

152ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO LONGITUDINAL DE LA CONCENTRACION
DE ALGUNOS PRODUCTOS DE SECRECION
PLAQUETARIA EN PACIENTES CON ANEMIA
MEGALOBLASTICA

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ARMANDO GALARZA RAMIREZ

FALLA DE CUBRIR

DIRECTOR DE TESIS:
Q.F.B. RAMON CENDEJAS RAMIREZ



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL.

	pag.
ABREVIATURAS.	
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
I.- GENERALIDADES: 1.1.-Plaquetas.....	4
1.2.-Historia	7
1.3.-Fisiología de las plaquetas	8
1.4.-Bioquímica de las plaquetas	12
1.5.-B-tromboglobulina y F4P	12
2.1.-Clasificación de las anemias	14
2.2.-Anemia megaloblástica	15
2.3.-Datos del laboratorio	17
2.4.-Manifestaciones clínicas	20
2.5.-Tratamiento médico	20
II.- OBJETIVOS	21
III.- MATERIAL Y METODOS.	
1.-Material biológico	22
2.-Toma de muestra	22
3.-Determinación del F4P por A.N.H.	23
a.-Fundamento.	
b.-Procedimiento.	
4.-Determinación de B-TG por RIA	26
a.-Fundamento.	
b.-Procedimiento.	
IV.- OBSERVACIONES Y RESULTADOS PREVIOS	26
V.- RESULTADOS	29
VI.- DISCUSION	42
VII.- CONCLUSIONES	46
APENDICE: 1.-Métodos estadísticos	47
VIII.- BIBLIGRAFIA	48

INDICE DE FIGURAS.

	pag.
No.1 Estructura plaquetaria y sus gránulos.....	4
No.2 Cambio de forma de las plaquetas.....	5
No.3 Interacción plaquetaria con otros sist.....	9
No.4 Integración de la Hemostasia.....	13
No.5 Secuencia de maduración eritrocítica.....	18
No.6 Técnica del F4P por A.N.H.	25
No.7 Método del RIA para la B-TG.....	27
No.8 Distribución de los niveles de B-TG en personas normales y en pacientes con A.megaloblástica.....	31
No.9 Distribución de los niveles de F4P(A.N.H.) normales y en pacientes con A.megaloblástica.....	32
No.10 Variación individual de los niveles de B-TG en c/u de los tres estadios en estudio.....	36
No.11 Variación individual de los niveles de F4P en c/u de los tres estadios en estudio.....	37
No.12 Valores promedio de B-TG, F4P y B-TG/F4P en c/u de los tres estadios en estudio.....	41

INDICE DE TABLAS.

No.1 Constituyentes subcelulares de las plaquetas.....	11
No.2 Clasificación de las A.megaloblásticas.....	16
No.3 Resultados de B-TG y F4P en el grupo control de personas normales.....	30
No.4 Resultados de B-TG y F4P en el grupo de pacientes en tratamiento.....	34
No.5 Índice de la actividad plaquetaria de los pacientes en tratamiento.....	39
No.6 Comparación estadística entre el grupo control y el grupo de pacientes.....	40

ABREVIATURAS.

A.A.	= Acido araquidónico.
ADP	= Adenosin difosfato.
3'5'AMPc	= 3'5'adenosin monofosfato ciclico.
A.N.H.	= Actividad neutralizante de la heparina.
AT-III	= Antitrombina III.
B-TG	= Beta-tromboglobulina.
B-TG/F4P	= Indice de actividad plaquetaria.
CID	= Coagulación intravascular diseminada.
D	= Daltons.
F4P	= Factor 4 plaquetario.
F4P-BA	= Factor 4 plaquetario de baja afinidad.
IRC	= Insuficiencia renal crónica.
K	= Calicreinas.
ng.	= nanogramos.
P	= Plasmina.
PDF	= Productos de degradación del fibrinógeno.
PGG2	= Prostaglandina G2
PGH2	= Prostaglandina H2
P.M.	= Peso molecular.
RIA	= Radioinmunoensayo.
TT-H	= Tiempo de trombina-heparina.
VCM	= Volumen corpúscular medio.

RESUMEN.

La medición de Beta-tromboglobulina (B-TG) y Factor 4 plaquetario (F4P); son útiles para identificar la activación plaquetaria "in vivo", particularmente en pacientes con estados pretrombóticos y con trombosis de repetición; con la observación de trombosis en pacientes con Anemia megaloblástica en tratamiento, se diseña el presente estudio con objeto de conocer los niveles de estos productos de la segregación plaquetaria; previamente se estudió un grupo control de 22 personas normales y un grupo problema formado de 24 pacientes, en los cuales se les determinó estas dos proteínas plaquetarias; antes, durante y posterior al tratamiento; se cuantificó la B-TG por Radioinmunoensayo (RIA); y F4P por la Actividad neutralizante de la heparina (A.N.H); con el grupo control, determinamos los valores normales de referencia, encontrándose de esta forma: la B-TG con promedio de 35.7 ng/ml, la A.N.H. con promedio de 33.7 seg (0.97 en expresión núm.); a los ocho días de iniciado el tratamiento, la B-TG alcanzó valores con promedio de 78.3 ng/ml y la A.N.H. con promedio de 30.4 seg (1.18 en expresión núm.); estos valores tienden a mantenerse altos en un 64% de los pacientes, a elevarse en un 16% y solo un 20% recuperaron los valores normales al término de 30 días de estudio; esto indica, que una deficiencia severa de vitamina B12, puede ocasionar alteraciones funcionales de las plaquetas, mismas que se corrigen después del tratamiento; en esta etapa existe una hiperactividad plaquetaria con riesgo de trombosis, que puede ser identificada con la determinación de estos dos productos de la activación plaquetaria.

INTRODUCCION.

La Anemia megaloblástica es una enfermedad que se origina por una marcada deficiencia de vitamina B12 ó de ácido fólico, estos compuestos, intervienen en forma co-enzimática para la síntesis del DNA; específicamente en la reducción del azúcar Ribosa a Desoxirribosa.(52)

El DNA contiene el material genético necesario para la división celular, de cada una de las series celulares sanguíneas en la médula ósea. Cuando falta alguna de estas co-enzimas por lo general habra alteraciones morfológicas y funcionales de las células, de la serie Eritrocítica, Granulocítica y Megacariocítica.(24, 60)

La Anemia megaloblástica se caracteriza por un aumento en el tamaño celular, tanto del núcleo como del citoplasma, pero de manera más intensa del citoplasma, a lo cual se le denomina "Asincronismo núcleo-citoplasmático".(20, 51)

Los hallazgos principales en los frotis sanguíneos son la observación de Macrovalocitos y neutrófilos hipersegmentados.

Cuando se efectúan los conteos celulares encontramos: Eritrocitopenia, leucopenia y trombocitopenia, lo cual indica una lenta maduración celular a nivel de médula ósea, originándose lo que se llama "Pancitopenia".(12, 31, 60)

Las plaquetas son células sanguíneas susceptibles a anomalías metabólicas por deficiencia severa de vitamina B12 y de ácido fólico; en estudios previos se determinó que el contenido de vitamina B12 en plaquetas es tres veces más alta que en suero y seis veces más alta que en eritrocitos.(38)

En 1973 Peter H. Levine, realizó una serie de estudios sobre defectos plaquetarios cualitativos en pacientes con deficiencia de vitamina B12; observándose una disminución de la segregación plaquetaria con estándares de Epinefrina y colágena, tiempos de sangrado prolongado e incremento del F3P, algunos pacientes desarrollaron trombosis (que es la extensión patológica de agregados plaquetarios); sin haber un aumento evidente en la cantidad de las plaquetas. (38)

Estas observaciones nos indican una anomalía cualitativa de las plaquetas por deficiencia de vitamina B12, por lo tanto se plantea un estudio longitudinal de la concentración de dos proteínas plaquetarias específicas que son: la Beta-tromboglobulina (B-TG) y el factor 4 plaquetario (F4P). (43, 53, 59, 61); para determinar la actividad plaquetaria y el índice de actividad plaquetaria dada por relación B-TG/F4P; en cada una de las etapas de evolución: antes, durante y posterior al tratamiento de la anemia, siendo en la segunda etapa cuando se presenta un mayor riesgo de trombosis venosa ó arterial, lo cual puede originar un infarto al miocardio ó un accidente vascular cerebral y es cuando es necesario proporcionar un mayor control médico individual de cada uno de los pacientes en estudio. (33, 34, 38)

I.- GENERALIDADES.

1.1.- plaquetas.

Las plaquetas se originan al fragmentarse los megacario-
citos de la médula ósea, poseen una forma discoide con un dia-
metro de 2-3 micras; con citoplasma gránuloso sin núcleo, con
mitocondrias, vacuolas y partículas densas.(fig 1) (2,7)

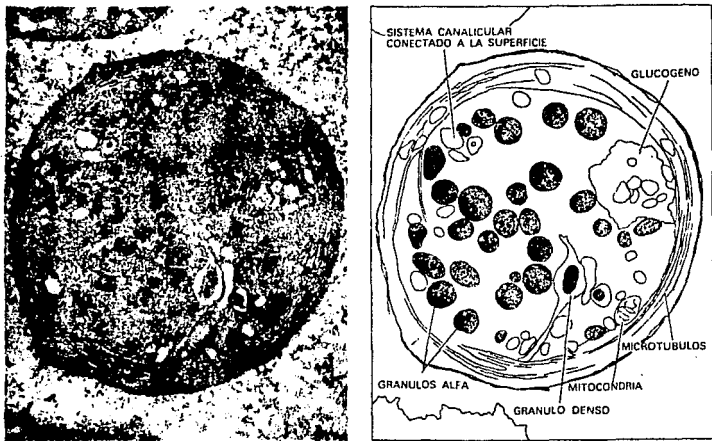


Fig.1 ESTRUCTURA PLAQUETARIA Y SUS GRANULOS.(62)

Se observan las distintas estructuras plaquetarias, el sistema canicular constituye un sistema conectado a la superficie, los microtubulos forman la estructura discoide, en tanto que las mitocondrias proporcionan la energía del glucogéno, que es una forma de almacenamiento de glucosa, los gránulos densos y gránulos alfa contienen diversas sustancias que se liberan en la activación plaquetaria.

