



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DESARROLLO DE LA METODOLOGIA DE OBTENCION,
PREPARACION Y FABRICACION DE UNA TROMBOPLASTINA
TISULAR LIOFILIZADA, DE CEREBRO DE CONEJO,
CONFIABLE PARA USO EN EL LABORATORIO CLINICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
BEATRIZ ELENA SANCHEZ CARRILLO

ASESOR: Q.F.B. HUGO LEYNEZ CELISEO

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
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 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

I. Resumen.....	1
II. Introduccion.....	2
III. Planteamiento del problema.....	4
IV. Marco Tebrico.....	6
IV.1. Coagulaci3n y hemostasia.....	6
IV.2. Sistema intrinseco y extrinseco.....	9
IV.3. Mecanismo de la coagulaci3n.....	13
IV.4. Anticoagulantes.....	19
IV.5. Anticoagulantes orales.....	20
IV.6. Estandarizaci3n de tromboplastinas.....	23
IV.6.1. Defini3n de tromboplastina.....	23
IV.6.2. Indice de Sensibilidad Internacional (ISI).....	24
IV.6.3. Reseña hist3rica.....	24
IV.6.4. Tromboplastinas de referencia internacional.....	26
IV.6.5. Desglose estadistico.....	29
IV.7. Pruebas de tromboplastinas establecidas por la OMS.....	33
IV.8. Estudios realizados de tromboplastinas.....	35
IV.9. Liofilizaci3n.....	37
IV.10. El proceso de liofilizaci3n.....	38
IV.11. Tipos de liofilizadores.....	42
IV.12. Caracteristicas para un buen liofilizado.....	43
V. Objetivos.....	47
VI. Hip3tesis.....	48
VII. Material y m3todos.....	49
VIII. T3cnicas.....	54
VIII.1. Obtenci3n de tromboplastina tisular.....	54
VIII.2. Selecci3n de plasmas.....	55
VIII.3. Realizaci3n del TP (Prueba de Quick).....	56
VIII.4. Trazado de la curva de referencia (% Quick).....	56
VIII.5. Calibraci3n de tromboplastina (ISI).....	57
a) Procedimiento.....	57
b) Interpretaci3n.....	59
c) Evaluaci3n estadistica.....	59
VIII.6. Formas de reportar el TP.....	61
VIII.7. Interpretaci3n de la prueba de TP.....	62
VIII.8. Eliminaci3n del factor VII de la tromboplastina tisular.....	62
VIII.9. Determinaci3n del mejor soporte de liofilizaci3n.....	64
VIII.10. Determinaci3n del agente surfactante.....	66
VIII.11. Integraci3n del cloruro de calcio.....	68

IX. Resultados y análisis de resultados.....	71
X. Discusión de resultados.....	106
XI. Conclusiones.....	115
XII. Referencias	118

RESUMEN

Se realizó un estudio de tipo experimental, transversal, prospectivo y comparativo, para la obtención de una tromboplastina de alta sensibilidad y fácil manejo en el Laboratorio Clínico.

Para tal efecto se trabajó con cerebros de conejo, para la obtención del extracto de tromboplastina.

Los conejos presentaron los siguientes criterios de inclusión:

- conejos juvenes de un año a año y medio, sin raza específica que hayan sido sacrificados un máximo de 24 horas antes.

Posteriormente a la tromboplastina obtenida en FES Zaragoza se le trató con sulfato de bario con el fin de aumentar su sensibilidad, se determinó el mejor soporte que le brindara cuerpo y protección a la tromboplastina, así como establecer el agente surfactante que le permitiera una mejor solubilización del reactivo liofilizado y la integración del ión calcio para la obtención de una tromboplastina de más fácil manejo.

Para la determinación del Índice de Sensibilidad Internacional de la tromboplastina se utilizó el método modificado de Biggs y Oenson, el cual utiliza 20 plasmas normales y 60 plasmas anticoagulados, evaluados en 10 días diferentes de trabajo frente a la preparación de referencia terciaria Thromborel-S.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- No se observó un aumento en la sensibilidad de la tromboplastina de trabajo en presencia del sulfato de bario a las concentraciones 1, 2, 4, 6 y 8 por ciento.
- El mejor soporte para la tromboplastina fue la albúmina de huevo y lactosa al 3 % respectivamente.
- El agente surfactante más adecuado fue el etilenglicol a la concentración de 0.75 %, sin embargo solubilizó mejor la tromboplastina sin él.
- Se integró el cloruro de calcio a la concentración 0.02M.
- El ISI fue de 1.19 para el lote Z2x y 1.26 para el lote Z2y.

Los resultados del estudio nos permiten concluir que la mejor formulación de la tromboplastina es el soporte determinado y el ión calcio integrado pues permitieron obtener una tromboplastina de alta sensibilidad y fácil manejo, sin embargo cabe mencionar que para obtener un reactivo terminado es necesario la integración de un conservador y un amortiguador.

II. INTRODUCCION

Actualmente a muchos pacientes se les administran, anticoagulantes orales en el tratamiento y profilaxis de transtornos trombóticos. El monitoreo de pacientes anticoagulados se hace con base en el tiempo de protrombina (TP). El reactivo empleado para esta prueba requiere extractos tisulares, llamados tromboplastinas cuyas fuentes son de placenta y cerebro humano, cerebro y pulmón de conejo, y cerebro bovino.

Las tromboplastinas como proceden de fuentes de tejido humano o animal diferente, su sensibilidad varía y por lo tanto también la forma de reportar el TP. Para evitar lo anterior se requiere la utilización de tromboplastinas calibradas.

Para que una tromboplastina sea utilizada en el Laboratorio Clínico, debe de cumplir con las especificaciones que marca la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La sensibilidad de las tromboplastinas, de cerebro de conejo importadas a nuestro país poseen una sensibilidad mediana. Ultimamente una casa comercial extranjera (Organon Teknika) ha producido lotes de tromboplastina de cerebro de conejo de sensibilidad muy cercana a la preparación internacional de referencia primaria.

En las primeras investigaciones sobre la producción de tromboplastina tisular de cerebro de conejo se encontró la

cantidad óptima para la realización del TP, y que la leche es el mejor soporte de liofilización (48).

En el último estudio realizado (38) encontraron que los parámetros de calibración de la tromboplastina están en los límites máximos que exige la OMS y que su comportamiento clínico en los padecimientos de Cirrosis Hepática Alcohólica Nutricional (CHAN), Ictericia Obstructiva, Valvulopatías y Tromboflebitis, en comparación con las tromboplastinas comerciales era muy similar.

Tomando en cuenta todos los avances que se tienen sobre tromboplastinas y que son uno de los reactivos de primordial importancia en los Laboratorios de Análisis Clínicos Nacionales, se eligió este proyecto para contribuir al desarrollo de tecnología nacional en la fabricación de este reactivo.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En FES Zaragoza se han realizado con anterioridad investigaciones sobre la producción de tromboplastina tisular de cerebro de conejo, en los cuales encontraron la cantidad óptima para la realización del TP, y que la leche descremada era el mejor soporte de liofilización (48).

En el último estudio realizado (38) encontraron que los parámetros de calibración de la tromboplastina están en los límites máximos que exige la OMS y que su comportamiento clínico en los padecimientos de Cirrosis Hepática Alcohólica Nutricional (CHAN), Ictericia Obstructiva, Valvulopatías y Tromboflebitis, en comparación con las tromboplastinas comerciales era muy similar.

Tomando en consideración todos los avances que se tienen hasta ahora sobre la producción de tromboplastina tisular de cerebro de conejo, así como también el hecho de que sea un reactivo de primordial importancia en los Laboratorios de Análisis Clínicos Nacionales, se quiere contribuir al desarrollo de tecnología nacional en la fabricación de este reactivo.

Con el fin de obtener un reactivo que presente unas características similares a los reactivos comerciales con los cuales se trabaja comúnmente y principalmente aquellos que tienen el calcio integrado, pues son de más fácil manejo y que cumpla con los parámetros de calibración de la tromboplastina que exige la OMS. Se pretende primero aumentar la sensibilidad de la tromboplastina, eliminando los

residuos que presente del factor VII, para después liofilizar la tromboplastina y para que no se vea afectada por el proceso de liofilización, se quiere encontrar un buen soporte, así como un buen agente surfactante que permita obtener un cuerpo poroso, que facilite se solubilice más rápido el reactivo e integrar el cloruro de calcio para la obtención de una tromboplastina cálcica. Una vez que el producto esté terminado, realizar la calibración de manera indirecta, con una preparación de referencia de trabajo (PRT) terciaria (Thromborel-S). Obteniéndose con esto un producto de bajo costo de fácil manejo y de uso confiable en el Laboratorio Clínico.

IV. MARCO TEORICO

IV.1. COAGULACION Y HEMOSTASIA

El mecanismo de la hemostasia puede considerarse como una serie de factores sucesivos puestos en juego y conducentes por último a la detención de la hemorragia. Estos factores se hallarian representados por sector vascular, plaquetas, factores plasmáticos de la coagulación y inhibidores de la coagulación (1,2,3,4).

1. SECTOR VASCULAR

Cuando las venas están intactas la sangre fluye en estado líquido y permanece dentro del sistema vascular. Esto depende de la fragilidad, permeabilidad, tonicidad y factores intravasculares y extravasculares. En las venas pequeñas y capilares, la hemostasia puede reemplazarse por la simple adhesión de las superficies endoteliales y la agregación local de las plaquetas.

En las pequeñas arterias el control espontáneo de la hemorragia se logra mediante un mecanismo complejo donde intervienen: la liberación de los factores histicos desencadenantes del mecanismo extrínseco de la coagulación, una vasoconstricción refleja y la adherencia de las plaquetas al colágeno desarrollandose el mecanismo intrínseco.

2. PLAQUETAS

Las plaquetas provienen de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos. Poseen factores específicos que intervienen en el mecanismo de la coagulación y son:

1. Factor plaquetario 1 o ac-globulinico: semejante al factor V plasmático. Está en discusión si es un factor específicamente plaquetario o un factor adsorbido del plasma por las plaquetas.
2. Factor plaquetario 2 o cotrombínico: acelera la reacción en la que interviene la trombina. También se debate su validez como factor propio.
3. Factor plaquetario 3 o tromboplastínico: Fosfolípido que participa de manera especial en el mecanismo intrínseco de la coagulación.
4. Factor plaquetario 4 o antiheparínico: Posee la facultad de neutralizar el efecto de la heparina sobre el coágulo.

Las plaquetas liberan, además serotonina y adrenalina en el lugar de su adhesión, produciéndose así una vasoconstricción que ayuda al proceso hemostático. Así mismo poseen trombostenina, una proteína contráctil responsable de la retracción del coágulo y que lleva adsorbidos en la superficie factores plasmáticos de la coagulación.

3. FACTORES PLASMATICOS DE LA COAGULACION

Son proenzimas (zimogenos) que al comenzar el proceso de la coagulación se activan convirtiéndose en enzimas. Todas son proteínas o agluco proteínas y casi la totalidad de origen hepático. En la tabla 1 se establece la nomenclatura y características de todos los factores.

4. INHIBIDORES DE LA COAGULACION

Es normal que existan en el organismo mecanismos inhibidores limitativos del proceso hemostático, entre los que se incluyen el flujo sanguíneo que previene la concentración de procoagulantes en un determinado lugar y la eliminación de los factores activados por el hígado y el sistema retículo endotelial.

Los inhibidores actúan de dos maneras:

1. Bloquean la reacción entre factores
2. Sobre un factor determinado lo bloquean de manera progresiva.

Existen tres grupos de inhibidores:

1. Inhibidores de la trombina
2. Heparina y sustancias heparinoides
3. Inhibidores del sistema plasminogeno-plasmina.

IV.2. SISTEMA INTRINSECO Y EXTRINSECO

El primer paso en la coagulación sanguínea es la transformación de fibrinógeno en fibrina que puede seguir dos caminos: el intrínseco o el extrínseco, dependiendo de la forma de activación del proceso.

El Sistema Intrínseco comprende los factores de la coagulación presentes en el plasma, calcio en forma iónica y las plaquetas. Lo inicia la adsorción del factor VII sobre una superficie activante (tubo de vidrio, daño en el endotelio de las venas, etc.).

El Sistema Extrínseco, en cambio es activado por un factor histico liberado por un daño en los tejidos, que actúa en forma directa sobre el factor VII; se trata de un mecanismo más rápido que el anterior y en el que no intervienen las plaquetas (Ver figura 1). (1,3).

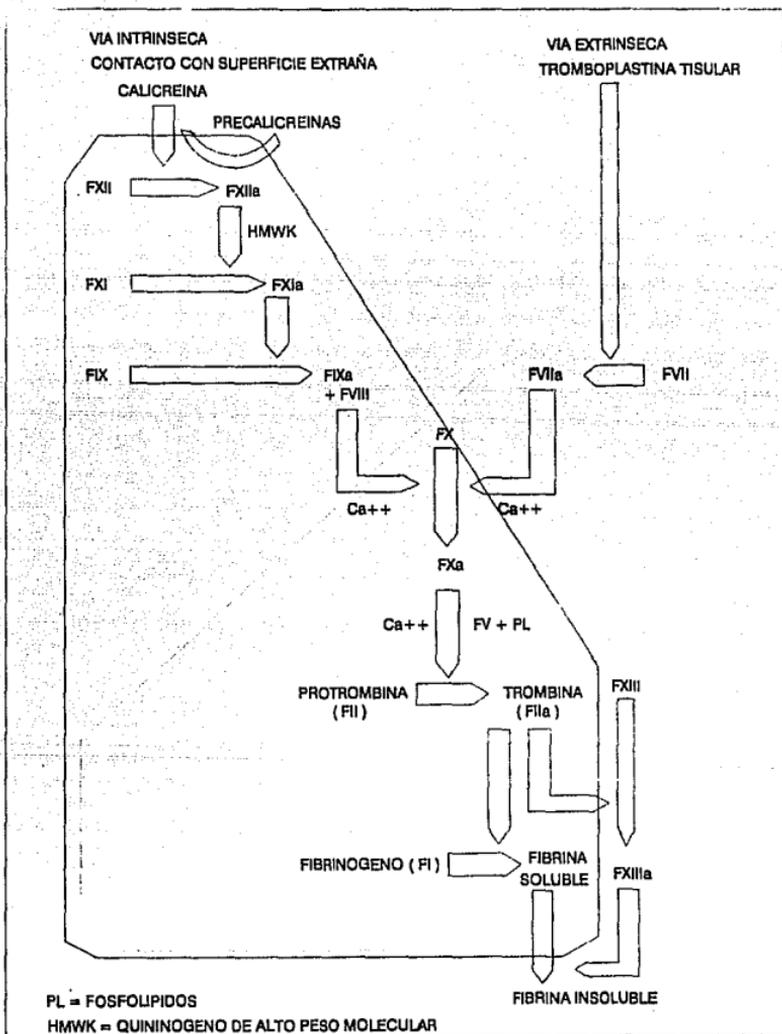


FIGURA No. 1 VIAS DE COAGULACION
FUENTE. IOVINE E. 1985

TABLA 1 : CARACTERISTICAS DE LOS FACTORES DE COAGULACION

FACTORES (SINONIMOS, SIMBOLOS)	FORMA ACTIVA	VIDA MEDIA (HORAS)	PESO MOLECULAR (DALTONS)	CONCENTRACION PLASMATICA INTERVALOS DE REFERENCIA g / l	FUNCION, PROPIEDADES Y VARIANTES GENETICAS (GV)
FIBRINOGENO F I	FIBRINA (ESTRUCTURA DEL COAGULO)	120	340,000	2.0 - 4.0	PRECURSOR DE FIBRINA, EL MAYOR CONSTITUYENTE DE LA SANGRE COMPLETA O.V. : CUALITATIVA Y CUANTITATIVA
PROTROMBINA F II	SERINA PROTEASA	100	72,000	0.05 - 0.1	PROENZIMA DE LA TROMBINA LA CUAL CONViERTE FIBRINO- GENO A FIBRINA VITAMINA K DEPENDIENTE: O.V
FACTOR TISULAR TROMBOPLASTINA F III	_____	_____	300 - 220,000	_____	_____
CALCIO (Ca ²⁺) F IV	_____	_____	_____	_____	_____
PROACELERINA FACTOR LABIL GLOBULINA ACELERADA F V	COFACTOR	25	330,000	< 0.03	FACTOR CONTRIBUYENTE EN EL COMPLEJO PROTROMBINOSA (CON FACTOR TISULAR) SENSELE A TROMBINA
PROCONVERTINA FACTOR ESTABLE ACELERADOR SERICO DE LA CON- VERSION DE LA PROTROMBINA (SPCA) F VII	SERINA PROTEASA	5	48,000	< 0.001	COACTIVADOR (CON FACTOR TISULAR) DE LA VIA EXTRINSECA DE LA COAGULACION VITAMINA K DEPENDIENTE.
FACTOR ANTIHEMOLITICO F VIII : C	COFACTOR	10	92,000 80,000 (2 CADENAS)	< 0.001	PROTEINA PROCOAGULANTE CONSTITUYENTE DEL COMPLEJO ACTIVADOR DEL FACTOR X. SENSELE A TROMBINA.
FACTOR VON WILLEBRAND F VIII : RA _g (VWF)	COFACTOR	30	1 x 10 ⁸	0.005 - 0.01	NORMALMENTE COMPLEJADO CON F VIII PROCOAGULANTE ES- SENCIAL PARA LA AGREGACION PLAQUETARIA.

OBTENIDO : 1,2,3,4,10,11.

TABLA 1 : CARACTERISTICAS DE LOS FACTORES DE COAGULACION (CONTINUACION)

FACTORES (SINONIMOS, SIMBOLOS)	FORMA ACTIVA	VIDA MEDIA (HORAS)	PESO MOLECULAR (DALTONS)	CONCENTRACION PLASMATICA INTERVALOS DE REFERENCIA g/l	FUNCION, PROPIEDADES Y VARIANTES GENETICAS (GV)
FACTOR CHRISTMAS COMPONENTE TROMBOPLASTICO PLASMATICO FIX	SERINA PROTEASA	20	51,000	0.005 - 0.01	PROENZIMA, CONSTITUYENTE DEL COMPLEJO DE ACTIVACION DEL FACTOR X. VITAMINA K DEPENDENTE; GV
FACTOR STUART-POWER FX	SERINA PROTEASA	85	59,000	0.005 - 0.01	PROENZIMA, CONSTITUYENTE DEL COMPLEJO ACTIVADOR DE PROTHROMBINA. VITAMINA K DEPENDENTE; GV
ANTECEDENTE TROMBOPLASTICO DEL PLASMA (PTA) FXI	SERINA PROTEASA	85	130,000	0.004 - 0.006	PROENZIMA, ACTIVADA POR FACTOR XIg. ACTIVA AL FACTOR IX FACTOR DE CONTACTO.
FACTOR HAGEMAN FXII	SERINA PROTEASA	60	78,000	0.015 - 0.05	PROENZIMA, ACTIVADA POR SUPERFICIE DE CONTACTO, ACTIVA AL FACTOR XI, CON HMWK. FACTOR XIg ADEMAS ACTIVA EN FORMA COMPLEMENTARIA A LA CALICREINA Y SISTEMA FIBRINOLITICO.
FACTOR ESTABILIZADOR DE FIBRINA FXIII	TRANSGLUTAMINOSA	150	320,000	0.01 - 0.04	TRANSAMIDASA; VINCULO PARA ESTABILIZAR LOS MONOMEROS DE FIBRINA DE LA SANGRE COMPLETA SENSIBLE A TROMBINA.
FACTOR FITZGERALD QUININOGENO DE ALTO PESO MOLECULAR HMWK	SERINA PROTEASA	---	197,000	0.09	CONTRIBUYENTE DE LA ACTIVACION EN LA FASE DE CONTACTO.
PRECALICREINA FACTOR FLETCHER PK	SERINA PROTEASA	---	95,000	0.09 - 0.11	PROENZIMA; CONTRIBUYENTE FUNCIONAL ENZIMATICO DE LA ACTIVACION EN LA FASE DE CONTACTO
PLASMINOGENO	PLASMINA (FORMA ACTIVA)	48	91,000	0.06 - 0.25	PROENZIMA O PLASMINA (FIBRINOLISINA), LISA FIBRINA. ACTIVADA POR ACTIVADOR PLESMINOGENO TISULAR, ESTREPTODURNASA, UROKINASA.

OBTENIDO : 1,2,3,4,10,11.

