

00562
1
1983

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE UN ESTUDIO PROSPECTIVO DE
LAS ALTERACIONES DE LA COAGULACION Y FIBRINOLISIS EN
GESTOSIS Y LEUCEMIAS PROMIELOCITICAS.

INFORME DE TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN
BIOQUIMICA.

MARIA DE LA LUZ ESPINOSA MORALES.

MEXICO, D. F.

1983.

00562
1983

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

- RESUMEN
- I INTRODUCCION
- II DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
- III DISCUSION Y COMENTARIOS
- IV CONCLUSIONES
- V BIBLIOGRAFIA

RESUMEN:

El objeto de este trabajo es dar a conocer los resultados de los estudios de coagulación y fibrinólisis de cuatro seguimientos, - con material obtenido de sangre de enfermos con padecimien--- tos, que en una de sus etapas o en su evolución global presentaron alteraciones importantes en ese campo, justificando por lo mismo una investigación de las alteraciones de esos componentes de la hemostasis. Los métodos utilizados en esos estudios incluyeron algunos que habitualmente se describen en la rutina, pero cuyo valor se desconoce al ignorarse los factores y vías de la coagulación que son detectados por ellos.

Se desarrolló además otro tipo de metodología no considerada como rutina y que forma parte de los trabajos de los laboratorios especializados de Hematología. Algunos de ellos quedan incluidos en el estudio del mecanismo de la coagulación como son las determinaciones de las concentraciones de los factores del complejo - protrombinico (II, VII, IX y X) y otros, como los factores V y - VIII (denominados lábiles) que se consumen durante el proceso de la coagulación. Uno de los factores estudiados y que se considero como componente clave de esta investigación, fue el factor I (Fibrinógeno), que por ser el sustrato de dos de las enzimas más importantes en la coagulación (trombina y plasmina), - origina una serie grave de alteraciones en el organismo, cuando sufre la acción de ellas.

Se consideraron ser de gran ayuda en este estudio, los métodos - de estudio de la fibrinólisis, como la cuantificación de los productos líticos de la fibrina, determinación de plasminógeno y del Proactivador, así como la demostración de los complejos solubles por la protamina.

La patología estudiada por los diversos métodos, incluyó a un grupo de pacientes con leucemia promielocítica con manifestaciones importantes de sangrado y que fue la causa de la muerte. El origen de esas manifestaciones se encuentra en las células leucémicas que son ricas en material tromboplástico (Factor Tisular) que en alguna etapa entra a la circulación y activa principalmente a la vía extrínseca de la coagulación. Una vez activada, se suceden una serie lineal de activaciones de proenzimas, mismas que posteriormente interactúan en etapas complejas de reacciones y que finalizan con la formación del monómero de la fibrina y de sus polímeros insolubles. La coagulación y fibrinólisis activadas en forma importante, produce alteraciones graves que se manifestarán por sangrado y/o trombosis.

La restante patología de la coagulación y fibrinólisis estudiada en este trabajo, correspondió a muestras provenientes de mujeres - portadoras de gestosis conocidas como Eclampsia, toxemia severa y mola hidatidiforme.

Habitualmente las concentraciones plasmáticas de los factores de la coagulación se encuentran aumentadas en la mujer gestante, pero al presentar las complicaciones mencionadas, su mecanismo de la coagulación se altera de tal modo, que ante cualquier estímulo interno, como un paso anormal de material tromboplástico de la placenta, desencadena la activación del sistema de la coagulación y de la fibrinólisis, conduciendo a cuadros similares como los descritos arriba para la leucemia promielocítica.

Los resultados en los primeros grupos, mostraron datos compatibles con aumento de la actividad de los factores de la coagulación y fibrinólisis, que tradujeron un Síndrome de Coagulación Diseminada, y en los dos últimos grupos, datos de un estado de hipercoagulabilidad, sin llegar a su activación. Se consideró de gran valor la utilización de la metodología desarrollada en esos estudios.

I.- INTRODUCCION

Desde el inicio de la segunda mitad de este siglo, se ha observado un desarrollo creciente en el conocimiento de una serie de cambios complejos que ocurren en el sistema de la coagulación y de la fibrinólisis en asociación con una variedad amplia de padecimientos como enfermedades malignas (leucemias, cánceres), complicaciones obstétricas, quemaduras extensas, picaduras de serpiente y otros más.

Las alteraciones mencionadas conducen al consumo exagerado de las proteínas de la coagulación y de las plaquetas, así como a una acción fibrinolítica aumentada de las primeras.

A ese conjunto de modificaciones de la sangre se le conoce como Síndrome de Coagulación Intravascular Diseminada, Desfibrinación y otros sinónimos más.

El disparo para ello es la entrada directa a la circulación de material tromboplástico (Factor Tisular), que activa en forma exagerada a los factores de la coagulación.

Puede observarse también un disparo indirecto que active a los mencionados factores. El resultado es el mismo y podrá reconocerse al utilizar una serie de métodos que midan el grado de actividad del mecanismo de la coagulación y fibrinólisis.

Para una mejor comprensión de este informe de trabajo versado sobre la utilización de diversos métodos en el estudio de los trastornos de la coagulación y fibrinólisis citados, a continuación se menciona a la hemostasis normal, sus componentes y el mecanismo de la coagulación no alterada (1).

1. HEMOSTASIS: es el proceso por el cual se detiene espontáneamente el flujo de la sangre en los vasos que la transportan bajo presión cuando ha ocurrido un daño local.

MECANISMOS DE LA HEMOSTASIS:

En el proceso de la hemostasis se requiere de la participación de tres factores que son: la pared del vaso, - las plaquetas y por lo menos 10 proteínas plasmáticas o factores de la coagulación.

Pared del vaso: Implica la contractilidad del mismo inducido por: la serotonina (o 5-hidroxitriptamina) liberada de las plaquetas, por el Tromboxano A_2 sintetizado a - partir de los endoperóxidos cíclicos de las prostaglandinas PGG_2 y PGH_2 en la misma plaqueta, por el fibrinopeptido B derivado del fibrinógeno del plasma y de la norepinefrina de origen plaquetario también.

Existen otros fenómenos vasculares que directa o indirectamente son hemostáticos, como la presión perivascular -

producida por la sangre extravasada y la acción de la -
subunidad Von Willebrand del Factor VIII (F.VIII_{VW}) (2).

2.- HEMOSTASIS PRIMARIA:

Se resumirán aquí sólo algunos aspectos de las funciones plaquetarias referidas al conjunto de modificaciones presentadas por estas células en el proceso de la hemosta - sis, que se denominan Hemostasis Primaria y que son se - guidas por el mecanismo de la coagulación.

Al ocurrir una lesión en la continuidad del endotelio - vascular, se expone el tejido conectivo de esa pared a - las plaquetas normales, las cuales sufren una serie de - cambios consistentes en la adhesión al tejido expuesto, - contracción y liberación del material contenido en sus - gránulos y en los cuerpos densos y agregación de unas -- con otras.

Adhesión: de los constituyentes de la pared del vaso se ha demostrado que sólo el colágeno promueve este fenóme - no, requiriéndose en parte para ello de la acción del factor de Von Willebrand.

Reacción de liberación: el colágeno y la trombina (que - puede adherirse al subendotelio), estimulan a las plaque

tas a liberar el material contenido en los cuerpos densos y en sus gránulos: ADP, serotonina, Factor Plaquetario 4, etc. El ADP origina un cambio en la forma de la plaqueta, de discoide a una más redondeada con emisión de pseudópodos. Con esta forma alterada se agregan fácilmente con otras plaquetas y con aquéllas que se han adherido a la pared del vaso dañado.

Al ser estimuladas las plaquetas por el colágeno o por la Trombina, se hidroliza por acción de la fosfolipasa A_2 , fosfatidilcolina y fosfatidilinositol de la membrana, formándose ácido arachidónico. Sobre éste actúa una cicloxigenasa que lo convierte a una forma inestable de los endoperóxidos de las prostaglandinas PGG_2 y PGH_2 . Estos compuestos tienen una vida corta y por sí mismos pueden causar que la plaqueta cambie de forma, se agregue y libere su contenido.

Agregación: el proceso de adhesión de las plaquetas a la pared del vaso dañado, es seguido rápidamente por la formación de agregados plaquetarios, fenómeno que in vitro puede obtenerse con las plaquetas humanas mediante inducción con adrenalina, ADP, serotonina, trombina, colágeno

y ciertos ácidos grasos.

Cada agente inductor reacciona inicialmente con alguna - clase de receptor para él, en un sitio específico en la superficie externa de la doble capa de la membrana de la plaqueta, la cual en forma rápida sufre cambios en su -- morfología (3).

Siguiendo a todos estos cambios que presentan las plaque - tas, se desencadena inmediatamente la activación de la - coagulación o Hemostasis Secundaria.

3.- HEMOSTASIS SECUNDARIA:

Comprende la serie de cambios en el sistema de la coágu - lación sanguínea por interacción de sus diversos facto - res.

La teoría clásica de la coagulación de la sangre que ex - plicaba ese fenómeno en base a la interacción de 4 facto - res, sufrió serias modificaciones poco antes de la mitad de este siglo al descubrirse otros factores más (en algu - nos pacientes que presentaban deficiencias hereditarias de ellos) y no poder acomodarlos en dicha teoría. Así - mismo existía una gran confusión con los nombres asigna - dos a los diversos factores conocidos.

De 1957 a 1958 se estableció una Nomenclatura Internacional Romana para los Factores de la Coagulación por un subcomité internacional designado por el Comité Internacional en Trombosis y Hemorragia y que incluyó en ella, a los que consideró como verdaderos factores. A continuación se da un glosario de los factores de la coagulación con sus características estructurales (3).

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

FACTOR I

(Fibrinógeno) Glicoproteína con peso molecular alrededor de 340,000 (3), contiene de 3 a 5% de carbohidratos. Su estructura terciaria no ha sido completamente caracterizada. Por estudios de microfotografía electrónica se sugiere que está compuesto de tres subunidades nodulares interconectadas por filamentos. Los estudios de las subunidades moleculares después de disociar la proteína nativa (4), sugieren que el fibrinógeno tiene una estructura dimérica. Cada mitad de la molécula contiene tres pares similares pero no idénticas de cadenas polipeptídicas designadas A_α , B_β y γ , con pesos moleculares de 73,000, 60,000 y 50,000. Las dos mitades están unidas por tres enlaces disulfuro intra -

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION

dímeros y las tres cadenas de cada dímero están unidas también por ese tipo de enlace que están concentrados en el extremo - N-terminal de la molécula. Los enlaces - disulfuro suman 28 en total, repartidos en cinco dominios. Su concentración en plasma oscila de 200 a 400 mg/100 ml. (4, 5).

Función: después de la proteólisis por la trombina se transforma en fibrina, la cual constituye la base física de los coágulos sanguíneos y proporciona la malla para el coágulo hemostático (3).

FACTOR II
(Protrombina)

Glicoproteína de una sola cadena que para su actividad biológica depende de la vitamina K durante su síntesis en el hígado. Peso molecular de 69,000, contiene 8.7% de carbohidrato (galactosa, manosa, N-acetil glucosamina y ácido siálico).

La Protrombina contiene aproximadamente 10

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y SU FUNCION
--------	---

residuos de ácido gamacarboxilglutamato - para fijar el calcio y se encuentran localizados en la región N-terminal de la cadena.

Su concentración en el plasma oscila de 10-15 mg./100 ml. Su vida media biológica es de 2.8 días.

Función: interviene en la vía común de la coagulación y es transformada a su forma activa, la Trombina, en ese proceso por acción del Factor Xa (4).

FACTOR III

(Factor Tisular o Tromboplastina Tisular).

Está presente en muchos tejidos y particularmente abundante en la placenta, pulmón, cerebro y vasos sanguíneos. La bioquímica de este factor está muy pobremente entendida. Es un complejo de fosfátides, lipoproteína y colesterol.

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y SU FUNCION
<p>FACTOR IV (Calcio ionizado)</p>	<p>Este complejo puede disociarse en sus -- constituyentes por extracción con solventes. La acción de este factor en la coagulación reside enteramente en la molécula de proteína.</p> <p>Función: La interacción de este factor -- con el Factor VII inicia la Vía Extrínseca de la coagulación.</p>
<p>FACTOR V (Factor Lábil)</p>	<p>Es una glicoproteína con peso molecular -- aproximado de 350,000. Por filtraciones en gel se han aislado subunidades de tamaño variable. Contiene de 10 a 20% de <u>car</u>bohidrato y la galactosa es esencial para su función. En electroforesis migra como una globulina α . Por su inestabilidad presentada en el plasma se le denomina -- Factor Lábil.</p>

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

La actividad de este factor (in vitro) - se aumenta por la acción de varias enzimas proteolíticas incluyendo a la Trombina, Factor Xa, el veneno de la serpiente Russell. Su vida media biológica es de 12 a 36 horas.

Función: es un factor accesorio (acelerador) que participa con la proteinasa Xa en la activación de la Protrombina (4, 6).

FACTOR VII
(Factor Estable)

Es un factor de la coagulación con propiedades físicas y químicas similares a las del factor X, lo que hace difícil su purificación aunque se ha logrado esto parcialmente a partir del plasma y suero humanos. Su peso molecular estimado es del orden de 58,000. Es una glicoproteína de una sola cadena y contiene residuos

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

de ácido gamacarboxiglutamato en base a su dependencia de la vitamina K y a la homología de la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal con la Protrombina y los factores IX y X. Su vida media biológica varía de 4 a 6 horas.

Función: Interactúa con el Factor Tisular en la vía extrínseca de la coagulación para activar al Factor X (4).

FACTOR VIII
(Factor Anti-hemofílico).

Es una glicoproteína de peso molecular de 1,000,000 a 2,000,000. Al igual que el Factor V es muy inestable en el plasma citratado. Este factor puede disociarse in vitro en dos tipos de subunidades por filtraciones en gel, correspondiendo a las subunidades VIII_{ag} y VIII_c. La primera, contiene al Factor VIII_{VW}, o

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

factor de Von Willebrand relacionado con la adhesión de las plaquetas. El segundo tipo de subunidad contiene a la porción coagulante del factor, con peso molecular de 25,000 a 34,000. Su vida media biológica varía de 10 a 14 horas.

Función: Interactúa con el Factor IX, Ca^{2+} y Factor Plaquetario 3 en la activación del Factor X en la vía Intrínseca de la coagulación. A su vez es activado por la Trombina. Su deficiencia produce la Hemofilia A (4, 6).

FACTOR IX

(Factor Christmas).

Glicoproteína de peso molecular alrededor de 55,000 conteniendo 17% de carbohidrato y está formado de una sola cadena polipeptídica. Es un factor vitamino K dependiente, contiene residuos de ácido gamma-carboxilato. Después de ser activado por

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

el factor XIa aparece en dos cadenas polipeptídicas, una de 16,600 y otra de 38,400 La primera posee los residuos de gamacarboxilato.

En su forma activa, es una serinoproteinasa con el residuo de serina activa en la cadena pesada. Su vida media biológica es - de 24 horas.

Función: activa al Factor X en la Vía Intrínseca de la Coagulación y su deficiencia produce la Hemofilia B (6).

FACTOR X
(Factor Stuart-Prower).

Es una glicoproteína de dos cadenas plipeptídicas con peso molecular alrededor de 59,000 la humana y 55,000 la bovina. Esta última contiene 15% de carbohidratos por molécula. Su cadena ligera con peso molecular de --- 17,000, contiene 14 residuos de ácido gamacarboxiglutámico por molécula y es un factor vitamino

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

K-dependiente. Existe homología en la secuencia de los aminoácidos de la región N-terminal de la cadena ligera con aquella de los factores II, VII y IX. Su vida media biológica oscila de 24 a 60 horas.

Función: Interactúa con el Factor V, fosfolípido de la plaqueta y el Ca^{2+} en la activación de la Protrombina en la vía común de la coagulación (4).

FACTOR XI
(Antecedente Tromboplástico del plasma)

Glicoproteína de peso molecular alrededor de 160,000. Consiste de dos cadenas polipeptídicas del mismo peso molecular, unidas por enlaces disulfuro y al ser activado por el Factor XII resulta en cuatro cadenas unidas por ese mismo tipo de enlaces. La interacción con la Antitrombina III que es un inhibidor de la coagu

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

lación y con el diisopropilfluorofosfa to, indica dos sitios activos por molécula, lo cual hace un fenómeno único en las enzimas de la coagulación. Su vida media biológica varía de 48 a 84 horas. Función: activa proteolíticamente al Factor IX en la vía intrínseca de la coagulación (4, 5).

FACTOR XII
(Factor
Hageman)

Es una glicoproteína de una sola cadena polipeptídica con peso molecular entre 76,000 a 80,000. Al ser activado proteolíticamente por la Kalikreína forma una molécula de dos cadenas, una pesada de 50,000 y otra ligera de 28,000 que contiene el sitio activo. En su forma activa es una serinoproteinasa. Una vez activado ocurre la propagación de la vía intrínseca de la coagulación.

