

201



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES "ZARAGOZA"

**Importancia de la Cuantificación de Fibrinógeno,
Número de Plaquetas, TP y TTP como una Medida
Preventiva de Aparición de Problemas de Coagulación,
en Pacientes con Diabetes Mellitus.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

Armando Aguirre Guzmán

María del Rocío Breceda Hernández

México, D. F.

1985





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

<u>CAPITULO I</u>	páginas
I.1 INTRODUCCION -----	2
I.2 FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA -----	6
I.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	7
I.4 OBJETIVOS -----	8
I.5 HIPOTESIS DE TRABAJO -----	9
 <u>CAPITULO II</u>	
GENERALIDADES	
II.1 FISIOLOGIA DE LA HEMOSTASIA -----	11
II.2 VASOCONSTRICION LOCAL -----	12
II.3 HEMOSTASIA PRIMARIA -----	13
II.4 SISTEMA DE COAGULACION -----	22
II.5 FIBRINOLISIS -----	29
II.6 DIABETES MELLITUS -----	31
II.7 ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN LA DIABETES MELLITUS -----	42
 <u>CAPITULO III</u>	
MATERIAL Y METODOS	
III.1 MATERIAL BIOLOGICO -----	44
III.2 MATERIAL Y EQUIPO -----	46
III.3 REACTIVOS -----	47
III.4 OBTENCION DE TROMBOPLASTINA TISULAR -----	48
III.5 DETERMINACION DE TIEMPO DE PROTROMBINA -----	51
III.6 DETERMINACION DE TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL -----	54

	páginas
III,7 RECUENTO DE PLAQUETAS _____	56
III,8 CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO _____	58
III,9 DETERMINACION DE GLUCOSA _____	63

CAPITULO IV

RESULTADOS

IV,1 ANALISIS DISCRIMINANTE _____	69
IV,2 ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE _____	73
IV,3 VALIDACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR OBTENIDA DE CEREBRO HUMANO _____	79
IV,4 VALIDACION ESTADISTICA DE LOS VALORES DE REFEREN CIA DE FIBRINOGENO _____	83

CAPITULO V

DISCUSION DE RESULTADOS _____	85
-------------------------------	----

CAPITULO VI

VI,1 CONCLUSIONES _____	90
VI,2 BIBLIOGRAFIA _____	93

CAPITULO I

I.1 INTRODUCCION

Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha estado vitalmente interesado en la sangre y sus propiedades. La debilidad y la muerte que frecuentemente seguían a la rápida pérdida del líquido escarlata a través de una herida, demostraban dramáticamente al hombre de las cavernas su importancia para la vida.

Gracias a una sorprendente propiedad, la sangre conserva su estado líquido mientras funciona en el interior del organismo como un sistema de transporte de toda clase de sustancias necesarias para la vida (elementos nutritivos, líquidos, hormonas, vitaminas), mientras que, cuando es necesario, ese mismo líquido vital puede convertirse localmente en un gel insoluble para ocluir una rotura del sistema vascular. (23)

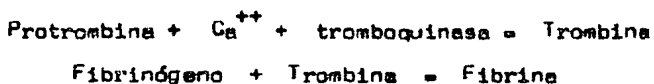
La importancia de la coagulación sanguínea ha sido reconocida desde los tiempos más remotos. En antiguos escritos hebreos ya se describe la hemofilia como un estado patológico, y las leyes de aquel tiempo establecían que si el primogénito moría a causa de una hemorragia provocada por la circuncisión, los hijos quedaban dispensados de esa ceremonia. Del mismo modo, las antiguas leyes familiares de Egipto prohibían que una mujer tuviera más hijos si su primogénito moría a consecuencia de una hemorragia causada por una herida leve.

Los primeros intentos por comprender las propiedades coagulantes de la sangre datan de 1666, y tuvieron su origen en la observación de Malpighi de que un coágulo sanguíneo lavado contiene una trama de fibras. Más de un siglo después, se idearon los primeros métodos para mantener la sangre en estado líquido fuera del cuerpo.

A principios del siglo XIX, Buchanan comparó la coagulación de la sangre con el cuajado de la leche, y opinó que, en ambos casos, la acción de un fermento (enzima) producía un coágulo insoluble a partir de una proteína soluble. En 1803, J.C. Otto llamó por primera vez la atención sobre el trastorno hemorrágico clínico llamado hemofilia. En 1890, Arthus y Pages reconocieron el papel esencial del calcio en el proceso de la coagulación.

En 1875, Schmidt publicó una concluyente monografía sobre el "fermento de la fibrina" (trombina) y su importancia en la coagulación sanguínea. El papel exacto de la substancia que transforma la sangre líquida en un gel fué motivo de grandes controversias hasta 1951, cuando Bailey y sus colaboradores publicaron la primera prueba directa de la acción proteolítica de la trombina sobre el fibrinógeno. Esta prueba y estudios posteriores han demostrado que la trombina cataliza la hidrólisis de las uniones peptídicas en dos puntos distintos de la molécula de fibrinógeno.

En 1904 Morawitz formuló la teoría clásica de la coagulación: (23,30)



Con tal hipótesis se llegó a un punto decisivo en la historia de las investigaciones sobre la coagulación, pues durante más de 30 años constituyó una guía para los investigadores y condujo a mayores adelantos.

En la década de 1930, el método de Quick para la determinación de protrombina en un paso y el de Brinkhous y Smith en dos pasos, pusieron los estudios de coagulación al alcance del laboratorio clínico ordinario.

Los estudios realizados con dichos métodos para la determinación de la protrombina, permitieron atribuir el trastorno hemorrágico del ganado

conocido como "enfermedad del trébol oloroso" a una disminución de la actividad protrombínica causada por la ingestión de trébol oloroso descompuesto. Este descubrimiento condujo al aislamiento e identificación de la bihidroxicumarina ("Dicumarol") a partir del trébol descompuesto y dió como resultado el amplio uso del producto en ciertas enfermedades cardíacas para evitar la coagulación intravascular.

En los últimos 25 años han aumentado enormemente los esfuerzos encaminados a la investigación de los complejos problemas de la coagulación. Aunque esos esfuerzos han producido controversias, también han conducido al descubrimiento de interesantes hechos sobre el mecanismo de coagulación.

Desde 1962 se ha entrado en lo que podría llamarse la Era de la Hipercoagulabilidad, en la que se ha visto que la aceleración del proceso de la coagulación es capaz de producir trombos intravasculares, lo que sucede con tanta frecuencia y que constituye la mayor causa de muerte inmediata de los individuos del sexo masculino del hemisferio occidental. (30)

En la actualidad se sabe que son trece los factores que intervienen en el proceso de la coagulación y como varios de ellos fueron descubiertos simultáneamente por diversos autores y en distintos países, han recibido diferentes denominaciones, lo que constituyó una fuente de confusión al tratar de entenderse los investigadores entre sí, hasta que en el año de 1962 la Comisión de Estandarización y Nomenclatura de la Sociedad Internacional de Hematología procuso la terminología que ahora es generalmente aceptada, designándose a los factores mediante números romanos de la forma siguiente : (23), (6).

-
- I Fibrinógeno
 - II Protrombina
 - III Tromboplastina
 - IV Calcio
 - V Proacelerina, Factor lábil, Globulina aceleradora (AcG).
 - VI No existe
 - VII Proconvertina, Acelerador sérico de la conversión de la protrombina (Spca), Factor estable, Autoprotrombina I.
 - VIII Factor antihemofílico (AHF), Globulina antihemofílica -- (AHG), Tromboplastinógeno, Cofactor plaquetario I, Factor tromboplástico A del plasma, Factor antihemofílico A.
 - IX Componente plasmático de la tromboplastina (PTC), Factor de Christmas, Cofactor plaquetario II, Autoprotrombina - II, Factor tromboplástico B del plasma, Factor antihemofílico B.
 - X Factor Stuart-Prower
 - XI Antecedente plasmático de la tromboplastina (PTA)
 - XII Factor Hageman
 - XIII Fibrinasa, Factor estabilizador de la fibrina, Factor -- Laki-Lorand.
-

I.2 FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Considerando que en la actualidad se presentan con mayor frecuencia casos de Diabetes Mellitus en la población de México (12), resulta de suma importancia conocer todos los aspectos relacionados con dicha enfermedad, poniendo especial énfasis en las complicaciones que de ella se derivan y que afectan cada vez más la salud del paciente (18,19,29).

Una de las complicaciones sujetas a investigación reciente, son las alteraciones vasculares, en las cuales estudios sobre plaquetas y factores de coagulación sugieren que dicha enfermedad se encuentre posiblemente asociada a estados hipercoagulables (13,29), pero son aspectos que hasta el momento no han sido bien dilucidados en la población mexicana.

Es frecuente en nuestro medio realizar la comparación de los valores encontrados en química clínica con los reportados en otros países, sin tomar en cuenta que hay factores genéticos, nutricionales, ambientales, etc., que pueden alterar los valores de referencia, por lo tanto es necesario determinarlos en individuos de la población que se somete a estudio.

Por ello, el trabajo que se pretende realizar consiste precisamente en determinar los parámetros homeostáticos en personas que presentan Diabetes Mellitus Tipo II, delimitando el área de trabajo a pacientes que residen en Cd. Nezahualcoyotl.

I.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la Diabetes Mellitus es un estado patológico capaz de provocar alteraciones de la hemostasia, como es el estado de hipercoagulabilidad en pacientes hiperglucémicos, es importante realizar conjuntamente las pruebas de coagulación y de glucosa control, para detectar a tiempo alguna alteración a nivel de coagulación sanguínea.

Es importante considerar que hasta el momento se ha realizado poca investigación al respecto, la cual aún no proporciona conclusiones concretas (11), por tal motivo estimamos de utilidad la realización del trabajo.

I.4 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Corroborar que la Diabetes Mellitus tiene implicaciones en el mecanismo de la coagulación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar la concentración de fibrinógeno plasmático (factor I), número de plaquetas, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo II, utilizando para ello las pruebas de laboratorio específicas existentes - en la literatura.
- Obtención de tromboplastina tisular a partir de cerebro humano, - para la realización de la prueba (tiempo de protrombina).
- Proporcionar la tromboplastina obtenida en el Laboratorio Central de Análisis Bioquímico Clínicos, para fines de docencia en el módulo de Análisis Bioquímico Clínicos I.

I.5 HIPOTESIS DE TRABAJO

En estados hiperglucémicos causados por Diabetes Mellitus se observarán las siguientes alteraciones en las pruebas de laboratorio:

- a).- Concentración de fibrinógeno aumentada.
- b).- Número de plaquetas disminuido.
- c).- Tiempo de protrombina disminuido.
- d).- Tiempo de tromboelastina parcial disminuido.

CAPITULO II

GENERALIDADES

II.1 FISIOLOGIA DE LA HEMOSTASIA

Debemos diferenciar lo que son la hemostasia y la coagulación. La hemostasia es un sistema de defensa del organismo, cuya principal función es prevenir la salida de sangre del interior de los vasos por la reparación rápida de cualquier ruptura vascular y restablecer la circulación de la sangre cuando se ha obstruido un vaso. La coagulación se ha definido como el paso de la sangre del estado líquido al sólido por acción de la trombina. La coagulación por tanto es una parte importante del proceso de la hemostasia.

La hemostasis engloba una serie de mecanismos, unos rápidos, de respuesta inmediata, otros más lentos que mantienen y consolidan la hemostasia y, por último, los que regulan y controlan una hemostasia excesiva. (6,10,23,30,34).

Se pueden clasificar para su estudio en: Vasoconstricción local ó componente vascular, Hemostasia primaria ó formación del trombo plaquetario, Coagulación de la sangre ó formación del coágulo de fibrina y Fibrinólisis ó disolución del coágulo de fibrina.

Dichos mecanismos no son independientes unos de otros, sino que están íntimamente relacionados entre sí y, a pesar de que se desencadenan simultáneamente, su desarrollo es secuencial, dependiendo de papel que cada uno tiene en la hemostasia. (10).

II.2 VASOCONSTRICCIÓN LOCAL

Cuando se produce una incisión en la piel, la pérdida de sangre es mínima durante los primeros segundos, aumentando después progresivamente. Esto obedece a que se produce una vasoconstricción rápida, seguida de una relajación.

Esta vasoconstricción por mecanismo reflejo es el resultado de la estimulación directa de los nervios simpáticos existentes en la pared de los vasos.

Posteriormente tiene lugar una vasoconstricción por estímulo químico, provocada por la salida del interior de las plaquetas de sustancias vasoactivas, como la serotonina, y por la síntesis de las prostaglandinas en la plaqueta, como el tromboxano A₂ fuertemente vasoconstrictor.

Paralelamente, en el endotelio vascular se sintetiza una prostaglandina, la protaciclina (PGI₂) que es fuertemente vasodilatadora, habiéndose demostrado mayor cantidad de síntesis en la pared de las venas que en la de las arterias.

Todo ello hace pensar que las prostaglandinas representen un mecanismo regulador de la vasoconstricción, si bien no se ha podido dilucidar cuál es el verdadero papel de tales sustancias en la fisiología de la vasoconstricción. (30).

II.3 HEMOSTASIA PRIMARIA (FORMACION DEL TROMBO PLAQUETARIO)

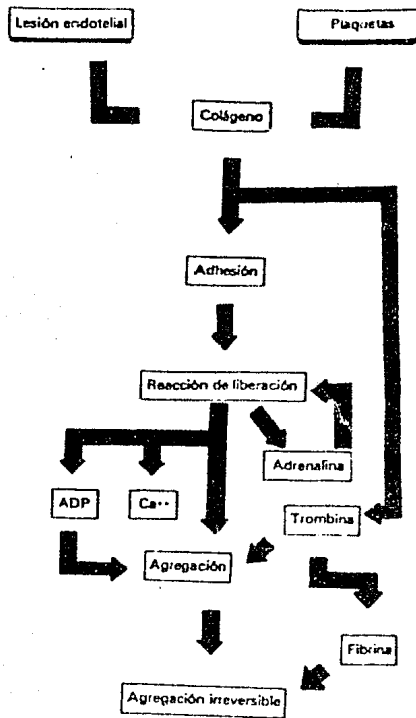
La hemostasia primaria comprende una serie de fenómenos que culminan en la formación de agregados plaquetarios ó trombo plaquetario.

Es una respuesta rápida y provisional de la hemostasia en la que participan fundamentalmente las plaquetas y la pared vascular.

Se pueden distinguir los procesos:

- 1) Adhesión a la pared vascular.
- 2) Cambio de forma y contracción de la plaqueta.
- 3) Reacción de secreción ó liberación del contenido de los gránulos.
- 4) Agregación de las plaquetas ó formación del trombo plaquetario.
- 5) Agregación irreversible ó estabilización por la fibrina.

(ver fig. 1)



(Fig. 1)

Fenómenos que llevan a la formación del trombo plaquetario. (10).

1) Adhesión de las plaquetas

Este fenómeno es la etapa inicial en la formación del trombo plaquetario y tiene lugar por el contacto de la plaqueta con la pared del vaso.