IV.3. MECANISMO DE LA COAGULACION

Se considera que la coagulación consta de cuatro fases y lo que podría denominarse una prefase las cuales son las siguientes (1,3,4,5):

A. PREFASE

El primer hecho llamativo de la intervención plaquetaria en la coagulación es el contacto de las plaquetas con la pared vascular, lo que por lo general no sucede merced a la existencia de un equilibrio fisicoquímico y a la integridad de la pared vascular, que se comporta como una superficie parafinada, al impedir un contacto directo entre la pared y la sangre.

Cuando por cualquier razón se altera el endotelio, se rompe el equilibrio y las plaquetas se adhieren al colágeno y al endotelio. Luego de la adhesión a los tejidos sigue la adhesión entre sí para lo que las plaquetas requieren adenosindifosfato (ADP), ión calcio y una superficie plaquetaria reactiva.

La adhesión de las plaquetas entre sí se denomina agregación reversible; en este momento conservan su estructura y el flujo sanguíneo pasa a través del coágulo flojo; si resulta muy fuerte, el flujo puede arrastrar el coágulo que debe volver a construirse.

Si se forma trombina "in situ" la agregación pasa de reversible a irreversible; las plaquetas pierden su estructura, se degranulan, existen alteraciones morfológicas y bioquímicas. Es entonces cuando se forma un tapón con la ayuda de los factores de la coagulación, que se impermeabiliza, contrae y retrae.

B) FASE 1. Formación de un complejo conversor de protrombina.

Sólo el sistema intrínseco utiliza esta fase. La coagulación ocurre cuando el factor plaquetario 3 se libera y reacciona con los factores plasmáticos de la coagulación.

La etapa I involucra el factor XII que es activado "in vivo" por colágeno, estearatos, ácido úrico, etc., y en su momento activará al factor XI. Así se desencadena lo que denominamos cascada, cuya base es la teoría que considera que el proceso de coagulación constituye el principio de una serie de reacciones enzimáticas, en las cuales cada enzima activa a la siguiente.

La serie de reacciones ocurridas hasta la activación del factor II (Protrombina) toman 3 a 5 minutos.

El complejo activador de la protrombina se forma más rápido si en lugar de utilizar el sistema intrínseco, se usa el extrínseco.

Este último necesita para actuar la presencia de tromboplastina hística que no se encuentra en plasma en condiciones fisiológicas, pero en ciertas condiciones

patológicas como traumas, situaciones quirúrgicas, o complicaciones obstétricas entra en contacto con la sangre circulante.

Para activar a la protrombina necesita de la presencia del factor VII, que en el otro sistema no interviene y de los factores V, X y calcio iónico.

Esta reacción ocurre en 12 a 15 segundos pues pasa por alto la formación de tromboplastina intrínseca que demora como se indicó antes de 3 a 5 minutos.

Como puede apreciarse los factores V y X están involucrados en los dos sistemas y constituirían un camino común.

FASE 2. Conversión de protrombina en trombina.

La transformación de protrombina (Factor II inactivo) en trombina (Factor II activo) puede realizarse por ambos sistemas: El intrínseco o el extrínseco. Cuando se forman pequeñas cantidades de trombina, éste actúa de manera autocatalítica y acelera las primeras reacciones aunque intervienen los factores VIII, IX, V y factor plaquetario 3, por lo que aumenta en consecuencia la producción de trombina. La cantidad y la velocidad en que se forma la trombina es un paso importantísimo en el mecanismo de la coagulación. Además se ha descubierto que la trombina ataca a la molécula de protrombina no para convertirla en trombina activa, sino en un intermediario I, que en presencia de Xa, V, Ca⁺⁺, se transforma en un intermediario II que va a dar como resultado trombina, como se muestra en la figura 2.

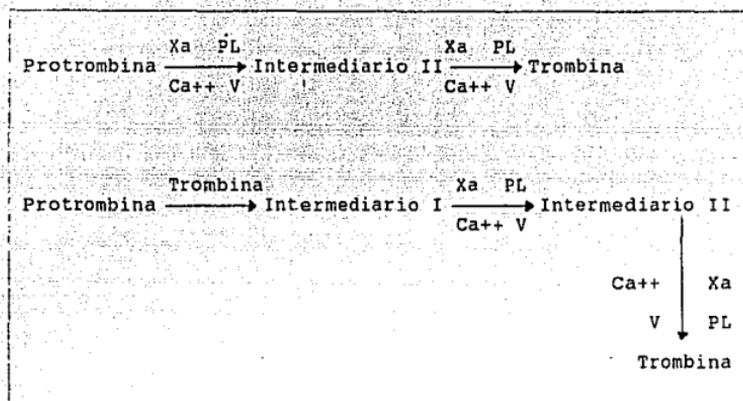


FIGURA 2. CONVERSION DE PROTROMBINA EN TROMBINA
FUENTE: IOVINE E. 1985.

FASE 3. Conversión de fibrinógeno en fibrina.

La trombina formada en la fase 2 actúa como enzima proteolítica sobre el fibrinógeno y escinde la molécula nivel de uniones de glicina-arginina. Se forma así el monómero de fibrina con la liberación de dos pequeños fibrinopéptidos (denominados A y B); la pérdida de esos fragmentos hace que las moléculas reduzcan su carga negativa, entonces los monómeros tienden a unirse en forma longitudinal y a pH fisiológico uniones de tipo puente de hidrógeno forman la fibrina primaria.

Estas últimas en presencia del factor XIIIa y Ca^{++} , se unen reaccionando la glutamina de un monómero de fibrina con una lisina de otro monómero.

Estas en presencia del factor XIII activo y calcio iónico dan un coágulo insoluble de fibrina, como se indica en la figura 3.

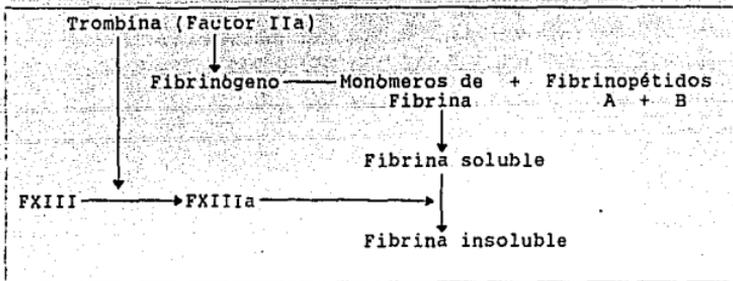


FIGURA 3. CONVERSION DE FIBRINOGENO EN FIBRINA.
FUENTE: IOVINE E. 1985.

FASE 4. Fibrinólisis.

Es el término aplicado a la destrucción enzimática del coágulo. Cuando se produce el tapón hemostático se adsorbe plasminógeno (alrededor de un 20 a 30 %) en la red de fibrina; así el sistema fibrinolítico está colocado "in situ" y listo para actuar. El generarse "in situ" hace específica a la plasmina (enzima), que libre posee un gran espectro proteolítico; por esto es que en condiciones normales no realiza una proteblisis generalizada (1,6,18).

La plasmina no diferencia entre fibrina y fibrinógeno, ataca también a los factores V, VIII, XI y XII.

La plasmina al atacar al fibrinógeno conduce a la formación de los siguientes productos de la degradación (figura 4) según Marder (1)(1970):

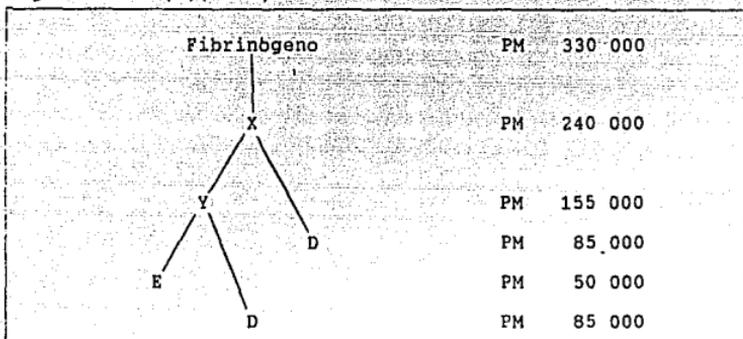


FIGURA 4. PRODUCTOS DE LA DEGRADACION DEL FIBRINOGENO, POR EL ATAQUE DE LA ENZIMA PLASMINA.

Cuando se producen coagulación y fibrinólisis, en pequeña escala y simultáneamente "in vivo" los productos de degradación se unen a los monómeros de fibrina y al fibrinógeno para construir complejos solubles.

Estos últimos son en cierta medida, una eficaz protección del equilibrio hemostático, ya que al combinarse con:

- a) Fragmentos X, evitan que estos precipiten obstruyendo vasos.
- b) Monómeros de fibrina, impiden que el coágulo siga aumentando.
- c) Productos de degradación, evitan que estos ejerzan su poder anticoagulante.

En condiciones normales escasas cantidades de estos productos de degradación pueden encontrarse en suero (1,6,18).

IV.4. ANTICOAGULANTES

Son farmacos o sustancias químicas que impiden o retardan la coagulación sanguínea. Pueden ser de tres clases:

a) Anticoagulantes que actúan "in vitro".

Son esencialmente sustancias descalcificantes que eliminan el ión calcio de la sangre, pues fijan el ión formando un precipitado o complejo. Como el Oxalato de Sodio y el Citrato de Sodio, Resinas de Intercambio Iónico (Amberlita IR100), EDTA (disódico), Acido Citrato de Extrosa (ACD) y Fosfato de Extrosa (CPD).

b) Anticoagulantes que actúan "in vivo".

i) Anticoagulantes directos.

Se les llama así a los inhibidores que normalmente se encuentran presentes en el plasma como la antitrombina III, productos de degradación de la fibrina, proteína C y S, llamándolos antitrombóticos pues evitan la formación de trombina, además de inhibir otros factores.

ii) Anticoagulantes indirectos.

Son denominados anticoagulantes sintéticos o anticoagulantes orales, llamados también drogas "Hipoprotrombinémicas", pues retardan la formación de trombina. Son derivados de la 4-Hidroxycumarina y de la indanediona, interfieren en la síntesis hepática de los

factores II, VII, IX y X. También interfieren en la síntesis de anticoagulantes naturales como la proteína C y S.

c) Anticoagulantes que actúan "in vitro" e "in vivo", como la heparina.

Es un mucopolisacarido sulfatado, es un ácido fuerte y se encuentra disponible en forma de sal sódica. Su mecanismo de acción principal es que se une a la antitrombina III y experimenta un cambio de conformación que aumenta la tasa de su efecto inactivador sobre la trombina.

Además la heparina puede ser captada por las células endoteliales y alterar de esa forma las propiedades de los vasos sanguíneos, pues es fuertemente electronegativa (2,3,7,8,9).

IV.5. ANTICOAGULANTES ORALES

Los anticoagulantes orales derivados de la cumarina son ampliamente utilizados en la prevención de las trombosis recurrentes.

En la figura 5 se muestra esquemáticamente el mecanismo bioquímico por el cual estos anticoagulantes orales reducen el nivel de los factores de coagulación Vitamina K dependientes. La vitamina K cataliza la formación de ácido gamacarboxiglutámico en aminoácidos específicos de los factores de coagulación II, VII, IX y X, así como en la proteína anticoagulante C y su cofactor la proteína S.

Estos aminoácidos modificados son los responsables de la unión al calcio y los fosfolípidos y por lo tanto son

esenciales para la actividad enzimática de estos factores en el esquema de coagulación.

Los anticoagulantes cumarínicos actúan como antagonistas de la Vitamina K, bloqueando las reductasas que producen su regeneración en el ciclo de oxidorreducción.

Como se bloquea la acción de la Vitamina K no se producen los restos gamacarboxiglutámico; apareciendo en circulación las proteínas no modificadas denominadas Proteínas Inducidas por Antagonistas de la Vitamina K (PIVKA).

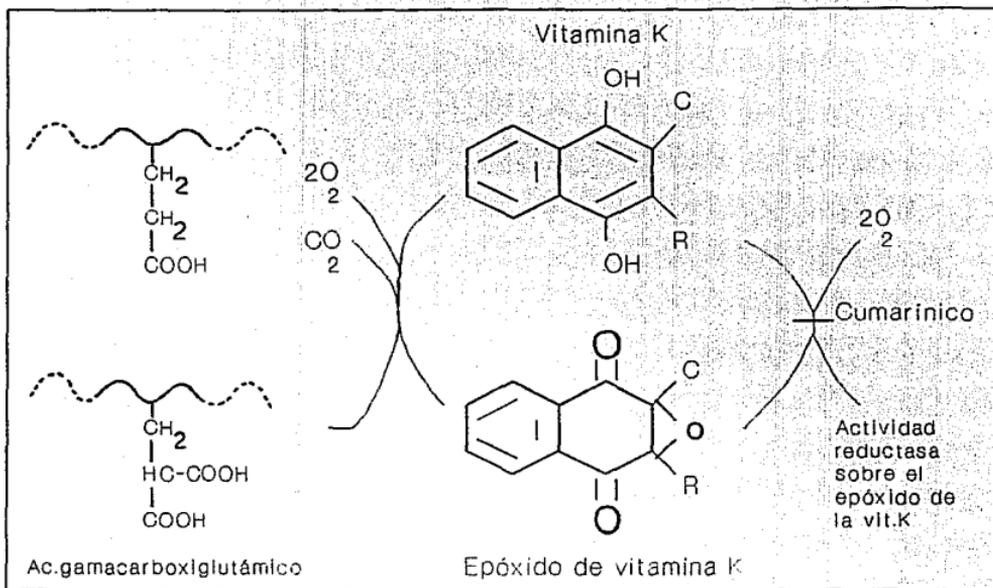


FIGURA 5. Mecanismo de la acción cumarínica. Los fármacos de tipo cumarínico se interfieren en el ciclo de la vitamina K bloqueando la enzima que reduce el epóxido de vitamina K a vitamina K. Se impide la carboxilación de los residuos de ác. glutámico de los factores II, VII, IX y X (izquierda), con lo que inhibe su activación.

FUENTE. GOODMAN G. 1986.

IV.6. ESTANDARIZACION DE TROMBOPLASTINAS

IV.6.1. DEFINICIONES DE TROMBOPLASTINAS.

Tromboplastina: Extracto tisular que tiene la propiedad de acelerar la activación de la coagulación sanguínea, por vía extrínseca, soslayando así algunas reacciones de la vía intrínseca.

Las tromboplastinas preparadas con tejidos de mamíferos contienen proteínas y fosfolípidos. Existen dos tipos de tromboplastina, la simple y la combinada.

También se pueden clasificar las tromboplastinas por tipos según el origen del tejido que proceden de cerebro y pulmón de conejo, cerebro y placenta humana y cerebro bovino (13,14).

Tromboplastina simple: Suspensión de tejido cerebral en suero salino.

Tromboplastina combinada: Suspensión de tejido cerebral en suero salino, o solución amortiguadora, con una concentración apropiada de fibrinógeno bovino, factor V y cloruro cálcico añadidos.

Tiempo de protrombina: Tiempo de coagulación de una muestra de plasma en presencia de una preparación de tromboplastina y de la cantidad apropiada de iones calcio.

IV.6.2. INDICE DE SENSIBILIDAD INTERNACIONAL (ISI)

Para una tromboplastina dada sería:

1) La pendiente de la línea de calibración obtenida en un gráfico logarítmico doble que representará los tiempos de protrombina para la preparación internacional de referencia de tromboplastina humana combinada (clave: 67/40) en el eje vertical y los tiempos de protrombina para la tromboplastina dada en el eje horizontal.

2) El producto de a) la pendiente de la línea de calibración obtenida en un gráfico logarítmico doble que representará los tiempos de protrombina, para cualquier preparación de tromboplastina, cuyo (ISI) hubiera sido determinado por regresión ortogonal, en el eje vertical y los tiempos de protrombina para la tromboplastina dada en el eje horizontal y b) el ISI previamente determinado para la primera de las preparaciones (14,15,16,39).

IV.6.3. RESEÑA HISTORICA

En 1935 Armand Quick describe una prueba que llama tiempo de protrombina, que la profesión médica adoptó como tal. La cual se evalúa con tromboplastinas, siendo estas extractos tisulares, cuyas fuentes son comúnmente de cerebro y pulmón de conejo, cerebro y placenta humana y cerebro bovino, algunas eran simples y otras combinadas. Al proceder las tromboplastinas de diferentes fuentes, su sensibilidad varía y por lo tanto la forma de reportar el TP también.

A la fecha se han realizado modificaciones a tal prueba, a fin de mejorar la sensibilidad interlaboratorio de las tromboplastinas en cuanto a los resultados del TP en unidades tradicionales tales como: % de actividad, segundos, radio de protrombina, etcétera (17-22).

El Comité Internacional de Trombosis y Hemostasia (ICTH) y el Comité Internacional para la Estandarización de Hematología (ICSH), de la Organización Mundial de la Salud (OMS), contribuyeron enormemente para que se obtuvieran las bases y técnicas adecuadas para la estandarización de tromboplastinas, a fin de contar con una unidad de medida internacional común, que tiene el mismo significado en cualquier parte del mundo; el Radio de Tiempo de Protrombina Internacional Normalizado (RIN) (3,14).

De acuerdo a lo establecido por la OMS, para la estandarización de tromboplastinas, se emplea el método modificado de Biggs y Denson (1983), el cual utiliza 20 plasmas normales y 60 plasmas anticoagulados, evaluados en 10 días diferentes de trabajo, actualmente existen tres tipos de tromboplastina de referencia internacional, de acuerdo al tipo de tromboplastina que se desee estandarizar; la BCT/099 de humano, OBT/079 de bovino y la RBT/079 de conejo, estas son preparaciones secundarias de referencia, pues son calibradas frente a una preparación de referencia primaria, la 67/40 (Combinada) a la BCT/253 (Simple), ambas de cerebro humano, que poseen un Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) de 1.0 por definición. Se habla de materiales de -

referencia terciarios cuando estos son calibrados ante una referencia secundaria, las cuales son tromboplastinas comerciales. Por lo que se pueden calibrar lotes producidos localmente frente a una tromboplastina comercial (ISI conocido), llamándose a esto una comparación indirecta.

El tener estas tromboplastinas un ISI por definición de 1.0 deduce que hay un comportamiento lineal entre las tromboplastinas denotándola por la relación $Y = a + bx$ (13,17,23,24).

De esta forma intentan una mejor correlación de datos, además deducen que es un error reportar el TP en porcentaje de actividad, pues cada tromboplastina tiene diferente sensibilidad, además de que la curva de referencia esta sujeta a muchos factores que afectan los resultados, y que la forma adecuada de reportar el TP es en Radio de Protrombina (25-28).

IV.6.4. TROMBOPLASTINAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Todas las tromboplastinas usadas deben de ser calibradas frente a preparaciones internacionales de referencia. Existen preparaciones primarias y secundarias de referencia, ambas permiten la comparación entre tromboplastinas, ya que la primaria esta muy limitada en cuanto a su distribución (29,30).

Por contribución de la ICSH, ICTH y BCR (Comunidad Boreau de Referencia) en la tabla 2 se designan características de

las Preparaciones Internacionales de Referencia (PIR'S) primarias y secundarias propuestas por la OMS y BCR.

La calibración de tromboplastinas es más precisa cuando las comparaciones son hechas entre preparaciones similares, en especie, por lo que la OMS propuso preparaciones de humano, conejo y bovino (13,14). Se muestra en la figura 6.

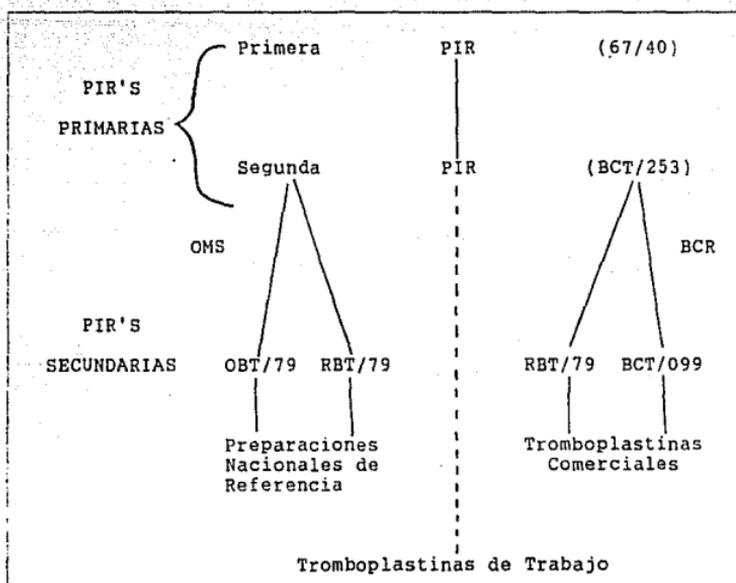


FIGURA 6. Preparaciones Internacionales de Referencia primarias y secundarias propuestas por la OMS y BCR.

FUENTE: OMS. 1983.