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
<p>FACTOR XIII (Transglutaminasa, Factor Estabilizador de la Fibrina).</p>	<p>Función: inicia la Vía Intrínseca de la Coagulación. (7).</p> <p>El Factor XIII purificado del plasma es una globulina alfa₂ con peso molecular de 320,000 (la forma plasmática, que es tetramérica) y 160,000 (la forma plaquetaria, que es dimérica). Su molécula consiste de dos subunidades alfa (forma plasmática y forma plaquetaria, con peso molecular de 75,000) y dos subunidades beta (forma plasmática unicamente, con peso molecular de 88,000).</p> <p>Las subunidades alfa son rotas proteolíticamente a la forma activa "trnasglutaminasa" con la generación de un grupo activo cisteína.</p> <p>La forma plaquetaria es sintetizada por los megacariocitos y por las plaquetas. Estas dos células, son fuente de origen de la forma plasmática del Factor XIII. Su vida media biológica es de 3 a 12 días. Las substancias que exhiben actividad de este factor in vitro, están presentes en otros tejidos como el hígado y placenta.</p> <p>Función: en su forma activa, el Factor XIII une covalentemente a los monómeros, en polímeros de la fibrina (4, 5).</p>
<p>PREKALIKREINA</p>	<p>Proteína de una sola cadena, con peso molecular alrededor de 90,000. La secuencia de los aminoácidos de la región N-terminal de la Prekalikreína bovina, parece homóloga con aquella del Factor XI humano. Es un componente del Sistema de Contacto, a su vez es</p>

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION.

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

	<p>un precursor de la proteínasa Kalikreína que rompe al Factor XII y al Kininógeno de Peso Molecular Alto, para transformarlo en Kinina (5 y 7).</p>
<p>KININOGENO DE PESO MOLECULAR ALTO (Factor Fitzgerald)</p>	<p>Glicoproteína de una sola cadena polipeptídica con peso molecular aproximado de 150,000 y contiene 13% de carbohidratos. Electroforeticamente migra como una globulina alfa. Se conoce la secuencia de los aminoácidos del fragmento 1.2 donde residen los determinantes estructurales responsables para que este factor se fije al caolín (superficie extraña) en la etapa de contacto.</p> <p>Función: proteína accesoria en la activación del Factor IX por el XIIa (4).</p>
<p>PLASMINOGENO</p>	<p>Comunmente no enlistado como factor de la coagulación, sino como una proteína del Sistema Fibrinolítico, la cual tiene un peso molecular de 81,000 y está formado de una sola cadena polipeptídica que al sufrir proteólisis para su activación, libera una cadena peptídica y el resto se rompe en dos cadenas, una ligera de 25,000 y otra pesada de 52,000, que constituyen la proteínasa activa. Su sitio activo se localiza en la cadena</p>

GLOSARIO DE LOS COMPONENTES DE LA COAGULACION

NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DISTINGUIBLES Y FUNCION
--------	---

ligera. Al transformarse en plasmina, degrada -
proteolíticamente y en forma fisiológica a la fi-
brina, y en forma patológica al fibrinógeno, al -
Factor V y al Factor VIII (4, 5).

PROCESOS DE ACTIVACION EN EL SISTEMA DE LA COAGULACION SANGUINEA.

Aunque de un modo general y sencillo puede considerarse a la activación de una proteína como el aumento en su potencia bioquímica por unidad de masa, en los sistemas como la coagulación, en la cual una proteólisis limitada es responsable de muchas activaciones, casi siempre se ha identificado a este proceso, como aquél en que ocurre la activación de una proenzima a una enzima activa. Además en el Sistema de la Coagulación pueden presentarse varios tipos de procesos de activación y que aunque comunmente implican proteólisis, no siempre conducen a la formación de una enzima.

En este sistema se pueden distinguir tres tipos de proteólisis que pueden llamarse activación. El primero incluye el rompimiento proteolítico ejercido sobre una proenzima (o factor de la coagulación no activo) y que generalmente se reconoce que está relacionado con la exposición de su sitio catalítico.

El segundo tipo de activación proteolítica no resulta en la formación de una enzima, sino más bien conduce a la exposición de sitios de fijación de la molécula activada y que le permiten su polimerización. Este tipo de activación se ejemplifica por el rompimiento del fibrinógeno ejercido por la trombina para formar el monómero de la fibrina el cual se asociará rápidamente con otros monómeros (5).

El tercer tipo de activación posee las características de los dos anteriores, pero a diferencia de la primera, la proteína activada no es una proteinasa, sino una proteína que acelera marcadamente la velocidad de una reacción que realiza determinada enzima proteolítica. Como ejemplo de este último tipo de activación tenemos "el aumento que se observa en la actividad de la potencia biológica de los cofactores proteicos Factores V y VIII como un resultado de su exposición a la Trombina (5).

Una vez mencionados algunos conceptos sobre los procesos de activación en el Sistema de la Coagulación Sanguínea se hace una revisión a continuación de su mecanismo normal, recordando que aunque algunas etapas son bien conocidas, en algunas otras permanecen aún algunos puntos oscuros y que en la actualidad son difíciles de esclarecer.

VÍAS DE LA COAGULACION.

La coagulación de la sangre se inicia fundamentalmente por dos mecanismos diferentes: 1) por el proceso de activación con el contacto y 2) por la acción del Factor Tisular. Si inicialmente procede por dos vías separadas, éstas finalmente convergen al activar una vía final común que conduce a la formación de fibrina (Figura 1). La activación con el contacto implica la adsorción a una variedad grande de superficies con carga negativa de ciertas proteínas del plasma, como son Factor XII, XI, Prekalikreína y Kininógeno de Peso Molecular Alto. Forma parte de las etapas iniciales de la Vía Intrínseca de la Coagulación la cual termina con la activación del Factor X.

Cuando la coagulación se inicia por el Factor Tisular, ocurre interacción entre éste y el Factor VII, conduciendo a la formación de una enzima que también activa al Factor X. Esto ocurre en ausencia de los factores de la Vía Intrínseca y no requiere de la activación con el contacto. En las etapas subsecuentes en el proceso de la coagulación (Vía Común) intervienen los factores X, V, Factor Plaquetario 3, Protrombina y Fibrinógeno, interactuando del mismo modo ya sea que el Factor X sea activado por el producto de la Vía Intrínseca o por aquél de la Vía Extrínseca. (4).

VÍA INTRINSECA DE LA COAGULACION.

ACTIVACION DEL FACTOR XII: la reacción de contacto se considera -

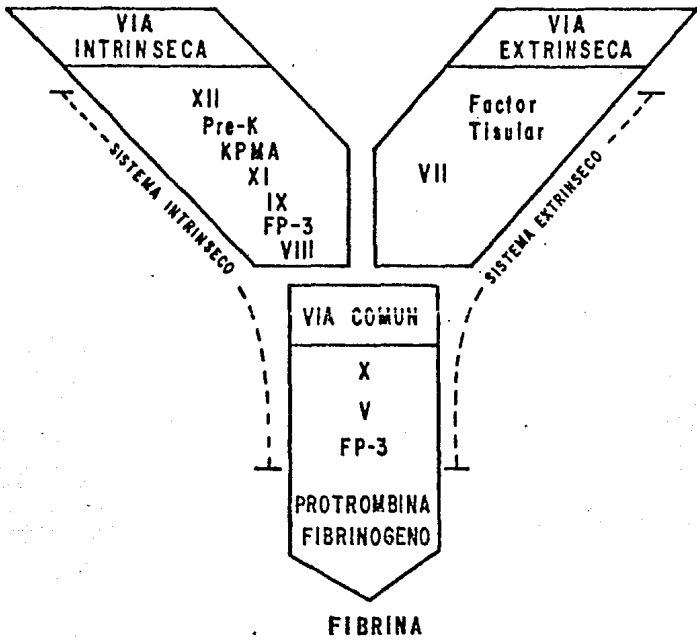


FIGURA 1. VIAS DE LA COAGULACION. Los términos de Sistema Intrínseco y Sistema Extrínseco se usan ampliamente con referencia a las reacciones indicadas con líneas punteadas. FP-3 = Factor Plaquetario 3. Pre-K = Prekalikreína. KPMA= Kíninógeno de Peso Molecular Alto. (4).

que se efectúa en dos fases, en la primera el Factor XII al contacto con la superficie con carga negativa, sufre un cambio conformacional que se acompaña por la aparición de actividad enzimática pero no por cambio en el peso molecular que es de 80,000. El factor XII activo (o XIIa) convierte algo de Prekalikreína a Kalikreína la cual en una segunda fase rápidamente activa más factor XII. En esta reacción se efectúa un rompimiento proteolítico del Factor XII, liberando un fragmento (fragmento E) con peso molecular de 28,000 que tiene actividad enzimática y no solamente activa al factor XI sino también al activador del Plasminógeno y en activación en frío, al Factor VII. Es decir que a partir de este nivel, la vía intrínseca se interrelaciona con la vía extrínseca y la separación estricta entre ambas no puede ser rígida. El Factor XII también puede convertirse a su forma activa en fase fluida en ausencia de una superficie activa y esta conversión la pueden realizar varias enzimas proteolíticas como la Kalikreína, Plasmina, Tripsina y el Factor XIa, teniendo mayor importancia la primera. Las etapas subsecuentes en la activación del Factor XII en esta fase, son las mismas que para la de contacto. (8,9).

KININOGENO DE PESO MOLECULAR ALTO.

El papel que desempeña esta proteína en la fase de contacto, es el formar complejos bimoleculares con el F. XI o con la Prekalikreína y se adsorbe con ellos a la superficie activa donde los dos constituyentes de cada complejo funcionan cooperativamente para aumentar la actividad del Factor XI sobre sus sustratos naturales, funcionando como un cofactor en estas reacciones (4).

ACTIVACION DE LOS FACTORES XI Y IX.

Cuando la Kalikreína activa en la etapa anterior al Factor XII y lo convierte en XIIa, éste en turno activa al siguiente factor en la se---

cuencia, que es el Factor XI, convirtiéndolo a su forma enzimática activa por medio de una reacción que no se acompaña de cambio en su peso molecular sino en la transformación de una molécula inicial de 2 cadenas polipeptídicas del mismo tamaño (80,000), a cuatro cadenas unidas por enlaces disulfuro, dos de 50,000 y dos de 30,000. En esta activación el Factor XIIa requiere de una proteína adicional del plasma conocida inicialmente como Factor Fitzgerald, pero que posteriormente se reconoció ser el Kininógeno de Peso Molecular Alto. La activación del Factor XI por el XIIa no requiere de calcio y puede realizarla también la tripsina.

Los estudios cinéticos de la interacción entre los factores XIa y IX, sugieren que este factor se comporta como un sustrato y que el factor XIa es una serinoproteasa. Esta reacción requiere de calcio y la activación de la proenzima IX ocurre en dos etapas: 1a.) rompimiento de la cadena polipeptídica inicial del Factor IX en dos cadenas, una ligera con un peso molecular de 16,000 formada a partir de la región aminoterminal de dicho factor y una pesada ~ 38,000. Esta molécula no tiene actividad enzimática o coagulante. 2a.) Hidrólisis de un enlace peptídico (arginina-valina) y liberación de un péptido de activación rico en carbohidratos y que deriva del extremo aminoterminal de la cadena pesada. Esta etapa se acompaña por la aparición de actividad coagulante. El sitio activo serina del factor activo IXa reside en la cadena pesada, mientras que los sitios fijadores de Ca^{2+} se concentran en la cadena ligera (6).

FORMACION DEL ACTIVADOR INTRINSECO DE LA PROTROMBINA.

La siguiente proenzima a ser activada en la secuencia es el Factor X en una reacción que requiere de Ca^{2+} , trazas de Factor Plaquetario 3, del Factor IXa y del Factor VIII. Esta reacción se acelera marcadamente por la adición de pequeñas cantidades de trombina al Factor VIII y al parecer el papel de este factor, es acelerar la velocidad de activación del Factor X.

En el sistema formado arriba, la membrana de la plaqueta sirve como -

una superficie donde se adsorben los factores y iones, se orientan de tal modo, que el complejo que resulta adquiere una gran actividad enzimática (figura 2).

VIA EXTRINSECA DE LA COAGULACION.

Esta vía es corta y rápida e implica la interacción entre el Factor Tisular y el Factor VII. Requiere de la presencia de iones de calcio, se forma un complejo particular que se comporta como una enzima. El complejo Factor Tisular -VIIa y Ca^{2+} activan al Factor X, el cual en esa forma activa reciprocamente al Factor VIIa, transformándolo de una molécula de una sola cadena, a otra de dos (4).

Al activarse el Factor Xa por cualquiera de las dos vías, ocurre un rompimiento en su molécula entre Arg_{51} - Ile_{52} y se transforma en una molécula de dos cadenas, la pesada que contiene el sitio activo y la ligera que contiene los residuos de glutamato. El veneno de la serpiente Russell puede de activar también al Factor X. (figura 3).

VIA COMUN DE LA COAGULACION.

La molécula activa del Factor X (Xa), interactúa rápidamente con el Factor V (que a su vez recibe la acción de la Trombina), con el Ca^{2+} y con el Factor Plaquetario 3, se forma entonces un complejo denominado Protrombinasa, el cual activará subsecuentemente a la Protrombina (Factor II). En este complejo el centro activo es el Factor Xa que se une al Factor Plaquetario 3 por enlaces hidrofóbicos (Figura 4) (4, 5).

ACTIVACION DE LA PROTROMBINA.

En esta penúltima etapa de la coagulación, la Protrombina se transforma en Trombina en una reacción catalizada por la proteinasa Xa y acelerada por el Ca^{2+} , las plaquetas y por el Factor V o cofactor proteico. Durante ella se pierde la mitad de la masa de la Protrombina y se liberan sucesi-

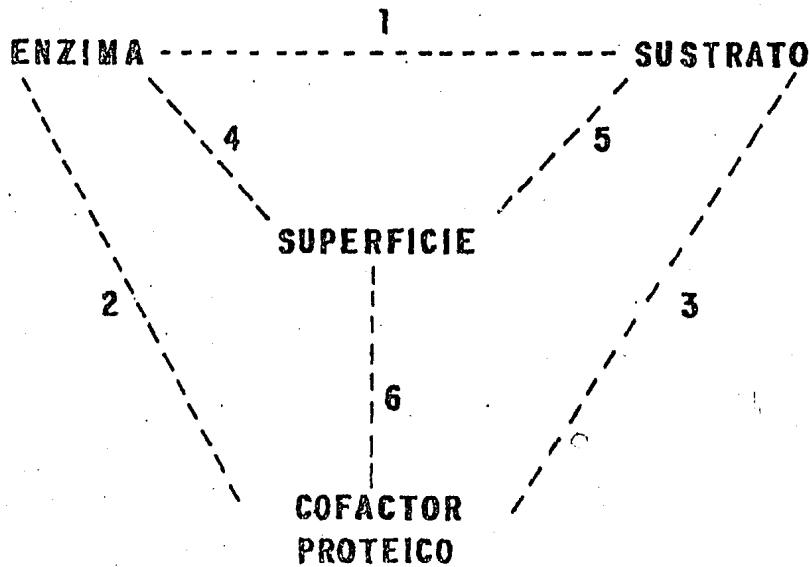


FIGURA 2. INTERACCIONES ENTRE LOS COMPONENTES QUE PARTICIPAN EN UNA ETAPA DE LA CASCADA DE LA COAGULACION. Cuando la enzima y su sustrato son proteínas relacionadas con la vitamina K (Protrombina, X, (Xa), - IX, (IXa) y VII, (VIIa), las interacciones que se representan por las líneas unidas 4-5, implican al calcio y a la superficie de la membrana de la plaqueta. (5).

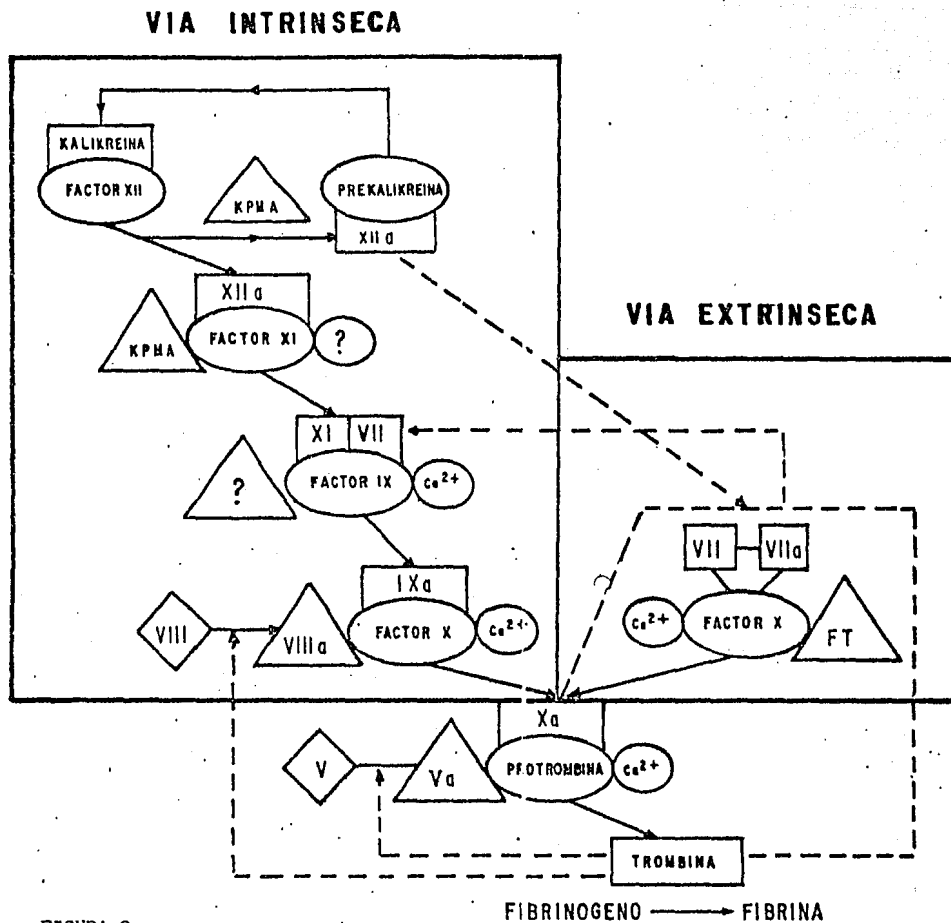
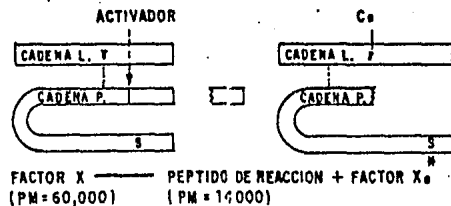


FIGURA 3. REPRESENTACION DE LA CASCADA DE LA COAGULACION CON SUS DISTINTAS ETAPAS DE REACCION. (5).