El endotelio intacto no es capaz de provocar adhesión, pero cuando se lesiona, queda al descubierto el tejido conjuntivo subendotelial, que está constituido por colágeno al igual que la membrana basal, con lo que se produce la adhesión.

Se ha identificado en el glucocálix de la membrana plaquetaria una glucoproteína ó también llamada glucocalcina. Hallazgos recientes apoyan que la glucocalcina es la responsable de la adhesión y el lugar de unión con el colágeno.

Hay un factor plasmático imprescindible en la adhesión, es el factor VIII (Willebrand). Estudios recientes indican que hay otra molécula, la-fibronectina ó globulina insoluble en frío, que también participa en la adhesión, sugiriéndose el papel de receptor para el colágeno.

La adhesión no requiere metabolismo energético ni presencia de calcio y parece debida a un fenómeno físico.

2) Cambio de forma y contracción de la plaqueta

La adhesión de las plaquetas al colágeno provoca una serie de cambios en las mismas, pierden su forma discoidea y adquieren forma esférica con emisión de pseudópodos, facilitándose la unión entre las plaquetas. Simultáneamente tienen lugar varios fenómenos, todos ellos determinantes de la agregación plaquetaria:

a) contracción y relajación

- b) síntesis de prostaglandinas
- c) secreción del contenido de los gránulos ó reacción de liberación.

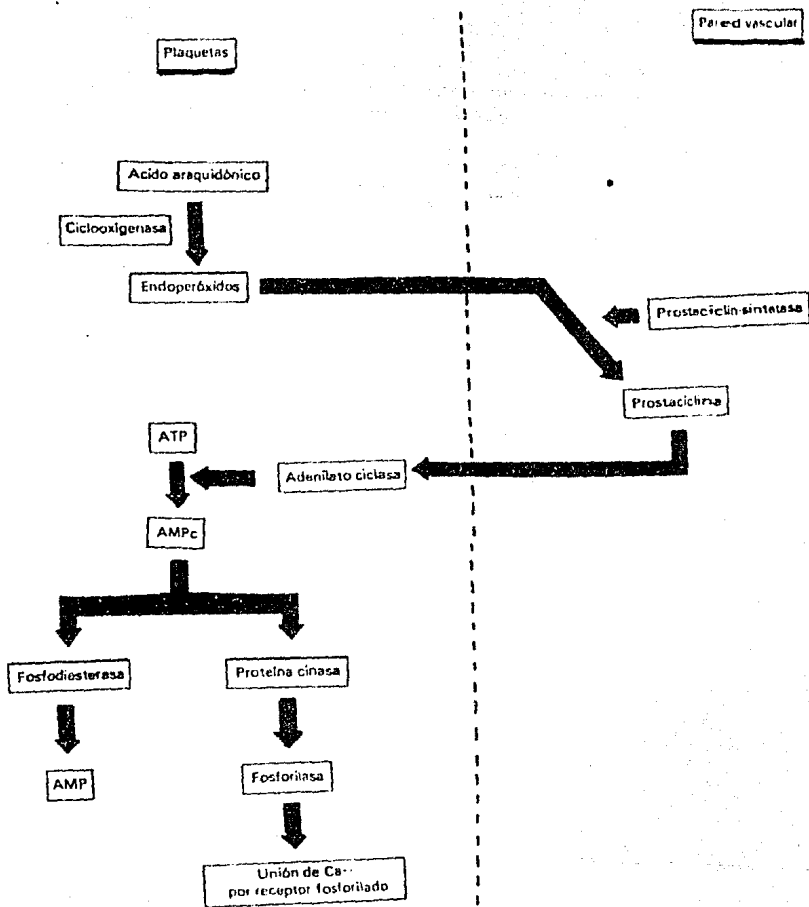
Estos fenómenos desencadenados por el contacto con el colágeno se producen también por otras sustancias capaces de estimular la membrana de la plaqueta; entre los agentes inductores existen compuestos de bajo peso molecular, como ADP y serotonina, enzimas proteolíticas como trombina y tripsina, complejos antígeno-anticuerpo, virus, bacterias, endotoxinas, - ácidos grasos, y otras sustancias como látex y zimosen.

El mecanismo de contracción-relajación está mediado por la salida de calcio y por ello condicionado por la regulación de dicha salida.

La regulación según Varmylen se realiza por medio del AMP cíclico, el calcio se une a una fosfoproteína (cuya fosforilación se produce por la enzima AMPc proteína cinasa); así niveles altos de la enzima AMPc aumentan la fosforilación de la proteína, y con ello aumenta el secuestro de calcio y la relajación de las plaquetas.

El AMPc se sintetiza a partir de ATP por una enzima que es la adenilciclase, y se degrada por otra enzima que es la fosfo-diesterasa, las variaciones de tales enzimas tienen por lo tanto, gran importancia en el proceso de contracción y como consecuencia en la agregación plaquetaria.

Otro sistema de regulación de la contracción, es el GP7Mc, de efecto contrario ya que libera el calcio del sistema tubular denso y favorece la contracción de las plaquetas, (fig.2).



(Fig. 2)

Probable mecanismo de la formación de AMPc interplaquetario y su papel en la relajación plaquetaria. (10).

Síntesis de prostaglandinas:

Se han destacado dos derivados protenoides, el tromboxano A₂ sintetizado en la plaqueta, sustancia inestable muy potente inductor de la agregación y de la contracción vascular, y otra sustancia, la prostaglandina I₂ ó prostaciclina sintetizada en el endotelio, cuyo efecto es contrario ya que inhibe la agregación y produce la vasodilatación.

La síntesis de prostaglandinas en las plaquetas se produce al estimular la membrana con inductores (por ejemplo la trombina), activándose una enzima de la membrana que es la fosfolipasa A₂ que libera el ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de membrana, el ácido araquidónico es un ácido graso no sintetizado por la plaqueta, ya que es incorporado por intercambio con el plasma y parece estar mediado por albúmina.

Mecanismo de acción de las prostaglandinas:

Se ha sugerido la hipótesis de que las prostaglandinas y en particular el TXA₂ sirven de mensajeros químicos en la secreción del contenido de gránulos. Las evidencias que apoyan la hipótesis se basan en estudios ultraestructurales y citoquímicos, demostrándose que la síntesis de TXA₂ tiene lugar en el sistema tubular denso que sirve al mismo tiempo de almacén de calcio, todo ello sugiere que el TXA₂ es el encargado de transportar el calcio al citoplasma, dando lugar a la contracción y a la secreción del contenido granular.

Algunos autores rechazan ésta teoría y sostienen que la activación de las plaquetas por el TXA₂ es secundaria a la secreción, ya que es necesaria la presencia de calcio para que se active la fosfolipasa A₂, que es el primer eslabón en la síntesis del tromboxano A₂.

La acción inhibitoria de la PGI₂ sobre la agregación parece ser debida a que estimula la enzima adenilciclase, dando lugar a un aumento del AMPc con inhibición de la contracción plaquetaria.

3) Reacción de secreción ó liberación del contenido de los gránulos.

La contracción de la plaqueta mantiene los orgánulos al centro y al producirse la relajación tiene lugar la expulsión del contenido de ellos al exterior. En la reacción de liberación juega un papel muy importante el tromboxano A₂, pero es evidente que existen otras vías independientes de la síntesis de prostaglandinas, ya que cuando se bloquea dicha vía, con aspirina, indometacina, etc., hay inductores potentes como la trombina a grandes concentraciones que provoca la reacción de liberación sin que se produzca síntesis de TXA₂, ni requerimiento de calcio, habiéndose sugerido que es la actividad proteolítica de la trombina la responsable de su acción.

En la reacción de liberación sale el contenido de los gránulos constituido por diversas sustancias:

- a) Cuerpos densos, de los que se libera ADP y serotonina, sustancias a su vez inductoras de la agregación y de reacción de liberación, la serotonina además es un potente vasoconstrictor.
- b) Fibrinógeno, que interviene también en la agregación.
- c) Factor 4 plaquetario, proteína de PM 96,000 constituida por una cadena simple de polipeptidos; tiene actividad antiheparina, pero su papel en la fisiología de la hemostasia permanece en estudio.

- d) B-tromboglobulina (BTG), proteína de peso molecular 35,000 constituida por una cadena simple de polipéptidos, se le ha pretendido identificar con el F4 plaquetario, pero se ha demostrado su diferencia tanto química como inmunológica. Hasta el momento el papel fisiológico de la BTG permanece oscuro, mientras para unos autores tiene actividad antiheparina, para otros inhibe la producción de PGI₂ en el endotelio vascular.
- e) El factor mitogénico es una proteína que induce la proliferación de las células del músculo liso en la pared vascular y que puede tener un papel importante en la patogenia de la arteriosclerosis.
- f) Lisosomas de los que se liberan enzimas tales como hidrolasas, que pueden intervenir en la destrucción del trombo plaquetario.

4) Agregación de las plaquetas ó formación del trombo plaquetario

Todos los cambios producidos en la plaqueta por estímulo de su membrana tales como contracción y emisión de pseudópodos favorecen la unión de unas con otras formando agregados, pero para que ésto se lleve a cabo son necesarios los factores siguientes:

- a) Presencia de calcio extracelular, los quelantes del calcio inhiben la agregación.
- b) Fibrinógeno extracelular, en afibrinogenemia se produce reacción de liberación pero no agregación.
- c) Presencia en la zona externa de la membrana de la plaqueta de glucoproteínas.

5) Agregación irreversible ó estabilización por la fibrina

Los agregados plaquetarios forman un trombo plaquetario-inestable; si el estímulo cesa se produce la desagregación y las plaquetas recuperan su forma normal. Se trata pues de un proceso reversible.

Si el inductor es potente y constante, tiene lugar la formación de fibrina entre los agregados plaquetarios, quedando éstas atrapadas entre las redes de fibrina, con formación de trombo estable y la agregación es irreversible.

II.4 SISTEMA DE COAGULACION

El proceso de coagulación de la sangre tiene como fin la formación de fibrina, que es la transformación de una proteína soluble (fibrinógeno), en una proteína insoluble (fibrina) cuyas redes constituyen la trama fundamental del coágulo.

Este mecanismo involucra la activación de todos los factores plasmáticos. Todos ellos proteínas, excepto los fosfolípidos de las plaquetas, y una vez activados se comportan como enzimas proteolíticas sobre otros, activándolos a su vez, constituyendo así la llamada "Cascada de la coagulación".

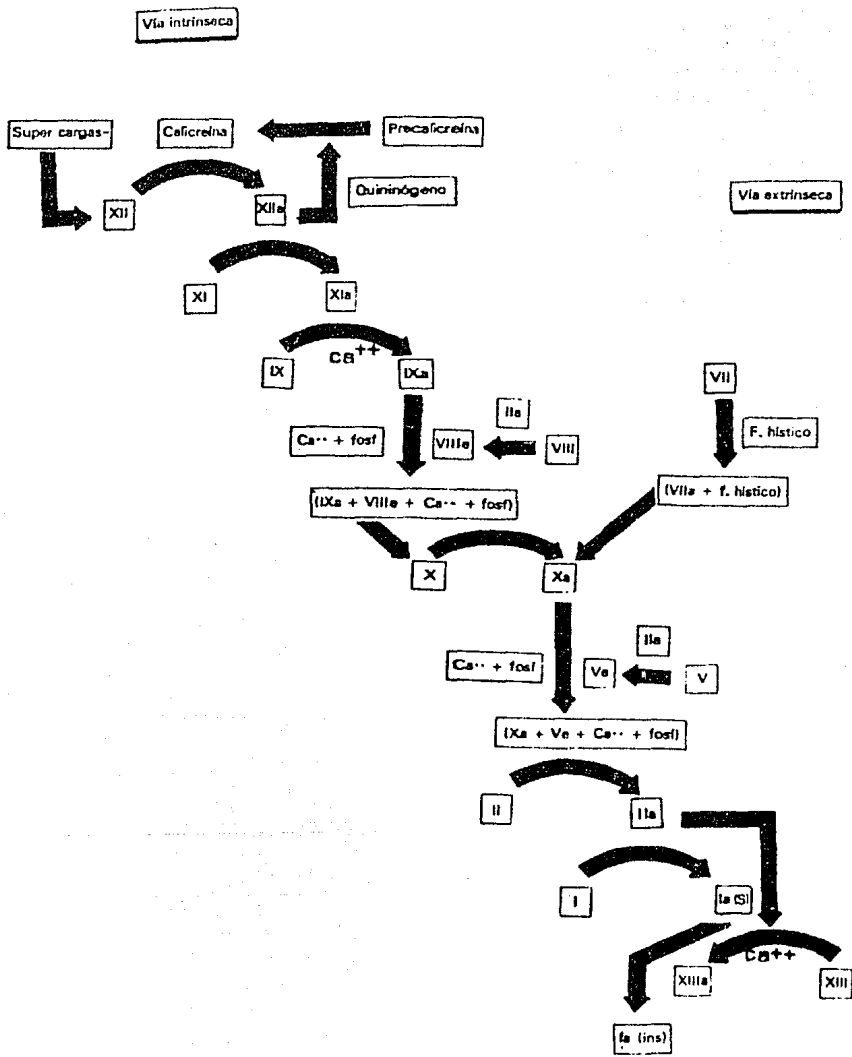
Clásicamente se distinguen 2 vías de activación de la coagulación:

- I) Vía intrínseca.- Donde sólo participan factores plasmáticos.
- II) Vía extrínseca.- La cual se desencadena por la presencia de un factor extrínseco a la sangre, factor hístico y es mucho más rápida.

Para una mejor comprensión, éste mecanismo puede dividirse en tres fases:

- A) Fase inicial de activación del contacto.
- B) Fase intermedia, formación de trombina.
- C) Fase final con formación y estabilización de fibrina.

En el siguiente esquema (fig.3) se muestran las tres fases integradas, constituyendo la hipótesis de cascada.



(Fig. 3) Hipótesis de la cascada enzimática de la coagulación sanguínea. Este diagrama es una modificación del --- publicado por Macfarlane. (10).

A).- La primera fase, comienza con la activación del factor XII, el cual se puede activar por dos mecanismos:

En fase sólida: Por unión de la molécula del FXII a superficies de cargas negativas, lo que ocurre cuando se lesiona el endotelio vascular y queda al descubierto el colágeno del tejido conjuntivo subendotelial ó de la membrana basal. También puede activarse por contacto con otras sustancias como endotoxinas, complejo antígeno-anticuerpo, vidrio, etc., y en forma más lenta por fosfolípidos.

Esta forma de activación provoca un cambio conformacional en la molécula.

En fase líquida: Por activación proteolítica, a través de enzimas como la calicreína, tripsina y plasmina, que rompen la molécula liberando polipéptidos llamados fragmentos de --- FXIIa.

Estudios recientes, proponen la hipótesis de que la verdadera activación del FXII, se produce por la acción proteolítica de la calicreína y, que los cambios conformacionales que tienen lugar por el contacto con superficies de cargas negativas, únicamente hacen a la molécula más susceptible a la rotura proteolítica.