TABLA 2 : CARACTERISTICAS DE LAS TROMBOPLASTINAS DE REFERENCIA

	CODIGO DE REFERENCIA WHO			BCR		
	67/40	68/434	70/178	BCT/089	OBT/79	RBT/79
TIPO DE TEJIDO CEREBRAL	HUMANO	BOVINO	CONEJO	HUMANO	BOVINO	CONEJO
SIMPLE O COMBINADA ¹	COMBINADA	COMBINADA	SIMPLE	SIMPLE	COMBINADA	SIMPLE
VIALES O AMPULAS	AMPOLLETA	AMPOLLETA	AMPOLLETA	FRASCO DE	AMPOLLETA	AMPOLLETA
	VIDRIO	VIDRIO	VIDRIO	HULE CON	VIDRIO	VIDRIO
	SELLADO	SELLADO	SELLADO	TAPON	SELLADO	SELLADO
MASA INICIAL O	2.051 ±	2.2 ±	1.029 ±	1.45 ±	2.11 ±	0.5 ±
VOLUMEN (±sd)	0.025 g	0.01 g	0.01 g	0.03 g	0.005g	0.02 ml
FASE GASEOSA	NITROGENO	VACIO	NITROGENO	VACIO	VACIO	NITROGENO (88.7KPa
FRACCION MASA DE	0.0064	0.021	0.0069	0.02	0.016	0.01
AGUA DESPUES DE LA LIOFILIZACION (KG. KG.)						
PARA SER RECONSTITUI-	2.0 ml	2.2 ml	1.0 ml	1.0ml	2.2ml	0.5ml
DO CON	CaCl ₂	CaCl ₂	AGUA	AGUA +	CaCl ₂	AGUA
	(3.2 mmol/l)	(3.2 mmol/l)	DESTILADA	FENOL (0.5g/l)	(3.2 mmol/l)	DESTILADA
PH				6.5	7.73	6.8
HEMOGLOBINA				L.B.D. ²	L.B.D. ²	L.B.D. ²

1) TAMBIEN CONTIENE FIBRINOGENO Y FACTOR V DE COAGULACION

2) LIMITE BAJO DE DETECCION

FUENTE. KIRWOOD TBL. 1883

IV.6.5. DESGLOSE ESTADISTICO

Anteriormente se dijo que cada tromboplastina de trabajo, es una preparación que debe tener un Índice de Sensibilidad Internacional (ISI), por comparación con una PIR primaria o secundaria, con un ISI asignado.

Para la obtención del ISI inicialmente se relacionaban los logaritmos de TP, de ambas tromboplastinas, en una gráfica, resultando una línea recta.

$$Y = a + bx \quad (1)$$

donde a es la ordenada al origen y b es la pendiente, X y Y denotan los logaritmos de los TP; graficando en el eje Y la preparación de referencia, y en el eje X la preparación de trabajo. Pero esta ecuación no definía bien la relación entre ambas tromboplastinas (28,31).

La ecuación 1 se utilizaba tanto para plasmas normales, como anormales y se transformaba el dato de TP de una tromboplastina de trabajo en una de referencia, usando de la ecuación 1 la pendiente (b), por lo que la ecuación para el plasma normal y anormal siempre y cuando se utilicen radios de protrombina

$$RP_{67/40} = \frac{b}{MR} RP \quad (2)$$

donde $RP_{67/40}$ = Es el radio de protrombina de la PIR 67/40

RP_{MR} = Es el radio de protrombina para otro material de referencia

b = La pendiente de la línea de calibración 1.

Los radios convertidos a la escala de PIR-67/40 son denominados Radio de Normalización Internacional (RIN) y la pendiente es llamada el Índice de sensibilidad Internacional (ISI) (32).

El problema que se presentaba era como estimar los parámetros a y b de la ecuación de calibración 1. Por experiencia se sabe que en la regresión lineal, la suma de cuadrados de las desviaciones son de manera perpendicular a la línea, ocasionando desviaciones mínimas a los valores, lo cual se considera un error calcular a y b . Pero en la regresión ortogonal resultaba una estimación simétrica completamente de la relación lineal con mejor precisión y pruebas de linealidad que podían ser derivadas. Otra ventaja que se observa es que dicho método suprime de manera implícita, el error estadístico en ambos ejes. Por lo tanto los estimadores a y b eran calculados así:

$$b = m + (m^2 + 1)^{1/2} \quad (3)$$

$$m = \frac{(Y - \bar{Y})^2 - (X - \bar{X})^2}{2(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})} = \left| \frac{1}{2r} \cdot \frac{S_y}{S_x} - \frac{S_x}{S_y} \right| \quad (4)$$

$$a = y - bx \quad (5)$$

donde: r = Coeficiente de correlación

S_x y S_y = Desviación estandar de X y Y

\bar{Y} y \bar{X} = Son las medias de X y Y

Las tromboplastinas de referencia tienen valores de ISI asignados, para la PIR 67/40 su ISI por definición es 1, por lo que para obtener el ISI de la tromboplastina de referencia o de trabajo es:

$$\text{ISI}_{MR} = C \cdot \text{ISI}_{67/40}$$

donde: $C =$ Pendiente de calibración obtenido de la ecuación 3 ($C = b$)

$$\text{ISI}_{67/40} = \text{ISI asignado a la preparación de referencia}$$

Por lo tanto la ecuación 2 se transforma en :

$$\text{RIN} = \text{RP}^{\text{ISI}}$$

b

$$\text{RIN} = \text{antilog} (\text{ISI} \log \text{RP})$$

Para una obtención de resultados más precisos, en lugar de emplear una media aritmética ordinaria en el RP.

$$\text{TP}_N = (t_1 + t_2 + \dots + t_n) / n$$

Se hizo uso de la media geométrica.

$$\text{TP}_N = \text{antilog} (\log + \log + \dots \log) / n$$

La diferencia entre una y otra era que

aritmética > geométrica

Para la obtención del Radio de Protrombina

$$RP = \frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ normal}}$$

Por lo tanto una vez obtenido el ISI, el TP del paciente anticoagulado se reporta en una escala común, que es el RIN.

$$RIN = \frac{ISI}{RP}$$

El RIN es una medida universal para un mejor control de estos pacientes, ya que éste sí toma en cuenta las diferencias de los tipos de tromboplastinas a los efectos de los anticoagulantes orales (14,19,27,33).

Actualmente en el comercio existen una gran cantidad de tromboplastinas, cada una de ellas con una diferente sensibilidad de acuerdo a las fuentes e tejido del cual proceden. De acuerdo a lo establecido por la OMS una tromboplastina de uso en el laboratorio debe de tener un ISI menor a 2.5 con un porcentaje de coeficiente de variación menor al 3% de la estimación del índice de sensibilidad por comparación con la Preparación Internacional de referencia secundaria.

La precisión del ISI estimado del lote, teniendo en cuenta la precisión de la calibración de la preparación de referencia nacional o de trabajo, debe tener un coeficiente de variación del 5% o menos (14).

Se ha observado que aun siendo la tromboplastina del mismo tipo de tejido, difiere mucho su sensibilidad y comportamiento, por lo que cada lote que sea producido deberá de calibrarse como lo exige la OMS y dependiendo de sus parámetros de calibración éste podrá ser utilizado (20,34).

IV.7. LAS PRUEBAS EN TROMBOPLASTINAS ESTABLECIDAS POR LA OMS SON:

Cada lote de tromboplastina de cualquier origen deberá satisfacer los criterios siguientes.

1. Sensibilidad al defecto inducido por la cumarina.

La sensibilidad al defecto inducido por la cumarina se determinará por el tiempo de protrombina, utilizando plasma normal y cumarinizado. El valor obtenido deberá ser análogo a los obtenidos con otros lotes de la misma tromboplastina, preparados por el mismo fabricante. El Índice de Sensibilidad Internacional no deberá exceder de 2.5.

2. Prueba de sensibilidad a la deficiencia de Factor VII.

La prueba de sensibilidad a la deficiencia del factor VII se practica mediante la prueba del tiempo de protrombina de una etapa en plasma de un sujeto conocido como deficiente de factor VII. El tiempo de protrombina deberá ser semejante al obtenido con una tromboplastina de referencia conocida como sensible al factor VII.

3. Contenido de hemoglobina.

Debe tratarse de obtener preparaciones tan exentas de hemoglobina como sea posible.

4. Opacidad y volumen de sedimento.

El método de fabricación, especialmente el método de trituración del tejido, tiene un efecto acentuado sobre la actividad, la opacidad y el volumen del sedimento de la tromboplastina. Como puede usarse equipo fotoeléctrico para determinar el tiempo de coagulación, es conveniente que las preparaciones sean adecuadas para emplearse en esos instrumentos.

5. Ausencia de agentes infecciosos.

Es deseable aunque no siempre posible preparar tromboplastinas estériles. No obstante hay que hacer todos los esfuerzos por utilizar el material menos contaminado desde su origen y emplear un procedimiento de fabricación que impida nuevas contaminaciones y la proliferación de microorganismos durante la fabricación.

Deberá comprobarse que las tromboplastinas de tejido humano estén exentas de virus de la hepatitis B (VHB) y del SIDA (VHI), con métodos de gran sensibilidad.

6. Estabilidad.

El método de fabricación de tromboplastinas deberá dar estabilidad a las preparaciones.

La estabilidad se comprobará mediante una prueba de degradación acelerada, en la cual las preparaciones de tromboplastina liofilizada deberán mostrar que conservan actividad. El servicio nacional de inspección especificará las condiciones de prueba. No deben utilizarse tromboplastinas que pierdan actividad en una prueba de degradación acelerada.

La sensibilidad de las tromboplastinas aumentará siempre y cuando su valor de ISI se acerque a 1.0. Los valores de ISI de las tromboplastinas utilizadas en México varían entre 1.7 y 2.2, siendo éstas poco sensibles. Actualmente la casa comercial Organon Teknika ha producido lotes de tromboplastina, de cerebro de conejo, con un ISI de 1.10 (Simplastin Excel S), de una alta sensibilidad acercándose éste al valor de 1.0 de las preparaciones de referencia primaria.

IV 8. Los estudios presentados a continuación, nos encaminan a la obtención de una tromboplastina sensible.

Estudios realizados por Singer y Sibley (35) discuten que la variabilidad del tiempo de protrombina es debido al factor VII. Al realizar un estudio con siete tromboplastinas comerciales y una preparación de tromboplastina de cerebro humano, determinando la sensibilidad de éstas al factor VII; emplearon plasmas con % de actividad diferente, respecto al factor VII, para lo cual utilizaron plasmas normales, plasmas

adsorbidos y plasmas de pacientes con deficiencia del factor VII. Encontrando que la prolongación del tiempo de protrombina es debido principalmente a la disminución del factor VII en los plasmas de estos pacientes (35).

Posteriormente Neville (36), discute que la sensibilidad de una tromboplastina se ve afectada por los residuos del factor VII. Al realizar un estudio entre dos tipos de tromboplastinas, una de ellas preparada a partir de tejido cerebral de perros normales y la otra con perros con deficiencia congénita del factor VII, de la coagulación.

Encontrando que la tromboplastina preparada a partir de tejido cerebral de perros con deficiencia congénita en el factor VII, da en plasmas de pacientes, tiempos de protrombina, más largos que los dados por la tromboplastina de perros normales, lo cual indica una mayor sensibilidad de la primera tromboplastina deficiente de éste factor VII. Este estudio reafirma el realizado por Singer y Sibley (36).

También otros grupos de investigadores han reportado que los diferentes lotes de tromboplastina preparada a partir de cerebros animales tratados con algún tipo de anticoagulante oral afecta no sólo la producción del factor VII, sino también de los factores II, IX, y X (35,37).

En un estudio realizado recientemente (38) se encontró que la tromboplastina tisular líquida que se produjo, posee una sensibilidad media, con un % de coeficiente de variación en el límite superior al que exige la OMS. Además de realizar la comparación clínica de la tromboplastina producida, con la

de una tromboplastina comercial en los padecimientos de Cirrosis Hepática Alcohólica Nutricional (CHAN), Ictericia Obstructiva, Valvulopatías y Tromboflebitis, encontrando que no existía diferencia estadística entre el comportamiento de la tromboplastina de trabajo producida, con la tromboplastina comercial de referencia. El reactivo obtenido en este estudio, como ya se dijo, es sensible en los límites establecidos por la OMS, sin embargo, para su uso se invierten 1:20 horas, en tanto que una tromboplastina comercial, que se encuentra liofilizada, para su uso se necesita de sólo 2 minutos.

IV.9. Por lo tanto un punto importante de tratar, es la conservación de la tromboplastina tisular de cerebro de conejo, evitando así, la acción destructora del calor y la oxidación de procesos fermentativos (41).

En la Industria Química, una de las técnicas especiales de secado, es la liofilización, la cual tiene una aplicación limitada, pero dentro de ciertas limitaciones esta técnica puede proporcionar el mejor método a casos particulares de secado y por lo tanto la conservación de determinados alimentos (carne, fruta, verduras), productos farmacéuticos (cultivos de virus, sueros, antibióticos, cultivos de bacterias) y tejidos animales y extractos (huesos, piel, sangre, tumores, arterias, hormonas); como en el caso en particular que tratamos, de la tromboplastina tisular de cerebro de conejo (41-44).

La liofilización es un proceso especial de deshidratación conducido a bajas temperaturas y altos vacíos, en el cual se elimina el agua por sublimación. Los productos liofilizados se identifican por su gran ligereza y su elevada porosidad, friabilidad e higroscopicidad (41,43,44).

IV.10. El proceso de liofilización.

Usualmente la liofilización es una operación discontinua; el congelamiento inicial puede ser llevado a cabo fuera del liofilizador o también puede ser obtenido por evaporación al vacío. El recipiente que contiene la sustancia a secar se sitúa dentro de una caja al vacío o se la conecta a una línea de vacío (método usado para secar gran cantidad de recipientes pequeños).

Normalmente se eliminan los gases incondensables por bombeo, y el agua por condensación. Debe suministrarse calor a la sustancia para proveer el calor latente de vaporización, pero el flujo de calor debe de ser lo suficientemente pequeño como para que la temperatura del material a secar se mantenga menor a 0 C (41,44)

Es importante durante el proceso de liofilización cada una de las siguientes etapas:

IV.10.1. Conducción dentro del sólido: En el secado normal de las sustancias se encuentran dos etapas de secado. En la primera sublima el hielo superficial, dejando un producto esponjoso que contiene en su interior cristales de hielo

aislados. En la segunda etapa estos cristales subliman muy lentamente, debido a la resistencia al flujo de calor hasta ellos, el objeto es reducir la humedad en el producto seco buscando una prolongación de su estabilidad. Una humedad residual del producto seco del 2% es en la mayoría de los casos satisfactoria (41,43).

IV.10.2. Congelamiento inicial.

Un congelamiento rápido produce normalmente los siguientes resultados:

- a) Se forman cristales de hielo más pequeños, lo cual disminuye el daño en las paredes de las células, permite una mayor velocidad de sublimación y reduce las tensiones debidas a la expansión dentro del recipiente que contiene la sustancia.
- b) Se reduce el riesgo de producir soluciones altamente concentradas antes que se complete el congelamiento. (Estas soluciones pueden provocar un desecamiento osmótico de las células o una reacción química).

Sin embargo un congelamiento lento puede mejorar la posibilidad de supervivencia de las bacterias y las células. Se pueden reducir las tensiones generadas por la expansión del congelamiento por adición de ciertas sales, como son cloruro de sodio o potasio o reduciendo la adherencia con el recipiente mediante un tratamiento de la superficie con un organo-silicona.

El congelamiento se obtiene con las técnicas convencionales de refrigeración usando dióxido de carbono sólido, freón, etc., esta operación se conoce con el nombre de precongelación; o por evaporación por vacío dentro del liofilizador, operación conocida como autocongelación. El segundo método es más lento pero puede significar un ciclo de operaciones más sencillo.

IV.10.3. Taponamiento: Para evitar el contacto del producto seco dentro de frascos con el aire, se dispone de mecanismos automáticos de taponamiento; también es posible sellar las ampollitas antes de sacarlas del vacío (41,45).

IV.10.4. Suministro de calor por sublimación

Para obtener la máxima velocidad de secado a una temperatura dada la sustancia a secar debe tener un pequeño espesor y una gran superficie. Como la velocidad de secado también depende de la presión de vapor saturado sobre la sustancia, su temperatura no debe ser más baja que lo necesario.

El flujo de calor puede ser controlado por esta temperatura. En líquidos: se disponen dentro de una bandeja poco profunda o se hacen girar dentro de un recipiente, de tal manera que el fluido congelado se esparza por las paredes del recipiente (41,44,45).

IV.10.5. Mantenimiento del vacío.

Los gases no condensables contenidos inicialmente en el sistema son eliminados por medio de bombas de vacío y/o eyectores de vapor.

Operando a pequeña escala se puede eliminar el vapor de agua por medio de bombeo, aunque esta técnica introduce la complicación de tener que separar el agua del aceite de la bomba. Normalmente el vapor es eliminado del sistema por condensación. Para un secado rápido la presión de vapor dentro del sistema debe ser lo más baja posible.

Las siguientes condiciones aseguran esto:

- a) La superficie de condensación debe de estar lo más fría que sea posible.
- b) Debe de estar cerca de la superficie a liofilizar cuando se produce la sublimación.
- c) Se debe disponer de un área de condensación tal que el hielo formado sobre ella no forme una capa gruesa que genere una gran resistencia a la transferencia de calor. El hielo se deposita preferentemente en aquellas partes del condensador enfrentadas a la sustancia que se está secando. En el secado de muchas sustancias no es un inconveniente la formación de una capa espesa de hielo en el condensador en las últimas etapas de secado, puesto que el factor limitante de la velocidad de sublimación está dado por la velocidad con que las moléculas de agua abandonan al sólido (41,43,45).

IV.10.6. Descongelación del condensador.

El hielo puede ser eliminado haciendo pasar agua caliente por el condensador. El condensador puede estar diseñado de tal manera que, una vez que se ha fundido la interfase entre el hielo y el condensador, el hielo cae limpiamente, de manera que se acorta el tiempo de parada del secador. También se puede eliminar el hielo mediante algún mecanismo de raspado del mismo.

IV.11. Tipos de liofilizadores.

Para ordenar los distintos factores discutidos anteriormente podemos clasificar los liofilizadores en tres tipos principales:

- a) Liofilizadores con recipientes rotatorios; usados solamente para secar líquidos.
- b) Liofilizadores múltiples; son convenientes para secar el contenido de una gran cantidad de recipientes pequeños. Presentan la desventaja que la ruptura de vacío en un recipiente destruye el vacío en todos los demás.
- c) Liofilizadores de armario con estantes; son los más comunes y se usan para una gran variedad de sustancias.

Cualquier equipo para liofilizar, consta fundamentalmente de cinco elementos indispensables:

1. El sistema de congelamiento.
2. El sistema de vacío.
3. El sistema de condensación.

4. El sistema de calefacción.
5. El sistema de medición y control. (41,43,45).

IV.12. CARACTERISTICAS PARA OBTENER UN BUEN LIOFILIZADO.

IV.12.1. Para llevar a cabo una liofilización se utiliza un soporte, el cual le da cuerpo y protección al elemento a liofilizar. La sustancia protectora mejora la sobrevivencia de materia viva o proteínas, esto es, de productos biológicos. Los protectores más usados son: glicerina, suero, gelatina, caseína, metanol, pectina, inositol, albúmina y leche descremada.

El soporte de leche descremada manifiesta una actividad protectora de 98.5%, la gelatina diluida logra un 85%, la glucosa al 5% logra una actividad protectora de 91% y la glicerina al 5% logra una actividad protectora de 48.5% (45,46).

IV.12.2. Así también cuando las estructuras de un soluto crean grietas durante el secado y especialmente cuando las cantidades de sólidos son bajas, se obtienen productos friables, que casi se pulverizan durante su manejo; puede ser conveniente entonces la adición de un aditivo. El aditivo va a proporcionar resistencia a la estructura.

Los aditivos deben reunir varias características:

- a) No ser higroscópicos
- b) Ser muy solubles en agua
- c) Ser inocuos (No alterar sabor en caso de alimentos)

- d) Para productos inyectables estar libres de antígenos y pirogenos.
- e) Tener puntos eutécticos cercanos a 0 C.

Dentro de los aditivos se encuentra la lactosa, glicocola, inositol, manitol, urea, gelatina, fosfatos de sodio, ácido cítrico y tartárico (45,46).

Por otro lado ocurren cambios fisicoquímicos, químicos y enzimáticos durante la liofilización como son:

- a) Congelación
- b) Desnaturalización de proteínas
- c) Ruptura de estructura celular por los cristales de hielo
- d) Cambios de pH, alteración osmótica.

