



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EL MECANISMO NORMAL DE LA HEMOSTASIS
Y SU ESTUDIO EN EL LABORATORIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA HIPOLITA SANCHEZ DOMINGUEZ

ASESOR: DR. FEDERICO GERZSO RIVERA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

El mecanismo normal de la hemostasis y su estudio
en el laboratorio.

que presenta la pasante: María Hipólita Sánchez Domínguez.
con número de cuenta: 7736138-1 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 9 de noviembre de 1995

PRESIDENTE Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa

VOCAL Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez

SECRETARIO Dr. Federico Gerzso Rivera

PRIMER SUPLENTE QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Sandra Arceo Díaz Barriga

A mi madre, con respeto y cariño.

A mi esposo Antonio, por ser mi compañero desde
la adolescencia.

A mi hija Anita, con todo mi amor.

INDICE

	Hoja
I. OBJETIVOS	1
II. INTRODUCCION	
II.1 JUSTIFICACION	2
II.3 ANTECEDENTES HISTORICOS	3
II.3 ABREVIATURAS	7
III. HEMOSTASIS PRIMARIA	
III.1 VASOCONSTRICION	9
III.2 ADHESIVIDAD PLAQUETARIA	10
III.3 AGREGACION PLAQUETARIA	16
III.4 LIBERACION PLAQUETARIA	17
IV. HEMOSTASIS PRIMARIA	
IV.1 FACTORES DE COAGULACION	19
IV.2 VIA INTRINSECA	24
IV.3 VIA EXTRINSECA	26
V. FIBRINOLISIS	28
VI. INHIBIDORES	31
VII. EL LABORATORIO EN LA HEMOSTASIS PRIMARIA	
1. TIEMPO DE SANGRADO DE DUKE	39
2. PRUEBA DE LAZO	40
3. CUENTA DE PLAQUETAS	42
4. RETRACCION DEL COAGULO	44
5. ADHESIVIDAD PLAQUETARIA	46
6. AGREGACION PLAQUETARIA	48

VIII. EL LABORATORIO EN LA HEMOSTASIS SECUNDARIA	
1. TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL	51
2. TIEMPO DE PROTROMBINA	53
3. TIEMPO DE TROMBINA	55
4. CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO	57
5. BUSQUEDA DE INHIBIDORES	61
6. GENERACION DE TROMBOPLASTINA	62
7. CONSUMO DE PROTROMBINA	65
IX. EL LABORATORIO EN LA FIBRINOLISIS	
1. LISIS DE EUGLOBULINAS	68
2. PRUEBA DE ETANOL	70
3. PRUEBA DE SULFATO DE PROTAMINA	72
X. PREPARACION DE REACTIVOS	73
XI. RESUMEN	76
XII. GLOSARIO	78
XIII. REFERENCIAS	88

I . OBJETIVOS

a) Estudiar los conceptos actuales del mecanismo normal de la hemostasis.

b) Conocer diversas técnicas de laboratorio sencillas que permitan evaluar un trastorno hemorrágico.

c) Establecer una batería de pruebas de coagulación que auxiliien en el diagnóstico de una enfermedad hemostática.

II. INTRODUCCION

II.1 JUSTIFICACION

Los padecimientos hemorrágicos constituyen un grupo heterogéneo de entidades fisiopatológicas, tanto heredadas como adquiridas, cuya relevancia clínica se pone de manifiesto en razón directa de que sólo, en los padecimientos hematológicos, junto con la infección, constituyen la primera causa de muerte.

Así mismo, las enfermedades hemorrágicas complican con relativa frecuencia padecimientos tan comunes como los procesos infecciosos severos, complicaciones obstétricas, el cáncer, etc...

Las alteraciones en el mecanismo de la hemostasis no solo pueden expresarse en forma de hemorragia, sino también en forma de oclusión vascular, tanto arterial como venosa, conocida como trombosis.

Por tales motivos, considero de gran importancia realizar un estudio de éste mecanismo biológico y de los métodos que a nuestro alcance, permitan evaluarlo.

11.2 ANTECEDENTES HISTORICOS.

El mecanismo hemostático está destinado a mantener la sangre dentro de los vasos sanguíneos lesionados, para ello interactúan diversos elementos tales como: los vasos sanguíneos, las plaquetas y elementos tisulares, que en conjunto, nos ayudan a detener una hemorragia (1).

Haciendo un poco de historia, diremos que los primeros descubrimientos llevados a cabo en relación al estudio de la hemostasis, se refieren al año de 1842, donde Alfred Donné, un histólogo francés, reportó que existían partículas en la sangre tan pequeñas como los eritrocitos y leucocitos. Estos fueron identificados posteriormente como plaquetas por Bizzozero en 1880 (2).

En el año de 1845 Andrew Buchanan, un cirujano escocés descubrió a la trombina. En 1880 Olaf Hammarsten, un bioquímico sueco, purificó y caracterizó al fibrinógeno (3).

En 1890 Maurice Arthus un fisiólogo francés estableció que el calcio era necesario para la coagulación de la sangre. En 1891, es separada la trombina del fibrinógeno por Cornelius Pekelharing, un fisiólogo holandés (4).

En 1905, Paul Morawitz un internista alemán, reunió todas las evidencias posibles para unificar la teoría de la coagulación. Él decía que el coágulo de fibrina, proviene de un precursor soluble, el fibrinógeno con la ayuda de la enzima trombina, que surge de un precursor inactivo la protrombina y de dos sustancias adicionales, el factor tisular o tromboplastina y el calcio iónico, que juntos activan a la protrombina. Esta fue la hipótesis de entonces y ha sido la base de todas las predicciones actuales (5).

En 1926, Erik von Willebrand un profesor alemán, describió el desorden del sangrado congénito que lleva su nombre. Estudió a diversos miembros de una familia de Föglö, en una isla del archipiélago en Aland, en el golfo de Bothnia (6).

En 1930, Henrick Dam, un bioquímico danés identificó a la vitamina K, con una sustancia antihemorrágica (7).

En 1935, Quick introdujo la prueba del tiempo de protrombina, la cual tuvo gran aplicación en el empleo de fármacos dicumarínicos. Esta prueba se basa en la teoría de los cuatro factores, ya que admitía a la tromboplastina, fibrinógeno, calcio y protrombina. Tiempo después surgieron discrepancias observadas por el mismo Quick en 1943, encontró que el plasma presentaba un tiempo de protrombina alargado. Debido a esto Quick sugirió que existe un factor lábil (8).

En 1944, Robbins notificó que el plasma contiene un factor que, en presencia de Ca, da lugar a que la fibrina recientemente formada sea insoluble en urea, mientras que en ausencia de éste factor la fibrina continúa siendo insoluble. Este factor fué denominado por Laky y Lorand en 1948 como factor estabilizador de la fibrina (9).

En 1947, Owren encontró un nuevo factor de coagulación observó, que un tiempo de protrombina largo, podía corregirse con la adición de plasma, el cual había sido adsorbido con $Al(OH)_3$. Este factor era muy lábil, recibió el nombre de factor V. En 1950 el mismo Owren postuló la existencia de un nuevo factor, al que designó proconvertina, éste factor era estable, es adsorbido por geles inorgánicos, y se encuentra en el suero. Finalmente, Koller y cols. en 1952 denominó a este factor como factor VII (10).

No obstante de todos esos descubrimientos, se preguntaban en el caso de los hemofílicos, porque la sangre no coagulaba en tubos de vidrio, o bien en las heridas de los enfermos. Se iniciaron estudios con pacientes hemofílicos en suero y plasma. En 1952, en un paciente de apellido Christmas pudieron encontrar que éste factor es el " componente tromboelastínico del plasma " (11).

En 1955, Ratnoff y Colopy descubrieron un defecto por la deficiencia de un factor que normalmente inicia una serie de alteraciones en la sangre, tras el contacto con el vidrio. Estas alteraciones comprenden la activación del mecanismo de coagulación y también del sistema de kinina, éste factor es el factor Hageman, éste nombre proviene del primer paciente al que se estudió (12).

En 1956, Denson y Wright encontraron un factor relativamente estable y que podía ser adsorbido por los precipitados inorgánicos, dando tiempos de protrombina prolongados, éste factor recibió el nombre de factor Stuart - Prower, procedente del nombre de dos pacientes (13).

En 1959, se instituyó un comité internacional para proponer un sistema de nomenclatura universal. En 1963, se publicó la tercera edición del Human Blood Coagulation, aquí se estableció que existe un sistema extrínseco (activado por los tejidos) y de un sistema intrínseco (activado por contacto), y cada uno de ellos dando un activador final de la protrombina, aunque no se conocía el orden en que actuaban éstos factores se manifestó que los factores V y X son comunes en ambos sistemas y a ellos se suman los fosfolípidos y plaquetas (14).

En 1964, Macfarlane paralelamente con Davie y Ratnoff, propusieron una hipótesis mediante la descripción esquemática del mecanismo de coagulación intrínseco, tal mecanismo recibió el nombre de cascada enzimática (15).

Finalmente quién ha dado mayor claridad en el estudio del mecanismo de la coagulación fué Seegers en 1969, quién denominó a los factores VII, IX y X como autoprotrombinas I, II y III, y éstas pueden intensificar la activación de la protrombina (16).

II.3 ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
AEAC	Acido aminocaproico
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Adenosin trifosfato
AT III	Antitrombina III
FEC-Mg	Factor estimulador de colonias de megacariocitos
FEC-GM	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
FRDE	Factor de relajación derivado del endotelio
FT	Factor tisular
FPA	Fibrinopéptido A
GLA	Acido carboxiglutámico
GP Ib/IX	Complejo glucoproteína Ib/IX
GP IIb/IIIa	Complejo glucoproteína IIb/IIIa
IL-3	Interleucina 3

IVFT	Inhibidor de la vía del factor tisular
PAI-1	Activador tisular del plasminógeno
PCa	Proteína C activada
PK	Precalicroína
t-PA	Activador del plasminógeno tisular

III. HEMOSTASIS PRIMARIA

La hemostasis primaria es la primer fase de la coagulación, en la que intervienen los vasos sanguíneos y las plaquetas para reestablecer una lesión.

Para estudiar ésta fase la dividiremos en cuatro pasos que son los siguientes:

- a) VASOCONSTRICCIÓN
- b) ADHESIVIDAD PLAQUETARIA
- c) AGREGACIÓN PLAQUETARIA
- d) LIBERACIÓN PLAQUETARIA

III.1 VASOCONSTRICCIÓN

Los vasos sanguíneos en general están formados por una membrana basal de sostén, en la cual se adhieren células endoteliales (17). Estas juegan un papel de pivote en la hemostasis. Expresan receptores de superficie semejantes a los de las plaquetas activadas; también expresan receptores como el GMP (glucoproteína externa de la membrana de los gránulos dependientes de la activación de las plaquetas, también conocida como P-selectina), que median la adherencia de los neutrófilos y monocitos activados a las células endoteliales y a las plaquetas (18). Además, las células endoteliales secretan endotelina, que es un péptido que causa vasoconstricción intensa, así como el factor de relajación derivado del endotelio (FRDE). Se sabe que éste es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria (19).

Las arterias y las venas tienen una estructura más compleja compuesta por: 1) membrana basal, de tejido elástico y fibras de colágena. 2) media compuesta, formada de células de músculo liso, y fibras de colágena. 3) adventicia externa, formada de fibras de fibroblastos y fibras de colágena (20).

Al haber daño o lesión vascular, el vaso se contrae transitoriamente, como respuesta de los receptores que se encuentran en los pericitos del vaso, éstos liberan factor tisular FT (21). La vasoconstricción detiene la salida de la sangre, con la que los demás componentes sanguíneos, tales como plaquetas se encuentran en el lugar de la lesión (22).

III.2 ADHESIVIDAD PLAQUETARIA

Para estudiar éste paso es importante saber que son las plaquetas. Las plaquetas son un fragmento citoplasmático del megacariocito, son células grandes multinucleadas y son producidas en la médula ósea, se encuentran en circulación de 8 a 10 días y tienen una vida media de alrededor de cuatro días (23). Miden aproximadamente 2 micras, en su estado basal son de forma discoide y en su estado activado emiten pseudópodos (24).

Los megacariocitos son originados de células tronco mieloides pluripotenciales. parece ser que la producción de las plaquetas está controlada por la trombopoietina, que participa en la maduración final del megacariocito (25). Se piensa que existe un factor estimulador de colonias de megacariocitos (FEC-Meg), así como un factor potencializador de los mismos, pero esto aún no ha sido afirmado (26). Puede ser que el factor de células tronco, la

interleucina-3 (IL-3), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC_GM) y la interleucina-6 (IL-6) tengan todos algún papel en el control de la megacariopoyesis (27).

Con la ayuda de microscopía electrónica se ha podido estudiar la morfología de las plaquetas, para lo cual se han clasificado cuatro zonas anatómicas (Fig 1):

1. Zona periférica. La cual está constituida por la capa externa llamada glucocálix, cubre la membrana plaquetaria,

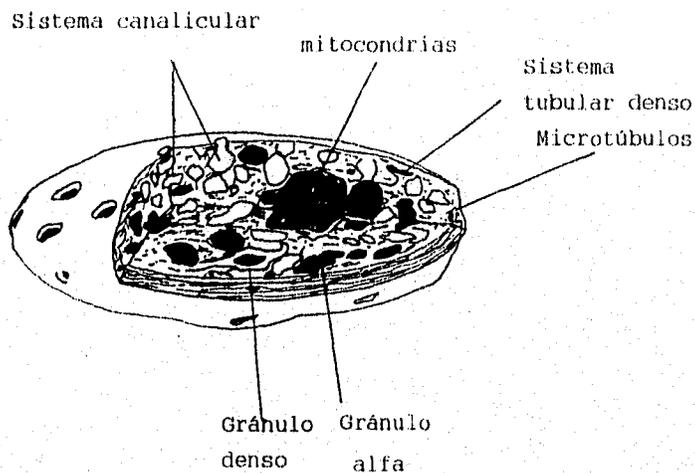


Fig. 1. Ultraestructura de la plaqueta. Se observan las zonas anatómicas más importantes y sus componentes. George J.N. Blood. 1990;76:859.

y debido a su contenido de ácido siálico, es responsable de la carga eléctrica negativa, importante en la adhesión y agregación plaquetaria (28). La membrana plaquetaria está constituida por una bicapa fosfolipídica y proteica. Contiene glucoproteínas (tabla 1), que funciona como receptores para los agonistas de la activación plaquetaria (29).

La glucoproteína Ib-IX, funciona en interrelación con la parte glucoproteica del factor VIII de la coagulación o factor von Willebrand, que permite la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular (30). El complejo Ib-IX (GPIb/IX), posiblemente es el primer receptor plaquetario que inicia el fenómeno adhesivo ligando la plaqueta a diferentes estructuras presentes en el subendotelio. Además se sugiere la capacidad del complejo GPIb/IX para unirse a otras estructuras como fibrina y colágena, también con finalidad adhesiva (31).

<u>Gluco-</u> <u>proteínas</u>	<u>Peso</u> <u>molecular</u>	<u>Comentarios</u>
Ib	143,000	Ausente en plaquetas Bernard-Soulier y receptor al factor von Willebrand
IIb	132,000	Ausente en plaquetas
IIIa	110,000	Tromboasténicas
V	89,000	Fija la trombina
IX	22,00	Forma el complejo con GpIb.