Una vez liberadas a la circulación sanguínea, las plaquetas tienen una vida media de 10 días, si no han sido consumidas en algún proceso hemorrágico; no obstante muestran un metabolismo muy activo en la segregación ó cuando se estimulan por una lesión vascular ó por un agente inductor, observándose un cambio de forma con emisión de pseudópodos, lo que facilita su desgranulación y unión con otras plaquetas. (fig 2) (24)

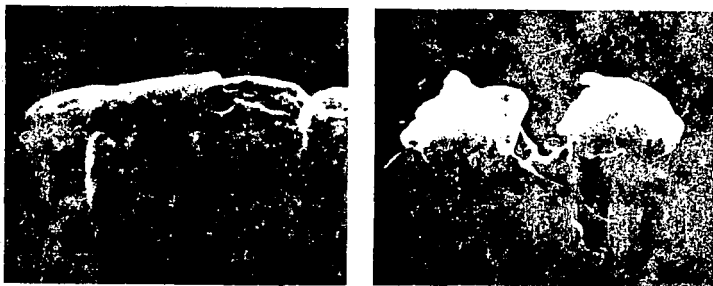


Fig.2 CAMBIO DE FORMA DE LAS PLAQUETAS.(62)

Las plaquetas aparecen como discos eplanados de contornos lisos, después de ser estimuladas con ADP, las plaquetas se hinchan y se transforman en una esfera erizada, las prolongaciones se adhieren a la superficie vascular ó a otras plaquetas.

Estos corpúsculos juegan un papel importante en la detención del flujo sanguíneo en las heridas; sus interacciones con sustancias plasmáticas y de los tejidos desempeñan múltiples funciones, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. (62)

Las plaquetas tienen tres funciones principales que son:

- a) Agregación y formación de un tapón hemostático.
- b) Actividad tromboplástica.
- c) Retracción del coágulo. (31)

El resultado de un daño en la pared vascular, es la formación de un tapón plaquetario, para evitar la pérdida sanguínea posteriormente se formará al rededor de este, un coágulo sanguíneo estable. La extensión patológica de agregados plaquetarios, puede contribuir sin embargo al desarrollo de la oclusión de algún vaso, dando un cuadro severo de trombosis. (14)

La aparición en la circulación sanguínea de dos proteínas específicas secretadas por los gránulos alfa; como son la Beta-tromboglobulina y el Factor 4 plaquetario, dan una medida de esta reacción y un índice de la actividad plaquetaria dada por la relación B-TG/F4P. (14, 16, 18, 21, 27)

1.2.- Historia.

La existencia de las plaquetas, no se estableció definitivamente hasta fines del siglo XIX, pronto se supo que estaban implicadas en la hemostasia y coagulación, pero su papel en dicho proceso no se decifró sino hasta fines de la década de los cuarenta y en la década de los cincuenta, desde entonces se han descubierto muchos detalles sobre la fisiología y la bioquímica de la función plaquetaria. (62)

Al inicio de los cincuenta, Van Creveld, usando la precipitación con sulfato de bario, aislaron una fracción residual de las plaquetas, que mostraba elevada actividad neutralizante de la heparina; al mismo tiempo, investigadores independientes fueron capaces de diferenciar las distintas fracciones químicas que mostraban actividad tromboplástica y actividad anti-heparínica; en 1955 Deutsch propuso que el factor antiheparínico, fuera designado Factor 4 plaquetario. (59)

En 1975, Moore y otros reportaron una proteína plaquetaria que se enlaza a una columna de Agarosa-heparina, solo que menos firme que el F4P; similarmente Rucinski (53) y otros describieron una proteína de baja afinidad por la heparina, que le denominaron Factor 4 plaquetario de baja afinidad (F4P-BA); estudios posteriores mostraron que la B-TG es un derivado proteico del F4P-BA. (9, 29)

En 1962 Grete y en 1978 Dawes (21) describieron la liberación de los constituyentes plaquetarios, cuando se exponen a la trombina; desde entonces el término de liberación plaquetaria, ha sido aceptado para resumir la exocitosis de la secreción plaquetaria.

La B-TG y el F4P han recibido considerable atención actual, como marcadores moleculares de la activación plaquetaria, basada en su alta especificidad, ausencia en el plasma normal y determinables por un método de alta sensibilidad como es el Radioinmunoensayo (RIA). (9, 21, 25)

1.3 Fisiología de las plaquetas.

Las plaquetas se componen por tres zonas principalmente:

- a) Una zona periférica llamada "glicocalix", constituida por glicoproteínas, que participan en la recepción de estímulos, una membrana con un sistema canicular abierto, con las enzimas necesarias para la síntesis de prostaglandinas. (10)
- b) Una zona interior llamada "sol-gel", que esta compuesta por microtúbulos, que es un sistema canicular denso y una banda de microfilamentos contractiles de trombostenina, proteína responsable de la contracción plaquetaria y cambio de forma. (24, 31)
- c) Una zona de organelos, que está compuesta por gránulos densos, gránulos alfa, lisosomas y mitocondrias; las plaquetas circulantes se adhieren a la colágena expuesta en la zona vascular lesionada, interviniendo el factor VIII fracción Von Willebrand (VIII:VW). (62)

En la primera fase llamada vascular, ocurre primeramente una vasodilatación como respuesta a un daño tisular, con la liberación de histamina, Factor VIII:Ag y colágena; al enlace entre plaquetas y endotelio vascular se le da el nombre de adhesión plaquetaria ó agregación primaria. (fig 3) (8)

La agregación primaria es reversible y esta dada por ADP

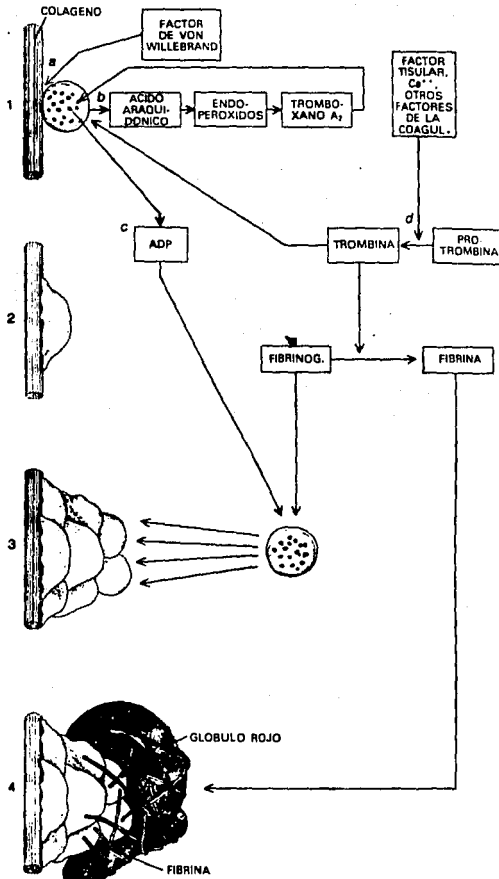


Fig No.3 INTERACCION DE LAS PLAQUETAS CON OTROS SISTEMAS.(62)

FIG.No.3

El contacto de las plaquetas con la colágena(1) en presencia del factor VIII:VW (a) inicia una vía (b) que estimula la secreción de ADP a partir de los gránulos densos (c); las plaquetas que se adhieren cambian de forma y pierden sus gránulos (2) al mismo tiempo los factores tisulares, iones calcio y otros factores de la coagulación, transforman la protrombina en trombina (d); la trombina estimula también la secreción y transformación del fibrinógeno en fibrina. Bajo la influencia de colágena, ADP y trombina se produce la agregación plaquetaria (3). El proceso puede detenerse en este momento o proseguir, dando lugar a un trombo con globulos rojos atrepados (4).

y iones calcio; las plaquetas ya activadas liberan compuestos como ADP y factores plaquetarios, llevándose a cabo la agregación secundaria la cual es irreversible y es mediada por ADP y trombina; al mismo tiempo se produce una vasoconstricción(33).

Al estímulo de ADP se produce la liberación de los productos contenidos en los gránulos densos y al estímulo de trombina ó colágena, la liberación de los gránulos alfa. (tabla 1)

La agregación plaquetaria la producen los siguientes compuestos: Acidos grasos de cadena larga, Trombina, Colágena, Serotonina, ADP, Noradrenalina, Histamina y cinasas. Los compuestos anteriores se adhieren a los receptores de membrana y causan una reactividad plaquetaria. (12, 62)

Los anticoagulantes no inhiben la agregación plaquetaria a nivel de lesión vascular, por lo tanto es independiente de los factores de la coagulación. Las plaquetas además de cooperar con el cierre vascular, ayuda a la reparación continua de la integridad vascular. (19, 31)

**TABLA No.1 LOCALIZACION DE LOS CONSTITUYENTES SUBCELULARES
DE LAS PLAQUETAS. (10)**

Gránulos alfa	Gránulos densos	Lisosomas	Sist.tubular
Factor V	ADP	Hidrolasas	Tromboxano
Fibrinógeno	ATP		A2
P4P	Pirofosfato		Tromboxano
B-TG	Serotonina		B2
F VIII:Ag	Calcio		
F VIII:VW			
F crecimiento DP			
Factor XIII			

DP = dependiente de plaquetas.

1.4.- Bioquímica de las plaquetas.

Las membranas de las células endoteliales, así como la membrana de las plaquetas, contienen fosfolípidos, que al activarse el sistema vascular, como el sistema plaquetario, son convertidos por la fosfolípasa A2 en ácido araquidónico (A.A.); que es convertido en dos subsecuentes peróxidos: Prostaglandina G2 (PGG2) y la prostaglandina H2 (PGH2). (24)

La enzima responsable de esta conversión es la Ciclooxygenasa, que es inhibida por el ácido acetil salicílico y la sulfilpirazona. Las plaquetas sintetizan el tromboxano A2 que es un potente vasoconstrictor y agente agregante y las células endoteliales sintetizan la Prostaciclina (PGI2); que es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria ambos compuestos vienen de la misma endoperóxidasa y tienen acciones diametralmente opuestas. (6)

La clave medular de la bioquímica de las plaquetas está dada por el 3'5'AMPc, que por un mecanismo de inhibición de su concentración determina la cantidad de calcio libre, que es utilizado por la trombóstenina para producir su acción contractil. (fig 4)

1.5.- B-tromboglobulina y factor 4 plaquetario.

Dentro de las proteínas que son secretadas por los gránulos alfa se encuentran la B-tromboglobulina (B-TG) y el factor 4 plaquetario (F4P); los cuales son excelentes marcadores moleculares. (43, 45, 53, 59)

La B-TG primera proteína estudiada por la técnica del Radioinmunoensayo; es secretada por las plaquetas como un tetrámero con un P.M. total de 35,400 D.

