



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

IMPLEMENTACION DE LA DETERMINACION DE ANTICOAGULANTE LUPICO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA LILIANA ORTEGA MARAVILLA



Director: Dr. Rogelio Paredes Aguilera
Asesores: QFB. Lina Teresa Romero Guzmán
M. en C. Catalina Machuca Rguez.

MEXICO, D. F.

MAYO 2002

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.

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO AL RECUERDO DE MI PADRE:

MANUEL ORTEGA GUZMÁN

PORQUE NO DESAPARECE  
LO QUE MUERE,  
SOLO LO QUE SE OLVIDA.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que quiero agradecer por haberme apoyado y brindado su atención, para realizar esta investigación:

AL INP

Al Dr. Rogelio Paredes Aguilera, por la oportunidad que me proporcionó.

A Lina, por la guía y experiencia que compartió conmigo.

Al personal del laboratorio de Hematología, compañeros todos.

A Romi, por esperar siempre lo mejor de mí.

A LA UNAM.

Por tener a Zaragoza y sus profesores.

A Catalina Machuca, tu pensamiento ha marcado mi razón.

A mis asesores: Carolina Sauer, Patricia Vidal y Araceli García, me indicaron errores y me dieron útiles sugerencias, he aprendido de sus recomendaciones.

A todos, gracias, los admiro mucho.

A MI FAMILIA

Mami, enorme ejemplo de entereza y sacrificio, siempre conmigo.

Susi, por dejarme ser la primera en pisar una Universidad, hay bendiciones en la vida, definitivamente, tú eres una.

Mini, por llevar en el corazón el anhelo de superación.

Viqui, siempre mi gran esperanza.

A TI

MÁS QUE A NADIE MÁS, QUISIERA AGRADECER A MI ESPOSO, POR LAS MUCHAS HORAS QUE SACRIFICÓ, PERMITIÉNDOME TRABAJAR EN ESTE PROYECTO: César Augusto Miranda Lara.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,  
nombró como Sinodales de Examen Profesional a:

- ✓ Presidente: M. C. Carolina Sauer Ramírez.
- ✓ Vocal: Dr. Rogelio Paredes Aguilera.
- ✓ Secretaria: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez
- ✓ 1<sup>er</sup>. Suplente: QFB Araceli García del Valle
- ✓ 2<sup>o</sup> Suplente: QFB Patricia Vidal Millán.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

# ÍNDICE

---

I.	Resumen .....	1
II.	Introducción .....	3
III.	Marco Teórico .....	5
IV.	Planteamiento del problema .....	46
V.	Objetivos.....	48
VI.	Tipo de Estudio .....	49
VII.	Hipótesis .....	50
VIII.	Método .....	51
IX.	Resultados .....	53
X.	Análisis Estadístico.....	60
XI.	Discusión de resultados .....	63
XII.	Conclusiones .....	67

## ANEXOS

a)	Bioquímica y activación de los factores de coagulación.....	68
b)	Pruebas coagulométricas.....	79
c)	Automatización en Hemostasia.....	115
d)	Verificación de la precisión y exactitud de micropipetas Semiautomáticas .....	123

GLOSARIO .....	129
----------------	-----

REFERENCIAS .....	133
-------------------	-----

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**I. RESUMEN**

El Anticoagulante Lúpico (AL) es un término que se aplica a la actividad anticoagulante que un plasma ejerce sobre las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos, como lo son las pruebas rutinarias de TP y TTPa, ésto es, resultan tiempos bastante alargados y como el término se aplicó por primera vez en 1950, cuando se descubrió éste hecho en un grupo de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), que sin padecer ninguna otra patología que explicara el alargamiento en los tiempos de coagulación, Conley y Hartman llamaron a esta característica de laboratorio Anticoagulante Lúpico.

Es conocido en los esquemas de coagulación que al determinarse tiempos alargados en las pruebas de coagulación, se investigue si corrigen, al adicionar al plasma problema una cantidad igual de plasma "normal" y repetir las pruebas. Este procedimiento cautivadoramente sencillo, define la presencia de un inhibidor de la coagulación, si los tiempos persisten alargados. Esencialmente es lo que sucede cuando el AL está presente; sin embargo, en esta etapa sólo se ha obtenido la información de un inhibidor de la coagulación, demostrar que se trata del tipo lúpico, requiere de pruebas más específicas.