Tabla 1. Principales glucoproteínas de la membrana plaquetaria. Ambriz R. Medicine. Trombopatías, 1989;10:575.

El complejo Ib-IX, es un heterodímero formado por la unión no covalente de dos proteínas, la glucoproteína Ib(GPIb) y glucoproteína IX (GPIX), que se encuentra en la membrana plaquetaria (32).

La GPIb, está constituida por dos cadenas alfa y beta, unidas por puentes disulfuro. Existe un fragmento soluble en agua que se separa del resto de la molécula por diferentes estímulos proteolíticos, ésta es llamada glicocalicina, ésta se une a enzimas tales como plasmina, tripsina, elastasas, etc. (33). Esto se ha traducido en un desorden de sangrado semejante al Bernard-Soulier, y la glicocalicina plaquetaria puede actuar como potente inhibidor de la acción de la trombina (34).

El complejo de glucoproteínas IIb-IIIa, funciona como receptor de membrana para el fibrinógeno. La presencia de calcio es requerimiento necesario para la formación y función del complejo GPIIb-IIIa (35).

La glucoproteína V sirve como receptor para la trombina (36).

En la zona de la membrana, se encuentra también la región de la submembrana, constituida por el sistema canalicular de superficie, con el que tiene contacto la plaqueta hacia el exterior, y le sirve para liberar los productos del metabolismo de la misma (37).

2. Zona Sol-Gel. Contiene unos microtúbulos en su banda circunferencial. La función de ésta zona es la de proporcionar un citoesqueleto a las plaquetas. Cuando desempeñan su función contráctil, los microtúbulos son jalados hacia el centro de la plaqueta protegiendo así la zona de organelos (38).

3. Zona de organelos. Se han identificado tres tipos de organelos: Los cuerpos densos, lisosomas y gránulos alfa.

En los cuerpos densos se encuentra contenido el ADP intraplaquetario, ATP, serotonina, fosfato y calcio. Los lisosomas contienen ácidos e hidrolasas (39).

Durante la maduración del megacariocito, los gránulos alfa se hacen muy prominentes y son últimamente empaquetados dentro de las plaquetas durante la trombopoyesis. Los gránulos alfa son el único organelo secretor en que éste exhibe más compartimentos y adquiere su contenido, principalmente por medio de endocitosis y pinocitosis (40). De éste modo se incluyen proteínas adhesivas, como el fibrinógeno, factor von Willebrand y trombospondina, así como proteínas del plasma como IgG y albúmina. También contiene gránulos alfa, mitógenos celulares, como factor de crecimiento de plaquetas, así como factor de coagulación V, además inhibidores de las proteasas alfa 2-macroglobulina y alfa 2-antiplasmina (41). Los gránulos alfa, están destinados para liberar todo su contenido durante la activación de la plaqueta, y juega un papel importante en la reparación del daño (42).

En la fig. 2 se muestran los gránulos alfa secretorios.

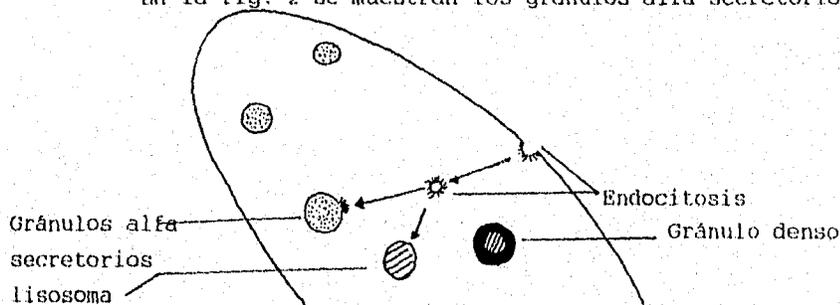


Fig. 2. Gránulos alfa secretorios. Se observa como, mediante endocitosis, la plaqueta incorpora sus proteínas.

George J.N. Blood.1990;76:859.

4. Sistema conectivo de superficie y sistema tubular denso. En éstas estructuras se contienen enzimas necesarias para la síntesis de prostaglandinas como el tromboxane A², y la producción de iones calcio, que fluyen en el citoplasma de la plaqueta. Además de las estructuras antes mencionadas en el citoplasma se encuentran, las mitocondrias, glucógeno y material fagocitado, incluyendo bacterias y virus (43).

Cuando existe daño endotelial las plaquetas tienen la capacidad de adherirse a superficies extrañas, sufriendo un cambio morfológico, al exponerse el endotelio, constituido por colágena, y la diferencia de carga eléctrica, entre el sub-endotelio y la plaqueta, favorece la unión entre ambos, iniciándose así la adhesividad plaquetaria (44).

En éste proceso de adhesión también participan enzimas como la fibronectina, que es una proteína adhesiva, y las glucoproteínas Ib y IX, junto con el factor von Willebrand (45).

Ultimamente se ha conferido gran importancia a una proteína adhesiva, la vitronectina, como un nuevo componente regulatorio en la interfase de la pared de los vasos sanguíneos. La vitronectina es sintetizada en el hígado, es de cadena sencilla, se ha encontrado en plasma en una concentración de 0.025-0.45 mg/ml. Durante la activación de las plaquetas la vitronectina es liberada por células del tejido conectivo, músculo liso, riñón y de la superficie capsular de todas las vísceras (46).

Se ha encontrado que la vitronectina no solo está implicada en acciones procoagulantes, sino también interviene en funciones regulatorias de la coagulación, como la fibrinólisis o la activación del sistema plasminógeno (47).

III.3 AGREGACION PLAQUETARIA

Una vez que se adhieren las plaquetas al lugar de lesión, las plaquetas agregadas centralizan sus gránulos, ocurre la contracción y la formación de pseudópodos plaquetarios debido a las proteínas contráctiles. Por el sistema canalicular son liberados el ADP y Tromboxano A₂, que permiten la adhesión y agregación de nuevas plaquetas (48).

Existen varios agentes que son capaces de inducir la agregación plaquetaria, como el ATP, que actúa sobre la adenilciclase que mantiene bajos los niveles de AMPc, o bien la activación de la fosfolipasa A₂, por medio de la trombina, colágena o ADP, que desencadena la activación de otras enzimas: entre las más importantes se encuentran la ciclooxigenasa y la tromboxano-sintetasa, que determina la síntesis del tromboxano A₂, que es un potente vasoconstrictor y también favorece la agregación plaquetaria (49).

Se han hecho estudios de agregación plaquetaria mediante el uso de un agregómetro, éste es básicamente un instrumento foto-óptico que está conectado a un mapa de registro. El plasma rico en plaquetas, el cual es turbio, es adicionado a una cubeta y la transmitancia de luz con respecto a un blanco de muestra de plasma pobre en plaquetas y ésta es registrada. Cuando se agrega un agente agregante como: ADP, colágena, epinefrina, trombina, ristocetina y ácido araquidónico, la formación de agregados plaquetarios cada vez mayores está acompañada por una disminución en la turbidez del plasma rico en plaquetas, la cual incrementa la transmitancia de la muestra, y ésta es convertida en una señal electrónica que es amplificada y registrada (50).

III.4 LIBERACION PLAQUETARIA

Esta etapa es la continuación de la agregación plaquetaria y ocurre de manera simultánea, ya que en las plaquetas activadas, el factor V se moviliza de los gránulos alfa hacia la superficie de la plaqueta, en donde actúa como receptor del factor Xa, proporcionando así una protrombinasa justo en el sitio de la lesión. El contacto de trombina o de la plaqueta con la colágena activa también a la fosfolipasa A₂ de superficie de la plaqueta (fig. 3), catalizando la formación de ácido araquidónico, que es un precursor de los endoperóxidos cíclicos. El tromboxano A₂ es un vasoconstrictor potente, y favorece también la agregación plaquetaria. La retracción del coágulo está mediada por la actomiosina plaquetaria que, al activarse la plaqueta, se une al complejo GPIIb-IIIa (51).

Existe otro elemento que interviene, la prostaciclina sintetizada también a partir del ácido araquidónico, inhibe la agregación plaquetaria al disminuir la liberación del ADP. Esta reacción de liberación está mediada por el AMP cíclico, logrando así un equilibrio entre la activación y la inhibición de la agregación plaquetaria (52).

La célula endotelial dañada y la plaqueta activada actúan juntas para generar el trombo hemostático en el sitio exacto de daño vascular.

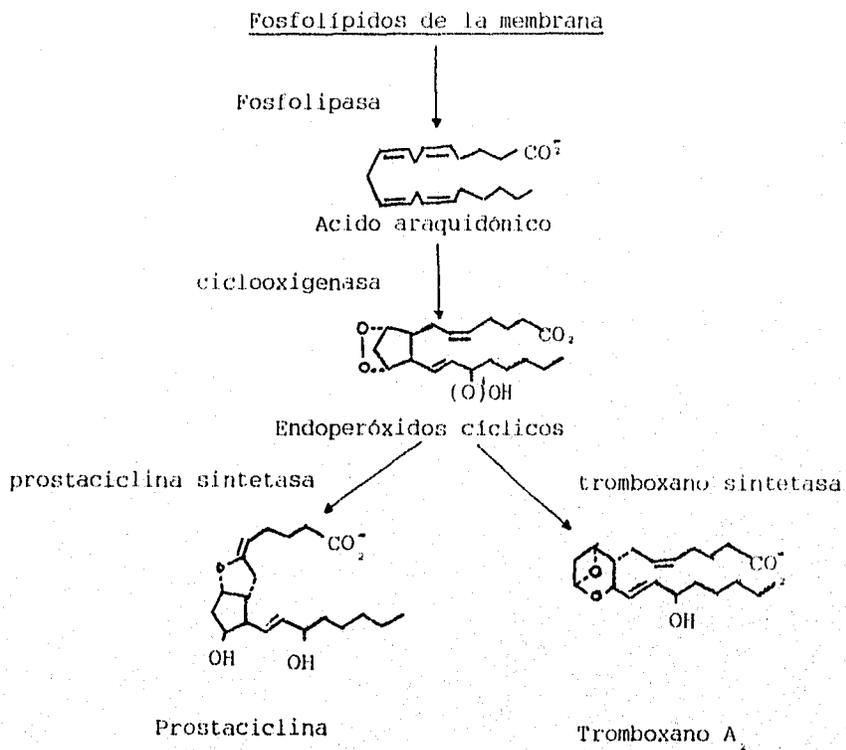


Fig.3. Metabolismo de la prostaglandina. La fosfolipasa escinde a los ésteres del ácido araquidónico. Williams. Hematology. 1987; 1194.

IV. HEMOSTASIS SECUNDARIA

En esta fase se lleva a cabo el fenómeno por el cual la sangre fluida se transforma en una masa insoluble e inmóvil. Es muy difícil separar tanto la fase de hemostasis primaria como la de hemostasis secundaria una de otra, pero para su estudio la dividiremos en las siguientes etapas:

- a) Factores de coagulación
- b) Vía intrínseca
- c) Vía extrínseca

IV.1 FACTORES DE COAGULACION

Las proteínas de la coagulación forman una cascada de tipo enzimático, ocurriendo una reacción en cadena. A éstos factores se les ha designado con números romanos: del I al XIII. El factor VI no se incluye, ya que se encontró que en realidad era el factor V activado. Quedando solo doce factores como a continuación se muestra (53).

Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Factor tisular
Factor IV	Calcio
Factor V	Factor lábil o proacelerina
Factor VII	Factor estable o proconvertina
Factor VIII	Globulina antihemofílica
Factor IX	Factor Christmas
Factor X	Factor Stuart-Prower
Factor XI	Antecedente tromboplastínico del plasma
Factor XII	Factor Hageman
Factor XIII	Factor estabilizante de la fibrina

Los factores de coagulación se dividen en tres familias:

1) Familia del fibrinógeno. Aquí se incluyen a los factores V, VIII, XIII y el fibrinógeno. Se caracterizan por tener un peso molecular alto y ser lábiles, principalmente los factores V y VIII, que no son estables en sangre almacenada. Estos factores son consumidos durante la coagulación y no son adsorbidos por sulfato de bario o hidróxido de aluminio (54).

El fibrinógeno es una glicoproteína muy compleja consiste en dos juegos de tres cadenas polipeptídicas diferentes: 2 alfa, 2 beta y 2 gamma, unidos por enlaces disulfuro. Su peso molecular es de 340,000 y se sintetiza en hígado. La trombina actúa sobre el fibrinógeno en el extremo N-terminal de cada una de las cadenas alfa y beta, hidrolizando los enlaces arginil glicina, liberando de la cadena alfa, el péptido A y de la cadena beta, el péptido B, dando lugar a los monómeros de fibrina (55).

El factor V es una glicoproteína de cadena simple, con peso molecular de 330 000. Es sintetizada en hígado y su concentración normal en plasma es de 5 a 12 ug/ml. Su forma activa es como cofactor (56).

El factor XIII es un tetrámero de dos cadenas alfa y dos cadenas beta, con peso molecular de 300,000. Las cadenas alfa son las que tienen el centro activo de la molécula (57).

El factor VIII es una glicoproteína de cadena simple, se encuentra unido al factor von Willebrand. Se pensaba que el factor VIII era una sola molécula con diferentes actividades, pero ahora se conoce la estructura química de los dos diferentes factores, y entonces el factor VIII participa en la hemostasis secundaria y el factor von Willebrand en la hemostasis primaria. La forma activa del factor VIII es de cofactor (58).

2) Familia de la protrombinasa. Esta familia incluye a los factores VII, IX, X, la protrombina y las proteínas C y S. Se caracterizan por tener un peso molecular bajo, son estables al calor, y por ende no son consumidos por la coagulación, excepto la protrombina. Pueden ser adsorbidos por sulfato de bario u otras sales, además requieren vitamina K para ser sintetizados (59).

Estos factores son sintetizados en el hígado y contienen una región amino-terminal con el ácido carboxiglutámico (GLA). El factor VII es una glicoproteína de cadena simple, con peso molecular de 50 000, contiene 10 residuos GLA. Se activa por proteólisis menor y para activar al factor X y al IX forma complejos con Ca^{++} y fosfolípidos, y como cofactor al III. Su concentración normal en plasma es de 1 $\mu\text{g/ml}$ (60).

El factor IX es una glicoproteína de cadena simple con peso molecular de 57 000, contiene 12 residuos GLA. Se activa por los factores XI y VII. Su concentración normal en plasma es de 4 $\mu\text{g/ml}$. El factor X es una glicoproteína, de doble cadena, con peso molecular de 59 000, contiene un residuo GLA. Se activa por los factores IXa y VIIa, ambos formando complejos con Ca^{++} y fosfolípidos y como cofactor el factor V (protrombinasa) (61).

La protrombina o factor II es una glicoproteína de cadena simple, con peso molecular de 70 000, contiene 10 residuos GLA. Su concentración normal en plasma es de 100 $\mu\text{g/ml}$. La proteína C es un péptido vitamino K dependiente, formado por dos cadenas de glicoproteínas, con peso molecular de 62 000 y fué descubierta en 1976 por Stenflo mediante cromatografía (62).

