

16.  
2y

---

---

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



"ESTANDARIZACION DE UNA TROMBOPLASTINA LOCAL EN  
RELACION AL INDICE INTERNACIONAL DE SENSIBILIDAD  
( ISI ) DE UN REACTIVO COMERCIAL DE ALTA CALIDAD"

---

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ALMA ELIZABETH PEREZ JIMENEZ

---

Asesor: Q.F.B. Araceli Escobedo Magallón

GUADALAJARA, JALISCO. , 1990

---

---

FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INDICE

	Pag.
I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	5
2.1. FACTORES DE LA VIA COMUN DE LA CASCADA DE COAGULACION	6
2.1.1. FIBRINOGENO	6
2.1.2. FACTOR V	8
2.1.3. FOSFOLIPIDOS	8
2.2. VITAMINA K	8
2.3. PROENZIMAS DE LA COAGULACION DEPENDIENTES DE VITAMINA K	10
2.3.1. PROTROMBINA (FACTOR II)	12
2.3.2. FACTOR VII	14
2.3.3. FACTOR IX	15
2.3.4. FACTOR X	16
2.4. ANTICOAGULANTES ORALES	17
III.-MATERIAL Y METODOS	20
PARTE a. MATERIAL	21
PARTE b. METODOS	23
IV.- RESULTADOS	36
V.- ANALISIS DE RESULTADOS	47
VI.- CONCLUSIONES	51
VII.-BIBLIOGRAFIA	54

INTRODUCCION

## INTRODUCCION

El tratamiento y la profilaxis de los trastornos trombóticos se realiza mediante la administración oral de medicamentos anticoagulantes a base de cumarina en forma crónica y agudamente con heparina intravenosa.

En la terapia a base de anticoagulantes orales se debe tener en cuenta el riesgo de sangrado que puede tener el paciente en caso de que no sea definida la dosis exacta de anticoagulante.

Para regular la intensidad de terapia anticoagulante el doctor se basa en el Tiempo de Protrombina (TP) en caso de cumáricos y en el Tiempo Parcial de Tromboplastina (TPT) en caso de heparina. El Tiempo de Protrombina se realiza utilizando una suspensión de tromboplastina hística, que se prepara a partir de extractos de cerebro o pulmón, de origen humano, conejo y de otros animales.

El problema para definir una dosis exacta de anticoagulante son las discrepancias que se observan en los resultados de la determinación del Tiempo de Protrombina entre diferentes laboratorios, las variables más importantes y en las que haremos énfasis en este trabajo son: el uso de tromboplastina de origen diferente y la forma de expresar los resultados.

La disponibilidad de tromboplastinas correctamente calibradas quizá sea el punto clave para lograr la normalización de la vigilancia del tratamiento anticoagulante oral.

Es por esto que la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) ha preparado tromboplastinas estables de referencia que se emplean para calibrar la actividad biológica de otras

preparaciones. En 1977 se elaboró, un patrón de referencia internacional a partir de cerebro humano, que es actualmente considerado como un patrón primario. Posteriormente en 1979 se elaboró un patrón a partir de tejido bovino y de conejo. Estas preparaciones permiten verificar la calidad y sensibilidad de los diferentes preparados comerciales en los que debe venir indicado su Índice Internacional de Sensibilidad (ISI), calculado en relación al patrón de referencia internacional que se considera de 1.0.(1)

El resultado del Tiempo de Protrombina puede ser expresado como tiempo en segundos; como tasa de protrombina (Tiempo de protrombina del paciente en segundos/Tiempo de protrombina del control en segundos), como porcentaje de actividad (Tiempo de protrombina del control en segundos/Tiempo de protrombina del paciente en segundos multiplicado por 100), pero cuando se conoce el Índice Internacional de Sensibilidad (ISI) de la tromboplastina, la mejor forma de expresar el Tiempo de Protrombina es en Índice Normalizado de Referencia (INR), que es un sistema de calibración uniforme que ha sido recomendado por un Comité Internacional, en el que la Tasa de Protrombina sea expresada en términos de Índice Normalizado de Referencia,(2,3) logrando esto dar un valor equivalente de Tiempo de Protrombina en cualquier laboratorio, sin importar el origen de la tromboplastina.

En este trabajo se va a estandarizar una Tromboplastina Local extraída a partir de cerebro de conejo, utilizaremos como patrón de referencia Tromborel S que es una tromboplastina comercial extraída de plaqueta humana (de Behring), la cual ya tiene calculado su Índice Internacional de Sensibilidad (ISI), determina-

do a partir de la preparación de referencia de la O.M.S..

Se utilizará esta tromboplastina ya que es difícil conseguir el patrón de referencia de la O.M.S. y además por ser Tromborel S considerada la preparación mejor calibrada de América Latina.

GENERALIDADES



### GENERALIDADES.

El Tiempo de Quick o de protrombina es el tiempo necesario para la coagulación de un plasma recalcificado en presencia de un exceso de tromboplastina hística. Explora fundamentalmente la función de la vía extrínseca de la coagulación, incluyendo el fibrinógeno, la protrombina (factor II) y los factores V, VII y X.

Esta prueba se utiliza principalmente para controlar los efectos de la terapia cumarínica, así como para estudiar a los pacientes con trastornos congénitos o adquiridos. Para medir el Tiempo de Protrombina se añade tromboplastina tisular y  $Ca^{2+}$  en concentración óptima, de esta forma el factor VII reacciona con el factor hístico y se forma un producto que convierte el factor X en su forma activa: el factor  $Xa$ ; este, a su vez, reacciona con el factor V, con el calcio y con los fosfolípidos del factor hístico para formar protrombinasa extrínseca, que convierte al fibrinógeno a fibrina. (6)

La velocidad de formación de la fibrina depende de la concentración de los factores V, VII, X, protrombina y fibrinógeno; esta prueba mide la actividad total de estos factores.

### 2.1 FACTORES DE LA VIA COMUN DE LA CASCADA DE COAGULACION.

#### 2.1.1. FIBRINOGENO.

El fibrinógeno se forma en el parenquima hepático.

Se trata de un dímero formado por dos mitades idénticas, cada una con tres cadenas llamadas  $\alpha$  (A),  $\beta$  (B) y  $\gamma$ . Cada cadena posee un extremo libre  $NH_2$  y otro  $COOH$ . El peso molecular del fibri



### 2.1.2. FACTOR V.

Este factor probablemente se forme en el hígado, pero no depende de la vitamina K para su formación. Solo se encuentra en el plasma y se consume al coagular la sangre. (7) Este factor desempeña un importante papel en las últimas etapas de la formación de tromboplastina.

El factor V actúa como cofactor con el factor X activado, fosfolípido y  $Ca^{+2}$  para formar el principio activo que convierte la protrombina. Tiene un peso molecular de 290,000.

### 2.1.3. FOSFOLÍPIDOS.

Los fosfolípidos también forman parte en el proceso de coagulación de la sangre, estos compuestos aceleran la coagulación sanguínea participando en las reacciones que afectan a los factores VIII y V. La fuente de fosfolípidos pueden ser las plaquetas o los componentes hísticos.

### 2.2. VITAMINA K.

Vitamina K es el nombre genérico de un grupo homólogo de vitaminas liposolubles, que consisten en derivados de 2-metil-1,4 naftoquinona. Su ausencia de los tejidos animales causa sangrado, debido a defectos en la coagulación. Este defecto en la coagulación es el resultado de una síntesis inadecuada de factores activos procoagulantes, II (protrombina), VII, IX y X.

Esta vitamina fue descubierta por el Dr. Dam en 1929, (9) al estudiar la biosíntesis de colesterol en pollos alimentados con una dieta libre de grasas, él observó que después de varios días

los pollos presentaban hemorragias subcutaneas e intraperitonea--  
les, esta enfermedad era causada por una sustancia previamente no  
reconocida, la ausencia de este factor causaba un retraso en la -  
coagulación de la sangre que fue finalmente rastreada hasta la  
ausencia de la actividad de protrombina. Esta sustancia se  
denominó vitamina K por Koagulación.

Como se han encontrado diferentes tipos de vitamina K, la  
Unión Internacional de Bioquímica a propuesto una nomenclatura  
para los derivados 2-metil-1,4 naftoquinona. (8)

Vitamina K1 .- Es la 2-metil-3-fitil-1,4 naftoquinona que es  
conocida como filoquinona. Su principal fuente alimenticia es la  
alfalfa y otros productos del reino vegetal.

Vitamina K2 .- Es una familia con una larga serie de homólogos  
que tiene cadenas isoprenil no saturadas. El nombre generico para  
este grupo es menaquinona (MK), con un sufijo que indica el  
número de unidades de isopreno (MK-n). Esta es aislada  
principalmente del pescado, se incrementa su cantidad cuando el -  
pescado esta en proceso de putrefacción.

Vitamina K3 .- Esta se conoce como menaquinona - 0.

La absorción de filoquinona y menaquinona requiere de la bilis  
y del jugo pancreatico, la vitamina K que viene en la dieta se -  
absorbe en el intestino delgado, incorporándose a los  
quilomicrones y a la linfa. Los sitios de captación de la  
vitamina K son: el hígado principalmente y luego sigue en orden  
de importancia piel y musculo.

La vitamina K que se ingiere se elimina rapidamente en 24  
horas, llegando a una reserva corporal relativamente baja  
respecto a otras vitaminas liposolubles, siendo esta reserva de

1 Mg por 1 Kg de peso corporal.

La función fisiológica de la vitamina K fue descubierta por -  
Dam y sus colaboradores, (10) cuando demostraron que la prolonga-  
ción en la coagulación, por deficiencia de vitamina K se debía a  
la reducción de la actividad de protrombina en el plasma. En los  
próximos 10 años se descubrieron otras 3 proteínas procoagulantes  
que también son reguladas por la vitamina K que son los factores  
VII, IX y X.