Así pues, el FXII queda activado, cuando es atacado en la unión val-arginina con liberación de un péptido; y se forma una doble cadena de polipéptidos unidas por puentes disulfuros, con centro activo serina en la cadena pesada. Esto último puede apreciarse mejor en la fig. 4.

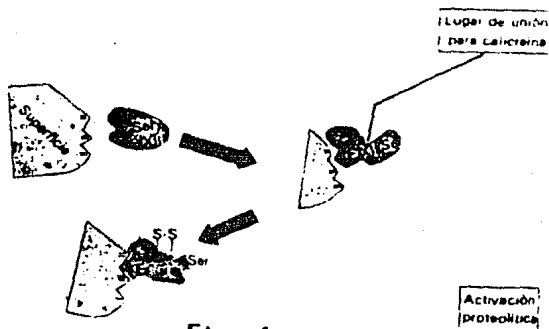


Fig. 4

Activación proteolítica del FXII.

Una vez que el FXII se ha activado, actúa sobre el FXI como proteasa con centro activo serina sobre cada una de las dos cadenas de la molécula del FXI, dando lugar a cuatro cadenas unidas por puentes disulfuro lo que constituye el FXIa.

El FXIa actúa a su vez como proteasa con centro activo serina sobre la molécula del FIX, quedando también con centro activo serina en su cadena pesada, se forma así el FIXa. Esta reacción es Ca^{++} dependiente.

B) Activación del FX por vía intrínseca

Para la activación del FX por vía intrínseca, se requiere del FIXa - iones Ca^{++} , otros factores como FVIII y fosfolípidos. El papel de los fosfolípidos parece ser, el de formar una superficie micelar que favorece la reacción. El FVIII actúa como cofactor acelerando la reacción.

El complejo de (FIXa - FVIII - Ca^{++} - fosf) actúa proteolíticamente sobre el FX rompiendo un enlace arginil-isoleucina de la región N-terminal de la cadena pesada, liberando un pequeño fragmento.

La molécula resultante es el FXa y también actúa como proteasa con centro activo serina.

B) Activación del FX por vía extrínseca

Para la activación del FX por la vía extrínseca, se requiere la activación del FVII, lo que sucede por acción proteolítica del factor tisular (que parece ser una lipoproteína, ampliamente distribuida en el organismo siendo los órganos más ricos el cerebro, pulmón, riñón, hígado, bazo y pared de grandes vasos), también es indispensable el Ca^{++} .

Se rompe la cadena polipeptídica del FVII, dando lugar a una molécula con dos cadenas, que es el FVIIa.

El FVIIa forma un complejo con el factor tisular, fosfolípidos y Ca^{++} y actúa como proteasa sobre el FX, de la misma forma que en la vía intrínseca, dando lugar al FXa.

FORMACION DE TROMBINA

El FXa es la proteasa que activa la protrombina transformandola en trombina.

La reacción se lleva a efecto por acción del complejo formado por (FXa - FVa - Ca^{++} - fosf), formando así la trombina.

La protrombina también se puede activar por otras enzimas como el veneno de Taysen que la activa proteolíticamente, y la estafilocoagulasa que forma un complejo con la protrombina y se comporta como "producto activo" que actúa como trombina.

C) FORMACION Y ESTABILIZACION DE FIBRINA

Corresponde a la etapa final, en la cual, la trombina actúa proteolíticamente sobre el fibrinógeno transformandolo en fibrina y también activa el FXIII que introduce enlaces covalentes en la fibrina, convirtiendola en estable ó insoluble.

La zona de acción de la trombina sobre la molécula de fibrinógeno, corresponde al extremo N-terminal de cada una de las cadenas A y B hidrolizando los enlaces arginil-glicina-- liberando de ésta manera 2 pequeños fragmentos conocidos como fibrinopéptidos A y B (fig. 5).

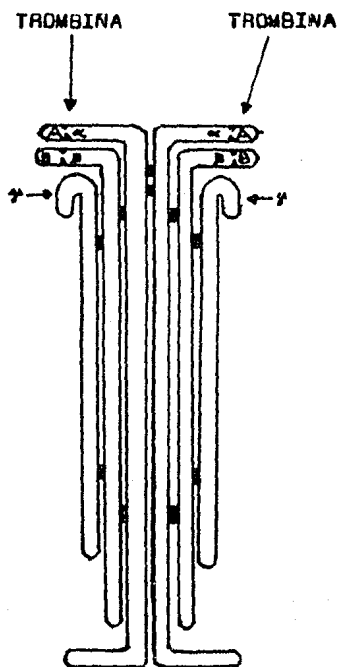


Fig.5

Acción de la trombina sobre la molécula de fibrinógeno. La trombina actúa sobre el extremo N-terminal de las cadenas alfa A y beta B liberando los péptidos A y B respectivamente. (30).

Una vez liberados los fibrinopéptidos, la molécula deja de llamarse fibrinógeno para transformarse en monómero de fibrina en donde los enlaces no son covalentes, por lo que la fibrina formada es soluble a pH ácido ó por agentes desnaturizantes.

El FXIII activado por la trombina, actúa sobre el polímero soluble de fibrina convirtiendo los enlaces iónicos iniciales en enlaces covalentes. De tal manera se forma la fibrina estable e insoluble, que al depositarse en el tapón hemostático de plaquetas formará el coágulo definitivo.

II.5 FIBRINOLISIS

El sistema fibrinolítico es el proceso responsable de la degradación enzimática del coágulo de fibrina. Es la etapa final de la hemostasia que elimina los depósitos de fibrina formados en la etapa de coagulación cuando han cumplido su función en la detención de la hemorragia, y al mismo tiempo restaure el flujo sanguíneo.

Es importante en la fisiología de la hemostasia el que exista un balance adecuado entre el sistema de coagulación y el sistema de fibrinólisis.

El mecanismo fibrinolítico es representado por la transformación del plasminógeno en plasmina, la cual es una enzima proteolítica, cuyos substratos son la fibrina, el fibrinógeno y los factores V y VIII.

La plasmina digiere en forma enzimática a la macromolécula que es la fibrina depositada, produciendo por digestiones sucesivas, fragmentos cada vez más pequeños que pueden ser fagocitados por el sistema fagocítico mononuclear. De todos esos fragmentos nos interesan 4 denominados con las letras "X", "Y", "D" y "E", los que se conocen con el nombre genérico de productos de degradación del fibrinógeno.

Estos 4 productos poseen actividad biológica muy importante, los primeros dos bloquean a la trombina y el "D" y el "E", que son los más pequeños impiden la polimerización de la fibrina y bloquean la agregación plaquetaria.

Los productos de degradación del fibrinógeno funcionan realmente como anticoagulantes, ya que además de lo que se ha señalado sobre ellos disminuyen el nivel de fibrinógeno, factor V y VIII localmente. Este mecanismo por lo tanto, al igual que las prostaglandinas en la agregación plaquetaria, es crítico en la limitación del depósito de fibrina donde es requerida sin que se extienda más allá. (fig.6)

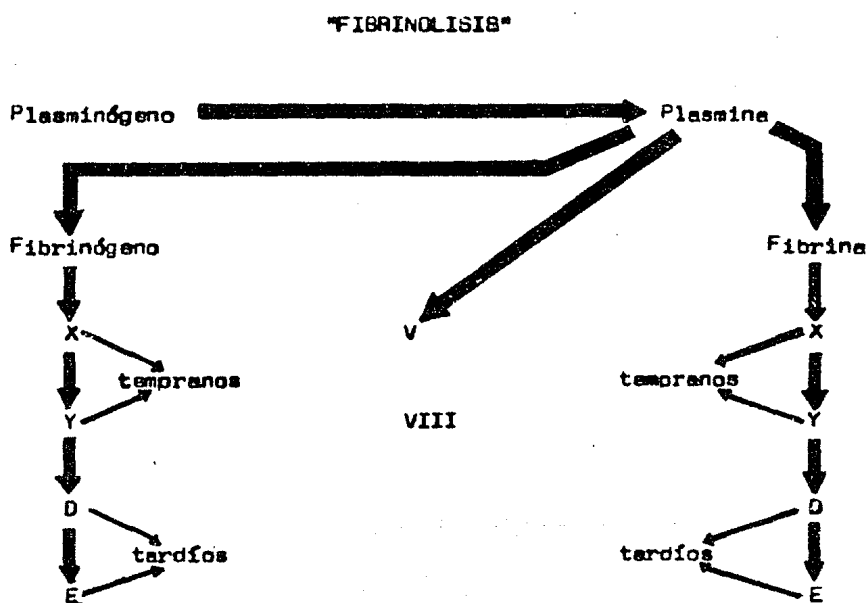


Fig. 6

Sistema fibrinolítico que consiste en la acción de la plasmina sobre la molécula del fibrinógeno y fibrina, hasta llegar a los productos de degradación X, Y, D y E. (13)

II.6 DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus es una enfermedad que se conoce desde la antigüedad. En el papiro de Ebers (Egipto, 1500 años a.c.), se indica que existía una enfermedad que producía orina dulce. En el siglo primero de la era cristiana, Celsus hizo la primera descripción clínica, aunque el nombre "diabetes" (que significa sifon y mellitus que significa dulce) se debe a Aretaneus, un médico romano contemporáneo de aquella época.

La diabetes mellitus no constituye una enfermedad en el sentido clásico de la palabra, es decir, no presenta una clara y definible patogénesis y etiología ni tampoco un cuadro invariable de observaciones clínicas, es en sí una enfermedad compleja. Sin embargo, para su mejor comprensión, se puede considerar como un síndrome de evolución crónica con fuerte predisposición hereditaria, en la cual existe una falla en la reserva pancreática con la consiguiente disminución cuantitativa ó cualitativa de la insulina circulante, ocasionando alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y en diferentes etapas de su evolución, daño micro y macrovascular, así como trastornos neurológicos. (7,12,16-38).

II.6.1) CLASIFICACION

Aunque existen diferentes clasificaciones para la diabetes, en fecha reciente el "National Data Group" en los Estados Unidos estableció una que ha sido ampliamente aceptada--

y que se resume de la siguiente manera: (12)

- 1) Diabetes Mellitus idiopática.
 - a) Tipo I ó que requiere insulina para su manejo.
 - b) Tipo II ó que no requiere insulina para su manejo.
 - Sin obesidad
 - Con obesidad
- 2) Diabetes gestacional ó que se produce exclusivamente durante el embarazo.
- 3) Trastorno en la curva de tolerancia a la glucosa, sin problema clínico.
- 4) Anomalia previa a la curva de tolerancia a la glucosa, cuando en etapas previas el sujeto cursó con diabetes.
- 5) Anomalia potencial a la tolerancia a la glucosa.
- 6) Otros tipos (farmacológica, enfermedad pancreática, etc.).

II.6.2) FRECUENCIA

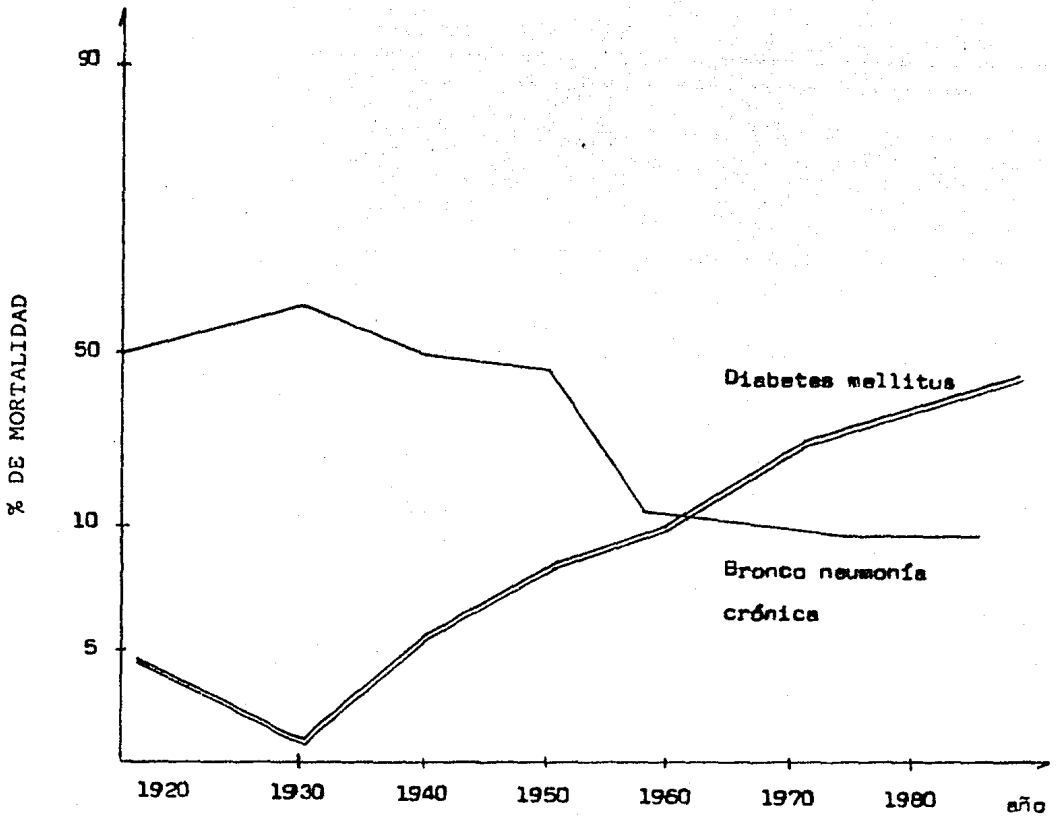
Tanto la prevalencia (porcentaje de la población afectada) como la incidencia (número de casos nuevos por año) sólo pueden calcularse por aproximación, debido a la falta de un método específico para la identificación del individuo diabético. (36)

Sin embargo, resulta claro que la diabetes constituye una de las enfermedades crónicas más comunes y reviste una gran importancia a nivel mundial. (7,12)

La magnitud del problema en América, en relación con la frecuencia de la enfermedad, se observa en el siguiente cuadro:

Porcentaje de enfermos con D.M. en algunos países de América.	
Venezuela	7.3 %
Uruguay	6.9 %
Colombia	6.8 %
Argentina	6.0 %
E. U. A	5.0 %
México	2 a 4 %
Cuba	3.8 %
Brasil	2.7 %
Jamaica	1.2 %
Chile	1.1 %

En México no se cuenta con suficiente información sobre la frecuencia de la diabetes, pero si se analiza la mortalidad por dicha enfermedad en el país (fig.7) puede observarse que ha experimentado un incremento del 200% en los últimos 25 años. (12)



(Fig. 7)

Gráfica que representa la evolución de la mortalidad de algunos padecimientos en la República Mexicana.

Como puede apreciarse en la gráfica, el crecimiento de la mortalidad por diabetes ha sido muy significativo, a pesar de que existen recursos para su manejo y control; ello se debe, en parte, a que existen un número considerable de diabéticos que no saben que lo son y, por lo tanto, no buscan atención médica.