I



II

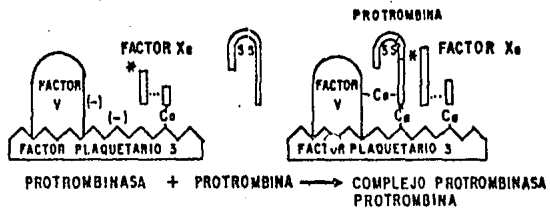


FIGURA 4. I. ACTIVACION DEL FACTOR X
 II. FORMACION DE LA PROTROMBINASA (4)

vamente dos fragmentos (Fragmento 1 y Fragmento 2), se generan dos productos intermedios, Pretrombina 1 (Protrombina menos fragmento 1) y Pretrombina 2 (Protrombina menos fragmento 2). Los mencionados fragmentos derivan de la ruptura sucesiva en la región aminoterminal. Al final la Pretrombina 2 sufre una nueva ruptura en un enlace peptídico interno (figura 5) y se transforma en una molécula de dos cadenas unidas por enlace disulfuro y que es la Trombina, con peso molecular de 34,000 El sitio activo reside en la cadena pesada que tiene 260 aminoácidos y un residuo de carbohidrato (5) (figura 5 y 6).

REACCION TROMBINA FIBRINOGENO.

En esta última etapa de la coagulación el fibrinógeno es convertido a su forma estable que es la fibrina y pueden distinguirse en ella tres etapas, una enzimática, una de polimerización y otra de estabilización(10). En la primera ocurre un rompimiento del fibrinógeno por la Trombina a nivel de cuatro enlaces arginina-glicina, dos en las cadenas alfa y dos en las cadenas beta. El sitio de la ruptura reside en la porción aminoterminal de esas cadenas. Se liberan por lo tanto cuatro fibrinopéptidos, dos A y dos B, quedando una molécula residual llamada "monómero de la fibrina" con peso molecular ~334,000 (figura 6).

En la etapa de polimerización que es un fenómeno físico complicado y no totalmente comprendido, ocurre una disminución de la electronegatividad de los monómeros de la fibrina por la pérdida de los fibrinopéptidos (figura 6).y disminuyen de este modo las repulsiones intermoleculares entre ellos. Se forman fácilmente enlaces por puentes de hidrógeno, se agregan los monómeros originando polímeros por asociación término-terminal de los extremos carboxiterminal de las cadenas gama y por interacción látero-lateral de las cadenas alfa. A medida que sucede esto, interactúan los extremos aminoterminal de una molécula de un monómero, con los extremos carboxiterminal de otro, se originan así fibras elongadas con traslapamiento de casi la mitad de la longitud de los monómeros implicados (4).

Esa polimerización conduce primero a la formación de fibrina soluble, pro

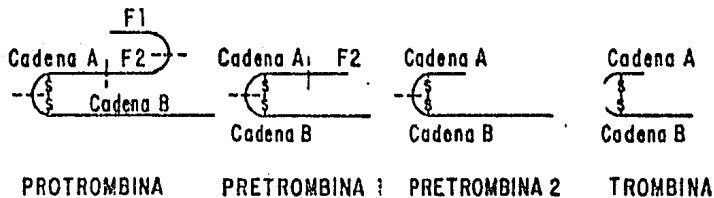
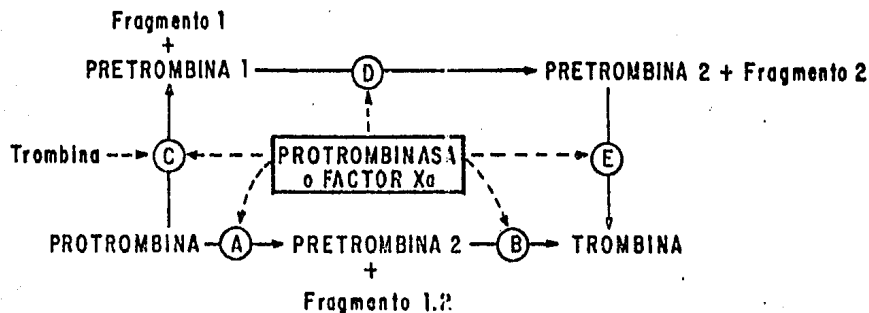
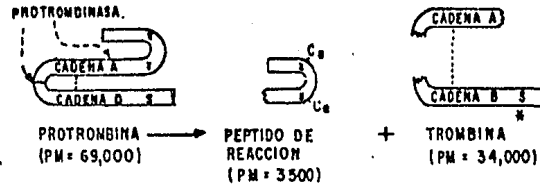


FIGURA 5 PRODUCTOS INTERMEDIOS DURANTE LA ACTIVACION DE LA PROTROMBINA. (4).

III



IV

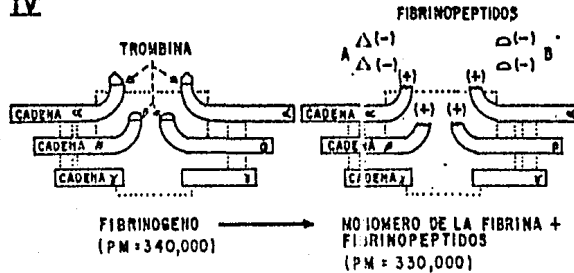


FIGURA 6 III ACTIVACION DE LA PROTROMBINA.
IV. ACCION PROTEOLITICA DE LA TROMBINA SOBRE EL FIBRINOGENO. (4).

ceso que es reversible in vitro en presencia de agentes desnaturalizantes como la urea (4).

La fibrina soluble formada en la etapa anterior es convertida a su forma insoluble en la etapa de estabilización por acción del Factor XIIIa, que es una transaminidasa que forma enlaces covalentes entre los grupos epsilonamino de la lisina y los grupos amida de la glutamina entre pares de cadenas gama y se forman así los dímeros. El factor XIII requiere para su activación de la acción de la Trombina. Ese factor se transforma de una proteína tetramérica con estructura A_2B_2 , en un dímero catalítico derivado de las cadenas A modificadas y de un dímero inactivo derivado de las cadenas B (4).

FIBRINOLISIS.

Significa la disolución de la fibrina sólida mediante una serie de reacciones de un sistema enzimático del plasma sanguíneo. Sus componentes son: el Plasminógeno que es la proenzima de la enzima fibrinolítica o Plasmina; los Activadores del Plasminógeno y los Inhibidores de la Plasmina.

PLASMINOGENO: es una proteína de una sola cadena con peso molecular de 90,000 que por acción de los activadores se transforma en otra de dos cadenas unidas por enlace disulfuro, la Plasmina. El sitio de la ruptura en el Plasminógeno es a nivel de un enlace peptídico arginina-valina. El sustrato natural de la Plasmina es la fibrina y en forma anormal el Fibrinógeno, Factor V y Factor VIII.

ACTIVADORES DEL PLASMINOGENO: pueden ser: 1) sustancias que activan al Plasminógeno y que específicamente se trata de la Urokinasa y probablemente del Proactivador. 2) enzimas proteolíticas como la tripsina y la misma plasmina. 3) sustancias que convierten normalmente a un Proactivador, a Activador, como la Estreptokinasa (11).

REACCIONES CATALIZADAS EN LA FIBRINOLISIS:

Primera: ataque por parte de los activadores sobre el Plasminógeno para formar la plasmina. Segunda: ataque de la plasmina sobre la fibrina con la formación de los productos de degradación de la misma.

PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL FIBRINOGENO-FIBRINA.

La acción proteolítica de la Plasmina sobre el Fibrinógeno o la Fibrina conduce a la formación de una familia de fragmentos solubles que poseen los determinantes antigénicos del Fibrinógeno nativo y que son retenidos en la fibrina y en sus productos de degradación. De ahí la utilidad de los métodos inmunológicos empleados para su estudio, aunque no distinguen si proceden del Fibrinógeno o de la Fibrina.

El tamaño de la molécula de cada producto lítico varía de acuerdo al tiempo de acción de la Plasmina sobre su sustrato. Los productos removidos en forma secuencial de acuerdo al tiempo de acción de la plasmina son: Fragmento X con peso molecular de 250,000, Fragmento Y con peso molecular de 155,000 que a su vez origina dos fragmentos: E y D con pesos moleculares el primero de 30,000 a 50,000 y el segundo 90,000. A partir del Fragmento X pueden producirse un Fragmento D que deriva de la región carboxiterminal de la molécula del Fibrinógeno y un Fragmento Y (4). El monómero de la fibrina y los fragmentos X y Y forman complejos solubles con el fibrinógeno, que se disocian en presencia de alcohol o con sulfato de protamina, formando geles y precipitados varios. A este fenómeno se le conoce como "Paracoagulación" y se realiza in vitro en los laboratorios de coagulación.

La importancia biológica de esos productos líticos reside en su capacidad para dañar en forma importante el proceso hemostático y son la causa de la hemorragia en los procesos patológicos conocidos como Coagulación Intravascular y Fibrinogenolisis. Son antitrombinas potentes e inhiben la polimerización correcta de la fibrina y daña la función plaquetaria de agregación (12). Su cantidad normal en el suero es alrededor de 5 μ g por mililitro de suero. (figura 7).

INHIBIDORES DE LA FIBRINOLISIS:

Cuando la fibrinólisis rompe el equilibrio con el Sistema de la Coagulación y su acción exagerada es peligrosa, entran en juego la acción de ciertas proteínas conocidas como antiplasminas de las cuales se conocen al menos cinco. Dos de esas proteinasas tienen mayor importancia biológica y son la Antiplasmina alfa 2 y la Macroglobulina alfa 2. Los estudios de los complejos Plasmina-Inhibidor aislados de sangre de humanos que

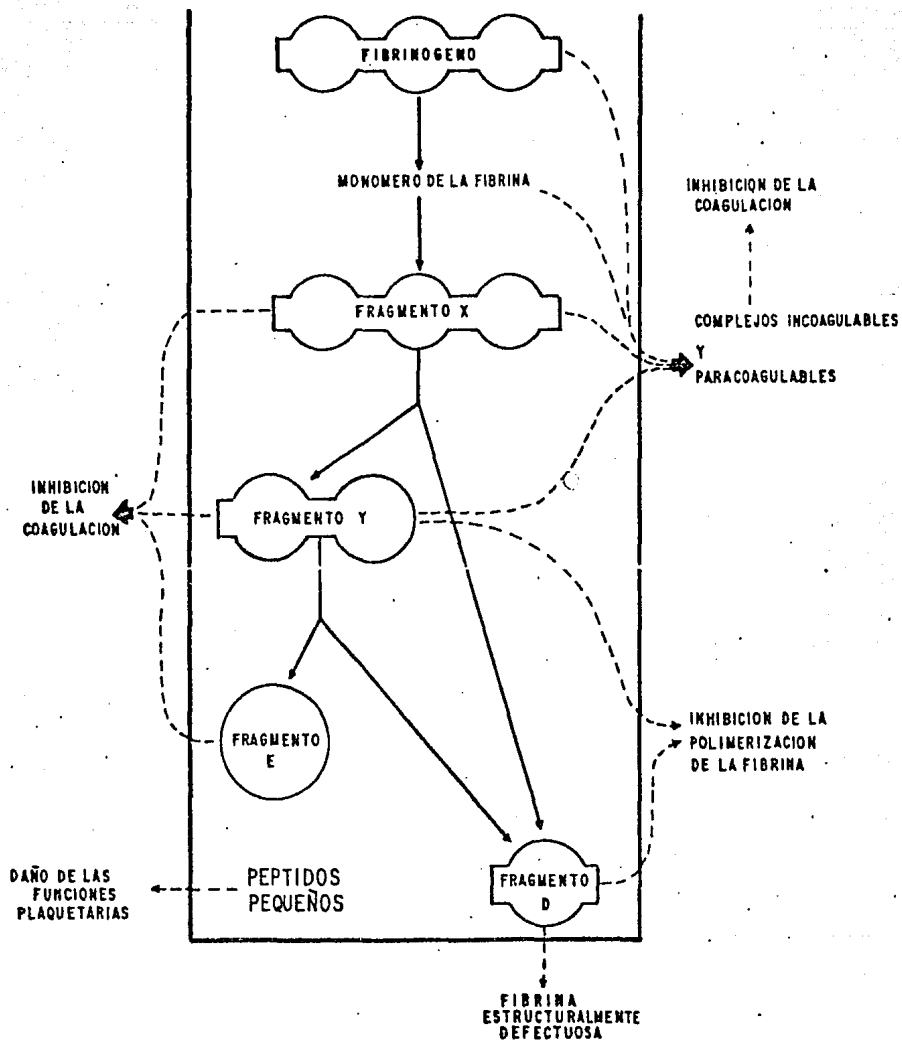


FIGURA 7. DEGRADACION PROTEOLITICA DEL FIBRINOGENO O DE LA FIBRINA POR LA PLASMINA Y SUS EFECTOS BIOLÓGICOS. (4).

reciben tratamiento trombolítico, sugieren que la plasmina no reacciona con la macroglobulina alfa-2 o con la antitripsina alfa-1 hasta que se haya saturado la antiplasmina alfa-2 (4).

INHIBIDORES FISIOLÓGICOS DE LOS FACTORES DE LA COAGULACION.

Son proteínas con acción inhibitoria de los factores de la coagulación y cuya importancia biológica reside al presentarse su deficiencia hereditaria en algunos individuos que presentan tendencia a la trombosis. De esos inhibidores el mejor estudiado es la Antitrombina III o cofactor de la heparina. Es una glicoproteína alfa-2 con peso molecular de 67,000 de una sola cadena y contiene 15% de carbohidrato.

Mecanismo de acción de la Antitrombina III: unión de un residuo de arginina de ese inhibidor, con una serina del sitio activo de la Trombina. La heparina se fija a un grupo epsilonamino de la Antitrombina III y actúa acelerando la velocidad de la formación del complejo enzima-inhibidor.

De las seis antitrombinas conocidas (3 fisiológicas y 3 anormales), además de la Antitrombina III, tiene importancia la Antitrombina VI o Productos de Degradación del Fibrinógeno-Fibrina ya mencionados previamente (13).

Antes de entrar a la descripción de los resultados obtenidos en el desarrollo de este informe de trabajo, con viene señalar el tipo de material humano escogido para la realización de los estudios de coagulación y fibrinólisis en síndromes sugestivos de Coagulación Intravascular o muy relacionados con ellos. Posterior a esto, se señalará la Metodología utilizada y el Material empleado y posteriormente la descripción de los resultados mencionados.

El material de estudio incluyó a cuatro grupos de pacientes: 1o. Enfermos con Leucemias Prómielocíticas. 2o. Una serie con un número aceptable de pacientes con Eclampsia y/o Toxemia. 3o. Un grupo de pacientes con mola hidatidiforme con edad gestacional no avanzada, con un pequeño grupo control. 4o. Un último grupo de pacientes con mola hidatidiforme con edad gestacional mayor que el anterior y de edad más avanzada.

Se seleccionaron un conjunto de métodos aplicables al estudio de la coagulación y la fibrinólisis que aparecen posteriormente. El número mayor de pruebas se realizaron en el primer grupo en una época donde fue fácil contar con los reactivos requeridos. En la descripción de los resultados aparecerán los métodos utilizados en cada estudio.

En cuanto a la investigación del primer grupo, el interés estribó en que la hemorragia es frecuentemente una complicación grave y que los conduce a la muerte. En los últimos años los estudios de esta enfermedad han aumentado

en el conocimiento del papel de la célula leucémica en la iniciación de la hemorragia y/o trombosis.

Algunos autores como Gralnick y Abrell (14), estudiaron la actividad del factor tisular de los promielocitos en esas leucemias y la encontraron aumentada en algunas fracciones granulares de esas células.

Con referencia a los tres grupos restantes, el interés en ese estudio derivó en sí, por tratarse de pacientes gestantes -- con ciertas características interesantes por la propia gravidez. Conocido es que los factores de la coagulación se encuentran aumentados durante la evolución progresiva de un -- embarazo normal, como son el fibrinógeno y los factores II, -- VII y X. Entre ellos destaca el penúltimo por su elevada concentración (15).

Se conoce además que la actividad fibrinolítica durante ese -- estado, se encuentra disminuída, y existe acuerdo general de que el tiempo de lisis de euglobulinas es muy prolongado en -- el embarazo (14, 15).

La disminución de esa actividad comienza temprano en la gestación y retorna rápidamente a lo normal en el postparto inme--diato (16).

La placenta además es rica en inhibidores de la uroquinasa, lo cual favorece una lisis retardada (17).