Más recientemente se han encontrado cuatro nuevas proteínas -  
dependientes de vitamina K que contienen residuos de ácido glutá-  
mico, que son: las proteínas C, M, S, y Z. Todas requieren de  
Ca<sup>+2</sup> ionizado para su actividad, presentan cierto parecido en su  
estructura con los factores dependientes de vitamina K.

La proteína C y S son anticoagulantes. La proteína C activada;  
en forma rápida y selectiva inactiva a los factores V y VIII que  
son los cofactores inmediatos para la activación del factor X y -  
II (protrombina), también estimula la fibrinólisis,  
presumiblemente por la liberación de un activador tisular de  
plasminógeno.

La proteína S facilita la inactivación del factor V, por la  
proteína C activada en presencia de fosfolípidos. El papel  
biológico de la proteína Z y M no se han definido.

Los cuatro factores de la coagulación dependientes de vitamina  
K son distribuidos en el sistema extrínseco que es activado por -  
daño celular. El sistema para la formación de estos factores  
requiere de un sustrato peptídico, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y de vitamina K. No -  
requiere de ATP.

La vitamina K que entra al organismo no es activa, esta se

activará hasta que sea reducida de la forma quinona a hidroquinona en los microsomas hepáticos. La forma reducida de la vitamina K es conocida como K1H2, esta actúa como un donador de electrones en un sistema de transporte de electrones microsómico para el cual el oxígeno es el aceptor terminal. Este sistema de transporte de electrones se acopla a una reacción de fijación de CO2 que convierte los puentes peptídicos del glutamato - -  
γ-carboxiglutamato.

Para entender mejor la formación de los factores dependientes de la vitamina K pasaremos a la Fig. 2-1.

Fig.2-1

El ciclo de la vitamina K en la formación de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K.

La vitamina K entra al organismo y es reducida a la forma de hidroquinona (Vitamina  $KH_2$ ). Tomaremos como primer paso en este esquema, la combinación de la carboxilasa activada más vitamina  $KH_2$  y  $O_2$ , que dan lugar a la vitamina  $KH-OOH$  (hidroperóxido).

El segundo paso es el acoplamiento de  $KH-OOH$  y la activación del péptido Glutámico, la adición del péptido estimula la carboxilación para formar el  $\gamma$ -carboxiglutamato (Gla) y además favorece la epoxidación de la forma  $KH-OOH$  para darnos  $K_2O$ , luego la forma reducida es regenerada por la epóxido-reductasa y por la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH).

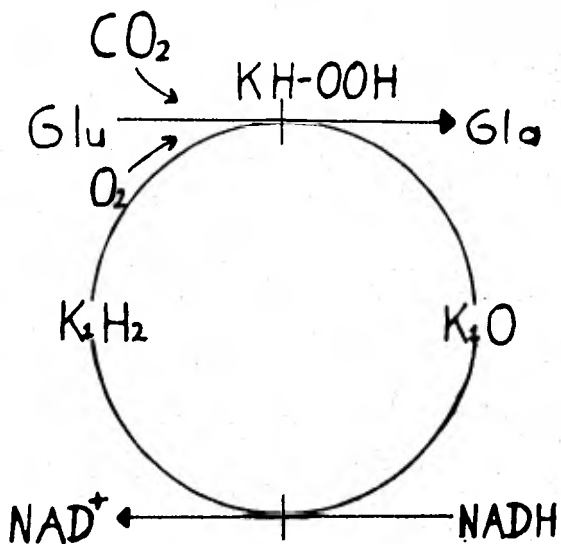


TABLA 2.a.

Características de las proenzimas de la coagulación dependientes de Vitamina K.

	FACTOR				PROTEINA			
CHARACTERISTICAS:	II	X	IX	VII	C	S	M	Z
Concentración en plasma mg/ml	10	20	5	1	10	1	< 1	< 1
Peso Molecular	72000	55000	55000	46000	57000	69000	50000	55000
Porcentaje de Carbohidrato	8	15	26	13	8	(+)	(+)	(+)
Numero de cadenas	1	2	1	1	2	1	1	1
Numero de residuos	10	12	12	10	11	10	+	13

## 2.3. PROENZIMAS DE LA COAGULACION DEPENDIENTES DE VITAMINA K.

### 2.3.1. PROTROMBINA (FACTOR II).

La protrombina se compone de una sola cadena polipeptídica con alanina como grupo terminal. Su molécula contiene un 8% de carbohidratos, los cuales consisten en hexosa, hexosamina y ácido siálico.

Los hidratos de carbono están localizados en tres o cuatro cadenas laterales, una de las cuales está adherida a la porción de la molécula que se convierte en trombina y las otras dos o tres a la molécula que se pierde durante la conversión de la protrombina en trombina. (13)



La estructura primaria de la protrombina esta caracterizada por la presencia de un aminoácido único, el ácido  $\gamma$  - carboxiglutámico.

El ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico que se encuentra en la protrombina le confiere la propiedad de fijar al  $Ca^{+2}$ .

La Vitamina K es esencial para la síntesis de ácido  $\gamma$  - carboxiglutámico, ya que este se forma por la adición de  $HCO_3^-$  a los residuos de ácido glutámico en el precursor de la protrombina.

La trombina se forma por la hidrólisis que sufren diversos enlaces peptídicos de la protrombina, esto es provocado por el factor X activado.

### 2.3.2. FACTOR VII.

Se considera como una proteína procoagulante, y es uno de los factores plasmáticos esenciales para el desarrollo de actividad de tromboplastina de origen tisular. Este factor para su producción constante depende de la Vitamina K. Este factor tiene dos formas, cada una de estas formas tiene diferente actividad coagulante.

La forma de cadena única del factor VII, es rapidamente hidrolizada por el factor Xa en presencia de fosfolípidos y calcio. La forma de dos cadenas tambien es hidrolizada por esta enzimas, pero la hidrolisis de estas dos cadenas da como resultado, pequeñas moléculas con actividad coagulante.

La forma de dos cadenas del factor VII tiene una actividad coagulante 85 veces mayor que la forma de cadena única, pero lo

que tienen en común estas cadenas es que ambas deben de ser completadas por el factor hístico, para de esta manera poder activar al factor X.

Este factor se encuentra tanto en el plasma como en el suero.

La actividad del factor VII en el suero parece ser superior a la que se desarrolla en el plasma, pero la actividad del factor VII en el plasma aumenta cuando ha sido expuesto a una superficie de cristal u otras superficies, se cree que el aumento de la actividad se debe a los factores de contacto que son el XII y XI.

Este factor es estable, siempre y cuando se guarde en las condiciones que se indican en los bancos de sangre, que son: Primero se toma la unidad de sangre que contiene 500 ml. de sangre total, esta unidad se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 30 minutos, de esta forma se obtiene el plasma y el paquete globular. Se separa el plasma y se congela.

El plasma fresco congelado es útil para tratar episodios de sangrado en pacientes con deficiencia de factor VII.

### 2.3.3. FACTOR IX.

Este factor se encuentra tanto en el plasma como en el suero. Este factor es termolábil, se conserva mejor a 4° C. a esta temperatura se conserva en cantidades normales durante 2 semanas, luego empieza a disminuir rápidamente. En el plasma fresco congelado se conserva durante largo tiempo.

Este factor es una cadena polipeptídica única que contiene 26% de carbohidratos, esta cadena única tiene a la tirosina como grupo terminal amino-libre y tiene puentes disulfuro

intramoleculares. El factor IX es activado por el factor XIa que rompe un enlace peptídico interno formando un intermedio enzimáticamente inactivo de dos cadenas con grupos extremos amino-libres tirosina y alanina, un segundo enlace peptídico es hidrolizado por el factor XIa, que libera un péptido de activación de la cadena mayor y forma con ello una proteína de dos cadenas con actividad enzimática. La cadena ligera formada, tiene un peso molecular de 10,000, presentando ésta la misma secuencia N-terminal, que presenta el factor IX intacto. La cadena pesada que tiene un peso molecular de 27,000 es el factor IXa.

#### C.3.4. FACTOR X.

Este factor se halla en el plasma y en el suero, es una glucoproteína que contiene 12% de hidratos de carbono. Se han aislado dos formas de factor X (llamados factor XI y factor XC).

El factor X consiste en dos cadenas polipeptídicas (cadena pesada y cadena ligera) conectadas por puentes disulfuro. El sitio activo de este factor parece hallarse en la cadena pesada.

El factor X activado (Xa), es el activador primario de la protrombina, esta reacción requiere  $Ca^{+2}$ , fosfolípidos y factor V como cofactor.

Se ha encontrado una estrecha semejanza estructural con la protrombina, por la presencia en la cadena ligera de unos 14 residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, que es el aminoácido que caracteriza a los factores de la coagulación dependientes de vitamina K.

#### 2.4. ANTICOAGULANTES ORALES.

Un trombo puede formarse en cualquier parte del sistema cardiovascular, incluyendo venas, arterias, el corazón y la microcirculación. El trombo venoso se forma en áreas de flujo lento o moderado, esta compuesto de una mezcla de células rojas, plaquetas y fibrina.

Las complicaciones de una trombosis pueden ser debidas a un obstrucción local o embolización tardía, pero se pueden prevenir tales complicaciones mediante un tratamiento anticoagulante muy bien vigilado por un doctor.

Los anticoagulantes no tienen efecto directo sobre un trombo ya establecido ni pueden revertir del daño tisular producido por la isquemia. Sin embargo, una vez que una trombosis ha ocurrido, el tratamiento anticoagulante tiene como objetivo prevenir una mayor extensión del coágulo ya formado y prevenir secundariamente, las complicaciones tromboembólicas que pueden dar como resultado graves y posiblemente fatales secuelas.

