógeno	
II	Protrombina	Protrombina
III	Factor Tisular	Tromboplastina Tisular
IV	Calcio	
V	Proacelerina	Factor lábil, Globina aceleradora (AcG).
VI	No asignado	
VII	Proconvertina	Factor estable, acelerador de la -- conversión de protrombina sérica - (SPCA), Autotrombina I
VIII	Factor Antihemofílico (AHG).	Globulina antihemofílica (AHG) Factor antihemofílico A, Factor plaquetario I
IX	Componente plasmático de tromboplastina (PTC)	Factor de Christmas, Autotrombina II, Cofactor plaquetario II, Factor antihemofílico B
X	Factor de Stuart	Factor de Stuart-Prower, Autotrombina III, Tromboquinasa
XI	Antecedente plasmático de tromboplastina (PTA)	Factor antihemofílico
XII	Factor Hageman	Factor de contacto
XIII	Factor estabilizador de la fibrina.	Fibrinasa, Factor de Laki-Lorand.

Los números denotan los factores que existen en el plasma, excepto el factor III, que no se encuentra ahí. Los fosfolípidos ó fofolipoprotefnas no se les ha asignado número, pero las fosfolipoprotefnas de las plaquetas, son conocidas como el -- factor tres de las plaquetas. (5, 7, 19, 37).

En la tabla No. 2 se presentan algunas propiedades de los factores de coagu--- lación, designados por números romanos.

Tabla No. 2

Algunas propiedades de los factores de coagulación. (7)

Factor	Bioquímica	Sitio de síntesis	Vida media Biológica (horas)	Actividad en el suero	Función	Deficiencia con Hemorragia manifiesta
Fibrinógeno	Glucoproteína PM 340 000	Hígado	77-108	Ausente	Precursor de la fibrina	si
Protrombina	Glucoproteína PM 70 000	Hígado, dep. Vit. K	68	Ausente	Proenzima	si
V	Glucoproteína PM 30 000	Hígado	20	Ausente	Cofactor	si
VII	Glucoproteína PM 63 000	Hígado, dep. Vit K	4-6	Aumentado	Proenzima	si
VIII	Glucoproteína PM 1 100 000	Hígado, RES	9-15	Ausente	Cofactor	si
IX	Glucoproteína PM 72 000	Hígado, dep. Vit K.	20-30	Aumentado	Proenzima	si
X	Glucoproteína PM 55 000	Hígado, dep. Vit K.	32-48	No cambia	Proenzima	si
XI	Gamma-2-globulina PM 164 000	Hígado ?	48-84	No cambia	Proenzima	si
XII	Beta-globulina PM 80 000	?	52-60	Disminuido	Proenzima	no
XIII	Alfa-2-globulina PM 320 000	Hígado ?	108-168	Disminuido	Proenzima	si

1.3. TROMBOPLASTINA TISULAR

13.a. GENERALIDADES

La tromboplastina tisular puede ser definida como un complejo presente en plaquetas y en varias células de tejidos, interviene esencialmente en la conversión de protrombina a trombina, iniciando la vía extrínseca de la coagulación. Al parecer, las plaquetas son la fuente de tromboplastina durante la coagulación de la sangre total. Los términos originales para esta sustancia fueron: trombocinasa (Morawitz), citocima (Fuld y Spiro), sustancia zimoplástica de Schmidt, tromboplastina (Howell), término comunmente usado en América. Una variedad de términos como extracto de tejidos, fibrinógeno tisular, trombocima, factor de fosfolípidos, fueron empleados. Se le ha asignado por el Comité Internacional para la Nomenclatura de los factores de la coagulación sanguínea, el término de factor III. (5, 19, 30, 31).

13.b. COMPOSICION QUIMICA

La tromboplastina tisular aislada de diferentes tejidos es un complejo de proteína-fosfolípidos. La composición y purificación de este factor se obruvo con la ayuda de métodos como filtración en gel con Sephadex G-100 y electroforesis empleando desoxicolato de sodio y dodecil sulfato de sodio como detergentes. (3, 10, 24).

El contenido de carbohidratos del factor se presentan en la tabla No. 3. La cantidad total de carbohidratos en la molécula de la proteína es calculada alrededor de 6.3. g/100 g.

La composición de la parte lípida del factor se reporta en la tabla No. 4. El factor tisular purificado, contiene aproximadamente un 7% de fosfolípidos en su constitución. Es necesaria la recombinación de 7.5 mg. de fosfolípidos por mg. de proteína para que el factor tenga su máxima actividad coagulante. (3, 10, 18, 24).

Tabla No. 3

Contenido de carbohidratos del factor tisular. (3)

	Contenido (mol de carbohidrato/mol de proteína)	
Fructosa	2.4	± 1.1
Manosa	6.0	± 0.7
Galactosa	7.4	± 0.5
N-Acetilglucosamina	2.6	± 1.0
N-Acetilneuraminato	0.7	± 0.8

Tabla No. 4

Contenido de lípidos del factor tisular. (3)

	Contenido (gramos/100 gramos de lípido total)	
Colesterol + ac. grasos libres	12	- 23
Fosfatidilcolina	34	- 43
Fosfatidiletanolamina	13	- 22
Lisofosfatidilcolina	5	- 16
Esfingomielina	7	- 9
Fosfatidilserina	6	- 7
Fosfatidilinositol	trazas	

Los fosfolípidos son una gran clase de lípidos complejos, son también llamados-fosfogliceridos ó gliceril-fosfátidos. Los fosfogliceridos son sólidos blancos de consistencia cerea, que por exposición al aire se oscurecen, ya que sus ácidos grasos no saturados tienden a oxidarse por la acción del oxígeno atmosférico. Los fosfolípidos son solubles en muchos solventes no polares que contengan cierta cantidad de agua--son extraídos adecuadamente de las células mediante mezclas de cloroformo y metanol. Cuando los fosfogliceridos se adicionan al agua, se disuelven. La mayor parte del lípido disuelto se halla en forma de micelas dispersas en el sistema acuoso. El grado de insaturación u oxidación de los ácidos grasos y el tamaño de las micelas --formadas, son parámetros importantes. Una carga negativa en la superficie de la micela es esencial en la actividad coagulante. (2, 9, 14, 37).

Los más abundantes en las plantas superiores y en los animales son la fosfatidil-colina y la fosfatidil-etanolamina, conocidos como lecitina y cefalina respectivamente. Las lecitinas contienen glicerol, ácidos grasos,, ácido fosfórico y colina, están distribuidas en el organismo y tienen funciones metabólicas y estructurales importantes.

La fosfatidiletanolamina difiere de las lecitinas solo en su cabeza aminoalcohol, que en éstas es una etanolamina.

El fosfatidil-inositol (lipositol) tiene como grupo de cabeza al azúcar-alcohol --cíclico de seis carbonos llamados inositol, se ha encontrado en tejidos encefálico.

La fosfatidil-serina, se ha encontrado en tejido nervioso. En ésta, el grupo hidroxilo del aminoácido L-serina esta esterificado por el ácido fosfórico.

El fosfatidil-glicerido tiene como grupo de cabeza una molécula de glicerina, se encuentra frecuentemente en las membranas de las bacterias.

Intimamente relacionado con el fosfatidil-glicerido se encuentra la cardiolípinina. Esta es un lípido complejo constituido por una molécula de fosfatidilglicerido. Ambos fosfolípidos son característicos de las membranas celulares.

Las esfingomiélinas se encuentran en grandes cantidades en el encefalo y tejido nervioso de animales superiores. En la molécula de éstos compuestos no hay glicerol. Contienen fosforil-etanolamina o fosforil-colina como grupos de cabeza polares esterificados al grupo hidroxilo de la ceramida y contienen un aminoalcohol complejo.

1.3.c. DISTRIBUCION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR.

La tromboplastina esta ampliamente distribuida en el cuerpo. Aparece formando parte de muchas células de tejidos. El cerebro, pulmón, timo, testículos y otros -- órganos contienen gran cantidad de esta sustancia. Para el punto de vista de la coagulación de sangre, la tromboplastina contenida en las plaquetas es de suma importancia. La tromboplastina es un producto intracelular, no se encuentra libre en la sangre, linfa y fluidos intersticiales. Se ha encontrado que la saliva y la leche materna contienen tromboplastina y esta última tiene particularmente una elevada actividad -- tromboplástica. (3, 24, 32).

Es interesante que todos los tejidos activos parecen tener una rica reserva de tromboplastina así como el hecho de que extractos acuosos de cerebro y pulmón tengan una actividad tromboplástica cuando son probados con plasma recalcificado. Se -- consideró al observar la amplia distribución de la tromboplastina como una medida preventiva del organismo en el caso de una hemorragia interna, pero ésta explicación es cuestionable en el caso de la hemofilia. En éste caso, el contenido de tromboplastina en los tejidos es normal, sin embargo un sangrado interno es característico de esta enfermedad. La tromboplastina está distribuida en todas las partes del cuerpo.

La tromboplastina es un agente indispensable en el mecanismo de la coagulación, su presencia es necesaria, acompañada de los factores que intervienen en el mecanismo. (3, 24, 31, 32).