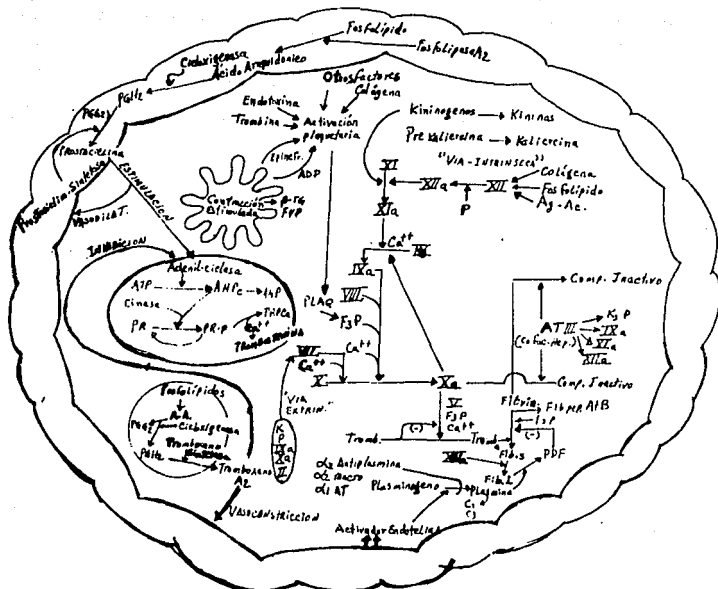


Fig No.4 INTEGRACION DE LA HEMOSTASIA Y SU RELACION CON OTROS SISTEMAS.(Sist. Vascular, Placuetario y plasmático). SEEGERS-MURANO-BICK: 1981-1982 (b).

La B-TG parece ser un producto proteolítico del factor 4 plaquetario de baja afinidad.(34)

El F4P es también un tetrámero; pero es secretado como un complejo de dos tetrámeros y dos moléculas de proteínglicano, que está compuesta por 4 unidades de 7,700 cada una y el complejo con un P.M. total de 30,800 D.(34)

Dawes y colaboradores, reportaron la depuración de B-TG cuyo tiempo de vida media fué de 100 min., mientras que para el F4P fué de aproximadamente 20 min., la rápida liberación de F4P es debida a que esta enlazada a las células endoteliales; estos enlaces han sido demostrados "in vitro" en cultivos celulares.(21,34,35)

Así mismo se ha demostrado que el F4P y la B-TG son metabolizadas en el riñón y se encuentran niveles elevados en pacientes con Insuficiencia renal crónica (IRC).(6,21,28)

Los estudios en los cuales, solamente una de las dos proteínas es determinada, son difíciles de interpretar, porque no hay un control de liberación "in vitro". Por lo cual es importante determinar ambas proteínas así como el Índice de la actividad plaquetaria dada por su cociente B-TG/F4P.(33,34)

2.1.- Clasificación de las anemias.

Se entiende como anemia, a un descenso de la concentración de hemoglobina por debajo niveles normales; aceptandose hasta 12 g/dl de Hemoglobina para mujeres adultas y 13.5 g/dl para varones adultos.(19)

La anemia no constituye un diagnóstico, sino que se considera como un signo de una enfermedad a diagnosticar y que está

dada por: a) Valoración del descenso de hemoglobina.

b) La rapidez del cuadro clínico.

c) El estado general del paciente.(37)

Una forma de clasificar las anemias es según el tamaño de los eritrocitos (clasificación morfológica); que se da a continuación: 1.-Macrocítica (VCM mayor de 99 micras³).

2.-Normocíticas (VCM de 83-99 micras³).

3.-Microcítica hipocrómica (VCM menor de 83 micras³).

La Anemia megaloblástica es del tipo macrocítica y normocrómica, a menos que exista una deficiencia de hierro.

2.2.- Anemia megaloblástica.

El término de Anemia megaloblástica es utilizado para determinar una serie de alteraciones, que tienen como característica común: Anomalías morfológicas y funcionales de las células sanguíneas y de la médula ósea.(60)

Se atribuye la causa a un defecto en la síntesis del DNA por deficiencia severa de vitamina B12, ácido fólico ó deficiencia mixta (tabla No.2); estos compuestos intervienen en forma coenzimática en la síntesis del DNA, específicamente en la reducción del azúcar Ribosa a Desoxirribosa; en donde la Ribonúcleotido-reductasa es la enzima y la vitamina B12 es la coenzima.(52)

Para la adsorción de vitamina B12 también se requiere de una glicoproteína secretada por las células parietales de la mucosa gástrica llamada "Factor intrínseco".(26)

El factor intrínseco se combina con la vitamina B12 y el complejo es captado en presencia de iones calcio por

TABLA No.2 CLASIFICACION DE LAS A.MEGALOBLASTICAS.(60)

1.-DEFICIENCIA DE VITAMINA B12.

Disminución en el aporte.

Dieta pobre.

Malabsorción.

Deficiencia del factor intrínseco.

Anomalia del factor intrínseco.

Malabsorción selectiva familiar.

Malabsorción inducida por fármacos.

Parasitosis intestinal

Aumento de las necesidades.

Embarazo.

2.-DEFICIENCIA DE ACIDO FOLICO.

Disminución en el aporte.

Dieta pobre.

Malabsorción

Aumento en las necesidades.

Activación bloqueada por antagonistas.

Alcohol

3.-DEFICIENCIA MIXTA DE ACIDO FOLICO Y VITAMINA B12

Inhibidores metabólicos.

Medicamentos extrínsecos.

Errores congénitos.

Trastornos de etiología desconocida.

Adquiridas.

receptores específicos del Ileo; transportada por una globulina Beta llamada Transcobalamina II y almacenada por una globulina Alfa llamada Transcobalamina I.(52)

En cuanto a los trastornos celulares; los precursores megaloblásticos, abarcan tanto la serie Eritrocítica, Granulocítica como Megacariocítica. El Promegaloblasto es el estadio más inmaduro de los eritrocitos y el más fácil de identificar, se observa de un tamaño superior al normal, con un citoplasma basófilo.(Fig No.5)

Al aumentar la síntesis de hemoglobina, la madurez de citoplasma contrasta con la inmadurez del núcleo; a este rasgo se le denomina: "Asincronismo núcleo-citoplasmático".(52)

Los precursores Granulocíticos, también muestran asincronismo y el estadio más representativo es el Metamielocito. Los Megacariocitos megaloblásticos no siempre presentan características morfológicas distintivas.(19)

2.3.- Datos del laboratorio.

Todos los elementos formes se hallan afectados; los eritrocitos presentan variaciones en cuanto a tamaño y forma e inclusiones tales como: cuerpos de Howell-Jolly y anillos de cabot.(19, 20, 52)

a) Sangre periférica y médula ósea.- existe anemia macrocítica y normocrómica, a menos que exista un déficit de hierro con morfología de los eritrocitos ya descrita, leucopenia con neutrófilos hipersegmentados (más de cinco); a veces con trombocitopenia y la médula ósea con maduración megaloblástica.

b) Análisis de jugo gástrico.- la cantidad es escasa.

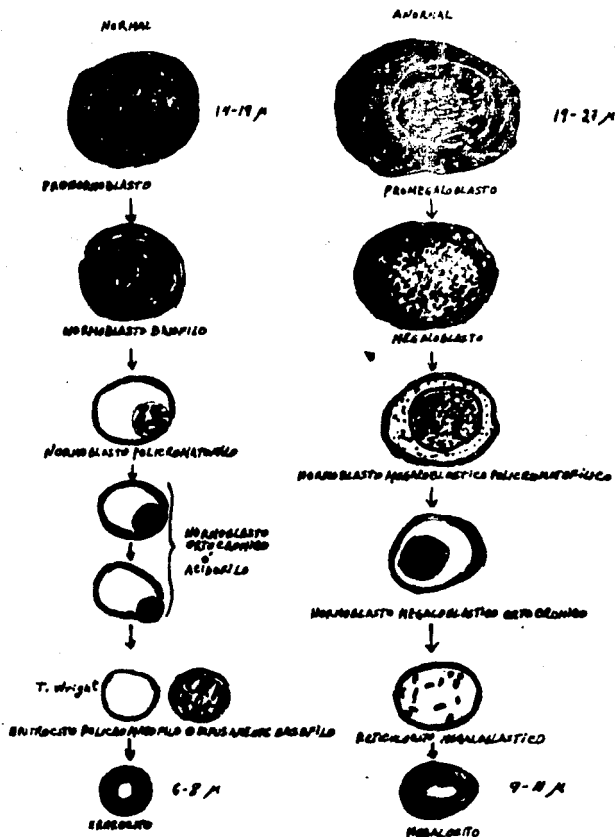


Fig.5 SECUENCIA DE MADURACION ERITROCITICA. (51)
NORMAL Y CON DEFICIENCIA DE VIT. B12

FIG.No.5

La célula más joven de la serie eritrocítica normal es el pronormoblasto de 14-19 micras; el núcleo es de color púrpura y gránular con densificación de la cromatina, el citoplasma es gránular y de color azul.

En la evolución desde pronormoblasto a normoblasto ortocromático tiene lugar aproximadamente unas tres divisiones mitóticas, esta última célula es incapaz de llevar a cabo la síntesis del DNA, por lo que no puede efectuar divisiones posteriores; la célula tiene un diámetro de 8-12 micras.

El reticulocito es un eritrocito joven originado por la salida del núcleo celular ó por destrucción del mismo; aunque retiene restos de RNA, lo que explica sus propiedades policromatófilas en la tinción de Wright; los eritrocitos normales tienen una forma de disco biconcavo, de color rojizo de 6-8 micras.

En la maduración eritrocítica anormal por deficiencia de vitamina B12, las células son de mayor tamaño a las normales en todas sus fases del desarrollo, debido a que crecen durante largos periodos, sin sufrir mitosis, por lo que se retrasa su salida a circulación.

En la fase de maduración de estas células se observa mitosis anormal y mayor cantidad de citoplasma con respecto al núcleo (Asincronismo núcleo-citoplasmático).

La célula más primitiva de esta serie, es el Promegaloblasto que mide 19-27 micras, le sigue el megaloblasto basófilo, normoblasto megaloblastico policromatófilo de 10-18 micras y por lo tanto de mayor tamaño que su equivalente, le sigue el normoblasto ortocromático, reticulocito megaloblastico y megalocito de 9-11 micras, tiene un color naranja azulado y en ocasiones con variación de tamaño y forma.

c) Análisis hematológico.-el nivel de vitamina B12 en suero es bajo, el nivel sérico de folatos es normal o bajo, la bilirrubina está ligeramente elevada (1-2 mg/dl); la LDH resulta incrementada (mayor de 1000 mU/ml); debido a la eritropoyesis. (31).

d) Pruebas de adsorción.-el procedimiento empleado es la prueba de Schilling, que mide la excreción urinaria de vitamina B12 radioactiva.(39)

e) Anticuerpos.-el 90% de los enfermos con Anemia perniciosa presentan autoanticuerpos, contra el citoplasma de las células Parietales gástricas.