Entre los anticoagulantes orales podemos mencionar a la indandiona y a los anticoagulantes a base de cumarina como dicumarol, la dihidroxicumarina, la warfarina de sodio.

Para hablar de anticoagulantes orales, nos inclinaremos por la warfarina de sodio ya que es el antagonista más popular de la Vitamina K, utilizado en América, por tener las propiedades farmacológicas más favorables que el dicumarol y su toxicidad es menor que la de otros anticoagulantes.

La característica química esencial que le confiere a la cumarina su actividad anticoagulante como antagonista de la

Vitamina K es su núcleo 4-hidroxicumárico con un sustituyente en la tercera posición, la warfarina tiene un carbono asimétrico sustituyendo una tercera posición.

La warfarina sódica actúa deprimiendo la síntesis, en el hígado, de diversos factores que participan activamente en el mecanismo de la coagulación, en una gran variedad de trastornos caracterizados por fenómenos tromboembólicos. El efecto in-vivo de la warfarina sódica es la depresión en orden secuencial, de los factores VII, IX, X y II. El grado de depresión depende de la dosis administrada. (8)

Los anticoagulantes orales son antagonistas de la Vitamina K ya que interfieren en su regeneración metabólica, esto provoca una disminución de los factores dependientes de Vitamina K. Lo cual explica la acción hipotrombinémica de estas drogas. La forma en que actúan los anticoagulantes cumarínicos se explicará en la Fig. 2.2..

Después de su administración oral, su adsorción es completa alcanzando su máxima concentración plasmática en un lapso que dura de 1 a 7 horas. Aproximadamente el 97% de la warfarina sódica se liga a la albúmina del plasma e induce hipoprotrombinemia en 36 a 76 hr., pudiendo persistir la duración de este efecto hasta por 4 o 5 días, produciendo así una curva de respuesta, de larga duración, poco elevada. Además se elimina fácilmente por la orina.

La dosificación se debe adaptar a cada paciente de acuerdo con las respuestas obtenidas.

La mejor manera de regular la terapia con anticoagulantes orales es con el Tiempo de Protrombina. El tejido

tromboplastinico utilizado debe estar estandarizado con tromboplastina de referencia y debe realizarse una curva estandar a partir de plasma de referencia. El Tiempo de Protrombina (TP) es sensible a diversos factores de coagulación dependientes de Vitamina K; factor II, VII y X. El Tiempo de Protrombina debe de ser determinado diariamente cuando se empieza una terapia con anticoagulantes orales y luego se realizará la prueba semanalmente y posteriormente cada mes, esto se hace como control en aquellos pacientes que estan bajo terapia anticoagulante por largo plazo.

Se debe de tomar muy en cuenta que el rango de los valores terapéuticos de Tiempo de Protrombina varía de laboratorio a laboratorio.

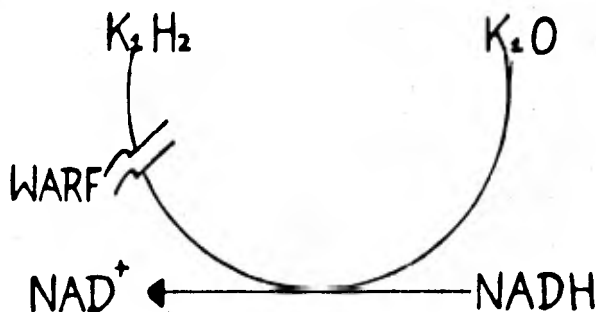


Fig. 2.2.

Esta es una parte del ciclo de la Vitamina K en la formación de los factores de la coagulación dependientes de Vitamina K. La warfarina actúa en este ciclo evitando que se forme la Vitamina K reducida ( $K_2H_2$ ), por lo tanto esto provoca una acumulación de epóxido de Vitamina K ( $K_2O$ ).

MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL Y METODOS

### PARTE a. MATERIAL.

#### 3.a.1. MATERIA PRIMA:

Cerebro de conejo (en este trabajo se utilizaron 7 cerebros de conejo).

#### 3.a.2. EQUIPO:

- Pinzas para cortar hueso
- Pinzas
- Tijeras
- Embudo
- Papel filtro
- Mortero y pilón
- Papel aluminio
- Hielo
- Fibrinómetro (de marca Behring)
- Tubos de ensayo (especiales para fibrinómetro)
- Tubos de ensayo de 75 x 10 mm.
- Papel parafilm
- Pipeta pasteur
- Baño maría a 50 C.
- Centrífuga
- Tubos de vacutainer (especiales para Tiempo de Protrombina)
- Vacutainer
- Agujas para vacutainer
- Balanza



- Termoblock

### 3.a.3. REACTIVOS.

- Acetona (de calidad farmacopea)
- Solución Salina Fisiológica
- Solución de Citrato de Sodio (concentración de 0.2 M y 0.11 M)
- Solución de Cloruro de Calcio 0.025 M
- Agua Destilada
- Tromborel S (tromboplastina cálcica de Behring)

## PARTE b. METODOS.

### METODOS PARA OBTENER LA TROMBOPLASTINA Y EL TIEMPO DE PROTROMBINA.

Para el proceso de obtención de tromboplastina de cerebro de conejo, que naturalmente se inicia con el sacrificio de los animales; la muerte de estos se provoca mediante la inyección de 60 cm<sup>3</sup>. de aire por la vena media de la oreja causándole una embolia gaseosa. De esta forma se obtiene que el animal no tenga mayores consecuencias que puedan influir en los resultados de la preparación de tromboplastina.

Es conveniente remover el cerebro inmediatamente después de matar al conejo, para ésto se procede de la siguiente forma: se hace una incisión longitudinal en la zona central de la piel dejando el craneo al descubierto. Con una pinza fuerte se incide la articulación occipitoatloidea, se recorta y se separa la calota craneana. Se corta la duramadre extrayendo el cerebro con la ayuda de un instrumento sin filo (puede servir el mango de la pinza). A medida que se van extrayendo los cerebros se van colocando en papel aluminio sobre hielo.

Luego se procede a limpiar los cerebros, quitándole todos los vasos sanguíneos, la piamadre y bulbo raquídeo (esto se hace con la ayuda de unas pinzas). Ya limpios los cerebros se lavan dos veces con un poco de solución salina fisiológica. Se colocan los cerebros en el mortero, se agrega 0.1ml. de citrato de sodio 0.2M por cada 3 cerebros; esto es para remover las posibles trazas de calcio.

Después de esto se cubren los cerebros con acetona (10 ml. por

cada cerebro), se presiona el material con la mano del mortero; en esta etapa hay que abstenerse de dividir el material; se vuelca la acetona y se agrega otra porción de acetona repitiendo el tratamiento anterior, se retira la segunda porción y se agrega una tercera, en este momento el material comienza a ser escamoso y se puede desintegrar. Se decanta la acetona que en esta etapa queda practicamente limpia, ya que las porciones anteriores salian opalescentes por la disolución de lípidos.

Se agrega una porción nueva de acetona y se muele el material cubierto por la acetona hasta obtener una sustancia granulosa.

Se filtra a través de un papel filtro y el polvo de tromboplastina se seca al aire libre, de un día para otro.

### 3.b.2. ACTIVACION DE LA TROMBOPLASTINA LOCAL.

Ya que tenemos nuestro polvo de tromboplastina seco, se procedemos a preparar los viales con los que se va a trabajar.

Para la preparacion de los viales, ocupamos tubos de ensayo de 75 x 10 mm., en los que se colocan 0.2 grs. de polvo de Tromboplastina, despues se sellan los tubos, con papel parafilm y se guardan los tubos ya preparados a 4°C.

La activacion de la tromboplastina, se va ir haciendo según se vaya ocupando.

Para activarla se agregan 3.5 ml. de solución salina fisiológica, al tubo que contiene la tromboplastina, se mezcla bien con una pipeta pasteur (procurando que no se formen muchas burbujas) y se incuba durante 20 minutos en un baño maría a 50°C (el baño se pone previamente a esta temperatura).

Ya que trascurrió este tiempo, se procede a centrifugar el tubo para obtener el sobrenadante que se pasara a otro tubo de ensayo (75 x 10 mm.).

Este sobrenadante es la Tromboplastina activada lista para usar.

### 3.b.3. OBTENCION DE LA MUESTRA.

Se seleccionaron muestras de sangre de pacientes normales.

Para la obtención de la muestra, se utilizaron tubos de vacutainer ya calibrados, estos contienen una parte de citrato de sodio al 0.11 M (0.5 ml) y el vacío necesario, para lograr una proporción de 1 a 9 con la sangre obtenida.

La muestra se toma por punción venosa, con el vacutainer, evitando la hemólisis de la muestra. Ya tomada la muestra se mezcla el citrato de sodio con la sangre, para obtener una muestra homogénea, esto se hace mediante una inversión repetida del tubo, procurando formar la menor cantidad de burbujas posibles, después de esto la muestra se centrifuga durante 10 minutos a 3000 r.p.m. de esta manera obtenemos un plasma pobre en plaquetas.

Después de la centrifugación, se va a observar un claro fraccionamiento de la sangre donde se obtiene el plasma y el paquete globular; se separa el plasma sobrenadante, con la ayuda de una pipeta pasteur y se pasa a un tubo de vidrio de 75 x 10 mm.

### 3.b.4. REALIZACION DE LA PRUEBA.

El principio de esta prueba (Tiempo de Protrombina) consiste en desencadenar el proceso de coagulación mediante la incubación del plasma con cantidades óptimas de tromboplastina y calcio; midiendo el tiempo transcurrido hasta la formación de un coágulo de fibrina.

#### a) TROMBOREL S.

Tromborel S es una tromboplastina cálcica humana, que sirve para la determinación del Tiempo de Protrombina, este producto es de la marca Behring. Tromborel S es una tromboplastina liofilizada que se ha extraído de tejido humano.