A este conjunto de alteraciones encontradas en la gestación -- se le conoce como estado hipercoagulable, pero esto, hasta -- cierto límite y por lo tanto no justifica su descripción como un estado del sistema activado de la coagulación, aunque fá--cilmente puede darse en él ante una serie de complicaciones -- obstétricas (15).

Por todas esas características mencionadas de la gestación, cabe pensar, que padecimientos como la Eclampsia, toxemia severa y el embarazo molar que cursan la primera, con alteraciones graves de la placenta, material rico en tromboplastina tisular, y la segunda con una degeneración del producto del embarazo y deportación en ocasiones importantes del trofoblasto (con contenido alto - también de tromboplastina tisular) a la circulación pulmonar, en un momento dado estos fenómenos pueden dar origen a alteraciones graves en el mecanismo de la coagulación y de la fibrinólisis que justifican un estudio a fondo en este problema.

Basado en esos hechos, se decidió realizar este estudio cuyos objetivos se señalan a continuación.

OBJETIVOS.

1o. Conocer el tipo de alteraciones en la coagulación y fibrinólisis en la patología ya mencionada (leucemia promielocítica y estados gravídicos conocidos como gestosis (Eclampsia y Toxemia), Embarazo Molar con gestación temprana y Embarazo Molar con gestación tardía en pacientes añosas.

2o. Investigar en el último grupo de pacientes el estado de coagulación y fibrinólisis a nivel de las venas uterinas y simultáneamente en sangre periférica.

3.- Utilizar en los cuatro estudios, métodos con tendencias distintas, es decir: a) una dirigida a los estudios del mecanismo de la coagulación y b) otra al mecanismo de la fibrinólisis.

4.- Valorar por medio de un análisis de los resultados, la utilidad que prestó cada método utilizado, es decir, su grado de sensibilidad de acuerdo a la etapa de la hemostasis estudiada.

MATERIAL Y METODOS.

Los diferentes métodos empleados en el estudio de los cuatro grupos de pacientes (Coagulación y Fibrinolisis) se desarrollaron en condiciones óptimas de conservación, material y reactivos específicos mantenidos gran parte de ellos a temperatura especial.

MATERIAL:

- 1.- Tubos de vidrio siliconizados o de plástico de 12 x 75 mm., 13x100mm. etc.
- 2.- Baño a 37 grados centígrados, baño con hielo, este último para la conservación de las muestras (plasma o suero), así como gran parte de los reactivos requeridos durante la realización del ensayo. El cloruro de calcio 0.025M. utilizado en los ensayos, se mantuvo a 37 grados - durante su verificación,
- 3.- Centrifuga refrigerada para la separación del plasma o suero con excepción de los "Complejos Solubles" que requirió de la temperatura ambiente.
- 4.- Cronómetros, pipetas de diferentes volúmenes 0.05, 0.1, 0.2 de ml. etc. Matraces volumétricos o de Erlenmeyer de diferentes volúmenes.
- 5.- Papel filtro Whatman # 42, varilla de vidrio, pipetas automáticas, placas de vidrio para grupos sanguíneos.
- 6.- Horno, espectrofotómetro Beckman, balanza analítica, etc.
- 7.- Cámara cuentaglobulos de Neubauer, pipetas para conteo de glóbulos rojos, lancetas.
- 8.- Microscopio de contraste de fase.

METODOS.

- 1.- Numeración de la cuenta de plaquetas en toma de sangre capilar (8).
- 2.- Tiempo de Protrombina en presencia de extracto acetinado de cerebro de conejo en los estudios 2, 3 y 4. (19).
- 3.- Tiempo Parcial de Tromboplastina activado en los estudios 2,3 y 4. (19).
- 4.- Tiempo de Trombina en los cuatro estudios (19).
- 5.- Dosificación de fibrinógeno por el método ponderal en el primer estudio y por la determinación del fibrinógeno coagulable en el plasma en los estudios 2, 3 y 4 (20).
- 6.- Lisis de euglobulinas plasmáticas en los estudios 1, 2 y 3. (19).
- 7.- Dosificaciones diferenciales de los factores II,V, VII, VIII, IX y X en el primer estudio, y de los factores II, V, VII y X en los estudios 2, 3 y 4. (19).
- 8.- Medición de los Productos de Degradación del Fibrinógeno, según Merskey (21)., en el primer estudio.
- 9.- Proactivador, en el primer estudio (19).
- 10.- Plasminógeno medido sobre la alfa-caseína en presencia de estreptoquinasa en el primer estudio. (22).
- 11.- Medición de los complejos solubles en el plasma, por precipitación en presencia del etanol y con sulfato de protamina (23, 24)., en estudios 1, 2 y 3.
- 12.- Hematocrito. en el estudio 4.

METODOLOGIA

1.- Cuenta de plaquetas (18)

Se basa en la numeración de las plaquetas en sangre capilar obtenida por punción directa a través de la piel.

Reactivos:

1.- Solución de oxalato de amonio al 1% guardado en pequeñas fracciones a 4 grados C.

Método: toma de muestra capilar y dilución de la misma en la pipeta para glóbulos rojos 1:200, agitación con rotador, reposo 10 minutos para permitir la hemólisis de los glóbulos rojos. Agitar nuevamente, descartar 4 primeras gotas y pasar la muestra a la cámara mantenida en ambiente húmedo. Reposar 20 minutos y conteo en microscópico de contraste defase.

Resultado: número de plaquetas contadas x 2000. Esta cifra se obtiene de la dilución de la sangre que es de 1:200, el conteo se efectúa en 0.1 mm³
Normal: de 150,000 a 350,000 /mm³.

2.- Tiempo de Protrombina (19)

Evalúa la eficiencia del Sistema Extrínseco de la coagulación en presencia de un exceso de extractos tisulares (cerebro humano o de conejo). Mide la formación de la Trombina a partir de la Protrombina en presencia de los factores V, VII y X.

Reactivos:

1.- Tromboplastina tisular (de cerebro humano o de conejo), reconstituida según indicaciones del fabricante.

2.- Cloruro de Calcio 0.025 M.

3.- Plasma citratado a partir de muestra de sangre con citrato de sodio al 3.8% a razón de un volumen de éste por 9 de sangre, Centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos.

Método:

a) Muestras y tromboplastina tisular (Factor Tisular) en hielo hasta efectuar el ensayo.

b) Colocar 0.1 ml. de plasma control o plasma problema por duplicado en tubo de 10x75 mm. e incubar a 37 grados C uno a dos minutos, tiempo necesario para obtener el equilibrio térmico.

c) agregar 0.2 ml. de tromboplastina cálcica, marcar el cronómetro y agitar rápidamente. Dejar en el baño a 37 grados de 8 a 10 segundos, hacer inclinaciones rápidas del tubo y leer el tiempo de coagulación deteniendo el cronómetro en ese momento.

Resultados: se expresan relacionando el problema con el normal, del modo siguiente: problema/testigo en segundos.

Normal: de 12 a 14 segundos. El resultado del plasma problema no debe prolongarse en más de 2 segundos con referencia al plasma normal ni acortarse en más de un segundo.

En el control de los anticoagulantes orales que afectan este ensayo, el plasma problema no deberá resultar dos veces y media el valor del plasma normal ni permanecer menos de 1.5 veces, ese valor.

Ejemplo: problema 24 segundos, testigo 12 segundos, la relación será:

2.

3.- Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado (19).

Principio: el tiempo de recalcificación de un plasma citratado en presencia de una cantidad óptima de cefalina, es un método de la medición global de los factores plasmáticos de la vía intrínseca de la coagulación a excepción de los factores plaquetarios reemplazados por el lípido.

Reactivos: cefalina, que es un extracto cloroformado de cerebro, con concentración óptima establecida previamente o un sustituto plaquetario de origen comercial reconstituido según instrucciones del fabricante.

Caolín: suspensión a razón de 5 mg./ml. en regulador de Veronal pH 7.35
CaCl₂ 0.025 M.

Plasma citratado obtenido igual que para el tiempo de protrombina, pero con centrifugación de la sangre a 3600 rpm. durante 15 minutos.

Método:

La cefalina, caolín y plasma mantenidos en hielo hasta la hora de efectuar el ensayo.

En baño a 37 grados C colocar un tubo de vidrio de 10x75 mm. por duplicado y depositar 0.1 ml. de plasma problema o control y 0.1 ml. de cao-

lfn. Mantenerlo a 37 grados y marcar el cronómetro desde el momento de hacer esa mezcla, agitar y dejar reposar dos minutos. Agregar 0.1 ml. de cefalina y 0.1 ml. de cloruro de calcio marcando el cronómetro, agitar, hacer inclinaciones discretas del tubo después de unos 15 segundos de incubación y en el momento de la formación -- del coágulo, detener el cronómetro.

Resultados: se reportan igual que para el tiempo de protrombina. - Normal de 30 a 45 segundos, no debiendo rebasar más de 3 o 4 segundos al testigo ni acortarlo en más de un segundo.

4.- Tiempo de Trombina (19).

Este método mide el tiempo de coagulación del plasma citratado en - presencia de trombina y explora por lo tanto la última fase de la - coagulación o fibrinoformación a la excepción del Factor XIII. Mide también la presencia de un inhibidor que intervenga en la fibrinofor - mación como producto de degradación del fibrinógeno-fibrina, anti--- trombinas, heparina, etc.

Reactivos.

- a) Plasma citratado obtenido en las mismas condiciones que para el - tiempo de protrombina y misma velocidad de centrifugación.
- b) Trombina bovina 50 u INH por ml. de la cual una vez reconstituida según indicaciones del fabricante, se toman pequeñas alícuotas que - se diluyen en regulador de Veronal pH 7.35 (de 0.2 a 0.3 ml.) lle- vando la coagulación de un plasma testigo entre 14 y 20 segundos.

Método:

El plasma problema y testigo así como la solución de Trombina se man- tienen en baño con hielo hasta el momento del ensayo.

Colocar en un tubo de 10x75 mm. 0.2 ml. de plasma problema y llevarlo a 37 grados C. Marcar el cronómetro y dejarlo en esas condiciones un minuto. Añadir en forma rápida 0.2 ml. de la solución de trombina, marcar cronómetro, agitar y realizar varias inclinaciones del tubo observando el tiempo de aparición del coágulo deteniendo en ese momen- to el cronómetro.

Esta prueba se realiza por duplicado y se reporta igual que para el - tiempo de protrombina "problema/testigo" en segundos.

El problema no debe rebasar normalmente más de dos segundos al testigo ni acortarse en ese mismo valor. En el caso de que el problema se prolongara en forma importante, se pueden hacer diluciones de éste con el plasma testigo 1:2, 1:4, etc. y ver si corrige o no. Si sucediera lo primero, se tratará de la existencia de una deficiencia de fibrinógeno en el plasma problema. Si no corrigiera, se tratará de la presencia de un inhibidor.

5. DOSIFICACION DEL FIBRINOGENO:

Método Ponderal. (19).

Principio: mide la transformación del fibrinógeno en fibrina por una solución de trombina cálcica, separación, lavado y determinación del peso de la fibrina después del secado.

Reactivos:

a) Solución recalcificante:

Cloruro de calcio anhidro 0.400 g.

Cloruro de sodio 9.0 g

Agua bidestilada 1000 ml.

b) Solución de Trombina 50 u INH por ml. en regulador de Veronal pH 7.35

c) Plasma citratado obtenido en las mismas condiciones que para el tiempo de protrombina, pero centrifugado a 3600 o 4000 rpm. durante 15 minutos.

Método:

En un matraz de Erlenmeyer de 25 ml. o en un tubo de vidrio de 20ml. introducir 0.5 ml. de la solución recalcificante, 3 ml. de plasma y 0.5 ml. de la solución de Trombina. Agitar y dejar en reposo de 15 a 30 minutos en baño a 37 grados C. Separar el coágulo con una varilla de vidrio y depositarlo en una cápsula de vidrio. Lavarlo con agua bidestilada, después con etanol y luego con éter. Secarlo en horno a 80 grados C. durante una hora. Después enfriar, pesar en balanza de precisión y calcular el peso con la fórmula siguiente.:

$$\frac{\text{peso} \times 1000 \times \text{volumen utilizado}}{3 \times (\text{volumen} - 1)}$$

El resultado se expresa en gramos por litro o se hace la conversión a mg./100 ml. de plasma.

En el embarazo normal y a partir de la 20a. semana, los valores habituales son un poco mayores que en la mujer no embarazada, alrededor de -

350 mg./100 ml. de plasma y al final de la gestación se encuentra en los límites superiores normales de 450 mg/100 ml.

Método por Determinación del fibrinógeno coagulable en plasma (20).

Principio: En presencia de concentraciones altas de Trombina y concentraciones menores de Fibrinógeno, los tiempos de coagulación del plasma son proporcionales a la tasa del primero.

Reactivos:

- a) Solución de trombina con 100 u INH por ml.
- b) Regulador de Veronal ph 7.35
- c) Estándar de fibrinógeno con concentración conocida de origen comercial reconstituido en regulador de Veronal según indicaciones del fabricante.
- d) Plasma citratado obtenido en las mismas condiciones que para el método anterior.

Método:

Mantener los reactivos anteriores en baño de hielo. Hacer diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 del estándar de fibrinógeno con regulador de Veronal. Pasar 0.2 ml. de cada dilución a una serie de 4 tubos de 12x75 mm. y llevar el primer tubo a baño de 37 grados C. Marcar el cronómetro e incubar 2 minutos. Agregar en forma rápida 0.1 ml. de trombina y marcar el cronómetro, agitar suavemente. Con inclinaciones del tubo observar el momento de la aparición del coágulo. Hacer por duplicado esta operación y repetir lo mismo con cada dilución.

Graficar los resultados en papel bilogarítmico marcando las concentraciones conocidas de las diluciones del fibrinógeno en las abscisas y los tiempos de coagulación en las ordenadas, obteniendo una curva estándar de este modo.

Hacer una dilución 1:10 del plasma problema y repetir el resto del procedimiento en un tubo de 12x75 en el baño a 37 grados C. igual como se realizó para las diluciones del estándar del fibrinógeno, también por duplicado. El resultado se calcula interpolando el tiempo de coagulación obtenido en la curva estándar.

Resultados normales: Entre 200 y 400 mg. por 100 ml. de -- plasma.

En caso de fibrinogenopenia practicar el problema con concentración mayor (al doble) del plasma en la dilución. Por el contrario, si la muestra problema procediera de un estado de hipercoagulabilidad con concentración alta de fibrinógeno, se practicará el ensayo con una dilución mayor del plasma.

6.- DOSIFICACIONES DIFERENCIALES DE LOS FACTORES II, V, VII y X en un tiempo (19).

Principio:

Este método mide los factores mencionados en un sistema coagulante que aporta todos ellos, excepto el que se dosifica. El sistema coagulante es un reactivo artificial que llamaremos reactivo para la dosificación del factor en estudio y es un plasma con deficiencia congénita total del mismo. El método es similar para la medición de todos esos factores y consiste en la corrección de un tiempo de Protrombina del plasma deficiente, con una dilución 1:10 del plasma problema en presencia de tromboplastina tisular comercial y calcio.

Reactivos:

- a) Tromboplastina tisular comercial igual que para el tiempo de protrombina.

- b) Cloruro de Calcio 0.025 M.
- c) Reactivo comercial que contiene plasma deficiente, reconstituido según indicaciones del fabricante en regulador de Veronal ph 7.35.
- d) Plasma normal y problema obtenidos de sangre citratada igual que para el tiempo de protrombina y centrifugada a 1,800 rpm para los factores II y X y a 3,600 rpm para los factores V y VII durante 15 minutos.

Método:

El sistema anterior se colocará en baño de hielo. Preparar diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 del plasma normal en regulador de Veronal. En un tubo de 10x75 depositar 0.1 ml. del reactivo comercial con la deficiencia congénita y pasarlo al baño de 37 grados. Agregar 0.1 ml. de la primera dilución, reposar un minuto y agregar 0.1 ml. de tromboplastina tisular y 0.1 ml. de cloruro de calcio (o 0.2 ml. de tromboplastina cálcica) marcando el cronómetro y agitando suavemente. Dejar 15 segundos en reposo el tubo y hacer inclinaciones suaves del mismo para leer la coagulación de la mezcla. Realizar por duplicado y repetir lo mismo para las siguientes diluciones del plasma normal.

Graficar los resultados en papel bilogarítmico transportando las concentraciones del factor en estudio en por ciento en las abscisas y los tiempos de coagulación en segundos sobre las ordenadas. La dilución 1:10 corresponde al 100% de concentración, 1:20 al 50%, 1:40 al 25% y 1:80 al 12.5%.

Preparar una dilución del mismo modo 1:10 para el plasma problema en duplicado o triplicado y repetir el resto del procedimiento igual que para el plasma normal. Los resultados --

del tiempo de coagulación obtenidos con el plasma problema se calculan en la gráfica interpolándolo en la curva estándar y se expresa en porcentaje de actividad del factor.

7.-DOSIFICACION DE LOS FACTORES VIII Y IX (19).

Principio:

Se basa en la corrección del tiempo de calcificación de un plasma con déficit congénito de ese factor por diferentes diluciones de un plasma testigo o problema en presencia de caolín y de cefalina.