En algunos de los pocos estudios que se han realizado en nuestro país para documentar la frecuencia real de diabetes en la población, se deduce que la diabetes es tan común en México como en otros países y se señala que existen de 2 a 3 diabéticos por cada 100 habitantes. (7,12,38)

II.6.3) ETIOLOGIA

En los diabéticos el páncreas no genera insulina ó existe una insuficiencia de la misma, ya sea porque se encuentra en pocas cantidades ó - porque no es funcionalmente útil. (7,12)

Hay también factores hereditarios, en donde la enfermedad se transmite como carácter genético recesivo y factores ambientales que predisponen a la diabetes, como son:

- a) La obesidad, que constituye la característica más común en un paciente diabético, puede explicarse sabiendo que la capacidad de producción de la insulina está programada genéticamente para una determinada masa corporal (peso). Cuando el peso sobrepasa los valores esperados es muy probable que la insulina se produzca en cantidad insuficiente ó se torne ineficiente, presentándose así la diabetes.
- b) Los fármacos pueden producir clara hiperglucemia. Entre los más comunes están los glucocorticoides y el componente estrogénico de los orales utilizadas para el control natal. Ambas sustancias parecen inducir un estado de resistencia a la insulina.

c) El estrés, se ha asociado con una mayor secreción de cuatro hormonas reguladoras de la glucosa:

-glucocorticoides

-glucagón

-catecolaminas

-hormona del crecimiento

las cuales pueden inducir hiperglucemia. (7,12,15,21,39)

II.6.4) SINTOMATOLOGIA

El síntoma primario de la diabetes mellitus aguda es la hiperglucemia que va frecuentemente acompañada de las siguientes características clínicas:

a) Poliuria: aumento del volumen excretado de orina, causada por la necesidad del organismo de eliminar la alta concentración de glucosa presente en la sangre.

b) Polidipsia: aumento de la sed, originado por la respuesta del organismo a la deshidratación.

c) Polifagia: si los nutrientes no pueden penetrar a la célula, a pesar de estar presentes en el torrente sanguíneo, el individuo tendrá hambre y consumirá más alimentos que lo habitual.

Además se experimenta pérdida de peso, y en casos más graves se produce cetonemia (elevado nivel sanguíneo de cuerpos cetónicos), cetonuria y acidosis.

En la diabetes crónica ó permanente se aprecia un conjunto secundario de síntomas, entre ellos la degeneración de las paredes de los vasos sanguíneos, especialmente de los capilares finos y de sus membranas de sostén. Aunque son varios los órganos que resultan afectados, los ojos son los más susceptibles, por ello la diabetes es una de las causas principales de la ceguera.

Y por último, las complicaciones más importantes son: retinopatías, neuropatías, nefropatías, arteriosclerosis, aumento de la susceptibilidad a las infecciones bacterianas y micóticas. (7,12,15,18,21)

II.6.5) FISIOPATOLOGIA DE LA DIABETES

Los factores que ocasionen falla cuantitativa ó cualitativa de la insulina, son principalmente aquellos que se relacionen con su regulación:

- Alteración en los mecanismos fisiológicos responsables de la estimulación sobre las células beta, como es el caso de una lesión del hipotálamo.
- Falla en los receptores pancreáticos al estímulo fisiológico.
- Defectos en la síntesis, almacenamiento ó liberación de la insulina.
- Alteración de la conversión de proinsulina a hormona activa.
- Falla del complejo insular-transportador.
- Alteraciones en los mecanismos de degradación y eliminación de la insulina.

Cualquiera ó todos los factores, conducen a bajos niveles ó falta total de insulina en el torrente sanguíneo, ocasionando varios trastornos en las rutas metabólicas donde interviene la insulina. (7,12,16,21)

Y se pueden resumir de la siguiente manera:

- Menor utilización de la glucosa por las células, con elevación de su concentración en sangre.
- Movilización considerable de las grasas de reserva, que significa anomalía del metabolismo de las grasas, y en especial depósito de lípidos en las paredes vasculares, dando lugar a arteriosclerosis.
- Menos formación de proteínas en los tejidos debido en parte a que la glucosa ya no cumple la función de ahorro de proteínas, y en -- parte a desaparición del efecto directo de la insulina sobre el anabolismo protéico.

Tales alteraciones se describen en el siguiente esquema:
(Fig. 8).

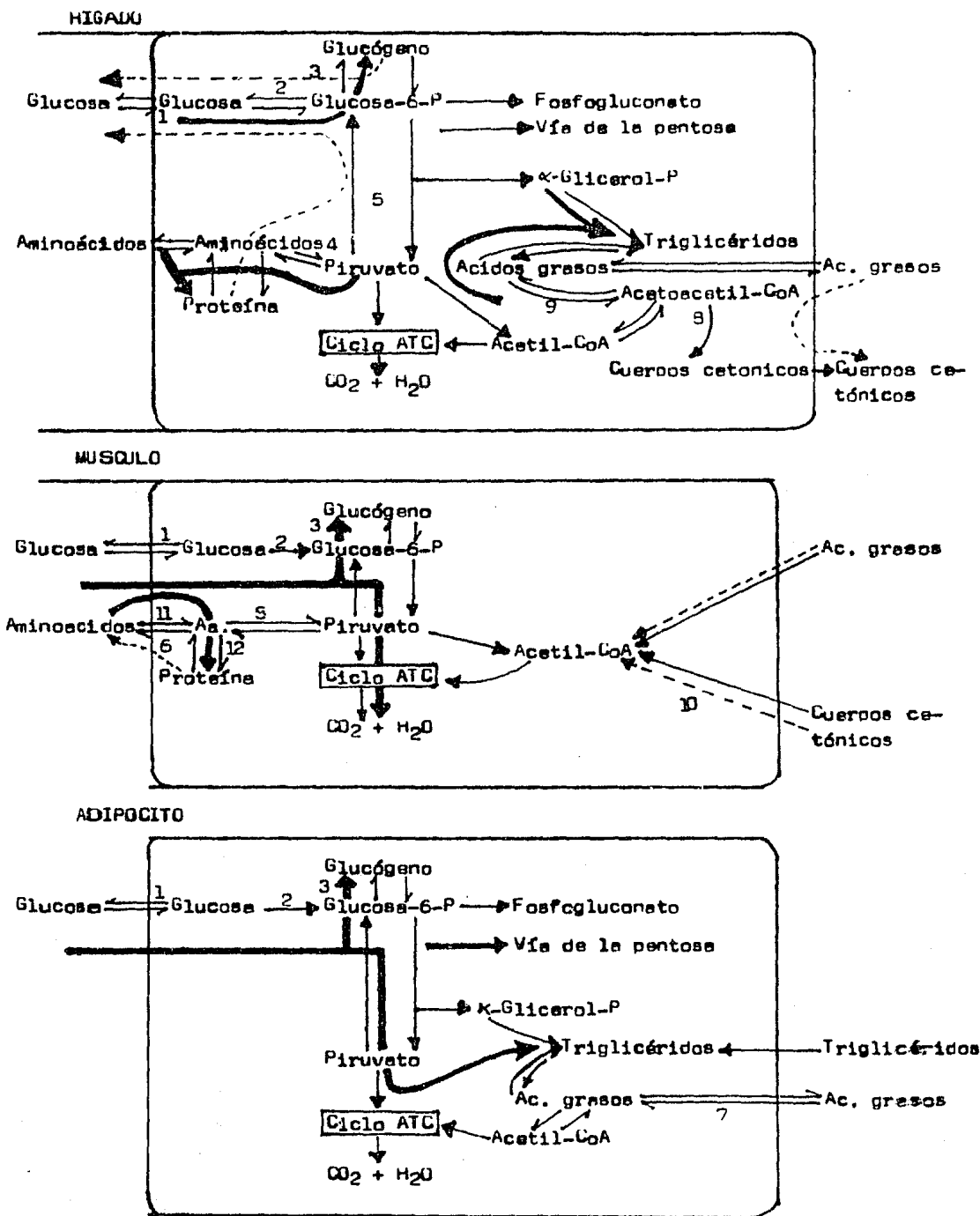


Fig. 8 Efectos metabólicos importantes de la deficiencia de insulina.

————→ Con insulina
 - - - - - → Deficiencia de insulina

H = hígado

M = músculo

A = adipocito

- La insulina acelera el transporte de algunas hexosas, entre ellas la glucosa, a través de las membranas celulares (pasos M-1 y A-1). En la célula hepática se verifica la entrada de glucosa aún en ausencia de insulina. Pero en las demás células su ausencia provoca una marcada reducción en el transporte de la glucosa a través de la membrana, ocasionando elevación de la concentración de glucosa en sangre.
- Una vez que la glucosa entra en la célula, es rápidamente fosforilada a glucosa-6-fosfato; (pasos H-2, M-2, A-2). En donde la velocidad de fosforilación es independiente al transporte de la glucosa.
- En los pasos (H-3, M-3, A-3) se indica la conversión de la glucosa a glucógeno para su almacenamiento. En la ausencia de insulina hay una marcada reducción en la actividad del sistema enzimático que cataliza la conversión de la glucosa a glucógeno. Por lo tanto, la glucosa no es almacenada, incrementando su concentración en sangre.
- En ausencia de insulina hay conversión anormalmente alta de proteínas a glucosa. El hígado es el sitio de la conversión (pasos H-4, H-5). Las proteínas y los aminoácidos son movilizados de los tejidos prifá ricos; así en músculo sucede una pérdida neta de aminoácidos, (paso M-6). Los aminoácidos así movilizados, en la deficiencia de insulina son convertidos en el hígado a glucosa y urea (pasos H-4, H-5), además hay un aumento en la formación de proteínas plasmáticas.

- El nivel alto de ácidos grasos libres en el plasma del diabético se debe, en gran medida, a la aumentada movilización de los depósitos de grasa periféricos (paso A-7). La hormona del crecimiento, las hormonas tiroideas y las catecolaminas refuerzan la lipólisis.

La fuente de los cuerpos cetónicos en el sujeto diabético y en el individuo normal en ayuno es el hígado (paso M-8).

Si falta la insulina, la lipólisis facilitada por diversas hormonas avanza sin freno. El hígado capta grandes cantidades de los ácidos grasos así liberados y los oxida a acetil-CoA (paso M-9). La capacidad reducida del hígado deficiente en insulina para sintetizar ácidos grasos a expensas de la acetil-CoA da por resultado una mayor desviación de éste sustrato a cuerpos cetónicos (paso M-8), los cuales aparecen en la sangre en grandes cantidades.

Los cuerpos cetónicos son utilizados como fuente de energía por el músculo esquelético, músculo cardíaco y otros tejidos (paso M-10).

- La deficiencia de insulina da por resultado la conversión de grandes cantidades de proteínas en glucosa con el consiguiente aumento de la producción y excreción de urea y de amoníaco.

Cuando falta la insulina se reduce la entrada de aminoácidos en el músculo y posiblemente en otras células (paso M-11) y se reduce su incorporación en proteínas (paso M-12).

II.7 ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN LA DIABETES MELLITUS

En pacientes con Diabetes Mellitus, la proporción de mortalidad se ha incrementado como resultado de enfermedades vasculares.

Los problemas vasculares en la Diabetes están manifestados primariamente en dos formas: enfermedad macrovascular (con aterosclerosis prematura) y enfermedad microvascular (retinopatías y nefropatías). Después de años de investigación, las causas de la enfermedad vascular diabética aún permanecen oscuras.

Recientes evidencias sugieren la participación del sistema hemostático en la iniciación ó propagación de lesiones vasculares, en donde los factores de coagulación y las plaquetas están asociados con un estado de hipercoagulabilidad. (18,19,29)

Las alteraciones de la función plaquetaria se relacionan con el incremento en la adhesividad y agregación, lo cual es condicionado por el aumento de las concentraciones plasmáticas de algunos factores de la coagulación (fibrinógeno), la mayor producción por parte de la plaqueta de B-tromboglobulina, prostaglandinas y factor 3 plaquetario, así como una disminución en la producción y liberación del factor 4 plaquetario. El mecanismo fibrinolítico todavía es objeto de controversia en cuanto a su participación en la oclusión vascular del diabético.

En cuanto al fibrinógeno, no sólo existe un aumento en la producción sino al parecer también una vida media acortada en estados hiperglucémicos, lo que sugiere la utilización del fibrinógeno en la formación del trombo. (13,19).

CAPITULO III

MATERIAL

Y

METODOS

III.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se seleccionaron 60 pacientes de ambos sexos, con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo II, cuyas edades estuvieron comprendidas entre los treinta y sesenta años, dicha selección se efectuó en el Laboratorio Central de Análisis Bioquímico Clínicos "ZARAGOZA" y en la Clínica Multidisciplinaria "EDO. DE MEXICO" (UNAM).

También se estudiaron 62 pacientes normales de ambos sexos, cuyas edades estuvieron comprendidas entre veinte y sesenta años y fueron seleccionados en los sitios antes mencionados.

En el grupo testigo se incluyeron todos aquellos pacientes cuyas determinaciones de laboratorio se encontraron en el rango de referencia. Las pruebas de laboratorio realizadas se mencionan a continuación:

- a) Glucosa de 80 a 110 mg/100ml.
- b) Fibrinógeno de 195 a 535 mg/100ml.
- c) Tiempo de protrombina de 11 a 14 seg.
- d) Tiempo de tromboelastina parcial de 25 a 45 seg.
- e) Número de plaquetas de 150,000 a 450,000/mm³.

En el grupo problema se incluyeron aquellos pacientes que por sus características clínicas y de laboratorio presentaron Diabetes Mellitus tipo II, para lo cual se tomaron los siguientes datos:

- a) Edad
- b) Sexo
- c) Tiempo de padecer la diabetes
- d) Tipo de tratamiento

- a) Tiempo de tratarse
- f) Aparición de hemorragias
- g) Aparición de hematomas
- h) Tipo de síntomas generales
- i) Glucosa sanguínea

Nota: La concentración de glucosa sanguínea para el grupo problema (diabéticos) está comprendida en el rango de 120 a 300 mg/100ml.

III.2 MATERIAL Y EQUIPO

Espectrofotómetro. ESPECTRONIC 20 Mod. Bausch & Lomb.

Centrífuga, Aparatos científicos Mod. Solbat.

Microscopio óptico. American optical Mod. Micro Star.

Balanza analítica. Mettler H-80.

Baño de agua. Mappa Mod. BMT-4.

Cronómetro.

MATERIAL:

Cámaras de Neubauer.

Cubrehematímetros.

Pipetas de thoma para glóbulos rojos.

Cajas de petri.

Embudos de vidrio.

Matraces volumétricos de 500 y 1000ml.

Matraces erlenmeyer de 250 y 500ml.

Vasos de precipitados de 100,250,500 y 1000ml.

Pipetas Pasteur.

Pipetas graduadas de 0.1,1.0,5.0, y 10ml.

Probetas de 50 y 100ml.

Tubos de ensayo de (13X100mm y 12X75mm).

Mortero con pistilo (grande).

Gredillas.

Jeringas desechables de 5.0 y 10ml.

Ligaduras.

Espátulas.

Torundas de algodón.

Agitadores de vidrio.

Papel filtro.