IV.12.3. La adición de un agente surfactante ayuda a que los cristales formados sean más pequeños o impidan su formación, son protectores contra la congelación y los más usados son el glicerol, propilenglicol, butilenglicol, glucosa y sacarosa (44,46).

IV.12.4. La adición de fosfatos protegen a las proteínas contra la desnaturalización, aumentan la capacidad de retención de agua y evitan que las proteínas se deshidraten.

IV.12.5. Cuando la liofilización se lleva a cabo en productos estériles, los pasos preliminares deben hacerse en condiciones asépticas: los envases y tapones se deben esterilizar térmicamente. El producto debe ser microfiltrado por membrana con poro de 0.2 micras; el llenado debe hacerse,

en áreas estériles (de preferencia con protección de flujo laminar).

IV.12.6. Los equipos deben ser esterilizados; hay algunos que admiten vapor en su interior, permitiendo una esterilización térmica (como si fueran autoclaves) en caso de no ser así, una saturación del ambiente interno con formol durante 4 ó 5 horas, suele ser suficiente. En caso de contaminaciones microbianas bajas, la liofilización misma suele ayudar a lograr el producto estéril, ya que tanto la congelación como el secado, destruyen a una gran cantidad de microbios.

IV.12.7. Si es posible un taponamiento al vacío es magnífico; si no, la ruptura de vacío debe hacerse con gases estériles (microfiltrados).

IV.12.8. Las bajas humedades en las áreas donde se manejan los productos liofilizados, son requisitos indispensables.

IV.12.9. El vidrio neutro (Tipo I) es mejor para la liofilización, por su mejor conductividad térmica y su mejor coeficiente de dilatación, que lo hace más resistente al choque térmico. La desventaja es que es más caro. Los fondos de los envases deben de ser planos.

IV.12.10. Casi todo material es más o menos permeable a los gases. La goma de la cual están hechos los tapones, no es una excepción. Como la cantidad de aire húmedo que puede penetrar en doce meses es relativamente importante, es casi universal el recurrir a otra solución. El vacío de la cámara de liofilización es roto con nitrógeno ultrapuro y seco.

Habiendo este gas en el interior de los frascos a la presión de una atmósfera, la permeación de aire húmedo hacia adentro del frasco es casi nula.

IV.12.11. Aparte del problema de la permeabilidad de la goma, se ha encontrado que el contenido de humedad de un tapón de goma natural es suficientemente alto como para rehidratar una muestra liofilizada de 0.05g de peso seco (5 % de sólidos en 1 ml) desde cero a 6 % de contenido de humedad (44).

V. OBJETIVOS

- Eliminación del factor VII de la tromboplastina de trabajo.
- Determinar el mejor soporte de liofilización para la tromboplastina de trabajo.
- Integración del cloruro de calcio a la tromboplastina de trabajo durante el proceso de liofilización.
- Utilizar el mejor glicol (Etilenglicol, Propilenglicol), como agente surfactante, que garantice la preparación rápida de la suspensión de tromboplastina.
- Calibrar la tromboplastina de trabajo liofilizada utilizando el método de Biggs y Denson modificado, empleando una preparación de referencia terciaria (Tromboplastina comercial).
- Determinación del Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) de la tromboplastina de trabajo liofilizada.
- Realizar una comparación de costos entre el reactivo comercial y el elaborado en el laboratorio.

VI. HIPOTESIS

La sensibilidad de una tromboplastina se ve aumentada si ésta no presenta residuos del factor VII, por lo que si es eliminado, su sensibilidad aumentará.

Si una tromboplastina liofilizada presenta un buen soporte, un adecuado agente surfactante y tiene integrado cloruro de calcio, entonces tendremos una tromboplastina tisular cálcica liofilizada de fácil manejo, uso confiable para el laboratorio clínico y de más bajo costo que una tromboplastina comercial.

DISEÑO DE INVESTIGACION

VII. MATERIAL Y METODOS

VII.1. TIPO DE ESTUDIO

La investigación se realizó de acuerdo a un estudio de tipo experimental, transversal, prospectivo y comparativo.

VII.2. UNIVERSO: MATERIAL BIOLÓGICO.

Se extrajo la tromboplastina de cerebros de conejos, sanos, jóvenes de un año a año y medio, que hubieran sido sacrificados en un intervalo de tiempo máximo de 24 horas.

VII.3. UNIVERSO PARA LLEVAR A CABO LA DETERMINACION DEL ISI.

Se estudio una población de 20 sujetos sanos y 60 pacientes que estuvieran recibiendo tratamiento con anticoagulantes orales, del Hospital Regional de Zona No.25 del IMSS durante el mes de julio de 1992.

VII.4. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION PARA LA OBTENCION DEL EXTRACTO DE TROMBOPLASTINA.

- Conejos sanos, jóvenes de año a año y medio, sin importar raza que hayan sido sacrificados máximo 24 horas antes.

VII.5. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION PARA LA DETERMINACION DEL ISI.

- Se obtuvo el plasma de 20 sujetos sanos de ambos sexos, que no presentaran defectos en el sistema de coagulación, con un porcentaje de TP arriba del 70 %.

- Se obtuvo el plasma de 60 pacientes que estuvieran recibiendo tratamiento con anticoagulantes orales (derivados de la indanediolona o cumarina: warfarina, fenindiona, etc.)

entre un periodo de tres a seis semanas, con un rango de RIN de 1.5 a 5.

VII.6. VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION	CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES
Soporte	Le da cuerpo y protección al elemento a liofilizar	No sea higroscópico Sea soluble en agua Sea inocuo, estar libre de pirogenos.
Agente Surfactante	Ayuda a que los cristales formados sean más pequeños o impida su formación y da protección contra la liofilización.	Permite una mejor solubilización del reactivo liofilizado.
Ión calcio	Su integración disminuye el tiempo de preparación del reactivo para elaborar la prueba de TP.	Tromboplastina calcica de más fácil manejo.
Tiempo de Protrombina	Tiempo de coagulación de una muestra de plasma en presencia de una preparación de tromboplastina y de la cantidad apropiada de iones calcio.	11 a 13 seg > 70% actividad < 1.2 RP

VII.7. MATERIAL

VII.7.1. MATERIAL DE VIDRIO

NOMBRE	ESPECIFICACION
Pipetas graduadas	0.1, 0.2, 1.0, 5.0 y 10 ml
Tubos de ensaye	12x75, 13x100 y 18x150 mm
Vasos de precipitado	100, 250 y 500 ml
Probeta	100 ml
Tubos de vidrio al vacío	12x75 mm
Viales transparentes	10 ml
Viales color ambar	10 ml

Pipetas pasteur
Cajas petri
Desecador
Vidrio de reloj

VII.7.2. EQUIPO

Liofilizadora	Freeze Dryer 3 Labconco Internacional científica BBL
Fibrintimer (Fibrómetro)	
Centrifuga clinica	Solbat J-12, aparatos científicos
Balanza analítica	Mettler H80
Baño metabólico	Mapsa modelo BMT-4
Refrigerador	American
Refrigerador	Revco Ultra Low
Pipeta semiautomática	0.1 ml, Alva nuclear
Pipeta semiautomática	0.2 ml, Absoluter
Engargoladora	
Cronómetro manual	

VII.7.3. SUSTANCIAS

Alcohol etílico	70 %
Citrato trisódico	3.8 % (0.11 mol/l)
Cloruro de calcio	0.02 M
Solución salina estéril	0.9 %
Sulfato de bario	Merck
Acetona grado reactivo	Baker 9006-62
Acetona destilada	48-57 C
Albumina bovina	Merck
Albumina de huevo	Merck
Lactosa	Bioxon
Leche descremada	Magnolia
Etilenglicol	Merck
Propilenglicol	Merck
Acetona	Industrial
Agua destilada	
Hielo seco	

Tromboplastina cálcica liofilizada de placenta humana
+ thromborel-S (Lote No. 505795) Behring ISI=1.11

Tromboplastina de cerebro de conejo (Tromboplastina
de trabajo) liofilizada
+ Producida en FES Zaragoza

VII.7.4. MATERIAL DIVERSO

Papel filtro	Poroso mediano
Agujas estériles	Calibre 22x32 mm
Gradilla	metal
Jeringas desechables	5 ml
Gasas	
Perilla de plástico	
Mortero con pistilo de porcelana	
Pinzas de disección	
Tijeras	
Papel parafilm	
Espátula	
Bulbos de goma	
Ligaduras	
Masking tape	
Algodón	
Porta agujas para vacuntainer	
Tapones de hule No. 0	
Agitador de vidrio	
Aplicadores	
Copas de plástico para el fibrinómetro	
Tapones y retapas para viales	

M E T O D O L O G I A

El presente trabajo fue realizado primero en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos Zaragoza para la obtención de tres lotes de extracto granulado de la tromboplastina de trabajo. Los lotes obtenidos fueron: Z1, Z2 y Z3, de los cuales se obtuvo, 30, 20 y 50 gramos respectivamente, con el fin de emplear los mismos lotes durante el desarrollo de todo el trabajo y tener un mejor control de los factores que intervienen.

La parte experimental del proceso de liofilización se desarrolló en el Laboratorio de Investigación de Inmunología de Campus II de FES Zaragoza.

Para la calibración indirecta de los lotes Z2x y Z2y liofilizados, la parte experimental se desarrolló en el laboratorio clínico del Hospital Regional de Zona No. 25 del IMSS.

VIII. TECNICAS.

Las técnicas empleadas en éste estudio fueron las siguientes:

VIII.1. Obtención de tromboplastina tisular.

a) Método común para su obtención.

Se obtuvo el cerebro de conejo de 6-24 horas post-mortem, en una caja de petri con agua destilada, se le quitaron perfectamente los vasos sanguíneos y meninges.

Se fragmentó el cerebro en pequeños pedazos de uno a dos centímetros cuadrados. Se maceró con acetona hasta obtener el aspecto de hojuelas.

Por último se maceró con acetona grado reactivo hasta obtener un aspecto de granulado. El granulado se dejó secar en papel filtro por media hora y se guardó en un desecador.

Para probar la sensibilidad de las tromboplastinas, se realizaron las curvas de referencia, con pool de plasmas, de la misma forma que con el reactivo de referencia Thromborel-S y de esta manera se eligieron los lotes más idóneos para la calibración.

b) Preparación líquida de tromboplastina.

Se pesa 0.5 g de granulado de tromboplastina en 10 ml de solución salina estéril. Se incuba a 37°C agitando en el vortex cada cinco minutos, un minuto durante media hora. Se deja sedimentar durante 30 minutos a 37°C. Se separa el sobrenadante y se coloca la cantidad proporcional de cloruro de calcio 0.02M, se guarda en el refrigerador hasta antes de utilizar.

VIII.2. SELECCION DE PLASMAS

a) Normales.

Se seleccionaron plasmas de sujetos sanos ambulatorios de ambos sexos, que no presentaron defectos en el sistema de coagulación, con un porcentaje de TP arriba del 70%.

El pool de plasmas se realiza con 5 donadores sanos.

La sangre se obtiene por punción venosa con el sistema de vacutainer, evitando la hemolisis y la contaminación con líquidos tisulares. El tubo de vacutainer al vacío, contiene una parte (0.5 ml) de citrato trisódico (0.11 M) que se mezcla con nueve partes de sangre (4.5 ml), se agita suavemente para evitar la formación de hemolisis. Se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos. Se separa el plasma sobrenadante y se conserva el plasma a 4° C en el refrigerador, hasta la realización de la determinación. Se procesa en un máximo de 2 horas.

b) Anticoagulados.

Se seleccionaron plasmas de pacientes que estuvieron recibiendo tratamiento con anticoagulantes orales, entre un periodo de tres a seis semanas, derivados de la indanediona o cumarina (Warfarina, fenindiona, etc.), con un rango de RIN 1.5 a 5.

La toma de muestra es en la misma forma que la anterior. Estos plasmas fueron utilizados en la calibración de tromboplastinas.

VIII.3. REALIZACION DEL TIEMPO DE PROTROMBINA (PRUEBA DE QUICK)

El tiempo de protrombina se realizó con el equipo semiautomatizado, fibrómetro.

Se calienta previamente a 37°C un volumen suficiente de Tromboplastina (0.2 ml por prueba) no menos de 15 minutos y no más de 60 minutos. Se colocan 0.1 ml de plasma, con la pipeta semiautomática, a la copa del fibrinómetro, posteriormente se incuba de 1-3 minutos a 37°C y no más de 3 minutos y se integra enérgicamente 0.2 ml de tromboplastina recalcificada iniciándose simultáneamente el cronometraje y deteniéndose al momento de formarse el coágulo. El tiempo se obtiene en segundos digitalmente. Cada TP se realiza por duplicado para observar reproducibilidad.

Nota: En el transcurso de la medición de TP, los demás plasmas se conservan de 2-6°C en hielo. La valoración se realiza dentro de las dos horas después de la colección de la muestra.

VIII.4. TRAZADO DE LA CURVA DE REFERENCIA (% QUICK).

El tiempo de protrombina en segundos se transformó en porcentaje de actividad utilizando una curva de referencia.

La curva de referencia se prepara a partir de las diluciones de un pool de plasmas citratado, de un mínimo de 5 donadores sanos. Las diluciones se realizan con solución salina 0.9% estéril, como se indica a continuación.

Porcentaje del normal	100	50	25	12.5	10
Dilución del plasma	Sin diluir	1 + 1	1 + 3	1 + 7	1 + 9

El tiempo de protrombina para cada dilución se realiza por triplicado, dentro de los primeros 30 minutos de realizadas las diluciones.

Los tiempos de protrombina se grafican en función del porcentaje en las ordenadas y el tiempo en segundos en las abscisas en papel milimétrico. Obteniéndose una línea recta.

El trazado de la curva se puede ver afectado por:

- La presencia de filamentos de fibrina en el plasma.
- Plasmas hemolizados o lipémicos.
- Errores técnicos como variación de la temperatura, trombo-plastina o cloruro de calcio contaminado, variación en la relación uno a nueve de anticoagulante con sangre.
- Incubación corta o prolongada de reactivos.
- Errores en la técnica de lectura del TP.

Nota: Los datos, se ajustaron por el método de mínimos cuadrados.

VIII.5. CALIBRACION DE TROMBOPLASTINA (ISI).

a) Procedimiento.

El procedimiento de calibración comprende la determinación de una serie de tiempos de protrombina, realizándose ocho determinaciones para cada uno de los 10 días de prueba, de

los cuales seis eran plasmas de pacientes anticoagulados y dos eran plasmas de pacientes normales, determinados tanto por la preparación de referencia como por la tromboplastina liofilizada a calibrar (la cual debe contener material suficiente para 10 pruebas por lo menos).

La PRT terciaria fue:

Thromborel-S ISI = 1.11

Las tromboplastinas liofilizadas a calibrar fueron la Z2x y la Z2y. Todo el manipuleo de los plasmas se realizó con material de plástico. La determinación del punto final se realizó con equipo semiautomatizado.

Cada muestra de plasma se evaluó por única vez, siguiendo el procedimiento de Quick.

El orden de la lectura fue la siguiente:

PLASMA	Preparación de Referencia de Trabajo (PRT)		Preparación a calibrar (b)	
	Orden de Prueba	Tiempo de coagulación (seg)	Orden de Prueba	Tiempo de coagulación (seg)
Normal 1	I	----	II	----
Paciente 1	III	----	IV	----
Paciente 2	V	----	VI	----
Paciente 3	VII	----	VIII	----
Paciente 4	IX	----	X	----
Paciente 5	XI	----	XII	----
Paciente 6	XIII	----	XIV	----
Normal 2	XV	----	XVI	----

b) Interpretación.

Una vez obtenidos los 80 valores de los 10 días de evaluación, se sometieron a un análisis de regresión ortogonal, a fin de obtener un ISI correspondiente a la tromboplastina de trabajo liofilizada (lote Z2x y Z2y) y un coeficiente de variación del índice de sensibilidad, menor al 3%. En algunos países puede ser aceptable una precisión de 5%.

c) Evaluación estadística.

El ISI de la tromboplastina liofilizada a calibrar se obtiene anotando los tiempos de protrombina obtenidos con las dos tromboplastinas con los ejes logarítmicos, en el eje Y la preparación de referencia y en el eje X los de la tromboplastina a calibrar, trazando una línea recta y calculando la pendiente. La técnica utilizada es la regresión ortogonal. Con esta técnica se calcula la pendiente C aplicando las siguientes fórmulas.

PRT,b

$$C_{PRT,D} = m + (m^2 + 1)^{1/2}$$

$$\text{donde } m = \frac{\sum (LTP_{PRT} - \overline{LTP}_{PRT})^2 - \sum (LTP_b \cdot \overline{LTP}_b)^2}{2 \sum (LTP_{PRT} - \overline{LTP}_{PRT}) - \sum (LTP_b \cdot \overline{LTP}_b)}$$

LTP_{PRT} = LOGARITMO DEL TP INDIVIDUAL, EMPLEANDO PRT

\overline{LTP}_{PRT} = MEDIA DE LOS LOGARITMOS DEL TP, EMPLEANDO PRT

LTP_b = LOGARITMO DEL TP INDIVIDUAL, EMPLEANDO LA TROMBOPLASTINA A CALIBRAR

\overline{LTP}_b = MEDIA DE LOS LOGARITMOS DEL TP, EMPLEANDO LA TROMBOPLASTINA A CALIBRAR

\sum = DENOTA LA SUMATORIA DE LOS TERMINOS DE TODOS LOS PLASMAS

EL INDICE DE SENSIBILIDAD INTERNACIONAL DE LA TROMBOPLASTINA LIQUIDA A CALIBRAR ISI_b SE OBTIENE COMO SIGUE :

$$ISI_{PRT,D} = ISI_{PRT} C_{PRT,D}$$

EL ERROR ESTANDAR DEL ISI_{PRT} SE CALCULA COMO :

$$SE_{(ISI,PRT)} = ISI_{PRT} SE_{(C_{PRT,D})}$$

LA FORMULA PARA CALCULAR $SE_{(C_{PRT,D})}$ USANDO LA REGRESION ORTOGONAL ES :

$$SE_{(C_{PRT,D})} = \left\{ \frac{[(1 + C^2)U + VC]}{nU^2} VC \right\}^{1/2}$$

donde :

n = No. DE PLASMAS PROBADOS (PACIENTES Y NORMALES)

$C = C_{PRT,D}$

$$U = \sum (LTP_{PRT} - \overline{LTP}_{PRT}) (LTP_b - \overline{LTP}_b) / n$$

$$V = \{ \sum (LTP_{PRT} - \overline{LTP}_{PRT})^2 - C \sum (LTP_{PRT} - \overline{LTP}_{PRT}) (LTP_b - \overline{LTP}_b) \} / (n - 2)$$

EL COEFICIENTE DE VARIACION EN PORCIENTO ES :

$$\% CV_{ISI,PRT} = 100 SE_{ISI,PRT} / ISI_{PRT,D}$$

COMO EL ISI_{PRT} Y $C_{PRT,D}$ SON DETERMINADOS EN EJERCICIOS DE CALIBRACION INDEPENDIENTE, EL ERROR ESTANDAR DE ISI_b EN FUNCION DE LAS IMPRECIOSIONES DE ISI_{PRT} Y $C_{PRT,D}$ PUEDE CALCULARSE COMO :

$$SE_{ISI,D} = \left[\left\{ ISI_{PRT} SE_{(C_{PRT,D})} \right\}^2 + \left\{ C_{PRT,D} SE_{ISI,PRT} \right\}^2 \right]^{1/2}$$

EL COEFICIENTE DE VARIACION DEL ISI_b SERA ENTONCES :

$$\% CV_{ISI,D} = 100 SE_{ISI,D} / ISI_b$$

TODOS LOS CALCULOS FUERON REALIZADOS EN UNA CALCULADORA CASIO FX-3800P.

VIII.6. FORMAS DE REPORTAR EL TIEMPO DE PROTROMBINA (TP).

El tiempo de protrombina obtenido en segundos, puede convertirse en porcentaje de actividad (Quick %), Radio de Protrombina (RP) o Radio de TP Internacional Normalizado (RIN).

- Porcentaje de actividad.

Este se obtiene interpolando el tiempo en segundos, en la curva de referencia, para así obtener el % de actividad.

normal > 70 %

- Radio de protrombina (RP)

Se define como la relación

$$RP = \frac{\text{TP paciente en segundos}}{\text{TP normal en segundos}} \quad \text{normal} < 1.2$$

El plasma normal puede ser un estándar o un pool de plasmas.

- Radio de TP Internacional Normalizado (RIN).