Reactivos:

- a) Plasma sustrato proveniente de un déficit congénito total de este factor el cual puede ser proporcionado también en forma comercial.
- b) Plasma normal y plasma problema obtenidos de sangre citratada igual que para los factores V y VII, pero con centrifugación durante 30 minutos y conservados a 4 gra dos hasta el momento de la prueba.
- c) Cefalina: extracto cloroformado de cerebro con concentración óptima establecida previamente o cefalina comercial reconstituída según las instrucciones del fabricante.
- d) Caolín: Suspensión 5 mg/ml. en regulador de Veronal pH 7.35.
- e) Cloruro de Calcio 0.025 M.
- f) Regulador de Veronal pH 7.35

Método:

A excepción del Cloruro de Calcio todos los componentes del sistema anterior se conservan en baño de hielo hasta el momento de la prueba.

Preparar a partir del plasma normal y del problema 3 diluciones (1:40, 1:80, 1:160) en regulador de Veronal. En una serie de tubos de 13x100 mm. introducir 0.1 ml. del reac -

tivo con la deficiencia, 0.1 ml. de las diferentes diluciones del plasma normal o problema, 0.1 ml. de cefalina y - 0.1 ml. de caolín. Pasar esa serie de tubos al baño de 37 grados C. Marcar un cronómetro para cada tubo en forma sucesiva, dejándolos en incubación 2 minutos. Añadir 0.1 ml. de cloruro de calcio a cada uno de los tubos, marcando - nuevamente con el cronómetro para cada tubo en el momento de esta adición. Agitar suavemente los tubos dejándolos - en el baño durante 90 segundos. Hacer inclinaciones leves de cada uno de ellos leyendo el tiempo de coagulación en - forma precisa y sucesiva a partir del primer tiempo, dete - niendo en ese momento el cronómetro respectivo.

El control del reactivo se obtiene por la mezcla siguiente: 0.1 ml. del reactivo con la deficiencia, 0.1 ml. del regulador, 0.1 ml. de cefalina, 0.1 ml. de caolín y 0.1 ml. de cloruro de calcio, en las mismas condiciones que las muestras anteriores y el tiempo de coagulación debe ser superior a 250 segundos. En caso de déficit muy importante se repetirá la prueba utilizando diluciones menores (1:5, 1:10) del plasma problema.

Resultados:

Se expresan en porcentaje en relación a una curva obtenida con las 3 diluciones del plasma testigo graficada en papel bilogarítmico, transportando en las abscisas los porcentajes, considerando la dilución 1:40 como el 100%, 1:80 como el - 50% y 1:160 como el 25%. En las ordenadas se transportan los tiempos de coagulación obtenidos para el testigo. Los resultados de los tiempos de coagulación obtenidos con el plasma problema se graficarán del mismo modo que con el plasma normal, obteniendo una recta que será paralela a la de este último donde la pendiente define la sensibilidad del reactivo.

Se expresarán los resultados del problema en porcentaje - en relación a la curva de las 3 diluciones obtenidas con - el testigo.

Resultados normales de los factores VIII y IX varían del - 65 a 180%. Por estas variaciones espontáneas se prefiere siempre utilizar como control una mezcla de 2 a 3 plasmas normales o un estándar de referencia conservado a -70 gra dos centígrados.

8.- LISIS DE EUGLOBULINAS PLASMATICAS (19).

Principio:

El tiempo de lisis del coágulo de las euglobulinas del plasma es un método sensible que permite apreciar una actividad lítica global. La precipitación de las euglobulinas por dilución y acidificación del plasma conduce a eliminación de los inhibidores de la lisis y de este modo a la exterioriza ción de la fibrinolisis.

Reactivos:

- a) Plasma citratado obtenido en las mismas condiciones que para los factores V y VII, con centrifugación de 15 minutos a 3,600 rpm.
- b) Cloruro de Calcio 0.025 M.
- c) Acido acético, solución al 1.6%, diluido extemporánea- mente en agua destilada.
- d) Regulador de boratos pH 7.6%

Método:

El plasma y el regulador se mantienen en baño con hielo hasta el momento de la prueba y el cloruro de calcio a 37 grados C.

En un tubo de 10 ml. introducir 0.5 ml. de plasma. Agregar

9.5 ml. de la solución de ácido acético. Mezclar el contenido y dejar 20 minutos a 4 grados. Repartir la solución por igual en 2 tubos de 10 ml. Centrifugar 10 minutos a 3,500 rpm. Decantar el sobrenadante por inclinación del tubo. Secar sobre papel filtro por inversión sin perder el precipitado.

Agregar a cada tubo 0.25 ml. de regulador de boratos disolviendo el precipitado. Llevar los tubos a 37 grados C. Agregar 0.25 ml. de cloruro de calcio a cada tubo marcando el cronómetro y agitando suavemente. Verificar la coagulación de las euglobulinas que se realizará en unos 2 minutos y después vigilar su disolución a intervalos regulares para determinar el tiempo de la lisis completa del coágulo.

Resultados:

El tiempo normal de las lisis de las euglobulinas plasmáticas es igual o superior a 3 horas. Se considera lisis aguda de 10 a 30 minutos y subaguda de 30 a 60 minutos. En caso de fibrinogenopenia la solución puede ser incoagulable, por lo que se utilizará en lugar de 0.5 ml. del plasma problema, 0.25 ml. de éste y 0.25 de un plasma normal, que aporta el sustrato deficiente.

9.- DETERMINACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL FIBRINOGENO-FIBRINA. METODO DE MERSKEY (21).

PRINCIPIO: Cuando un suero antifibrinógeno se añade a eritrocitos tanados sensibilizados con fibrinógeno, los anticuerpos se unirán a éste en la membrana de los hematíes y consecuentemente se aglutinarán. Los productos de degradación del fibrinógeno-fibrina tienen una afinidad igual para el anticuerpo, y si están presentes se producirá un fenómeno competitivo con el fibrinógeno. Por lo tanto, esta prueba detecta la cantidad de productos de degradación por el grado

de inhibición de la aglutinación de los eritrocitos.

MATERIAL:

- a) Placa para grupos sanguíneos transparentes con excavaciones redondas.
- b) Pipetas de 1 ml. graduadas en 0.1 o pipetas automáticas de 0.1 ml.
- c) Pipetas de 0.1 ml. y 0.2 ml. calibradas, de modo que una gota equivalga a 0.025 ml.
- d) Tubos de ensaye 12x75 mm.
- e) Tubos de plástico de 50 ml. de capacidad.
- f) Incubadora a 37 grados.
- g) Agitador magnético.
- h) Centrífuga.
- i) Reloj.

REACTIVOS:

- a) Glóbulos rojos humanos grupo 0 colectados en ACD solución fórmula A (3 ml. de ACD para 20 ml. de sangre). - Guardarla 2 días a 4 grados antes de la sensibilización.
- b) Regulador fosfato-salina pH 6.4 (un volumen de regulador de fosfatos 0.15 M., más un volumen de solución salina normal).
- c) Regulador fosfato-citrato ph 6.4 (un volumen de regulador de fosfatos 0.15 M., más un volumen de solución de citrato de sodio 0.1 M.)
- d) Regulador fosfato-citrato-albúmina ph 6.4 (es el mismo regulador anterior pero contiene albúmina bovina al 2%).
- e) Acido tánico. Solución al 1% diluída 1:400 en regulador fosfato-salina.
- f) Suero humano obtenido de 3 ml. de sangre colectada en tubo de plástico conteniendo 10 ml. de ácido ϵ -amino.

- caproico como inhibidor de la fibrinolisis. Incubación - de la sangre a 37 grados durante 3 horas y centrifugación de la misma a 4,500 rpm. durante 10 minutos. Remoción del suero con pipeta Pasteur y se deposita en un tubo.
- g) Mezcla de plasmas normales obtenidos de donadores de banco de sangre y colectados en citrato de sodio relación: 1:10, conteniendo 0.3 ml. de ácido ϵ -aminocaproico y guardado en alícuotas a -20 grados centígrados después de su de - terminación de fibrinógeno.
- h) Suero antifibrinógeno humano diluido en regulador fosfato-citrato (puede ser de origen comercial obtenido por sensi- bilización en conejos).

METODO DE LA SENSIBILIZACION DE LAS CELULAS

Lavado de los eritrocitos obtenidos por sedimentación y remo- ción del plasma 3 veces con regulador de fosfato-salina con 20 volúmenes de ésta. Suspensión de los eritrocitos en solu- ción de ácido tánico fresco en regulador fosfato-salina para obtener una suspensión (del volumen inicial de las células) al 2%. Incubación por una hora a 22 grados C. mezclando sua- ve y constantemente. Lavado de las células 3 veces en 20 vo- lúmenes de regulador fosfato-citrato, y la suspensión final llevarla a un hematocrito de 4% con el mismo regulador. Se mezclan 4/5 partes de esa suspensión con un volumen igual de una dilución 1:250 del plasma citratado en el mismo regulador. Se sensibiliza del mismo modo 1/5 de la suspensión de eritro- citos con suero normal como control. Estas células no deben aglutinar con el antisuero. Incubación a 37 grados una hora, mezclando ocasionalmente. Lavado de los dos grupos de células 3 veces en 20 volúmenes de regulador fosfato-citrato. Suspensión de las mismas al 4% en regulador fosfato-citrato.

conteniendo albúmina de suero humano al 2%, y se conservan durante 3 semanas a 4 grados. Antes de su uso se lavarán previamente, resuspendiéndolos en regulador fosfato-citrato.

METODO PARA LA CUANTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL FIBRINOGENO-FIBRINA.

- a) Determinación de la concentración óptima del antisuero a usarse preparando diluciones del mismo (0.1 ml.) en la placa de vidrio, en regulador fosfato-citrato que contiene albúmina bovina al 2%. Añadir a cada dilución 0.1 ml. del mismo regulador y una gota (0.025 ml.) de las células sensibilizadas tratadas con plasma. La concentración óptima del antisuero deberá ser dos diluciones menos que aquélla que causa la aglutinación de los eritrocitos en 15 minutos y que habitualmente varía entre 1:3,200 y 1:6,400.
- b) Preparar diluciones dobles del plasma normal, suero normal y suero problema en regulador de fosfato-citrato, directamente en la placa de vidrio, utilizando si es posible una pipeta automática. Las diluciones serán de 1:200 a 1:25,000.
- c) Agregar 0.1 ml. de antisuero a cada dilución y se deja la placa 30 minutos a 4 grados C.
- d) Añadir una gota de células en cada dilución.
- e) Agitar suavemente la placa dejándola 30 minutos a 22 grados y leer.

CALCULO DEL RESULTADO:

La inhibición de la aglutinación producida por la dilución

de la muestra desconocida se compara directamente con el plasma estándar (normal). Si éste contiene por ejemplo 320 mg/100 ml. de fibrinógeno e inhibe la aglutinación a la dilución 1:6,400, cada una de estas diluciones representa:

$$320 \times \frac{1000}{100} \times \frac{1}{6,400} = 0.5 \text{ mcg/ml.}$$

10.- DETERMINACION DEL PLASMINOGENO Y PLASMINA (22)

Principio:

La enzima proteolítica plasmina conduce a la liberación a partir de la caseína, de la tirosina que puede medirse después por un método espectrofotométrico, el cual permite por lo tanto medir la plasmina libre o el plasminógeno. En el método siguiente, una unidad de plasmina (Subcomité de Agentes Trombolíticos del Instituto Nacional de la Salud "INIH") libera 0.1 microequivalentes de tirosina /minuto del lote que ese subcomité señala como estándar de referencia.

REACTIVOS;

- 1.- Regulador TRIS (0.06 M) - NaCl (0.09 M) pH 7.5.
- 2.- Acido perclórico (0.5M)
- 3.- Alfaseína 1.4 g. disuelta en 100 ml. del regulador TRIS-NaCl, lote GCl-16 de Worthington Biochemical Corp. El valor del blanco para la caseína debe ser 0.04 (A_{275}) o menos.
- 4.- Estreptoquinasa (Varidasa de Lederle), solución que contiene 2000 u. por ml. conservada a menos 20 grados C y en el momento del ensayo a 4 - grados C.
- 5.- Plasmina estándar en glicerol al 50%. Las muestras contienen 10 u CAT por ml., se mantendrá a -20 grados C mientras no se utilice y en baño con hielo en el momento del ensayo.

Método: Los componentes anteriores se mantendrán en baño con hielo.

- a) Preparación de la plasmina: diluir 10 unidades (CAT) en regulador - TRIS-NaCl y colocar en una serie de tubos volúmenes de 1.0, 0.8, 0.6 - 0.4 y 0.2 ml. de esa solución.
- b) Agregar 0.2 ml. de la solución de estreptoquinasa y llevar a un volumen de 2.5 ml. con el regulador y agregar 2.5 ml. de la solución de la alfaseína. Se mezclan ambos contenidos invirtiendo los tubos 3 o 4 veces con papel parafilm.
- c) Incubación de los tubos a 37.5 grados C. marcando el tiempo.
- d) Tomar alícuotas de 2.0 ml. en el minuto 2 y 32 de cada una de las diluciones y agregar 3.0 ml. de ácido perclórico 0.5M, mezclar por agitación delicada unos cuantos segundos. Las muestras del minuto 2 se tomarán como el valor 0.

- e) Dejar precipitar a temperatura ambiente durante 30 minutos y centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos. Filtrar el contenido del tubo con papel Whatman # 42 y leer absorbencia a 275 milimicrons en espectrofotómetro Beckman -- utilizando como blanco las muestras del minuto dos.
- f) Graficar en papel milimétrico la densidad óptica contra las concentraciones de plasmina de las diferentes diluciones, obteniendo así una recta.
- g) A continuación determinar la plasmina de la muestra problema con una o dos diluciones del plasma en estudio y repetir el resto del procedimiento anterior.
- h) Calcular la cantidad de plasmina del plasma problema interpolando la densidad óptica obtenida con esa muestra - en la recta estándar.

Resultados: normales de 2 a 2.5 unidades caseína/ml.

11.- PROACTIVADOR PLASMÁTICO (19)

PRINCIPIO:

El plasma bovino desprovisto de proactivador es insensible a la acción de la estreptoquinasa. La adición de diferentes diluciones de un plasma humano normal o problema en presencia del plasma bovino y de estreptoquinasa hacen aparecer una actividad fibrinolítica donde la intensidad está en función de la cantidad del proactivador aportado.

REACTIVOS:

- a) Plasma bovino citratado (citrato de sodio 3.8%, 1 volumen de éste para 9 de sangre), obtenido por dos centrifugaciones a 6000 rpm durante 30 minutos. Se congela en pequeñas fracciones a -20 grados C.
- b) Plasma humano obtenido de sangre citratada en la misma relación que el anterior, y centrifugada a 3600 rpm durante 30 minutos en centrífuga refrigerada y mantenido a 4 grados hasta el momento de la prueba y durante ella.

- c) Estreptoquinasa (Choay) solución de 10,000 u. por ml. en regulador de fosfatos pH 740
- d) Trombina solución con 30 unidades INH/ml. en regulador de fosfatos.
- e) Regulador de fosfatos pH 740

METODO:

- a) En baño con hielo preparar diluciones del plasma testigo y del plasma problema 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 en regulador de fosfatos.
- b) En una serie de tubos de 10x75 mm. en baño con hielo - introducir sucesivamente: 01 ml. de plasma bovino, ---- 0.05 ml. de plasma testigo o problema de las diferentes diluciones y 0.05 ml. de la solución de estreptoquinasa.
- c) Añadir rápidamente 0.1 ml. de trombina marcando el cronómetro. Agitar, llevar los tubos a baño de 37 grados, verificar la coagulación y vigilar el tiempo de la disolución del coágulo. Anotar los tiempos de la lisis de las diferentes diluciones.

RESULTADOS:

Se considera arbitrariamente como el 100% del Proactivador al tiempo de la lisis del plasma testigo diluido 1/10 y que caen entre 160 y 230 segundos.

Los tiempos obtenidos por las diferentes diluciones de este plasma corresponderán al 100, 50, 25 y 12.5% de Proactivador y permite obtener una curva estándar en papel bi logarítmico anotando los tiempos de la lisis en las ordenadas y los porcentajes del Proactivador en las abscisas. Los valores normales del Proactivador varían entre 80 y - 120%.

12.- MEDICION DE LOS COMPLEJOS SOLUBLES EN PLASMA POR PRECIPITACION CON ETANOL (METODO DE TULLIS) (23), O CON SULFATO DE PROTAMINA (METODO DE KOWALSKI) (24).

PRINCIPIO:

El monómero de la fibrina y los fragmentos X y Y forman complejos solubles con el fibrinógeno que se disocia en presencia del etanol o con sulfato de protamina formando geles y precipitados varios. A este fenómeno se le conoce como "Paracoagulación" y es útil su práctica en los Síndromes de Coagulación Intravascular Diseminada con fibrinolisis secundaria y también en la fibrinolisis primaria.

REACTIVOS:

- a) Plasma citratado obtenido igual que para el tiempo de protrombina pero con centrifugación de la sangre a temperatura ambiente.
- b) Hidróxido de Na 0.1 N.
- c) Sulfato de Protamina al 1% en regulador TRIS.
- d) Regulador TRIS-Na Cl pH 7.3
- e) Etanol al 50% preparado extemporáneamente.

METODO: Con el Etanol.

a) A temperatura ambiente agregar a un tubo de 10x75 0.9 ml. de plasma problema y practicar lo mismo con un plasma testigo.

b) 0.1 ml. NaOH 0.1N

c) 0.3 ml. de etanol y esperar un minuto.

Si aparece un gel se toma el resultado como positivo comparando con la negatividad del testigo normal.

d) Si aparece un gel tardío se agregará 0.1 ml. de NaOH y se disolverá el gel, si éste no es específico, y se tomará como resultado negativo.