1.3.d. FUNCION DE LA TROMBOPLASTINA EN LA COAGULACION

Puede afirmarse que la sangre circulante mantiene su estado líquido debido a la ausencia de cantidades significativas de tromboplastina libre o disponible. Debe mencionarse que otros dos factores, el fibrinógeno y la protrombina se presentan libres en la sangre, y se encuentran en concentraciones muchas veces, mayores que las requeridas fisiológicamente. La tromboplastina en marcado contraste, es el factor limitado en el sistema de coagulación. (3, 32).

La relación de liberación del factor tisular, determina el tiempo de coagulación y es considerada como la sustancia disparadora de este mecanismo.

Esta relación puede expresarse de mejor forma en la Fig. No. 10

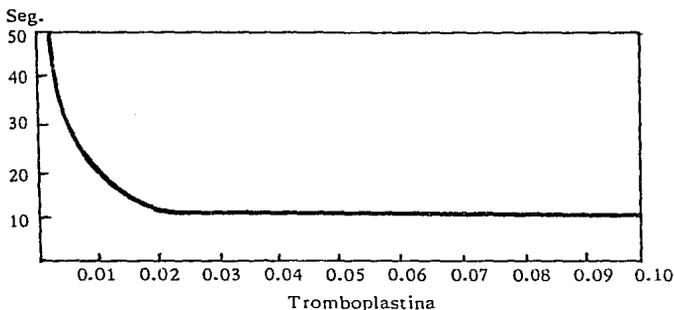


Fig. No. 10 Relación del tiempo de formación del coágulo contra la concentración de tromboplastina. (Se usaron 0.1 ml de plasma humano recalcificado y cantidades variables de tromboplastina tisular). (32).

Observamos que a elevadas concentraciones de tromboplastina el cambio en el tiempo de formación del coágulo, es exageradamente marcado para pequeñas variaciones de tromboplastina. Al aumentar la cantidad de ésta, el tiempo se acorta, hasta que un valor mínimo constante es obtenido. Al alcanzarse la concentración óptima de tromboplastina, el tiempo se establece entre 11-13 seg., considerándose este rango de tiempo como valor normal.

El suministro de tromboplastina en la sangre, es derivado de las plaquetas, que con su ruptura, liberan este factor. Por lo tanto, los factores que regulan la lisis o destrucción de las plaquetas, determinan el mecanismo de coagulación sanguínea. (3,-10, 32).

Diferentes escuelas sugieren el mecanismo de acción de la tromboplastina, una estima que su acción es de tipo enzimático y la otra establece que es de tipo químico.

El concepto enzimático fué propuesto por Morawitz y Douglas, quienes notaron la gran habilidad que tienen las enzimas proteolíticas como la tripsina. Esta actúa directamente sobre la protrombina para dar trombina; aumenta su potencia en presencia de calcio ionizado. Eagle y Harris propusieron que la tromboplastina constituye una

enzima proteolítica semejante a la tripsina en su constitución para activar el mecanismo de coagulación. Es importante enfatizar que este factor no cumple con las propiedades típicas de estas enzimas, por lo que esta teoría no quedó establecida. (31, 32, 37).

La segunda teoría, basándose en la ley de estequiometría, establece que la -- tromboplastina se une directamente a la protrombina para formar trombina. Al fijar una cantidad de protrombina y mezclarla con incrementos controlados de tromboplastina, la cantidad de trombina formada es directamente proporcional a la cantidad de tromboplastina, hasta llegar a una concentración en la que la producción de trombina es constante. (Fig. No. 11).

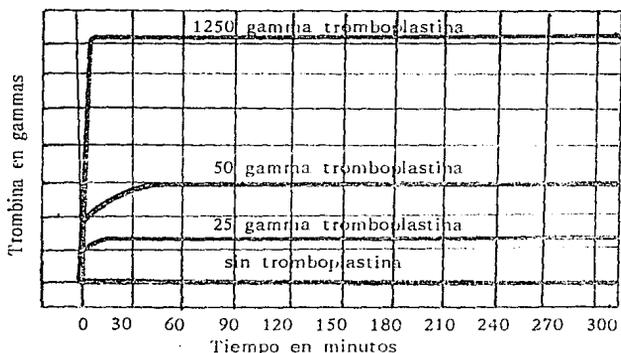


Fig. No. 11 Cantidad de trombina formada a partir de una cantidad constante de protrombina, variando la cantidad de tromboplastina. La concentración inicial de protrombina fué de 2300 - u/ml. (31).

En adición a la tromboplastina, un segundo factor es esencial para la activación de la protrombina, el calcio. En la sangre, este factor se presenta en dos formas, libre y unido o también llamado ionizado o no ionizado. Los iones calcio son importantes en tres pasos dentro del sistema de coagulación:

1. Durante la activación final de la tromboplastina, por activación de los productos tromboplastínicos del sistema intrínseco o extrínseco con el factor V y factor X.

2. Durante la transformación de protrombina en trombina, bajo la acción de la tromboplastina activa.
3. Durante la formación de fibrina. (Fig. No. 12)

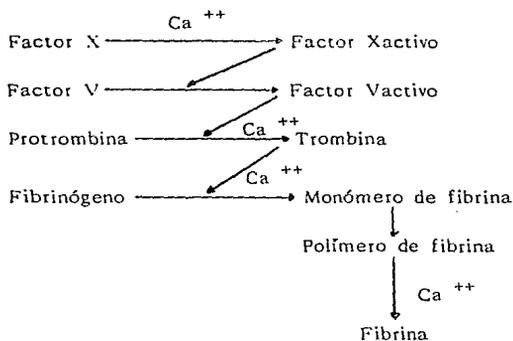


Fig. No. 12 Papel del calcio en la coagulación. (31)

Cuando se extrae sangre puede evitarse que ésta se coagule, disminuyendo la concentración de iones calcio por debajo del umbral necesario, esto se logra desionizándolo al hacerlo reaccionar con ión citrato provocando un complejo soluble calcio-citrato, o precipitándolo con iones oxalato. (2, 10, 16, 23, 32, 32).

13.e. ESTABILIDAD DE LA TROMBOPLASTINA

Es difícil determinar el efecto directo de la temperatura sobre la tromboplastina, mientras que el medio y la presencia de otras sustancias influyen enormemente sobre este factor. Los extractos de tejidos acuosos pierden relativamente poca actividad cuando hierve. Puede establecerse que la tromboplastina es más resistente que la protrombina, que se ve levemente afectada a 60° C.

Los extractos de pulmón después de ser sujetos a temperatura de ebullición por una hora, permanecen más activos que los extractos de cerebro, con lo que se deduce que los extractos de cerebro son más lábiles que los de pulmón. Estas variaciones pueden verse en la tabla No. 5.

Es probable que la tromboplastina purificada presente mayor estabilidad que los extractos crudos y la marcada resistencia al calor, debate la teoría que indica que la tromboplastina es una enzima. (13, 17, 31).

Tabla No. 5

Efecto del calor sobre la actividad tromboplástica de extractos hísticos. (31)

Temperatura (°C)	Tiempo de formación del coágulo	
	Extracto de cerebro de conejo. (segundos)	Extracto de pulmón de conejo. (segundos)
54	8	7.5
60	8	8
75	25	12
90	30	13
100	37*	15*
	50i	20i

Los extractos tisulares fueron calentados por 15 min. a la temperatura especificada.

* calentado por 10 min.

i calentado por 60 min.

La tromboplastina cuando es expuesta al aire, gradualmente se torna café y simultáneamente ocurre la pérdida de actividad. Almacenando las preparaciones en un tubo evacuado o en atmósfera de nitrógeno, la potencia completa puede mantenerse indefinidamente, probablemente por prevención de la oxidación. (12, 17, 30, 31, 32 36).

1.3.f. ESPECIFICIDAD DE ESPECIES

Se encuentran diferencias entre la actividad tromboplástica de tromboplastina tisular obtenida de diferentes animales de laboratorio, así como una diferencia en la respuesta de la sangre de esos animales a la tromboplastina. Este efecto se presenta más en cerdos de Guinea, los extractos tisulares de éstos, aceleran la formación del coágulo del plasma de cerdos de su especie, siendo menos efectivo para plasmas de conejos e inefectiva para plasmas de pollos. Se ha observado que la tromboplastina -

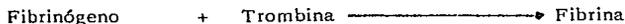
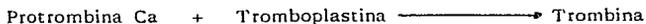
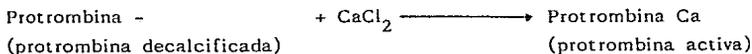
obtenida de conejo tiene actividad sobre plasmas de animales de otras especies así como para plasmas de su misma especie; esto es debido a su composición química. Lo cual sugiere que la acción de la tromboplastina depende de las especies para definir su actividad, por lo que se considera que tiene especificidad. (3, 15, 23, 24, 31, 32)

14. FUNDAMENTO DEL METODO DE QUICK

El tiempo de formación del coágulo de fibrina en la sangre o plasma, es medido por una relación directa que depende de la concentración de protrombina con otros factores de la coagulación, como son tromboplastina, calcio y fibrinógeno. El fibrinógeno es encontrado en sangre, en concentraciones constantes, por lo que es considerado como un factor constante. La concentración de calcio es completamente controlada por la adición de oxalato de calcio en sangre y recalificando el plasma por la adición de cantidades constantes de cloruro de calcio. La tromboplastina tisular es adicionada en exceso al plasma.