2.4.- Manifestaciones clínicas.

Este trastorno es raro antes de los 35 años, los afectados suelen quejarse de debilidad y fátiga, pueden también destacar algunos síntomas gastrointestinales y diarreas; es también frecuente el embotamiento y hormigueo de pies y manos; cuando el grado de nutrición es bueno, pero los pacientes presentan palidez e ictericia, la lengua tiene aspecto liso y en ocasiones también aparecen petequias.(26)

El diagnóstico lo determina el médico por medio de la exploración física, la historia clínica y con exámenes de laboratorio y de médula ósea.(15,38,54,57)

2.5.- Tratamiento médico.

A).-TRATAMIENTO DE VITAMINA B12.via I.M.

Durante el primer día 1,000 microgramos.

Durante la primera semana 100 microgramos. por día.

Durante el siguiente mes 100 microgramos c/3er día.

En los meses posteriores 100 microgramos c/mes.

B).-TRATAMIENTO DE ACIDO FOLICO. via oral.

5 mg diarios por 2 meses.

Tratamiento antitrombótico: Heparina via I.V. 0.2-0.4 UI; y antiagregantes plaquetarios como la aspirina y el Dipiridamol (Persantín).(11,26,37)

II.- OBJETIVOS.

Con el antecedente de la observación de trombosis en pacientes con Anemia megaloblástica(13,38); se plantea un estudio longitudinal de los niveles de dos proteínas plaquetarias específicas: la B-tromboglobulina y el factor 4 plaquetario ; antes, durante y posterior al tratamiento; hasta 30 días de evolución de este tratamiento.

En este período de estudio es cuando tiene un mayor riesgo de presentar trombosis y donde es necesario proporcionar un mayor control médico individual.

Por lo que se plantean los siguientes objetivos :

a) Determinar los niveles de ambas proteínas, en un grupo de pacientes con Anemia megaloblástica: antes, durante y posterior al tratamiento.

b) Demostrar la importancia de determinar estas dos proteínas en el laboratorio de Hematología Especial, como una medida de la actividad plaquetaria, en pacientes en que se sospecha estados pretrombóticos como en el caso de la Anemia megaloblástica.

c) Correlacionar los resultados con un grupo control de personas normales sanas.

III.- MATERIAL Y METODO.

1.- Material biológico.

Se estudiaron 24 pacientes hospitalizados de ambos sexos con diagnóstico de Anemia megaloblástica, corroborados clínicamente y con exámenes previos de laboratorio y de médula ósea; se les tomaron tres muestras a cada uno de los pacientes en este orden :

- a) La 1a. muestra cuando se estableció el diagnóstico.
- b) La 2a. muestra a los 8 días de iniciado el tratamiento.
- c) La 3a. m. a los 30 días de iniciado el tratamiento.

Previamente se realizaron las determinaciones de las proteínas a un grupo control de 22 personas normales, para obtener los valores de referencia de la población estudiada, las características de este grupo fueron las siguientes :

- a) Fueron donadores familiares.
- b) Edad entre 18-40 años.
- c) No haber ingerido, durante la última semana, medicamentos como: antibióticos, aspirinas ni anticonceptivos orales.
- d) No haber ingerido alcohol ni ser fumadores crónicos.

2.- Toma de muestras.

Las muestras para la determinación de B-tromboglobulina son obtenidas en tubos especiales, proporcionados por el equipo, que contienen EDTA como anticoagulante y un agente anti-agregante llamado Teofilina; las muestras sanguíneas son centrifugadas en frío, el plasma es separado y congelado hasta su determinación; las muestras para la determinación del F4P son obtenidas en trombotubos de 2.5 ml con citrato de sodio como anticoagulante; centrifugadas y mantenidas en hielo para su determinación inmediata.

3.- Determinación del F4P por la A.N.H.

a) **Fundamento:** en el transcurso de la agregación inducida por trombina, las plaquetas liberan F4P, el cual es susceptible de ser medido en forma indirecta por su actividad antiheparínica(12); la prueba se realiza en dos etapas:

A). **Tiempo de trombina (TT):**-este método mide el tiempo durante el cual, el fibrinógeno presente se transforma en fibrina, por la acción de una cantidad estandarizada de trombina.(12)

B). **Tiempo de trombina-heparina (TT-H).**-la heparina interfiere en la relación de trombina-fibrinógeno, para la formación de un complejo: Antitrombina III-heparina-trombina; alargando el tiempo de coagulación en el cual el fibrinógeno libre se transforma en fibrina.(50)

b) **Procedimiento:** la sangre se recoge en trombotubos de 2.5 ml con citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante, en una relación 1:10, se centrifuga la muestra a 3,000 r.p.m. por 30 min; para obtener un plasma pobre en plaquetas (PPP); la cantidad de plaquetas de este plasma se encuentra entre 10,000 a 20,000 plaquetas/mm³. Se separa el plasma en tubos de plástico de 12 x 75 mm y se mantienen en hielo para su determinación inmediata.

A). **Tiempo de trombina (HARDISTY).**-Se pone a incubar 0.1 ml de plasma normal en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm, usando un Fibrómetro (Clotec-hyaland); se le agrega 0.2 ml de trombina diluida y se pone en marcha el cronómetro ajustando el tiempo de coagulación entre 18-20 seg; y se determina la concentración de trombina diluida.

B). Tiempo de trombina-heparina(TT-H).-se incuba 0.1 ml de plasma normal a 37°C por un min en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm, en un fibrómetro (Clotec-hyland);posteriormente se adiciona 0.1 ml de heparina diluída y se cronometran 20 seg , se adiciona 0.2 ml de Trombina 2.5 U/ml y se pone en marcha el crónometro,ajustando el tiempo de Trombina entre 30 a 35 seg ,se determina la concentración de Heparina diluída.

Nota: se consideran valores normales,hasta 5 seg mayor que el testigo,se realiza la misma operación con los plasmas normales y todas las determinaciones se hacen por duplicado.

A). Tiempo de trombina (TT).

Fibrinógeno + Trombina \longrightarrow Fibrina.

B). Tiempo de trombina heparina (TT-H).

Fibrinógeno + Trombina + heparina + F4P \longrightarrow [AT III-hep-trom]

Fibrinógeno lib. + Trombina lib. \longrightarrow Fibrina.

Cuando el F4P a \Rightarrow el TT-H (prob/test) d \Rightarrow Valor núm.(tes/pro)a
a= aumenta.

b= disminuye.

Por lo tanto el factor numérico es directamente proporcional a la actividad antiheparínica del F4P y es proporcional al aumento en la curva (fig No. 9).

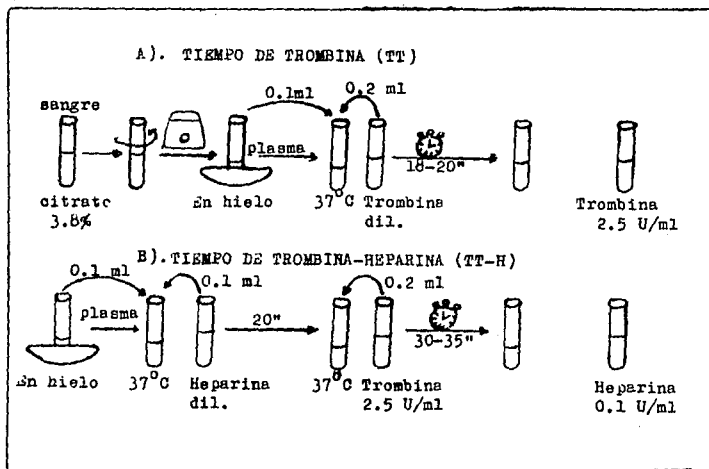


Fig.6 TECNICA DEL F4P POR LA A.N.H. (12)

En la agregación inducida por trombina, las plaquetas liberan F4P, el cual es susceptible de ser medido en forma indirecta por su actividad antiheparínica; la prueba se realiza en dos etapas.

3.-Determinación de B-tromboglobulina por RIA.

a) Fundamento: El método de radioinmunoensayo depende de la competencia entre la B-TG marcada con I^{125} y la B-TG no marcada del plasma problema, para un número limitado de sitios enlazantes en el anticuerpo Anti-B-TG. La cantidad de B-TG marcada enlazada al anticuerpo, será inversamente proporcional a la cantidad de B-TG no marcada, presente en el plasma problema. (12)

b) Procedimiento:

Inmediatamente después de la colección de la sangre, debe ser transferida a uno de los tubos del equipo, que contiene EDTA como anticoagulante y una sustancia antiagregante llamada Teofilina, mezclar suavemente y posteriormente dejar que la muestra se enfríe en hielo aprox. 15 min.; centrifugar la muestra a 3,000 rpm por 30 min. en una centrifuga refrigerada (4-8°C); separar 0.5 ml. de plasma en un tubo de plástico de 12 x 75 mm. y congelar la muestra para su almacenamiento. Descongelar la muestras hasta su determinación.

Nota: Todas las determinaciones se hacen por duplicado;

Las muestras descongeladas, no se deben congelar de nuevo.

TECNICA.

Se colocan en una gradilla, tubos de plástico de 12x75, se pipetea en cada uno de los tubos de ensaye 50 microlitros de los estandares (9, 19, 47, 97 y 215 ng/ml) respectivos y de plasmas problemas y un plasma normal; se adicionan alícuotas de 200 microlitros (ó lambdas) de B-TG marcado con I^{125} , a cada uno de los tubos de ensaye; pipetear alícuotas de 200 microlitros de suero anti B-TG en cada uno de los tubos de ensaye; los tubos de ensaye se mezclan en un Vortex y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente.

Se pipetea alícuotas de 500 microlitros de solución de sulfato de amonio saturado a cada uno de los tubos de ensayo y centrifugar a 2,000 r.p.m. durante 10-15 minutos; posteriormente se sacan los tubos de la centrifuga, se decanta el sobrenadante y se invierten los tubos por 5 min sobre un papel absorbente, evitando los movimientos bruscos; por último se pasan los tubos a un contador de partículas Gema y se obtienen los resultados de las cuentas por min.