METODO: Con el Sulfato de Protamina.

a) Depositar en un tubo de 10x75 0.9 ml. de plasma problema y repetir lo mismo para un plasma testigo.

b) 0.1 ml. de sulfato de Protamina, agitar suavemente y leer a los 5 y 30 minutos la aparición de un gel que se tomará como positividad para la prueba.

Se pueden hacer también diluciones seriadas 1:5, 1:10, - 1:20 y 1:40 del sulfato de Protamina en el mismo regulador TRIS NaCl, y de cada dilución agregar 0.2 ml. a 0.2 ml. de plasma y dejar 30 minutos a temperatura ambiente. Se calificarán las positivities como sigue: g-gelación, fs-filamentos de fibrina, P-precipitado y O-solución -- clara.

Nota: el plasma en estudio nunca se debe dejar a 4 grados por fácil precipitación de los complejos y error de la prueba.

II.- DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

TABLA I. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE COAGUACION Y FIBRINOLISIS EN 7 CASOS DE LEUCEMIA PROMIELOCITICA

	CASO 1 Fem. 26			CASO 2 Masc 73			CASO 3 Masc 10			CASO 4 Masc 68	
Cuenta plaquetas x mm ³ x 10 ³	20	30	40	40	30	20	60	20	20	15	20
Factor V %	56	100	100	80		100	100	100	100	65	87
Factor VII y X %	67	100	50	59		59	77	55	46	62	57
Factor II %	82	100	100	66		75	70	100	100	80	82
Factor VIII %				120		280	30	140	150	210	200
Factor IX %				175		330				150	130
Tiempo Trombina(segundos).	21/19	19/17	20/18	15/14		17/15				15/15	
Fibrinògeno(mm./100 ml)	125	215	550	170		400	150	150	330	260	260
Productos Deg.Fibrin. mcg./ml.	38	54	108	76		153	64	256	12	140	76
Lisis euglobulinas Plasm. Hs.	2.15	4	4	4		4	4	3	4	4	
Plasminògeno unid.case- fina. Proactivador %	1.1	1.35	1.6			1.4		1.5	2.4	1.2	
Comp.Sol. Etanol.	neg.	+	+	+		+	neg.	+	neg	+	neg.
Comp.Sol. Protamina	neg. precip.						neg. prec.neg		+	precip.	
TRATAMIENTO	Rubidomicina Transf.leucocit.			Rubidomicina Conc.plaq.		Rubidomicina Fibrinòg. Conc.plaq.		Rubidomicina Transf.leuc. Sangre.			

TABLA I (CONTINUACION) RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE COAGULACION Y FIBRINOLISIS EN
7 CASOS DE LEUCEMIA PROMIELOCITICA.

ESTUDIOS PRACTICADOS Y RESULTADOS.	CASO 5 Masc. 43			CASO 6 Masc. 8			CASO 7 Masc. 39	
Cuenta plaquetas por mm ³ .x10 ³	30	50	12	65	80	22	25	
Factor V %	37	100	100	52	53	55	39	
Factor VII y X %	80	100	77	100	85	65	70	
Factor II %	80	100	87	80	72	40	100	
Factor VIII	180	108	200	115	-	-	-	-
Factor IX	-	-	-	-	-	-	415	570
Tiempo Trombina segundos	17/16	16/15	18/17	19/15	30/16	22/16	27/19	
Fibrinógeno mg./100 ml.	335	250	210	110	80	250	85	66
Prod.Degrad.Fibrinóg.-Fibrina mcg./ml.	281	64	9	64	32	4	307	150
Lisis Eug.Plasm. Horas	3.0	4	4	2	1.15	3	4	
Plasminógeno unid.caseína.	-	-	-	-	-	-	-	-
Proactivador %	70	45	75	-	-	-	-	-
Complejos Solub. Etanol	neg.	neg.	neg.	+	+	neg.	+	neg.
Complejos Solub.Protamina		neg.	prec.	+	precip.	neg.	+	+
TRATAMIENTO	Rubidomicina Heparina Transf.leucoc.			Rubidomicina L-asparaginasa Transf.leucoc.			Rubidomicina L-asparaginasa Hepar.T.Leuc.	

TABLA II PERFILES HEMATOLOGICOS INDIVIDUALES EN 33 CASOS DE PACIENTES TOXEMICAS

NUM. CASO	EDAD	CTA.PLAQ. por ₃ mm ³ x10	FIBRINOLOG. mg/100ml.	TP		TPTA		TT		Prota mina	Eta- mol	LISIS EUGLO BUL.
				Prob. segundos	Cont. segundos	Prob. segundos	Cont. segundos	Prob. segundos	Cont. segundos			
1	15	143	270	11.8	12.0	35.0	38.0	22.5	15.5	+	-	-
2	16	127	D	D	D	59.0	45.0	16.0	15.0	+	-	D
3	17	63.5	460	13.2	13.4	47.0	46.0	13.0	13.8	+	-	-
4	17	230	330	12.4	13.0	33.0	47.0	19.0	19.0	+	-	-
5	18	142	460	12.2	12.8	27.5	27.0	29.0	18.0	+	+	-
6	18	135	380	11.5	13.4	27.0	33.0	22.0	16.5	-	-	-
7	19	263	433	13.0	13.0	46.0	34.0	25.8	20.0	-	-	-
8 *	19	75	275	13.5	12.8	43.5	40.0	21.8	14.8	+	-	+
9	21	220	183	11.2	10.5	45.0	45.0	21.0	18.5	+	+	-
10*	21	36	320	14.0	12.8	35.0	39.5	52.0	19.0	-	+	-
11	22	185	220	12.5	13.0	35.0	40.0	15.4	16.5	+	+	+
12	22	78	550	11.8	13.4	27.0	30.5	24.5	16.0	-	-	-
13	23	94	300	14.0	13.5	47.0	40.0	25.0	18.5	-	-	-
14	23	44	197	17.0	11.0	46.5	32.0	23.4	17.0	+	-	-
15	23	29	300	12.4	13.2	34.0	37.0	26.0	17.5	-	-	-
16	24	134	D	12.0	12.2	40.0	47.0	29.0	20.0	-	-	-
17	25	105	125	15.0	12.5	40.0	40.0	30.0	16.0	+	-	-

*= Defunción

D= Desc onocido

O= Fibrinógeno no medible, sumamente bajo

TABLA I I PERFILES HEMATOLOGICOS INDIVIDUALES EN 33 CASOS DE PACIENTES TOXEMICAS

NUM. CASO	EDAD	CTA. PLAQ por 10^3 mm ³	FIBRINOG. mg./100ml.	TP		TPTA		TT		Protamina	Etanol	LISIS EUGLO BUL.
				Prob.	Cont.	Prob.	Cont.	Prob.	Cont.			
18	26	263	550	11.6	11.8	31.0	39.4	17.4	15.0	-	-	-
19	27	72	300	10.8	12.8	40.0	35.0	15.0	20.0	-	-	-
20*	27	290	D	13.2	13.2	30.0	39.0	20.0	16.8	+	-	D
21	27	98	220	13.2	13.0	34.0	42.0	25.0	18.0	+	+	-
22*	29	49	133	16.5	13.0	35.0	40.0	55.0	20.0	+	-	+
23*	32	160	370	12.2	12.4	43.0	34.0	20.5	18.0	+	-	-
24	32	30	140	18.8	11.8	55.0	36.8	13.4	15.0	+	+	+
25*	32	76	320	12.8	12.2	46.0	39.0	30.6	21.6	+	+	-
26*	33	23,7	433	14.0	12.5	41.0	36.5	55.5	18.5	-	-	-
27	34	153	590	16.0	12.2	43.0	39.3	20.5	14.5	+	-	-
28	34	70	240	D	D	D	D	29.0	14.0	+	-	-
29	34	49	495	11.8	13.4	35.4	33.0	19.5	17.2	-	-	-
30	39	55	150	15.5	13.2	57.0	48.0	23.5	16.0	+	-	-
31	39	86	116	11.9	11.0	27.4	27.0	55.0	23.0	-	-	+
32	41	125	0	18.0	12.0	72.0	33.0	45.0	21.0	+	0	D
33*	42	69	0	20.0	13.0	103.0	35.0	20.5	16.0	+	0	-

* = Defunción

D = Desconocido

0= Fibrinógeno no medible, sumamente bajo.

TABLA III PRINCIPALES DATOS CLINICOS, HEMATOLOGICOS Y MORFOLOGICOS EN LAS OCHO MUERTES MATERNAS DEL ESTUDIO.

NUM. CASO	EDAD	DIAGNOSTICO		HS.POST MORTEM	CAUSA PRINCIPAL DE MUERTE.	LESION GLO-MERULAR TOXEMICA	CAPILARES		NECROSIS HEMORRAGICA PERIPORTAL
		CLINICO	HEMATOLOGICO				Fibrina riñón	Trombos en pulmón	
8	19	EA	D	NO	Hemorragia + cerebral	-	-	-	-
10	21	EA	C	NO	Hemorragia + cerebral	-	-	-	-
20	27	T/H	SC	3.0	Hemorragia cerebral	intensa	No	Sí	No*
22	29	T/H	D	5.3	Hemorragia cerebral	intensa	No	No	Marcada
23	32	EP/H	D	1.0	Bronconeum.	intensa	No	Sí	Marcada
25	32	EA/H	SC	1.5	Hemorragia cerebral	intensa	No	Sí	Sí
26	33	EP	SC	1.0	Hemorragia cerebral	intensa	No	No	Sí
33	42	T	D	2.2	Ruptura hepática	intensa	No	Sí	Marcada

A = anteparto P = postparto E = Eclampsia H = Hipertensión crónica

T = toxemia C = Coagulac. Intravascular Compensada D = Coagulac. Intravas. Descompensada

SC = Coagulación Intravascular Sobrecompensada. * = Cambios degenerativos periportales unicamente

+ = Diagnóstico Clínico

TABLA IV. CARACTERISTICAS INDIVIDUALES DE LOS PERFILES HEMATOLOGICOS DE 15 CASOS DE MOLA HIDATIDIFORME.

CASO	EDAD	TIEMPO DE TOMA DE MUESTRAS.		ASPECTO DEL PLASMA.	HEMATOCRITO. %	PLAQUETAS x 10 ³ mm ³	FIBRINOGENO. mg./100ml	TP		TPTA	
		Antes de evacuación	Después de evacuación					Prob. segundos	Cont. segundos	Prob. segundos	Cont. segundos
1	23	49		Ictérico	31	274	350	13.5	12.8	28.2	32.0
		3		Normal	30	201	510*	12.8	12.6	31.5	34.0
2	29	25		Normal	33	178	350	12.5	11.5	31.4	34.0
		0.5		Normal	35	165	350	11.5	12.4	40.0	42.5
3	41		2.5	Normal	32	170	345	11.8	12.4	39.0	42.0
		24		Normal	39	209	320	12.4	13.1	30.0	42.0
4	21		1.3	Normal	38	180	300	12.6	13.0	31.2	31.9
		7 días		Normal	38	244	330	13.0	12.0	31.0	43.5
5	26	48		Normal	31	269	400	13.6	12.9	31.6	30.7
			2.0	Normal	30	210	360	13.6	13.0	31.5	40.0
6	22	23		Normal	32	190	445	13.4	12.4	31.3	36.0
			2.0	Normal	32	226	372	13.2	12.2	29.8	41.6
7	26	3		Normal	28	226	580*	13.2	14.2	31.0	38.5
8	27	0.3		Normal	39	169	400	13.4	12.8	32.4	34.5
			2.0	Normal	37	139	400	13.5	12.8	30.0	34.5

* = Anormal | = Prolongado | = acortado %Tiempo de toma de las muestras excepto cuando se indicó.

TABLE IV CARACTERISTICAS INDIVIDUALES DE LOS PERFILES HEMATOLOGICOS DE 15 CASOS DE MOLA HIDATIDIFORME.

CASO	EDAD	% TIEMPO DE TOMA DE MUESTRAS.		ASPECTO DEL PLASMA	T _r		Prot.	Eta	LISIS EUGL.	Total de Pruebas alteradas.
		Antes de evacuación	Después de evacuación.		Prob.	Cont.				
		segundos	segundos		min	min				
1	23	49		Ictérico	19.5	18,8	neg.	+	neg	1
		3		normal	17.7	18.5	+	+	neg	3
2	29	25		normal	24.0	18.5	neg	neg	neg	1
		0.5		normal	19.4	13.8	neg	neg	neg	1
3	41	24		normal	15.5	14.5	neg	neg	neg	1
			2.5	normal	21.0	13.8	neg	neg	neg	1
4	21	7 días		normal	18.5	19.0	neg	+	neg	2
			1.3	normal	20.0	15.5	+	neg	neg	2
5	26	48		normal	15.0	13.8	neg	neg	neg	0
			2.0	normal	15.6	15.2	neg	neg	neg	1
6	22	23		normal	18.4	15.0	neg	neg	neg	0
			2.0	normal	19.4	17.0	neg	neg	neg	1
7	26	3		normal	23.0	16.2	neg	neg	neg	3
8	27	0.3		normal	17.0	15.5	neg	neg	neg	0
			2.0	normal	14.4	14.2	neg	neg	+	1

*=Anormal | =Prolongado | =acortado °= Tiempo de toma de las muestras excepto cuando se indicó.

TABLA IV. CARACTERISTICAS INDIVIDUALES DE LOS PERFILES HEMATOLOGICOS DE 15 CASOS
DE MOLA HIDATIDIFORME .

CASO	EDAD	°TIEMPO DE TOMA DE -		ASPECTO -- DEL PLASMA	HEMATO- CRITO. %	PLAQxmm3 x10 ³	FIBRINOg. mg/100ml.	TP		TPTA	
		MUESTRAS.						Prob.	Cont.	Prob.	Cont
		Antes de evacuación	Despuès de evacuación								
9	18	4 Días		Normal	39	221	500*	13.6	12.9	43.0	39.0
			6.0	Normal	34	121	295	12.8	10.8	31.8	34.6
10	34	1		Normal	32	259	330	12.0	13.0	27.5	35.5
11	34	2		Normal	32	388	447	12.8	12.4	34.5	43.9
12	22	39		Ictérico	17	168	300	14.0	12.4	32.0	40.4
		16		Ictérico	27	119	330	14.4	12.8	37.0	37.4
			8.0	Ictérico	25	96*	159*	13.5	13.4	33.0	40.8
13	20	68		Normal	34	265	300	11.5	13.2	36.5	35.0
		48		Normal	32	216	360	12.8	13.6	38.4	45.5
14	20	0.75		Normal	32	114	235	12.6	10.4	41.0	33.8
15	51	24		Ictérico	35	122	400	12.8	12.4	32.7	35.9
		2.5		Ictérico	33	157	420	10.4	11.2	20.0	22.0

*=Anormal | = Prolongado | = acortado ° = tiempo de toma de las muestras excepto cuando se indicó

TABLA IV CARACTERISTICAS INDIVIDUALES DE LOS PERFILES HEMATOLOGICOS DE 15 CASOS DE MOLA HIDATIDIFORME

CASO	EDAD	° TIEMPO DE TOMA DE MUESTRAS.		ASPECTO DEL PLASMA	T T		Protamina.	Eta-nol.	LISIS EUGL.	Total de Pruebas alteradas.
		Antes de evacuación.	Despuès de evacuación.		Prob. segundos	Cont.				
9	18	4 días		Normal	16.5	15.8	neg	neg	neg	1
			6.0	Normal	18.2	14.6	neg	neg	neg	1
10	34	1		Normal	27.8	20.5	neg	neg	neg	2
11	34	2		Normal	12.4	15.0	neg	neg	neg	1
12	22	39		Ictérico	27.4	18.4	neg	neg	neg	2
				Ictérico	25.2	18.0	+	neg	neg	2
			8.0	Ictérico	13.5	18.0	neg	neg	neg	4
13	20	68		Normal	18.5	17.5	+	neg	neg	1
			48	Normal	28.2	20.2	+	neg	neg	3
14	20		0.75	Normal	24.2	17.2	+	neg	+	5
15	51	24		Ictérico	52.5	17.0	+	neg	neg	2
			2.5	Ictérico	26.5	17.4	neg	neg	neg	1

*= Anormal | =Prolongado | =acortado ° =Tiempo de toma de las muestras excepto cuando se indicó.

TABLA V. RESULTADOS DE LOS PERFILES HEMATOLOGICOS INDIVIDUALES EN CUATRO CASOS DE MOLA HIDATIDIFORME EN MUESTRAS DE SANGRE DE VENAS UTERINAS Y DE - SANGRE DE VENA PERIFERICA.