Bajo estas condiciones, la formación de la trombina que determina el tiempo de coagulación, es exclusivamente dependiente de la concentración de protrombina en sangre.

La química de estas reacciones se expresa de la siguiente forma:



El tiempo de protrombina de un solo paso, es una prueba de selección para la vía extrínseca y vía común de la coagulación. (5, 19, 20, 31, 34)

15. VALORES NORMALES

Un plasma normal debe coagularse en un tiempo entre 11 y 14 segundos después de añadir clacio con una tromboplastina activa. Las muestras duplicadas se coagularán con un intervalo de 0.3 segundos entre sí. (5, 19, 34)

16. DEFICIENCIAS Y ALTERACIONES EN EL SISTEMA DE COAGULACION

Los diferentes estados hemorrágicos en un paciente, pueden ser detectados o ex cluidos con la ayuda de dos parámetros: una historia clínica familiar y los reportes de las determinaciones del laboratorio de coagulación. Las coagulopatías son fácilmente detectadas indicando si la anomalía radica en la vía extrínseca o en la intrínseca - de la coagulación. (15, 28)

1. El tiempo de protrombina (método de Quick) nos indica si la anomalía - se encuentra en la vía extrínseca de la coagulación.
2. El tiempo de generación de tromboplastina (método de Biggs y Douglas), - nos reporta si la anomalía se encuentra en el sistema intrínseco de la - coagulación.

La medición del tiempo de protrombina, con tromboplastina tisular y calcio, en concentraciones adecuadas, mide la contribución de la protrombina, factor V, factor - VII y factor X para la generación de protrombina. Por tal razón cuando uno o más - de uno de estos factores están en concentraciones reducidas, el tiempo normal de - - protrombina se prolonga. Se sabe que la influencia de las concentraciones de acuerdo a su importancia cita al factor VII como el primero, seguido por el factor X, factor - V y protrombina. El fibrinógeno también juega un papel importante en el proceso de coagulación. (20, 28)

A. Factor VII (proconvertina)

El déficit congénito (hipoconvertinemia congénita) parece resultar de un gen -- autosómico alterado. El defecto es autosómico pero tan solo parcialmente recesivo; - los pacientes presentan una tendencia a un sangrado excesivo, hematomas fáciles y -- gingivorragias. En las mujeres es frecuente una menorragia importante.

Las deficiencias adquiridas de este factor pueden ser detectadas desde el perío do neonatal, en pacientes tratados con cumarina, también en personas con enfermeda - des del hígado, deficiencias de vitamina K y neoplasias malignas.

Estas deficiencias deben sospecharse en pacientes cuyo tiempo de protrombina - sea prolongado.

B. Factor X (Stuart Prower)

La deficiencia hereditaria de este factor es rara, aparece como un factor autosómico recesivo.

La deficiencia adquirida es asociada con un factor estable formado en hígado - y dependiente de la producción de vitamina K, aparece en pacientes a los que se les administra cumarinas. Debe sospecharse en pacientes con tendencia a sangrar y tiempo de protrombina y tromboplastina parcial anormales.

C. Factor V (Proacelerina)

La deficiencia del factor V es conocida como para-hemofilia o enfermedad de Owren. Es un defecto hereditario con un rasgo autosómico recesivo. Se presenta en hombres y mujeres con signos similares a los de una hemofilia. Los síntomas consisten en una hemorragia excesiva debida a un trauma.

La para-hemofilia adquirida puede asociarse con enfermedades severas en hígado, septicemia, leucemia y neoplasias malignas. La deficiencia se sospecha en pacientes con tiempo de protrombina prolongado.

D. Factor II (Protrombina)

La deficiencia hereditaria o también llamada Hipotrombonemia es rara encontrarla. El déficit adquirido ocurre cuando la producción de vitamina K es interferida (sintetizada en el tracto intestinal); por lo tanto en padecimientos gastrointestinales se puede presentar un sangrado excesivo. Asimismo se encuentra en pacientes con -- enfermedades hepáticas.

El diagnóstico de esta deficiencia es difícil, ya que siempre está asociada a la deficiencia de otros procoagulantes.

E. Factor I (Fibrinógeno)

El fibrinógeno es esencial para la formación del coágulo sanguíneo. La concentración normal es de 100 mg/100 ml de plasma. Las deficiencia congénitas son raras presentandose tres tipos:

- E.1. Afibrinogenemia congénita. - La sangre de estos pacientes no forma un coágulo visible al añadir trombina. Parece demostrarse la ausencia de --fibrinógeno.
- E.2. Disfibrinogenemia congénita.- La concentración de fibrinógeno es menor a la normal. Se forma un coágulo visible al dejar que la sangre coagule - espontáneamente.
- E.3: Hipofibrinogenemia congénita. La concentración de fibrinógeno es tan baja que no es posible detectarla, se necesita un método inmunológico para lograrlo.

Las deficiencias adquiridas se presentan en pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas con complicación posterior, en hemorragias retroplacentarias, cirugía de hígado, padecimientos pulmonares, transfusiones de sangre incompatibles, cirrosis hepática, cáncer prostático e infecciones bacterianas. El fibrinógeno parece estar controlado por un gen recesivo autosómico. La deficiencia debe sospecharse en pacientes con tiempo de protrombina largo, y valores anormales en pruebas específicas para este - factor. (5, 15, 19, 20, 21, 28, 37).

17. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

17.a. CONCEPTO DE ESTABILIDAD

La estabilidad de un fármaco puede ser definida como el lapso de tiempo desde su preparación inicial, durante el cual se mantienen las propiedades físicas, químicas y biológicas dentro de especificaciones, a pesar de estar sujetas a una variedad de cambios, como son, calor, luz y temperatura. (4, 36)

La estabilidad de los productos debe ser demostradas por el uso de métodos adecuados. Las consideraciones de estabilidad, deben incluir, no solo los requerimientos establecidos en sus especificaciones, sino también los cambios en su aspecto físico. Los parámetros de estabilidad de un producto pueden ser afectados por diversos factores, como son: temperatura, radiaciones, humedad, oxígeno, bióxido de carbono u otros gases atmosféricos, presión, solventes, cambios de pH, contaminación microbiana componentes del empaquetado, propiedades del agua u otros solventes. (36)

Los criterios aceptables de estabilidad de un fármaco o producto, se presentan en la tabla No. 6.

Tabla No. 6

Criterios de niveles aceptables de estabilidad. (36)

Tipo de estabilidad	Condiciones mantenidas a lo largo de la vida media del producto
Químico	Cada ingrediente activo mantiene su integridad química, potencia y pureza dentro de especificaciones.
Físico	Las propiedades físicas originales como su color, forma, olor, tamaño, etc., deben mantenerse dentro de su especificación.
Microbiológico	La esterilidad o resistencia al crecimiento bacteriano es mantenida de acuerdo a la especificación. La acción de los agentes antimicrobianos es efectiva.
Terapéutico	Los efectos terapéuticos se mantienen sin cambios.
Toxicidad	No hay incremento en la toxicidad.

En el mantenimiento de la estabilidad en líquidos estériles, debe considerarse - la presencia de contaminación microbiana por indicios de opalescencia, cambio de color, presencia de coágulo, capa superficial particulada, formación de gas o materia - flocculante. (4, 17, 36)

1.7.b. ESTABILIDAD ACELERADA

Existen razones y necesidades para realizar estudios de estabilidad acelerada. - Una razón es de tipo sanitario, ya que el hecho de que un fármaco sea inocuo, no -- significa que sus productos de degradación también lo sean. Otra razón es de tipo -- legal, que exige que todos los medicamentos cumplan con las condiciones de identi-- dad, efectividad, potencia, pureza e inocuidad durante el período en el que se encuen-- tran en el mercado. (13, 30).

Inicialmente los estudios de estabilidad acelerada son empleados para predecir - el período de tiempo en el que la potencia cae bajo condiciones ambientales. Esen-- cialmente la prueba involucra la exposición de las muestras bajo estudio a 3 ó 4 tem-- peraturas elevadas, elegidas entre un rango de 50 a 100° C. (4, 33).

Todos estos métodos, se basan en la cinética de su velocidad de reacción. Es posible obtener experimentalmente los datos cinéticos, correlacionarlos por medio de - ecuaciones matemáticas, proponer el mecanismo de la reacción y establecer las condi-- ciones para acelerar o disminuir la velocidad de reacción según cada finalidad.

La velocidad de una reacción, es definida como la velocidad con la que cambia la concentración de una sustancia que interviene en esa reacción. Es de interés para la cinética, determinar los cambios por los cuales se puede llegar de los reactivos - (estado inicial), a los productos (estado final).