La proteína S es un péptido vitamino K dependiente formado por una sola cadena de glicoproteínas de peso molecular 69 000. Fué descubierta por Discipio y col. en 1977, y designada proteína S porque se estudió en Seattle por primera vez (62,63).

3) Familia de los factores de contacto. Aquí se incluyen a los factores XII, XI, precalicreína y cininógenos de alto peso molecular (CgPMA). Estos factores son estables en sangre almacenada, no son consumidos durante la coagulación y no requieren vitamina K para su síntesis. Tienen en común que su activación es con superficies cargadas negativamente, tales como caolín, celite y superficies celulares (64).

El factor XII es una betaglobulina de cadena simple con peso molecular de 80 000. Es activado por la calicreína. Actúa sobre el plasminógeno, precalicreína, factor XI y cininógenos de alto peso molecular. Su concentración normal en plasma es de 29 µg/ml (65).

El factor XI es una gamaglobulina, de doble cadena con peso molecular de 80 000. Es activado por el factor XIIa y por la calicreína. El factor XI actúa sobre el factor IX. Su concentración normal en plasma es de 4 µg/ml (66).

La precalicreína es una gamaglobulina de cadena simple con peso molecular de 88 000. Se activa por el factor XIIa. Su concentración normal en plasma es de 50 µg/ml, el 25% está libre en plasma y el otro 75% está unido a los (CgPMA). La calicreína es la forma activa y actúa sobre el factor XII, CgPMA, plasminógeno y prourokinasa (67).

El cininógeno de alto peso molecular (CgPMA) es una alfa globulina de cadena simple, con un peso molecular de 120000. Cuando se activa libera un péptido vasoactivo: la bradikinina y modula el efecto de la trombina sobre las plaquetas. Su concentración normal en plasma es de 70 µg/ml (68).

Las proteasas séricas o factores, son enzimas desdobladoras a excepción de los factores V, VIII y III. Las proteasas se diferencian entre sí, porque actúan sobre diferentes sustratos. Estas enzimas actúan bajo el estímulo de dos diferentes tipos de superficie (69).

a) El fosfolípido de la membrana plaquetaria, que se encuentra expuesto en el sitio de la lesión.

b) El fosfolípido tisular que es liberado de la membrana de la superficie tisular de los tejidos lesionados.

Los cofactores actúan como coenzimas o factores asistentes, en éste grupo se encuentran los factores V, VIII y el III (factor tisular). Este factor como su nombre lo indica, no se encuentra en la circulación plasmática, sino en los tejidos. Al producirse ruptura de un vaso sanguíneo hay exposición de éste factor. Tiene un peso molecular de 45 000 (70).

IV.2 VIA INTRINSECA

La bioquímica de la coagulación se inicia cuando el fosfolípido plaquetario, es expuesto por las plaquetas, o bien a nivel del fosfolípido tisular y éstos se unen a las proteasas de la coagulación (71).

Las vías que conducen a la formación de fibrina se dividen en dos: vía intrínseca y vía extrínseca, siguiendo posteriormente una vía común.

La vía intrínseca, se inicia en el espacio intravascular con un complejo enzimático que está compuesto por el factor XII, precalicreína (PK) y Cininógenos de alto peso molecular (CgPMA), los cuales interactúan sobre una superficie cargada negativamente y esto hace que se convierta la precalicreína en calicreína, que a su vez activa al factor XI. A éstos factores se les llama factores de contacto (72).

El factor XIa (factor XI activado), actúa sobre el factor IX activándolo (IXa). El factor IXa forma un complejo con iones calcio y fosfolípidos para poder activar al factor X. Esta reacción se acelera en presencia de un cofactor, éste cofactor es el factor VIII. A éste complejo se le llama Díezasa de la vía intrínseca (73).

El factor Xa forma un complejo con iones calcio y fosfolípidos, utilizando al factor V como cofactor, y así activar al factor II. A éste complejo se le llama Protrombinasa (fig 4). La ruptura del factor IIa, da lugar a la trombina (74).

La trombina actúa eliminando dos fibrinopeptidos A y dos fibrinopeptidos B del fibrinógeno, quedando solo los monómeros de fibrina. Estos monómeros se polimerizan para formar la fibrina soluble. También la trombina activa al factor XIII en presencia de iones calcio. El factor XIIIa convierte la fibrina soluble en fibrina insoluble (75).

VIA INTRINSECA
CgPMA

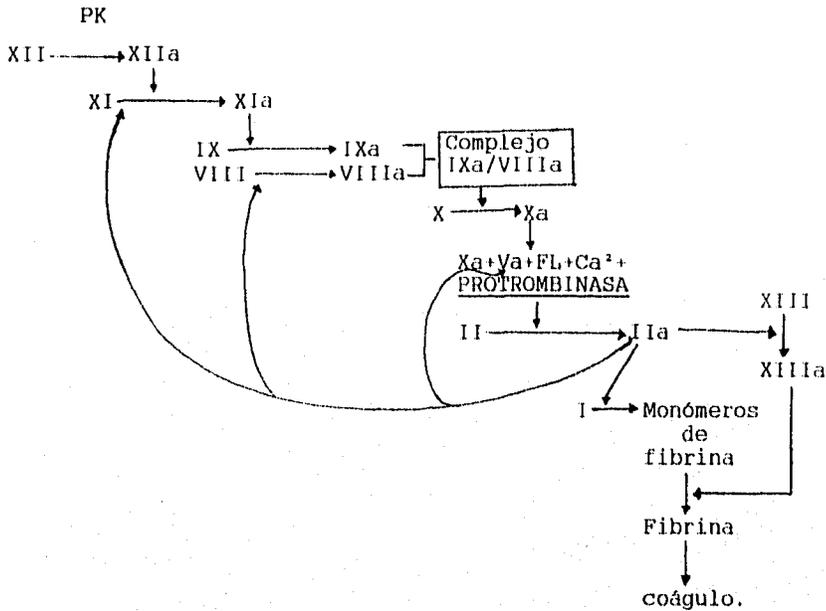


Fig.4. La vía intrínseca. La actividad enzimática formada por el complejo de Xa, Va, Ca²⁺ y fosfolípidos de la membrana de las células endoteliales y de las plaquetas se ha denominado protrombinasa. Las flechas externas indican que la trombina (factor IIa) aumenta la actividad de otros factores. Rapaport S.I. Hemostasis. 12ed 1991, Williams & Wilkins Co.

IV.3 VIA EXTRINSECA

Esta vía involucra la activación tisular, es un método alternativo para la activación del factor X. Empieza por la activación del factor VII, y ésta es dada por la ruptura de un enlace sencillo Arg-Ile, lo que ocasiona la salida de dos cadenas ligadas por puentes disulfuro. Esta activación también es posible gracias a los factores IIa, IXa y Xa en presencia de Ca^{2+} . El complejo VIIa forma complejos con iones calcio y fosfolípidos. Este complejo requiere de un cofactor, en éste caso es el factor III (factor tisular FT). A éste complejo se le llama Díezasa de la vía extrínseca (76).

Al formarse el complejo antes mencionado, los factores que intervienen después se encuentran presentes en ambas vías, y de ahí su nombre de vía común. El complejo VIIa/FT, activa al factor IX, transformándolo en factor IXa y el factor X a factor Xa. A continuación el factor Xa, unido al factor Va sobre la superficie de las células endoteliales o de las plaquetas, convierte con rapidez la protrombina o factor II en trombina (factor IIa) (77).

En la figura 5 se observan ambas vías, tanto la intrínseca como la extrínseca, actuando al mismo tiempo.

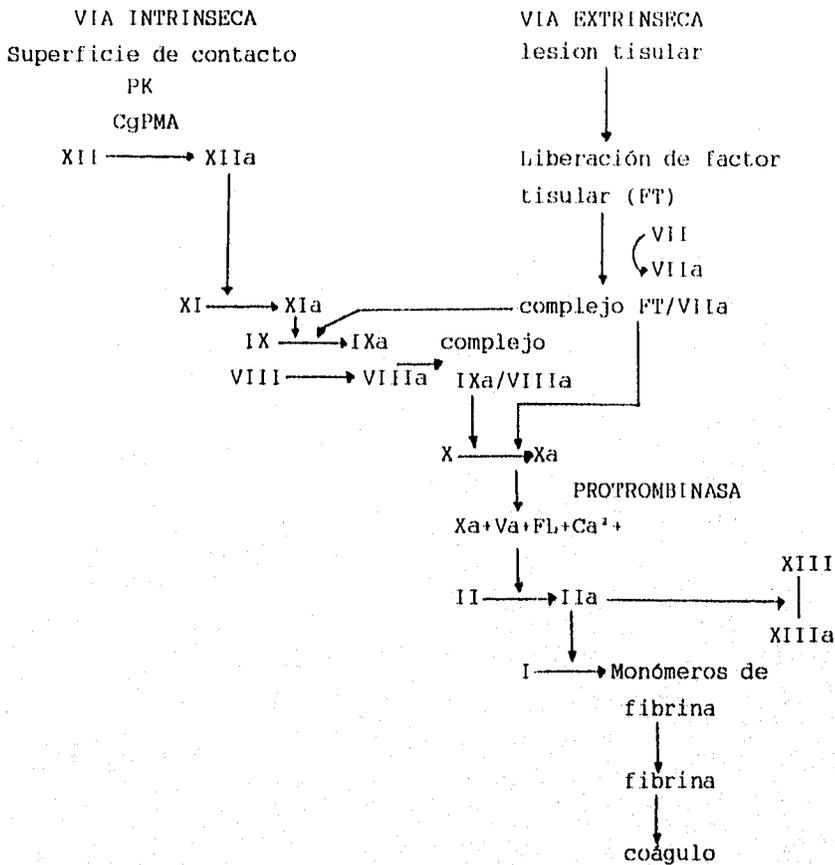


Fig.5. Vía intrínseca y vía extrínseca. Antes se consideraba que la vía intrínseca era de mayor importancia, pero el descubrimiento de la función clave que tiene el complejo factor tisular/ factor VIIa ha hecho que éste concepto de la coagulación sea en parte obsoleto. Rapaport S.I. Thromb Haemost. 1991;66:6.

V. FIBRINOLISIS

La fibrinólisis es el sistema lítico, el cual se encarga de degradar enzimáticamente el coágulo para reestablecer la permeabilidad del vaso trombosado (78).

La fibrinólisis comienza por la liberación de activadores del plasminógeno, como el activador del plasminógeno tisular (t-PA), liberado por las células endoteliales, formándose un complejo activador tisular del plasminógeno-fibrina-plasminógeno (79).

El plasminógeno es una glucoproteína plasmática con peso molecular de 90 000, es producida por el hígado y tiene vida media de dos días. el mecanismo de acción del plasminógeno más conocido es el de la urocinasa, que activa al plasminógeno por la ruptura del enlace arg-val (80).

No se debe olvidar el efecto activador del factor XIIIa, calicreína e indirectamente la proteína C, por neutralización del inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) liberado por la célula endotelial y almacenado en la plaqueta. Fig 6. Otros inhibidores del activador tisular del plasminógeno son PAI-2 de origen placentario y el PAI-3 que no inhibe el activador tisular del plasminógeno pero sí a la proteína C activada (81).

Una vez formada la plasmina, ésta se convierte en una proteasa sérica activa más específica que la trombina, al desintegrar los monómeros de fibrina Ia ó productos de degradación de fibrina. Del mismo modo actúa sobre la conversión del fibrinógeno I, dando los productos de degradación del fibrinógeno. La conversión del factor I a monómeros Ia de fibrina genera el fragmento peptídico fibrinopéptido A (FPA). La conversión del polímero Ia de Fibrina a fibrina II origina al fibrinopéptido B (FPB) Fig. 7 (82).

La plasmina y la trombina IIa compiten entre sí para unirse al polímero Ia de fibrina. La acción de la trombina origina la producción del coágulo de fibrina con enlaces cruzados mientras que la acción de la plasmina forma los fragmentos X y B. La plasmina también actúa sobre el coágulo de fibrina formando así el dímero de D y tetrámeros (83).

Existen agentes farmacológicos que se utilizan para modificar el proceso de fibrinólisis normal, tales como el ácido aminocaproico (AEAC) y el ácido tranexámico, que inhiben la unión del plasminógeno y la plasmina a la fibrina Fig 6. (84).

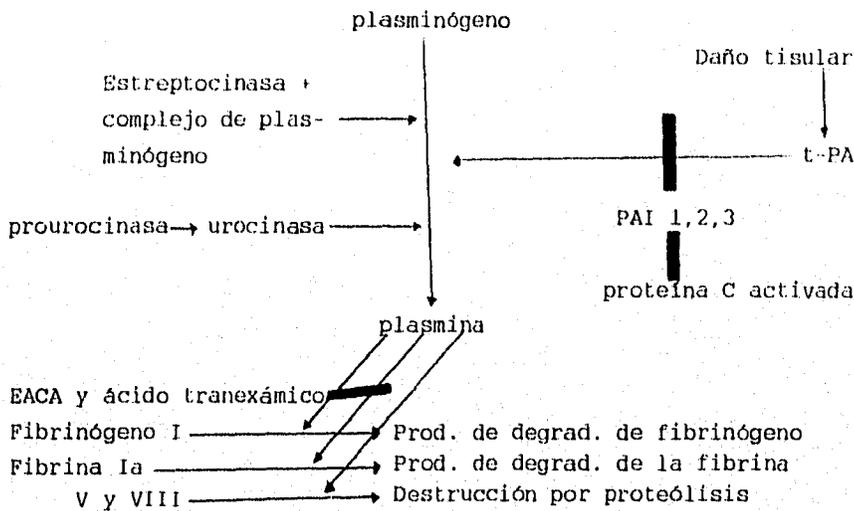


Fig.6. El diagrama muestra la fibrinólisis normal y los agentes farmacológicos que pueden utilizarse para modificarla. Betries J. Blood 70;343:1987.

Existe un mecanismo de regulación celular, en donde las células sanguíneas se unen al plasminógeno con gran afinidad al expresar receptores para componentes fibrinolíticos, y de éste modo regulan la función del sistema plasminógeno-plasmina. Algunas de éstas células son: los monocitos, granulocitos, linfocitos T y B eritrocitos, plaquetas, células endoteliales y hepatocitos (85).

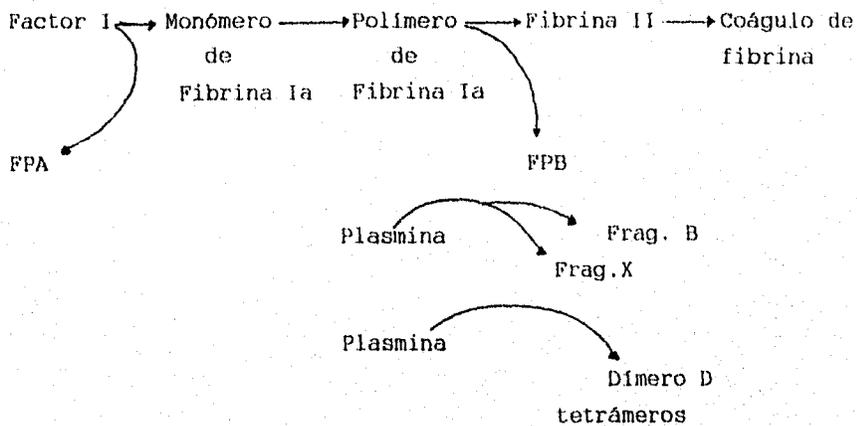


Fig.7. Se observa la conversión del polímero Ia de fibrina a fibrina II, que origina el fibrinopéptido B (FPB). Mosesson MW. J.Lab.Clin.Med.1990;116:8

VI. INHIBIDORES

Si no se controlan las propiedades de autoamplificación de la coagulación, cada hemorragia produciría coagulación generalizada y oclusión permanente de los vasos, para ello, el organismo produce los inhibidores (86).