La estructura bioquímica del AL se ha definido como un grupo de inmunoglobulinas, principalmente de tipo IgM, ésto es, se trata de anticuerpos adquiridos que no inhiben específicamente algún Factor de la Coagulación, sino que, se dirigen a epitopes de micelas de fosfolípidos y a fosfolípidos aniónicos, como los que se requieren para la formación del complejo protrombinasa en la cascada de la coagulación.

Este mecanismo (que cuenta con mayor apoyo en la literatura), explica el alargamiento de los tiempos de coagulación, ya que el Factor II (protrombina) no puede ser activado de manera eficiente y por tanto la formación del coágulo requiere de mayor tiempo; a su vez coloca al AL, como un miembro de los anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos: Anticuerpos antifosfolípido, concepto, que en el ámbito clínico ha tenido tal impacto, que se ha reconocido una enfermedad llamada Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido.

Con el tiempo se reconoció que en la práctica clínica, el término AL, resultó erróneo, ya que se demostró que en un poco menos de la mitad de los pacientes a los que se determina con AL positivo, padecen LES y además, por que a pesar de que en el Laboratorio se alargan los tiempos de coagulación, en la clínica se relaciona con eventos tromboticos, donde las manifestaciones clínicas dependen del órgano irrigado, presentándose infarto cerebral, infarto

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

al miocardio, embolia pulmonar y en la mujeres embarazadas por trombosis en los vasos placentarios, abortos repetitivos.

En la literatura se enfatiza que la sensibilidad para determinar AL, puede diferir ampliamente de un laboratorio a otro, lo que motivo a Organismos Internacionales a establecer criterios de diagnóstico de laboratorio, y motivar con ello, la estandarización en todas las variables analíticas que presentan dificultad en su uniformidad.

Así que fijándose el objetivo de implementar la determinación del AL en nuestro laboratorio, se investigaron todas las recomendaciones y se obtuvo la mayor cantidad de especificaciones técnicas, seleccionándose seis pruebas especiales reconocidas con gran sensibilidad para determinar AL. Posteriormente se aplicaron estas pruebas a muestras de pacientes con diagnósticos que; primero, se manejan dentro de la población del servicio de Hematología y, segundo, en aquellos donde la presencia de AL es fuertemente sospechada, y cuyo estudio es un dato imprescindible para cuidar el curso de la enfermedad.

Se analizaron un total de 114 muestras, de siete principales diagnósticos. Para evaluar la utilidad de la prueba, se aplicó el método estadístico de la Curvas ROC, con el que se encontró que dos pruebas respondieron con menor sensibilidad, por lo que el panel de pruebas especiales para el AL quedó conformado por tres pruebas sensibles, y una confirmatoria del tipo lúpico.

La prueba así constituida, es una prueba especial de coagulación, que posee buena sensibilidad y especificidad, pero se requiere en todo momento que sea solicitada dentro de una adecuada orientación clínica; a su vez, esta determinación contribuirá en las investigaciones clínicas que busquen esclarecer la relación entre los anticuerpos antifosfolípidos y los fenómenos de trombosis.

## II. INTRODUCCIÓN

El Instituto Nacional de Pediatría (INP) inició sus actividades como el Hospital Infantil de la IMAN (Institución Mexicana de Asistencia a la Niñez) en 1970<sup>1</sup>. Comenzando sólo con los servicios de Consulta externa, Urgencias, un Laboratorio Clínico y un gabinete radiológico. La existencia de la Institución, que se pensó sería una "extensión" del Hospital Infantil de México, se fue adecuando a los tiempos políticos, a los cambios epidemiológicos experimentados en la población infantil, a las situaciones sociales y económicas del propio País y a los avances vertiginosos de la tecnología y su impacto en la atención médica, la docencia y la investigación en el campo de la Pediatría<sup>2</sup>.

Desde su fundación y hasta el primer semestre de 1999, se abrieron 400,712 expedientes y se han impartido 5,275,279 consultas. Han sobresalido diferentes especialidades de atención pediátrica, destacando a la par de muchas, la Hematología, cuya responsabilidad no se ha limitado a brindar atención médica de tercer nivel a la población infantil, si no que mantiene un nivel de excelencia en enseñanza e investigación<sup>3</sup>.

El servicio de Hematología está integrado por el equipo médico y el Laboratorio, organizado éste a su vez, en tres secciones, Hematología general, Hematología especial y Coagulación y Trombosis<sup>4</sup>.