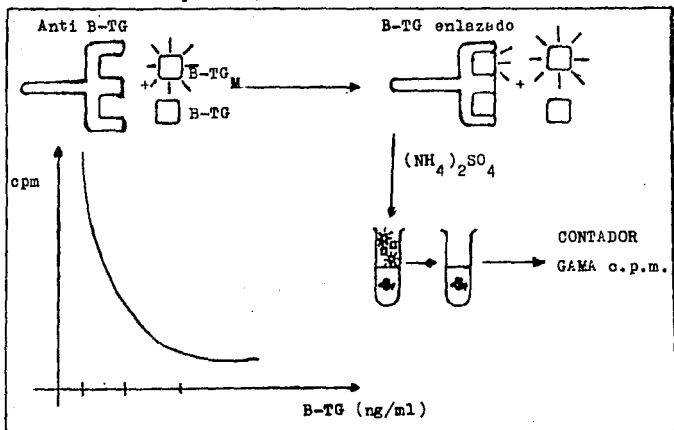


Fig.6 METODO DE RADIOINMUNOENSAYO PARA LA B-TG.(40,41)

Este método depende de la competencia entre la B-TG marcada y la B-TG no marcada del plasma problema, para un número limitado de sitios enlazantes en el anticuerpo; los resultados obtenidos se contraponen en el diagrama de la curva; dadas por las cuentas por min. de la B-TG marcada con Iodo 125, contra la concentración de los estándares.

IV.- OBSERVACIONES Y RESULTADOS PREVIOS.

En estudios previos realizados en pacientes con Anemia megaloblástica en el H.de Especialidades C.M.R., bajo la dirección del Dr.J.Gonzalez Llaven, se obtuvieron los siguientes resultados (13): se reunieron 110 casos de Anemia en adultos; la edad promedio fué de 41.8 años, con un rango de 15-85 años; las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron: palidez, astenia y adinamia, pérdida de peso, diarrea, ictericia y síntomas neurológico. El peso se recuperó rápidamente despues del tratamiento y la fiebre desaparece despues de algunos días.

La medición del ácido fólico y la vitamina B12, se realizó a casi la mitad de los pacientes y la médula ósea fué con maduración megaloblástica en todos los casos. En la mayoría de los pacientes la etiología de la Anemia fué debida a deficiencia de vitamina B12, pero también se observó deficiencia de ácido fólico y deficiencia mixta.

En relación con los datos de laboratorio: el 100% de los pacientes, tuvieron anemia con una cifra media hemoglobina de 6.2 g/dl, el 61% de los pacientes tuvieron cuentas de 4,000 leucocitos/mm³, más de la mitad de los pacientes tuvieron menos de 100,000 plaquetas/mm³, con cifra media de 120,000 plaq/mm³, el 47% de los pacientes tuvieron pancitopenia.

Las alteraciones morfológicas más frecuentes en los frotis sanguíneos fueron: poiquilocitosis, macrocitosis, cuerpos de Howell-Jolly y macropolicitos.

Ocho de los pacientes tuvieron recaídas de la Anemia megaloblástica y fueron debido a deficiencia de vitamina B12.

V.- RESULTADOS.

Se reunieron 24 casos de Anemia megaloblástica en adultos en el Hospital de Especialidades del C.M.R.; las principales características de este grupo son las siguientes: la relación entre mujeres/hombres es de 1.4:1.0, la distribución de los pacientes por décadas fué bastante homogénea; la edad promedio fué de 42.7 años, con un rango entre 18-72 años. En el grupo control de personas normales, la edad promedio fué de 25 años con un rango entre 19 a 38 años.

Con el grupo control de personas normales, determinamos los valores de referencia de nuestra población en estudio; los niveles de estas proteínas son: para B-TG, un promedio de 35.7 ng/ml con un rango de 20 a 54 ng/ml., para la A.N.H. un rango de 30.7 a 36.7 seg; con un promedio de 33.7 seg (valor numérico de 0.97).

En la tabla No.3 se registran los resultados obtenidos de B-TG determinados por RIA y P4P por A.N.H., en el grupo control de personas normales, con promedio, rango y desviación Standard; al comparar los valores por sexos mediante la t-Student, se obtuvo una $t=0.15$, con un valor de significancia menor de 0.05; que resulta no significativo y por lo cual no hay diferencia significativa de la población normal por sexos.

En la figura No.8 se muestra gráficamente los valores de B-TG plasmáticos, en los cuales se observa un aumento progresivo de los valores en el transcurso del tratamiento; que corresponde a un aumento en la actividad plaquetaria.

En la figura No.9 se observa al inicio del estudio en la primera etapa "A", una actividad disminuida de las plaquetas,

TABLA No.3. RESULTADOS DE B-TG y F4P EN EL GRUPO CONTROL DE PERSONAS NORMALES.

No.	SEXO	EDAD	VALOR DE B-TG (ng/ml)	VALOR DE F4P seg Prob/tes	VALOR DE F4P exp núm t/p
1	F	27	50	31.8/33.6	1.05
2	F	20	48	32.9/30.5	0.92
3	F	28	46	33.3/32.1	0.96
4	F	33	46	31.9/31.5	0.98
5	F	21	32	35.9/33.1	0.92
6	F	25	29	34.8/34.2	0.98
7	F	33	28	36.7/34.2	0.93
8	F	19	28	34.6/32.1	0.92
9	F	27	24	35.9/33.6	0.93
10	F	26	24	35.9/33.9	0.94
11	M	27	54	31.3/34.2	1.09
12	M	36	50	32.4/30.5	0.94
13	M	38	45	32.3/30.2	0.93
14	M	30	44	31.4/33.1	1.05
15	M	29	41	32.9/33.6	1.02
16	M	27	38	30.7/30.4	0.99
17	M	27	34	31.4/33.6	1.07
18	M	27	33	32.7/33.9	1.03
19	M	23	29	34.6/30.4	0.87
20	M	28	24	35.3/35.3	1.00
21	M	24	20	36.4/32.3	0.88
22	M	30	20	36.4/33.6	0.92
Promedio		25	35.7	33.7 seg	0.97
Rango		19-38	20-54	30.7-37.7"	0.87-1.07
Desv. Std.			9.1		0.06
t-Student $t < 0.05 \Rightarrow$ n.s.					

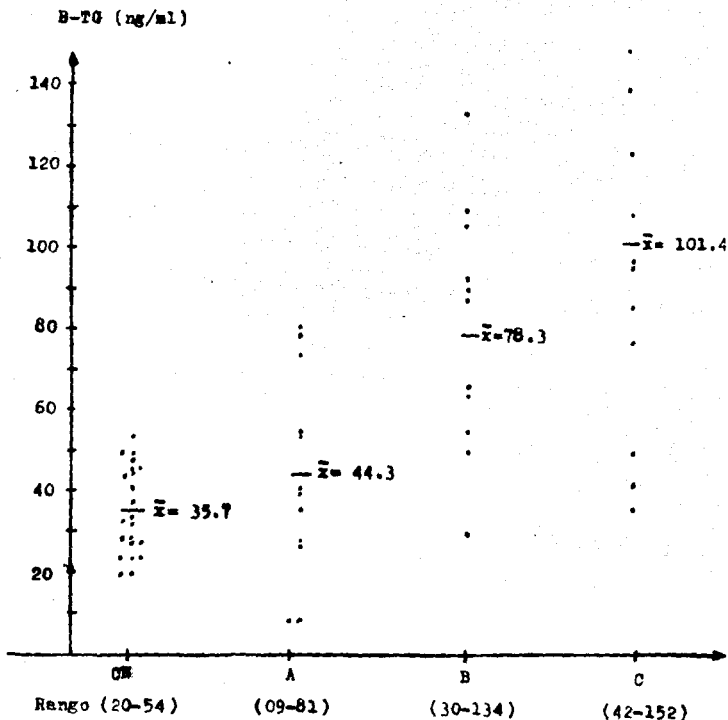


Fig No.8 DISTRIBUCION DE LOS NIVELES DE B-TG EN PERSONAS NORMALES Y EN PACIENTES CON A. MEGALOBLASTICA. (CN=control normal, A=antes, B=durante, C=después del tratamiento)

Distribución gráfica de los valores de B-TG, obtenidos por Radioinmunoensayo; en que se observa un aumento de los valores por el aumento de la actividad plaquetaria.

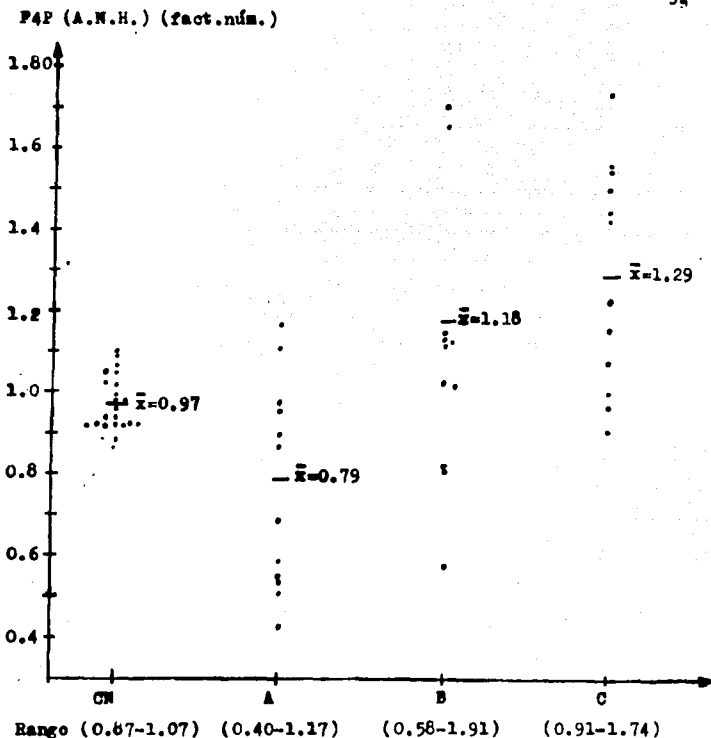


Fig No.9 DISTRIBUCION DE LOS NIVELES DE F4P EN PERSONAS NORMALES Y EN PACIENTES CON A.MEGALOBLASTICA.(CN=control normal, A=antes,B=durante,C=después del tratamiento).

En la etapa "A" se observa una actividad disminuída de las plaquetas, que concuerda con la trombocitopenia presente antes del tratamiento, pero en "B" tienden a mantenerse elevados los valores de F4P, con riesgo de trombosis.

que concuerdan con la trombocitopenia presente antes del tratamiento, pero durante el transcurso de este en "B", los valores de B-TG y F4P tienden a mantenerse altos, con un probable riesgo de trombosis.

A los ocho días de iniciado el tratamiento la B-TG aumenta en un 91% de los casos y alcanza valores con un promedio de 78.3 ng/ml, con un rango de 30-134 ng/ml; la A.N.H., también aumenta en un 79% , con un rango de 0.58 a 1.91 y con promedio de 30.4 seg (1.18 en expresión núm.).