A continuación se darán los mecanismos regulatorios de la coagulación:

1) Aumento de la circulación sanguínea, que reduce la probabilidad de una concentración localizada de precursores y elimina los materiales activados por dilución con un volumen mayor. Se piensa que ahí pueden ser captados por las células mononucleares fagocíticas (87).

2) Durante el proceso de coagulación se producen enzimas proteolíticas que no solo activan a los factores de coagulación, sino que también degradan a los cofactores, un ejemplo de éstos es la proteína C y S. La proteína C es un péptido vitamino K dependiente, formada por dos cadenas de proteínas, una pesada y otra ligera, unidas por puentes disulfuro y de peso molecular 62 000. Fué descubierta en 1976 por Stenflo, mediante cromatografía. Más tarde Seegers y colaboradores demostraron que ésta proteína era un potente anticoagulante natural (88).

En 1981 Esmon y Owen descubrieron a la trombomodulina, que se encuentra en las células del endotelio vascular y cuyo peso molecular es de 74 000, ésta es una proteína-receptor de la membrana de la trombina con la que forma un complejo para activar a la proteína C (PCa), acelerando 30 000 veces más su actividad que la trombina sola (89).

El complejo trombina-trombomodulina actúa sobre la proteína C activándola, dando lugar a la proteína C activada (PCa) (Fig 8). Este complejo tiene tres funciones (90):

a) Antitrombótica: Inactiva a la trombina quitándole sus propiedades coagulantes tanto del plasma como los que ejerce sobre las plaquetas.

b) Anticoagulante: Destruye la actividad coagulante del F VIII y la del factor Va, presente en el complejo formado por el F Va y Xa unidos a los fosfolípidos de la superficie plaquetaria. Inhibe la activación procoagulante ya sea de la protrombina, si esto se lleva a cabo en la superficie de las plaquetas o bien, inactivando directamente al F Va, si éste se halla libre en el plasma.

c) Fibrinolítica: Aumenta la cantidad del activador tisular del plasminógeno (t-PA), al neutralizar a su inhibidor circulante. Así se favorece la conversión del plasminógeno en plasmina y con ello la fibrinólisis.

Debido a los poderosos efectos de la proteína C, su activación es regulada, y su acción es bloqueada por el inhibidor de proteína C. Esta fue aislada en 1983 por Susuki y col. se encontró en pacientes con deficiencia combinada de los factores V y VIII. Tiene un peso molecular de 57 000 y forma complejos 1:1 con la proteína C (91).

La proteína S es una glucoproteína de una cadena, con peso molecular de 69 000. Es vitamino K dependiente. Fue descubierta por Discipio y col. en 1977, y designada proteína S porque se estudió en Seattle por primera vez (92).

La proteína S actúa como cofactor de la proteína C, formando un complejo estequiométrico 1:1, sobre la superficie de fosfolípidos cargada negativamente (Fig.9). La presencia de la proteína S, incrementa la afinidad de la Proteína C (PCa) a la membrana (93).

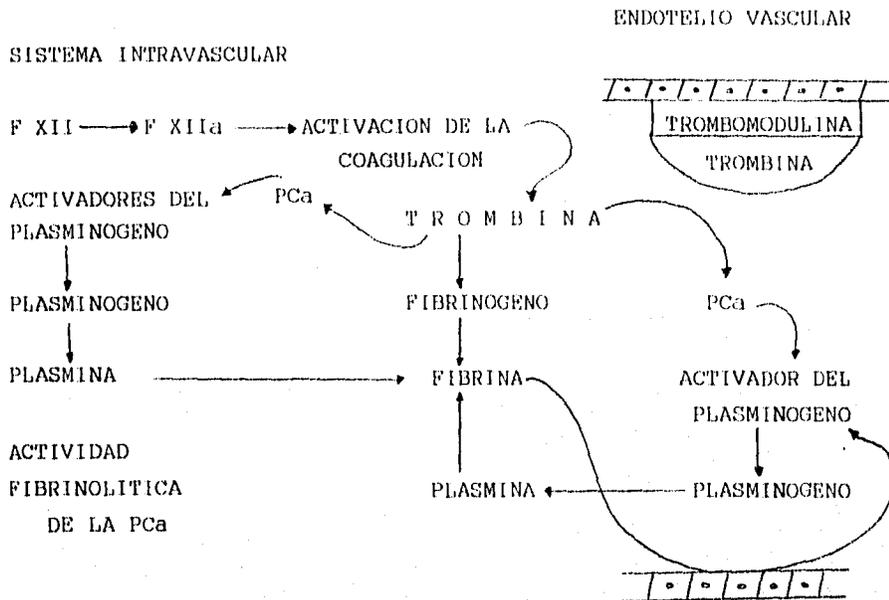


Fig.8. Actividad fibrinolítica de la proteína C en la autorregulación antitrombótica de la hemostasis. Pizzuto J. Gaceta CMN 1991:184

La proteína S circula en dos formas: una forma libre, en la que es activa como anticoagulante, y una forma combinada, unida a la proteína C4b del sistema del complemento, que es motivo de estudio en áreas diferentes a la hematología (92,94).

3) En la actualidad se ha identificado un inhibidor específico del complejo factor tisular/Factor VIIa, y se denomina Inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT). Es una lipoproteína que es activada por el factor Xa. El complejo factor Xa/IVFT actúa en forma específica sobre el factor tisular/factor VIIa, inactivándolo (95).

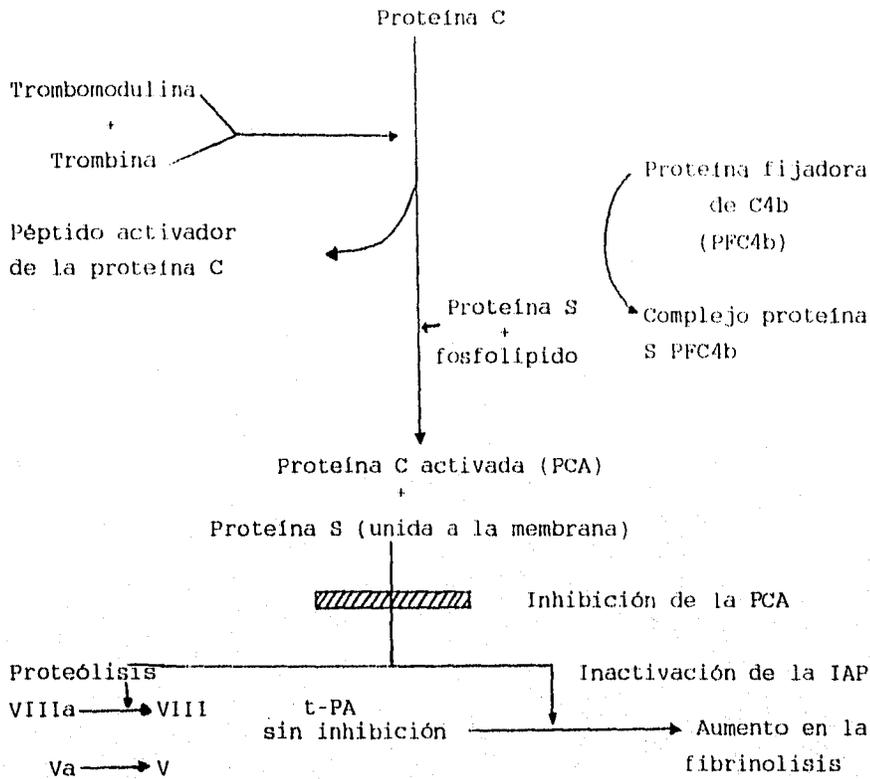


Fig.9. La proteína C se activa por la acción combinada de la trombina, trombomodulina, la proteína S y el fosfolípido. para formar la PCA, que tiene dos funciones principales: degrada y de esa manera inactiva a los factores VIIIa y Va y aumenta la acción del t-PA. El efecto de la proteína S sobre la activación de la proteína C puede ser inhibida por la proteína fijadora de C4b, que forma un complejo con la proteína S. Adams G.A. J.Lab.Clin. Med. 1990;7:613.

4) Antitrombina III, es una globulina de PM 65 000. Su poder inhibitorio se eleva hasta 1000 al combinarse con la heparina (AT III-heparina). La antitrombina III forma complejos estequiométricos 1:1 con las siguientes proteasas, o factores : calicreína, XIIa, XIa, IXa, Xa y IIa. La heparina se une a los residuos lisil de la AT III, produciendo un cambio morfológico que hace que el sitio activo de la AT III sea más accesible a los procoagulantes proteasa de serina (96).

5) Alfa 2 de la plasmina o antiplasmina. Es una alfa 2 globulina de PM 67 000. Inhibe rápidamente a la plasmina, aunque también puede inhibir lentamente a la calicreína, XII, XIa, Xa y trombina (97).

6) Alfa 2 macroglobulina. Es una globulina de PM 75 000. Se localiza en el glucocalix de las células endoteliales protegiendo al endotelio del daño de proteasas plasmáticas y celulares, las cuales se producen durante eventos inflamatorios y hemostáticos. Inhibe principalmente a la calicreína, y en forma menos importante a la trombina y a la plasmina (98).

7) Inhibidor de CI. Es una globulina de PM 105 000 . Es el principal inhibidor de la calicreína, aunque también inhibe a los factores XIIa, XII, XIa. Su deficiencia no causa anormalidades hemostáticas (98).

8) Alfa 1 antitripsina. Tiene peso molecular de 54 000. Su papel en la hemostasis parece ser menor, inhibe al factor XIa y a velocidad muy lenta a la trombina y a la plasmina (98).

9) Inhibidor de la PCa. Es una proteína de PM 57 000. Se descubrió en pacientes con deficiencia combinada de los factores VIII y V. Forma complejos 1:1 con la proteína C activada (99)

Los capítulos que a continuación se presentan, contienen las técnicas, fundamentos químicos e interpretación de las pruebas de laboratorio de coagulación más comúnmente empleadas.

Como se apuntó en los objetivos del presente trabajo, lo que se pretende es proporcionar técnicas sencillas y útiles y que éstas puedan ser montadas por cualquier laboratorio de coagulación, que no tenga la infraestructura necesaria para poder introducir sistemas automatizados.

Así mismo se dará especial interés en la preparación de reactivos, ya que de ello depende la realización óptima de cada una de las pruebas.

La interpretación de éstas pruebas y su correlación con los padecimientos hemorrágicos, son para el médico tratante de gran utilidad en el diagnóstico de problemas de coagulación.

CONSIDERACIONES GENERALES

Para estudiar el mecanismo hemostático, se deben de tomar en cuenta ciertas variables , como son el control de la temperatura, pH, relación anticoagulante-sangre, etc... que pueden darnos un resultado erróneo. Es por ello que se deben de tomar precauciones: (15):

___ Toma de muestra. Se recomienda el uso de jeringas de plástico, con aguja de 20 x 32 mm de calibre, que reduce el riesgo de hemólisis. La punción venosa debe ser limpia, para evitar la liberación de tromboplastina tisular.

___ Vaciado al tubo. Se debe retirar la aguja y pegar el pivote a la pared del tubo, vaciando lentamente, lo que evita la hemólisis, y la formación de espuma, que dañan a las plaquetas.

___ Proporción anticoagulante-sangre. Se debe respetar la relación 1:9 ya que un exceso de anticoagulante puede alterar los tiempos plasmáticos.

-- ___ Conservación. La muestra debe conservarse en baño de hielo, hasta ser procesada, en un lapso no mayor de 4 horas.

___ Temperatura. Se debe mantener una temperatura constante de incubación de $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

___ Limpieza del material de trabajo. Se debe evitar la presencia de residuos de grasa, por un mal lavado.

Se deben tomar en cuenta todas estas consideraciones para la obtención de buenos resultados.

VII EL LABORATORIO EN LA
HEMOSTASIS PRIMARIA

1. TIEMPO DE SANGRADO DE DUKE (100)

FUNDAMENTO:

La normalidad en el tiempo de sangrado depende de cuando menos dos factores: uno plaquetario (cantidad y calidad) y otro vascular. La alteración en alguno de éstos elementos da como resultado una prolongación en el tiempo de sangrado.

MATERIAL:

Cronómetro
lanceta estéril
papel filtro
torundas con alcohol

METODO:

- a) Dar masaje suave en el lóbulo de la oreja, limpiarla con alcohol y dejar evaporar.
- b) Hacer una punción de 2 a 3 mm de profundidad con la lanceta, simultáneamente echar a andar el cronómetro.
- c) Con el papel filtro se quita la gota de sangre a intervalos de 15 seg. sin tocar la piel.
- d) Parar el cronómetro en el momento en que el papel filtro ya no se manche de sangre.

INTERPRETACION:

Normal : 1 a 3 minutos
Dudoso : 3 a 5 minutos
Anormal : más de 5 minutos

Esta prueba es útil para el estudio de pacientes con enfermedad de von Willebrand, donde se encuentra alargado el tiempo de sangrado.

2. PRUEBA DE LAZO (100)

FUNDAMENTO:

Esta técnica, también conocida con los nombres de prueba del torniquete o prueba de Rumpel-Leede, consiste en aplicación de presión positiva a los capilares, observando clínicamente la aparición de petequias en una zona distal, en un diámetro conocido en el antebrazo. El espectro de éste método es semejante al del tiempo de sangrado, y su positividad se observa, en defectos graves de la calidad plaquetaria, o en problemas de fragilidad o permeabilidad capilar.

MATERIAL:

Lancetas
Cronómetro
Esfigmomanómetro

METODO:

- a) Inspeccionar la piel de la mitad superior interna del antebrazo del paciente en busca de petequias y marcarlas si las hay, con un punto de tinta.
- b) Tomar la presión arterial.
- c) Inflar el manguito del esfigmomanómetro, hasta que alcance una presión igual a la mitad de la suma de las presiones máxima y mínima y sostener dicha presión de 3 a 5 minutos.
- d) Desinflar el manguito y esperar que el brazo se descongestione (5-15 minutos).
- e) Contar el número de petequias que hayan aparecido en una área circular de 2.5 cm. de diámetro. Dicha área debe escogerse preferentemente en la cara de flexión del antebrazo, a unos 2 a 3 cms por debajo del pliegue del codo y libre de la zona de presión del manguito del esfigmomanómetro.

f) Ocasionalmente sucede que no aparecen petequias en el círculo, pero se encuentran en toda la superficie del antebrazo, pliegue del codo y mano. En éste caso se da la prueba como positiva, pero sin mencionar el número de petequias, interpretando la intensidad de la respuesta con cruces de + a +++

g) Debe preferirse mantener la presión durante 3 minutos, ya que la prueba que se hace manteniéndose 5 min. es menos específica, aún cuando más sensible.