El RIN se calcula a partir del Índice de Sensibilidad Internacional (ISI).

$$RIN = \frac{ISI}{RP}$$

b

$$RIN = \text{antilog} (ISI \log RP)$$

Para cada lote de tromboplastina se determina un valor ISI mediante su calibración frente a una preparación de referencia. Este dato lo tiene que especificar el fabricante.

VIII.7. INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE TP

La prueba del tiempo de protrombina se utiliza sobre todo en la selección prequirúrgica para detectar problemas de hemorragias potenciales. Una prueba de TP anormal o alargada indica normalmente que se ha producido una disminución de nivel de uno o más factores en la vía extrínseca o común de la coagulación sanguínea. Esta condición puede aparecer debido a trastornos de coagulación de tipo hereditario, deficiencia de vitamina K, enfermedad hepática o administración de fármacos. La prueba de TP es también el ensayo de laboratorio más corriente utilizado para controlar la terapia anticoagulante oral, puesto que es sensible a los factores II, VII y X. El TP no es sensible a las deficiencias en el sistema de coagulación intrínseca (factores VIII, XI y XII) ni a disminuciones plaquetarias, ni tampoco puede utilizarse para controlar un tratamiento con heparina.

VIII.8. ELIMINACION DEL FACTOR VII DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR.

En estudios anteriores (35-37). Se observó que los residuos del FVII de la coagulación afectan el TP y en su ausencia, el TP se ve alargado por lo que se obtiene una tromboplastina más sensible; en base a estos estudios, el primer objetivo de este trabajo, pretende eliminar el factor VII, de la tromboplastina tisular, por medio del sulfato de bario, el cual adsorbe las proteínas y lipoproteínas del

plasma. Ya que sabemos que la tromboplastina esta formada por proteínas y fosfolípidos y el FVII es una beta-globulina (47).

Por consiguiente se plantearon diferentes concentraciones de sulfato de bario, iniciando con una baja concentración. A fin de detectar si ocurren diferencias o hay algún efecto, se propuso evaluar, la sensibilidad de la tromboplastina conforme se fuera sometiendo a las diferentes concentraciones de sulfato de bario, con curvas de referencia y pool de plasmas.

A continuación se muestra el tratamiento a seguir:

Se pesa un gramo de granulado de tromboplastina y se le integran 20 ml de solución salina estéril, inmediatamente se incuba a 37°C agitando en el vortex cada 5 minutos, por un minuto, durante media hora, después se deja sedimentar por 30 min. a 37°C, se separa el sobrenadante y se mide el volumen. El volumen de sobrenadante se divide en 6 fracciones, integrándole a cada fracción, sulfato de bario al: 1, 2, 4, 6 y 8 % respectivamente, a una de las fracciones dejarla sin sulfato de bario. Se mezcla homogéneamente el sobrenadante con el sulfato de bario y dejar sedimentar por 30 minutos a 37°C y se centrifuga 5 min. a 1000 rpm. Después se separa el sobrenadante y se le coloca la cantidad proporcional de cloruro de calcio 0.02 M. y se deja en el refrigerador hasta antes de utilizar.

Se realizan curvas de referencia para cada concentración.

VIII.9. DETERMINACION DEL MEJOR SOPORTE PARA LA LIOFILIZACION DE LA TROMBOPLASTINA DE TRABAJO.

Estudios anteriores (48) han demostrado que la leche descremada comercial de vaca funciona adecuadamente como soporte de liofilización presentando como principal inconveniente, concentraciones no controlables de iones calcio, el cual es un factor determinante para el tiempo de protrombina. Por tanto se pretende encontrar un mejor soporte de liofilización para la tromboplastina de trabajo obtenida de acuerdo al objetivo anterior.

Para ello se procederá a estudiar proporciones variables de albúmina bovina, albúmina de huevo, lactosa y leche descremada.

Se realizaron curvas de referencia, con pool de plasmas para evaluar si el liofilizado y/o la sensibilidad de la tromboplastina se afectan con cada uno de los soportes.

Primero se estableció probar, los soportes a la concentración de 1 %, en base a los estudios realizados (48). Los resultados que se obtuvieron fueron determinantes para establecer si eran adecuados, o bien se tenían que probar otras concentraciones de soportes, o de mezclas de ellos hasta encontrar la concentración y el soporte adecuado.

METODO A SEGUIR PARA PREPARAR LA TROMBOPLASTINA CON EL SOPORTE, PARA LIOFILIZAR.

Se pesa un gramo de granulado de tromboplastina y se le integra 20 ml de solución salina estéril, inmediatamente se incuba a 37°C agitando en el vórtex cada 5 minutos, por un minuto durante media hora, después se deja sedimentar por 30 minutos a 37°C, se separa el sobrenadante y se mide su volumen. Del volumen obtenido se separa 1 ml, al cual hay que colocarle la cantidad proporcional de cloruro de calcio 0.02 M y se refrigera, al volumen restante se le adiciona el soporte a la concentración a probar, se disuelve y homogeniza bien el soporte. Posteriormente, para liofilizar se mide 1 ml y se coloca en un vial de 10 ml, enseguida se procede a formar la monocapa con mezcla frigorífica (hielo seco-acetona).

Ya formada la monocapa se coloca el vial en la liofilizadora, que previamente se encontrará a una temperatura $< -50^{\circ}\text{C}$ y que presente un buen vacío.

Enseguida se observa la formación de una capa de hielo sobre el vial, lo cual será indicación de que esta liofilizándose la tromboplastina de trabajo, se mide el tiempo que tarda en perder el vial esta capa de hielo completamente y se deja liofilizar de 15 a 20 minutos más para garantizar un buen liofilizado, por último se coloca al vial su tapón y retapa (la retapa se coloca al vial con la engargoladora).

FORMA DE PREPARAR PARA SU USO LA TROMBOPLASTINA LIOFILIZADA.

Se hidrata el vial con 1 ml de agua destilada estéril (comercial) y se le integra 1 ml de cloruro de calcio 0.02 M. Se homogeniza e incuba no menos de 15 minutos y no más de 60 minutos. De la misma forma incubar el reactivo, al que no se integró soporte, el cual se probará simultaneamente, para observar cambios originados por el proceso de liofilización o por el soporte integrado.

Se realiza curvas de referencia para observar estos posibles cambios.

VIII.10. DETERMINACION DEL AGENTE SURFACTANTE.

Como ya se planteó anteriormente, el fin principal de un agente surfactante, es ser un protector contra la liofilización, además de que ayuda a la formación de cristales pequeños o bien impide su formación produciendo un cuerpo poroso lo cual permite que se disuelva fácilmente el reactivo liofilizado.

Para lograrlo se utilizaron dos glicoles; el etilenglicol y el propilenglicol.

Respecto a las concentraciones a probar, como no hay información al respecto, se determinó probar 3, 5, y 10 %, se consideró en forma arbitraria que estas concentraciones darían pauta para saber si se debía utilizar una concentración mayor o menor a éstas.

Se evaluó el agente surfactante, mediante curvas de referencia (como parámetro de exclusión), de la tromboplastina de referencia (Thromborel-S) y la tromboplastina de trabajo ya con un soporte establecido.

METODOLOGIA PARA ENCONTRAR EL AGENTE SURFACTANTE.

Se pesa un gramo de granulado de tromboplastina y se le integra 20 ml de solución salina estéril, inmediatamente se incuba a 37°C agitando en el vórtex cada 5 minutos, por un minuto durante media hora, después se deja sedimentar por 30 minutos a 37°C, se separa el sobrenadante y se mide su volumen. Al volumen obtenido se le integra el soporte a la concentración determinada, se disuelve y se homogeniza el soporte y se integra el agente surfactante a la concentración a probar y se disuelve bien. Para proceder a liofilizar se mide 1 ml del sobrenadante en las condiciones establecidas y se coloca en un vial de 10 ml, posteriormente se procede a formar la monocapa con mezcla frigorífica (hielo seco-acetona), se coloca el vial en la liofilizadora, que previamente se encontrará a una temperatura $< -50^{\circ}\text{C}$ y que presente un buen vacío, inmediatamente se observa la formación de una capa de hielo sobre el vial, lo cual indica que la tromboplastina de trabajo ya se está liofilizando, se mide el tiempo que tarda en perder el vial esta capa de hielo completamente y se deja liofilizar de 15 a 20 minutos más para garantizar un buen liofilizado, por último se coloca al

vial su tapón y retapa (la retapa se coloca con la engargoladora).

PREPARACION DE LA TROMBOPLASTINA LIOFILIZADA CON EL AGENTE SURFACTANTE.

Se hidrata un vial con 1 ml de agua destilada estéril (comercial) y se le integra 1 ml de cloruro de calcio 0.02 M, se homogeniza e incuba no menos de 15 min. y no más de 1 hora. Se realizan las curvas de referencia.

Nota: Si se liofilizan 2 ml de reactivo, entonces se hidrata con 2 ml de agua destilada.

VIII.11. INTEGRACION DEL CLORURO DE CALCIO A LA TROMBOPLASTINA DE TRABAJO.

La importancia principal de la integración del cloruro de calcio a la tromboplastina de trabajo radica, en la obtención de una tromboplastina cálcica, lo cual facilita su uso, en el laboratorio clínico principalmente.

Para lo cual se pretende integrar el cloruro de calcio a la concentración 0.02 M, que es, la concentración con la cual se trabaja, para los fines clínicos propuestos.

Tomando en cuenta que durante un proceso de liofilización se pierde el agua; y las sales y solutos se conservan, y por lo tanto no se ven afectados.

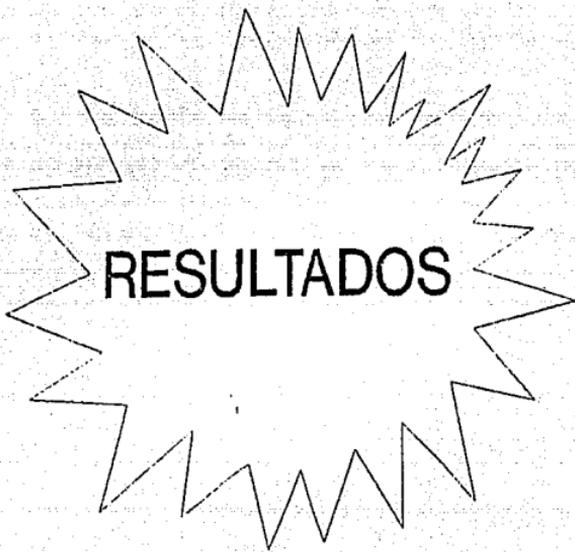
METODOLOGIA PARA LIOFILIZAR LA TROMBOPLASTINA CON CALCIO INTEGRADO.

Se pesa un gramo de granulado de tromboplastina y se le integra 20 ml de solución salina estéril, inmediatamente se incuba a 37°C agitando en el vórtex cada 5 minutos, por un minuto durante media hora, se deja sedimentar por 30 minutos a 37°C, se separa el sobrenadante y se mide su volumen, posteriormente se integra el soporte a la concentración determinada, se disuelve y se homogeniza el soporte, inmediatamente después se le coloca la cantidad proporcional de cloruro de calcio 0.02 M y se homogeniza. Se miden 2 y 4 ml y se colocan en forma individual en un vial de 10 ml. Se procede a formar la monocapa con mezcla frigorífica (hielo seco-acetona) y se coloca rápidamente el vial en la liofilizadora que previamente se encontrará a una temperatura menor de -50°C y que presente un buen vacío, inmediatamente se empieza a observar la formación de una capa de hielo sobre el vial, lo cual será indicación de que esta liofilizándose. Posteriormente se mide el tiempo en que tarda en perder el vial esta capa de hielo completamente y se deja liofilizar de 15 a 20 minutos más para garantizar un buen liofilizado. Por último se coloca al vial su tapón y retapa (la retapa se coloca al vial con la engargoladora).

FORMA DE PREPARAR PARA SU USO, LA TROMBOPLASTINA CALCICA DE TRABAJO.

Si se liofilizb 2 y 4 ml de la tromboplastina de trabajo, se hidratan con 2 y 4 ml respectivamente, de agua destilada estéril, se homogeniza y se incuba no menos de 15 minutos y no más de 60 minutos.

Nota: De igual manera los viales liofilizados, se sometieron a realizar curvas de referencia para determinar cambios y evaluar la sensibilidad de las tromboplastinas.



RESULTADOS

TROMBOPLASTINAS DE TRABAJO

A continuación se muestra en la tabla 1 los resultados obtenidos para las curvas de referencia de los lotes Z1, Z2 y Z3 con los que se desarrolló todo el trabajo para la determinación de la formulación de la tromboplastina de trabajo liofilizada, en comparación con la tromboplastina de referencia Thromborel-S.

Se observó en los tiempos obtenidos para el lote Z1 y Z2 que tendían a ser parecidos a la tromboplastina de referencia, lo cual se observa más claramente en la grafica 1, lo cual nos indicó indirectamente que se contaba con lotes sensibles.

TABLA 1

DATOS PARA LAS CURVAS DE REFERENCIA.

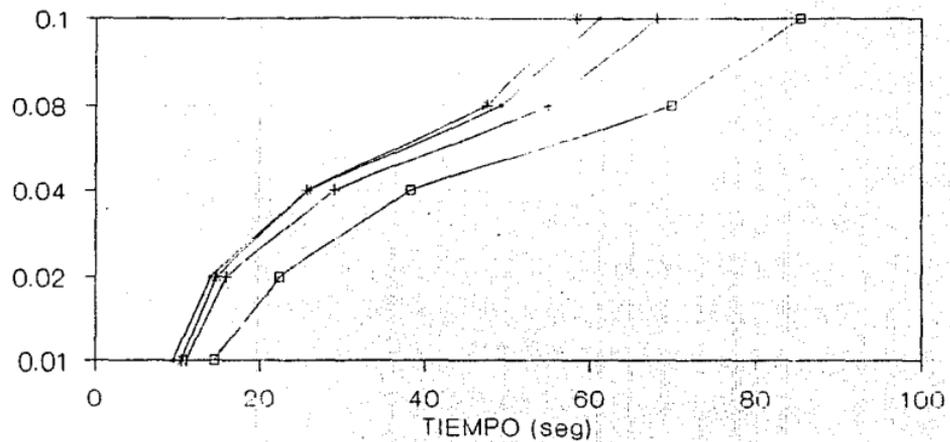
% DE ACTIV.	T-S	Z-1	Z-2	Z-3
100.0	9.5	11.1	10.5	14.5
50.0	14.0	16.0	15.0	21.9
25.0	25.1	27.1	24.3	38.5
12.5	47.0	53.8	46.1	72.6
10.0	63.0	69.5	59.8	83.0

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO A PARTIR DE UN MISMO POOL DE PLASMAS.

GRAFICA 1

TROMBOPLASTINAS DE TRABAJO

PORCIENTO DE ACTIVIDAD



LOTES

— T-S — Z-1 — Z-2 — Z-3

CURVAS DE REFERENCIA

EFFECTO DEL SULFATO DE BARIO EN LA SENSIBILIDAD DE LA TROMBOPLASTINA DE TRABAJO

Para observar si se mejoraban en su sensibilidad los lotes obtenidos se estudiaron las concentraciones 1, 2, 4, 6 y 8 % de sulfato de bario en el lote Z3 y se observó que todas estas concentraciones tendían a aumentar el TP en el 100 % de actividad de 0.4 a 0.7 seg excepto al 8 % y continuando con un % de actividad menor hasta llegar al 10 % de actividad el TP tiende a seguir siendo muy parecido al TP de la tromboplastina que no tiene sulfato de bario a excepción que al 8 % de sulfato de bario el TP es más bajo lo cual indicaría que la sal ya está interfiriendo de alguna manera en el TP. Con esto se observa que el sulfato de bario no favorece realmente bajo estas condiciones a aumentar la sensibilidad como se puede observar en la grafica 2, por lo que considerando los resultados obtenidos de cada lote en la tabla y grafica 1, se decidió continuar trabajando con el extracto natural de cada lote que como ya se dijo, indirectamente, los resultados establecidos en esta tabla y grafica 1 indican buena sensibilidad.

TABLA 2

DATOS DE LAS CURVAS DE REFERENCIA

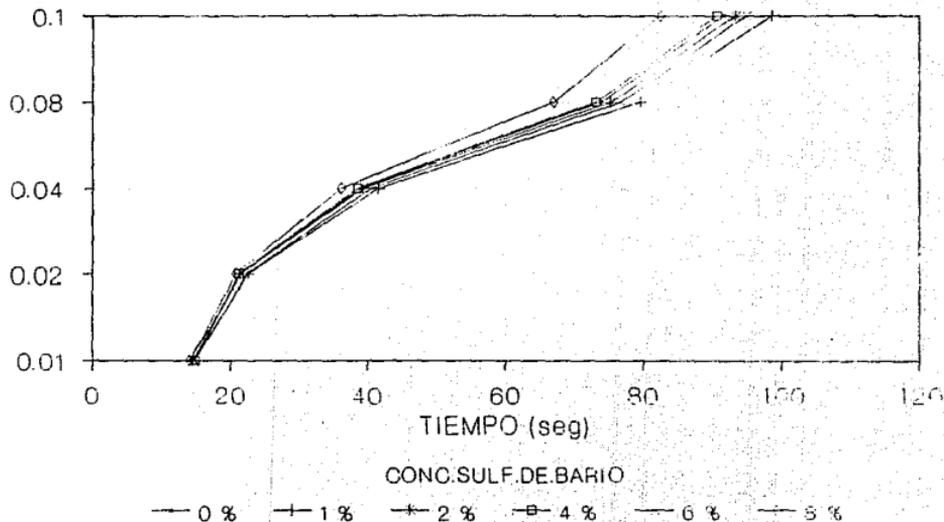
% ACT	CONCENTRACION DE SULFATO DE BARIO					
	0%	1%	2%	4%	6%	8%
100.0	14.1	14.5	14.5	14.8	14.7	14.0
50.0	22.0	23.0	21.8	21.0	21.3	19.0
25.0	36.8	38.2	35.8	35.0	39.6	37.3
12.5	73.0	87.2	76.4	80.7	78.5	74.0
10.0	93.0	92.5	93.5	84.7	94.0	75.6

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO A PARTIR DE UN MISMO POOL DE PLASMAS.

GRAFICA 2

EFFECTO DEL SULFATO DE BARIO

PORCIENTO DE ACTIVIDAD



CURVAS DE REFERENCIA

DETERMINACION DEL MEJOR SOPORTE DE LIOFILIZACION

Para determinar el mejor soporte de liofilización inicialmente se procedió a probar leche descremada al 1 % que en un estudio realizado anteriormente (48) se estableció que era el mejor soporte, así como albúmina de huevo y albúmina bovina al 1 % y una mezcla de albúmina bovina-albúmina de huevo al 0.5 % respectivamente en comparación con la tromboplastina de trabajo (L-23) sin soporte y la tromboplastina de referencia Thromborel-S. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3 nos mostraron que la leche incrementó los TP en cada por ciento de actividad de la tromboplastina aun sin liofilizar por lo que ya estaba afectando de antemano la actividad de la misma y observando los resultados de los otros soportes también tienden a aumentar el TP, a esta concentración estudiada ninguno fue efectivo. Después de probar más concentraciones de estos y otro soporte que fue la lactosa se estableció que la concentración más apropiada así como el soporte más adecuado era la albúmina de huevo-lactosa al 3% respectivamente, como se puede observar en la tabla 4 pues a pesar de que la albúmina de huevo sola como soporte presenta TP adecuados a los respectivos % de actividad, el aspecto del liofilizado era muy quebradizo y se adhería a las paredes del vial lo que dificultaba su solubilización en tanto que la albúmina de huevo-lactosa presentó un cuerpo poroso no adherido a las paredes y fácil de solubilizar.

TABLA 3

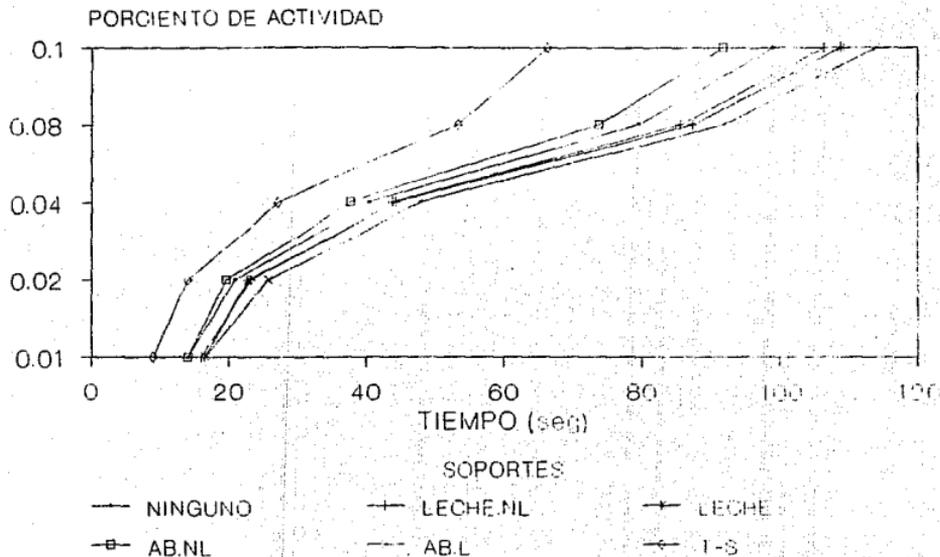
DATOS DE LAS CURVAS DE REFERENCIA OBTENIDAS CON LOS SOPORTES Y DIFERENTES CONCENTRACIONES.