III.3) REACTIVOS

Oxalato de potasio 0.1M. Baker.
Cloruro de calcio 0.02M. Baker.
Cloruro de sodio 0.85%. Baker.
Oxalato de amonio 1%. Tecnica Quimica.
Cloruro de bario. Baker.
Acido sulfúrico 0.2N. Baker.
EDTA. Productos Químicos Monterrey.
Ac. acético glacial. Baker.
O-toluidina. Merck-México.
Tiourea. Baker.
Agua destilada.

III.4 OBTENCION DE TROMBOPLASTINA TISULAR (5, 23)

Se ha demostrado la existencia de actividad tromboplástica en muy diversos materiales biológicos que incluyen extractos tisulares y hasta el veneno de una serpiente (la *Vipera russelli*).

El pulmón, el cerebro, el testículo y la placenta son algunos de los órganos de los que se puede extraer la tromboplastina. La actividad relativa de la tromboplastina varía según el órgano del que haya sido extraída. También influyen notablemente en la potencia y estabilidad del producto final, el método de preparación y la calidad de los órganos empleados.

La tromboplastina extraída de cerebro humano tiene mayor actividad y estabilidad, por lo que se recomienda su preparación para fines de investigación de la coagulación sanguínea.

III.4.1) PREPARACION DEL EXTRACTO CEREBRAL

- a) Obtener un cerebro humano post-mortem, de preferencia de 24 a 48 horas después de la muerte. El órgano se transporta perfectamente sellado en un recipiente que contiene suficiente solución isotónica para cubrirlo. Si no es utilizado inmediatamente conservarlo en refrigeración.
- b) Teniendo cuidado al manejar el órgano, remover y descartar las meninges y cerebelo, así como los pequeños vasos sanguíneos.
- c) Lavar con agua corriente y cortar el órgano en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 a 2 cm. de diámetro.
- d) Emulsificar los fragmentos en un mortero grande, con acetona, hasta que adquieran un aspecto de hojuelas. La acetona sobrenadante se deshecha y se repite la emulsión hasta que ya no adquiera aspecto lechoso, lo que indica que se han quitado todos los lípidos solubles en acetona.

- e) La substancia cerebral restante se esparce sobre papel filtro seco, y se deja secar a temperatura ambiente.
- f) 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.

III.4.2) PREPARACION DE LA SUSPENSION DE TROMBOPLASTINA TISULAR PARA LA DETERMINACION DE TIEMPO DE PROTROMBINA

- a) Tomar 0.5g de polvo seco de cerebro y suspenderlos en 10ml de cloruro de sodio al 0.85% y calentar a 37°C durante 15 a 20 min. agitar cada cuatro min. por inversión del tubo de ensayo, donde está contenido el extracto.
- b) Las partículas gruesas se dejan sedimentar, y para la prueba de tiempo de protrombina se utiliza el sobrenadante opalescente.
- c) Almacenar el sobrenadante en frascos viales de 5ml. de capacidad a 4°C durante un día antes de su uso.

III.4.3) ESTANDARIZACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR

- a) Utilizar 10 plasmas obtenidos de pacientes normales, a los cuales se les determina su TP con un reactivo comercial de referencia y con el obtenido en el laboratorio. Dichos plasmas deben caer en el rango de referencia (11 a 14 seg).
- b) Una vez que se ha determinado el TP para cada uno de los plasmas proceder a preparar el pool, que consiste en la mezcla de todos ellos, y se determina el TP de dicha mezcla.

- c) Este pool sirve como control normal en cada serie de determinaciones que se realicen cada día. Al mismo tiempo indica la estabilidad y potencia de la tromboelastina.
- d) Para cada suspensión de tromboelastina tisular que se prepare, debe seguirse el mismo procedimiento.

NOTAS:

- 1) Es aconsejable hacer lotes suficientemente grandes de polvo de cerebro y si se conserva convenientemente, retiene su potencia durante varios meses.
- 2) Se recomienda preparar la suspensión de tromboelastina tisular por lo menos cada dos ó tres semanas, ya que su actividad va disminuyendo con el tiempo.
- 3) Esta tromboelastina adicionada de cantidades óptimas de calcio y empleada en la determinación de TP, da resultados confiables y reproducibles.

III.5 DETERMINACION DEL TIEMPO DE PROTROMBINA EN UN PASO

METODO DE QUICK. (33)

FUNDAMENTO:

El plasma obtenido de una sangre a la que se ha añadido un anti coagulante que fija el calcio, se coagulará en pocos segundos cuando se recalifique en presencia de tromboplastina tisular. Esta detección además de medir la actividad de la protrombina, mide también la actividad de los factores: I, V, VII y X.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Antes de la toma de muestra, calibrar tubos de ensayo de vidrio de 13 X 100mm. limpios y secos, de tal manera que se deposite en ellos exactamente 5ml de sangre.
- 2) Agregar 0.5ml de solución de oxalato de sodio 0.1M a cada tubo.
- 3) Obtener alrededor de 5ml de sangre venosa y se depositan de inmediato en el tubo calibrado, hasta alcanzar la marca. Mezclar la sangre y la solución de oxalato mediante una suave inversión del tubo.
- 4) Centrifugar la muestra a 3000 rpm en un lapso no mayor a 10min. el plasma sobrenadante se separa en otro tubo de ensayo limpio y seco.
- 5) Para cada muestra que se quiera someter a prueba, colocar 0.5ml de solución de cloruro de calcio 0.02M en un tubo de ensayo. En otro tubo, depositar la misma cantidad de la suspensión de tromboplastina tisular (obtenida previamente). Poner ambos tubos en un baño de agua a 37°C.

- 6) Medir exactamente 0.1ml del plasma problema en un tubo de ensayo de 11 X 75 mm y colocarlo en el baño de agua a 37°C.
- 7) Dejar incubar el plasma aproximadamente por 60 seg, añadir 0.1ml de la solución de tromboplastina tisular agitando el tubo suavemente, y en seguida 0.1ml de sol. de cloruro de calcio 0.02M, al mismo tiempo accionar el cronómetro. Dejar el tubo dentro del baño hasta transcurridos 8 seg. aproximadamente.
- 8) Someter el 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 ese momento se detiene el cronómetro y se registra el tiempo.
- 9) Repetir el procedimiento dos veces más para obtener 3 registros por cada problema. La primera determinación da una idea aproximada del valor del TP, la segunda y tercera no deben variar en más de dos segundos.
- 10) Tratar la muestra control de igual forma que la muestra problema. Debe tenerse cuidado de tratar un control en cada serie de determinaciones.
- 11) Los resultados pueden reportarse como sigue:
 - a) Como tiempo de protrombina (seg)

El TP normal puede variar entre 11 y 14 seg, considerando las diferencias de técnica entre los distintos laboratorios y el manejo personal de las muestras.

Otro aspecto importante se refiere a que cada laboratorio establece sus propios valores de referencia correspondientes al reactivo que produce.

b) Como porcentaje del normal:

Puede obtenerse una relación más exacte entre el plasma normal y el plasma en estudio, usando las curvas de actividad protrogbínica.

Para construir tales curvas, se relacionan los tiempos de protrombina con varias diluciones de plasmas normales.

NOTAS:

- 1) En la toma de muestra, debe evitarse al máximo el traumatismo de la vena, ya que se liberan sustancias que aceleran el mecanismo de la coagulación, obteniéndose de ésta manera resultados falsos. Cuando ésto suceda, se recomienda descartar la primera porción de la muestra y coleccionar la siguiente.
- 2) Es muy importante que todo el material de vidrio (como tubos y pipetas) que se utilice para las pruebas de tiempo de protrombina, tiempo de protrombina parcial y fibrinógeno esté perfectamente limpio, cuidando de eliminar todo residuo de detergente enjugando escrupulosamente con suficiente agua destilada, así mismo utilizarlo bien seco.

III.6) DETERMINACION DE TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL (8)

FUNDAMENTO:

La prueba de TTP consiste en añadir tromboelastina parcial (obtenida por extracción clorofórmica de la tromboelastina tisular) y calcio al plasma fresco del paciente, para medir el tiempo en que se forma el coágulo.

Esta técnica determina las deficiencias de los factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II y I.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Al igual que para el TP, antes de la toma de muestra se calibran tubos de ensayo de vidrio (13 X 100mm) limpios y secos de modo que se deposite en ellos exactamente 5ml de sangre.
- 2) Agregar 0.5ml de solución de oxalato de sodio 0.1M en cada tubo.
- 3) Obtener alrededor de 5ml de sangre venosa y se depositan de inmediato en el tubo calibrado hasta alcanzar la marca.
Mezclar la sangre y la solución de oxalato mediante una suave inversión del tubo.
- 4) Centrifugar la muestra a 3,000 rpm en un lapso no mayor de 10min. el plasma sobrenadante se separa en otro tubo de ensayo limpio y seco.
- 5) Para cada muestra que se someta a prueba, colocar 0.5ml de solución de cloruro de calcio 0.02M en un tubo de ensayo. En otro tubo colocar la misma cantidad de tromboelastina parcial activada.

- 6) Medir exactamente 0.1ml del plasma problema en un tubo de ensayo de 12 X 75mm y colocarlo al igual que los dos tubos anteriores, en un baño de agua a 37°C durante 60 seg.
- 7) Añadir 0.1ml de tromboplastina parcial activada al plasma problema agitando el tubo suavemente y en seguida 0.1 ml de solución de cloruro de calcio 0.02M, al mismo tiempo accionar el cronómetro. Se deja el tubo dentro del baño hasta transcurridos 20seg.
- 8) Someter el tubo a un suave movimiento de vaivén frente a una buena fuente de luz, observando el contenido hasta la formación de la malla de fibrina, en ese instante detener el cronómetro y registrar el tiempo.
- 9) Repetir el procedimiento dos veces más para obtener tres registros para cada plasma problema. La primera determinación da una idea aproximada del valor del TTP, el valor de la segunda y tercera no debe variar en más de dos segundos.
- 10) Debe cuidarse el tener un control en cada serie de determinaciones.
- 11) El resultado se reporta conjuntamente con el valor del control normal en segundos. El valor de referencia para TTP puede variar de 25 a 45 segundos.

NOTA:

Las recomendaciones son las mismas que se dan en la determinación de tiempo de protrombina en un caso.

III.7) METODO PARA RECuento DE PLAQUETAS CON SOLUCION DE
OXALATO DE AMONIO 1%. (6)

FUNDAMENTO:

Se diluye sangre total 1:20 con solución de oxalato de amonio al 1%, con lo cual se produce la lisis de los hematíes y se hace el conteo de plaquetas mediante la cámara de Neubauer.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Tomar una muestra de 3ml de sangre venosa con jeringa de plástico y se coloca en un tubo de plástico de 12 X 75mm que contiene una gota de EDTA, mezclar perfectamente para evitar que la muestra se coagule, así mantendrá propiedades satisfactorias durante 2 a 3 hs.
- 2) Aspirar sangre hasta la marca 1 con la pipeta de Thoma para glóbulos rojos. Se aspira inmediatamente solución de oxalato de amonio 1% hasta la marca 100 de la pipeta, se agita durante 15 a 20 min.
- 3) Descartar las primeras 8 gotas de la pipeta de thoma, en seguida se llena la cámara de Neubauer cuidando que el líquido no se derrame.
- 4) Colocar la cámara en una caja de petri que contiene un papel filtro húmedo. Se deja reposar de 20 a 30 min de preferencia en refrigeración.
- 5) Colocar la cámara en el microscopio óptico y se cuentan las plaquetas como se hace en un recuento de glóbulos rojos. El número de células contadas se multiplica por el factor (5000) para obtener el N° de células/mm³.

El valor de referencia de las plaquetas es de 150,000 a 450,000/mm³.

NOTAS:

- a) La solución de oxalato de amonio 1% debe conservarse a 4°C, además debe agregarse una gota de solución de timerosal (1 gota por cada 100ml de solución) para prevenir el crecimiento de microorganismos, también debe filtrarse antes de su uso.
- b) La agitación debe ser suficiente para eliminar los eritrocitos y evitar su interferencia en el conteo de las plaquetas.

III.8) QUANTIFICACION DE FIBRINOGENO

METODO DE STIRLAND (MODIFICADO). (22)

Es un método muy fácil que da resultados fidedignos en casi todos los casos. Se basa en la propiedad del fibrinógeno de coagular a 56°C mientras que las demás proteínas del plasma sólo coagulan por encima de 60°C.

Stirland utilizaba 0.2ml de plasma, pero se ha encontrado que 0.3ml permiten obtener una mayor sensibilidad para las cifras bajas de fibrinógeno. También recomendaba utilizar cloruro de sodio al 1%, pero el cloruro de sodio al 0.85% resulta satisfactorio.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Obtener sangre fresca (2 ml) utilizando como anticoagulante oxalato de sodio 0.1M (el método no puede realizarse con citrato).
- 2) Centrifugar a 3000 rpm en un lapso no mayor de 10 min. y separar el plasma en otro tubo de ensayo limpio y seco.
- 3) En dos tubos (13 X 100mm), rotulados "problema" y "blanco" pipetear 0.3ml de plasma y 3.0ml de cloruro de sodio 0.85% (preparado lo más exacto posible).
- 4) Mezclar perfectamente el contenido de los tubos, colocar el tubo marcado como "problema" en un baño de agua a 56°C durante 15min exactamente, dejando el tubo "blanco" a temperatura ambiente.
- 5) Retirar el tubo "problema" y enfriar a temperatura ambiente. Medir la turbidez a 650nm, utilizando la dilución de plasma "blanco" (sin calentar) para establecer el cero del espectrofotómetro. La cifra de fibrinógeno se lee en una curva de calibración previa.

CALIBRACION (METODO DE SHANK Y HOAGLAND)

En esta prueba la turbidez que produce un plasma que contiene 590 mg de fibrinógeno/100ml equivale a 20 unidades de turbidez de timol (6 unidades de globulina gamma de Kunkel). La relación de turbidez y la concentración de fibrinógeno es lineal hasta 600mg por 100ml.

Por lo tanto, con el patrón de 20 unidades de turbidez de timol puede construirse una curva para el método empleando cualquier tipo de colorímetro ó espectrofotómetro.

- 1) Disolver 1.173 g de cloruro de bario químicamente puro en agua destilada y se afora a 100ml.
- 2) Colocar exactamente 3.0ml de la solución de cloruro de bario en un matríz volumétrico de 100ml y se afora con ácido sulfúrico - 0.2N, mezclar perfectamente. El patrón resultante corresponde a 20 unidades de turbidez de timol.
- 3) En una serie de 5 tubos se colocan 0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 ml del patrón de 20 unidades y llevar el volumen de cada tubo a 10ml con agua destilada, mezclar bien el contenido. Estos patrones equivalen a 0, 5, 10, 15 y 20 unidades de turbidez.
- 4) Leer las absorbancias a 650nm estableciendo el cero con el blanco; las absorbancias y las cifras correspondientes a la turbidez permitan construir una gráfica. Los puntos deben caer sobre una recta que pase por el origen de los ejes.
En la siguiente tabla (tabla N°1), se muestran 5 datos calculados para la construcción de la gráfica.