CASO	EDAD	MUESTRA DE SANGRE DE VENA	HEMATOCRITO	TP		TPTA		TT		Plaq. $\times 10^3$	Fibrinógeno mg./100 ml.
				segundos	Prob.	segundos	Prob.	segundos	Prob.		
1	48	uterina	32	11.6	11.5	31.2 ^a	38.0	18.0 ^p	14.0	91.5 ^d	460
		periféric.	34	11.6	11.5	32.2 ^a	38.0	19.0 ^p	14.0	103 ^d	510 ^p
2	45	uterina	39	10.8	11.4	35.5 ^a	49	18.4	15.5	176	345
		periféric.	38	10.5	11.4	36.7 ^a	49	19.0 ^p	15.5	158	370
3	42	uterina	35	12.2	11.0	42.5	43	27.8 ^p	15.0	278	633 ^p
		periféric.	35	12.4	11.0	41.0	43	26.0 ^p	15.0	239.5	600 ^p
4	36	uterina	39	11.4	11.6	37.0 ^a	42	23.0 ^p	15.4	218	230
		periféric.	40	11.2	11.6	39.0	42	21.0 ^p	15.4	220	300

TP = Tiempo Protrombina TPTA=Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado

T T= Tiempo Trombina

a = acortado d= disminuída p= prolongado c= aumentado

TABLA V. CONTINUACION. RESULTADOS DE LOS PERFILES HEMATOLOGICOS EN - - -
 CUATRO CASOS INDIVIDUALES DE MOLA HIDATIDIFORME EN MUESTRAS DE SANGRE
 DE VENAS UTERINAS Y DE SANGRE DE VENA PERIFERICA.

CASO	EDAD	MUESTRA DE SANGRE	FACTORES DE LA COAGULACION %			
			II	V	VII	X
1	48	uterina	108	51	116	94
		periférica	104	51	132	100
2	45	uterina	136	136	400	184
		periférica	112	90	280	104
3	42	uterina	110	86	150	88
		periférica	88	89	144	106
4	36	uterina	205	-	110	108
		periférica	200	-	124	106

II.- DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

1.- DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRABAJO DENOMINADO "ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE UN ESTUDIO PROSPECTIVO DE LAS ALTERACIONES DE LA COAGULACION Y FIBRINOLISIS EN LEUCEMIAS PROMIELOCITICAS"

Este estudio comprende los resultados de las pruebas de la hemostasis en siete casos de leucemia promielocítica. Al parecer su número es corto, pero al tener en cuenta que su frecuencia no es alta y la reunión de estos casos para su estudio abarcó casi un año, el grupo estudiado, por lo tanto, no es tan pequeño, como aparece a primera vista.

En los resultados de los estudios de la hemostasis del primer caso, se revela una hipofibrinogenemia importante, discreta tendencia fibrinolítica y aumento moderado de los productos de degradación del fibrinógeno. Sin tratamiento específico con heparina (por la baja importante de plaquetas), se observa un ascenso del fibrinógeno, pero con positividad de los complejos solubles. Posteriormente se observa otra nueva alza de ese factor aun cuando hay un aumento algo importante de los productos de degradación del fibrinógeno y positividad de los complejos solubles (Tabla I). La paciente de este caso se egresa del hospital por mejoría después de un mes de estancia.

En el caso 2, los estudios de coagulación muestran al principio una hipofibrinogenemia moderada, aumento de los productos de degradación del fibrinógeno y complejos solubles positivos al etanol. Con la quimioterapia única y esteroi

des (no se administró heparina por la edad), (Tabla I), - se observa un ascenso notable del fibrinógeno, pero los - productos líticos del mismo permanecen altos y existe po- sividad a los complejos solubles.

Se observan algunas modificaciones de los factores del -- complejo protrombínico consistentes en ascenso de sus con centraciones, así como de los factores antihemofílicos -- VIII y IX, pero la cifra de plaquetas permaneció alrede - dor de 20,000. El paciente fallece en el curso de un mes de evolución del padecimiento.

En el caso 3 observamos dos fases en la evolución de las pruebas de coagulación. A su ingreso existe trombocitope - nia, hipofibrinogenemia y presencia de complejos solubles en el plasma. Clínicamente hubo hemorragias cutáneas y - meníngicas. Las transfusiones plaquetarias y de fibrinóge - no asociadas con la heparina originaron mejoría hematoló - gica y clínica. Se observa un ascenso del fibrinógeno - (Tabla I), desaparición de los complejos solubles, pero - persisten discretamente elevados los productos de degrada - ción del mismo. La remisión fue transitoria y al parecer una crisis de aplasia y datos de infección originan san - grado y el paciente fallece.

El caso 4 muestra desde el ingreso datos hemorrágicos y - las pruebas de coagulación señalaron fibrinógeno con con - centración normal, productos de degradación del mismo ele - vados y complejos solubles positivos. El enfermo tradujo poca respuesta de mejoría en las pruebas de coagulación a pesar del tratamiento instituido y fallece después de cin - co días de evolución.

El caso 5 presenta dos fases distinguibles en la evolu -

ción de las pruebas de hemostasis: en la primera ocurre una trombocitopenia importante 24 horas después de inicia da la quimioterapia, elevación de los productos de degradación del fibrinógeno, disminución del Factor V, así como del nivel del Proactivador. Se instituye la heparina. En una segunda fase aparecen nuevas alteraciones consistentes en aumento de los productos de degradación del fibrinógeno y disminución de este último, así como descenso de los Factores II, VII y X. Todo esto va asociado a un cuadro infeccioso agregado del cual se recupera el paciente y es dado de alta por mejoría después de un mes de estancia en el hospital.

En el caso 6, se observan también dos fases en las pruebas de coagulación. En la primera una trombocitopenia, disminución moderada del Factor V, hipofibrinogenemia importante y tendencia fibrinolítica subaguda. Pruebas del etanol y de la protamina positivas (Tabla I). Se obtiene una mejoría después del tratamiento con heparina donde se inicia la segunda fase al aumentar el fibrinógeno, disminuir los productos de degradación del mismo, pero permaneciendo aún bajas las concentraciones de los Factores II, V, VII y X.

El aumento observado en las plaquetas se relaciona con las transfusiones de estas células. Aparecen posteriormente signos hemorrágicos y el paciente es trasladado a otro hospital después de desarrollar una hemorragia cerebromeningea.

El caso 7 revela a un paciente con síndrome hemorrágico al ingreso, déficit del Factor V, hipofibrinogenemia importante, concentración alta de los productos de degradación del fibrinógeno y complejos solubles positivos.

Mejora al administrarle heparina y transfusiones de plaquetas y los productos de degradación del fibrinógeno disminuyen. Se negativizan los complejos solubles pero el paciente fallece con hemorragia de tubo digestivo después de 4 - días de estancia hospitalaria.

2.- DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRABAJO DENOMINADO "ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE UN ESTUDIO PROSPECTIVO DE LAS ALTERACIONES DE LA COAGULACION Y FIBRINOLISIS EN GESTOSIS"

Este estudio incluye los resultados de las pruebas de la hemostasis (Coagulación y Fibrinólisis) en tres grupos de pacientes con gestosis:

2.1.- Coagulación y Fibrinólisis en Eclampsia (33 casos).

2.2.- Coagulación y Fibrinólisis en Embarazo Molar.

2.3.- Perfiles de Coagulación y Fibrinólisis en sangre de venas uterinas y periféricas en embarazo molar.

2.1.- Coagulación y Fibrinólisis en Eclampsia.

Descripción de los Resultados.

En el embarazo en estudio, cinco pacientes presentaron una toxemia agregada (es decir, antecedente de enfermedad con daño vascular más toxemia), una de las cuales presentó ruptura de hígado. Dos tuvieron eclampsia anteparto y dos postparto. Ocho pacientes murieron, y la mitad de estas muertes se presentaron en el pequeño grupo de pacientes con enfermedad subyacente previa.

EDAD.- El valor promedio fue de 26.4 años \pm 7.7 La edad gestacional promedio fue de 35.5 semanas \pm 5.6 Tres pacientes ingresaron al hospital con producto muerto y una de ellas murió con el producto in útero. Se atendieron para evacuación del útero por medio de parto 11 pacientes, y 21 por operación cesárea.

Los estudios que integraron el perfil de coagulación y fibrinólisis se refieren en la página 41-B, así como la metodología

utilizada en esos ensayos.

Los resultados de esa serie de estudios individuales se en-
globan en la Tabla II.

TIEMPO DE TOMA DE LAS MUESTRAS	
PREPARTO O PRECESAREA	POSTPARTO O POSTCESAREA
1 caso 2.8 horas	4 casos entre el primero
10 casos con promedio de 6.9 hr.	y segundo día
17 casos con promedio de 9.4 hr.	
1 caso 22 días	
DURACION DEL ESTUDIO: UN AÑO.	

PLAQUETAS: La cuenta promedio fue de $113,401 \pm 71,521/\text{mm}^3$
Existieron 14 casos con cuentas por debajo de 75,000 y con-
taron para 5 de las 8 muertes maternas.

FIBRINOGENO: Se obtuvo un valor promedio de 288.7 ± 171.2
mg/100 ml. Existieron 9 casos con fibrinógeno abajo de -
200 mg., incluyendo dos casos con una concentración tan ba-
ja que no pudo ser medida. Seis de los casos con fibrino-
genopenia presentaron también cuentas de plaquetas menores
de $75,000/\text{mm}^3$.

TIEMPO DE PROTROMBINA: El valor promedio de esta prueba -
fue de 13.7 ± 2.3 segundos, contra 12.6 ± 0.8 segundos-
de los plasmas controles. Este tiempo se encontró prolon-
gado al menos en 4 segundos con respecto a su control en
4 casos (promedio 6.5 segundos). Tres de ellos tuvieron
plaquetas inferiores a $75,000/\text{mm}^3$ y fibrinógeno menor de
200 mg/ml. en cuatro casos, y uno de ellos incluyó a una
ruptura de hígado.

TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA: Esta prueba -
dio un valor promedio de 42.5 ± 14.8 segundos, contra un

valor promedio del testigo de 38.1 ± 5.4 segundos. En 12 casos se obtuvo un resultado con este tiempo por lo menos de 5 segundos más prolongado que su control, y en otros 8 cinco segundos más corto que el testigo (Tabla II).

TIEMPO DE TROMBINA: Se realizó en las 33 pacientes con un resultado promedio de 26.7 ± 11.9 segundos, contra un valor promedio de 17.5 ± 2.3 segundos del plasma control, es decir, existió una diferencia promedio de 9.2 segundos.

En 22 casos se encontró prolongada esta determinación por lo menos en cuatro segundos más que el control (diferencia promedio de 13.6 segundos). En siete pacientes se encontraron tiempos de trombina al menos 15 segundos más prolongados que el testigo (diferencia promedio de 27.3 segundos). De este último grupo, cinco estudios tuvieron cuenta de plaquetas por debajo de 75,000 cuatro con nivel de fibrinógeno inferior a 200 mg., dos con tiempo parcial de tromboplastina activada prolongado y tres acertado.

COMPLEJOS SOLUBLES

PROTAMINA: Veintiuna de las 33 determinaciones fueron positivas con sulfato de protamina, y simultáneamente seis de ellas dieron positividad al etanol.

LISIS DE EUGLOBULINAS PLASMATICAS: En cinco casos se encontró actividad fibrinolítica aumentada (antes de 90 minutos). Se consideró como normal igual o mayor a 3 horas.

ESTUDIOS NECROPSICOS: En esta serie se practicaron las necropsias en las ocho defunciones, cuyos hallazgos en algunas de ellas fundamentan los resultados de las pruebas de coagulación y fibrinolisis anormales encontrados.

2.2.- Coagulación y Fibrinolisis en Embarazo Molar.

2.3.- Perfiles de Coagulación y Fibrinolisis en sangre de venas uterinas y periféricas en embarazo molar.

La descripción de los resultados obtenidos en el estudio de coagulación y fibrinolisis en estos dos grupos de pacientes se realiza simultáneamente, por tratarse de un estudio desarrollado en material proveniente de enfermas con el mismo tipo de gestosis, con la diferencia importante de que en la primera serie las muestras procedieron exclusivamente de sangre periférica, y en el segundo grupo los plasmas tuvieron doble origen: 1) de sangre obtenida de venas útero-ováricas durante la cirugía, y 2) de sangre periférica de vena antecubital obtenida al mismo tiempo que la anterior.

GRUPO 2 .1.- Comprendió 15 casos con mola hidatidiforme y edades gestacionales que variaron de 10 a 28 semanas, promedio 16.33 ± 5.56 semanas.

EDAD: Varió de 18 a 51 años, promedio 27.60 ± 9.0 años.

Los perfiles hematológicos de coagulación y fibrinolisis se practicaron en 14 casos en etapa prelegrado e incluyeron 19 estudios. En etapa postlegrado se estudió a una paciente con un perfil, y a 7 pacientes de la etapa prelegrado se les practicó también estudios postlegrado.

TIEMPO DE TOMA DE LAS MUESTRAS: Varió de 30 minutos a 7 días antes del legrado, y en el postlegrado de menos de una hora a 8 horas.

GRUPO CONTROL: Además de las muestras de plasma testigo obtenidas de banco de sangre, con las que simultáneamente se practicaron los perfiles hematológicos de las pacien -

tes, se contó con plasma proveniente de un grupo voluntario de 10 mujeres embarazadas del personal del hospital - con edades gestacionales muy parecidas. Este grupo sirvió, por lo tanto, como control.

TIEMPO DE DURACION DEL ESTUDIO: Nueve meses.

GRUPO 2.2.- Incluyó cuatro casos con embarazo molar en un tipo especial de pacientes seleccionadas, como sigue:

EDAD GESTACIONAL: Mayor que en el grupo anterior, y varió de 16 a 35 semanas, promedio 23.50 ± 8.8 semanas.

EDAD: Se prefirió que el grupo estuviese integrado por pacientes añosas con paridad satisfecha y determinaciones hormonales de gonadotrofinas coriónicas muy altas, de tal modo que al existir el peligro de malignización a un corio carcinoma, hubiera la indicación de histerectomía total abdominal con consentimiento previo de la paciente. Por ese motivo se requirió de un tiempo mayor que fue de un año, para poder integrar ese grupo pequeño de pacientes con las características mencionadas.

TIEMPO DE TOMA DE LAS MUESTRAS: Se realizó transoperatoriamente en la histerectomía total abdominal. Se tomaron simultáneamente dichas muestras de venas antecubitales y de venas útero-ováricas.

Los estudios de coagulación y fibrinolisis realizados en estos dos grupos de pacientes (2.1 y 2.2) se mencionan en la página 41-B, así como la metodología y sus características anotadas en el capítulo correspondiente.

RESULTADOS: Para las dos series estudiadas aparecen en las Tablas IV y V, respectivamente.

PLAQUETAS: en el estudio 2.1 el resultado promedio prelegrado fue de 199,852 + 11,903 /mm3. y en el grupo control de 234,000+24,852/mm3, es decir que la diferencia no fue importante. Se observó un descenso de un 21.4% en el resultado promedio de la etapa postlegrado de este grupo y que fue de 157,000+16,604 /mm3 (p < 0.025).

En el estudio 2.2 en sangre periférica y de venas útero-ováricas los resultados mostraron valores promedios discretamente más bajos que el de la etapa prelegrado del estudio 2.1, 180,000+61,900 y 190,000 + 78,580/mm3 respectivamente.

FIBRINOGENO: los resultados promedio de los dos grupos 2.1 y 2.2 mostraron datos que revelan una hiperfibrinogenemia en el segundo, con valores altos para la edad gestacional en que se realizó el estudio y que fueron de 445 +135.2/100 ml. en sangre periférica y 414+ 171 mg/100 ml. en sangre de venas útero-ováricas. En el caso del grupo 2.1 prelegrado, la media tendió a ser también alta para dicha edad gestacional, aunque el grupo control gestante dió un valor similar o cercano de 376+22.7 mg./100 ml. y el prelegrado de 366+16.5mg./100 ml., en este grupo hubo tres casos con fibrinógeno mayor de 500 mg./100 ml. (Tablas IV y V).

En la etapa postlegrado del grupo 2.1, se observó un descenso de un 15.8% con respecto al valor promedio de la etapa prelegrado, el valor promedio de dicha etapa postlegrado fué de 308+28.1 mg/100 ml. En esta última etapa existió un sólo caso con hipofibrinogenemia de 159 mg./100 ml. (caso 12).

TIEMPO DE PROTROMBINA: no se observaron diferencias notables entre los tres grupos, 2.1, 2.2 y el control, con valores promedios de : 12.86/12.54 y 12.9 segundos en las etapas pre y postlegrado, 12.8/12.5 en el control, 11.5/11.38 en sangre periférica transcurugía y -- 11.43/11.38 en venas útero-ováricas durante esa etapa.

TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA: las características fundamentales en los resultados de esta prueba en los dos grupos en relación al plasma testigo y al del grupo control gestante fueron acortamientos importantes de 4 a 5 segundos a favor de los plasmas - problemas como se observa por ejemplo en los valores promedios de 32.9/37.1 y 33.3/37.3 segundos en las etapas pre y postlegrado - -

del grupo 2.1 comparados con los valores promedio de 33.6/35.9 segundos del grupo control.

TIEMPO DE TROMBINA: un alargamiento importante en los resultados promedio de este ensayo en los plasmas problema, fue el hallazgo en los dos grupos comparado contra el plasma testigo y el control gestante. El valor promedio de la etapa prelegrado fueron 21.6/16.6 segundos y en la embarazada normal de 17.6/15.9 segundos. En el grupo 2.2 - con sus componentes central y periférico, los resultados mostraron alargamientos similares.

COMPLEJOS SOLUBLES: Protamina y etanol. Existieron cuatro positividades al sulfato de protamina en la etapa prelegrado del grupo 2.1 y dos en la postlegrado. Existieron pocas positividades a la prueba del etanol.

LISIS DE EUGLOBULINAS PLASMATICAS: Se encontró escasa respuesta lítica global en este seguimiento.