SOPORTE	NINGUNO	LE	LE	AB	AB	AH	AH	AB-AH	AB-AH	T-S
CONCENT.	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0.5%-0.5%		
% ACTIV.	NL	NL	L	NL	L	NL	L	NL	L	
100.0	14.0	16.0	16.5	14.0	16.5	14.0	15.0	16.0	14.5	9.0
50.0	22.5	24.5	23.5	20.5	25.0	21.5	24.0	24.5	24.5	14.5
25.0	36.0	41.5	37.5	35.5	46.0	34.0	44.5	44.0	41.0	25.0
12.5	76.0	78.1	88.0	66.5	92.7	69.1	96.0	93.0	88.0	52.0
10.0	102.5	112	110	97.0	114	96.5	123	112.5	120	68.0

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO A PARTIR DE UN MISMO POOL DE PLASMAS. SE LIOFILIZO 1 ml. (LIOFILIZADO = L Y NO LIOFILIZADO = NL)

GRAFICA 3

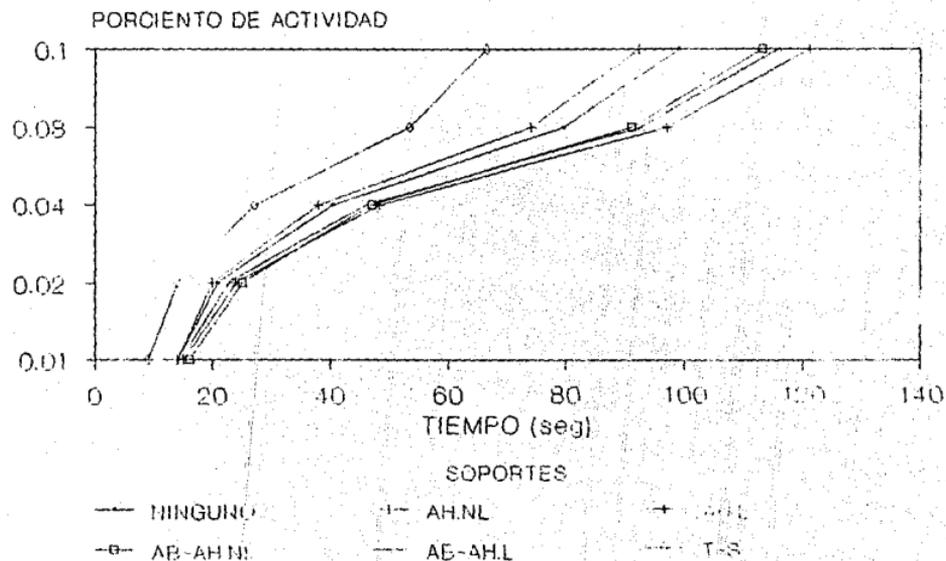
DETERMINACION DEL SOPORTE



CURVAS DE REFERENCIA

GRAFICA 3.1

DETERMINACION DEL SOPORTE



CURVAS DE REFERENCIA. CONTINUACION.

TABLA 4

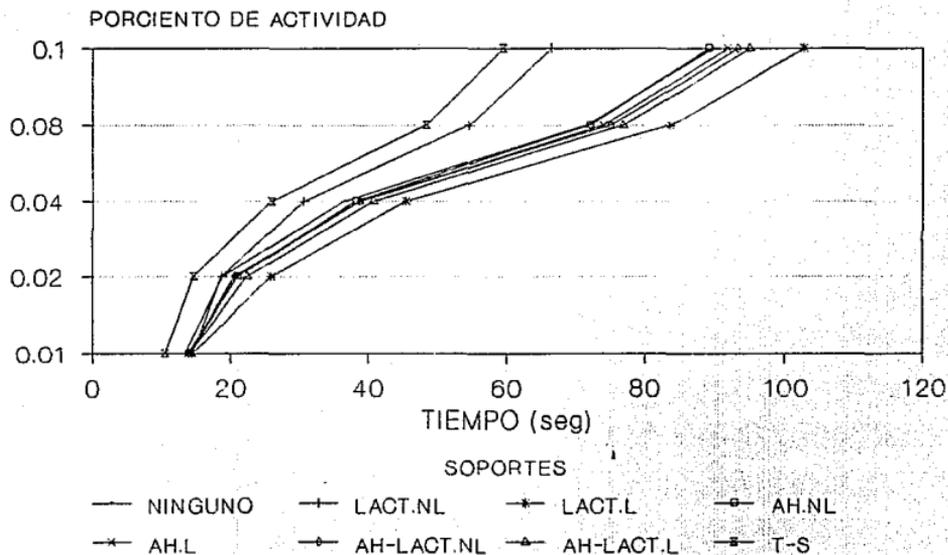
DATOS DE LAS CURVAS DE REFERENCIA OBTENIDAS CON LOS SOPORTES Y DIFERENTES CONCENTRACIONES.

SOPORTE CONCENT. % ACTIV.	NINGUNO 0%	LACT 3%	LACT 3%	AH 3%	AH 3%	AH-LACT 3%-3%	AH-LACT L	T-S
100.0	13.4	14.5	14.5	14.0	13.8	14.0	14.0	10.5
50.0	19.0	18.7	25.1	21.1	22.5	21.2	23.0	14.7
25.0	34.7	34.8	54.0	37.1	36.0	35.5	40.7	25.7
12.5	65.3	44.8	75.2	69.7	71.2	73.0	72.9	45.2
10.0	93.5	70.3	104.5	91.0	94.4	95.5	97.7	61.7

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO A PARTIR DE UN MISMO POOL DE PLASMAS.
SE LIOFILIZO 1 ml. (LIOFILIZADO = L, NO LIOFILIZADO = NL).

GRAFICA 4

DETERMINACION DEL SOPORTE



CURVAS DE REFERENCIA

TROMBOPLASTINAS DE TRABAJO

Se determinaron nuevamente las curvas de referencia de los lotes Z1, Z2 y Z3, los cuales se encontraban almacenados en compartimentos diferentes de papel filtro en un desecador y además estaban divididos en partes iguales en dos compartimentos cada lote por lo cual se consideró cada uno de ellos como un lote diferente, por lo que se asignó a cada uno el siguiente símbolo de identificación: Z1x, Z1y, Z2x, Z2y, Z3x y Z3y. Se llevó a cabo esta nueva determinación pues se encontraron problemas para poder mantener los lotes en condiciones apropiadas.

Se trabajó con la tromboplastina líquida de cada lote en comparación con la tromboplastina de referencia Thromborel-S y se encontró que los lotes habían incrementado el TP en cada porcentaje de actividad, sin embargo se observó que la curva de referencia obtenida con respecto a la de referencia indica buena sensibilidad para los lotes Z1x, Z1y, Z2x y Z2y, siendo mejor la de los lotes Z2x y Z2y, lo cual se puede observar en la tabla 5 y gráfica 5.

TABLA 5

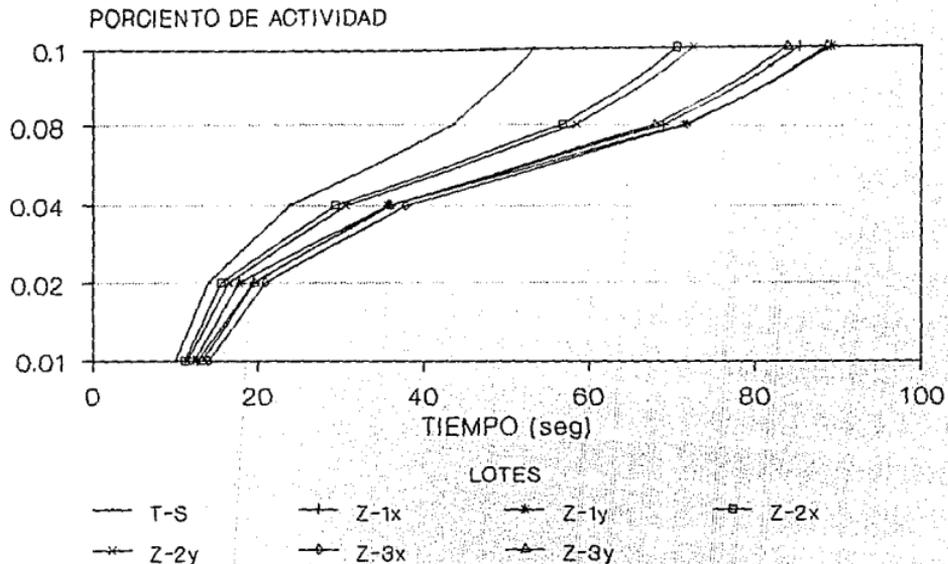
DATOS PARA LAS CURVAS DE REFERENCIA

% ACTIVIDAD	T-S	Z1x	Z1y	Z2x	Z2y	Z3x	Z3y
100.0	10.0	12.6	12.3	11.1	11.4	14.0	13.2
50.0	13.7	18.5	17.2	15.0	16.2	20.3	19.9
25.0	24.0	34.9	33.6	27.4	29.1	36.5	33.5
12.5	41.1	69.2	67.0	54.7	56.5	71.5	65.3
10.0	54.9	85.5	92.7	72.4	74.2	89.2	86.0

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO A PARTIR DE UN MISMO POOL DE PLASMAS.

GRAFICA 5

TROMBOPLASTINAS DE TRABAJO



CURVAS DE REFERENCIA

DETERMINACION DEL AGENTE SURFACTANTE

Para la determinación del agente surfactante, se empezó analizando el etilenglicol únicamente, pues era el único con el que se contaba. Se estudio inicialmente la concentración de 3, 5 y 10 % y se encontró que debía de ser una concentración menor a 3 % considerando las curvas de referencia obtenidas, de esta manera se continuo estudiando otras concentraciones hasta establecer que la concentración más óptima fue al 0.75 % con etilenglicol. Posteriormente se contó con el propilenglicol y se decidió probar únicamente a la concentración de 0.75 % en comparación con el etilenglicol, para tal fin se utilizó el L-23x sin soporte (SS) y sin agente surfactante (SAS) como control, se determinaron las curvas de referencia a la tromboplastina liofilizada (L) y no liofilizada (NL) y se liofilizaron 2 ml. De esta manera se observó que el liofilizado obtenido únicamente con el soporte era fácil de disolver y tenía un buen aspecto, con el etilenglicol integrado se observó un poco de dificultad para disolver y su aspecto no era tan poroso, con el propilenglicol se aspecto era aun menos poroso y presentó dificultad para disolverse así como se presentaron problemas para poder liofilizar, como puede observarse en la tabla 6 los tiempos obtenidos con el etilenglicol liofilizado no varían mucho con respecto al reactivo que presenta sólo el soporte también liofilizado, en tanto que en el propilenglicol se observaron resultados muy diferentes y que no son adecuados si consideramos la tromboplastina líquida sin el agente surfactante y sin el soporte.

TABLA 6

DATOS PARA LAS CURVAS DE REFERENCIA OBTENIDAS CON LOS AGENTES SURFACTANTES A LA CONCENTRACION 0.75 %.

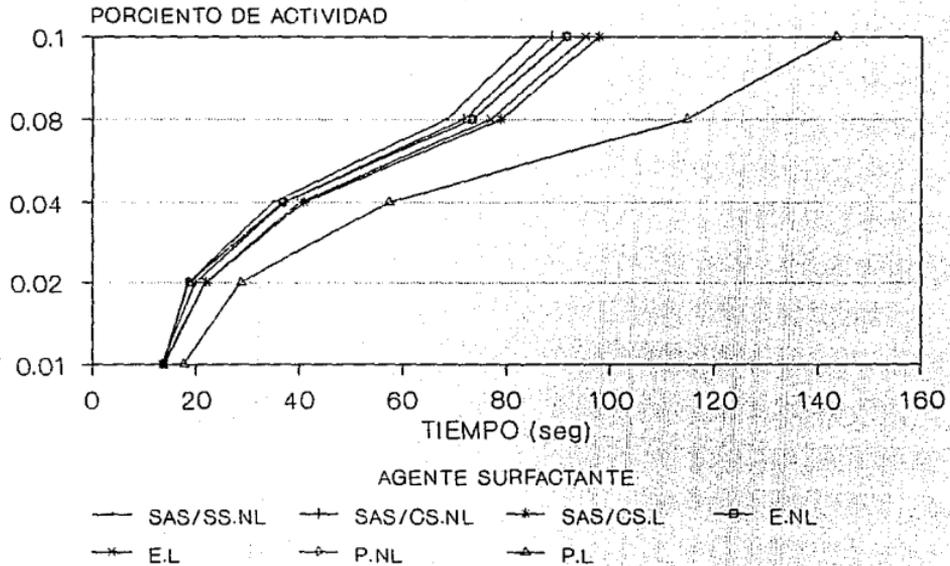
AG.SURF. % ACTIV.	SAS/SS NL	SAS/CS NL	SAS/CS L	E NL	E L	P NL	P L
100.0	13.5	13.3	13.8	13.5	13.5	13.5	17.5
50.0	20.0	19.3	22.5	21.0	21.1	21.0	28.0
25.0	33.1	35.4	39.2	34.0	39.3	33.0	54.3
12.5	59.5	69.3	75.5	63.0	78.0	65.0	111
10.0	90.5	91.0	100.7	98.0	94.7	97.5	146

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO A PARTIR DE UN MISMO POOL DE PLASMAS.

E - ETILENGLICOL P - PROPILENGLICOL

CS - CON SOPORTE INTEGRADO

GRAFICA 6 DETERMINACION DEL AGENTE SURFACTANTE



CURVAS DE REFERENCIA

INTEGRACION DEL CLORURO DE CALCIO

Para tal fin se trabajó con el lote Z3y. A la tromboplastina líquida con el soporte (Albumina de huevo 3% y Lactosa 3%, se le integró el cloruro de calcio a la concentración de 0.02 M y se liofilizaron 2 y 4 ml. Se estudió la tromboplastina sin soporte (SS), sin calcio (SCa) integrado así como con soporte (CS) pero sin calcio para establecer diferencias, además de con soporte y con calcio integrado (CS + Ca).

En este estudio se encontró como se puede observar en la tabla 7 que el calcio liofilizando 4 ml del reactivo presenta resultados muy similares al reactivo liofilizado únicamente con el soporte, así como el aspecto que presentó el liofilizado con el ión calcio integrado, fue muy parecido al aspecto que presenta el reactivo de referencia Thromborel-S, pues se liofilizó un vial de este reactivo (el cual fue hidratado previamente y liofilizado nuevamente pero bajo nuestras condiciones de trabajo) simultáneamente con la tromboplastina de trabajo y tanto la tromboplastina de trabajo como la de referencia al hidratarlos se solubilizaron fácilmente, en el caso de la tromboplastina de trabajo, tanto para 2 y 4 ml liofilizados. El tiempo de liofilizado de 2 ml fue en promedio de 1:30 hrs y para 4 ml fue de 2:30 hrs.

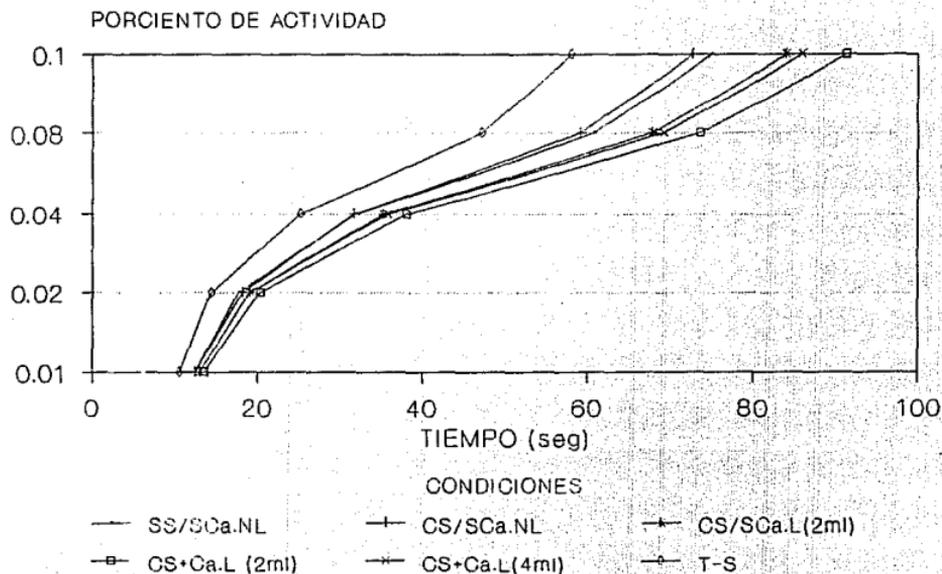
TABLA 7

DATOS DE LAS CURVAS DE REFERENCIA OBTENIDOS EN LA INTEGRACION DEL ION CALCIO.

CONDICIONES	SS/SCa	CS/SCa	CS/SCa	CS+Ca	CS+CA	T-S
VOL. LIOF.	----	----	2 ml	2 ml	4 ml	
% ACTIV.	NL	NL	L	L	L	
100.0	12.5	12.5	13.0	13.5	13.0	10.5
50.0	17.8	18.5	19.5	20.0	18.5	14.7
25.0	30.0	30.5	32.7	35.5	34.1	23.0
12.5	59.0	57.2	66.1	74.1	67.0	46.2
10.0	76.9	74.5	86.0	91.6	88.0	59.3

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO Y CON UN MISMO POOL DE PLASMAS.

GRAFICA 7 INTEGRACION DEL ION CALCIO



CURVAS DE REFERENCIA

FORMULACION DE LA TROMBOPLASTINA DE TRABAJO

Para establecer la formulación de la tromboplastina se decidió trabajar con las condiciones que habían resultado más favorables tanto para el soporte, agente surfactante y calcio. Para tal fin se utilizó el lote Z2y con el soporte albúmina de huevo 3% y lactosa 3%, el etilenglicol al 0.75% y el calcio al 0.02 M. Se liofilizaron 2 y 4 ml en estas condiciones las cuales se muestran en la tabla 8. Las condiciones de trabajo se identifican con la siguiente simbología:

SS = Sin soporte
SCa = Sin calcio integrado
SE = Sin etilenglicol integrado
CS = Con soporte integrado
L = Liofilizado
NL = No liofilizado
CS+Ca+E = Con soporte, calcio y etilenglicol integrado.

Se estudiaron todas estas condiciones para observar mejor las posibles diferencias y se encontró que los resultados tienden a ser muy parecidos pues las diferencias son mínimas si la tromboplastina tiene únicamente el soporte o si presenta soporte y calcio, soporte y etilenglicol o bien soporte calcio y etilenglicol, sin embargo considerando las características del liofilizado en cada caso, así como su solubilidad se encontró que la tromboplastina de trabajo con el soporte y calcio integrado observó un mejor aspecto del liofilizado y facilidad para disolverse muy similar a las características que presenta Thromborel-S, en tanto que observó un poco de dificultad para liofilizarse el que tenía además etilenglicol integrado y su aspecto era poco poroso así como dificultad para disolverse. Se liofilizaron 2 ml en un promedio de 1:30 hrs y 4 ml en 2:30 hrs.