INTERPRETACION:

La prueba es normal, cuando aparecen hasta 10 petequias en el círculo. Hasta 15 es dudosa y más de 15 es positiva.

Esta determinación nos sirve para el diagnóstico de una Trombocitopenia, trombocitemias hemorrágicas y en la Enf. de Glanzmann, donde esta prueba es positiva.

3. CUENTA DE PLAQUETAS (101)

FUNDAMENTO :

Existen diversos métodos para el conteo directo de plaquetas, que van desde su apreciación directa en un extendido de sangre periférica; métodos que utilizan microscopio de contraste de fase, colorantes como el azul de cresilo, hasta modernos contadores automáticos. Cualquier método empleado y realizado correctamente produce resultados satisfactorios.

Técnica de Brecher y Cronkite

Los glóbulos rojos son destruidos mediante una solución de oxalato de amonio al 1%, y posteriormente se hace un conteo plaquetario directo al microscopio de contraste de fases en una cámara de Neubauer de fondo plano.

MATERIAL:

Oxalato de amonio al 1%
Microscopio de contraste de fase
Agitador mecánico
Pipeta de Thoma para glóbulos rojos
Cámara de Neubauer sin espejo
Caja de petri
Papel filtro

METODO:

a) Con una pipeta de Thoma para cuenta de eritrocitos, se toma sangre perfectamente homogenizada con anticoagulante EDTA o directamente por punción capilar, llenando el tallo de la pipeta hasta la marca 1.

b) Con el oxalato de amonio se completa hasta la marca 101.

c) Agitar la pipeta durante 3 minutos en agitador mecánico.

d) Deshechar las primeras 7 gotas y llenar la cámara. Dejarla reposar durante 10 minutos, cubriéndola con la caja petri con papel filtro humedecido en agua, a fin de evitar la evaporación. El conteo debe hacerse con objetivo seco fuerte en la cuadrícula central de la cámara.

Cálculos:

Número de plaquetas contadas x 1000 = número de plaquetas / mm³

INTERPRETACION:

Normal: 150 000 a 450 000 por mm³.

El número de plaquetas se encuentra disminuido en las Trombocitopenias. Se encuentra elevado el número de plaquetas en las trombocitemias hemorrágicas, Enfermedad de Hodgkin, Procesos malignos diseminados, Transtornos inflamatorios , crónicos e infecciosos.

4. RETRACCION DEL COAGULO (102)

PUNDAMENTO:

Este método consiste en la valoración, cualitativa o cuantitativa de la intensidad de retracción del coágulo fibrinoso, después de la coagulación de la sangre en un tubo de vidrio, que dependerá del número y calidad de las plaquetas.

MATERIAL:

Tubos de centrifuga graduados
Tapón de hule con tirabuzón
Tubos para microhematocrito
Material biológico: 5 ml. de sangre.

METODO:

a) Se extraen 5 ml. de sangre por punción venosa y se depositan en el tubo de centrifuga graduado, se tapa con tapón de hule con tirabuzón. Se deja coagular y se mantiene a 37 °C en baño maría por una hora. Después de ése tiempo se saca y se observa el coágulo ya sea firme o gelatinoso, debe desprender una a dos gotas en dos minutos.

b) Se centrifuga a 3000 rpm por 5 min.

c) En el tubo se encuentra suero y glóbulos rojos, se lee el volumen total de suero y se le resta el paquete de glóbulos rojos.

d) Se resta éste resultado al volumen inicial de sangre y se hace la relación: ejemplo:

5 ml. de sangre --- 100 %
3 ml. de suero --- X%

e) A éste resultado se le resta el hematocrito y esto va a dar el porcentaje de retracción.

INTERPRETACION:

Normal: hasta un 25 % de retracción.

Esta prueba es útil en el diagnóstico de Trombocitopenias y en la Enfermedad de Glanzmann, donde se encuentra la retracción deficiente.

5. ADHESIVIDAD PLAQUETARIA (103)

FUNDAMENTO:

La adhesividad plaquetaria se define como la capacidad que tienen las plaquetas de adherirse a superficies extrañas. Cuando el vaso se lesiona, el subendotelio constituye una superficie extraña para las plaquetas las cuales se van adhiriendo progresivamente a él. Esta técnica detecta defectos en la calidad plaquetaria.

MATERIAL:

Cronómetro
Pipeta de Thoma para glóbulos rojos
Lanceta
Oxalato de amonio al 1 %
Torunda con alcohol
Agitador mecánico
Cámara de Neubauer
Caja de Petri
Papel filtro
Microscopio de contraste de fase

METODO:

- a) asear con una torunda alcoholada el pulpejo del dedo o lóbulo de la oreja.
- b) Con la lanceta hacer una punción hasta el tope de su punta.
- c) No hacer presión, la sangre debe escurrir espontáneamente. Cargar la sangre con la pipeta de Thoma igual que para la cuenta de plaquetas, repitiendo la operación cada 30 seg. hasta que la sangre deje de fluir. Se cuentan las plaquetas por el método ya descrito. Suponiendo que se hayan hecho 5 tomas, el cálculo debe ser de la siguiente manera:

1. 230 000
2. 200 000
3. 178 000
4. 177 000
5. 130 000

Sumando el total tendremos: 915 000, que dividido entre el número de cuentas da 183 000. Suponiendo que la cuenta venosa haya sido de 235 000, la cual tomamos como 100 % , Entonces se le resta 183 000, por lo que quedan 52 000 y se efectúa una regla de tres:

235 000	-----	100%
52 000	-----	X%

X = 22, que es el porcentaje de adhesividad.

INTERPRETACION:

Normal: 20 a 40 %

Esta prueba se usa para detectar la Enfermedad de Bernard Soulier, donde hay ausencia de la proteína Ib-IX de la membrana plaquetaria. También es útil en el Síndrome de las plaquetas grises, donde hay la ausencia de los gránulos alfa; en defectos de la calidad plaquetaria inducidos por drogas, o en enfermedades sistémicas como la insuficiencia renal crónica o la cirrosis hepática. En todos los trastornos anteriores, la adhesividad plaquetaria se encuentra deficiente.

6. AGREGACION PLAQUETARIA (104,105)

FUNDAMENTO:

La agregación plaquetaria es la capacidad que tienen las plaquetas de unirse entre sí. Este fenómeno está mediado por el Ca^{2+} , fibrinógeno, fracción von Willebrand del factor VIII y ADP. Y se modula o limita por un equilibrio entre tromboxan A^2 y prostaglandinas.

Puede medirse en el laboratorio a través de dos métodos: con el agregómetro plaquetario que es muy exacto y sensible y que permite incluso graficar el fenómeno. Sin embargo, tal equipo se encuentra en contadas instituciones. Otro método que es menos exacto pero más fácil de realizar, consiste en preparar un plasma rico en plaquetas al cual se agrega un agente que puede ser la epinefrina, la colágena, el ADP o la ristocetina, observando el tiempo que tardan en aparecer grumos de plaquetas.

MATERIAL:

Tubos de 10 x 75 siliconizados
Pipetas terminales de 1.0 ml.
Cronómetro
Adrenalina (10 ug por ml.)

METODO:

Obtener plasma rico en plaquetas (PRP), el cual se prepara centrifugando el tubo con sangre citratada a 1,500 rpm por 5 min, pasando el plasma sobrenadante a un tubo siliconizado. En un tubo de 10 X 75 siliconizado colocar: 0,5 ml. de PRP y 0.2 ml. de adrenalina. En el momento de agregar la adrenalina se echa a andar el cronómetro, se agita el tubo y se empieza a ver la aglutinación macroscópica de las plaquetas, parar el cronómetro. Correr un testigo en las mismas condiciones. La prueba debe efectuarse no más de 30 min. después de extraída la sangre.

INTERPRETACION:

Normal: 18 a 31 segundos.

Esta prueba es útil en alteraciones de la función plaquetaria de tipo congénito, como la trombastenia. Además, también puede verse alterada la agregación plaquetaria por medicamentos, por ejemplo: antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos β -lactámicos, medicamentos cardiovasculares etc.... Además es útil en la diferenciación de tipos de la enfermedad de von Willebrand.

VIII EL LABORATORIO EN LA
HEMOSTASIS SECUNDARIA

1. TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL (107)

FUNDAMENTO:

Esta técnica permite evaluar los factores que intervienen en la vía intrínseca de la primera fase plasmática en forma directa, en presencia de una tromboplastina "parcial" lipídica. En forma indirecta es sensible también a la protrombina y al fibrinógeno.

MATERIAL:

Tromboplastina parcial líquida activada
Cloruro de calcio 0.02 M
Tubos de ensayo de 10 X 75 mm
Pipetas terminales de 1 ml.
Pipetas Pasteur
Baño maría a 37 °C
Cronómetro

METODO:

- a) Tomar 4.5 ml. de sangre venosa con 0.5 ml. de oxalato de calcio 0.1 M
- b) Centrifugar la sangre a 2 000 rpm por 5 min. para separar el plasma.
- c) Colocar en un tubo de 10 X 75 mm, 0.1 ml. de tromboplastina e incubar a 37 °C por 2 min.
- d) A los 2 min. agregar 0.1 ml. de plasma problema, agitar e incubar la muestra durante 2 min.
- e) Agregar 0.1 ml. de cloruro de calcio y simultáneamente echar a andar el cronómetro, a los 20 seg, observar cuidadosamente el tubo haciendo resbalar el contenido por la pared, hasta la aparición de las primeras mallas de fibrina, en ese momento parar el cronómetro.

INTERPRETACION:

Valor normal : 20 a 45 seg.

El Tiempo parcial de tromboplastina (TPT), es más sensible a las alteraciones y deficiencias de la secuencia de activadores de los procoagulantes que ocurren antes de la activación del factor X.

Esta prueba es útil en hemofilias tanto la A como la de tipo B, donde el TPT se encuentra prolongado.

2. TIEMPO DE PROTROMBINA (108,109)

FUNDAMENTO:

Es una prueba que sirve para estimar la concentración de protrombina en la sangre, explora en forma directa a los factores II, V, VII y X, y en forma indirecta también al fibrinógeno. Es una prueba del sistema extrínseco que consiste en la agregación del factor tisular al plasma total y en la medición de la fibrina resultante.

MATERIAL:

Tromboplastina líquida activada
Cloruro de calcio
Tubos de ensayo de 10 X 75 mm
Pipetas terminales de 1 ml
Pipetas Pasteur
Baño maría a 37 ° C
Cronómetro

METODO:

- a) Centrifugar la sangre a 2 000 rpm para separar el plasma.
- b) Sucesivamente poner en un tubo de 10 X 75 en baño maría 0.1 ml. de plasma problema, 0.1 ml. de tromboplastina y 0.1 ml. de cloruro de calcio, la adición de último echa a andar el cronómetro.

Para convertir el tiempo que tarda el plasma en coagular, en porcentaje de actividad de protrombina, se utiliza la tabla que trae el reactivo comercial.

INTERPRETACION:

Valor normal : más del 60 % de actividad.

Esta prueba se altera específicamente con la utilización de cumarínicos, cuando existe daño hepático, en las deficiencias de protrombina, y de los factores V, VII y X. O bien cuando el hepatocito no llega a una concentración adecuada de vitamina K.

En la terapia anticoagulante, la necesidad de una dosis individualizada en cada momento de la terapia, obliga a tener un control más estricto en el tiempo de protrombina. Por ello en 1983, la OMS establece una tromboplastina de referencia para calibrar los distintos reactivos y determina un índice de sensibilidad internacional (ISI) y se calcula como sigue:

$$\text{ISI} = \frac{\text{TP del paciente}}{\text{TP del control}}$$

Cuanto más cercano a 1 es el ISI, más sensible es la tromboplastina al descenso factorial. Así para dar el resultado se utiliza el INR (razón internacional normalizada).

3. TIEMPO DE TROMBINA (110)

FUNDAMENTO:

Esta prueba permite explorar en forma directa las diferencias en calidad o en cantidad de fibrinógeno y en forma indirecta puede valorar al mecanismo de fibrinólisis, ya que los productos de degradación del sistema fibrinógeno-fibrina principalmente el Y y el X son antitrombínicos.

MATERIAL:

tubos de ensaye de 10 X 75 mm
Pipetas terminales de 1 ml.
Pipetas pasteur
Cronómetro
Trombina humana
Solución salina al 0.85 %
Material biológico: 4.5 ml. de sangre venosa con 0.5 ml. de oxalato de sodio 0.1 M

METODO:

- a) Centrifugar la sangre a 2000 rpm por 5 minutos para separar el plasma.
- b) Diluir una ampolleta de trombina 1:10 con solución salina de tal manera que con un plasma normal nos de un tiempo de 18 segundos.
- c) Poner en un tubo 0.2 ml. de plasma y agregar 0.2 ml. de la trombina diluida y hechar a andar el cronómetro al mismo tiempo.
- d) Al momento de agregar la trombina, empezar a agitar el tubo suavemente y observar la aparición de fibrina.
- e) En ese momento se para el cronómetro y se deja reposar el tubo por un minuto, al cabo del cual se observa la integridad del coágulo.

INTERPRETACION:

Valor normal: 18-23 segundos.

La prolongación del tiempo de trombina se presenta cuando hay una deficiencia de fibrinógeno o un inhibidor de la reacción trombina-fibrinógeno (heparina, antitrombinas, productos de fibrinogenólisis). Algunos ejemplos de patologías donde se encuentra elevado este tiempo son: Coagulación intravascular diseminada, Enfermedad hepática, donde hay una fibrinólisis aumentada o bien una disfibrinogenemia.

4. CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO (111,112)

FUNDAMENTO:

El fibrinógeno contiene 8.547 % de tirosina. La reacción de color empleada en la determinación de fibrinógeno, es debida a la fracción de tirosina que contiene. El patrón se prepara a partir de la tirosina pura, donde 1 mg de tirosina equivale a 11.7 mg de fibrinógeno.

Debido a su abundancia en el plasma, el fibrinógeno se cuantifica en miligramos por decilitro.

MATERIAL:

Material Biológico

4.5 ml. de sangre venosa con 0.5 ml. de oxalato de sodio 0.1 M, mezclar por inversiones repetidas. Centrifugar por 5 min a 2 000 rpm y separar el plasma.

Reactivos

Sol. de cloruro de sodio 0.85 %

Sol. de hidróxido de sodio al 10 %

Sol. de carbonato de sodio al 20 %

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Sol. de trombina

Sol. de cloruro de calcio 0.02 M

METODO:

1) Colocar 0.5 ml. (vol. aproximado) de vidrio molido en un tubo de 15 X 125 mm.

2) Agregar 10 ml. de solución salina al 0.85 %

3) Agregar 0.05 ml. de solución de trombina y 1.5 ml. de cloruro de calcio.

4) Agregar 0.5 ml. de plasma problema

5) Agitar el tubo en diferentes sentidos de modo que

las bandas de fibrina que se formen se adhieran a las películas de vidrio (aprox. 15 min.)