La preparación de Tromborel S consiste en disolver la tromboplastina liofilizada, con la cantidad de agua destilada indicada en el envase, después se incuba a 37°C. y está lista para la realización de la prueba, que consiste:

:	Pipetear en un tubo de ensayo precalentado a +37 C :	:	:
:	Plasma Citratado	:	0.1 ml. :
:		:	:
:	Incubar 1 minuto a + 37 C	:	:
:		:	:
:	Tromborel S (precalentado a + 37 C)	:	0.2 ml. :
:		:	:
:	Simultaneamente con el agregado de Tromborel S poner en marcha el cronómetro o el reloj del coagulómetro y determinar el tiempo de coagulación.	:	:

b) TROMBOPLASTINA LOCAL.

Esta tromboplastina estará lista para usar cuando ya sea activada ( esto se explica en la seccion 3.b.2.).

: Pipetear en un tubo de ensayo precalentado a +37 C	:	:
: Plasma citratado	: 0.1 ml.	:
: Tromboplastina Local (activada y precalentada a +37 C	: 0.1 ml.	:
: Incubar 1 minuto a +37 C		
: Cloruro de Calcio 0.025 M	: 0.1 ml.	:
: Simultaneamente con el agregado del Cloruro de Calcio 0.025M: poner en marcha el cronometro o el reloj del coagulometro y determinar el tiempo de coagulacion.		

Se analizaron 94 muestras de plasma normal, en donde 10 muestras formaron parte del "pool" de plasma y las 84 restantes fueron la poblacion analizada.

El Tiempo de Protrombina (TP) realizado a cada muestra se hizo por duplicado, se sacó un promedio entre los dos resultados, en el que la diferencia de uno a otro no debe de ser mayor de 0.5 segundos.

Cada muestra se analizó con Tromborel S y con la Tromboplastina Local.

## MÉTODOS PARA LA EVALUACION DE LAS TROMBOPLASTINAS.

En la evaluación de las tromboplastinas se incluirán los siguientes puntos: Curva de actividad, Sensibilidad, Reproducibilidad, Estabilidad y Rango terapéutico.

### 3.b.5. CURVA DE ACTIVIDAD.

La Curva de Actividad o Curva de Referencia, nos sirve para ver como se comporta el reactivo de tromboplastina, en caso de concentraciones bajas de Factor VII (por diluciones elevadas del plasma).

El trazado de la Curva de Referencia, se hace a partir de un "pool" de plasmas citratados de 10 donantes masculinos sanos de entre 18 a 40 años de edad. La serie de diluciones que se hacen, se preparan con solución isotónica de Cloruro de Sodio (NaCl 0.9%).

Porcentaje del normal	100 %	50 %	25 %
Dilución del Plasma	Sin diluir	1 + 1	1 + 3

Observación de resultados en: Cuadro 4.1, Cuadro 4.2, y Fig. 4.a.1..

### 3.b.6. SENSIBILIDAD.

Para poder obtener la sensibilidad de una tromboplastina, se tiene que observar que la diferencia en segundos de las concentraciones de 100 y de 50 por ciento, estén en un rango de 4

a 6 segundos. (14)

Pasar al cuadro 4.2..

### 3.b.7. REPRODUCIBILIDAD.

Este es uno de los varios requerimientos con los que debe contar el reactivo de tromboplastina, en este caso lo que se hizo fue la determinación de la media, de la desviación standar, de la T de Student y la observación del polígono de frecuencia para ambas tromboplastinas; los resultados se compararon entre ambas tromboplastinas (Tromborel S y Tromboplastina Local).

#### 3.b.7.1 MEDIA.

Esta es una medida de tendencia central, que comunmente la gente denomina "promedio". La media se obtiene, sumando todos los valcres en una población o muestra y dividiendo entre el número de valores que se sumaron.

Se usa  $\bar{x}$  para designar a la media de la muestra y n para indicar el número de valores en la muestra.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

#### 3.b.7.2. DESVIACION STANDAR.

Esta es una medida de dispersión, o bien la diseminación de los valores alrededor de la media. La Desviación Standar se denomina S, en este trabajo nos servirá para obtener el rango



normal de Tiempo de Tromboplastina en segundos.

Para la determinación de  $S$ , se resta la media de cada uno de los valores, se elevan al cuadrado las diferencias y a continuación se suman. Esta suma se divide entre el tamaño de la muestra, menos 1, de esta forma obtenemos la varianza ( $S^2$ ) a esta le sacamos la raíz cuadrada y obtendremos la desviación standar.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

El rango normal de Tiempo de Protrombina en segundos es igual a:

$$\pm 2 S \text{ de la } \bar{X}$$

Los valores para Tromborel S estaran representados en la Tabla 4.b. y los valores para la Tromboplastina Local en la Tabla 4.c.

#### 3.b.7.4. POLIGONO DE FRECUENCIA.

Esta es la representación gráfica, de la distribución de frecuencia de los Tiempo de Protrombina en segundos, para cada Tromboplastina. Tromborel S Fig. 4.a.2.. Tromboplastina local Fig. 4.a.3..

#### 3.b.8. ESTABILIDAD.

Para el estudio de estabilidad, se sometieron los tubos con

tromboplastina ya activada a las temperaturas de 4°C., 37°C. y 50° C. y se midió el Tiempo de Tromboplastina durante una semana utilizando plasmas normales. Esto se hizo solo para la Tromboplastina Local. Los resultados de estabilidad se encuentran en el Cuadro 4.3..

### 3.b.9. RANGO TERAPEUTICO.

El rango terapéutico se establece con los reactivos de Pathoplasma I y Pathoplasma II; de la marca Behring.

Pathoplasma se obtiene a partir de una mezcla de plasmas citratados provenientes de donantes sanos de 20 a 40 años de edad.

Mediante un procedimiento especial, los factores II, VII, IX y X son ajustados a niveles determinados. De esta manera son simulados los trastornos de la coagulación en la forma en que se presentan durante el tratamiento con anticoagulantes orales o en casos de deficiencias congénitas o adquiridas del sistema exógeno de la coagulación.

Pathoplasma I: Zona inferior de la Terapia Anticoagulante.

Pathoplasma II: Zona superior de la Terapia Anticoagulante.

Los resultados de las pruebas de Tiempo de Protrombina con Pathoplasma I y II se observan en el cuadro 4.4.

MÉTODOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA TROMBOPLASTINA.

OBTENCIÓN DEL ÍNDICE NORMALIZADO DE REFERENCIA (INR).

3.b.10. Determinación del Índice Internacional de Sensibilidad (ISI) de la Tromboplastina Local.

El Índice Internacional de Sensibilidad (ISI) se debe de calcular en relación al patrón de referencia internacional que se considera de 1.0, pero como es difícil conseguir este patrón de referencia de la O.M.S., lo calcularemos usando como patrón Tromborel S que tiene un Índice Internacional de Referencia de 1.04.

Para la determinación del Índice Internacional de Referencia (ISI) de la Tromboplastina Local tomaremos el promedio de las lecturas de Tiempo de Protrombina que se hicieron, para el "pool" de plasma normal, para el plasma ortho control, para Pathoplasma I y II. Las pruebas de Tiempo de Protrombina se hicieron utilizando Tromborel S y la Tromboplastina Local.

Con el promedio de las lecturas de Tiempo de Protrombina en segundos se sacará un ISI parcial para cada fase, esto se hará de la siguiente forma:

$$\text{ISI parcial} = \frac{(\text{ISI de Tromborel S}) (\text{TP promedio de cada fase con la Tromboplastina Local})}{\text{TP promedio de cada fase con Tromborel S}}$$

Los valores relacionados para la determinación del Índice Internacional de Sensibilidad (ISI) se observan en el cuadro 4.5.

Después de tener el ISI parcial de cada fase, sacaremos el Índice Internacional de Sensibilidad de la Tromboplastina Local.

$$\text{ISI de la Tromboplastina Local} = \frac{\sum \text{ISI parciales}}{4}$$

### 3.b.11. TASA DE PROTROMBINA. (PR)

Para llegar a la determinación del Índice Normalizado de Referencia (INR) se necesita sacar la Tasa de Protrombina para cada valor esto es igual a:

$$\text{TASA DE PROTROMBINA} = \frac{\text{TP de la muestra en segundos}}{\text{TP promedio de la población}}$$

Tiempo de Protrombina promedio para Tromborel S = 11.8"

Tiempo de Protrombina promedio para Tromboplastina Local = 19.5"

Estos fueron calculados como se indica en la sección 3.b.7.1.

### 3.b.12. DETERMINACION DEL INDICE NORMALIZADO DE REFERENCIA (INR).

Aunque todavía se puede observar variaciones en la Tasa de Protrombina cuando se usan diferentes Tromboplastinas, por medio del Índice Internacional de Sensibilidad (ISI) se trata de hacer que los valores de Tasa de Protrombina sean parecidos cuando se expresan en Índice Normalizado de Referencia (INR).

Indice Normalizado de Referencia = (Tasa de Protrombina)

La determinación de la Tasa de Protrombina y el Índice Normalizado de Referencia (INR), para cada muestra, utilizando Tromboplastina Local y Tromborel S se observaron en la Tabla 4.a.

### 3.b.13. PRUEBA DE AJUSTE DE BONDAD DE KOLMOGOROV-SMIRNOW.

Es una estimación entre 2 poblaciones para establecer si hay o no una diferencia significativa desde el punto de vista estadístico, relacionando valor por valor.

Esta relación se hizo entre los valores de Índice Normalizado de Referencia (INR), de ambas tromboplastinas. Los valores fueron acomodados en orden creciente, tanto para Tromborel S y para la Tromboplastina Local.

Para esto se hace una comparación entre una distribución teórica (en este caso serían los valores de Tromborel S) y una distribución de los datos de la muestra (serían los valores obtenidos por la Tromboplastina Local).