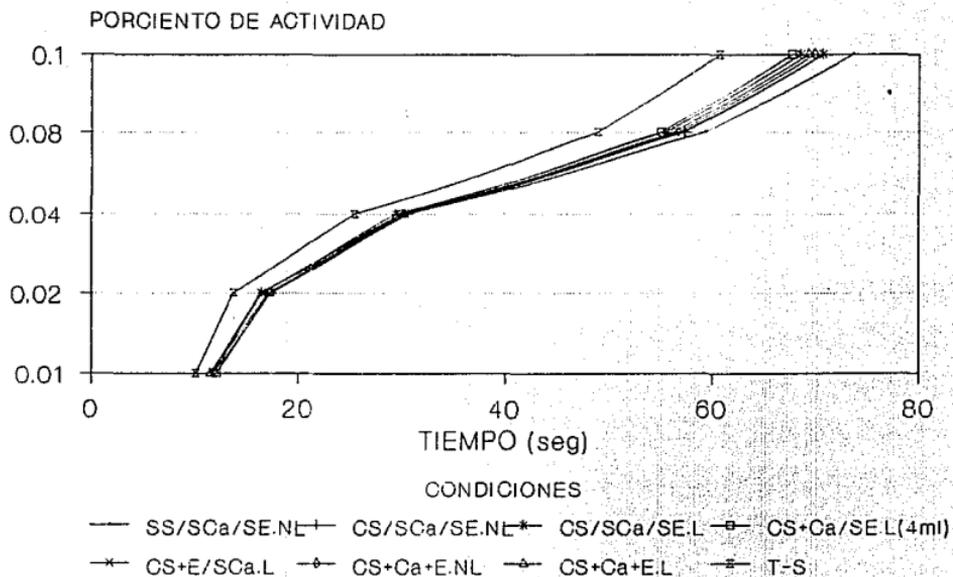
TABLA 8

DATOS DE LAS CURVAS DE REFERENCIA EN LAS CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LA FORMULACION.

CONDIC.	SS/SCa/SE	CS/SCa/SE	CS+CA/SE	CS+E/SCa	CS+CA+E	T-S
VOL. LIOF.	----	-- 2 ml	4 ml	2 ml	-- 4 ml	
% ACTIV.	NL	NL L	L	L	NL L	
100.0	11.5	11.8 11.7	12.1	11.8	12.0 11.5	10.1
50.0	16.5	18.2 16.3	17.1	16.8	18.0 17.0	14.5
25.0	28.8	28.7 28.2	28.8	27.3	28.0 29.3	22.0
12.5	57.0	56.2 53.5	54.0	55.3	56.0 55.7	48.1
10.0	75.7	72.0 70.3	68.8	72.6	71.0 70.0	62.1

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO CON UN MISMO POOL DE PLASMAS.

GRAFICA 8 FORMULACION DE LA TROMBOPLASTINA



CURVAS DE REFERENCIA

**CURVAS DE REFERENCIA DE LAS TROMBOPLASTINAS LIOFILIZADAS
A CALIBRAR.**

En la tabla 9 se muestran los resultados de las curvas obtenidas de los lotes seleccionados para la determinación del ISI en comparación con la tromboplastina de referencia Thromborel-S empleando el lote utilizado para la determinación del ISI y como se puede observar en la gráfica 9 sus curvas son muy parecidas lo cual indica que las sensibilidades son muy parecidas.

Al final de las curvas de referencia se muestra una tabla de datos para las tromboplastinas liofilizadas Z2x y Z2y así como de T-S las cuales presentan diferente sensibilidad, pues dependiendo de la sensibilidad de la tromboplastina producida van a ser los datos utilizados.

TABLA 9

DATOS DE LAS CURVAS DE REFERENCIA.

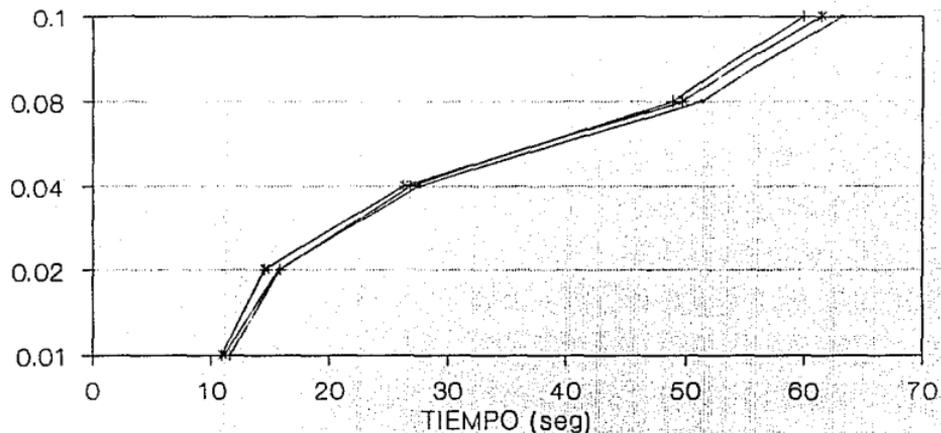
% ACTIVIDAD	Z2x	Z2y	T-S
100.0	11.1	11.6	10.9
50.0	16.3	16.3	14.8
25.0	26.0	25.5	23.9
12.5	48.7	46.4	47.2
10.0	65.3	62.0	63.7

NOTA: LOS DATOS PARA CADA CURVA FUERON OBTENIDOS EN UN MISMO DIA DE TRABAJO Y CON EL MISMO POOL DE PLASMAS. EL LOTE DE THROMBOREL-S EMPLEADO FUE EL MISMO QUE SE UTILIZO PARA CALIBRAR. LOTE No. 505795.

GRAFICA 9

TROMBOPLASTINAS DE TRABAJO A CALIBRAR

PORCIENTO DE ACTIVIDAD



LOTES

— Z-2x

+ Z-2y

* T-S

CURVAS DE REFERENCIA

TIEMPO (SEG) / % ACTIVIDAD

SEG.	Z 2x %	Z 2y	T - S
10.0	> 120		
10.3	117	> 120	
10.6	108	114	> 120
10.9	100	105	117
11.2	91	100	111
11.5	85	91	100
11.8	80	87	95
12.1	74	81	87
12.4	69	77	83
12.7	67	74	78
13.0	62	70	74
13.3	60	66	71
13.6	57	64	66
13.9	54	60	64
14.2	53	58	60
15.0	48	53	54
15.5	46	50	51
16.0	44	48	49
16.5	43	46	47
17.0	41	44	45
17.5	40	43	43
18.0	38	41	41
19.0	38	39	38
20.0	34	36	36
22.0	30	32	32
24.0	27	29	28
26.0	25	26	25
28.0	23	24	23
30.0	21	22	21
32.0	20	21	20
34.0	19	19	18
36.0	17	18	17
38.0	16	17	16
40.0	15	16	15
42.0	15	15	14
46.0	13	14	13
50.0	12	12	12
54.0	11	11	11
58.0	11	11	10
60.0	10	10	9
64.0	9	9	9
70.0	8	8	8
75.0	8	8	7
80.0	7	7	7
85.0	7	7	6
90.0	6	6	6

TABLA 10. CURVAS DE TROMBOPLASTINAS CON DIFERENTE SENSIBILIDAD

ESTANDARIZACION INDIRECTA
 FUE UTILIZANDO EL THROMBOREL-S
 COMO MATERIAL DE REFERENCIA, EN 10
 DIAS DIFERENTES DE TRABAJO.

DIA	TEMPOS DE PROTROMBINA				DIA
	PRT	b	PRT	b	
1	11.5	12.6	9.1	9.6	6
	20.5	20.0	19.6	20.7	
	13.1	13.6	23.1	21.5	
	29.5	29.6	35.5	33.5	
	22.0	22.0	29.5	28.5	
	25.6	23.5	20.0	20.6	
	29.1	25.4	16.0	17.3	
	10.1	12.1	10.1	11.6	
2	11.1	11.6	10.2	11.6	7
	22.5	21.5	15.0	17.0	
	32.5	31.1	12.5	13.6	
	24.5	23.1	19.0	17.7	
	17.0	18.6	29.6	26.1	
	24.0	20.5	14.6	15.0	
	23.1	21.6	28.1	29.1	
	10.7	12.0	10.6	11.5	
3	13.0	12.1	12.3	11.5	8
	20.2	16.0	36.0	31.0	
	20.5	20.6	21.4	22.6	
	19.4	21.5	24.2	21.4	
	36.6	36.5	19.0	20.0	
	19.5	19.4	20.7	21.4	
	18.1	19.4	34.0	33.6	
	10.5	11.4	10.9	11.6	
4	11.5	12.6	12.0	12.4	9
	21.1	20.2	35.0	36.0	
	12.2	13.0	24.0	26.1	
	13.1	13.0	25.0	27.1	
	34.0	31.6	29.5	30.9	
	17.1	17.5	20.0	21.0	
	29.5	23.9	15.5	16.7	
	10.6	12.2	10.5	11.5	
5	10.4	10.9	10.6	11.6	10
	28.6	31.0	22.0	22.0	
	21.5	19.9	25.0	23.7	
	25.6	23.6	17.2	18.5	
	19.2	18.5	28.4	29.3	
	13.1	13.7	17.0	16.6	
	31.5	30.5	25.7	24.0	
	10.5	11.9	10.1	11.4	

TABLA 11. DATOS DE TP OBTENIDOS EN EL PROCEDIMIENTO
 DE CALIBRACION DEL LOTE Z2x.

LA CALIBRACION FINAL CON THROMBOREL-S FUE :

DIA	n	m	$C_{PRT,b}$	$ISI_{PRT,b}$	$SE_{CPRT,b}$	$SE_{ISI,PRT}$	$\%CV_{ISI,PRT}$	$SE_{ISI,b}$	$\%CV_{ISI,b}$
1	8	0.217	1.24	1.37	0.072	0.080	5.84	0.128	9.31
2	8	0.180	1.19	1.32	0.067	0.097	7.34	0.152	11.45
3	8	0.01	1.01	1.12	0.087	0.097	8.65	0.138	12.30
4	8	0.227	1.25	1.39	0.077	0.085	6.15	0.137	9.87
5	8	0.091	1.09	1.21	0.067	0.075	6.16	0.111	9.14
6	8	0.121	1.12	1.25	0.050	0.055	4.44	0.083	6.69
7	8	0.117	1.12	1.24	0.670	0.074	5.95	0.111	8.96
8	8	0.078	1.08	1.20	0.085	0.095	7.93	0.14	11.68
9	8	-0.006	0.99	1.10	0.02	0.022	2.01	0.031	2.84
10	8	0.14	1.15	1.27	0.059	0.065	5.14	0.10	7.83
Σ 10	80	0.072	1.07	1.19	0.042	0.046	3.90	0.068	5.73

TABLA 12. PARAMETROS OBTENIDOS DE LA ESTANDARIZACION DEL LOTE Z2x

ESTANDARIZACION INDIRECTA
FUE UTILIZANDO EL THROMBOREL-S
COMO MATERIAL DE REFERENCIA, EN 10
DIAS DIFERENTES DE TRABAJO.

DIA	TIEMPOS DE PROTROMBINA				DIA
	PRT	b	PRT	b	
1	11.5	12.6	9.1	10.0	6
	20.5	18.9	19.6	20.7	
	13.1	14.1	23.1	21.5	
	29.5	27.8	35.5	32.5	
	22.0	20.9	28.5	25.6	
	25.6	24.0	20.0	20.8	
	28.1	25.6	18.0	17.0	
	10.1	12.0	10.1	11.8	
2	11.1	11.5	10.2	11.1	7
	22.5	21.0	15.0	17.0	
	32.5	29.0	12.5	13.6	
	24.5	22.4	19.0	18.0	
	17.0	17.5	29.6	28.0	
	24.0	20.6	14.6	14.7	
	23.1	21.6	28.1	27.6	
	10.7	11.5	10.6	12.1	
3	13.0	13.0	12.3	12.1	8
	20.2	18.2	36.0	30.0	
	20.5	20.1	21.4	22.5	
	19.4	19.6	24.2	21.5	
	36.6	35.5	19.0	18.6	
	19.5	19.1	20.7	20.2	
	18.1	19.0	34.0	30.0	
	10.5	11.6	10.9	11.1	
4	11.5	13.0	12.0	12.2	9
	21.1	20.1	35.0	37.4	
	12.2	12.0	24.0	25.0	
	13.1	13.5	25.0	26.4	
	34.0	30.5	29.5	30.0	
	17.1	17.5	20.0	19.8	
	29.5	25.1	15.5	16.0	
	10.8	11.9	10.5	12.1	
5	10.4	11.8	10.8	11.1	10
	28.6	29.4	22.0	21.5	
	21.5	20.6	25.0	24.6	
	25.6	24.5	17.2	17.5	
	19.2	19.1	28.4	27.8	
	13.1	13.6	17.0	17.5	
	31.5	28.6	25.7	24.7	
	10.5	12.0	10.1	11.1	

TABLA 13. DATOS DE TP OBTENIDOS EN EL PROCEDIMIENTO
DE CALIBRACION DEL LOTE Z2y

LA CALIBRACION FINAL CON THROMBOREL-S FUE :

DIA	n	m	$C_{PRT,b}$	$ISI_{PRT,b}$	$SE_{CPRT,b}$	$SE_{ISI,PRT}$	$\%CV_{ISI,PRT}$	$SE_{ISI,b}$	$\%CV_{ISI,b}$
1	8	0.266	1.30	1.44	0.051	0.057	3.97	0.094	6.51
2	8	0.208	1.22	1.36	0.061	0.067	4.96	0.107	7.86
3	8	0.091	1.09	1.21	0.065	0.072	5.97	0.107	8.85
4	8	0.214	1.23	1.37	0.061	0.068	4.97	0.108	7.91
5	8	0.163	1.17	1.30	0.050	0.055	4.25	0.085	6.56
6	8	0.193	1.21	1.34	0.063	0.069	5.2	0.109	8.17
7	8	0.156	1.16	1.29	0.049	0.055	4.25	0.084	6.54
8	8	0.146	1.15	1.28	0.067	0.075	5.84	0.114	8.94
9	8	0.027	1.02	1.14	0.044	0.049	4.30	0.070	6.17
10	8	0.102	1.10	1.22	0.024	0.027	2.23	0.041	3.33
Σ 10	80	0.134	1.14	1.26	0.038	0.042	3.36	0.064	5.11

TABLA 14. PARAMETROS OBTENIDOS DE LA ESTANDARIZACION DEL LOTE Z2y

COMPARACION DE COSTOS ENTRE LA TROMBOPLASTINA COMERCIAL THROMBOREL-S Y LA TROMBOPLASTINA DE TRABAJO.

Las cantidades establecidas para la comparación de costos entre el Thromborel-S y la tromboplastina de trabajo, son las necesarias para 5g de extracto de tromboplastina, obtenidas a partir de 1 Kg de cabezas de conejo; las cuales son de conejos jóvenes de un año a año y medio, sanos y con un máximo de 24 hrs de haber sido sacrificados.

De 5 g de extracto se obtienen 36 viales de tromboplastina liofilizada, con la formulación establecida mediante el estudio realizado en este trabajo.

El balance de costos se establece unicamente, mediante el material y reactivos necesarios para la obtención y fabricación de la tromboplastina de trabajo, considerando los resultados obtenidos en la investigación realizada en este proyecto.

No se va a considerar el costo del equipo de liofilización, desgaste y mantenimiento del mismo, pues este va a depender del tipo y calidad del equipo del cual se disponga en un momento dado, para efectuar la producción de este reactivo (Tromboplastina tisular liofilizada), pues depende principalmente del tipo de liofilizadora, el rendimiento de producción. Además se debe considerar que la formulación de este reactivo, aún no esta completa, dado que es necesario integrarle un conservador y un amortiguador.

**PRESUPUESTO DE LA TROMBOPLASTINA DE TRABAJO CONSIDERANDO
SOLO LA FORMULACION ESTABLECIDA EN ESTE PROYECTO.**

MATERIAL	CANTIDAD COMERCIAL	COSTO COMERCIAL	CANTIDAD DE PRODUCCION	COSTO DE PRODUCCION
BIOLOGICO				
CABZ. DE CONEJO	1 Kg	N\$ 17.00	1 Kg	N\$ 17.00
SUSTANCIAS				
ALBUM. DE HUEVO	100 g	N\$ 45.20	4.35 g	N\$ 2.00
LACTOSA	500 g	N\$ 96.10	4.35 g	N\$ 1.00
CLORURO DE CALCIO ANHID.	500 g	N\$ 449.34	0.34 g	N\$ 0.50
CLORURO DE SODIO	500 g	N\$ 21.92	0.9 g	N\$ 0.50
ACETONA G.R.	4 l	N\$ 111.48	150 ml	N\$ 4.20
ACETONA IND.	1 l	N\$ 4.00	200 ml	N\$ 0.80
AGUA DESTILADA	1 l	N\$ 2.00	400 ml	N\$ 0.80
MATERIAL				
HIELO SECO	1 Kg	N\$ 5.00	2 Kg	N\$ 10.00
VIALES Y TAPONES	100 PZAS	N\$ 50.00	36 PZAS	N\$ 18.00
PAPEL FILTRO	2 PLIEGOS	N\$ 1.40	2 PLIEGOS	N\$ 1.40
TOTAL		N\$ 803.40	TOTAL	N\$ 55.75

TABLA 15.

Ahora bien, una caja de reactivo comercial Thromborel-S, contiene 8 viales, cada uno de ellos para hidratar con 4 ml de agua destilada, realizando 20 pruebas por vial, siendo un total de 160 determinaciones de 1 caja, la cual tiene un costo de N\$ 300.00, en tanto que para producir 36 viales, los cuales se hidratan también cada uno con 4 ml de agua destilada y se obtiene el mismo número de determinaciones de cada uno de ellos, se necesita hacer un costo total de producción, considerando sólo las cantidades necesarias de reactivos y materiales a utilizar, respecto al costo en el mercado de ellos, de N\$ 55.75, por lo que con esta cantidad se puede hacer un total de 720 determinaciones. Con esto que da justificado, que implicando toda la serie de gastos necesarios para la producción de tromboplastina tisular liofilizada, su costo de producción sigue siendo bajo. Pues el reactivo se produce con la cuarta parte del costo de una caja de tromboplastina comercial y además se pueden realizar 560 determinaciones más, en las condiciones propuestas.

Sin embargo hay que tomar en cuenta que se realiza un costo total para adquirir los reactivos y materiales de N\$ 803.40, pero aun así, como se está produciendo un total de 4 cajas y media, se necesita N\$ 1,350.00 para adquirir el reactivo comercial, por lo que la tromboplastina de trabajo, sigue siendo de más bajo costo, además de que se cuenta con más reactivo para seguir produciendo.

DISCUSION DE RESULTADOS

Se obtuvieron los lotes Z1, Z2 y Z3 para el desarrollo de éste estudio, siendo el lote Z3 el que se empleo más pues se encontraba en mayor proporción.

Se realizaron curvas de referencia (1/2 Quick) como parámetro de exclusión para cada cambio efectuado a la tromboplastina de trabajo en su formulación en comparación con la tromboplastina de referencia Thromborel-S (T-S), ésto se llevó a cabo, considerando que a medida que disminuye el ángulo de inclinación con respecto al eje de las abscisas la sensibilidad aumenta y si el ángulo tiende a aumentar la sensibilidad disminuye por lo tanto en las curvas de referencia hay tromboplastinas con sensibilidad baja o sensibilidad alta.

De esta manera en la gráfica 1 se observa que el lote Z1 presenta una sensibilidad mayor que la referencia T-S y una menor sensibilidad que el lote Z2. Por lo tanto el comportamiento que presenta el lote Z1 con respecto ala referencia T-S, nos indica que contamos con un lote de buena sensibilidad.

Pretendiendo aumentar la sensibilidad de las tromboplastinas de trabajo, se integro sulfato de bario, a concentraciones de 1, 2, 4, 6 y 8 % al lote Z3, se utilizó como control el mismo lote pero sin integración de sulfato de bario, para observar modificaciones en los resultados. Por lo que en la gráfica 2 se observa claramente que la tromboplastina de trabajo, no sufrió realmente un aumento en

la sensibilidad, pues la mayoría de los resultados obtenidos tienden a ser parecidos. Además de que en el 100 % de actividad hay una variación de 0.4 a 0.7 unidades entre cada concentración evaluada, con respecto al que no presenta sulfato de bario. Lo cual es significativo pues se pretendió principalmente incrementar los tiempos de protrombina (TP), conforme el porcentaje de actividad, tratando de alterar el TP lo menos posible en el 100 % de actividad. Estos resultados es posible se hayan obtenido debido a que se tienen lotes, con buena sensibilidad respecto a la referencia T-S, por lo que pudiera ser que la tromboplastina de trabajo, no presentara residuos significativos de FVII, por otro lado se observó que el sulfato de bario dependiendo de la concentración, modifica el TP, en el 100 % de actividad.

Tomando todo lo anterior en cuenta, se continuó trabajando con los lotes obtenidos inicialmente.

Continuando ahora con la determinación del soporte de liofilización, en la tabla 3, se tienen la leche, la cual había sido considerada uno de los mejores soportes para la tromboplastina, sin embargo aquí se observa que en el 100% de actividad el TP se ve aumentado en 2.0 unidades con respecto al control, lo cual ya es bastante significativo, pero hay que considerar que al liofilizar, los tiempos no se ven realmente muy alterados, por lo que realmente protege del proceso de liofilización a la tromboplastina, pero por otro lado al hidratar el color de la tromboplastina es blanco mate, además de que se adhiere demasiado a la pared del vial,

lo cual dificulta su solubilización y tiene un aspecto quebradizo el liofilizado. Por estas razones se descarta como soporte la leche.