En esta última sección es donde se desarrolla el presente trabajo, buscando contribuir al objetivo de excelencia en servicio, enseñanza e investigación; comenzando con la siguiente teoría:

El diagnóstico de los trastornos de la coagulación sanguínea requiere, junto a una gran experiencia clínica, un gran conocimiento de los métodos de laboratorio, ya que el conocimiento de la química y fisiología de la hemostasia no han cesado de progresar a lo largo de los últimos años.

Un trastorno de la hemostasia se puede encontrar a nivel vascular, plaquetario o en los factores plasmáticos de la coagulación. La orientación clínica puede dirigir hacia el nivel afectado, pero haciendo uso de un conjunto de pruebas básicas (Tiempo de Protrombina —TP—, de Tromboplastina Parcial activada —TTPa—, etc.), se establece una orientación definitiva<sup>5</sup>. El resultado anormal en alguna de dichas pruebas básicas obedece esquemáticamente a dos causas:

1. Presencia de un anticoagulante circulante, o
2. Déficit de uno o varios factores de la coagulación.

La forma más sencilla para determinar a que causa pertenece un trastorno de la coagulación sanguínea es con un estudio de mezcla del plasma del paciente con un plasma normal, y tras incubación, repetir las pruebas. Si el tiempo de la prueba de coagulación de la mezcla, es similar al del plasma



control, puede asegurarse que se trata de un déficit de alguno de los factores de la coagulación, que ha sido corregido por los factores presentes en el plasma normal, si por el contrario, no existe corrección del defecto, éste debe atribuirse a la presencia de un anticoagulante circulante, o también llamados, inhibidores circulantes (porque su acción anticoagulante es de tipo inhibitorio), que continúan manifestando su acción, ahora sobre el plasma normal<sup>6,7</sup>.

El AL, pertenece al grupo de anticuerpos antifosfolípidos, autoanticuerpos heterogéneos con distinta especificidad por fosfolípidos aniónicos o complejos entre fosfolípidos y proteínas como la B<sub>2</sub>-glucoproteína-1, o con protrombina<sup>8,9,10</sup>.

Cuando los anticuerpos antifosfolípidos son determinados por su habilidad para prolongar pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos (TP, TTPA) estos autoanticuerpos son referidos como del tipo AL, determinación considerada como indirecta, ya que si se determinan mediante pruebas inmunológicas como el enzimoanálisis (ELISA) cuyo antígeno más común es cardioplipina, son referidos como anticuerpos anticardioplipina, y es considerada una determinación directa. Sin embargo los anticuerpos antifosfolípidos y el AL no son iguales o equivalentes, ya que se ha demostrado que pueden pertenecer a distintos subgrupos de anticuerpos<sup>11,12,13</sup>.

La importancia de contar con la determinación de AL, radica en que este inhibidor de la coagulación se ha encontrado en diversas condiciones clínicas (Enfermedades autoinmunes, infecciones víricas y bacterianas, diversos tipos de cáncer, complicaciones obstétricas, exposición a ciertos fármacos, etc.) que tienen en común el desarrollo de eventos tromboembólicos<sup>14,15,16</sup>. De esta manera confirmar la presencia de AL dentro del marco patológico, es alertar sobre el posible desarrollo de una complicación trombótica, como trombosis arterial o venosa, trombocitopenia, alteraciones neurológicas, pérdida fetal (por trombosis en los vasos placentarios), Livedo reticularis (moteado azul-rojizo, con un aspecto en red de pesca, que afecta a toda la pierna o brazos, producido por espasmo arterial), hipertensión pulmonar, necrosis cutánea, valvulopatía mitral/aórtica, etc., que consecuentemente torna más grave el estado general del paciente.

Dentro de las causas de las complicaciones trombóticas la participación autoinmunitaria, se conocía desde años atrás, porque se señalaba la presencia de anticoagulantes circulantes (AL), debido sin embargo a que los procedimientos coagulométricos eran una realidad cotidiana; fue a partir de 1983 cuando se dispuso de exámenes que reconocen anticuerpos antifosfolípidos como tales, que se conoció más sobre la naturaleza bioquímica y mecanismo de los anticoagulantes circulantes<sup>17,18,19</sup>.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. - El mecanismo de la hemostasia normal.

- Hemostasia primaria.
- Mecanismo de la coagulación.
- Mecanismo de la fibrinólisis
- Sistema anticoagulante o de inhibidores fisiológicos.