TABLA N° 1

Absorbancia	Concentración de fibrinógeno (mg/100ml.)
0,10	110,48
0,20	220,97
0,30	331,46
0,40	441,94
0,50	552,43

La recta se ajustó por mínimos cuadrados utilizando el factor siguiente:

0,0267

que se obtuvo por análisis de regresión múltiple, en la computadora Burroughs 7800, en el paquete SAREG (Simulación y Análisis de Regresión).

Los puntos de la recta que se muestran en la tabla N°1 se calcularon con la fórmula:

$$\text{mg de fibrinógeno} = \frac{\text{Abs.} (590)}{0,0267} \\ 20 \text{ U. Turb.}$$

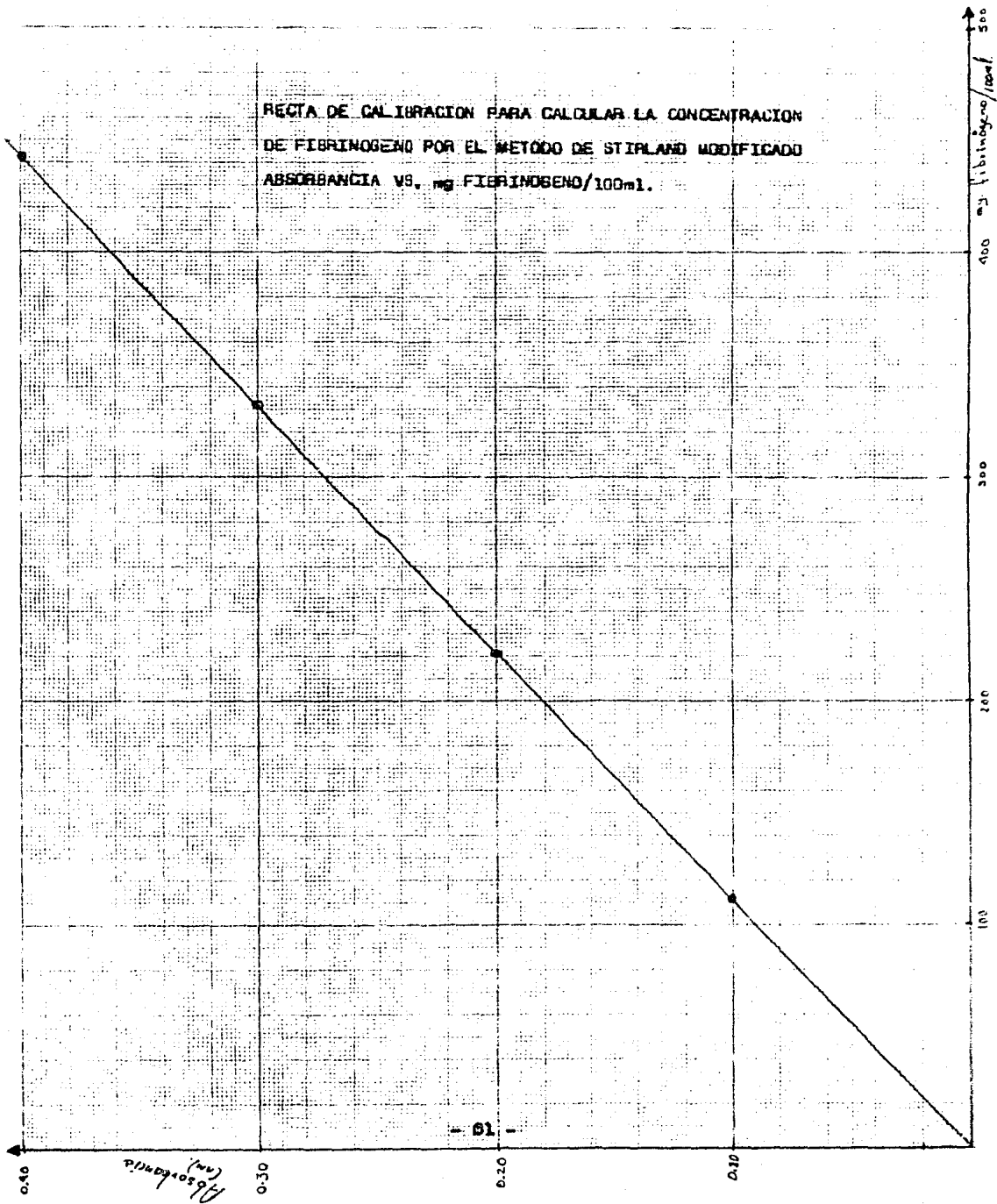
donde:

Abs. = Absorbancia del problema

0,0267 = Factor (constante)

y 20 Unidades de Turbidez equivalen a 590 mg. de fibrinógeno.

RECTA DE CALIBRACION PARA CALCULAR LA CONCENTRACION
DE FIBRINOGENO POR EL METODO DE STIRLAND MODIFICADO
ABSORBANCIA VS. mg FIBRINOGENO/100ml.



Valores de referencia para fibrinógeno:

Van de 195 a 535 mg/100ml.

NOTAS:

- 1) Al retirar el tubo problema del baño de agua, se debe tener especial cuidado de agitar antes de leer en el espectrofotómetro, con el objeto de favorecer la homogeneidad del medio, evitando así lecturas erróneas.
- 2) Cuidar que la temperatura del baño se mantenga constante en $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante los 15 minutos de calentamiento, para evitar la interferencia de otras proteínas plasmáticas.

III.9) DETERMINACION DE GLUCOSA (METODO O-TOLUIDINA)

FUNDAMENTO:

El método de la O-toluidina descrita por Hultman en 1959, se basa en que la O-toluidina reacciona específicamente con las aldohexosas en solución acética caliente, para formar una mezcla en equilibrio - de glicosilamina y la correspondiente base de Schiff.

Además de la rapidez, sensibilidad, precisión y relativa sencillez, junto con la especificidad de la hexosa, lo convierten en un método manual ideal.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Tomar una muestra de sangre venosa (alrededor de 5ml) y transferirla a un tubo de ensayo de 13X 100mm sin anticoagulante, en el caso de que se utilice suero, ó bien con anticoagulante si se utiliza plasma.
- 2) Centrifugar la muestra a 3000 rpm durante 5-10 minutos.
- 3) Separar el suero ó plasma en otro tubo limpio y seco.
- 4) Rotular tres tubos (Folin) como sigue:
Tubo 1 _____ blanco
Tubo 2 _____ patrón
Tubo 3 _____ problema
- 5) En el tubo 2 colocar 0.1ml de solución patrón de glucosa, cuya concentración es 100mg/dl.
En el tubo 3 se colocan 0.1ml del suero ó plasma problema.
- 6) Agregar 3ml del reactivo de o-toluidina a los tres tubos y mezclar.
Colocar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 10min.

- 7) Enfriar en un baño de hielo (ó agua fría) durante 5 a 10 min y se mezclan bien.
- 8) Leer en el espectrofotómetro a 630nm contra blanco de reactivos.
- 9) Los cálculos se realizan aplicando la relación siguiente:

$$\frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 100 = \text{mg de glucosa/100ml}$$

Los valores de referencia son de 80 a 110 mg/100ml .

CAPITULO IV

RESULTADOS

RESULTADOS

En el presente trabajo se manejan dos poblaciones, una de -- pacientes normales y otra de pacientes diabéticos, en la tabla -- N°2 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las -- determinaciones realizadas.

Tabla N°2

Variables	Pacientes normales			Pacientes diabéticos		
	N°de casos	\bar{x}	SD	N°de casos	\bar{x}	SD
Fibrinógeno (mg./100ml)	62	203.57	54.46	55	357.71	130.0
Tiempo de - protrombina (seg.)	62	12.79	0.580	36	12.45	0.769
Tiempo de - tromboplastina parcial (seg.)	62	41.98	0.859	36	37.63	0.970
Plaquetas - por mm ³ X10 ³	62	268.72	56.50	58	281.58	102.6

\bar{x} - Media aritmética

SD - Desviación estandar

Utilizando la fórmula:

$$\bar{X} \pm 1.96 \frac{\delta}{\sqrt{n}}$$

donde:

X es la media aritmética
δ es la desviación estandar
n es el número de casos

Se obtienen los valores de intervalo de confianza con 95%, para cada una de las variables incluidas en la tabla N°3.

Tabla N°3

Variables	Intervalo de confianza 95%
Fibrinógeno (mg./100ml)	88.76 ————— 318.37
Tiempo de protrombina (seg)	11.64 ————— 13.93
Tiempo de tromboplas- tina parcial (seg)	31.76 ————— 52.19
Plaquetas por mm ³ X10 ³	154.60 ————— 328.70

La tabla N°3 muestra los valores de referencia para la pobla-
ción normal utilizada en este estudio con un intervalo de confi-
anza del 95%.

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó el servicio de la computadora Burroughs-7800, y se manejaron las siguientes variables:

- X1 = GRUPO
- X2 = EDAD DEL PACIENTE EN MESES
- X3 = SEXO
- X4 = GLUCOSA
- X5 = CONCENTRACION DE FIBRINOGENO
- X6 = TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)
- X7 = TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL (TTP)
- X8 = NUMERO DE PLAQUETAS
- X9 = TIEMPO DE PADECER DIABETES
- X10 = TIEMPO DE TRATAMIENTO
- X11 = TRATAMIENTO CON TOLEUTAMIDA
- X12 = TRATAMIENTO CON INSULINA.

Los análisis estadísticos realizados fueron los siguientes:

IV. 1 .- ANALISIS DISCRIMINANTE. (5, 25).

IV. 2 .- ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE (2).

IV.1 .- Es posible resumir el propósito general del Análisis Discriminante de la siguiente manera:

Se tiene un conjunto de "n" individuos repartidos en "g" poblaciones mutuamente exclusivas, para cada individuo se tiene registradas "p" mediciones representadas por X_1, X_2, \dots, X_p variables aleatorias. Se desea investigar la relación que existe entre la clasificación de los individuos y el conjunto de variables medidas sobre ellos. Esto se hace en general por dos propósitos:

- A) Utilizar las variables X_1, X_2, \dots, X_p para clasificar individuos, que por alguna causa se desconozca la población de la que provienen.
- B) Estudiar las características de las "g" poblaciones, en términos de las X_1, \dots, X_p variables, para así poder establecer sus diferencias.

Los objetivos de un estudio de discriminación pueden ser diferentes y es en función de esto, que vamos a diferenciar entre las dos fases a seguir:

IV.1.1) FASE DESCRIPTIVA

Se tienen "n" individuos que pertenecen a "g" poblaciones distintas, se quiere establecer el poder discriminatorio de una serie de variables X_1, X_2, \dots, X_p tomadas de ellos. Es decir, que se quiere saber que tan bien esas variables pueden usarse para establecer diferencias entre las poblaciones y por consiguiente se desea determinar su eficacia para identificar a cual de las poblaciones pertenece un nuevo individuo. En un principio se desea probar si las variables toman valores significativamente distintos en cada uno de los grupos o poblaciones. Una vez probado el valor

---discriminativo de todas las variables en conjunto, interesa -- por otro lado, el poder discriminativo de cada una de las variables para poder escoger de ese conjunto total de variables un subconjunto de estas que permita la mejor discriminación entre los grupos. Así se excluye a variables con bajo poder discriminatorio y se facilita la interpretación de los resultados.

IV.1.2) FASE DECISIONAL O DE IDENTIFICACION

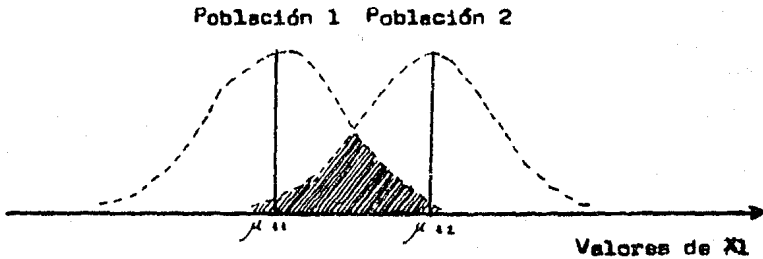
En esta fase, el problema consiste en elaborar una regla de -- "Asignación", es decir, una regla que diga a que población pertenecen individuos cuya población de origen es desconocida.

La forma como se desea llevar a cabo esta tarea es minimizando el número de observaciones mal clasificadas o minimizar un costo por error de clasificación.

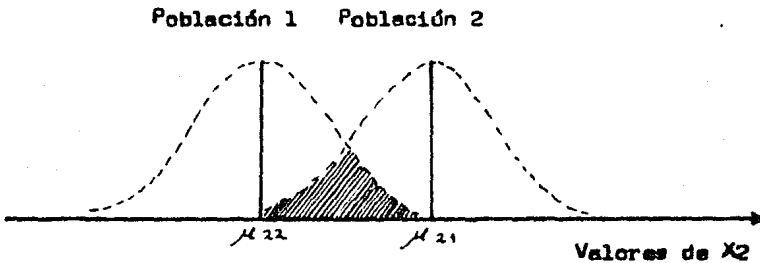
IV.1.2.1) DISCRIMINACION ENTRE DOS GRUPOS

Se considera que se tienen dos variables X_1 y X_2 ; muchas veces puede suceder que esas dos variables en forma individual presenten un "traslape", es decir, que tienen valores con una probabilidad muy alta de aparecer en los dos grupos.

En la figura 10, se muestra esta situación para X_1 y por separado, en la figura 11 para X_2 .



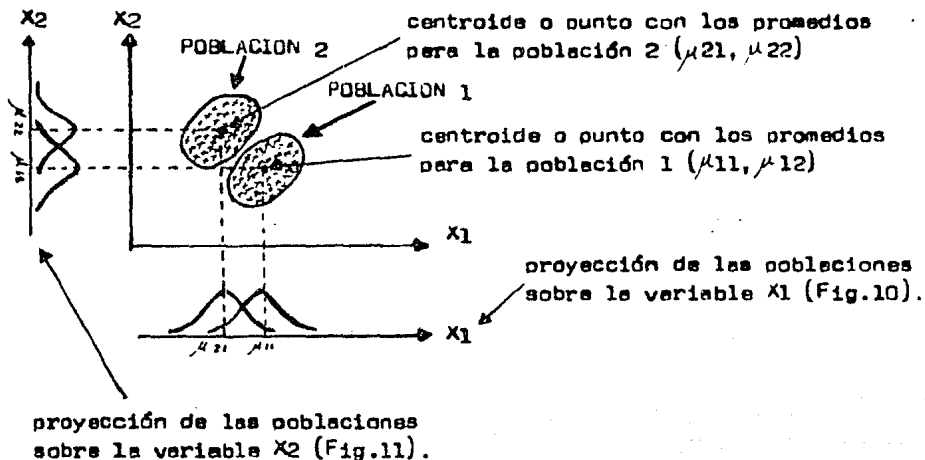
(Fig. 10) "Traslape" entre poblaciones 1 y 2 para los valores de X_1 .



(Fig. 11) "Traslape" entre poblaciones para los valores de X_2 .