- 6) Centrifugar el tubo a 2 000 rpm por 5 min.
- 7) Decantar el líquido sobrenadante
- 8) Agregar 10 ml de solución salina
- 9) Exprimir cuidadosamente el coágulo contra la pared del tubo con ayuda de un agitador.
- 10) Centrifugar nuevamente el tubo a 2 000 rpm por 5 min.
- 11) Decantar el líquido sobrenadante
- 12) Repetir los pasos 8,9,10 y 11 dos veces más.
- 13) Agregar al tubo 1 ml. de solución de hidróxido de sodio al 10 %
- 14) Poner en ebullición durante 10 min.
- 15) Enfriar al chorro de la llave
- 16) Agregar 7 ml. de agua destilada y agitar
- 17) Agregar 3 ml. de la solución de carbonato de sodio y agitar
- 18) Agregar 1 ml. de reactivo de Folin-Ciocalteu, y agitar.
- 19) Dejar en reposo durante 10 min para que se desarrolle el color de la reacción. Centrifugar para que se sedimente el vidrio molido
- 20) Colocar 2 ml. del sobrenadante colorido en un tubo de 15 X 125 mm.
- 21) Agregar 6 ml. de agua destilada
- 22) Leer a una longitud de onda de 650 nm. contra un blanco de reactivo.
- 23) Se obtiene la concentración en mg/dl a partir de la curva de calibración.

CURVA DE CALIBRACION PARA FIBRINOGENO

Se prepara una solución madre de tirosina, pesando cuidadosamente 20 mg , en un matraz volumétrico de 100 ml. (ésta solución debe prepararse cada tres meses). Se agrega un poco de solución de ácido clorhídrico 0.1 N (1 parte de ácido clorhídrico 0.2 N y 1 parte de agua destilada), para disolver y se afora con ácido clorhídrico 0.1 N, se mezcla. Esta solución madre contiene 0.2 mg de tirosina por ml , que equivale a 2.34 mg de fibrinógeno por ml.

Se toman 5 tubos de 20 X 175 y se marca del 1 al 5. Se pipetea en ellos los reactivos en la forma que señala el cuadro :

tubos	1	2	3	4	5
Sol.madre de tirosina	1.5	1.0	0.5	0.2	-
Hidróxido de sodio	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agua destilada	5.5	6.0	6.5	6.8	7.0

mezclar y poner a ebullición por 10 min.

Carbonato de sodio	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Folin-Ciocalteau	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

mezclar y dejar en reposo 10 min. a temperatura ambiente.

Después de esto, se toman 5 celdillas numeradas del 1 al 5. En la celdilla 5 se vierte el contenido del tubo 5 y en cada una de las otras cuatro se pipetea 2 ml. del contenido del tubo correspondiente y 6 ml. de agua destilada, mezclar por inversión.

Se lee a 650 nm, llevando a 100 % de T con la celdilla 5. Se grafica en una papel semilogaritmico poniendo en las abscisas las concentraciones de fibrinógeno en mg/dl.

Estas concentraciones son las siguientes:

Tubo 1 : 702.0 mg
Tubo 2 : 468.0 mg
Tubo 3 : 234.0 mg
Tubo 4 : 93.6 mg

A partir de la curva resultante, se construye una tabla con las lecturas y las concentraciones de fibrinógeno que corresponden a cada una.

INTERPRETACION:

Valor Normal: 200 a 400 mg/dl

La cuantificación del fibrinógeno tiene gran relevancia en los padecimientos como CID (Coagulación intravascular diseminada) y en FAP (Fibrinólisis anormal , donde el fibrinógeno se encuentra disminuido.

Se ha encontrado que el aumento en la concentración en plasma de fibrinógeno es un factor de alto riesgo para el desarrollo de desordenes tromboticos arteriales, infarto al miocardio, angina de pecho. (113)

5. BUSQUEDA DE INHIBIDORES (114,115)

FUNDAMENTO:

El alargamiento en cualquiera de los tiempos plasmáticos nos debe plantear la pregunta de si se trata de la deficiencia de uno o más factores, para lo cual es sensible ese ensayo o de si se trata de un inhibidor, que puede ser la presencia de un anticoagulante o un anticuerpo.

MATERIAL:

Plasma problema (citratado u oxalatado)
Plasma testigo (citratado u oxalatado)
Cloruro de calcio 0.02 M
Reactivo para TTP, TP o TT según el caso.

METODO:

Tubo	1	2	3	4	5
Plasma P	0.0	0.1	0.2	0.5	1.0
Plasma T	1.0	0.9	0.8	0.5	0.0

A cada una de las mezclas se le realiza el tiempo plasmático que previamente salió prolongado.

INTERPRETACION:

En caso de deficiencia, conforme se incrementa la cantidad de plasma testigo se obtendrá corrección del tiempo, en caso de no obtenerse corrección se deberá sospechar fuertemente de la presencia de un inhibidor.

La realización de ésta prueba es muy importante si se sospecha de un inhibidor, como en las hemofilias graves A y B. El inhibidor dirigido al factor VIII, se encuentra en trastornos autoinmunes como lupus eritematoso generalizado, padecimientos linfoproliferativos, reacciones a medicamentos etc...

6. GENERACION DE TROMBOPLASTINA (106)

FUNDAMENTO:

Para ésta prueba se fracciona la sangre en tres partes que son: plaquetas, plasma adsorbido y suero. Cada una de ellas contiene diferentes factores. En caso de que la generación del problema sea anormal es posible sustituir consecutivamente cada una de las fracciones por fracciones normales y determinar de esa manera en cual de ellas esta la anormalidad y por lo tanto cual es el factor deficiente.

La tromboplastina se genera incubando las 3 fracciones del problema en presencia de cloruro de calcio. Su potencia se mide tomando alícuotas seriadas y vertiéndolas sobre un sustrato (plasma pobre en plaquetas), anotando el tiempo que tarda en coagular.

PREPARACION DE LAS FRACCIONES

PLAQUETAS

Todo el material que intervenga en la preparación de las plaquetas debe ser siliconizado.

Se obtienen 9 ml. de sangre venosa con jeringa de plástico y se invierten en un tubo de centrifuga (de plástico) que contenga 1 ml. de citrato de sodio al 3.8 % , se mezclan por inversión.

Se centrifuga a 1000 rpm por 10 min. y se separa el plasma.

Se centrifuga nuevamente, esta vez a 3000 rpm por 15 min. y se separa el plasma sobrenadante en un tubo y se marca con la palabra sustrato. Este se guarda en el refrigerador y no se saca hasta el momento en que se vaya a usar.

En el fondo del tubo centrifugado a 3000 rpm 15 min. quedan las plaquetas que deben ser lavadas 3 veces con solución salina, centrifugando a 3000 rpm en cada ocasión. Es conveniente romper los grumos de plaquetas con un aplicador de madera a fin de que se laven bien.

Después del tercer lavado, se resuspenden las plaquetas en un volumen de solución salina isotónica de cloruro de sodio igual a un tercio del volumen original del plasma.

SUERO

Se ponen 3 ml. de sangre en un tubo de hemólisis que tenga en el fondo 3 perlitas de vidrio y se deja coagular, incubándose a continuación a 37 grados por 2 horas en baño maría. Terminando la incubación se centrifuga por 5 min. a 3000 rpm. Se separa el suero y se diluye este con solución salina 1:10

PLASMA

Se mezclan 4.5 ml. de sangre venosa y 0.5 ml. de oxalato de sodio 0.1 M. Se separa el plasma centrifugado 1000 rpm por 10 min. y se procede a su adsorción de la siguiente manera:

1. Se mezcla el plasma con sulfato de bario en proporción de 1000 mg. de éste por cada ml. de plasma.
2. Se incuba a 37 °C por 15 min. teniendo cuidado de agitar cada 5 min.
3. Se centrifuga por 5 min. a 3000 rpm y se separa el plasma sobrenadante.
4. Se guarda el plasma en el refrigerador y se

diluye 1:5 con solución salina en el momento que se va a usar.

Una vez preparadas las tres fracciones (tanto la del paciente, como la de un testigo normal) se procede a la realización de la prueba.

METODO

En un tubo puesto en baño maría se hace la mezcla incubadora, que consiste en la adición sucesiva de lo siguiente:

- 0.3 ml. de plaquetas
- 0.3 ml. de plasma adsorbido
- 0.3 ml. de suero
- 1.5 ml. de calcio 0.02 M

A partir de que se añade el calcio se empieza a medir el tiempo en un reloj de intervalos. A los 4 min. se toman 0.4 ml. de la mezcla y se pasan rápidamente a un tubo que contiene 0.1 ml. de sustrato (incubado previamente 1min.) se mezcla agitando 2 ó 3 veces. Se mide el tiempo que tarda en coagular el sustrato a partir del momento en que se le añadió la alícuota de la mezcla incubadora. Este paso se repite cada min. hasta el minuto 7. La prueba puede suspenderse en el momento en que el problema de un tiempo de coagulación igual al normal. A los 4 min. el tiempo de coagulación debe ser alrededor de 10 a 12 min. Si los resultados son anormales, se procede a hacer nuevas muestras incubadoras sustituyendo cada una de las fracciones hasta obtener una generación de tromboplastina normal.

INTERPRETACION

Normal: El tiempo de generación de tromboplastina debe ser igual al del testigo o con una diferencia de no más de 2 segundos.

7. CONSUMO DE PROTROMBINA (106)

FUNDAMENTO:

Por medio de ésta prueba se mide la protrombina residual del suero, después de la coagulación de la sangre. Normalmente casi toda la protrombina es transformada a trombina durante el proceso de coagulación, cuando hay anormalidades en la conversión de protrombina a trombina, debida a insuficiente generación de tromboplastina queda gran cantidad de protrombina en el suero. Si no hay plaquetas o sus fosfolípidos son deficientes no se activará correctamente la primera fase y no se convertirá la mayoría de la protrombina a trombina, por lo tanto ésta prueba es sensible a los factores que participán en la vía intrínseca y a la cantidad y calidad de las plaquetas.

MATERIAL:

Tubos de hemólisis de 10 x 75 mm
Baño maría a 37 ° C
Cronómetro
Cloruro de calcio 0.02 M
Citrato de sodio 0.02 M
Tromboplastina líquida activada
Plasma adsorto
Pipetas terminales de 1 ml.
Pipetas Pasteur

METODO:

- a) Se toman 2 ml. de sangre venosa y se dejan coagular en un tubo de hemólisis.
- b) Una vez coagulada la sangre se incuba por una hora a 37°C.
- c) Se separa el suero centrifugando el tubo a 2000 rpm por 5 minutos.

d) Se añade 0.1 ml. de citrato de sodio 0.02 M al suero y se incuba por 10 min. a 37 °C.

En un tubo de hemólisis colocado en baño maría se añaden los siguientes reactivos en forma sucesiva:

0.1 ml. de plasma normal adsorbido con sulfato de bario.

0.1 ml. de cloruro de calcio 0.02 M

0.1 ml. de tromboplastina líquida activada (previamente incubada).

0.1 ml. de suero problema.

El tiempo comienza a contarse desde el momento que se añade el suero a la mezcla y el punto final lo da la aparición del coágulo.

INTERPRETACION:

Los valores normales son tiempos de más de 20 seg. que indica que el suero contiene 30 % o menos de protrombina y que, durante la coagulación se consumió un 70% o más de dicho factor.

Esta prueba es útil para determinar deficiencias de fosfolípidos plaquetarios, en trombocitopenias, en la Hemofilia, Enfermedad de von Willebrand, deficiencias de factores que dependen de la vitamina K, y del síndrome de desfibrinación, entre otros.

IX EL LABORATORIO EN LA
FIBRINOLISIS

1. LISIS DE EUGLOBULINAS (116)

FUNDAMENTO:

En la fracción euglobulina del plasma, se encuentra el fibrinógeno, así como sus productos finales que son la fibrina y la plasmina. Esta técnica suprime la antifibrinolisis y desmascara la actividad fibrinolítica. Si el paciente cursa con un componente fibrinolítico, los activadores presentes en dicha reacción transformarán el plasminógeno en plasmina y esta última efectuará una digestión enzimática sobre la fibrina formada por esta técnica.

MATERIAL:

Matraces Erlenmeyer de 50 ml.
Tubos de ensayo de 13 X 100
Pipetas terminales de 1.0, 5.0 y 10 ml.
hisopos
Cloruro de calcio 0.05 M
Acido acético al 1%
Buffer de veronal pH 7.4

Material biológico:

4.5 ml. de sangre venosa + 0.5 ml. de citrato de sodio
al 3.8 %

METODO:

- a) En un matraz de 50 ml. colocar:
 - 19 ml. de agua destilada
 - 1.0 ml. de plasma
 - 0.35 ml. de ácido acético al 1 % (gota a gota y agitando)
- Reposar a 4 °C durante 10 min.
- b) Agitar y repartir en 4 tubos a partes iguales
- c) Centrifugar a 3,500 rpm por 5 min.
- d) Tirar el sobrenadante y secar

e) Redisolver con 1.0 ml. de buffer pH 7.4 y ponerlo en baño maría a 37 °C

f) Coagular con 2 gotas de cloruro de calcio (debe coagular en un lapso de 1-2 min.)

g) Buscar la lisis del coágulo en las primeras dos horas .

INTERPRETACION:

Normal: El coágulo debe permanecer firme a las 2 horas de incubación.

Este ensayo tiene gran importancia en el diagnóstico de la coagulación intravascular diseminada (CID), donde la lisis se encuentra aumentada.

2. PRUEBA DE ETANOL (117)

FUNDAMENTO:

Esta prueba es sensible a la presencia de monómeros de fibrina, pero también lo es a productos de degradación del fibrinógeno, por lo que en forma aislada podría confundir el diagnóstico.

MATERIAL:

Tubos de ensaye de 10 X 75
Pipetas terminales de 1.0 ml.
Baño maría
Baño de hielo

METODO:

Se utiliza plasma pobre en plaquetas, citratado, se recoge la muestra con un mínimo de estasis, a partir de la vena antecubital mediante aguja desechable No. 18. No se utilizarán muestras obtenidas por punción defectuosa. El plasma debe obtenerse por centrifugación a 3 000 rpm durante 30 min. El plasma así obtenido se pasa a un baño de hielo, y la prueba deberá efectuarse no más de 2 horas después de obtenida la muestra.

En un tubo de vidrio de 10 X 75 se depositan 0.5 ml. de plasma y se incuba 3 min. a 20 °C. Se añaden 0.15 ml. de una solución de etanol al 50 % en agua destilada, se agita el tubo y se deja en reposo por 10 min. Después de ese tiempo se inclina el tubo hasta la posición horizontal y se observa.

INTERPRETACION:

Normal: plasmas que no contienen gránulos y no hay gelificación.

Los plasmas que tienen gránulos y gelifican son etanol positivo.

La prueba de etanol es de gran ayuda en el diagnóstico de Coagulación intravascular diseminada y puede dar el diagnóstico diferencial entre esta entidad y la fibrinólisis anormal primaria (FAP) , donde el etanol es negativo.

3. PRUEBA DE SULFATO DE PROTAMINA (118)

FUNDAMENTO:

El sulfato de protamina tiene la propiedad de precipitar a los monómeros de fibrina.

MATERIAL:

Tubos de ensaye 10 X 75

Protamina pH 6.5

Buffer de tris pH 6.5

METODO:

Efectuar diluciones de sulfato de protamina con buffer de tris 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40, colocar en tubos de 10 X 75 o.2 ml. de cada una de las diluciones.