A y B son los reactivos y C el producto, la velocidad de reacción, es la veloci-- dad de desaparición de A, la velocidad de desaparición de B o la velocidad de apari-- ción de C, teniendo:

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = \frac{-d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt}$$

La concentración de determinada sustancia, suele relacionarse con alguna propiedad de fácil medición, como presión, absorción de radiación, rotación óptica, etc., y por lo tanto la velocidad de reacción es susceptible a medirse por el aumento o disminución de estos parámetros.

El orden de la reacción es definido como el número de moléculas de cuya concentración depende la velocidad de reacción.

En una reacción de orden cero, la velocidad de la reacción es independiente de la concentración de los reactivos. Su ecuación matemática es $v = k$

En la reacción $A + B \longrightarrow C$

$$v = \frac{-dA}{dt} = \frac{-dB}{dt} = \frac{dC}{dt} = k$$

Si llamamos x a la concentración inicial del reactivo, se representa

$$\frac{-dx}{dt} = k$$

$$-dx = k \cdot dt$$

Para obtener la forma integrada, se usará como límites la concentración inicial (C_0) y la concentración al tiempo t (C):

$$-\int_{C_0}^C dx = k \int_0^t dt$$

$$- \left| x \right|_{C_0}^C = k \left| t \right|_0^t$$

$$C = C_0 - k t$$

$$k = \frac{C_0 - C}{t}$$

La representación de la concentración en función del tiempo en una reacción de orden cero, es una recta cuya pendiente es la constante de velocidad de reacción ($-k$) y la ordenada al origen la concentración inicial (C_0). La recta siempre va a ser con pendiente negativa ($-k$) por lo que la constante de velocidad será positiva.

En una reacción de primer orden, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de uno de los reactivos.

En la reacción $A + B \longrightarrow C$

$$\frac{-dx}{dt} = k \cdot x$$

$$\frac{-dx}{x} = k \cdot dt$$

$$- \int_{C_0}^C \frac{dx}{x} = k \int_0^t dt$$

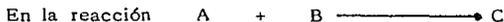
$$\left| \ln x \right|_{C_0}^C = -k \left| t \right|_0^t$$

$$\ln C = \ln C_0 - k t$$

La representación del logaritmo natural de la concentración actual en función del tiempo, es una recta de pendiente igual a $(-k)$. Puede controlarse el orden de la reacción calculando numericamente la k :

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C}$$

En una reacción de segundo orden, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de dos reactivos o a la segunda potencia de uno de ellos.



$$v = k A \cdot B$$

La representación de la concentración en función del tiempo queda representada de la siguiente forma:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + k t$$

La representación gráfica de la inversa de la concentración en función del tiempo, es una recta de pendiente (k) y ordenada al origen $\frac{1}{C_0}$

17.c. TIEMPO DE VIDA MEDIA Y $t_{90\%}$

En los estudios de estabilidad, es común encontrar en lugar de la constante de velocidad de reacción, el llamado tiempo de vida media $(t_{1/2})$ en el que la concentración del fármaco ha bajado a la mitad de la inicial.

El tiempo en el que la concentración del fármaco es el 90 % del valor inicial es denominado $t_{90\%}$ ó también $t_{10\%}$. (4, 17, 33)

17.d. METODO DE ARRHENIUS

El método de Arrhenius es también conocido como método de Garret, ya que este autor desarrolló su aplicación al cálculo de la estabilidad de productos farmacéuticos. La relación cuantitativa entre la velocidad de reacción y la temperatura puede provocar una reacción de orden cero o de primer orden.

La ecuación de primer orden es:

$$y(t) = y_0 - k t$$

en donde y_0 y $y(t)$ son las potencias iniciales y después de un tiempo t k es una constante, $y(t)$ graficado contra t es una recta con una pendiente de $(-k)$.

La ecuación de primer orden es:

$$\ln y(t) = \ln y_0 - k t$$

el $\ln y(t)$ contra t da una recta con pendiente de $(-k)$.

La relación entre la descomposición y la temperatura están dadas por la sustitución de k en la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{-E/RT}$$

en donde A es un factor de frecuencia o constante, E la energía de activación o entalpía de activación, T la temperatura en grados absolutos y R la constante de los gases.

En forma logarítmica tenemos:

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT}$$

el $\log k$ contra $1/T$ da una recta con pendiente de $= E/R$

Empleando estas ecuaciones es posible predecir el tiempo que toma el fármaco para descomponerse en $x\%$ a una temperatura T y con esto obtener el tiempo de vida media del mismo. (4, 17, 30, 33, 36)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que en la actualidad se presenta el problema de abastecimiento -- de material de importación utilizado en el laboratorio de Análisis Bioquímico- Clínico, y encontrando que dentro de estos reactivos se encuentra la tromboplastina tisular, - se propone que al obtener este producto en la E.N.E.P. Zaragoza, se logrará un sistema económico de autoabastecimiento de reactivos de uso clínico y se propiciará la -- creación de una infraestructura interna del plantel.

Es importante tomar en cuenta que hasta ahora, se ha relizado poca investiga-- ción sobre la producción de reactivos en la E.N.E.P. Zaragoza. Por esta razón, el pro yecto es considerado de gran utilidad.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- 3.1.a. Obtener la tromboplastina tisular a partir del tejido encefálico de conejo y acondicionarla farmacéuticamente en la E.N.E.P. Zaragoza, para ser utilizada en los laboratorios de Análisis Bioquímico-Clínicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 3.2.a. Estandarizar la tromboplastina tisular obtenida.

- 3.2.b. Efectuar las pruebas de estabilidad acelerada

- 3.2.c. Dejar establecidas las condiciones de producción y acondicionamiento del producto, así como los parámetros de control de calidad del mismo, para la producción posterior del reactivo dentro de la E.N.E.P. Zaragoza.

4. HIPOTESIS DE TRABAJO

La tromboplastina tisular obtenida en la E.N.E.P. Zaragoza, tendrá las propiedades químicas y de calidad, equivalentes a la obtenida comercialmente.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Plasma obtenido de sangre venosa.

Cerebro de conejo post-mortem, de preferencia obtenido de 24 a 48 hrs. después de la muerte.

5.2. EQUIPO

Centrífuga clínica Solbaat Mod. 12.

Balanza analítica Mettler H - 80.

Baño de agua Mapsa Mod. BMT - 4.

Refrigerador American A - 2.

Cronómetro.

5.3. MATERIAL

Tubos de ensayo de 12 x 75 mm Pyrex.

Tubos de ensayo de 12 x 100 mm Pyrex.

Embudo de vidrio.

Mortero con pistilo.

Matraz volumétrico de 100 ml.

Matraz volumétrico de 500 ml.

Matraz erlenmeyer de 250 y 500 ml.

Vasos de precipitado de 100, 250 y 500 ml.

Pipetas graduadas de 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 ml.

Pipetas Pasterur.

Termómetro.

Probetas de 50 y 100 ml.

Ampolletas de 5 ml. color ambar.

Gradilla para tubos de ensayo.

Espátula de acero inoxidable.

Perilla de succión
Bulbos de goma.
Ligadura.
Estuche de disección.
Papel filtro.

5.4. REACTIVOS

Solución salina isotónica.
Oxalato de sodio 0.1 M.
Cloruro de calcio 0.02 M.
Acetona
Agua destilada.
Azida de sodio.

5.5. METODOLOGIA

5.5.a. OBTENCION DE TROMBOPLASTINA TISULAR. (1,21,34)

1. Obtener un cerebro de conejo post-mortem de preferencia de 24 a 48 horas después de su muerte. El órgano se transporta perfectamente sellado en un recipiente que contenga suficiente solución salina isotónica para cubrirlo.
2. El cerebro puede guardarse en refrigeración, si no se utiliza inmediatamente.
3. Teniendo cuidado de manejar el órgano, remover y descartar las meninges y el cerebro rebelo bajo agua corriente fría. Quitar todos los vasos pequeños que sea posible.
4. Cortar el órgano en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 a 2 cm. de diámetro. Asegurarse de que no quede ningún vaso sanguíneo ni coágulo diminuto. Enjuagar los cortes otra vez con agua corriente.
5. Emulsificar los fragmentos en un mortero grande con acetona, hasta que adquieran un aspecto de hojuelas.
6. Desechar la acetona sobrenadante y repetir la emulsión hasta que ya no adquiera aspecto lechoso, lo que indica que ya se han quitado todos los lípidos solubles en acetona.
7. La sustancia cerebral restante se esparce sobre papel filtro seco, y se deja secar a temperatura ambiente.
8. Este material debe ser pulverento, de color pardo claro y puede conservarse por tiempo indefinido en recipientes herméticos a 4°C, conteniendo un agente desecante.