Si se toma a cada una de las variables por separado para efectuar una predicción o discriminación, se tendrá un gran porcentaje de error en la clasificación o discriminación debido al traslape. Pero si se estudian simultáneamente X_1 y X_2 , se pueden tener menos errores porque al pasar de una a dos dimensiones se da oportunidad a que las combinaciones de valores de X_1 y X_2 representados mediante puntos en el plano se pueden agrupar más entre sí, dependiendo al grupo a que pertenezcan.

En la figura 12 se señala esta situación:



En forma gráfica, lo que se hace es proyectar los puntos en la figura 12, en una línea que pase por los centroides, ó bien en una línea paralela a ésta. Resulta que la ecuación de ésta línea es la función discriminante:

$$D = a_1 X_1 + a_2 X_2 \text{ línea de Fisher.}$$

IV.2.- El estudio de las relaciones entre grupos de variables es de gran utilidad en múltiples disciplinas.

Dentro de los métodos para el estudio de tales relaciones se encuentra el conocido, Análisis de Regresión, el cual es, probablemente, uno de los métodos estadísticos más usados en la práctica.

En el Análisis de Regresión se tienen dos grupos de variables: variables explicativas y variable de respuesta.

Como su nombre lo indica, las primeras se usan para tratar de "explicar" el comportamiento de la segunda.

Esta explicación se efectúa mediante un modelo (generalmente lineal) los objetivos pueden ser:

- a) Descripción
- b) Predicción
- c) Control

La bondad del modelo se juzga de acuerdo a que tanto se acerca al logro del correspondiente objetivo.

Existen muchas situaciones en las que es necesario estudiar el comportamiento de una cierta variable, que se llama respuesta, ya sea para describirlo, predecirlo ó controlarlo.

Una forma muy conveniente es suponer que la citada respuesta puede ser aproximada a partir de una relación funcional en la cual se consideren todas aquellas variables que pudiesen afectar a la respuesta. Idealmente, los valores de la respuesta (Y) podrían obtenerse a partir de la relación:

$$Y = g (X_1, X_2, \dots, X_n)$$

Donde g es una función arbitraria

X_1, X_2, \dots, X_n denotan a las variables que se supone afectan a la respuesta.

Se hacen evidentes dos posibles problemas:

- 1) La forma analítica de "g" puede ser desconocida o, aun siendo conocida, muy complicada.
- 2) El número, N, de variables requeridas puede ser tan grande que sea prácticamente imposible manejar "g", aun en el caso de conocerla.

En éste caso, como posibles alternativas pueden considerarse - las siguientes:

- a) Aproximar "g" mediante una función sencilla, "f", posiblemente un polinomio.
- b) Eliminar todas aquellas variables cuya influencia sobre la respuesta se considere de poca importancia .

Esto tendrá como resultado que dichas variables no incluidas - causen fluctuaciones en la respuesta, los cuales pueden considerarse, para efectos de análisis, como aleatorias.

Así, se tienen finalmente, que la forma para "f" es la de un polinomio:

$$Y = \beta_1 Z_1 + \beta_2 Z_2 + \dots + \beta_p Z_p + E$$

Donde:

Z_j , $j=1, \dots, p$ es alguna función real de las variables X_1, \dots, X_n .

β_j , $j=1, \dots, p$ son parámetros desconocidos.

E = variable aleatoria.

En el análisis de regresión se usan éste tipo de modelos imponiendo ciertas condiciones, ya sea sobre los datos o sobre la estructura de la componente aleatoria.

El objetivo es "aproximar" (estimar los valores de los parámetros en base a un cierto número, "n", de observaciones del proceso.

ANALISIS DISCRIMINANTE

Tabla N°4

Variable	Coefficiente estandarizado
X2 = Edad en meses	-0.40
X3 = Sexo	0.02
X4 = Glucosa	-0.47
X5 = Fibrinógeno	-0.36
X6 = Tiempo de - protrombina	0.12

La combinación lineal de las cinco variables mencionadas anteriormente es:

$$Ec.(1) \dots D = (-0.40)X_2 + (0.02)X_3 - (0.47)X_4 - (0.36)X_5 + (0.12)X_6.$$

La finalidad de esta ecuación, es que exista una máxima separación entre las poblaciones analizadas, el histograma en el cual se acoplan ambos grupos (Fig. 13), se obtienen valores de $D < 0$, para el grupo de diabéticos y $D > 0$ para el grupo de normales.

De esta manera, se concluye que ambos grupos son diferentes.-- El que sean diferentes, depende entonces de las variables mencionadas en la tabla N°4.

TESIS DE COAGULACION

02/21/85

PAGE

JOB FILE	CASE NUMBER	MIS VAL	SEL	ACTUAL GROUP	HIGHEST PROBABILITY GROUP	P(X/G)	P(G/X)	2ND HIGHEST GROUP	P(G/Y)	DISCRIMINANT SCORES
TESIS	87	YES	YES	2 YES	2	0.0535	0.3257	1	0.3743	-0.1175
TESIS	88	YES	YES	2 YES	2	0.0920	0.9764	1	0.0276	0.1123

SYMBOLS USED IN PLOTS

SYMBOL GROUP LABEL

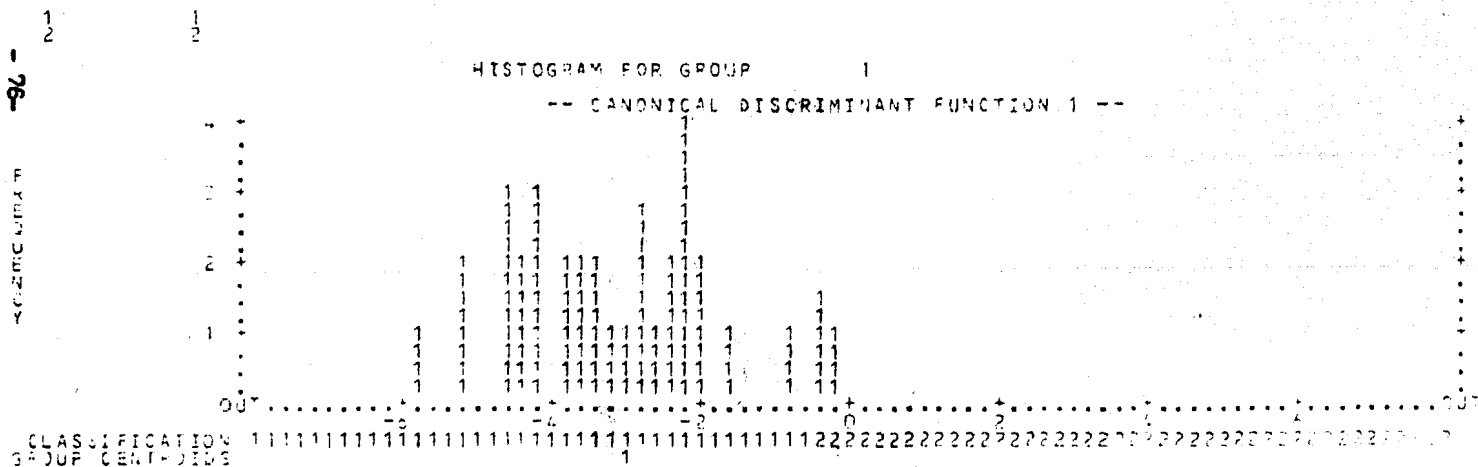
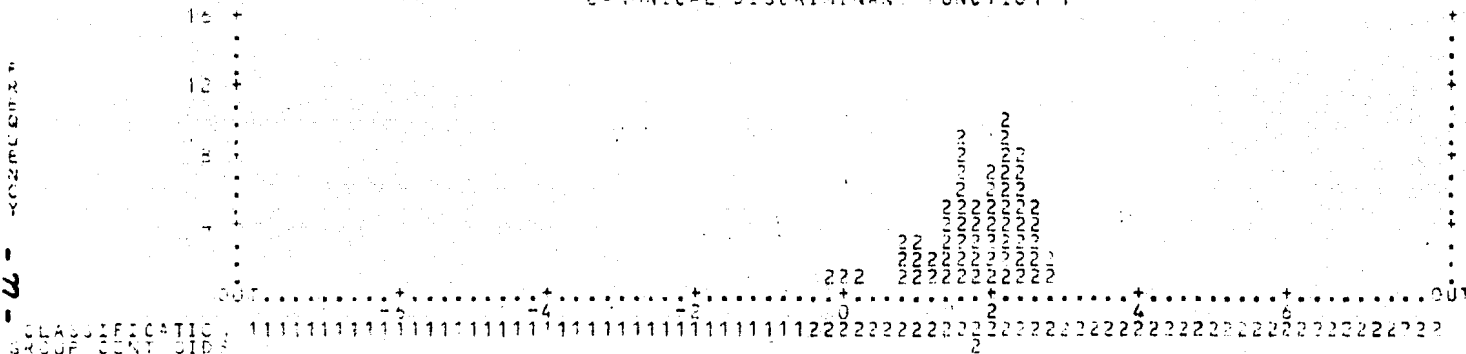


Fig. 13

HISTOGRAM FOR GROUP 2

-- CANONICAL DISCRIMINANT FUNCTION 1 --



ALL-GROUPS STACKED HISTOGRAM

-- CANONICAL DISCRIMINANT FUNCTION 1 --

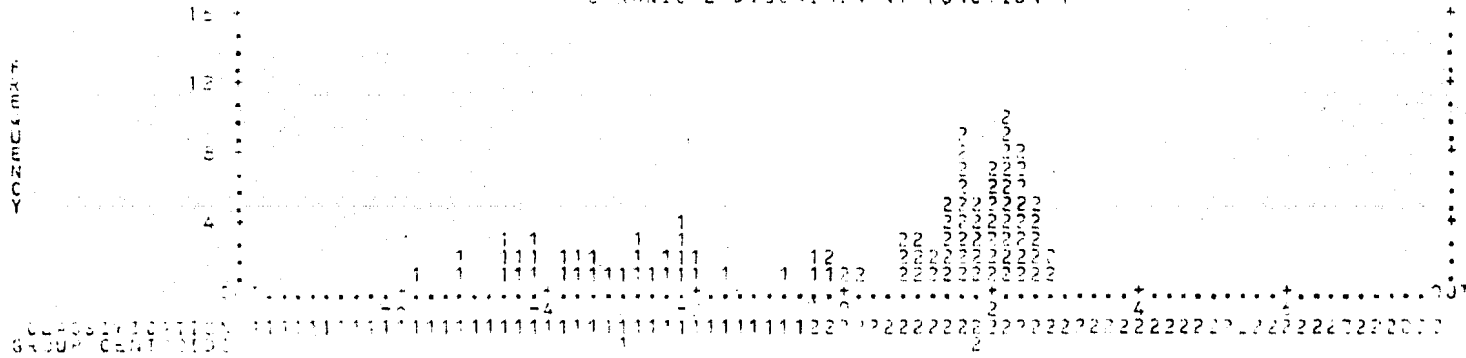


Fig. 14

ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE.

Tabla N°5

Variables incluidas en el modelo.	% de variabilidad explicada por el modelo.
X4 = Glucosa	74.82
X2 = Edad en meses	85.26
X12 = Insulina	88.61
X5 = Fibrinógeno	90.26
X10 = Tiempo de -- tratamiento	91.45

En la tabla N°5, se reportan los porcentajes de variabilidad explicada por la Regresión para las variables más significativas, incluidas en el modelo que toma como variable de respuesta a X1 (grupo).

Se obtiene el siguiente modelo matemático, que incluye las variables en orden de significancia:

$$X1 = Y = \beta_0 + \beta_1 X4 + \beta_2 X2 + \beta_3 X12 + \beta_4 X5 + \beta_5 X10$$

Con éste modelo, se puede "predecir" con un 91.4% si un individuo se comporta como diabetico o como normal.

IV.3).- VALIDACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR OBTENIDA DE CEREBRO HUMANO.

Partiendo de un cerebro humano cuyo peso aproximado fué de 700g. se obtuvieron aproximadamente 200g. de extracto.

Con esta cantidad de extracto se pueden obtener 800 frascos vigiles de 5ml. cada uno de tromboplastina tisular, para la detección del tiempo de protrombina.

Para validar esta tromboplastina ("Z") se comparó con una tromboplastina comercial (Simplastin). Utilizando para ello 12 plasmas de pacientes normales.

Table N°6

Tromboplastina comercial (Simplastin)		Tromboplastina Zaragoza ("Z")
Plasma N°	Media de TP (seg)	Media de TP (seg)
1	11.5	11.5
2	11.5	11.0
3	11.5	11.2
4	11.5	11.0
5	11.2	11.5
6	11.0	11.5
7	11.5	11.5
8	11.0	11.2
9	11.5	11.2
10	11.5	11.5
11	11.2	11.0
12	11.5	11.2

IV.3.1).- VALIDACION ANALITICA DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR "Z"

PARAMETRO A DESCRIBIR (IV.3.1.1)

Para establecer la validación analítica de la tromboplastina tisular es necesario aclarar, que la muestra de 12 ejecuciones experimentales será utilizado como estimador del parámetro: Tiempo de protrombina obtenido.

Dado que el estimador del parámetro será la media aritmética, podemos concluir que la esperanza del parámetro es el valor del estimador, por ser la Esperanza un estimador insesgado del parámetro:

$$E(\mu) = \bar{x}$$

donde:

μ = Al valor del parámetro

\bar{x} = Al valor de la media

IV.3.1.2).- HIPOTESIS DE CONTRASTACION

Las hipótesis que debemos de contrastar son:

H_0 : No existe diferencia en el tiempo de protrombina de la tromboplastina tisular "Z" con respecto a la tromboplastina tisular comercial (Simplastin)

H_a : Existe diferencia en el tiempo de protrombina de la tromboplastina tisular "Z" con respecto a la tromboplastina tisular comercial

IV.3.1.3).- ELECCION DEL MODELO PROBABILISTICO DE CONTRASTACION

Por el teorema central del límite podemos inferir que el tiempo de protrombina de la tromboplastina tisular "Z" se distribuye normalmente:

Tiempo de protrombina
de la tromboplastina-
tisular "Z" $\rightarrow N(\bar{x}, \sigma^2)$

con \bar{X} (media) y varianza σ^2 , entonces el modelo probabilístico de contraste es la "t" de student. El estadígrafo de contraste será "t" calculada, el cual se calcula como:

$$t_{\text{calc.}} = \frac{N - \bar{X}}{s / \sqrt{n}}$$

donde: N = media del valor del medio de protrombina de la trombo-
plastina tisular comercial.
 \bar{X} = media del valor del tiempo de protrombina de la trombo-
plastina tisular "Z".
s = desviación estandar del tiempo de protrombina de la --
tromboplastina tisular "Z".
 \sqrt{n} = número de muestras para la tromboplastina tisular "Z".

IV.3.1.4).- DEDUCCION DE LA DECISION

Bajo la hipótesis de nulidad (H_0) y para un nivel de significancia dado la "t.calc." da lugar a la región de rechazo y no rechazo, de lo cual se establece la siguiente decisión: Si "t.calc." es -- mayor que "t" de tablas para una significancia dada se rechaza H_0 .

De lo contrario, si "t.calc." es menor que "t" de tablas, no se rechaza H_0 con la significancia usada.