#### 3.2. - Alteraciones de la hemostasia.

- Padecimientos hemorrágicos.
- Padecimientos trombóticos.
- Inhibidores patológicos de la coagulación.

#### 3.3. - Autoinmunidad.

#### 3.4. - Diagnósticos abordados.

- Deficiencia congénita de Factor VIII (Hemofilia A).
- Anemia hemolítica autoinmune.
- Púrpura Trombocitopénica Idiopática.
- Coagulación Intravascular Diseminada.
- Síndrome hemofagocítico.
- Lupus Eritematoso Sistémico.
- Síndrome Antifosfolípido

### 3.1. - EL MECANISMO DE LA HEMOSTASIA NORMAL

---

La hemostasia (del griego αιμα –aima-, sangre y στασις –stasis- detención), es un conjunto de mecanismos fisiológicos que detienen la salida de sangre desde el espacio vascular mediante un cambio de estado físico.

Desde el punto de vista práctico la hemostasia se divide en dos fases: Hemostasia primaria (interacción vaso sanguíneo-plaquetas) y hemostasia secundaria (proteínas plasmáticas de la coagulación).

En condiciones normales, o como propiamente es llamado, en condiciones fisiológicas, la hemostasia primaria funciona equilibradamente con la secundaria; este equilibrio depende del funcionamiento “normal” de todos estos sistemas, que son: el endotelio vascular, la coagulación, el sistema anticoagulante natural, el sistema fibrinolítico, las plaquetas y la dinámica de la corriente sanguínea. Las tres funciones (vascular, celular y bioquímica) son necesarias para la hemostasia efectiva, pero son independientes en la medida en que es factible mantener la hemostasia compatible con la vida, aun cuando un componente, como las plaquetas o un factor de la coagulación se encuentre deficiente<sup>7</sup>.

#### HEMOSTASIA PRIMARIA<sup>20,21</sup>

La fase vascular y la formación del tapón plaquetario crean la barrera inicial o temporaria de la hemostasia (de ahí la razón de denominarse primaria). En los procesos de la hemostasia primaria la interacción entre plaquetas y células endoteliales es fundamental para su adecuado y equilibrado funcionamiento. Normalmente las plaquetas no se adhieren al vaso sanguíneo, esto solo ocurre cuando existe lesión en el vaso sanguíneo y se expone la colágena del subendotelio, permitiendo así la activación de las plaquetas.

Fase Vascular.- El vaso sanguíneo consta de tres capas: La íntima –endotelio-, La media -músculo liso- y La adventicia -tejido conectivo-.

Todas estas capas participan directamente en la hemostasia. Al ocurrir una lesión vascular, el endotelio queda incapacitado para ejercer sus funciones de tromborregulación y disminuye importantemente la producción de prostaciclina; por otra parte el músculo liso se contrae y disminuye el calibre del vaso, así como el flujo sanguíneo al sitio de la lesión. Finalmente la colágena queda expuesta y sirve de sitio de unión con las plaquetas a través de receptores específicos.

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

El endotelio realiza funciones de tromborregulación, al ejercer un poder antiagregante, al producir:

1. Prostaglandina I<sub>2</sub> (PG<sub>2</sub>), que bloquea la activación plaquetaria al incrementar los niveles del AMPc.
2. Liberación de óxido nítrico que incrementa los niveles de GMPc e inhibe la adhesión plaquetaria y es un poderoso vasodilatador local.
3. Producción de ADPasa, que se encarga de degradar al ADP como poderoso agente agregante plaquetario.

Al existir una lesión, estos mecanismos fisiológicos de regulación dejan de funcionar y favorecen los mecanismos proagregantes, que permitirán la interacción entre el vaso sanguíneo lesionado y las plaquetas.