A los treinta días con término del tratamiento: 20% de los casos (5 pacientes); lograron recuperar los valores normales de B-TG (20-54 ng/ml) y de F4P (30.7-36.7 seg); en 64% de los casos (15 pacientes); tienden a mantener valores altos de ambas proteínas, lo cual indica un riesgo de trombosis y solo en 16% de los casos (4 pacientes); se elevaron los valores plasmáticos de B-TG por arriba de 140 ng/ml y por arriba de 1.6 en expresión núm. para el F4P, con una trombosis que se debe controlar inmediatamente con heparina y con un tratamiento de medicamentos antitrombóticos. Estos valores se gráficán en las figuras 10 y 11.

En la tabla No.4 se hace una relación de los valores de B-TG obtenidos por RIA y F4P por A.N.H., durante las tres etapas de evolución; indicando la edad y sexo de cada uno de los pacientes, con promedio, rango y desviación estándar en los valores globales.

TABLA No.4 RESULTADOS DE B-TG y F4P EN EL GRUPO DE
PACIENTES EN LAS TRES ETAPAS DEL TRATAMIENTO.

No.	Sexo	Edad	Pre-trat.	Trans-trat.	Post-trat.
			B-TG ng/ml	B-TG ng/ml	B-TG ng/ml
1	F	46	9	30	96
2	F	45	55	88	109
3	F	41	9	55	42
4	F	35	36	134	140
5	F	32	74	93	50
6	F	25	40	66	150
7	F	26	41	110	151
8	F	18	54	63	86
9	F	40	10	31	97
10	F	46	54	87	108
11	F	38	11	57	44
12	F	37	34	132	138
13	F	28	42	111	152
14	F	20	53	62	85
15	M	72	28	55	77
16	M	64	80	106	124
17	M	63	79	90	97
18	M	36	27	50	96
19	M	38	41	67	151
20	M	43	73	92	49
21	M	70	29	56	78
22	M	61	79	105	123
23	M	65	25	48	98
24	M	37	81	92	95
Promedio		42.7	44.3	78.3	101.4
Rango		18-72	09-81	30-134	42-152
Des.St.			24.0	29.1	34.8

No.	Pre-tratamiento		Trans-trat		Post-tratamiento	
	F4P por seg p/t	ANH exp núm	ANH seg p/t	exp núm	ANH seg p/t	exp núm
1	38.6/33.6	0.87	27.1/30.5	1.12	28.9/33.6	1.16
2	29.0/32.1	1.11	16.3/31.5	1.91	22.6/32.1	1.43
3	64.8/33.6	0.51	41.7/34.2	0.82	36.4/35.3	0.97
4	29.0/34.2	1.17	19.3/32.1	1.16	21.0/30.5	1.45
5	34.2/33.6	0.98	28.8/33.9	1.18	31.5/33.9	1.08
6	49.6/34.2	0.69	17.7/30.5	1.71	20.1/33.6	1.74
7	54.9/30.4	0.55	29.1/33.1	1.14	19.7/30.4	1.55
8	62.1/33.6	0.54	37.3/30.5	0.81	27.2/33.6	1.23
9	32.4/31.5	0.97	26.3/32.1	1.22	26.7/33.6	1.26
10	33.8/34.2	1.01	18.2/33.6	1.81	25.2/33.6	1.33
11	45.0/32.1	0.71	33.5/34.2	1.02	27.2/32.1	1.17
12	35.0/33.9	0.97	22.8/33.6	1.46	27.3/34.2	1.25
13	46.8/30.5	0.65	27.2/33.6	1.24	19.2/31.5	1.65
14	76.9/33.6	0.44	47.3/33.6	0.71	28.2/32.1	1.13
15	35.0/33.6	0.96	32.9/33.6	1.03	36.4/33.6	0.91
16	38.3/30.5	0.79	31.0/35.3	1.13	19.9/30.5	1.51
17	35.8/32.1	0.90	29.2/33.6	1.15	19.5/30.5	1.56
18	76.2/30.5	0.40	57.7/33.6	0.58	34.2/34.2	1.00
19	38.4/30.5	0.79	18.8/34.2	1.81	18.4/34.2	1.84
20	37.7/33.6	0.88	28.1/30.5	1.08	33.7/33.6	0.98
21	33.2/35.3	1.06	26.7/30.5	1.13	30.5/30.5	1.00
22	48.7/33.6	0.69	34.2/35.3	1.03	23.8/33.6	1.41
23	52.1/31.5	0.60	47.4/32.1	0.68	27.0/32.1	1.36
24	48.3/33.6	0.70	32.7/34.2	1.05	25.1/34.2	1.29
Prom.	44.8"	0.79	30.4"	1.18	26.2"	1.29
Rango	(0.40-1.17)		(0.56-1.91)		(0.91-1.74)	
Desv. Std.		0.23		0.37		0.26

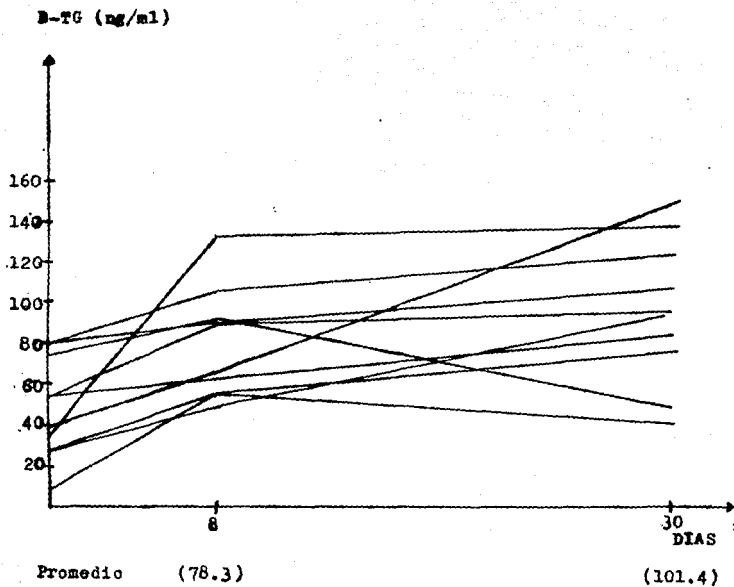


Fig No.10 VARIACION INDIVIDUAL DE LOS NIVELES DE B-TG EN CADA UNO DE LOS TRES ESTADIOS EN ESTUDIO.

Representación gráfica del estudio lineal de B-TG de cada uno de los pacientes, con un aumento progresivo a los 8 días del estudio y una respuesta variable a los 30 días del tratamiento.

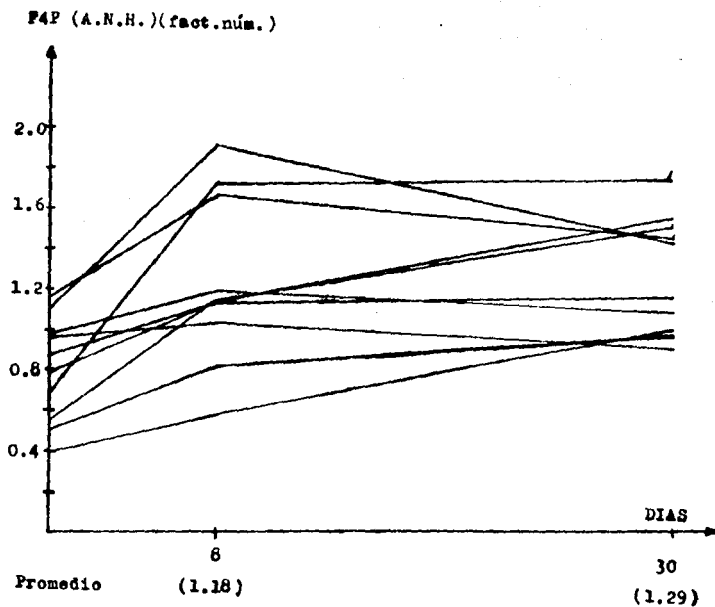


Fig No.11 VARIACION INDIVIDUAL DE LOS NIVELES DE F4P EN CADA UNO DE LOS TRES ESTADIOS EN ESTUDIO.

Representación gráfica del estudio lineal del F4P, la actividad antiheparínica es proporcional al aumento de la curva.

En la tabla No.5 se registren los valores del Índice de actividad plaquetaria; dada por la relación $B-TG/F4P$ del grupo control de personas normales y grupo de pacientes en cada una de las etapas de estudio con su promedio, rango y desviación estándar.

En la figura 12, se observa gráficamente un comportamiento lineal idéntico de las curvas de los valores promedio de $B-TG$, $F4P$ y de la relación $B-TG/F4P$, integrando de esta forma las figuras anteriores; 9, 10 y 11.

En la tabla No.6 se hace una comparación estadística de la población en estudio, comprendido en dos grupos: el grupo control "C" de personas normales y el grupo "P" de pacientes en cada una de las etapas de evolución en estudio, con el tamaño de la población, promedio y el sistema paramétrico de la t -Student como prueba de comparación de la media de dos poblaciones. Como es de esperarse, difieren mucho los valores de los dos grupos en las determinaciones de $B-TG$, $F4P$ y su relación $B-TG/F4P$; presentan una desviación significativa (d.s.) con una p mayor de 0.05, por lo cual cae fuera de los valores de significancia y de la distribución Gaussiana del grupo control "C".

TABLA No.5 INDICE DE LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA B-TG/F4P DEL
GRUPO CONTROL NORMAL Y DE LOS PACIENTES EN TRAT.

No.	"C" Normal	"P" Pre-trat.	"P" trans-trat.	"P" post-trat.
1	47.6	10.3	26.7	82.7
2	52.1	49.5	46.0	76.2
3	47.9	17.6	67.0	43.2
4	46.9	30.7	80.7	96.5
5	34.7	75.5	78.8	46.3
6	29.6	57.9	38.5	86.2
7	30.1	74.5	96.5	97.4
8	30.4	100.0	77.7	69.9
9	25.8	10.3	25.4	76.9
10	25.5	53.4	48.0	81.2
11	49.5	15.5	55.8	37.6
12	53.2	35.0	90.4	110.4
13	48.3	64.6	89.5	92.1
14	41.9	120.4	87.3	75.2
15	40.2	29.1	53.3	84.6
16	38.3	101.2	93.8	82.1
17	31.7	87.7	78.2	62.1
18	32.0	67.5	86.2	96.0
19	33.3	51.8	37.0	82.0
20	24.0	82.9	85.1	50.0
21	22.7	27.3	49.5	77.2
22	21.7	114.4	101.9	87.2
23		41.6	70.5	81.6
24		115.7	87.6	69.8
Prom	36.7	59.7	68.8	76.8
Rango	21-53.2	(10.3-120.4)	(26.7-101.9)	(37.6-110.4)
Des St.	10.3	34.6	23.2	18.1

TABLA No.6 COMPARACION ESTADISTICA ENTRE EL GRUPO CONTROL "C"
Y EL GRUPO "P" DE PACIENTES, EN CADA UNA DE LAS
ETAPAS EN ESTUDIO.