IV.3.1.5).- PROCESO DE CONTRASTACION

De los datos mencionados en la tabla N°6 se obtienen los siguientes valores:

$$\begin{aligned} N &= 11.36 \\ \bar{X} &= 11.27 \\ s &= 0.204 \\ \sqrt{n} &= \sqrt{12} \end{aligned}$$

Substituyendo los datos se obtiene:

$$\text{Para } t_{\text{calc}} = \frac{N - \bar{X}}{s / \sqrt{n}} = \frac{11.36 - 11.27}{0.204 / 12} = 1.542$$

como $t_{\text{tablas}} = 2.201$

$$\alpha = 0.05\%$$

$n - 1 = 11$ grados de libertad

$1.542 < 2.201$; como $t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}}$ no rechazamos H_0

Conclusión:

Con una confianza del 95% ($p < 0.05$) se concluye que no existe - diferencia en los tiempos de protrombina de las dos tromboplasti-- nas tisulares, por lo que se infiere que la tromboplastina tisular "Z" es eficiente.

IV.4).- VALIDACION ESTADISTICA PARA LOS VALORES DE REFERENCIA DE FIBRINOGENO EN PACIENTES NORMALES.

IV.4.1).- HIPOTESIS DE CONTRASTACION

H_0 : No existe diferencia en el rango normal para fibrinógeno obtenido con respecto a los valores de referencia reportados en la bibliografía.

H_a : Existe diferencia en el rango normal para fibrinógeno obtenido de la población estudiada con respecto a los valores de referencia reportados en la bibliografía.

IV.4.2).- PROCESO DE CONTRASTACION

Utilizando los valores mencionados en la tabla N°2, correspondientes a fibrinógeno en pacientes normales, se realizan los siguientes calculos:

$$\text{Para "t.calc."} = \frac{365 - 203,67}{59,46 / 62} = 21,38$$

para "t" tablas = 2.0

$$\alpha = 0,05\%$$

$$n - 1 = 61 \text{ grados de libertad}$$

21.38 > 2.0 ; como "t.calc." > "t" tablas se rechaza H_0 .

Conclusión:

Con una confianza del 95% ($p < 0,05$) se concluye que existe diferencia entre los rangos normales para fibrinógeno obtenidos de la población estudiada y los reportados en la bibliografía. Con lo que se infiere, que el rango normal obtenido es menor que el reportado.

CAPITULO V

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

Analizando los resultados que se encuentran resumidos en la tabla N°2. Se obtuvo lo siguiente con respecto a los pacientes diabéticos:

La concentración de fibrinógeno se encuentra aumentada con respecto a la población normal.

El tiempo de protrombina, se encuentra normal ó ligeramente disminuido, con respecto al normal (\pm 0.34 seg).

De lo anteriormente mencionado, se puede sugerir que al encontrarse elevado el fibrinógeno y acortado aunque (ligeramente) el tiempo de protrombina se induce la formación de trombos en los pacientes diabéticos.

Con lo cual se cumple uno de los objetivos planteados en el presente trabajo. Por lo que consideramos importante la realización de estas determinaciones además de la glucosa control en el paciente diabético.

V.1).- ANALISIS DISCRIMINANTE

De acuerdo con los resultados obtenidos en éste análisis, se observa que de las variables manejadas en el estudio las más significativas son las que se mencionan en la tabla N°4. Es decir, que dichas variables son las que contribuyen en mayor medida a discriminar las poblaciones.

En los mapas territoriales (Figs. 13 y 14), se demuestra que las poblaciones tienden a distribuirse normalmente.

En la (Fig. 14), en la cual se agrupan estas poblaciones, se concluye que para valores de la función discriminante menores que cero, el paciente se ubica como diabético, así pues, para valores de la función discriminante mayores que cero, el paciente se ubica como normal

De la Ecuación (1), se concluye que para que la función Discriminante (D) tome valores menores que cero;

X2 (Edad en meses) debe tomar valores grandes,

X4 (Glucosa) debe tomar valores grandes ,

X5 (Fibrinógeno) debe tomar valores grandes y ,

X6 (Tiempo de protrombina) debe tomar valores pequeños.

Cabe mencionar que el uso de la función discriminante está limitado únicamente a las variables que se manejaron en este trabajo.

V.2).- ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE

En el análisis de regresión, se fué tomando cada variable, como variable de respuesta (variable dependiente) contra todas las restantes (variables independientes ó explicativas).

La relación que más significancia tuvo, fué la que tomo como -- variable de respuesta X1 (grupo) y como variables explicativas -- (X4, X2, X12, X8, X10).

En este análisis, como era de esperarse la variable X4 (glucosa) es la que explica con un mayor porcentaje si un paciente es -- diabético ó normal, siendo acumulativo el porcentaje de variabilidad explicada por las demás variables mencionadas en la tabla N°5, hasta llegar al 91.4%.

De igual forma que para el análisis discriminante; este modelo está limitado a las variables empleadas en el estudio.

V.3).- VALIDACION DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR OBTENIDA DE
CEREBRO HUMANO.

Para la validación de la tromboplastina tisular "Z" se determino el tiempo de protrombina de 12 pecientes normales con una tromboplastina tisular comercial (Simplastin).

Las determinaciones se realizaron por triplicidad para cada paciente, obteniéndose la media aritmética para cada uno como se observa en la tabla N°6.

De acuerdo con la validación estadística de estos datos se demuestra que no existe diferencia significativa entre las dos tromboplastinas por tanto, se concluye que la tromboplastina tisular "Z" es eficiente para la determinación del tiempo de protrombina. Cumpliendo de esta manera con los objetivos planteados en el presente trabajo.

V.4).- VALIDACION ESTADISTICA PARA LOS VALORES DE REFERENCIA DE
FIBRINOGENO EN PACIENTES NORMALES.

Al observar que la concentración de fibrinógeno en los pacientes normales se encontraba disminuida con respecto a los valores de referencia reportados por otros países. Se procedio a realizar la validación estadística de la cual se obtuvo que si existe diferencia significativa entre ambos valores.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

VI.1) CONCLUSIONES

Considerando que la concentración de glucosa de la población diabética estudiada estuvo comprendida entre 120 y 300 mg/dl, se concluye lo siguiente:

- 1) Se corrobora que la Diabetes Mellitus tiene implicaciones en el mecanismo de coagulación.
- 2) Se concluye que en el paciente diabético:
 - La concentración de fibrinógeno se encuentra aumentada.
 - El tiempo de protrombina se encuentra normal ó ligeramente disminuído.
 - El número de plaquetas se encuentra normal.
 - El tiempo de tromboplastina parcial normal.Todos ellos con respecto a la población de referencia.
- 3) Del análisis discriminante se concluye que para valores de la función discriminante menores que cero, el paciente se ubica como diabético y para valores de la función mayores que cero como normal, con respecto a las variables significativas (Edad - en meses, sexo, glucosa, fibrinógeno y tiempo de protrombina).
- 4) Con una confianza del 95% se concluye que no existe diferencia en los tiempos de protrombina de las dos tromboplastinas tisulares, por lo que se infiere que la tromboplastina tisular "Z" es eficiente.
- 5) En base a los resultados obtenidos, se concluye que la tromboplastina tisular "Z" es de buena calidad y proporciona resultados -- confiables y reproducibles en contraste con la tromboplastina -- tisular comercial.

- 6) Se concluye que se pueden obtener reactivos para uso clínico en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos (Zaragoza), con el equipo y material existente.
- 7) Con una confianza del 95%, se concluye que existe diferencia entre los rangos normales para fibrinógeno obtenidos en la población de referencia estudiada y los reportados en la bibliografía. Con lo que se infiere que el rango normal obtenido es menor que el reportado.
- 8) De acuerdo a los resultados proporcionados por el análisis discriminante y el análisis de regresión múltiple, resulta importante determinar la concentración de fibrinógeno y tiempo de protrombina además de la glucosa control en el paciente diabético.
- 9) Se considera importante que se realicen algunas pruebas que evalúen la funcionalidad plaquetaria (como adhesividad plaquetaria y agregabilidad plaquetaria) y el sistema fibrinolítico (como lisis de euglobulinas y determinación de Antitrombina III).
- 10) Resulta importante trabajar con pacientes diabéticos que presenten un rango mayor en la concentración de glucosa. Además si se quiere realizar un estudio más profundo debe ampliarse el número de pacientes, así como las zonas de muestreo.
- 11) Para observar el inicio de problemas de trombosis, es interesante seguir a un mismo grupo de pacientes diabéticos, realizando las pruebas utilizadas en éste trabajo, así como las pruebas de adhesividad y agregabilidad plaquetaria, lisis de euglobulinas y-

Antitrombina III, durante un cierto período de tiempo.

- 12) Con respecto al reactivo obtenido (trombonastina tisular) resta realizar pruebas de vida media, control microbiológico y material de empaque, si se quiere conservar por períodos largos y producir a mayor escala.

VI.2.)- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adelson, E., Rhengold, J., Platelet and Fibrinogen Survival in Normal and Abnormal States of Coagulation., Blood., 12: 267, (1961).
- 2.- Aranda, F., Ruiz, S., "Un programa interactivo para Simulación y -- Análisis de Problemas de Regresión." Comunicaciones técnicas, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas- (UNAM) ., México, 1984., pp., 1-10.
- 3.- Balcells, A., "Patología General"., Ed., Toray., Sa., ed., España, 1978., pp., 1411-1419.
- 4.- Balcells, A., "La Clínica y el Laboratorio"., Ed., Marín., lla., ed., - México, 1978., pp., 198-200.
- 5.- Bauer, J., "Chemical Laboratory Methods"., Ed., The C.V. Mosby Company., Sa., ed., USA, 1984., pp., 165-167, 267-273.
- 6.- Catwright, G., "El Laboratorio en el Diagnóstico Hematológico"., Ed. Científico-Médica., Sa., ed., España, 1973., pp., 391-430.
- 7.- Casanueva, E., El peso corporal y la Diabetes Mellitus., Cuadernos de Nutrición., 12: 10; 33-37, (1970).
- 8.- Davidschn, I., "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio"., Ed., Salvat, Sa., ed., España, 1979., pp., 445-456, 614-625.
- 9.- Dacie, J., "Practical Haematology", Ed., Churchill-livingstone., 15a., ed., Great Britain, 1975., pp., 345-347.
- 10.- Escríbe, A., Maluenda, P., Fisiología de la Hemostasia., Medicina., 8: 7; 480-520, (1982).
- 11.- Estrada, C., Modificaciones de la Coagulación en la mujer embarazada diabética., Tesis para obtener el título de Q.F.B., Fac., Quia., México, 1982.
- 12.- Fanghanel, G., Sánchez, L., Diabetes Mellitus., Revista de la Fac. de Medicina., XXVI; 6; 256-266, (1983).

- 13.-Garszo, F., "Enfermedades Hemorrágicas Diagnóstico y Tratamiento"., Ed., Fco., Méndez Cervantes., México, 1983., pp., 168-170, 213-214, --- 223-227.
- 14.-Goodman, L., Gilman, A., "Bases Farmacológicas de la Terapéutica"., Ed., Interamericana., 5a., ed., México, 1978., pp., 1270-1279.
- 15.-Guyton, A., "Tratado de Fisiología Médica"., Ed., Interamericana., -- 4a., ed., México, 1971., 965-979.
- 16.-Henry, R., "Química Clínica"., Ed., Jims., 2a., ed., España, 1980., pp., -- 354-460.
- 17.-Harper, H., "Manual de Química Fisiológica"., Ed., El Manual Moderno., 7a., ed., México, 1980., pp., 327-354.
- 18.-Jones, R., Peterson, C., Reduced Fibrinogen Survival in Diabetes - Mellitus a reversible Phenomen., J. Clin. Invest., 63:485, (1979).
- 19.-Jones, R., Peterson, C., Hematologic Alterations in Diabetes Mellitus, Am. J. Med., 70; 339, (1981).
- 20.-Lehninger, A., "Bioquímica"., Ed., Omega., 2a., ed., España, 1980., pp., - 858-862.
- 21.-Linman, J., "Hematology"., Ed., Mac-Millan Publishing., USA, 1975., pp., 849-893.
- 22.-Lynch, M., "Metodos de Laboratorio"., Ed., Interamericana., 2a., ed., - México, 1972., pp., 426-434, 831-837.
- 23.-Manual Hyland., "Pruebas de Coagulación".,
- 24.-Méndez, I., Rodríguez, S., "Dos ejemplos de aplicación de análisis -- discriminante en Medicina"., Comunicaciones técnicas, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (UNAM)., - México, 1978., pp., 1-42.
- 25.-Mordes, J., Rossini, A., Animals Models of Diabetes., Am. J. Med., 70; -- 2; 353, (1981).

- 26.-Owen, J., Kvan, D., Thrombin and Plasmin Activity and Platelet Activation in the Development of Venous Thrombosis., Blood., 61:3;476, (1983).
- 27.-Ratnoff, O., Menzie, C., A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma., J. Lab. Clin. Med., 37: 316, (1951).
- 28.-Remington, R., "Estadística Biométrica y Sanitaria", Ed., Prentice - Hall International., España, 1974., pp., 231-240.
- 29.-Robert, L., Time course of reversibility of Accelerated fibrinogen-- Disappearance in Diabetes Mellitus., The Journal of the American Society of Hematology., 63: 1; 22-30, (1984).
- 30.-Roberts, S., "Manual de Hematología", Ed., El Manual Moderno., 2a., - ed., México, 1977., pp., 249-265, 284-286.
- 31.-Ronald, L., "Diagnostic Biochemistry", Ed., Mc.Graw-Hill Book Company., USA, 1969., pp., 212-222.
- 32.-Thomson, J., "Blood Coagulation and Haemostasis", Ed., Churchill-Livingstone., 2a., ed., Great Britain, 1980., pp., 118-120, 317-319.
- 33.-Tocentis, L., "Coagulación de la sangre, Hemorragias y Trombosis", Ed., Científico-Médica., España, 1969., pp., 125-130, 175-183.
- 34.-Velez, A., "Introducción a la Hematología (fundamentos y técnicas)" Sociedad Mexicana de Hematología., México, 1978., pp., 57-88.
- 35.-Widman, F., "Interpretación Clínica de las Pruebas de Laboratorio", Ed., Jims., 8a., ed., España, 1981., pp., 71-74.
- 36.-Wilson, W., Duke, M., "The relation of blood platelets to Hemorrhagic-diseases.", The Journal of the American Medical Association., 250:9; 1201, (1983).
- 37.-Williams, J., "Hematology", Ed., Mc.Graw-Hill., 2a., rd., USA, 1977., -- pp., 1645-1647.

- 38.-Williams,R., "Tratado de Endocrinología"., Ed., Salvat., 4a., ed., España, 1981, pp., 647-655, 703-720.
- 39.-Wintrobe,M., "Clinical Hematology"., Ed., Lea and Febiger., 7a., ed., USA, 1976, pp., 1060-1070, 1174-1187.
- 40.-Wuhrmann,M., "Disorproteinemias y Paraproteinemias"., Ed., Científico-Médica., 3a., ed., España, 1966, pp., 502-511, 621.