Se obtiene plasma pobre en plaquetas del problema, se coloca en un tubo limpio y se incuba 5 min a 37 °C, después de los cuales se colocan 0.2 ml. de este problema a cada uno de los tubos que contienen las diluciones de sulfato de protamina.

Se tapan los tubos y se colocan a 37 °C durante 30 min. Después se agitan suavemente para leerlos de la siguiente manera:

- g = gelación
- rf = red de fibrina
- + - = precipitado fino
- + = precipitado grueso
- = solución clara

INTERPRETACION:

Normal: solución clara.

La prueba de sulfato de protamina tiene importancia en transtornos tales como CID, FAP y en hepatopatías, donde se encuentra alterado.

X. PREPARACION DE REACTIVOS

Para la obtención de resultados de calidad en nuestro laboratorio se requiere de una óptima preparación de reactivos, anticoagulantes y Buffers. Estableciendo así para cada laboratorio sus rangos normales e intervalos de referencia. Otro punto importante es el establecimiento de un programa de control de calidad contando con plasmas controles, con los cuales se puede monitorear a reactivos, instrumentos, pipetas, etc...

La información que a continuación se presenta fue tomada del libro " El laboratorio en el Diagnóstico Hematológico" Cartwright G. (119)

1. ANTICOAGULANTES

Citrato de sodio al 3.8 %

Pesar 3.8 gr de citrato de sodio y llevar a 100 ml. con agua destilada.

Oxalato de sodio 0.1 M

Pesar exactamente 13.4 gr de oxalato de sodio y llevar a 1000 ml. con agua destilada.

Etilen diamino tetraacético (EDTA) al 10 %

Se pesan 10 gr de sal disódica de EDTA y llevar a 100 ml. con agua destilada.

Preparación del diluyente de plaquetas.

Oxalato de amonio al 1 %

Pesar 1 gr. de oxalato de amonio y llevar a 100 ml. con agua destilada.

Cloruro de calcio 0.02 M

Pesar cloruro de calcio anhidro 1.11 gr y llevar a 500 ml. con agua destilada.

2. PREPARACION DE BUFFERS

Buffer de Veronal pH 7.4

Primero preparar una solución A

Veronal sódico	7.36 gr
Acetato de sodio	4.86 gr
Agua destilada	250 ml.

Para la solución buffer:

Solución A	250 ml.
Sol. de cloruro de sodio al 4.25 %	200 ml.
Solución de HCl 0.1 N	217 ml.
Agua destilada	683 ml.

Buffer de tris

Pesar 1.5142 de hidroximetil-amino-metano, y llevar a 250 ml. con solución salina, ajustando el pH a 6.5

Plasma adsorto

Se mezclan 4.5 ml. de sangre venosa y 0.5 ml. de oxalato de sodio 0.1 M. Se separa el plasma centrifugando a 1500 rpm por 10 min y se procede a su adsorción de la siguiente manera:

1. Se mezcla el plasma con sulfato de bario en proporción de 100 mg de éste por cada ml. de plasma.
2. Se incuba a 37 °C por 15 min agitando cada 5 min.
3. Se centrifuga por 15 min a 3000 rpm y se separa el plasma sobrenadante.
4. Se guarda el plasma en el refrigerador y se diluye 1:5 con solución salina en el momento que se va a usar.

XI . RESUMEN

Por lo que se ha presentado en este trabajo, el mecanismo normal de la hemostasis constituye un delicado equilibrio entre elementos celulares y factores plasmáticos procoagulantes, con sus correspondientes antagonistas naturales.

Este equilibrio dinámico puede perturbarse en cualquiera de sus partes y componentes por infinidad de situaciones adquiridas o desde su inicio por algunas condiciones congénitas y/o heredadas.

Estas alteraciones, en su mayoría se expresarán desde el punto de vista del laboratorio como hipocoagulabilidad y desde el punto de vista clínico como hemorragias, sin embargo, en algunos casos el defecto en el mecanismo de la hemostasis producirá estados de hipercoagulabilidad, cuya expresión clínica la trombosis y el tromboembolismo.

La forma de expresión clínica y su inicio en la edad de la vida, permiten sospechar fuertemente la enfermedad heredada o adquirida de este sistema hemostático, no obstante, en la mayoría de los casos solo el laboratorio, permitirá conocer la naturaleza exacta y la severidad del defecto.

Considero que los objetivos propuestos se cumplieron, ya que se detalló la teoría del mecanismo normal de la hemostasis desde sus inicios, hasta nuestros días, encontrándose nuevos cofactores, activadores e inhibidores, que nos abren más el panorama del mecanismo por el cual es reparada una lesión.

En lo que respecta a la parte de laboratorio, se establecieron pruebas básicas, que como lo mencioné en los objetivos fueran de gran accesibilidad para ser montadas por cualquier laboratorio que no cuente con la infraestructura adecuada. Si bien es cierto que actualmente se realizan ensayos para determinación de factores de coagulación, enzimas, activadores, inhibidores etc... utilizando sustaratos cromogénicos, en aparatos automatizados, también es cierto que con las pruebas de coagulación que presento se puede auxiliar en el diagnóstico del paciente.

Me permito darles algunas sugerencias para el buen desarrollo de las técnicas de coagulación: Un control de calidad que abarque desde la toma de muestra, transporte, procesamiento de la muestra. Control de reactivos, material de cristalería, control de temperatura e incluir controles normales y anormales comerciales o en su defecto, utilizar un "pool" de 10 plasmas de varones, que no hayan utilizado medicamento en los diez días previos, ya que esto altera las pruebas. Además de incorporarse a un control de calidad externo, para comparar la calidad de nuestros estudios.

Finalmente, considero que debe haber un mayor acercamiento entre el médico tratante y el químico, esto redundará en beneficio del paciente.

XII GLOSARIO

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Acción . Toda función o movimiento de una parte, de un órgano o de todo el cuerpo.

Acidez . Calidad de ácido o agrio; exceso de un ácido.

Activador . Sustancia que hace más activa a otra o que hace posible la obra de un fenómeno, especialmente la inorgánica que se combina con una enzima inactiva y la hace capaz de realizar su acción propia.

Acuoso . Que contiene mucha agua o está formado por éste líquido.

Adenilo. Radical contenido en la adenina.

Adherencia . Unión anormal de partes que deben estar separadas.

Adsorción . Fenómeno por el cual una sustancia primitivamente disuelta en un líquido se fija sobre un sólido o sobre partículas de un coloide en suspensión.

Afibrinogenemia . Ausencia, genética o adquirida de fibrinógeno con un cuadro clínico de diátesis hemorrágica de tipo hemofílico, hemorragias digestivas y epixtasis.

Afinidad . Atracción química, fuerza por la cual un cuerpo se une perfectamente a otro.

Aglutinación . Acción de una sustancia aglutinante. Fenómeno que consiste en la colección en masas de células o bacterias distribuidas en un líquido. Se cree producido por sustancias específicas llamadas aglutininas, cuyas moléculas se unen a las células.

Agregación . Acción y efecto de agregar y agregarse.

Alcali . Nombre genérico de los compuestos que forman sales con los ácidos y devuelven el color azul al tornasol enrojecido por los ácidos. son hidróxidos de los metales alcalinos, sodi, potasio, litio, cesio y rubidio.

Amino . Prefijo que indica que la sustancia representada por la última parte del nombre está modificada por la sustitución de un átomo de H por el radical NH^2

AMP . Monofosfato de adenosina. Acido adenilico. De enorme importancia biológica, ya que acepta un segundo radical fosfórico para transformarse en ADP, y un tercero formando ATP, el combustible por excelencia de todos los tejidos.

Anticuerpo . Sustancia específica de la sangre y líquidos de los animales inmunes producida como reacción a la introducción de un antígeno y que ejerce una acción antagónica específica sobre la sustancia, para cuya influencia se ha formado. Es el agente de la inmunidad adquirida.

Balanza . Instrumento que sirve para pesar.

Bloqueo . Interrupción de la conductividad en una vía nerviosa.

Caliceína . Sustancia hipotensora causante del colapso en las pancreatitis agudas hemorrágicas. En estado normal se halla unida de modo reversible a un inactivador específico constituyendo el conjunto caliceínógeno.

Canalículo . Cada uno de los pequeños conductos que se forman en los tejidos en reparación para la circulación de los líquidos nutritivos.

Caolín . Arcilla blanca fina, silicato de albúmina hidratado, usada en las enfermedades de la piel y del estómago.

Capilar . Relativo o semejante a un cabello. Cualquiera de los diminutos vasos que conexionan las arteriolas con las vénulas y forman una red casi en todas las partes del cuerpo. Las paredes de los capilares están formadas por una simple capa de células endoteliales.

Célula . Elemento fundamental de los tejidos organizados o elemento más simple libre, dotado de vida propia, compuesto de una masa protoplasmática circunscrita que contiene un núcleo.

Centrifugación . Aplicación de la fuerza centrifuga con objeto de separar los corpúsculos sólidos suspendidos en un líquido. Se emplea generalmente para precipitar los elementos celulares contenidos en un líquido normal o patológico.

Citoplasma . Protoplasma de la célula con exclusión del plasma nuclear.

Coagulación . Proceso de formación de un coágulo. Conversión de un líquido en una masa blanca por el hecho de modificaciones isómericas sin alteración en la cantidad de agua contenida.

Coenzima . Sustancia termolábil que, unida a la apoenzima, excita la actividad de los fermentos y de los que puede separarse por diálisis.

Colágeno . Principal constituyente orgánico del tejido conjuntivo y de la sustancia orgánica de los huesos y cartílagos por el calor se convierte en gelatina.

Contractilidad . Capacidad de contraerse; propiedad elemental caracterizada por el hecho de que el elemento anatómico que de ella goza se acorta en un sentido y aumenta proporcionalmente de grosor en otro.

Cromógeno . Principio o sustancia que puede dar origen a una materia colorante, aunque él mismo sea incoloro.

Degradación . Reducción de un compuesto químico en otro menos complejo.

Deshidrogenasa . Enzima que oxida indirectamente por transferencia del hidrógeno. Se designan según su actividad específica o considerando el sustrato sobre el cual actúan.

Dímero . Formado de dos partes.

Endotelio . Delgada membrana compuesta de un solo estrato de células planas, poligonales, que constituye la superficie libre de las membranas serosas y sinoviales y la túnica interna de los vasos.

Enzima . Complejos orgánicos que catalizan las reacciones bioquímicas. Están compuestos por grupos prostéticos o coenzimas que tiene especificidad funcional y un grupo proteico o apoenzima, con especificidad de sustrato.

Epitelio . Capa celular que cubre todas las superficies externas e internas del cuerpo y se caracteriza principalmente

principalmente por estar formada de células de forma y disposición variables, sin sustancia intercelular, ni vasos.

Esfigmomanómetro . Instrumento para medir la tensión arterial.

Fibrina . Sustancia albuminoidea, proteína de la sangre y los líquidos serosos del cuerpo. La fibrina no existe en la sangre circulante, sino que se forma del fibrinógeno por la acción de la trombina.

Fibrinólisis . Disolución de la fibrina por la acción de enzimas.

Flagelo . Prolongación celular filiforme móvil, semejante a un látigo, que poseen ciertos protozoos como órgano de locomoción.

Globulina . Miembro de una clase de proteínas que se caracterizan por ser insolubles en agua pura, pero que son solubles en soluciones diluidas de cloruro de sodio. Las globulinas son coagulables por el calor y comprenden la globulina del suero, paraglobulina, seroglobulina, mioglobulina, miosina, mioglobulina y fibrinógeno.

Glucoproteína . Proteínas compuestas, que se conocen también con el nombre de mucoproteidos, cuyo grupo prostético está formado por un complejo hidrocarbonado.

Hematocrito . Aparato centrifugador que permite la separación de los glóbulos y plasma sanguíneo. La cantidad y proporción relativa de ambos constituye el índice o valor hematocrito que, normalmente, es de 45 % de glóbulos.

Hemólisis . Desintegración o disolución de los corpúsculo sanguíneos, especialmente de los hematies, con liberación consiguiente de la hemoglobina por la acción de lisisnas específicas o hemolisinas.

Hemostasis . Detención espontánea o artificial, de un flujo sanguíneo o hemorragia.

Homogenizar . Hacer homogénea una mezcla de substancias por medios mecánicos y fisicoquímicos.

Incubación . Mantenimiento en una estufa apropiada la temperatura constante y favorable .

Inhibición . Restricción o detención de la función de un órgano, o un proceso cualquiera.

Lábil . Deslizable; que se mueve facilmente de un punto as otro. Inestable.

Lesión . Daño o alteración, orgánica o funcional de los tejidos. Vascular. La que afecta a los vasos sanguíneos.

Leucocito . Glóbulos blancos de la sangre formados en las porciones linfoideas, mielopoyéticas, y reticular del sistema reticuloendotelial.

Linfático . Relativo a la linfa o que la contiene.

Lisis . Disolución o destrucción de células o bacterias por las lisisnas.

Médula . Porción central de un órgano en distinción de la corteza. Sustancia blanda en el interior de los huesos.

Membrana . Organó o capa delgada de tejido de funciones diversas.

Metabolismo . Conjunto de transformaciones físicas y químicas y biológicas que los organismos vivos experimentan las sustancias introducidas o las que en ellos se forman.

Mezcla . Reunión de sustancias en la que cada una conserva las propiedades que la caracterizan.

Molaridad . Número de moles de un soluto por litro de disolución.

Monómero . Relativo o que afecta a un solo segmento; compuesto de un solo segmento .

Núcleo . Corpúsculo, generalmente redondeado, de bordes definidos y rodeados de protoplasma, que constituye la parte esencial de la célula.

Oclusión . Obliteración, cierre.

Patología . Rama de la medicina que estudia las enfermedades y los trastornos que se producen en el organismo.

Plasmina . Fermento proteolítico parecido a la tripsina. Es producido por la activación de la profibrinolisisina y puede activar a la protrombina, en ausencia de calcio y disolver el fibrinógeno o la fibrina.

Plasma . Sustancia orgánica fundamental de las células y tejidos. Parte líquida de la sangre en la que están suspendidos los elementos figurados.

Precipitado . Depósito o suspensión de un cuerpo obtenido por precipitación.

Proteína . Miembro de un grupo de compuestos nitrogenados, no cristalizables, semejantes entre sí, que forman los constituyentes característicos de los tejidos y líquidos orgánicos.

Sangre . líquido rojo , espeso circulante por el sistema vascular sanguíneo, formado de un plasma, incoloro líquido, compuesto de suero y fibrinógeno, y de elementos sólidos en suspensión: eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Tejido . Agrupación de células, fibras y productos celulares varios que forman un conjunto estructural .

Tisular . Galicismo por hístico o histológico.

Torniquete. Instrumento de formas diversas para detener el curso de la circulación en un vaso sanguíneo y de éste modo evitar la hemorragia en una operación o en una herida.

Trombo . Coágulo sanguíneo en el interior de un vaso que permanece en el punto de formación.

Trombosis . Proceso de formación y desarrollo de un trombo.

Vena . Vaso sanguíneo que conduce la sangre desde los capilares al corazón.

Volumen . Espacio que ocupa un cuerpo. Corpulencia o masa de un cuerpo.

Tomado del Diccionario Enciclopédico University de términos médicos. inglés-español. Ed. Iberoamericana.