Fase plaquetaria.- Las plaquetas son pequeñas células anucleadas de la sangre periférica y su función consiste en taponar rápidamente cualquier pérdida de continuidad en el endotelio vascular, mediante la formación de cúmulos planetarios. El inicio de la activación plaquetaria está referido a su interacción con el endotelio (adhesividad plaquetaria) seguido por la relación plaqueta/plaqueta (agregación plaquetaria). Las etapas posteriores con la formación del tapón hemostático, necesitan de un adecuado mecanismo de adhesividad plaquetaria para que ocurran normalmente (la inhibición de la adhesividad plaquetaria puede ser el intento más válido para prevenir trombosis). Ultraestructuralmente las plaquetas se dividen en tres zonas: periféricas, intermedias y de organelos. La zona periférica está formada a su vez por tres capas, donde el glicocálix o cubierta externa, es el responsable de la respuesta plaquetaria inicial a través de receptores glicoproteicos entre los que se encuentra el complejo glicoproteico Ib-IX, IIb-IIIa, Gp V, etc. Las Glicoproteínas de la membrana plaquetaria han sido identificadas con los números I, II, III, IV, V, etc., sin embargo actualmente se han subclasificado en distintas familias: Integrinas, glicoproteínas ricas en leucina y selectinas.

Durante el proceso de agregación también participan otras proteínas adhesivas como: fibronectina, vitronectina, osteonectina, etc. y algunas proteínas endoteliales como el Factor de Von Willebrand, que es una proteína producida por la célula endotelial y los megacariocitos. Su función es la de formar los puentes de unión entre el colágeno del subendotelio con las glicoproteínas de la membrana plaquetaria. El primer sitio descrito de unión en la plaqueta, fue la glicoproteína Ib. La importancia de esta relación está reflejada en el hecho que pacientes con déficit congénito de la proteína de Von Willebrand o el síndrome de las plaquetas gigantes de Bernard-Soulier (donde falta la Gp Ib) presentan cuadros hemorrágicos.

El tapón hemostático plaquetario se consolida a través de la fibrina formada por la activación de los mecanismos de coagulación. La pequeña

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

cantidad de trombina que se forma en la atmósfera periplaquetaria en los momentos muy inmediatos de este proceso, determina modificaciones metabólicas y activación importante de las plaquetas, que favorecen la hemostasia primaria

Además, las plaquetas participan en la hemostasia secundaria al funcionar como superficie de contacto (fosfolípido plaquetario o factor 3 plaquetario) para activar factores de coagulación, así como en la liberación de ciertos factores procoagulantes.

## **HEMOSTASIA SECUNDARIA**<sup>20,21</sup>

Hasta hace algunos años se conocía que en el hombre, había dos sistemas encargados del equilibrio hemostático: el de COAGULACIÓN, que evita ante una lesión, la hemorragia excesiva; y el sistema FIBRINOLÍTICO que limita la magnitud del coágulo. Los dos mecanismos son, estructuralmente, muy similares: pueden ser activados por un mecanismo intrínseco y/o extrínseco para producir una enzima activa, en ambos sistemas, un conjunto de inhibidores, condicionan el equilibrio y limitan el proceso; en la coagulación la trombina es la enzima central, la plasmina lo es para la fibrinólisis. Sin embargo se demostró, que existe otro sistema, tan importante como los dos anteriores, denominado SISTEMA ANTICOAGULANTE O DE INHIBIDORES FISIOLÓGICOS. La causa que contribuyó a este cambio, fue conocer que el endotelio vascular desempeña una función trascendental en este equilibrio, ya que su participación no se concreta solamente a ser el contenedor de todos los factores plasmáticos que integran estos dos sistemas, sino que posee funciones que tienen que ver no solo con la activación de los factores coagulantes y fibrinolíticos, sino también con su neutralización o inhibición, integrando con ello un tercer sistema íntimamente ligado a los dos anteriores ya conocidos.

Para poder comprender la importancia de la definición de los tres sistemas, será necesario revisar cada uno detenidamente.

## **EL MECANISMO DE LA COAGULACIÓN**

El mecanismo de coagulación está compuesto por distintos zimógenos plasmáticos. Se trata de los factores de la coagulación, que al requerirse, se activan secuencialmente dando lugar a la formación de enzimas activas que culminan con la formación de trombina, que al actuar sobre el fibrinógeno, forma la malla de fibrina.

Se considera que este proceso ocurre en forma de cascada y, aunque se han descrito dos mecanismos de activación, uno intrínseco y otro extrínseco, existen interconexiones y sistemas de retroalimentación positivos y negativos

entre ellos, que lo hacen un mecanismo complejo (Teoría clásica de MacFarlane, Davie y Ratnoff).