El interés por la Prueba de ajuste de bondad de Kolmogorov-Smirnow se centra en probar la hipótesis de que las distribuciones de las dos poblaciones tienen un 95% de similitud. Para esto se hace una comparación entre la frecuencia acumulada teórica (Frec.A(M)) y la frecuencia acumulada de la muestra (Frec.A(m)). Estos valores se expresan en la Tabla 4.d..

La diferencia entre la Frecuencia Acumulada Teórica, Frec.A(M), y la Frecuencia Acumulada de la Muestra, Frec.A(m), se mide por medio de la estadística  $g$ , que es la distancia vertical

máxima entre Frec.A(M) y Frec.A(m), para que haya una relación del 95% entre Tromborel S y la Tromboplastina Local.

La  $\alpha$  máxima se determina utilizando las tablas respectivas para esta prueba y en este caso es de 0.145. Para que la hipótesis sea válida  $a_1$  y  $a_2$  no deben de ser mayores de 0.145.

$a_1$  y  $a_2$  se expresan en la Tabla 4.d..

$a_1$  y  $a_2$  se determinan por la diferencia entre las Frecuencias Acumuladas de Tromborel S y de la Tromboplastina Local.

$$a_1 = \text{Frec.A(M)}_n - \text{Frec.A(m)}_{n-1}$$

$$a_2 = \text{Frec.A(M)}_n - \text{Frec.A(m)}_{n-1}$$

RESULTADOS

No. DE DONANTE	T R O M B O R E L S ; TIEMPO DE PROTROMBINA EN SEGUNDOS	TROMBOPLASTINA LOCAL ;
1	12.2"	19.7"
2	11.9"	18.5"
3	12.0"	19.8"
4	11.7"	18.9"
5	11.0"	17.0"
6	10.8"	16.5"
7	12.9"	20.4"
8	10.5"	16.7"
9	12.2"	20.0"
10	11.6"	17.5"

CUADRO 4.1. Determinación del Tiempo de Protrombina, con Tromborel S y con la Tromboplastina Local para los 10 donantes, que formaron el "pool" de plasma normal.



DILUCION (% DEL NORMAL)	TIEMPO DE PROTROMBINA			
	TROMBORELS		TROMBOPLASTINA LOCAL	
	SEGUNDOS	PR	SEGUNDOS	PR
100 %	11.05"	0.94	16.8"	0.86
50 %	16.55"	1.40	22.8"	1.17
25 %	26.7"	2.26	34.5"	1.77

CUADRO 4.3. Tiempo de Protrombina de las diluciones que se hicieron del "pool" de plasma normal. Los resultados en segundos son para determinar la sensibilidad y en Tasa de Protrombina (PR) para la Curva de Actividad.

No. DE DIAS	TIEMPO DE PROTROMBINA		
	4 C	37 C	50 C
1er	19.5"	19.4"	20.0"
2do	19.0"	18.5"	24.5"
3ro	10.7"	18.6"	25.3"
4to	19.4"	19.5"	29.0"
5to	19.0"	19.3"	32.4"
6to	19.4"	19.2"	40.3"
7mo	18.4"	18.6"	51.2"

CUADRO 4.3. Tiempo de Protrombina en segundos, realizado con la Tromboplastina Local sometida a diferentes temperaturas, durante el lapso de una semana.

REACTIVO	TROMBORELS	TROMBOPLASTINA LOCAL
PATHOPLASMA I	38.5"	32.7"
PATHOPLASMA II	62.7"	49.7"

CUADRO 4.4. Limite inferior y limite superior de la Terapia Anticoagulante en segundos.

"Pool" de plasma N.	Plasma control	Ortho	Pathoplasma I	Pathoplasma II
TROMBORELS	11.0"	12.6"	38.1"	62.7"
TROMBOPLASTINA LOCAL	15.8"	20.0"	33.5"	49.7"
ISI Parcial	1.59	1.65	0.91	0.82

CUADRO 4.5. Valores utilizados para determinar el Indice Internacional de Sensibilidad (ISI).

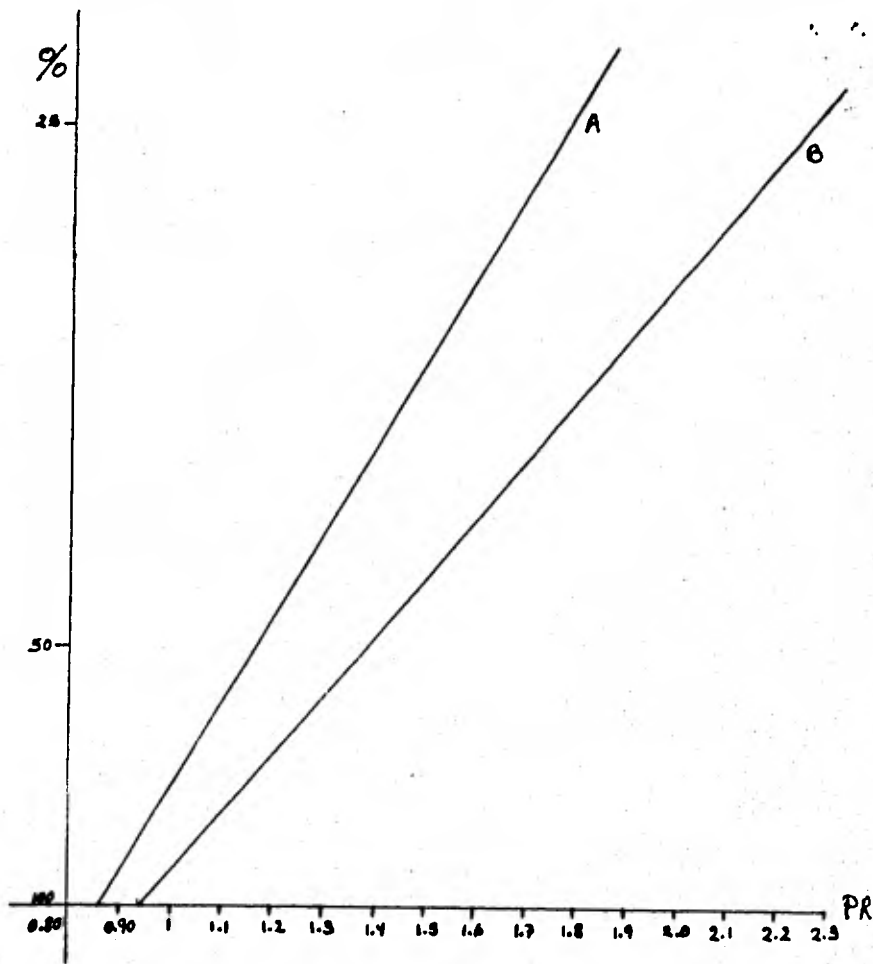


FIG. 4.a.1. Curva de Actividad.

A = Tromboplastina Local.

B = Tromborel S.

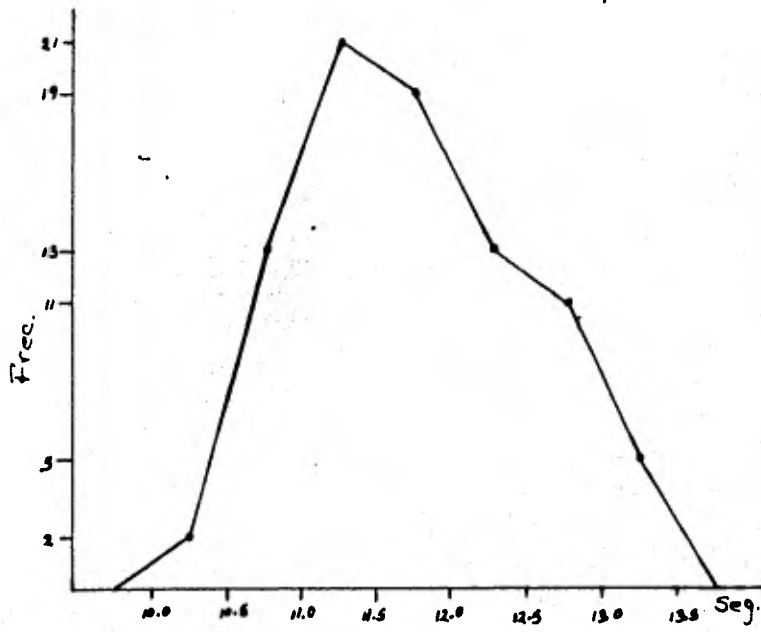


FIG. 4.a.2. Polígono de Frecuencia para Tromborel S.

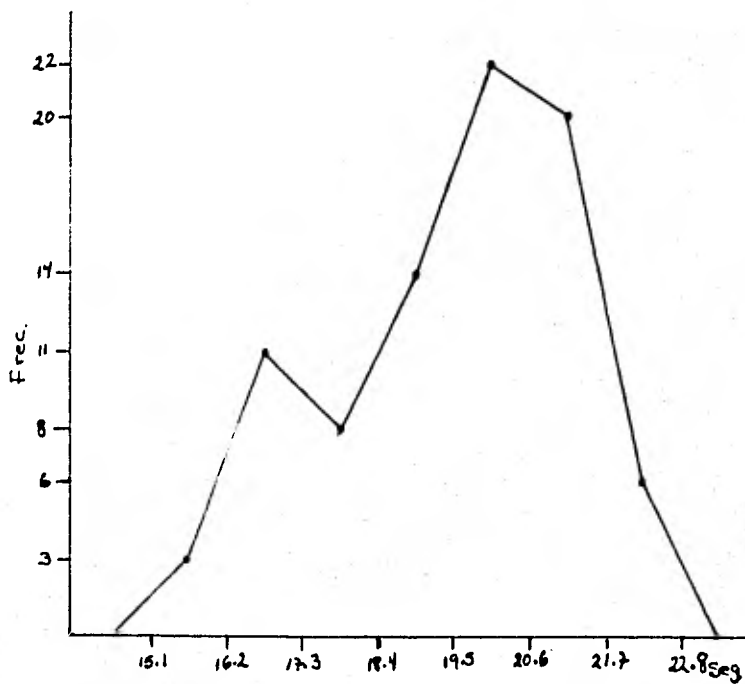


FIG. 4.a.3. Polígono de Frecuencia para la Tromboplastina local.