		GRUPOS						
		"C"	"P"	t-Stud.	"P"	t-Stud.	"P"	t-Stud.
		Normal	Pre-trat		trans-t		post-tra	
B-TG ng/ml	n	22	24	t=-1.6	24	t=-6.8	24	t=-8.9
	\bar{x}	35.7	44.3		78.3		101.4	
	S	9.1	24.0	n.s.	29.1	d.s.	34.8	d.s.
F4P Fact. núm.	n	22	24	t= 3.7	24	t=-2.7	24	t=-5.9
	\bar{x}	0.97	0.79		1.18		1.29	
	S	0.06	0.23	d.s.	0.37	d.s.	0.26	d.s.
B-TG F4P	n	22	24	t=-3.1	24	t=-6.1	24	t=-9.3
	\bar{x}	36.7	59.7		68.8		76.8	
	S	10.3	34.6	d.s.	23.2	d.s.	18.1	d.s.
		p= 0.05		c= 1.7 (tablas)		(-c < t < c) \Rightarrow n.s.		

B-TG/F4P = Índice de actividad plaquetaria.

c = valores críticos (tablas).

d.s. = desviación significativa.

n.s. = desviación no significativa.

p. = valor de significancia.

S = Desviación Standard.

t = T-Student.

n = tamaño de la muestra.

\bar{x} = promedio de la muestra.

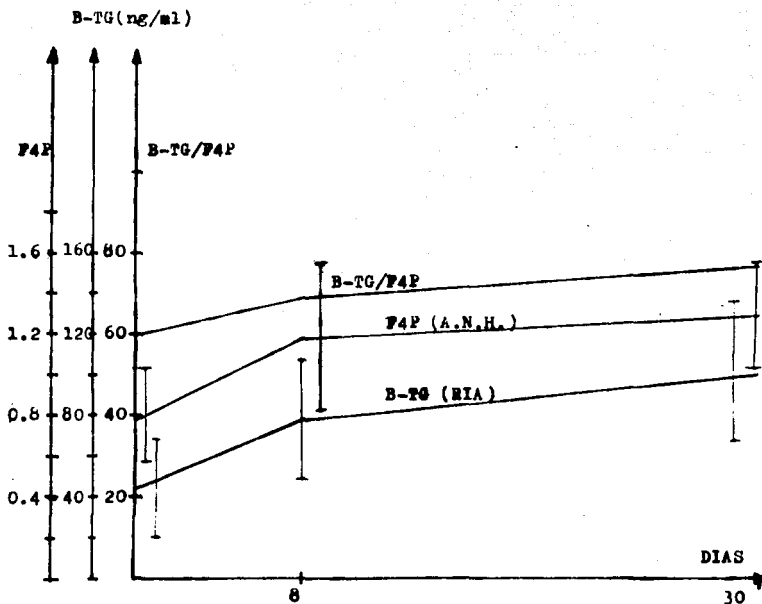


Fig No.12 VALORES PROMEDIO DE LOS VALORES DE B-TG, F4P, y B-TG/F4P EN CADA UNO DE LOS TRES ESTADIOS EN ESTUDIO.

Se observa el comportamiento lineal identico de las curvas, de los valores promedio de las proteínas en estudio, así como el indice de actividad plaquetaria, integrando las gráficas 9, 10 y 11)

VI.- DISCUSION.

En el presente estudio, se muestra los niveles elevados que pueden alcanzar la Beta-tromboglobulina y el Factor 4 plaquetario (9,21,41,43,59); así como de la relación B-TG/F4P, como índice de actividad plaquetaria, en pacientes con Anemia megaloblástica en tratamiento (fig.12).(34)

Las plaquetas son células susceptibles a anomalías metabólicas por deficiencia severa de vitamina B12 y de ácido fólico, la cual se puede corregir administrando una terapia adecuada (Cap.I)(38,57) esta corrección se refleja con un acortamiento en el tiempo de coagulación a sus valores normales y una buena respuesta en la agregación secundaria; provocada por estándares de ADP, Epinefrina, Colágena ó Trombina.(12,16,38)

Un aumento en la actividad plaquetaria, incrementará la concentración plasmática de productos de secreción plaquetaria como el F1P, que junto con factores tisulares; activará la vía Intrínseca de la coagulación sanguínea y producirá la conversión de Protrombina a Trombina, esta última estimulará la actividad plaquetaria en forma cíclica.(figs.3 y 4).(8,38,62)

La agregación plaquetaria, junto con depósitos de Fibrina, desarrollará evidentemente una trombosis venosa ó arterial, si no es detectada oportunamente con la determinación de Trombina y de los productos de segregación plaquetaria; que se debe controlar en los casos graves con la administración de heparina y antiagregantes plaquetarios; como el ácido acetil salicílico ó el Dipyridamol (persantín) (11,26). Por lo cual la función plaquetaria es importante en la patogenia de la hemorragia y la Trombosis.(10,12,19)

La B-TG y el F4P han recibido considerable atención como marcadores moleculares de la actividad plaquetaria; basada en su alta especificidad, su ausencia en plasma normal y determinación por el Radioinmunoensayo (RIA).(18,21,23)

Estas dos proteínas están aumentadas en varias condiciones clínicas como: Infarto al miocardio, Enfermedades coronarias, Trombosis venosa ó arterial, Arteriosclerosis, Diabetes mellitus, pre-Eclampsia, CID, IRC y migraña entre otras.(1,3,4,6,22,28,29,34,42,58)

Los valores de referencia obtenidos en laboratorios hospitalarios de la Unión Americana para el RIA reportaron valores normales de 180 personas con un rango de 10-65 ng/ml y un promedio de 30.8 ng/ml; comparando los resultados obtenidos en nuestra población del D.F. caen en estos valores; con un valor promedio de 35.7 y una desviación estandar de 9.1, por lo tanto no hay diferencia en los valores normales de las dos poblaciones.(40)

Antes del tratamiento, los pacientes presentan niveles normales para la B-TG con un promedio de 44.3 ng/ml y disminuidos para el F4P(A.N.H.); con un promedio 44.8 seg, teniendo diferencias significativas con respecto a los valores normales (Tabla No.6); y gráfícados en las figuras 8 y 9, esto indica baja en la actividad plaquetaria, que concuerda con la disminución de las plaquetas presente antes del tratamiento.
(13,38).

A los ocho días de iniciado el tratamiento, los valores de ambas proteínas aumentan en esta forma: un 91% para B-TG con un valor medio de 78.3 Ng/ml y un 79% para el F4P (A.N.H.); con un valor medio de 30.4 seg (1.18 en expresión núm.)

Después de 30 días de iniciado el tratamiento, encontramos una marcada diferencia en la respuesta de los pacientes, sujetos al mismo tratamiento; en un 20% de los casos, los pacientes recuperaron los valores normales (B-TG de 20-54 ng/ml y de F4P de 30.7-36.7 seg); mientras que a la mayoría de los pacientes, que corresponde a un 64% de los casos, tienden a mantener niveles altos con riesgo de trombosis y en un 16% de los casos, se elevan los valores por arriba 140 ng/ml por B-TG y 1.6 para el F4P; con un necesario tratamiento antitrombótico para estos pacientes. Con respecto a la t-Student, de los dos grupos, existen diferencias estadísticas significativas (Tabla No.6).(36,56)

La tendencia a presentar trombosis venosa ó arterial en forma repetitiva de ciertos pacientes, se debe probablemente a alguna alteración a nivel de sistema fibrinilítico ó alguna alteración funcional de las plaquetas llamada trombopatías, siendo el número de plaquetas normal ó disminuido; por lo que se sugiere estudios complementarios con la determinación de: Fibrinógeno, productos de degradación de fibrinógeno (PDF); determinación de F3P y pruebas de agregación plaquetaria con estándares de ADP, colágena o epinefrina.(12)

Así mismo se sugiere un estudio complementario de la administración de vitamina B12 y fólatos en personas normales, para observar cual es su respuesta plaquetaria.

Uno de los defectos sobre el tratamiento dado a los pa -
cientes; es que se administran ambas vitaminas, sin distinguir
cual de las dos es deficiente. (13)

Es interesante el hecho de observar, que hay una tendencia
a presentar fenómeno trombótico en el período de recuperación
y no antes, cuando hay una disminución en la producción pla -
quetaria; lo cual indica que es debido probablemente, a una
Trombocitosis de rebote y a un acortamiento en el tiempo
de maduración plaquetaria intramédular, saliendo a circula -
ción sanguínea, plaquetas inmaduras y con una disminución en
la calidad plaquetaria. (24,38)

Con el presente estudio no podríamos implicar, si la hiper
segregación plaquetaria es una respuesta espontánea ó induci -
da por la administración en altas dosis de vitamina B12 y
fólatos dados al inicio del tratamiento.

La mayoría de los pacientes estudiados, fueron dados de al -
ta del Hospital, después de un mes de tratamiento y recupera -
ción; por lo que es difícil dar un seguimiento posterior
extrahospitalario.

VII.- CONCLUSIONES.

1.- Este estudio, demostró el incremento progresivo de los niveles de B-TG y de F4P, así como de su relación B-TG/F4P (como índice de actividad plaquetaria); en relación con el tratamiento, comparandolos con un grupo control normal.

2.- La deficiencia de vitamina B12 y ácido fólico, pueden ocasionar deficiencias funcionales de las plaquetas, mismas que desaparecen con el tratamiento e inclusive pueden aumentar los productos de segregación plaquetaria, con riesgo de trombosis.

3.- Es de notar la importancia de determinar ambas proteínas en el laboratorio de Hematología Especial; en estados pre trombóticos como en el caso de la Anemia megaloblástica y en estados trombóticos en general.

4.- No podemos implicar si la hiperactividad plaquetaria es una respuesta espontánea ó es inducida por altas dosis del tratamiento.

APENDICE.1.- Métodos estadísticos.