5.5.b. PREPARACION DE LA SUSPENSION DE TROMBOPLASTINA TISULAR

1. Tomar 0.2, 0.5 y 0.7 gramos del polvo seco de cerebro y suspenderlos por separado en 10 ml. de solución salina isotónica.
2. Calentar a 37° C durante 15 ó 20 min., agitar cada cuatro minutos por inversión del tubo de ensayo, donde está contenido el extracto.
3. Las partículas gruesas se dejan sedimentar, centrifugar el líquido restante.
4. Utilizar el sobrenadante opalescente para efectuar la estandarización de la tromboplastina tisular.
5. Almacenar el líquido opalescente en frascos viales a temperatura de refrigeración si no se utiliza inmediatamente

5.c. MUESTRAS DE SANGRE Y OBTENCION DEL PLASMA. (5, 19)

1. Las muestras de sangre para las pruebas de coagulación deben recogerse por venipuntura simple de una vena anticubital.
2. Obtener la sangre por la técnica de dos jeringas de plástico. La primera unida a la aguja durante la venipuntura propiamente dicha, se usa para recoger los primeros 2 ó 3 ml. de sangre (con más posibilidades de contaminación por pequeñas cantidades de factor tisular), y para descartarlos, la segunda jeringa con 0.1 ml. de anticoagulante se une a la aguja que descansa en el lumen de la vena y se usa para la recolección de la muestra de sangre que va a usarse para la prueba.
3. Después de recoger la cantidad apropiada de sangre, la jeringa se retira con la aguja unida y después se invierte varias veces, de inmediato para que se mezcla la sangre y el anticoagulante.
4. Después de la recolección, centrifugar la sangre a 1 500 rpm durante 10 minutos.

5. Separar el plasma con una pipeta Pasteur y transferirlo a un tubo, se tapa y se conserva en un baño de hielo hasta la prueba.

5.5.d. ESTANDARIZACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR. (15, 21, 34)

1. Utilizar 10 plasmas obtenidos de pacientes normales, a los cuales se les determina su tiempo de protrombina (TP) con un reactivo comercial.
2. Dichos plasmas deben caer en el rango de referencia (de 11 a 14 seg.).
3. Una vez que se ha determinado el TP para cada uno de los plasmas, proceder a preparar un plasma de trabajo, consistente de la mezcla de plasmas normales.
4. Determinar el TP del plasma de trabajo que servirá como control normal en cada una de las determinaciones posteriores.
5. De la tromboplastina tisular obtenida, preparar suspensiones con las siguientes -- concentraciones:

Extracto de Tromboplastina tisular (g)	Volumen de SSI (ml)
0.2	10.0
0.5	10.0
0.7	10.0
0.9	10.0

6. Determinar el TP para cada concentración, empleando el plasma de trabajo como referencia.
7. Hacer las determinaciones de TP por triplicado.
8. Seleccionar la concentración que reporte un TP dentro de los valores normales, para su acondicionamiento.

5.5.e. DETERMINACION DEL TIEMPO DE PROTROMBINA. (1, 31, 35)

1. Antes de la toma de muestra, calibrar los tubos de ensayo de 13 x 100 mm., - para depositar en ellos exactamente 5 ml de sangre.
2. Agregar 0.5 ml de solución de oxalato de sodio 0.1 M a cada tubo.
3. Obtener alrededor de 5 ml de sangre venosa y depositarla de inmediato en el -- tubo calibrado, hasta alcanzar la marca.
4. Mezclar la sangre y la solución de oxalato mediante una suave inversión del tubo.
5. Centrifugar la muestra a 1 600 rpm en un lapso de 10 min.
6. Separar el plasma sobrenadante en otro tubo de ensayo limpio y seco.
7. Para cada muestra que se quiera someter a prueba, colocar 0.5 ml de solución - de cloruro de calcio 0.02 M en un tubo de ensayo.
8. En otro tubo, depositar la misma cantidad de la suspensión de tromboplastina ti sular (obtenida en el laboratorio). Poner ambos tubos en un baño de agua a -- 37º C.
9. Medir exactamente 0.1 ml del plasma problema en un tubo de ensayo de 11 x - 75 mm y colocarlos en el baño de agua a 37º C.
10. Dejar incubar el plasma aproximadamente por 60 seg., añadir 0.1 ml de la sus- pensión de tromboplastina tisular agitando el tubo suavemente y senseguida 0.1 - ml de la solución de cloruro de calcio 0.02 M. Al mismo tiempo accionar el - el cronómetro.
11. Dejar el tubo dentro del baño aprox. 8 seg.
12. Someter al tubo a un suave movimiento de vaivén frente a una buena fuente de luz y observar el contenido hasta la formación del coágulo de fibrina. En este momento, detener el cronómetro, registrando el tiempo.

13. Repetir el procedimiento dos veces más para tener tres registros por cada problema. La primera determinación dá una idea aproximada del valor del TP, la segunda y tercera determinación, no deben variar en más de dos segundos.

5.5.f. ACONDICIONAMIENTO DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR.

1. Colocar las ampollitas de 5 ml color ambar en recipientes para su esterilización. Introducirlas al horno a una temperatura de 160° C por un tiempo de dos horas. Sacarlas y dejarlas enfriar.
2. De la suspensión de tromboplastina estandarizada (V.5.d.), colocar con la ayuda -- de una jeringa estéril, 2 ml de la suspensión en cada una de las ampollitas, hacer esto en la zona de seguridad del mechero, para evitar contaminación del producto.
3. Cerrar la ampollita utilizando el mechero como fuente de calor.
4. Hacer cuatro lotes e incubarlos a las siguientes temperaturas: 4° C, 25° C, - - - 37° C y 47° C. Durante un período de tres meses.
5. Medir por triplicado la actividad de la tromboplastina tisular de acuerdo al método (V.5.e.) por semana durante tres meses, para cada una de las temperaturas.

5.5.g. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

1. Realizar análisis inicial de las muestras, reportando potencia y descripción física para obtener datos al tiempo inicial
2. Reportar los datos de análisis semanal durante 14 semanas en una tabla de tiempo de protrombina contra tiempo.

3. Por análisis gráfico determinar el orden de la reacción. Representar la concentración del producto contra el tiempo, correspondiendo respectivamente, a una reacción de orden cero (si se grafica concentración contra tiempo), de primer orden (\ln de la concentración contra el tiempo) y de segundo orden ($1/\text{concentración}$ contra el tiempo). La función que se aproxime a una recta, decidirá el orden de la reacción.
4. Obtener la ecuación de la recta por mínimos cuadrados.
5. Obtener las constantes k al graficar la concentración contra el tiempo.
6. Determinar el valor de la pendiente que corresponde al valor de k .
7. Obtener las constantes de la ecuación de Arrhenius. Determinar gráficamente la ordenada al origen A y la pendiente equivaldrá a la energía de activación, teniendo el valor de la constante de los gases.
8. De la ecuación de Arrhenius, determinar el valor de la constante k para la temperatura de 25°C .
9. Determinar la vida media del producto.

6. RESULTADOS

6.1. ESTANDARIZACION DE LA TROMBOSPLASTINA TISULAR OBTENIDA

A partir de la disección de cabezas de conejo (material obtenido como desecho) se obtuvo la masa encefálica de éstas. Se emplearon 20 cabezas de conejo, el extracto derivado de una cabeza fué de 1.5 gramos, por lo tanto:

1 cabeza de conejo ————— 1.5 g. extracto seco
20 cabezas de conejo ————— 30 g. extracto seco

Se procedió a hacer la estandarización del producto como indica la tabla No. 7

Tabla No. 7

Estandarización de la tromboplastina tisular

Extracto. seco de tromboplastina Tisular (g.)	Volúmen de S.S.I. (ml.)
0.2	10.0
0.5	10.0
0.7	10.0
0.9	10.0

A continuación, en la tabla No. 8 se dan los datos obtenidos a partir de los -- tiempos de protrombina para cada una de las concentraciones mencionadas. Se trabajó con un plasma de trabajo, formado por 5 plasmas de pacientes normales.

Tabla No. 8

Tiempo de Protrombina para cada concentración de tromboplastina tisular

No.	Concentración de tromboplastina tisular (g/ml)			
	0.02	0.05	0.07	0.09
1	19 seg	15 seg	12 seg	12 seg
2	18 seg	13 seg	11 seg	11 seg
3	18 seg	13 seg	11 seg	10 seg
4	17 seg	13 seg	10 seg	10 seg
5	17 seg	12 seg	10 seg	10 seg

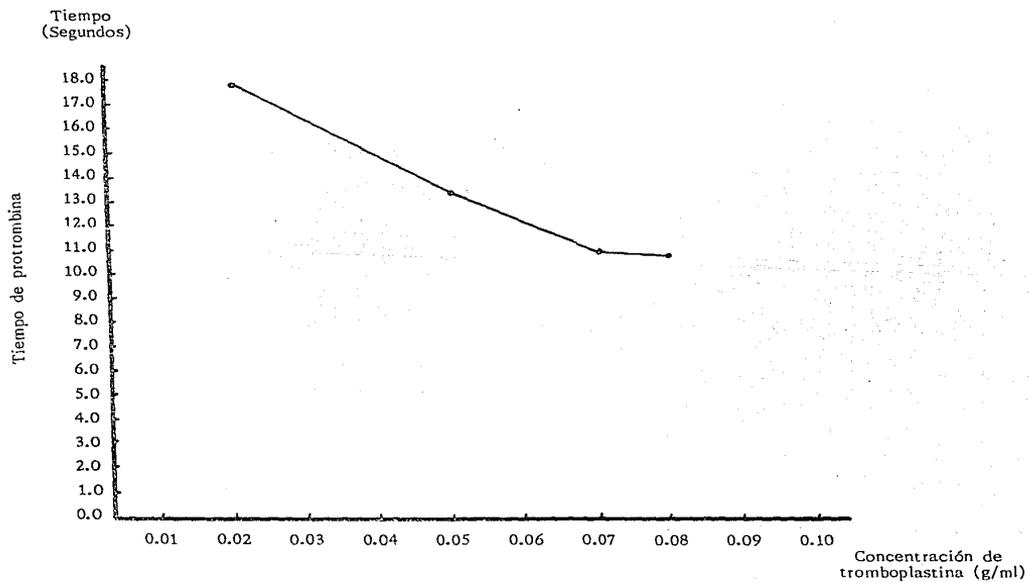
sacando la media de los valores para cada una de las concentraciones:

Concentración de tromboplastina tisular (g/ml)	Media (seg)
0.02	17.80
0.05	13.20
0.07	10.80
0.08	10.60

estos valores, se presentan en la gráfica A Aquí se observa el efecto de la concentración de tromboplastina tisular en relación al tiempo de protrombina.