TABLA 4.a.

No.	TROMBORELS			TROMBOPLASTINA LOCAL		
	SEGUNDOS	PR	INR	SEGUNDOS	PR	INR
1	10.2"	0.86	0.85	16.0"	0.82	0.78
2	10.3"	0.87	0.86	16.2"	0.83	0.79
3	10.4"	0.90	0.90	16.5"	0.85	0.82
4	10.4"	0.90	0.90	16.6"	0.85	0.82
5	10.4"	0.90	0.90	16.2"	0.83	0.79
6	10.6"	0.90	0.90	16.9"	0.87	0.84
7	10.7"	0.91	0.91	17.8"	0.91	0.89
8	10.8"	0.92	0.92	16.5"	0.85	0.82
9	10.8"	0.92	0.92	16.9"	0.87	0.84
10	10.8"	0.92	0.92	17.2"	0.88	0.85
11	10.8"	0.92	0.92	16.6"	0.85	0.82
12	10.9"	0.92	0.92	16.5"	0.85	0.82
13	11.0"	0.93	0.93	17.5"	0.90	0.88
14	11.0"	0.93	0.92	16.5"	0.85	0.82
15	11.0"	0.93	0.93	17.1"	0.88	0.85
16	11.1"	0.94	0.94	18.0"	0.92	0.90
17	11.1"	0.94	0.94	19.2"	1.00	1.00
18	11.1"	0.94	0.94	18.0"	0.92	0.90
19	11.1"	0.94	0.94	18.8"	0.96	0.95
20	11.2"	0.95	0.95	19.6"	1.01	1.01
21	11.3"	0.96	0.96	16.8"	0.86	0.83
22	11.3"	0.96	0.96	17.2"	0.90	0.88
23	11.3"	0.96	0.96	18.4"	0.94	0.93
24	11.3"	0.96	0.96	18.2"	0.92	0.91
25	11.3"	0.96	0.96	18.7"	0.96	0.95
26	11.3"	0.96	0.96	18.7"	0.96	0.95
27	11.3"	0.96	0.96	18.6"	0.95	0.94
28	11.4"	0.97	0.97	19.5"	0.99	0.98
29	11.4"	0.97	0.97	19.1"	0.98	0.98
30	11.4"	0.97	0.97	19.7"	1.01	1.01
31	11.4"	0.97	0.97	20.5"	1.05	1.06
32	11.4"	0.97	0.97	18.6"	0.95	0.94
33	11.5"	0.97	0.97	20.3"	1.04	1.05
34	11.5"	0.97	0.97	19.2"	1.00	1.00
35	11.5"	0.97	0.97	20.8"	1.07	1.09
36	11.5"	0.97	0.97	20.8"	1.05	1.06
37	11.6"	0.98	0.98	20.2"	1.04	1.05
38	11.6"	0.98	0.98	19.2"	0.98	0.98
39	11.6"	0.98	0.98	19.5"	1.00	1.00
40	11.7"	0.99	0.99	19.2"	0.98	0.98
41	11.8"	1.00	1.00	20.5"	1.05	1.06
42	11.8"	1.00	1.00	19.6"	1.01	1.01
43	11.8"	1.00	1.00	19.9"	1.02	1.02
44	11.8"	1.00	1.00	20.0"	1.03	1.04
45	11.8"	1.00	1.00	19.2"	1.00	1.00
46	11.8"	1.00	1.00	19.8"	1.02	1.02
47	11.8"	1.00	1.00	19.6"	1.01	1.01
48	11.9"	1.01	1.01	19.8"	1.02	1.02
49	11.9"	1.01	1.01	20.9"	1.07	1.09
50	12.0"	1.02	1.02	20.2"	1.04	1.05
51	12.0"	1.02	1.02	19.9"	1.02	1.02
52	12.0"	1.02	1.02	20.9"	1.03	1.04
53	12.0"	1.02	1.02	20.4"	1.05	1.06
54	12.0"	1.02	1.02	19.2"	0.99	0.99
55	12.0"	1.02	1.02	21.7"	1.11	1.14
56	12.1"	1.03	1.03	21.2"	1.09	1.11
57	12.1"	1.03	1.03	20.2"	1.04	1.05
58	12.2"	1.03	1.03	21.8"	1.12	1.15
59	12.3"	1.04	1.04	21.2"	1.09	1.11
60	12.3"	1.04	1.04	20.7"	1.06	1.07
61	12.3"	1.04	1.04	21.0"	1.08	1.10
62	12.3"	1.04	1.04	20.4"	1.05	1.06
63	12.3"	1.04	1.04	20.5"	1.05	1.06
64	12.4"	1.05	1.05	21.5"	1.10	1.12
65	12.4"	1.05	1.05	21.4"	1.10	1.12
66	12.5"	1.06	1.06	19.3"	0.99	0.99
67	12.5"	1.06	1.06	19.7"	1.01	1.01
68	12.5"	1.06	1.06	21.8"	1.12	1.15
69	12.6"	1.07	1.07	20.7"	1.06	1.07
70	12.7"	1.08	1.08	20.8"	1.07	1.09
71	12.7"	1.08	1.08	21.0"	1.08	1.10
72	12.7"	1.08	1.08	20.7"	1.06	1.07
73	12.8"	1.08	1.08	21.5"	1.10	1.12
74	12.8"	1.08	1.08	20.5"	1.05	1.06
75	12.8"	1.08	1.08	21.3"	1.09	1.11
76	12.9"	1.09	1.09	21.1"	1.08	1.10
77	12.9"	1.09	1.09	21.3"	1.09	1.11
78	13.0"	1.10	1.10	21.4"	1.10	1.12
79	13.0"	1.10	1.10	21.7"	1.11	1.14
80	13.2"	1.12	1.12	21.7"	1.11	1.14
81	13.3"	1.13	1.14	21.8"	1.12	1.15
82	13.4"	1.13	1.14	22.6"	1.16	1.20
83	13.5"	1.14	1.15	22.1"	1.13	1.16
84	13.5"	1.14	1.15	22.0"	1.13	1.16

Relación del índice Normalizado de Referencia (INR) de los 84 pacientes que formaron parte de este trabajo, estos datos se obtuvieron con Tromborel B y con la Tromboplastina Local.  
 \*Tiempo de protrombina (PR).  
 \*Tiempo de protrombina (segundos).

TABLA 4.b.

No.	SEGUNDOS	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$
1	10.2"	-1.6	2.56
2	10.3"	-1.5	2.25
3	10.6"	-1.2	1.44
4	10.6"	-1.2	1.44
5	10.6"	-1.2	1.44
6	10.6"	-1.2	1.44
7	10.7"	-1.1	1.21
8	10.8"	-1.0	1.00
9	10.8"	-1.0	1.00
10	10.8"	-1.0	1.00
11	10.8"	-1.0	1.00
12	10.9"	-0.9	0.81
13	11.0"	-0.8	0.64
14	11.0"	-0.8	0.64
15	11.0"	-0.8	0.64
16	11.1"	-0.7	0.49
17	11.1"	-0.7	0.49
18	11.1"	-0.7	0.49
19	11.1"	-0.7	0.49
20	11.2"	-0.6	0.36
21	11.3"	-0.5	0.25
22	11.3"	-0.5	0.25
23	11.3"	-0.5	0.25
24	11.3"	-0.5	0.25
25	11.3"	-0.5	0.25
26	11.3"	-0.5	0.25
27	11.3"	-0.5	0.25
28	11.4"	-0.4	0.16
29	11.4"	-0.4	0.16
30	11.4"	-0.4	0.16
31	11.4"	-0.4	0.16
32	11.4"	-0.4	0.16
33	11.5"	-0.3	0.09
34	11.5"	-0.3	0.09
35	11.5"	-0.3	0.09
36	11.5"	-0.3	0.09
37	11.6"	-0.2	0.04
38	11.6"	-0.2	0.04
39	11.6"	-0.2	0.04
40	11.7"	-0.1	0.01
41	11.8"	0	0
42	11.8"	0	0
43	11.8"	0	0
44	11.8"	0	0
45	11.8"	0	0
46	11.8"	0	0
47	11.8"	0	0
48	11.9"	0.1	0.01
49	11.9"	0.1	0.01
50	12.0"	0.2	0.04
51	12.0"	0.2	0.04
52	12.0"	0.2	0.04
53	12.0"	0.2	0.04
54	12.0"	0.2	0.04
55	12.0"	0.2	0.04
56	12.1"	0.3	0.09
57	12.1"	0.3	0.09
58	12.2"	0.4	0.16
59	12.2"	0.4	0.16
60	12.3"	0.5	0.25
61	12.3"	0.5	0.25
62	12.3"	0.5	0.25
63	12.3"	0.5	0.25
64	12.4"	0.6	0.36
65	12.4"	0.6	0.36
66	12.5"	0.7	0.49
67	12.5"	0.7	0.49
68	12.5"	0.7	0.49
69	12.6"	0.8	0.64
70	12.7"	0.9	0.81
71	12.7"	0.9	0.81
72	12.7"	0.9	0.81
73	12.8"	1.0	1.00
74	12.8"	1.0	1.00
75	12.8"	1.0	1.00
76	12.9"	1.1	1.21
77	12.9"	1.1	1.21
78	13.0"	1.2	1.44
79	13.0"	1.2	1.44
80	13.2"	1.4	1.96
81	13.3"	1.5	2.25
82	13.4"	1.6	2.56
83	13.5"	1.7	2.89
84	13.5"	1.7	2.89
	991.3"		31.83

Resultados de Tiempo de Prorombina; utilizando  
Tronbarel S. Estos resultados sirvieron para deter-  
minar la  $\bar{X}$  y S.