Se realiza una comparación estadística de la población en dos grupos: entre el grupo "C" de personas normales y el grupo "P" de pacientes, estableciendo las siguientes variables: Tamaño de la población (n), promedio (\bar{x}), rango (R), Desviación estándar (S) y la t-Student; que es una aplicación a sistemas paramétricos (Tabla no.6). (36,56)

La media (\bar{x}) = es el promedio de la suma de los valores encontrados en una serie de observaciones.

Desviación estándar (S) = es una medida de la dispersión de los valores alrededor de la media de la distribución y se define como la raíz cuadrada del medio de las desviaciones de la diferencia entre las observaciones y su media, su expresión es:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Pruebas de significancia.- Si dos medias ó dos proporciones, difieren por más del doble, el error estándar de la diferencia son significativos y no por factores de la casualidad; esta medida a nivel convencional de significancia es :p=0.05

La fórmula para estas pruebas de significancia para dos poblaciones por medio de la t-Student es:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

\bar{x}_1 = media de la población 1

\bar{x}_2 = media de la población 2

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Al-Mondhiry H. B-TG & F4P in patients with cancer: correlation with the stage of the disease & the effect of chemotherapy. Am J Haematol 14:105-111, 1983
- 2.- Amaro Saenz B.A. Características del patrón de anticuerpos antiplaquetas en transfusión sanguínea.
Tesis profesional FES-C pag 3-10, 1986
- 3.- Appiani A.C., Edefonti A., Bettinelli A. The relationship between plasma levels of the F VIII complex & platelet release products in children with the Hemolytic uremic syndrome. Clin Nephrol 17(4):195-199, 1982
- 4.- Allen B.N., Owen J., Kaplan K.L. Fibrinopeptide A, PF4, B-TG levels in coronary heart disease. Blood 60(3):650-654, 1982
- 5.- Barret J.P. Basic immunology and its medical application.
Edit Mosby Company pag 130-133, 1980
- 6.- Bern M., Green J. Effect of sulfilpyrazone upon Antitrombin III and PF4 in chronic renal failure. Thromb Res 27:457, 1982
- 7.- Bessman J.D., William L.J., Gilmer P.R. Jr. Platelet size in heart & Hematologic disease. Am J Clin Pathol 76(2):150, 1982
- 8.- Bick R.L. The clinical significance of fibrinogen degradation products. Semin in Thromb and haemost 8(4):302-312, 1982
- 9.- Bolton A.E., Ludlam C.A., Moore S. Three approaches to the RIA of human B-TG. Br J Haematol 33:233-238, 1976
- 10.- Bloom A.L., Duncan T.P. Haemostasis and Trombosis.
Edit. Churchill L. London & New York pag 22-39, 1981
- 11.- Bounameaux H.M., Marbet G.A., Lemmle B. Monitoring of heparin treatment. Am. J Pathol 74:68-73, 1980
- 12.- Ceen J., Larriou M.J. La hemostasia Edit Toray-Masson
pag 96-100, 303-305, 1980

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

49

- 13.- Camacho A.,Gonzalez Ll.J. XII Jornada anual.Agrupación Mexicana para el estudio de Hematología A.C. Nov. 1981
- 14.- Cella G.,Zahavi J ,de Haas H.A. B-TG,platelet producción time & platelet function in vascular disease.
Br.J. Heematol 43:127-136,1979
- 15.- Chanarin I ,Malkowska V ,O'Hea A.M. Megaloblastic anemia in vegetarian hindu community. Lancet 23;2(8465); 1166-1172, 1985
- 16.- Chesterman C.N.,Jennifer R. Plasma levels of platelet factor 4 measured by RIA. Br.J. Heematol 40:469-500,1978
- 17.- Chong B.H.,Grace C.,Rozenberg M.C. Heparin induced Thrombocitopenia. Br.J.Heematol 49:531-540,1981
- 18.- Cox A.,Inyageter P.,Esmon C. The effect of aggregation & release on platelet prothrombin converting activity.
Blood 54:659-672,1979
- 19.- Davidson I.J.;Hemry B. Todd-Sanford; Diagnóstico clínico por el laboratorio.Edit. Salvat pag. 192-197,1978
- 20.- Dzik W.H. Platelet size in megaloblastic anemia (Letter).
Am.J. Clin. Pathol. 79(2):274-275,1983
- 21.- Dawes J.R.,Smith R.C.,Pepper D.S. The release,distribution & clearance of human B-TG & PF4.
Throm Res 12:851-861,1978
- 22.- de BoerA.,Hen P.,Turpie A.Plasma & urine B-TG concentration in patients with deep veins thrombosis.
Blood 58:693-698,1981
- 23.- Douglas J.T.,Shah M.,Lowe D.G. Plasma fibrinopeptide A & B-TG preeclampsia & pregnancy hipertencion.
Throm Haemost 47:54,1981

- 24.- Erlev A.J., Gabuzda T.G. HEMATOLOGIA: Aspectos fisiopatológicos. Edit. Interamericana. pag. 158-167, 1981
- 25.- Fareed J., Walenga J., Bick R. Impact of automation on the quantitation of low molecular weight markers of hemostatic defect. Semin Throm & Haemost 9:355-379, 1983
- 26.- Ferreras V.P. Medicina Interna Edit. Marín pag 414, 1980
- 27.- Files J., Malpas T, Yee E. Studies of human platelet alpha granule in vivo. Blood 58:607-618, 1981
- 28.- Fong J.S., Kapla B. S. Impairment of platelet aggregation in hemolytic uremic syndrome: Evidence for platelet exhaustion. Blood 60(3):564-570, 1982
- 29.- Handin R.I., Mc Donough M, Lesch M. Elevation of platelet factor 4 in acute myocardial infarction measured by RIA. J Lab Clin Med 91:340, 1978
- 30.- Harvey J.W., Larry D., Karen L.K. Heterogeneity in storage pool deficiency. Blood 54(6):1296-1316, 1979
- 31.- Hillman R.S., Finch C.A., Boggs D.R. Manual de Hematología. Edit Manual Moderno pag 56-62, 1977
- 32.- Hirs J. Blood test for the diagnosis of venous & arterial thrombosis. Blood 57:1-8, 1981
- 33.- Kaplan K.L., Hymie L.N. RIA of B-TG & PF4: Development & application to studies of platelet release in relation fibrinopeptide A generation. Br J Haemathol 39:129-146, 1978
- 34.- Kaplan K.L. & Owen J. Plasma levels of B-TG & PF4 activation in vivo. Blood 57(2):199-202, 1981

- 35.- Kaplan K.L, Broekman N.J., Chernoff A.G. Platelet alpha granule proteins: Studies on release & Subcellular localization. Blood 53(4):604-618, 1979
- 36.- Kreyszig E. Introducción a la estadística matemática; principios y métodos. Edit Limisa pag 160-168, 403-405, 1978
- 37.- Krupp M.A., Chatton M.J. Diagnostico clínico y tratamiento Edit Manual moderno pag 307, 1986
- 38.- Levine P.H. A qualitative platelet defect in severe vitamin B12 deficiency. Annals of Int Med 78:533-539, 1973
- 39.- Lindenbaum J. Status of laboratory testing in the diagnosis of megaloblastic anemia. Blood 61(4):624-626, 1983
- 40.- Ludlam C.A. Evidence for the platelet specificity of B-TG & studies on its plasma concentration in healthy individuals. Br J Haemathol 41:271-275, 1979
- 41.- Ludlam C.S., Moore A., Bolton D., Pepper D.S. The release of the human platelet specific protein measured by RIA. Thromb Res 6:543, 1975
- 42.- Matuda T., Seki T., Ogawara M. Comparison between plasma levels of B-TG & PF4 in various diseases. Throm Haemostas 42:228, 1979
- 43.- Mesmore H.L., Walenga J.M., Fareed J. Molecular markers of platelet activation. Sem Throm Haemost 10(4):264-267, 1984
- 44.- Michalski R., Lane D.A. Neutralization of heparin in plasma by PF4 & protamine sulphate. Br J Haemathol 38:561-571, 1978
- 45.- Needleman P., Wyche A., Raz A. Platelet & blood vessel arachidonate metabolism & interactions. J Clin Inv 63:345-349, 1979

- 46.- Nichols A.J., Owen J., Kaplan K.L. Fibrinopeptide A, PF4 & B-TG levels in coronary heart disease.
Blood 60:650-654, 1982
- 47.- O'Brien J.R., Etherington M. Heparin neutralizing activity test in the diagnosis of acute myocardial infarction.
J. Clin Path 28:975-979, 1975
- 48.- O'Brien J.R., Etherington M.D. B-TG & heparin neutralising activity test in clinical conditions.
The Lancet 28:1153-1154, 1977
- 49.- Owen J., Kvan D., Nessel H., Kaplan K.L. Thrombin & plasmin activity & platelet activation in the development of venous thrombin. Blood 61:476-482, 1983
- 50.- Penner J.A. Experience with a thrombin clotting time assay for measuring heparin activity.
Am J Clin Pathol 61:645-653, 1974
- 51.- Platt W.R. Atlas de hematología. Edit Jims pag 80, 618, 1982
- 52.- Rapaport S.I. Introducción a la hematología.
Edit Salvat pag 44-61, 1979
- 53.- Rucinski B., Niewiarowski S., Pranne J. Antiheparin protein secreted by human platelets, characterization & RIA.
Blood 53(1):47-61, 1979
- 54.- Schuh S., Rosenblatt D., Cooper B.A. Homocystinuria & megaloblastic anemia responsive to vitamin B12 therapy.
N Engl J Med 15:310(11):686-690, 1984
- 55.- Siess W., Lorenz R., Roth P. Chatecolamines, platelet aggregation & associated thromboxane formation after physical exercise, smoking or norepinephrin infusion.
Circulation 66:44-48, 1982

- 56.- Sneedecor G.W. Métodos estadísticos Edit. CEGSA
pag 86,89,138-154
- 57.- Van der Wayden MD., Fong H. Red cell basic ferritin content
of patients with megaloblastic anemia due to vitamin B12
or folate deficiency. Scand J Haematol 33(4):373-377,1984
- 58.- Van Ost, Veldhuysen B., Timmermans PM. Increased urinary
B-TG excretion in diabetes assayed with a modified RIA
kit-technique. Thromb haemost 49(1):16-20,1983
- 59.- Walz D.A. Platelet released proteins as molecular markers
for the activation process. Sem Thromb & Haemost 10(4):
270-276,1984
- 60.- William J.W. Hematología. Edit. Salvat.
pag 319-325,1273-1279,1980
- 61.- Zahavi J., Cella G., Dubiel M. The variability of plasma B-TG
in healthy individuals. Thromb Haemost 40:565,1978
- 62.- Zucker M.B. Fisiología de las plaquetas sanguíneas
Scientific American pag 46-57 feb.1974