Gráfica A

Tiempo de Protrombina contra concentración de Tromboplastina Tisular



6.2. VALIDACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR OBTENIDA EN LA E.N.E.P. ZARAGOZA

La validación consistió en comparar a la tromboplastina tisular obtenida contra una tromboplastina comercial. Para esto, se emplearon 10 plasmas de pacientes normales. Los resultados se dan en la tabla No. 9

Aplicando la distribución de la población obtenida a la media muestral formemos el estadístico:

$$t = \frac{x - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$$

Gossett demostró que esta t tiene una distribución exacta, que depende de $\phi = n - 1$. Se denomina distribución de Student o distribución t .

Tabla No. 9

Validación de tromboplastina tisular

Plasma	Tromboplastina Comercial Tiempo de protrombina (valor x - seg)	Tromboplastina Obtenida Tiempo de protrombina (valor x - seg)
1	12.5	12.5
2	12.5	12.5
3	12.5	12.2
4	13.0	12.5
5	13.0	12.5
6	13.0	13.0
7	13.0	13.0
8	12.5	13.0
9	12.5	12.7
10	12.5	12.7

En este caso, la población distribuida normalmente son los tiempos de protrombina para ambas tromboplastinas.

Debemos verificar la hipótesis nula, de modo que:

Hipótesis nula $H_0 = 12.66$

Hipótesis alternativa $H_1 > 12.66$

Fijemos el riesgo del error de tipo I en = 5 por ciento. Con los grados de libertad $\phi - n - 1 = 10 - 1 = 9$, podemos encontrar en la tabla t los valores de t que corresponden a esa probabilidad del 95%

Para nuestro planteamiento:

$$t = \frac{x - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$$

x = valor medio del tiempo de protrombina en la tromboplastina comercial

μ = valor medio del tiempo de protrombina en la tromboplastina obtenida

σ = desviación estandar del tiempo de protrombina en la tromboplastina obtenida

n = número de muestras.

derivados de los resultados de la tabla No. 9, obtenemos:

x = 12.66

μ = 12.70

σ = 0.260

n = 10

sustituyendo en la fórmula:

$$t = \frac{12.66 - 12.70}{0.260 / \sqrt{10}} = \frac{-0.04}{9.082219} = -0.48650$$

$$P (-1.833 < t < 1.833 \mid \mu = 9) = 95 \%$$

Con la probabilidad del 95 % podemos observar que la hipótesis nula no se rechaza, por lo que la tromboplastina tisular obtenida cae en el rango de aceptabilidad con respecto a la tromboplastina comercial.

6. 3. ESTABILIDAD ACELERADA

Tabla No. 10

Tiempo de protrombina en relación al tiempo (segundos)

Tiempo semanas	Temperatura			
	4º C 277º K	25º C 298º K	37º C 310º K	47º C 320º K
1	13	16	78	149
2	13	122	137	206
3	13	129	230	195
4	13	138	199	161
5	13	150	166	180
6	13	174	120	207
7	13	118	135	124
8	13	114	125	109
9	13	109	116	108
10	13	116	139	134
11	13	181	171	157
12	13	174	154	146
13	13	168	109	135
14	13	154	140	144

Nota.- Los valores reportados son la media de cinco determinaciones del tiempo de protrombina.

Tabla No. 11

Porcentaje de la potencia con relación al tiempo				
Tiempo semanas	4° C	Temperatura		47° C
	277° K	25° C	37° C	320° K
		298° K	310° K	
1	100	81.25	18.66	8.72
2	100	10.65	9.48	6.31
3	100	10.07	5.65	6.66
4	100	9.42	6.53	8.07
5	100	8.66	7.83	7.22
6	100	7.47	10.83	6.28
7	100	11.01	9.62	10.48
8	100	11.40	10.40	11.92
9	100	11.92	11.20	12.03
10	100	11.20	9.35	9.70
11	100	7.18	7.60	8.28
12	100	7.47	8.44	8.90
13	100	7.73	11.92	9.62
14	100	8.44	9.28	9.02

Tabla No. 12

Logaritmo natural de la potencia en relación al tiempo

Tiempo semanas	Temperatura			
	49° C 277° K	25° C 298° K	37° C 310° K	47° C 320° K
1	4.6051	4.3975	2.8130	2.1656
2	4.6051	2.3655	2.2491	1.8421
3	4.6051	2.3095	1.7316	1.8961
4	4.6051	2.2428	1.8764	2.0880
5	4.6051	2.1587	2.0579	1.9171
6	4.6051	2.0108	2.3823	1.8373
7	4.6051	2.3988	2.2638	2.3494
8	4.6051	2.4336	2.3418	2.4782
9	4.6051	2.4782	2.4159	2.4878
10	4.6061	2.4159	2.2353	2.2721
11	4.6051	1.9712	2.0281	2.1138
12	4.6051	2.0108	2.1329	2.1860
13	4.6051	2.0451	2.4782	2.2688
14	4.6051	2.1329	2.2278	2.2002

Tabla No. 13

Inverso de la potencia en relación al tiempo				
Tiempo semanas	Temperatura			
	4º C 277º K	25º C 298º K	37º C 310º K	47º C 320º K
1	0.0100	0.0123	0.0600	0.1146
2	0.0100	0.0938	0.1054	0.1584
3	0.0100	0.0993	0.1769	0.1501
4	0.0100	0.1061	0.1531	0.1238
5	0.0100	0.1154	0.1277	0.1384
6	0.0100	0.1338	0.0923	0.1592
7	0.0100	0.0908	0.1510	0.0954
8	0.0100	0.0877	0.0961	0.0838
9	0.0100	0.0838	0.0892	0.0831
10	0.0100	0.0892	0.1069	0.1030
11	0.0100	0.1392	0.1315	0.1207
12	0.0100	0.1338	0.1184	0.1123
13	0.0100	0.1293	0.0838	0.1039
14	0.0100	0.1184	0.1077	0.1078

Los valores obtenidos en las tablas anteriores, fueron ajustados por mínimos cuadrados, obteniéndose los siguientes, para cada una de las temperaturas.

Tabla No. 14

Valores ajustados para $T = 4^{\circ} \text{C} (277^{\circ} \text{K})$

	Tiempo (semanas)			
	1	8	10	14
Actividad	100	100	100	100
ln actividad	4.6051	4.6051	4.6051	4.6051
1/actividad	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100

Tabla No. 15

Valores ajustados para $T = 25^{\circ} \text{C} (298^{\circ} \text{K})$

	Tiempo (semanas)			
	1	8	10	14
Actividad	81.25	13.97	11.20	8.45
ln actividad	4.3975	2.6375	2.4165	2.1352
1/actividad	0.0123	0.0715	0.0852	0.1182

Tabla No. 16

Valores ajustados para $T = 37^{\circ} \text{C}$ (310°K)				
	Tiempo (semanas)			
	1	8	10	14
Actividad	81.25	13.90	11.20	9.28
ln actividad	4.3975	2.6375	2.4165	2.2278
1/actividad	0.0123	0.0715	0.0852	0.1077

Tabla No. 17

Valores ajustados para $T = 47^{\circ} \text{C}$ (320°K)				
	Tiempo (semanas)			
	1	8	10	14
Actividad	8.75	8.69	8.68	8.66
ln actividad	2.1690	2.1621	2.1610	2.1587
1/ actividad	0.1142	0.1150	0.1152	0.1154

Se tomó la actividad de 13 seg. como 100%.