TABLA 4.2.

No.	SEGUNDOS	(x <sub>i</sub> - $\bar{x}$ )	(x <sub>i</sub> - $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>
1	15.2"	-4.3	18.49
2	16.0"	-3.5	12.25
4	16.5"	-3.0	9
5	16.5"	-3.0	9
6	16.5"	-3.0	9
7	16.5"	-3.0	9
8	16.6"	-2.9	8.41
9	16.6"	-2.9	8.41
10	16.8"	-2.7	7.29
11	16.9"	-2.6	6.76
12	16.9"	-2.6	6.76
13	17.1"	-2.4	5.76
14	17.2"	-2.3	5.29
15	17.5"	-2.0	4.0
16	17.5"	-2.0	4.0
17	17.5"	-2.0	4.0
18	17.8"	-1.7	2.89
19	18.0"	-1.5	2.25
20	18.0"	-1.5	2.25
21	18.2"	-1.3	1.69
22	18.4"	-1.1	1.21
23	18.6"	-0.9	0.81
24	18.6"	-0.9	0.81
25	18.7"	-0.8	0.64
26	18.7"	-0.8	0.64
27	18.8"	-0.7	0.49
28	19.1"	-0.4	0.16
29	19.2"	-0.3	0.09
30	19.3"	-0.3	0.09
31	19.3"	-0.3	0.09
32	19.3"	-0.3	0.09
33	19.5"	0	0
34	19.5"	0	0
35	19.5"	0	0
36	19.5"	0	0
37	19.6"	0.1	0.01
38	19.6"	0.1	0.01
39	19.6"	0.1	0.01
40	19.7"	0.2	0.04
41	19.7"	0.2	0.04
42	19.8"	0.3	0.09
43	19.8"	0.3	0.09
44	19.9"	0.4	0.16
45	19.9"	0.4	0.16
46	20.0"	0.5	0.25
47	20.0"	0.5	0.25
48	20.2"	0.7	0.49
49	20.2"	0.7	0.49
50	20.2"	0.7	0.49
51	20.2"	0.7	0.49
52	20.4"	0.9	0.81
53	20.4"	0.9	0.81
54	20.4"	0.9	0.81
55	20.5"	1	1
56	20.5"	1	1
57	20.5"	1	1
58	20.5"	1	1
59	20.7"	1.2	1.44
60	20.7"	1.2	1.44
61	20.7"	1.2	1.44
62	20.8"	1.3	1.69
63	20.8"	1.3	1.69
64	20.9"	1.4	1.96
65	21.0"	1.5	2.25
66	21.0"	1.5	2.25
67	21.1"	1.6	2.56
68	21.2"	1.7	2.89
69	21.2"	1.7	2.89
70	21.3"	1.8	3.24
71	21.3"	1.8	3.24
72	21.3"	1.8	3.24
73	21.4"	1.9	3.61
74	21.5"	2.0	4.0
75	21.5"	2.0	4.0
76	21.7"	2.2	4.84
77	21.7"	2.2	4.84
78	21.7"	2.2	4.84
79	21.8"	2.3	5.29
80	21.8"	2.3	5.29
81	21.8"	2.3	5.29
82	22.0"	2.5	6.25
83	22.1"	2.6	6.76
84	22.6"	3.1	9.61
<b>T</b>	<b>1637.3"</b>	<b>0</b>	<b>240.83</b>

Resultados de Tiempo de protrombina, utilizando la Tromboplastina Local. Estos valores se usaron para determinar la  $\bar{x}$  y S.



TABLA 4. d.

INO.	IN(R)I	IN(R)Iat	Frec. R(IN)I	Frec. A(IN)I	Frec. R(at)I	Frec. A(at)I	a1	a2
1	0.85	0.78	0.010	0.010	0.008	0.008	0.011	0.001
2	0.86	0.79	0.010	0.010	0.009	0.010	0.013	0.002
3	0.90	0.79	0.011	0.031	0.007	0.027	0.013	0.004
4	0.90	0.82	0.011	0.042	0.010	0.037	0.016	0.005
5	0.90	0.82	0.011	0.053	0.010	0.047	0.017	0.006
6	0.90	0.82	0.011	0.064	0.010	0.057	0.018	0.007
7	0.91	0.82	0.011	0.075	0.010	0.067	0.019	0.008
8	0.92	0.82	0.011	0.086	0.010	0.077	0.020	0.009
9	0.92	0.82	0.011	0.097	0.010	0.087	0.021	0.010
10	0.92	0.83	0.011	0.108	0.010	0.097	0.022	0.011
11	0.92	0.84	0.011	0.119	0.010	0.107	0.023	0.012
12	0.92	0.84	0.011	0.130	0.010	0.117	0.024	0.012
13	0.93	0.85	0.011	0.141	0.010	0.127	0.025	0.014
14	0.93	0.85	0.011	0.152	0.010	0.137	0.026	0.015
15	0.93	0.88	0.011	0.163	0.010	0.147	0.027	0.016
16	0.94	0.88	0.011	0.174	0.010	0.157	0.028	0.017
17	0.94	0.88	0.011	0.185	0.010	0.167	0.029	0.018
18	0.94	0.89	0.011	0.196	0.011	0.178	0.029	0.018
19	0.94	0.90	0.011	0.207	0.011	0.189	0.029	0.018
20	0.95	0.90	0.011	0.218	0.011	0.200	0.029	0.018
21	0.96	0.91	0.011	0.229	0.011	0.211	0.029	0.018
22	0.96	0.93	0.011	0.240	0.011	0.222	0.029	0.018
23	0.96	0.94	0.011	0.251	0.011	0.233	0.029	0.018
24	0.96	0.94	0.011	0.262	0.011	0.244	0.029	0.018
25	0.96	0.95	0.011	0.273	0.011	0.255	0.029	0.018
26	0.96	0.95	0.011	0.284	0.011	0.266	0.029	0.018
27	0.96	0.95	0.011	0.295	0.011	0.277	0.029	0.018
28	0.97	0.98	0.012	0.307	0.012	0.289	0.030	0.018
29	0.97	0.98	0.012	0.319	0.012	0.301	0.030	0.018
30	0.97	0.98	0.012	0.331	0.012	0.312	0.030	0.018
31	0.97	0.99	0.012	0.343	0.012	0.323	0.030	0.018
32	0.97	0.99	0.012	0.355	0.012	0.337	0.030	0.018
33	0.97	1.00	0.012	0.367	0.012	0.349	0.030	0.018
34	0.97	1.00	0.012	0.379	0.012	0.361	0.030	0.018
35	0.97	1.00	0.012	0.391	0.012	0.373	0.030	0.018
36	0.97	1.00	0.012	0.403	0.012	0.385	0.030	0.018
37	0.98	1.01	0.012	0.415	0.012	0.397	0.030	0.018
38	0.98	1.01	0.012	0.427	0.012	0.409	0.030	0.018
39	0.98	1.01	0.012	0.439	0.012	0.421	0.030	0.018
40	0.99	1.01	0.012	0.451	0.012	0.433	0.030	0.018
41	1.00	1.01	0.012	0.463	0.012	0.445	0.030	0.018
42	1.00	1.02	0.012	0.475	0.012	0.457	0.030	0.018
43	1.00	1.02	0.012	0.487	0.012	0.469	0.030	0.018
44	1.00	1.02	0.012	0.499	0.012	0.481	0.030	0.018
45	1.00	1.02	0.012	0.511	0.012	0.493	0.030	0.018
46	1.00	1.04	0.012	0.523	0.012	0.505	0.030	0.018
47	1.00	1.04	0.012	0.535	0.012	0.517	0.030	0.018
48	1.01	1.05	0.012	0.547	0.012	0.529	0.030	0.018
49	1.01	1.05	0.012	0.559	0.012	0.541	0.030	0.018
50	1.01	1.05	0.012	0.571	0.012	0.553	0.030	0.018
51	1.02	1.05	0.012	0.583	0.012	0.565	0.030	0.018
52	1.02	1.06	0.012	0.595	0.012	0.577	0.029	0.017
53	1.02	1.06	0.012	0.607	0.012	0.589	0.028	0.016
54	1.02	1.06	0.012	0.619	0.012	0.601	0.027	0.015
55	1.02	1.06	0.012	0.631	0.012	0.613	0.027	0.014
56	1.02	1.06	0.012	0.643	0.012	0.625	0.025	0.011
57	1.02	1.06	0.012	0.655	0.012	0.637	0.024	0.011
58	1.02	1.06	0.012	0.667	0.012	0.649	0.023	0.011
59	1.04	1.07	0.012	0.679	0.012	0.661	0.022	0.010
60	1.04	1.07	0.012	0.691	0.012	0.683	0.021	0.009
61	1.04	1.07	0.012	0.703	0.012	0.695	0.019	0.006
62	1.04	1.09	0.012	0.715	0.012	0.708	0.018	0.005
63	1.04	1.09	0.012	0.727	0.012	0.721	0.017	0.004
64	1.05	1.09	0.012	0.739	0.012	0.734	0.017	0.004
65	1.05	1.10	0.012	0.751	0.012	0.747	0.017	0.004
66	1.06	1.10	0.012	0.763	0.012	0.760	0.017	0.004
67	1.06	1.10	0.012	0.775	0.012	0.773	0.017	0.004
68	1.06	1.11	0.012	0.787	0.012	0.786	0.017	0.004
69	1.07	1.11	0.012	0.800	0.012	0.799	0.017	0.004
70	1.08	1.11	0.012	0.812	0.012	0.812	0.017	0.004
71	1.08	1.11	0.012	0.824	0.012	0.825	0.017	0.004
72	1.08	1.12	0.012	0.836	0.012	0.838	0.017	0.004
73	1.08	1.12	0.012	0.848	0.012	0.851	0.017	0.004
74	1.08	1.12	0.012	0.860	0.012	0.864	0.017	0.004
75	1.08	1.12	0.012	0.872	0.012	0.877	0.017	0.004
76	1.09	1.14	0.012	0.884	0.012	0.891	0.016	0.003
77	1.09	1.14	0.012	0.896	0.012	0.905	0.015	0.002
78	1.10	1.14	0.012	0.908	0.012	0.919	0.014	0.001
79	1.10	1.15	0.012	0.920	0.012	0.933	0.013	0.000
80	1.12	1.15	0.012	0.932	0.012	0.947	0.012	0.000
81	1.14	1.15	0.014	0.944	0.014	0.961	0.011	0.000
82	1.14	1.16	0.014	0.956	0.014	0.975	0.010	0.000
83	1.15	1.16	0.014	0.968	0.014	0.989	0.009	0.000
84	1.15	1.20	0.014	1.004	0.014	1.003		
184.04	184.23	1.002		1.003				