Se analizaron entonces, lactosa (Lt), Albúmina de huevo (AH), Albúmina bovina (AB), evaluando concentraciones diferentes, las cuales se fueron estableciendo conforme los resultados que se fueran obteniendo. Se decidió hacer mezclas en donde estuviera presente la lactosa, pues es un aditivo que brinda resistencia a la estructura, por lo que se evita con él, obtener un liofilizado quebradizo, guiándose por el aspecto poroso que presentó la albúmina de huevo sola, se pensó en probar juntos a la lactosa y la albúmina de huevo. En la tabla 4 se observa que la AH 3% y AH 3% - Lt 3% presentan TP muy idénticos al control, mejorándose la sensibilidad. Considerando lo antes mencionado de la Lt y AH, se decidió que el mejor soporte es AH-Lt (AH 3% y Lt 3%), en la gráfica 4 se aprecia, como bajo estas condiciones la tromboplastina de trabajo presenta mejor sensibilidad. Además el liofilizado presenta un aspecto poroso, no está adherido a la pared del vial, se disuelve fácilmente y ya hidratado presenta un color ligeramente más amarillento que la referencia Thromborel-S.

En la tabla 5, se muestran los resultados para las curvas de referencia, nuevamente de los lotes Z1, Z2 y Z3 en las mismas condiciones que los mostrados en la tabla 1, se realizó nuevamente su estandarización, pues se encontró un aumento en los TP, por lo que se evaluó en forma individual

cada lote, según su comportamiento ante el almacenamiento. Se cree que el incremento de los tiempos se debió posiblemente a un aumento del contenido de humedad del extracto de tromboplastina, pues es muy higroscópica, lo cual pudo ser la causa de que ahora el lote Z2x y Z2y sean los lotes más sensibles con respecto a la referencia T-S, como se puede observar en la gráfica 5.

Para la determinación del agente surfactante, se probó el etilenglicol inicialmente, pues era con el que se contaba únicamente. Se probaron arbitrariamente las concentraciones 3, 5, y 10 %, los resultados obtenidos indicaron que se requería encontrar una concentración menor al 3%, dado las curvas de referencia obtenidas, además que el etilenglicol a estas concentraciones no proporcionó un aspecto poroso ni facilidad para disolver el reactivo.

Se continuó evaluando concentraciones más pequeñas entonces que 3% y se encontró que al 0.75 % el etilenglicol brindaba en apariencia mejores características, posteriormente se contó con el propilenglicol y se decidió probarlo únicamente a la concentración de 0.75 % en comparación con el etilenglicol y fue así como se observó que el liofilizado obtenido únicamente con el soporte era más fácil de disolver y tenía buen aspecto en tanto que con el etilenglicol integrado se observó un poco de dificultad para disolver el reactivo liofilizado y su aspecto no era tan poroso y con el propilenglicol el aspecto del reactivo liofilizado era aun menos poroso y presentó bastante

dificultad para disolverlo así como también se presentaron problemas para poder liofilizarlo. En la tabla 6 se pueden observar los tiempos obtenidos con el reactivo liofilizado presentando etilenglicol los cuales no varían mucho respecto al reactivo liofilizado que tiene únicamente el soporte en tanto que con el propilenglicol se observaron resultados muy diferentes y que no son adecuados si consideramos la tromboplastina líquida sin el agente surfactante y sin el soporte.

Ahora continuando con la integración del ion calcio, se decidió integrar el calcio en la concentración que se trabaja normalmente para la determinación del TP, que es 0.02 M, y se sabe que durante el proceso de liofilización lo que se pierde es el agua por sublimación, en tanto que las sales y solutos no se pierden, se deben de conservar en las proporciones establecidas, y si el soporte es el indicado se van a proteger del proceso de liofilización. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para las curvas de referencia, probándose en la liofilización 2 y 4 ml, siendo que al inicio de éste proyecto se utilizó 1 ml para liofilizar al igual que en otros estudios realizados. Pero considerando que la OMS pide que los viales que se trabajan para la calibración de tromboplastinas debe de tener un mínimo para 10 pruebas, por lo que se estableció, liofilizar 2 y 4 ml para realizar un número de pruebas de 10 y 20 respectivamente, con cada vial liofilizado.

Se encontró por lo tanto que los resultados obtenidos para el vial liofilizado con 4 ml, presentó los TP más similares a la tromboplastina de trabajo que tenía el soporte integrado y el calcio no; esto puede apreciarse mejor en la gráfica 7.

El tiempo observado para liofilizar 2 ml, fue de 1:30 hrs. En tanto que para 4 ml fue de 2:30 hrs. Por lo que conviene liofilizar 4 ml y poder determinar 10 pruebas por una hora más de liofilización, durante un proceso de producción, en tanto que si se tuvieran que obtener los 4 ml en 2 procesos de liofilización diferentes se invertirían 3 hrs, por tanto más tiempo así como más material y gasto de equipo, entre otras cosas.

Por otro lado cabe mencionar que los viales liofilizados con un volumen de 4 ml, conteniendo el soporte y el calcio integrado, tendía a presentar un aspecto del reactivo liofilizado muy similar al de referencia T-S. Para tener un control del proceso se hidrato un vial del reactivo comercial T-S, y se liofilizó simultáneamente con la tromboplastina de trabajo bajo las mismas condiciones de liofilización. Se observó que tardó el mismo tiempo en liofilizarse, así como la estructura que presenta en el aspecto poroso es similar en ambos. Tanto T-S y la tromboplastina de trabajo se disolvieron fácilmente, la única diferencia más marcada que se observó, fue que tenía un color blanco el T-S y la tromboplastina de trabajo es ligeramente

amarillenta (La tromboplastina de trabajo fue liofilizada con el soporte y calcio unicamente.).

Para establecer la formulación de la tromboplastina de trabajo, se probaron soporte, agente surfactante, ión calcio, en las condiciones que se establecieron como más apropiadas, esto se observa en la tabla 8. Los TP obtenidos tienden a ser muy similares, presentando una variación de 0.2 a 0.6 unidades en el 100 % de actividad. Además de los TP obtenidos, es importante tomar en cuenta, aspecto del liofilizado, facilidad para disolverse. Tomando esto en cuenta el liofilizado que presentó el mejor aspecto y que se había mencionado antes, fue al que se le integró sólo el soporte y el calcio, se disolvió muy fácilmente, en tanto que el que tenía el soporte, el calcio y el etilenglicol, su aspecto no era tan poroso y presentó un poco de dificultad para disolverse y el color del mismo era un poco más amarillento.

En base a estos resultados, se descarta el integrar el agente surfactante, y se establece, sólo la integración del soporte AH-Lt (Albumina de huevo 3% y Lactosa 3%), con el ión calcio integrado en una solución 0.02 M.

Anteriormente se estableció que el lote más sensible fue el Z2x y Z2y, pues son los que presentaron una curva de referencia muy similar a la tromboplastina de referencia T-S. Por lo cual se calibraron ambos lotes con T-S. Obteniéndose para el lote Z2x un ISI de 1.19 y para el lote Z2y un ISI de 1.26, variando solamente por 0.07 unidades, por lo tanto el

ISI obtenido en ambas calibraciones, fue relativamente similar. Se obtuvo un % de coeficiente de variación (CV) para el L-Z2x de 3.9 y para el L-Z2y de 3.36. Su % de C.V. fue relativamente mayor al permitido por la OMS ($< 3\%$), pero que puede ser aceptable si es menor a un 5%. Por lo tanto el L-Z2x es 0.9 unidades mayor y el L-Z2y es 0.3 unidades mayor.

Se hizo una comparación de costos con respecto a la formulación establecida en éste proyecto y el costo de el reactivo comercial T-S.

Se estableció realizarlo en base a la producción que se obtendría de 1 Kg de cabezas de conejos sanos y con un promedio máximo de ser sacrificados de 24 horas. Se ha determinado que por cada cerebro de conejo se obtiene un gramo de extracto y como 1 Kg de cabezas contiene un promedio de 5 cabezas se obtendrían 5 gramos de extracto de tromboplastina. Con lo cual se pueden obtener 36 viales de tromboplastina liofilizada, con la formulación establecida durante éste estudio.

El balance de costos se establece unicamente mediante el material y reactivos necesarios para la obtención y fabricación de la tromboplastina de trabajo. No se consideró el costo del equipo de liofilización, desgaste y mantenimiento del mismo, pues depende del tipo y calidad del equipo del cual se disponga para efectuar la producción del reactivo (Tromboplastina tisular liofilizada), pues el

rendimiento de producción depende principalmente del tipo de liofilizadora con que se cuenta.

Considerando que la formulación establecida en este proyecto aun no esta completa, pues es necesario integrarle un conservador y un amortiguador.

En base a estas condiciones si sblo se toma en cuenta las cantidades exactas de los reactivos para su producción el costo es de 56 nuevos pesos y con este costo se realizarian un total de 720 determinaciones. Con esto se justifica que al incrementar todos los gastos necesarios, tomando en cuenta una formulación completa, el costo de producción sigue siendo bajo; si tomamos en cuenta que una caja de T-S tiene un costo de 300 nuevos pesos. El reactivo se produce por lo tanto con la cuarta parte del costo de una caja de tromboplastina comercial T-S, y además se pueden realizar 560 determinaciones más.

Ahora bien si se considera el costo total en la adquisición de los reactivos y materiales, este es de N\$ 803.40 , pero aun así, como se esta produciendo un total de cuatro cajas y media; se necesitaria N\$ 1,350.00 para adquirir el reactivo comercial, por lo que la tromboplastina de trabajo, sigue siendo de más bajo costo, además de que cuenta con un gran remanente para seguir produciendo.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron lotes con diferente sensibilidad (Z1x, Z1y, Z2x, Z2y, Z3x y Z3y), siendo los lotes Z2x y Z2y los que presentaron una sensibilidad similar a la tromboplastina de referencia Thromborel-S (T-S), con base a las curvas de referencia.

Se estableció que para los lotes obtenidos el sulfato de bario no aumentó la sensibilidad.

Los agentes surfactantes propuestos (etilenglicol y propilenglicol), no beneficiaron como se planteó inicialmente a la tromboplastina en su porosidad y solubilidad. Por lo que se suprimió el usarlo en la formulación.

Presento características muy similares el liofilizado, al reactivo de referencia T-S, con el ión calcio integrado en una solución 0.02M y con el soporte albúmina de huevo 3% y lactosa 3%.

Por lo tanto se calibraron los lotes Z2x y Z2y en las condiciones antes mencionadas. Las calibraciones realizadas fueron de manera indirecta con tromboplastinas de referencia terciarias (comerciales; Thromborel-S).

De la calibración se obtuvo un ISI para L-Z2x de 1.19 y para el L-Z2y de 1.26, con un % de CV de 3.9 y 3.3 respectivamente, por lo que fueron relativamente mayores al permitido por la OMS (< 3%) pero que puede ser aceptable si es menor a un 5%. Por lo tanto los % de CV son menores al máximo permitido.

De los resultados obtenidos para el L-Z2x y el L-Z2y y haciendo la comparación bibliográfica, se puede decir que los lotes producidos en FES Zaragoza, son parecidos al producto comercial de importación Thromborel-S de Behring, a pesar de ser provenientes de especies y órganos diferentes, de cerebro de conejo y placenta humana respectivamente.

Por lo tanto en la FES Zaragoza es conveniente seguir produciendo lotes con la misma sensibilidad que el L-Z2x o el L-Z2y o aun mejorar su sensibilidad, pero con un % de CV bajo (< 3 %), que se parezca aun más a la preparación de referencia.

Además se comprobó con la comparación de costos, que se esta produciendo un reactivo económico, de gran utilidad en el laboratorio clínico, fácil de trabajar, y con una sensibilidad comparable al reactivo comercial.

Con la calibración de tromboplastinas, el TP de pacientes que reciben anticoagulantes orales deberán reportarse en RIN, el cual toma en cuenta las diferentes sensibilidades de las diferentes tromboplastinas a los efectos de los anticoagulantes orales, puesto que proporciona un simple medio de obtención de una medida universal -Una que tiene un mismo significado en todo el mundo independientemente de la fuente de tromboplastina-; facilitando el control de este tipo de pacientes.

Cuando son padecimientos donde no se administran anticoagulantes orales, se reporta un tiempo en segundos (con control), porcentaje de actividad (con base a la curva de

referencia) o en radio de protrombina (RP), mientras no se proponga una escala universal.

Por todo lo anterior se debe establecer un conservador y amortiguador adecuados con los cuales el reactivo cumpla con todos los requerimientos que exige la OMS, para así producir en FES Zaragoza un reactivo de alta calidad y sensibilidad comparable a productos de importación en donde su tecnología e infraestructura es avanzada.

Ahora bien tomando en cuenta el TLC debe pensarse seriamente en la competitividad. Para ello, se requiere perfeccionar el proceso de producción e ingeniería de productos. " Si nuestra tecnología no está al nivel de otros países, que producen artículos en masa con poca inversión, la situación para México no mejorará y nos veremos desplazados del mercado ".

REFERENCIAS

1. Iovine E. El Laboratorio y la clínica. 3a Ed. Argentina: Panamericana; 1985: 149-205.
2. Mazza J. Manual of clinical hematology. Boston: Little Brown and Company; 1988: 288-298.
3. Erlsev A. Pathophysiology of blood. 3a. Ed. Oxford: Saunders; 1985: 212-231.
4. Hamilton. Diagnóstico Clínico. México: Interamericana; 1986: 45-50.
5. Ciscar PF, Farreras VP. Diagnóstico Hematológico, Laboratorio y Clínica. Tomo II: Barcelona: JIMS; 1972: 1688-1693, 1734-1764.
6. Escriba A, Malvenda M. Fisiología de la hemostasia: México: Medicine; 1982, Abril 7: 60-90.
7. Goth A. Farmacología Médica Principios y Conceptos. España: Ediciones Doyma; 1984: 422-432.
8. Goldstein A. Farmacología. México; Limusa; 1979: 500-501, 553-556.
9. Goodman G, Goodman, Rall T. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 7a Ed. México: Panamericana; 1986: 1273-1283.
10. Rifkind R. Hematología Clínica. 3a. Ed. México: Interamericana; 1988: 215-220.
11. Owens M, Cimino C. A plasmas factor activity of vitamin K dependent coagulation proteins., Thromb Haemostas 1983; 50 (1): 749-752.

12. Quick A. The role of vitamins in hemostasis, *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 33: 191-198.
13. WHO Expert Committee on Biological Standardization; 33th Tech Rep Ser 687. WHO. Geneva. 1983.
14. WHO Expert Committee on Biological Standardization; 34th Tech Rep Ser 700. WHO. Geneva. 1984.
15. Taberner DA, Poller L, Thomson JM, y Col. Effect of International Sensitivity Index (ISI) of thromboplastins on precision of onternational normalized ratio (RIN), *J. Clin. Pathol* 1989; 42(10): 1118-1119.
16. Kaham J, Norel I. Assesment of different mathematical models for coagulation and expresing the results of coagulation test procedures. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1975; 34: 522.
17. Alderson MR, Oller L. Thomson JM. Validity of the british system for anticoagulant control using the national reagent. *J. Clin. Pathol*, 1970; 23: 281-285.
18. Hosagama H. Nagata H, Murao M. Studies on the tissue thromboplastin during the coagulation-fibrinolytic process-ultraestructural changes. *thromb Haemostas*, 1977; 37: 541.
19. Loeiiger E A, Van Halem-Viser LP. A simplified thromboplastin calibration procedure for standardization of anticoagulant control. *Thromb Diath Haemorrh*, 1975; 33: 165-190.

20. Owren PA. Criteria for an acceptable thromboplastin preparation. *Thromb Diath Haemorrh*, 1975; 33: 165-171.
21. Miale J, Kent J., Standardization of the therapeutic range for oral anticoagulants based on standard reference plasmas. *Amer. J. Clin. Pathol*, 1972; 57: 80-88.
22. Brozovik M, Howarth D, Van Halem-Visser y col. Stability of freeze dried plasma prepared from patients on oral anticoagulants. *J. Clin. Pathol*, 1973; 26: 857-863.
23. Poller L. The british system for anticoagulant control. *thromb Diath Haemorrh*, 1975; 33: 157-162.
24. Van Dux-Wierda C A, Hermans J, Loeliger E A. Interlaboratory oral anticoagulant quality assesment by the Netherlands federation of thrombosis servises. *Thromb Haemostas*, 1977; 37: 509-522.
25. Korsan K, Jorsen M, Pehrson N C. Comparison between british comparative thromboplastin (BCT) and a factor II-VII-X determination method (Simplastin A) based on fresh plasma samples from dicoumarol-treated patients. *thromb haemostas*, 1977; 37: 98-103.
26. Hermans J., Van den Basselaar AMHP, Loeliger EA, y col. A collavorative calibration study of reference materials for thromboplastins. *Thromb Haemostas*, 1983; 30(3): 712-717.
27. Loeliger EA. Thromboplastin calibration. *Throm Haemostas* 1977; 37: 588-589.

28. Kirwood TBL. Calibration of reference thromboplastins and standarization of the prothrombin time ratio. *Thromb Haemostas*, 1983; 49(3): 247-248.
29. Ingram G. Symposium standarizing the control of oral anticoagulant treatment. *Thromb Diath Haemorrh*, 1975; 33: 142-147.
30. Peters RHM, Van den Basselaar AMHP, Olthius FMFG. A multicentre study to evaluate method dependency of the international sensitivity index of the bovine thromboplastin. *Thromb Haemostas*, 1989; 61(1): 166-169.
31. Poller L. RIN and the therapeutic range. *Biol Clin Haematol*, 1987; 9: 203-213.
32. Poller L, Path F. Laboratory Control of anticoagulant therapy. *Sem Thromb Haemostas*, 1986; 12(1): 13-19.
33. Loeliger EA. Performance characteristics of reference thromboplastins. *Amer J. Clin Pathol*, 1974; 62: 574-575.
34. Bockhost M, Petronella J. Prospective double blind clinical trial of bovine, human and rabbit thromboplastin in monitoring long-term oral anticoagulation. *Amer J. Clin Pathol*, 1981; 75: 297-303.
35. Singer JW, Sibley CA. Sensitivity of Commercial Thromboplastin Factor VII, *Am. J. Clin Pathol*, 1973; 59: 758.
36. Neville, Savory J. The influence of residual factor VII on the sensitivity of brain thromboplastin. *Thromb Haemostas* 1978; 36: 592-599.

37. Howell WH. The nature and action of thromboplastin (Zymoplastin) substance of the tissue. Am J. Physiolog, 1972; 12, XXXXI, 1.
38. Leynez C H. Calibración (Obtención del ISI) y evaluación clínica de una tromboplastina tisular líquida de cerebro de conejo, por comparación con una tromboplastina comercial. Tesis de QFB. México, D.F., ENEP Zaragoza, UNAM 1990.
39. Loeliger EA. Vander-Horf. Thromboplastin Calibration. Thromb Haemostas, 1978; 40: 272-287.
40. Gogstard GO, Wadt J, Smith A, y col. Utility of a modified calibration model for reliable conversion of thromboplastin times to international normalized ratios. Thromb Haemostas, 1986; 56 (2): 178-182.
41. Nonhebel Moss. El secado de sólidos en la Industria Química. España: Reverté; 1979: 327-332.
42. Frederick J, Carleton, James P. Agalloco. Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes. New York: Marcel Dekker; 1986: 595-596, 603-617.
43. Jeannin. Ingeniería Farmacéutica. México: El manual moderno; 1986: 368-409.
44. Helman J. Farmacotecnia Teórica y Práctica. México: Continental; 1980: 969-1040.
45. Rodarte CG. Técnica de liofilización. Instituto de capacitación en especialidades, S.S., 1981: 1-136.

46. Smith A. V. Current Trends in Cryobiology Plenum Press, U.S.A. Ed. "Freeze Drying of Biological Material". Rowe T.W.G. (1970): 61-138.
47. Howell Roy M. Effect of barium sulphate-adsorbable proteins from serum on thromboplastin activity. Biochem-Soc-Trans. 1990 Aug; 18(4): 680-681.
48. Tejada R E. Obtención de la tromboplastina tisular liofilizada. Tesis de QFB. México, D.F., ENEP Zaragoza, UNAM 1989.
49. Wayne D. Bioestadística. México: Limusa; 1983.
50. Chou Ya-Lung. Análisis estadístico. 2a Ed. México: Interamericana; 1977.