Utilizando las tablas anteriores, se obtuvo el coeficiente de determinación r , deduciendo de esta forma el orden de la reacción. Gráfica B

Para 24°C:

Orden de reacción	Coeficiente de determinación
0	0.984147
1	0.993818
2	0.999370

De acuerdo a los valores obtenidos para el orden de reacción, determinamos que la cinética de reacción de la tromboplastina tisular es de segundo orden.

$$-\frac{d [\text{TPT}]}{d t} = k [\text{TPT}]^2$$

$$\frac{1}{[\text{TPT}]} = k t + \frac{1}{[\text{TPT}]}$$

como no se midió concentración sino actividad, la cinética es:

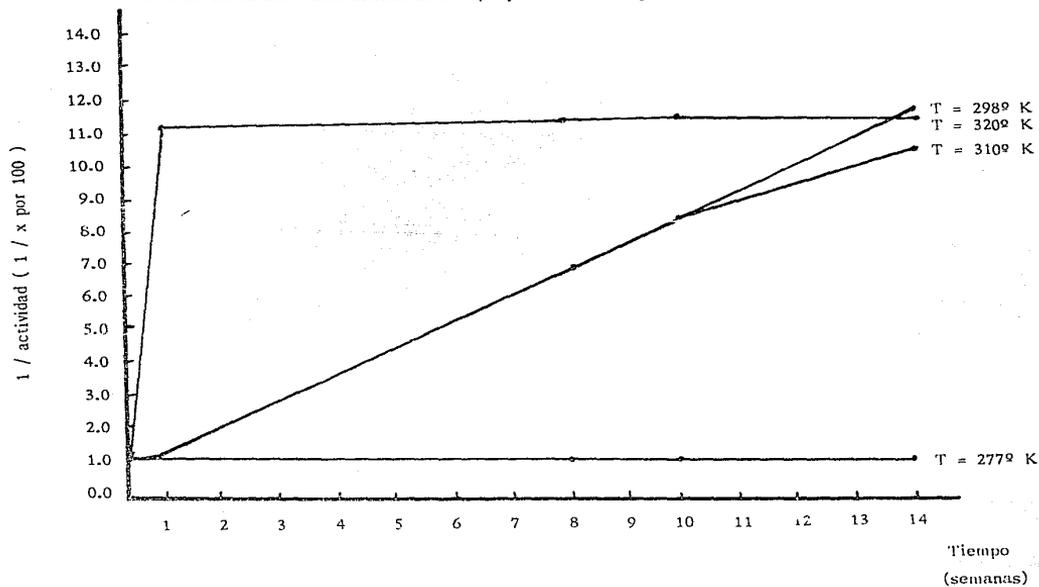
$$-\frac{d [a]}{d t} = k [a]^2$$

la ley de la velocidad es:

$$\frac{1}{[a]} = k t + \frac{1}{[a_0]}$$

Gráfica B

Inverso de la actividad contra el tiempo para las 4 temperaturas usadas



A partir de la gráfica C se obtienen las constantes k para las diferentes temperaturas.

Tabla No. 18

Valores de k para cada temperatura			
Temperatura	Inverso de la Temperatura	Valor de k	Logaritmo natural de k
277° K	0.00361	0	----
298° K	0.00335	0.0077	-4.8665
310° K	0.00322	0.0078	-4.8536
320° K	0.00312	0.0100	-4.6010

De la ecuación de Arrhenius:

$$k = A e^{-\frac{E_a}{R T}}$$

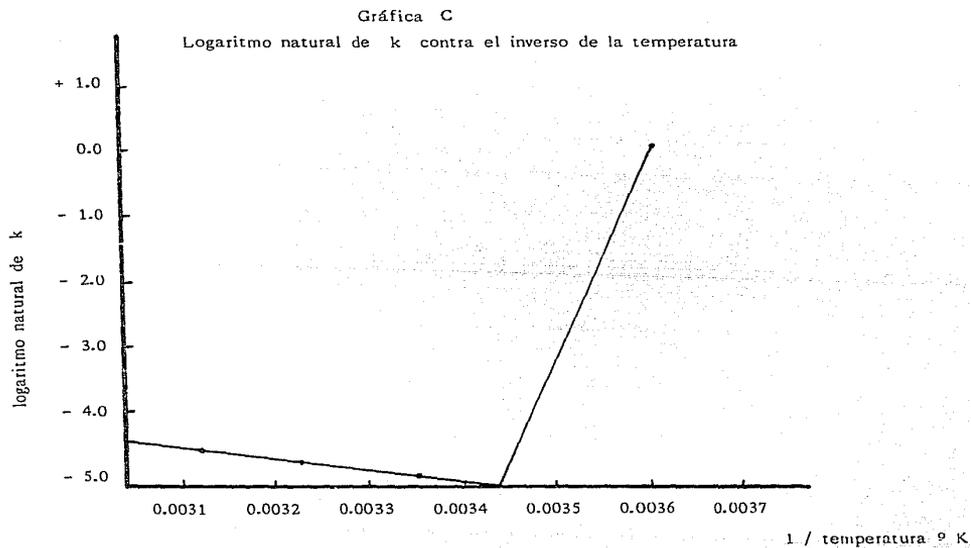
se puede calcular la energía de activación para el producto. A es un factor pre-exponencial y se puede calcular de manera gráfica como la ordenada al origen, al graficar el $\ln k$ contra el inverso de la temperatura. En este caso, la ordenada al origen es $\ln 8.1 \times 10^{-3}$.

se tiene entonces que:

$$A = 8.1 \times 10^{-3}$$

sustituyendo en la ecuación de Arrhenius para una temperatura de 25° C se tiene que la E_a ó entalpía es:

$$E_a = 15.12 \text{ Kcal/mol}$$



sustituyendo estos valores en la ecuación original, tenemos:

$$\text{Valor de } k_{25^{\circ} \text{ C}} = 7.8951 \times 10^{-3}$$

utilizando este valor en la ecuación obtenida de orden segundo, podemos determinar el tiempo a $t = 95\%$ y $t = 50\%$.

$$t_{95} = 0.066 \text{ días}$$

$$t_{50} = 1.26 \text{ días}$$

7. DISCUSION DE RESULTADOS

Considerando que en la actualidad se enfrenta un problema de abastecimiento de material de importación utilizado en el laboratorio clínico para efectuar análisis de rutina, es importante considerar que la obtención de la tromboplastina tisular, a nivel de producción en la E.N.E.P. Zaragoza, reduciría en alguna medida este problema.

La técnica empleada para obtener la tromboplastina tisular a partir de cerebros de conejo, es considerada de fácil ejecución y tiempo corto de elaboración. -- Sumando a esto, el hecho de que el material biológico se consigue a precio económico, ya que las cabezas de conejo son consideradas como desecho. Otro punto de consideración, es el solvente usado, puede ser sometido a reproceso y ser nuevamente de utilidad; en nuestro caso el solvente es acetona, que al destilarse, queda en -- condiciones de ser nuevamente usada.

La tromboplastina tisular está distribuida ampliamente en el cuerpo siendo el cerebro y pulmón los órganos que tienen una rica reserva de ésta. Por tal razón se optó por utilizar los extractos acuosos de cerebro, ya que se ha indicado tienen una gran actividad trombolástica cuando son tratados con plasmas recalcificados.

La tromboplastina tisular aislada de los tejidos, es un complejo de proteínas-fosfolípidos, que varía dependiendo del órgano tratado. Es importante considerar que para una identificación total de la tromboplastina tisular, es necesario -- el uso de metodología como filtración en gel y electroforesis.

Al realizar las pruebas de estandarización de la tromboplastina tisular, -- es muy importante tomar en cuenta las condiciones bajo las cuales se realizó la -- punción venosa, para obtener el plasma usado. La punción venosa debe estar exenta de traumatismo, ya que con ésto se tiene la posibilidad de contaminación de la -- muestra con factor tisular del tejido traumatizado; esto provocaría que los datos -- obtenidos en la estandarización no fueran correctos, ya que debido a la presencia -- del factor tisular se generarían tiempos de protrombina cortos, al ser estos compa -- rados con el rango normal.

Todas las pruebas de estandarización, se hicieron por quintuplicado, reportándose solo la media de estos valores.

En la estandarización de la tromboplastina, refiriendonos a la gráfica A, observamos que a bajas concentraciones de tromboplastina, el tiempo de protrombina es largo, variando considerablemente por pequeñas cantidades de tromboplastina. Al aumentar la concentración, el tiempo de protrombina se acorta, hasta que se obtiene un valor mínimo constante, indicando así, que la concentración óptima de tromboplastina para la formación del coágulo se ha alcanzado. Por esta razón, la concentración elegida para el acondicionamiento de la tromboplastina tisular fue de 0.07 g/ml.

La validación de la tromboplastina tisular consistió en comparar la actividad coagulante de la tromboplastina obtenida en el E.N.E.P. Zaragoza contra una tromboplastina comercial. Para esta finalidad se aplicó la distribución t o Student. Considerando la población normal distribuida como los tiempos de protrombina, la hipótesis nula propuesta no es rechazada, por lo que se concluye que la tromboplastina tisular obtenida es equivalente a la tromboplastina comercial en un intervalo de confianza del 95%.