Ia) Con este símbolo se representan los valores correspondientes a la -  
Tromboplastina Local.  
II) Con este símbolo se representan los valores correspondientes a la  
tromboplastina comercial (Trombores S).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### ANALISIS DE RESULTADOS.

Los resultados observados en el Cuadro 4.2. y en la Fig. 4.a.1. nos dan a conocer el comportamiento de la Curva de Actividad en donde podemos observar que la Tromboplastina Local, no presenta una variación proporcional entre la Tasa de Protrombina y la concentración del plasma.

Los valores que se muestran en el Cuadro 4.2. tambien son útiles para determinar la sensibilidad de la Tromboplastina Local, para esto se tiene que observar la diferencia en segundos entre las concentraciones de 100 y 50 por ciento, en este caso fue de 6 segundos, por lo tanto podemos afirmar que la Tromboplastina Local responde a las disminuciones del factor VII.

La Tabla 4.a. nos muestra, el comportamiento del Tiempo de Protrombina de cada paciente con ambas tromboplastinas. Tromborel S y Tromboplastina Local.

Los valores expresados en la Tabla 4.b. y 4.c. nos sirvieron para determinar el valor de la media (X) y de la desviación standar (S) para cada tromboplastina. Con estas tablas podemos decir que:

El valor medio y rango de los Tiempos de Protrombina efectuados con la Tromboplastina Local, usando 84 plasmas normales:

19.5 (16.1 - 22.9) Seg.

El valor medio y rango de los Tiempos de Protrombina efectuados con Tromborel S, usando los mismos 84 plasmas normales:

11.8 (10.2 - 13.4) Seg.

En las Figs. 4.a.2 y 4.a.3. que representan el Polígono de Frecuencia para Tromborel S y la Tromboplastina Local respectivamente, podemos observar, que en los rangos mas frecuentes, se encuentra la media para cada Tromboplastina.

Los valores que se muestran en el Cuadro 4.3. son los resultados de la prueba de Estabilidad de la Tromboplastina Local. En los que se puede observar que la Tromboplastina Local sometida a 4°C y 37°C durante una semana, permaneció estable, ya que no se obtuvieron variaciones sinificativas en los valores de Tiempo de Protrombina usando plasmas normales.

Los valores prolongados obtenidos con el reactivo sometido a 50°C, hacen pensar que el reactivo sufrió algún proceso de desnaturalización en su molécula, más que un proceso de degradación.

El cuadro 4.4. nos muestra los valores de Rango Terapéutico obtenidos con Pathoplasma I y II, en donde el limite inferior es de 32.7 segundos y el limite superior de 49.7 segundos. Este rango no queda del todo establecido debido a que estos reactivos son ajustados a que se comporten segun la Terapia anticoagulante.

El Indice Internacional de Sensibilidad (ISI) de la Tromboplastina Local se determinó con los valores que se muestran en el Cuadro 4.5.. El Indice Internacional de Sensibilidad para la Tromboplastina preparada fue de 1.24.

Para la prueba de ajuste de bondad de Kolmogorok-Smirnov, los resultados se encuentran expresados en la Tabla 4.d., con estos resultados podemos decir que hay un 95% de similitud entre la tromboplastina de origen animal y la tromboplastina de origen humano, siempre y cuando los valores de Tiempo de Protrombina

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

sean expresados en unidades internacionales de Índice Normalizado de Referencia (INR).

C O N C L U S I O N E S

## CONCLUSIONES.

### CONCLUSIONES PARTICULARES RESPECTO A LA TROMBOPLASTINA LOCAL.

En cuanto a la sensibilidad, la Tromboplastina Local fue menos sensible que Tromborel S, esto se debe al diferente origen de las tromboplastinas, ya que las tromboplastinas de origen humano, en este caso Tromborel S son mucho más sensibles a la disminución de los factores circulantes dependientes de Vitamina K. Especialmente a la concentración de factor VII hablando de Tiempo de Protrombina.

Con los estudios estadísticos que se realizaron se puede corroborar que ambas tromboplastinas son confiables y reproducibles.

En cuanto a su Estabilidad podemos asegurar que es adecuada por lo tanto es factible producir un lote de buen tamaño de tromboplastina tisular que pueda conservarse en refrigeración por tiempos prolongados sin que esta preservación afecte su actividad.

Para establecer un rango terapéutico real, es necesario trabajar con pacientes anticoagulados para observar su comportamiento clínico, debido a que a veces, aunque los pacientes se mantengan en el rango terapéutico estos presentan un riesgo de sangrado. Por lo tanto el rango terapéutico establecido en este trabajo no se debe utilizar para controlar a un paciente anticoagulado.

El rango normal establecido se debe de confirmar con un estudio más amplio, el cual tenga una población de pacientes

mayor.  
CONCLUSION FINAL.

Con este trabajo se demuestra la factibilidad de producir una Tromboplastina a nivel local, que sea de alta calidad, estable, sensible, reproducible y cuyo costo de producción sea bajo.

La ventaja de producir una tromboplastina a nivel local es de que haya la posibilidad de estandarizarla de acuerdo a los patrones de referencia internacionales con el objeto de reportar los resultados de Tiempo de Protrombina en unidades internacionales de Índice Normalizado de Referencia (INR), ya que la creación de estas unidades y de los patrones de referencia de la O.M.S. se realizaron con el fin de calibrar las tromboplastinas y de reportar en estas unidades el Tiempo de Protrombina, para eliminar de esta forma, la diferencia que se presenta al reportarlo en porcentaje de actividad, Tasa de protrombina o en segundos.

El objetivo de este estudio fue buscar la posibilidad de preparar una tromboplastina a partir de cerebro de conejo que diera buenos resultados, pero con un método análogo al anterior podemos obtener tromboplastina de mejor calidad, utilizando como materia prima cerebro humano o placenta, esta tromboplastina acortaría el rango de dispersión en los valores, su costo de producción sería igual de bajo y por lo tanto disminuiría el costo de funcionamiento del laboratorio.



BIBLIOGRAFIA

#### BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Joan Lluís Vives., MANUAL DE TECNICAS DE LABORATORIO DE HEMATOLOGIA. 1ra. edición. México, D.F. Editorial Salvat. 1987.
- 2.-ICTH/ICSH: REPORT OF THE EXPERT PANEL ON ORAL ANTICOAGULANT CONTROL. Thromb Haemost.42:1073 - 1114.1979.
- 3.-Loeliger EA: THE OPTIMAL THERAPEUTIC RANGE IN ORAL ANTICOAGULATION HISTORY AND PROPOSAL. Thromb Haemost.42:1141-1152.1979.
- 4.-DR. Abel Bello., HEMATOLOGIA BASICA. Ediciones Medicas del Hospital Infantil de Mexico.1983.
- 5.-Blomback, M.: ON THE MOLECULAR STRUCTURE OF FIBRINOGENO.Thromb-Diath.Haemorrh.54:117.1973.
- 6.-William J. Williams., HEMATOLOGIA.2da edición. Editorial Salvat.1987.
- 7.-Douglas, A.S:FACTOR V CONSUMPTION DURING BLOOD COAGULATION.Br.J. Haematol., 2:153.1956.
- 8.-IUFAC-IUB, COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURA:TENTATIVE RULES.J.Biol Chem 241: 2987-2994.1966.
- 9.-Dam H:CHOLESTERINST OFF WECHSEL IN HUHNEREIERN AND HUHNCHEN. Biochem Zeitsch. 215:475-492.1969.
- 10.-Dam H:STUDIES ON THE MODE OF ACTION OF VITAMIN K.Biochem J. 30: 1075-1079.1966.
- 11.-Escydera J:TEORIA Y FRACCTICA DEL TRATAMIENTO ANTICOAGULANTE A LARGO PLAZD. Principio Cardiológico 6356:382.1959.
- 12.-Nack, D.D.:SOLUBLE ENZYME SYSTEM FOR VITAMIN K DEPENDENT CARBOXYLATION. J. Biol. Chem.251:3269.1976.
- 13.-Lanchantim, G.F.:AMINO ACID COMPOSITION OR HUMAN PLASMA

PROTHROMBIN J. Biol. Chem. 243: 5479.1970.

14.-T.B.L. Kirkwood:CALIBRATION OF REFERENCE THROMBOPLASTINS AND  
STANDARDISATION OF THE PROTHROMBIN TIME RATIO. Thromb.Haemost.49:  
238-244.1983.

15.-Robert W. Colman., HEMOSTASIS AND THROMBOSIS BASIC, Ed.  
Lippincott.1982-1987.