DOSIFICACION DE LOS FACTORES II, V, VII y X: éstos se determinaron en 7 casos en la preevacuación uterina y otra en la postevacuación. Asimismo se determinaron en 6 casos de las gestantes normales entre la décima y vigésima semana. En el grupo problema 2.1 se encontraron valores más altos que en el control, particularmente en el Factor VII cuya concentración en un caso llegó al 384%. Contrariamente el Factor V permaneció en valores bajos, alrededor de 44% y en el grupo control 47%.

En el grupo 2.2, los factores II, VII y X volvieron a mostrar concentraciones altas y destacó de nuevo el Factor VII. En el Factor V, su concentración mostró un ascenso moderado con respecto a los valores encontrados en el grupo 2.1 tanto en sangre periférica como central.

(Tabla V).

III.- DISCUSION

1.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL PRIMER ESTUDIO: "COAGULACION Y FIBRINOLISIS EN LEUCEMIAS PROMIELOCITICAS"

Los siete casos referidos anteriormente correspondieron a los criterios hematológicos habituales de leucemias promielocíticas, pero se discutirán aquí únicamente las diversas pruebas de coagulación y fibrinólisis realizadas.

En los casos 1, 2, 3, 6 y 7, el valor de las pruebas practicadas fue innegable, ya que por sí solas dan un diagnóstico de una Coagulación Intravascular Diseminada, cuyo tratamiento por la heparina se vio limitado por la baja de plaquetas secundaria a la leucemia en sí. Pero al encontrar en dos casos (4 y 5), algunos cambios no entendibles como valores normales de los Factores II, V, VII y X, así como un aumento del Factor VIII, más descenso del Proactivador, nos parecería de gran ayuda que el diagnóstico podría descansar esencialmente en el estudio del sistema fibrinolítico y los derivados del fibrinógeno (productos de degradación y complejos solubles).

En el análisis de 5 de los 7 casos estudiados en este aspecto, el tiempo de lisis de euglobulinas habitualmente fue normal (casos 2, 3, 4, 5 y 7) y en los dos restantes se observó un aumento de la actividad lítica, la cual desapareció en 24 horas con el tratamiento por heparina, justificando la hipótesis de una lisis secundaria reaccional que habitualmente se presenta en los Síndromes de Coagulación Intravascular Diseminada. La tasa del Proactivador se encontró igualmente disminuída en todos los casos donde se midió, y esta disminución fue idéntica en presencia o en ausencia de

la actividad fibrinolítica global medida por la lisis de euglobulinas, hecho que ya ha sido mencionado previamente por Merskey y colaboradores (25).

De otro modo, los productos de degradación del fibrinógeno no constantemente se encontraron elevados en todos los casos y sufrieron cambios después del tratamiento con heparina. La presencia de los complejos solubles en el plasma en 6 de los 7 casos (1, 2, 3, 4, 6 y 7), y la probable positividad en el restante (5), significa que la activación de la coagulación, cualquiera que sea su mecanismo y que conduce a la formación de la trombina, ha permitido la aparición en la sangre circulante del monómero de la fibrina, el cual es un constituyente indispensable de los mencionados complejos. Por lo tanto, su evidencia autoriza el diagnóstico de Coagulación Intra-vascular, aun en el caso 5 donde además existió una hipofibrinogenemia moderada aparte del discreto precipitado con la protamina.

Debe hacerse notar, sin embargo, que la interpretación de esta prueba puede ser delicada, como lo señalan Breen y Tullis (23), el examen debe practicarse lo más rápidamente posible después de la toma del producto sin diferirlo no después de dos horas.

Otro punto discutible en este tipo de estudios se presenta ante la aparición de una hipofibrinogenemia y su posible mecanismo de producción. Su frecuencia en las leucemias promielocíticas es importante y en ella debe descartarse un problema de síntesis del fibrinógeno en el hígado cuando aparece dicha alteración durante el curso del tratamiento con la L-asparaginasa. El cuadro biológico -

observado en efecto, es diferente, encontrándose una hipofibrinogenemia aislada, sin aumento de los productos de degradación del fibrinógeno en el suero y las pruebas del -- etanol y de la protamina negativas. Se han descrito las -- posibilidades de síndromes fibrinolíticos primarios en estos casos (26).

El mecanismo más frecuente reportado de la hipofibrinogenemia en la leucemia promielocítica es el de una Coagulación Intravascular, y que en esta casuística pareció ser con -- temporánea a la fase inicial de la afección y a la citolisis inducida por la quimioterapia, teniendo en cuenta la -- riqueza de las células leucémicas en enzimas proteolíticas (27). Quigley (28), ha demostrado en particular la existencia de un factor tromboplástico presente en las células de las leucemias promielocíticas, que pudiera ser capaz de activar e iniciar la coagulación in vivo.

2.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO 2.

Los hallazgos dominantes en este estudio fueron grados diferentes de trombocitopenia, niveles anormales de fibrinógeno, que incluyeron valores inferiores a lo normal para la edad gestacional promedio que portaban las pacientes - toxémicas y eclámpticas. El tiempo de trombina prolongado que se encontró, no corrigió con la adición de plasma normal, revelando por lo tanto, la presencia de un probable inhibidor (productos líticos de la fibrina)(29) Las -- pruebas de complejos solubles mostraron la presencia in vivo del monómero de la fibrina y de productos de degradación del fibrinógeno.

Este conjunto de alteraciones difiere marcadamente de --- aquellos cambios típicos en la coagulación materna en los casos de desprendimiento prematuro de placenta y de los - síndromes de feto muerto y retenido por largo tiempo, que son lo. modelos clásicos obstétricos de Coagulación Intra vascular Diseminada rápida (forma aguda) y Coagulación In travascular Crónica (forma lenta). Sin embargo, el mecanismo de acción y su consecuencia básicamente son los mis mos: el consumo de las plaquetas y del fibrinógeno en la microvasculatura formando los depósitos de fibrina, hemo rragias múltiples y disminución de los órganos afectados.

Para algunos autores, se ha implicado la Coagulación Intra vascular Diseminada (30) en la génesis de la eclampsia y preeclampsia, y para otros, la tromboplastina o factor tisular liberado de la placenta dañada, invade la circula ción materna a diferentes velocidades, para producir una coagulación intravascular lenta, o sea la encontrada en - la preeclampsia, o la rápida, la observada en la eclampsia.

Los hallazgos de las ocho necropsias con los depósitos de fibrina en pulmón en algunos casos y la necrosis hemorrágica periportal, más la ruptura hepática que revela las microtrombosis y hemorragias en ese órgano, ofrecen datos que fundamentan el diagnóstico en sangre de Coagulación Intravascular Diseminada, donde las enzimas, trombina y plasmina, activadas en forma muy anormal, conducen por un lado la primera, a la formación de monómeros de la fibrina, y por otro, la plasmina a la degradación proteolítica del fibrinógeno y de la fibrina con resultados de sangrados.

La evidencia de esa actividad estuvo dada por pruebas tan sencillas como la cuantificación del fibrinógeno en las condiciones de ensayo debidas, en la determinación del tiempo de trombina, de las pruebas de paracoagulación (etanol y protamina) y en forma agregada la cuenta de plaquetas.

3.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL TERCER ESTUDIO. COAGULACION Y FIBRINOLISIS EN EMBARAZO MOLAR.

4.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LOS PERFILES DE COAGULACION Y FIBRINOLISIS EN SANGRE DE VENAS UTERINAS Y PERIFERICAS EN EMBARAZO MOLAR.

La discusión de los resultados de estos dos estudios se realiza al igual que en la descripción de sus resultados, en forma simultánea por los motivos expuestos en ese inciso. (material de estudio muy similar pero con diferencias que permiten hacer una comparación de utilidad, ya que no existen datos en la literatura mundial de este tipo de estudios con muestras tomadas a nivel de venas uterinas).

Dos alteraciones fundamentales se encontraron en estos estudios: una fue el acortamiento del tiempo parcial de tromboplastina activada, y otra el alargamiento del tiempo de trombina ante un fibrinógeno normal comparado con el grupo control en el primer estudio, y algo superior a lo normal en el segundo, aunque mundialmente existen diferencias alrededor de este valor (que algunos autores señalan aproximadamente en 290 y 340 mg/100 ml. en el segundo trimestre de un embarazo normal, que fue la edad gestacional promedio aproximada en los dos estudios) (15).

La interpretación dada a la primera alteración es que midiendo el TPTA, la vía intrínseca de la coagulación y fundamentalmente los Factores IX y VIII, el encontrarlo acortado nos revela un aumento importante en las concentraciones de esos factores y con poco consumo de los mismos. Se crea entonces un estado hipercoagulable que fácilmente pre dispone a la trombosis o al consumo al activarse esa vía.

En cuanto al alargamiento del tiempo de trombina en ausencia de corrección con plasma normal, muestra probablemente la presencia de un inhibidor que no puede ser la antitrombina III, puesto que ésta habitualmente disminuye en el embarazo y más bien se trataría de presencia de productos líticas del fibrinógeno, ya que cinco de los 15 casos del primer estudio mostraron positividad a esta prueba (31).

La medición de la vía extrínseca por el tiempo de protrombina, aparentemente con poca diferencia contra su testigo normal, indudablemente define alteraciones cuando se deteminan los factores que la integran, y fundamentalmente el Factor VII que dio los niveles más altos.

Integrando la discusión de las anormalidades encontradas se puede inferir la presencia de un estado hipercoagulable

latente, con poca activación del mismo o casi nula, pero que ante un estímulo importante podría traducirse en una peligrosa actividad, como se tradujo en uno de los casos del primer estudio (caso 12), al pasar material trombo--plástico de la mola a la circulación cuando se efectuó - el legrado.

CONCLUSIONES

1.- Los estudios de Coagulación y Fibrinolisis se consideraron ser indispensables en 4 seguimientos prospectivos para la investigación de un grupo de alteraciones englobadas bajo el nombre de Coagulación Intravascular Diseminada en las dos primeras series de este trabajo, así como en otro grupo de alteraciones denominadas estado hipercoagulable - asociado al Embarazo Molar.

2.- De los diferentes métodos utilizados, resaltan por su importancia en el efecto que tuvieron en la investigación, la determinación de la concentración del fibrinógeno en el plasma, proteína clave cuya disminución o aumento nos traduce alguno de esos dos estados antes mencionados.

La demostración in vivo del monómero de la fibrina por medio de la determinación de los complejos solubles en el plasma, orientó grandemente en los dos primeros estudios - hacia la existencia de una Coagulación Intravascular .

3.- La cuantificación de los productos líticos del fibrinógeno nos permitieron afirmar que la actividad proteolítica de la plasmina aumentada cuando dichos productos se encontraron elevados, formaba parte de una lisis secundaria o reaccional.

4.- Si en algunas circunstancias no es posible realizar todas las determinaciones deseadas en estos casos, la práctica de algunas pruebas más sencillas, como las realizadas - en los estudios 2 y 3, ayudarán grandemente a descubrir la existencia de esas alteraciones y permitirán el control de las mismas durante su tratamiento.

5.- Un solo resultado no será suficiente para afirmar o negar la existencia de un estado hipercoagulable o de un Síndrome de Coagulación Intravascular, como en el caso de encontrar una hipofibrinogenemia aislada. Se requerirá de la acción conjugada de 2 ó 3 ensayos distintos y de su correcta interpretación, que repercutirá en la conducta a seguir.

6.- En algunos estados fisiológicos normalmente alterados en el mecanismo de la coagulación y fibrinolisis, -- como es el embarazo, los resultados obtenidos deberán -- ser transportados a la normalidad del mismo para hacer comparaciones, ya que no es igual valorar una concentración de fibrinógeno normal en una mujer no gestante, -- que en aquélla que lo es, donde la síntesis de las proteínas de la coagulación se encuentra a su máximo.

7.- Los ensayos para el estudio de la coagulación y fibrinolisis, deberán realizarse en las condiciones óptimas requeridas para cualquier enzima, ya que muchos de sus factores bioquímicamente traducen actividad enzimática.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sharp A. A. Diagnosis and Management of Disseminated In
travascular Coagulation. Brit. Med. Bull. 33(3): 265, 1977.
- 2.- Mustard J.F., and Packman M.A. Normal and Abnormal Haemos
tasis. Brit. Med. Bull. 33(3):187, 1977.
- 3.- Biggs R. Human Blood Coagulation. Haemostasis and --
Thrombosis. Ed. 2, Oxford 1976. Blackwell Scientific -
Publications. p. 168.
- 4.- Wintrobe M. Clinical Hematology. Ed. 8, Philadelphia -
1981. Lea & Febiger, p. 408.
- 5.- Jackson C. and Nemerson Y. Blood Coagulation. Ann. Rev.
Biochem. 40:765, 1980.
- 6.- Esnouf M.P. and DPhil MB. Biochemistry of Blood Coagulation.
Brit. Med. Bull. 33(3):213, 1977.
- 7.- Ratnoff O. and Saito H. Interactions among Hageman Factor,
Plasma Kalikrein, High Molecular Weight Kininogen and -
Plasma Tromboplastin Antecedent. Proc. Natl.Acad. Sci.
76(2)958, 1979.
- 8.- Stormorken H. Activations and Interactions of some Defense
Systems, in Poller L. Ed.: Recent Advances in Blood Coagula
tion. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1977, vol.2, p. 35.
- 9.- Cochrane Ch.G. and Revan S.D. The Participation of High
Molecular Weight Kininogen in Hypotensive Shock and Intra
vascular Coagulation. Clin. Immun. and Immunopathol. 15:
367, 1980.
- 10.- Biggs R. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis.
Ed.2, Oxford 1976, Blackwell Scientific Publications, p.32.
- 11.- Biggs R. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis.
Ed.2, Oxford 1976, Blackwell Scientific Publications, p.402.
- 12.- Müllertz S. The Fibrinolytic System. Mamen E.F., Anderson F.G.
Barhart M.I. Thrombolytic Therapy. Transactions of the Nine
teenth Annual Symposium on Blood. Wayne State University,
School of Medicine, Detroit, Mich. Held on January 22-23, 1971.
- 13.- Biggs R. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis.
Ed.2, Oxford 1976, Blackwell Scientific Publications, p.151.

- 14.- Garlnick H.R. and Sultan C. Annotation. Acute Promyelocitic Leukaemia: Haemorrhagic manifestation and morphologic criteria. Brit. J.Haematol. 29:373, 1975.
- 15.- Beller F.K. and Ebert C. The coagulation and fibrinolytic --- enzyme system in pregnancy and in the puerperium. J.Obstet.Gynec. Reprod.Biol. 13:177, 1982.
- 16.- Barr R.D., Carty M.J. and Osuna N. The Blood coagulation and -- fibrinolytic enzyme system in the normal pregnancies of healthy African women. East Afr. Med. J. 50:620, 1973.
- 17.- Uszynski M. and Uszinka F.R. The plasminogen content of the -- myometrium in non pregnant, pregnant and parturient women. Am. J. Obstet. Gyn. 98:825, 1967.
- 18.- Brecher G., and Cronkite, E.P. Morphology and enumeration of - human blood platelets. J.Appl.Physiol 3:365, 1950.
- 19.- Caen J., Larrieu M.J., et Samama M. "Hemostase". Methodes et diagnostic pratique. L'Expansion Ed 1, vol. 1968 p:114 -220.
- 20.- Clauss M.: Fibrinogen (Rapid physiological coagulation method - in determination. Acta Haematol. 17:237, 1957.
- 21.- Merskey C., Lalezari P., and Johnson A.J. A rapid, simple, -- sensitive method for measuring fibrinolytic split products in -- human serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131:871, 1969.
- 22.- Johnson A. J., Kline D.L. and Aljaersig Norma. Assay methods and Standard Preparations for Plasmin, Plasminogen and Urokinase in Purified Systems. 1967-1968 . Recommendations of the N.H.I. Committee on Thrombolytic Agents, Subcommittee for Standardization. Thromb.et Diath.Haemor. 21(2) 259,1969.
- 23.- Breen F.A. and Tullis J.L. Ethanol gelation: a rapid screening for Intravascular Coagulation. Ann.Int.Med., 6:1197, 1969.
- 24.- Kowalski E. Fibrinogen derivatives and their biologic activities. Sem.Hemat. 5:45, 1968.
- 25.- Merskey C., Kleiner G.J., and Johnson A.J. Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnosis and treatment. Blood 28:1, 1966.

- 26.- Priest R.J., Ramsay N.K., Bennett A.J., Krivit W, and Edson J.R. The effect of L-asparaginase on antithrombin, plasminogen, and plasma coagulation during therapy for acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Pediatrics*. 100(6):990. 1982
- 27.- Cattani A., Scharzenberg L., Amicci L., Schneider M., -- Schlumberger J.R. et Mathé G. Syndrome de fibrinogénopénie au cours de leucémiques. Etude in vitro de leur pouvoir fibrinolytique. *Rev.Fr. et Clin.Biol.* 11: 155, 1966.
- 28 - Quigley H. J. Peripheral leucocyte thromboplastin in pro---myelocytic leukemia. *Fed. Proc.* 26:648, 1967.
- 29.- Jespersen J., and Sidelmann. A study of the conditions and accuracy of the Thrombin Time Assay of Plasma Fibrinogen. *Acta Haemat.* 67:2, 1982.
- 30 - Pritchard J.A., Cunningham F.G., and Mason R.A. Coagulation - changes in eclampsia: their frequency and pathogenesis. *Am.J.Obstet. Gyn.*, April 15, 1976, p. 855.
- 31.- Weiner C., and Brandt J. Plasma Antithrombin III activity: an aid in the diagnosis of preeclampsia-eclampsia. *Am.J.Obstet. and Gyn.* Feb. 1, 1982, p. 275.