Al referirnos a los estudios de estabilidad de la tromboplastina tisular como producto terminado, observamos que para una temperatura de 25° C se tiene un $t_{95} = 0.66$ días y para un $t_{50} = 1.26$ días. Con estos resultados verificamos que los preparados de tipo biológico requieren de condiciones de almacenaje estricto y controlado, ya que de lo contrario ocurre su degradación, con la consecuente baja de su actividad. Observamos que a temperatura de refrigeración (4° C), la tromboplastina tisular obtenida, mantiene su actividad un 100% durante catorce semanas de almacenaje. Esto es satisfactorio, ya que este producto marca en sus condiciones de almacenaje, esta temperatura. Es importante considerar que no solo el efecto de la temperatura provocó la baja de actividad en la tromboplastina a las diferentes temperaturas, ya que la exposición de ésta al aire, gradualmente la torna café y simultáneamente genera la pérdida de su actividad. Es recomendable almacenar los preparados en recipientes cerrados al vacío o con atmósfera de nitrógeno, para prevenir fenómenos de oxidación, y de esta forma mantener el producto activo indefinidamente.

8. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que la tromboplastina tisular -- obtenida a partir de cerebro de conejo producida en la E.N.E.P. Zaragoza, cumple con las condiciones requeridas de control de calidad para este producto.

La validación de la tromboplastina obtenida con una tromboplastina comercial, nos indica que la obtenida es un producto totalmente comparable con un intervalo de confianza del 95%.

Las condiciones de almacenaje del producto terminado deben ser a temperatura de refrigeración (4º C) como es recomendable para este preparado biológico, teniendo se una actividad del 100%.

Es recomendable que se realicen fabricaciones de este producto, considerando el efecto que tiene el aire en los preparados. Se propone que las condiciones de acondicionamiento sean en recipientes cerrados al vacío, o con atmósfera de nitrógeno para prevenir la oxidación y con ésto la pérdida gradual de la actividad del producto.

Es importante la necesidad de efectuar estos estudios con las condiciones propuestas, para proponer una posible fecha de caducidad del producto.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Baner J. "Chemical Laboratory Methods". Ed. The C.V. Mosby Company 8a. ed. U. S. A. 1984. p.p. 165-167, 267-273.
2. Bhagavan H. V. "Bioquímica". Ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. 1a. ed. en español. México. 1978. p.p. 262-269.
3. Bjorklid e. and. Storm E. Purification and some properties of the protein -- Component of Tissue Thromboplastin from Human Brain. Journal of Biochem. 165: 89-96. 1977.
4. Buncher C. R. and Tsay J. Y. "Statistics in the Pharmaceutical Industry". Ed. Marcel Dekker, Inc. 36. 1981. p.p. 355-395.
5. Davidson I., Bernard J. H. "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio". Ed. Salvat S.A. 6a. ed. España. 1979. p.p. 425-458.
6. Goodman L., and Gillman. "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Ed. Médico Panamericana. 6a. ed. Buenos Aires. 1981. p.p. 1316-1318.
7. Gradwohl and Sonnenwirth C.A. " Métodos y Diagnóstico del Laboratorio Clínico". Ed. Médica Panamericana. 8a. ed. Buenos Aires. 1983. p.p. 912-927.
8. Guyton A. "Tratado de Fisiología Médica". 6a. ed. Nueva Editorial Interamericana. México. 1984. p.p. 110-122.
9. Harper H. "Manual de Química Fisiológica". Ed. El Manual Moderno. 7a. ed. - México, 1980. p.p. 327-354.
10. Hecht E.R. et. al. Thromboplastin: Nomenclature and Preparation of Protein - Free Material Different from Platelet Factor 3 or Lipid Activator. American Journal of Physiology. 193: 584-592. 1958.
11. Henker H. C. and Kahn M. J. Reaction Sequence of Blood Coagulation. Nature 215: 1201. 1967.
12. Howell W. H. "Theories of Blood Coagulation". Physiological Reviews January: 15 (1): 435-467. 1935.
13. Ingram G. I. The Stability of the WHO Referencie Thromboplastin NIBS & C 67/40. Thromb. Haemost. Dec.; 42 (4): 1135-1140 . 1977.
14. Lehninger A. "Bioquímica". Ediciones Omega S.A. 2a. ed. Barcelona. 1979. --- p.p. 293-300.
15. Linman J. "Haematology". Ed. Mc. Millan Publishing. U.S.A. 1975. p.p. 849-893.

16. Loeliger E. A. et. al. Biological Properties of the Thromboplastins and Plasmas Included in the ICTH/ICSH Collaborative Study on Prothrombin Time Standardization. Thromb. Haemost. Dec; 42 (4): 1115-1127.
17. Loeliger E. A. Stability of reference Thromboplastins. Lancet. Dec; 2 (8051): 1279-1281. 1977.
18. Lyberg T. et. al. Synthesis of Thromboplastin by U - 937 cells. Br. J. Haematol. Aug; 51 (41): 631-41. 1982.
19. Lynch M. "Métodos de Laboratorio". Nueva Editorial Interamericana. 2a. ed. - México. 1969. p.p. 806-844.
20. Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. Ed. Merck Sharp & Dohme International. 6a. ed. 1978. p.p. 330-350.
21. Manual Hyland. "Pruebas de Coagulación".
22. Mac Farlane R. G. An enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism and its function as a Biochemical Amplifier. Nature. 202: 498. 1968.
23. Nemerson Y. Characteristics and Lipid Requireriments of Coagulant Protein --- Extracted from Lung and Brain. The Journal of Clinical Investigation. 48: 330-332. 1969.
24. Nemerson Y. Purification and Characterization of the Protein Component of -- Tissue Factor. Biochemistry. 9 (26): 5100-5104. 1970.
25. Nemerson Y. The Reaction Between Bovine Brain Tissue Factor and Factors -- VII and X. Biochemistry. 5 (2): 601-608. 1966.
26. Osterud B. et. al. Production of Blood Coagulation Factor V and Tissue Thromboplastin by Macrophages in vitro. FEBS. May 5; 127 (1): 154-60. 1981.
27. Palkuti H. A. et. al. A Precision Study of Coagulation factor assay Technics. Am. J. Clin. Pathol. 59: 231-235. 1973.
28. Platt W. R. "Color Atlas and Textbook of Hematology". Ed. J. B. Lippincot -- Company. U.S.A. 1969. p.p. 193-220, 223-280.
29. Poller L. et. al. Measuring Partial Thromboplastin Time. An International Collaborative Study. Lancet. Oct. 16; 2 (7990): 842-6. 1976.
30. Poller L. et. al. Stability Studies on Lyophilised Reference Thromboplastin - for Standardisation of Prothrombin-Time. Lancet. Nov. 12; 2 (8046): 1019-22. 1977.
31. Quick A. J. "The Hemorrhagic Diseases and the Physiologi of Hemostasis". Ed. Charles C. Thomas. 5a. ed. Illinois. 1942. p.p. 3-17, 64-79, 312-318.
32. Quick A. J. On various properties of Thromboplastin (aqueous tissue extracts). Am. J. Physiol. 114: 282-296. 1936.

33. Sbarbati N. E. "Estabilidad de Medicamentos". Ed. Ateneo. 1975. p.p. 1-16,--77-105, 135-152.
34. Sonnenwirt A. C. et. al. "Métodos y Diagnósticos de Laboratorio Clínico". Ed. Médica Panameiricana. 8a. ed. Buenos Aires. 1983. p.p. 913-926.
35. Tocantis L. "Coagulación de la Sangre, Hemorragias y Trombosis". Ed. Científico Médica. España. 1969. p.p. 125-130, 175-183.
36. The United States Pharmacopeia. XXI. Twenty-First Revisions. Official from - January 1, 1985. United States. p.p. 1285, 1333-1334, 1345-1347, 1412.
37. William J. W. et. al. "Hematology". Ed. Mac. Graw-Hill. Book Company. 3a. - ed. 1983. p.p. 1202-1211, 1222-1243, 1257-1263.
38. Zeldis S.M. Tissue Factor (Thromboplastin): Localitation to Plasma Membranes by Peroxidase-Conjugated Antibodies. Science. 175: 766-768.

APENDICE 1

Preparación de Soluciones

1. Solución Salina Isotónica (S.S.I.)

Pesar 0.850 g de cloruro de sodio, diluir y aforar a 100 ml. con agua destilada

2. Cloruro de Calcio 0.02 M.

Pesar 0.222 g de cloruro de calcio, diluir y aforar a 100 ml. con agua destilada

3. Oxalato de Sodio 0.1 M.

Pesar 1.340 g de oxalato de sodio, diluir y aforar a 100 ml. con agua destilada

Este anticoagulante se utiliza en la proporción de 1 parte de oxalato de sodio y 9 partes de sangre total .

APENDICE 2

Abreviaturas

ADP	Adenosina - 5' - difosfato
ATP	Adenosina - 5' - Trifosfato
Ca ⁺⁺	Calcio
Fibrina M	Monómero de fibrina
Fibrina Ps	Polímero de fibrina soluble
PF3	Factor 3 de Plaquetas
PG12	Prostaciclina
SFC	Complejos de fibrina soluble
SSI	Solución Salina Isotónica
TP	Tiempo de protrombina