XIII. REFERENCIAS

1. Owen CH.HP. Smith Award Lecture: H.P. Smith' s place in the history of blood coagulation. 1984;81:424.
2. Triplett D.A. Simposium of coagulation. Clinics in laboratory Medicine. 1984;4:207.
3. Rosemary Coagulación sanguínea. Hemostasis y trombosis. Ed. Limusa. 1980.
4. Soriano G.M. Structure of Ca protrombin fragment including the conformation of the Gla domain. Biochemistry. 1989;28:6805.
5. Nemerson Y. Tissue Factor and hemostasis. Blood. 1988;71:1
6. Zaverio M. von Willebrand Factor and von Willebrand Disease Blood. 1991;78:1637.
7. Stenflo G. Structure-function relationships of epidermal growth factor modules in vitamina K-dependent clotting factors. Blood. 1991;78:1637.
8. Erban S.B. Routine use of the prothombin and partial thromboplastin times. JAMA. 1989;262:2428.
9. Nariani G. Factor VII congenital deficiency haemostasis. 1983;13:169.

10. Mertens K.B. Activation of human coagulation factor VIII by activated factor X, the common product of the intrinsic and extrinsic pathway of blood coagulation. *Thromb. Haemost.* 1982;47:96.
11. Mertens K.B. Pathways in the activation of human coagulation factor X. *Biochem. J.* 1980;185:647.
12. Furie B. the molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 1988;33:505.
13. MacFarlane R.G. An enzyme cascada in the blood clotting mechanism and its function as a biological amplifier. *Nature.* 1964;202:498.
14. Seegers W.H. Relationship of "new" vitamin K dependent protein C and "old" autoprothombin IIa. *Thromb. Res.* 1976;8:543.
15. Lenahan j.G. Hemostasis. 18th Edition, 1986.
16. Mielke C.H. Mechanisms of Hemostasis and Thrombosis. Simposia Specialists Inc. Miami, Florida. 1978.
17. Wu K.K. Endothelial cells in hemostasis, Thombosis, and inflammation. *Hosp. Pract.* 1992;27:124.
18. Roth G.J. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glicoprotein Ib, and Leucine-rich glycoproteins. *Blood* 1991;77:5.
19. Lerman A. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clin. Proc.* 1990;65:1441.

20. Yang Z. Different interactions of platelets with arterial and venous coronary bypass vessels. *Lancet*. 1991;337:939.
21. Rapaport. Regulation of the tissue factor pathway. Progress in vascular Biology, hemostasis and thrombosis. Ed New York Academy of Sciences. 1991:51.
22. Bennett J.S. Mechanisms of platelet adhesion and aggregation an update. *Hosp. Pract.* 1992;27:124.
23. Vicente V. Syndrome de Bernard-Soulier. *Sangre*. 1992;37:185.
24. Levin J. An overview of megakaryocytopoiesis *Molecular Biology and Differentiation of Megakaryocytes*. Wiley-Liss, Inc, New York. 1990:217.
25. Han Z.C. New insights into the regulation of megakaryocytopoiesis by haematopoietic and fibroblastic growth factors and transforming growth factors and transforming growth factor beta-1. *Br. J. Haematol.* 1992;81:1.
26. Hoffman R. Regulation of human megakaryocytopoiesis by interacting cytokines. *Molecular Biology and Differentiation of Megakaryocytes*. Wiley-Liss, Inc, New York. 1990:199.
27. Flier J.S. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl. J. Med.* 1992;326:800.
28. Booth W.J. The interaction of von Willebrand factor and the platelet glycoprotein Ib/IX complex. *Platelets*. 1990;1:169.
29. Vicente V. Identification of a site in the alpha-chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding. *J. Biol. Chem.* 1990;265:274.

30. Ruggeri Z.M. The platelet glycoprotein Ib/IX complex. *Prog Haemostas.* 1990;13:145.
31. De Marco L. Variant Bernard-Soulier syndrome type Bolsano: a congenital bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib/IX complex. *J.Clin Invest.* 1990;86:25.
32. Yamamoto N. Platelet glycoprotein IV (CD 36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood.*1994;83:392.
33. Beer J.H. Glycocalicin: A new assay- the normal plasma levels and its potential usefulness in selected diseases. *Blood.* 1994;83:691.
34. Jandrot-Perrus M. Thrombin interaction with platelet glycoprotein Ib: Effect of glycocalicin on thrombin specificity. *Blood.* 1992;80:2781.
35. Bykowska. Different effects of human neutrophil elastase on platelet glycoproteins IIb and IIIa of resting and stimulated platelets. *Throm. Haem.* 1990;64:69.
36. Jinpeng P. Aged platelet have an impaired response to Thrombin as quantitated by P-selectin expression. *Blood.*1994;83:161.
37. Yen T. Cisplatin-induced platelet activation requires mononuclear cells:role of GMP-140 and modulation of procoagulant activity. *Br.J.Haematol.* 1993;83:259.
38. Haltori A. platelets-morfology,shape changing factor, and platelet agglutinating factor. *Nippon-Rinsho.* 1993;51:122.

39. Menard M. Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Thromb.haemost.* 1990;63:127.
40. George J.N. Platelet immunoglobulin G: Its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alfa-granule proteins. *Blood.* 1990;76:859.
41. James N.G. Platelets IgG: measurement, interpretation, and clinical significance. *Prog. Haemost.* 1990;13:145.
42. Cramer. Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelet and megakaryocytes. *Blood.* 1990;75:1220.
43. Takayama K. Changes in endothelial vasoactive substances and blood coagulation and fibrinolysis functions under recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Nippon-Jinzo-Gakkai-Shi.* 1993;35:179.
44. Zucker M.B. Platelet factor 4, production, structure and physiologie and immunologie action. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1991;198:693.
45. Eller T. Diagnostic strategies for detection of the von Willebrand syndrome. *Beitr-infusion.* 1992;30:268.
46. Klaus T. Structure of vitronectin and its Biological role in haemostasis. *Thomb. Haemost.* 1991;66:123.
47. Seiffert D. Serum-derived vitronectin influences the pericellular distribution of type-1 plasminogen-activator inhibitor. *J.Cell.Bioll.* 1990;111:1283.

48. Ikeda Y. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. J.Clin.Invest. 1991;87:1234.
49. Kroll M.H. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. J.Clin.Invest. 1991;88:1568.
50. Becker. Seminars in Thrombosis, Thrombolysis and vascular biology: Fibrinolysis. Cardiology. 1991;79:188.
51. Harrison P. Platelet alpha-granules. Blood Rev. 1993;7:52.
52. Scully M.F. The biochemistry of clotting the digestion of a liquid to form a solid. Essays Biochem. 1992;27:17.
53. Alonso G.J. Negative and positive developments during the last 25 years. Haemostasis. 1992;22:305.
54. Bloom A. Physiology of blood coagulation. Haemostasis. 1990;20:14.
55. Ahmed N.K. Biochemical characteristics of fibrolase, a fibrinolytic protease from snake venom. Haemostasis. 1990;20:147.
56. Malia R.G. Comparative haemostasis; an overview. Equi.Vet.J. 1992;24:6
57. Wersch J.W. Non-vitamin K-dependent clotting factors during oral anticoagulant treatment. Blood coagul.fibrinol. 1992;3:727.

58. Pasi K.J. Clinical and laboratory evaluation of the treatment of von Willebrand's disease patients with heat-treated factor VIII concentrate. *Br.J.Haematol.* 1990;75:228.
59. Furie B. Molecular basis of gamma-carboxylation role of propeptide in the vitamin K-dependent proteins. *Ann.Ny.Acad.Sci.* 1991;614:1.
60. Osterud B. Factor VII and haemostasis. *Blood.Coag.Fibrinol.* 1990;1:175.
61. Bom V.J. The contributions of Ca⁺⁺, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. 1990;265:327.
62. Esmon Ch.T. Inflammation and coagulation; Linked processes potentially regulated through a common pathway mediated by protein C. 1991;66:160.
63. Deutz P.P. Two ELISA's for measurement of protein S, and their use in the laboratory diagnosis of protein S deficiency. 1990;186:321.
64. Roberts H.R. New perspectives on the coagulation cascade. *Hosp.Pract.* 1992;27:97.
65. Mann K.G. Surface-dependent reactions in the propagation phase of blood coagulation. *Prog.Vasc.Biol.Haemost.Thromb.* 1991:63.

66. Gailani D. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*. 1991;253:909.
67. Novotny W.F. Purification and properties of heparin-releasable lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood*. 1991;78:394.
68. Ishi O.H. Biological regulation by the Kallikrein-Kinin system; a study with a Kininogen-deficient rat strain. *Nip.Yak. Zas.* 1993;101:209.
69. Wanaka K. effect of a highly selective plasma-kallikrein synthetic inhibitor on contact activation relating to kinin generation, coagulation and fibrinolysis. *Thomb.Res.* 1990;57:889.
70. Brozna J.P. Cellular regulation of tissue factor. *Blood Coagul.Fibrinol.* 1990;1:415.
71. Samori T. Blood coagulation factors in hepatic disorders. *Rinsho.Byori.* 1992;40:1252.
72. Meijers J.C. The contact activation proteins: a structure function overview. *Agents actions Suppl.* 1992;38:219.
73. Herring S.W. Human coagulation factor IX: assessment of Thrombogenicity in animal model and viral safety. *J.Lab.Clin.Med.* 1993;121:394.
74. Hoyer L.W. Factor VIII inhibitors: a continuing problem. *J.Lab.Clin.Med.* 1993;121:385.

75. Rapaport S. Blood coagulation and its alterations in hemorrhagic and thrombotic disorders. *West.J.Med.* 1993;158:153.
76. Briet E. The role of factor VII in haemostasis: infusion studies of factor VIIa in a canine model of factor VIII deficiency. *Mertens K Thromb.Haemost.* 1990;64:138.
77. Kappelmayer J. Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ. Res.* 1993;72:1075.
78. Constantini V. Fibrin and cancer. *Thomb.haemost.* 1993;69:406.
79. Levi M. Plasminogen activation in vivo upon intravenous infusion of DDAVP. Quantitative assessment of plasmin-alpha 2-antiplasmin complex with a novel monoclonal antibody based radioimmunoassay. *Thromb.Haemost.* 1992;67:111.
80. Lee M.H. Deficiency of plasma plasminogen activator inhibitor 1 results in hyperfibrinolytic bleeding. *Blood.* 1993;81:2357.
81. Keijer J. The interaction of plasminogen activator inhibitor 11 with plasminogen activators (tissue-type and urokinase-type) and fibrin: Localization of interaction sites and physiologic relevance. *Blood.* 1991;78:401.
82. Grant PJ. Hormonal regulation of haemostasis and the molecular biology of the fibrinolytic system. *Clin.Sci.* 1990;78:3.
83. Vassalli J.D. The plasminogen activator/plasmin system. *J.Clin.Invest.* 1991;88:1067.
84. Diéval J. A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor Type 1. *Blood.* 1991;77:528.

85. Plow E.F. Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb.Haemost* 1991;66:32.
86. Prentice A.G. Control of haemostasis. *Br.J.Hosp.Med.* 1990;43:385.
87. Bick R.L. Hypercoagulability and thrombosis. *Hematol.Oncol. Clin.North.Am.* 1992;6:1421.
88. Abe k. A study on the participation of protein kinase C in the blood coagulation. *Hokkaido.*1993;68:368.
89. Bajzar L. The effect of activated protein C on fibrinolysis in cell-free plasma can be attributed specifically to attenuation of prothrombin activation. *J.Biol.Chem.* 1993;268:8608.
90. Dittman W.A. Structure and function of thrombomodulin: A natural anticoagulant. *Blood.* 1990;75:329.
91. Walker F.J. Regulation of blood coagulation by the protein C system. *FASEB J.* 1992;6:2561.
92. Eckle I. Protein S degradation in vitro by neutrophil elastase. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 1993;53:281.
93. Matsuzaka T. Relationship between vitamin K dependent coagulation factors and anticoagulants (protein C and protein S) in neonatal vitamin K deficiency. *Arch.Dis.Child.* 1993;68:297.
94. Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: Components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system *Thromb.Haemost.* 1991;66:49.

95. Girolami A. Factor VII and haemostasis: interaction between abnormal factors VII and tissue thromboplastins. *Blood-Coagulation-Fibrinolysis*. 1990;1:749.
96. Rogers J.S. Hypercoagulable states. *W.V.Med.J.* 1993;89:61.
97. Ratnoff O.D. Circulating anticoagulants: a study of 40 cases and a review of the literature. 1961: an update. *Medicine. Bal.* 1993;72:199.
98. Okamura T. Acquired inhibitors (autoantibodies) to coagulation factors in non-hemophilic patients. *Rinsho. Ket.* 1993;34:583.
99. Bloom A.L. Management of factor VIII inhibitors: evolution and current status. *Haemostasis*. 1992;22:268.
100. The bleeding time. *Lancet*. 1991;337:1447.
101. Roman C. Platelet-induced thrombin generation time: a new sensitive global assay for platelet function and coagulation. Method and first results. *Haemostasis*. 1992;22:309.
102. Parkin J.D. Mild bleeding disorders. A clinical and laboratory study. *Med.J.Aust.* 1992;156:614.
103. Iwabuchi K. Platelet derived neutrophil adherence-inhibiting factor in humans. *Blood*. 1990;76:2368.
104. Colheim C. Effect of local hemostatics on platelet aggregation. *Eur.Surg.Res.* 1991;23:45.

105. Kirchhof B. Attempts to standardize platelet aggregation measurements: simplified screening tests. *Haemostasis*. 1990;20:169
106. Stetadini M. The one-stage prothrombin time. *Blood* 1950;5:965.
107. Lundberg G. Routine use of the prothrombin and partial thromboplastin times. *JAMA*. 1989;262:2428.
108. Hirsh J. Oral anticoagulant drugs. *N. Engl. J. Med.* 1991;324:1865.
109. Thomson J. The implantation of international normalized ratios for estandardization of the prothombin time in oral anticoagulant control. *Blood coag.hemost.* 1991;261:283.
110. Nammen E. Coagulation abnormalities in liver disease hema-
tol. *Oncol Clin North Ame.* 1992;6:1247.
111. Holburn R. Estimation of Fibrinogen in small samples of plasma. *The coagulation of blood methods of study*. Grune & Stratton, Inc. N.York, 1955.155.
112. Machin S. Routine measurement of fibrinogen concentration. *BMJ*.1993;307:882.
113. Ernst E. Fibrinogen- an independent risk factor for cardio-vascular disease. *BMJ*. 1991;303:596.
114. Kessler C. An introduction to factor VIII inhibitors: the detection and quantitation. *Am.J.Med.* 1991;91(suppl 5A).

115. Hultin M Acquired inhibitors malignant and nonmalignant disease states. Am J Med. 1991;91 (Suppl 5A)
116. Tsuzuky T. Disseminated intravascular coagulation after hepatic resection. Surgery. 1990;107:172.
117. Feinstein D. Diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation: the role of haparin therapy. Blood. 1982;60:284.
118. Thomas d. Bleeding after low-molecular-weigth heparin. Lancet. 1992;339:1119.
119. Cartwright G. El laboratorio en el diagnóstico hematológico. Ed. Científico-Médica. 4ª ed. 1973.