#### Nomenclatura

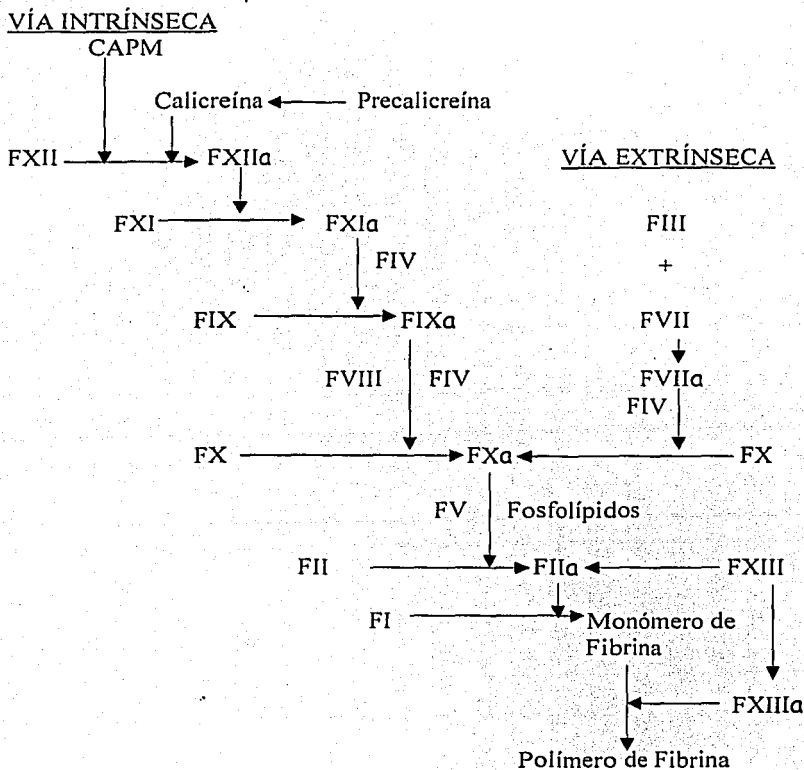
La nomenclatura de los factores de la coagulación es contradictoria y confusa. Definidos hace mucho tiempo, recibieron nombres descriptivos, por ejemplo, fibrinógeno, trombina, protrombina y tromboplastina. Más tarde se designaron de acuerdo con sus propiedades bioquímicas o funcionales elementales, como el factor "lábil" y el "acelerador de la conversión de la protrombina". También se denominaron con el apellido de las familias en las que se descubrieron carencias hereditarias, por ejemplo Christmas, Stuart y Hageman. De este modo, se usaban distintos términos para el mismo factor. Estos inconvenientes, se resolvieron, casi para todos los factores, por la nomenclatura estándar Internacional establecida en 1976, que adjudica a cada factor un número romano. Sin embargo para el Fibrinógeno, Protrombina, Calcio y Factor tisular es infrecuente, el empleo de su nomenclatura internacional como Factor I, Factor II, Factor IV y Factor III, respectivamente; así como para los componentes del sistema de la cinina, los cuales se describieron antes de demostrar completamente su participación en la coagulación y por tanto no se consideraron dentro de la nomenclatura Internacional, por lo que de este modo se utilizan como sinónimos los nombres de sus observadores, Fletcher y Fitzgerald, aunque el nombre descriptivo es preferido (Consúltese los Esquemas 1 y 2). Se suele representar en forma abreviada Factor, con F, seguido del número romano asignado, así como el agregar una letra "a", si el factor se ha activado, por ejemplo, la Protrombina se activa a trombina, su representación es: FII → FIIa.

Esta descripción de la cascada de coagulación provee la lógica necesaria para estudiar anomalías, relacionadas con la velocidad de formación de Fibrina *in vitro*, provee la explicación para las pruebas de coagulación, PERO NO ES adecuada la descripción como coagulación sanguínea *in vivo*; la coagulación sanguínea es más bien una serie de cambios bioquímicos y enzimáticos para la formación de trombina y subsecuentemente la formación de un coágulo de Fibrina.

#### a) MECANISMO O VÍA INTRÍNSECA

Se denomina vía intrínseca por que en las pruebas de laboratorio, la determinación del Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa) se considera, que todos los componentes (excepto el activador -caolín-) son intrínsecos del plasma. Se inicia por la activación de la llamada "Fase de contacto" en la que intervienen cuatro proteínas plasmáticas: -FXII, Precalicerina (Pre C), FXI, y Cininógeno de alto peso molecular (CAPM).

SECUENCIA DE LA COAGULACIÓN



Esquema 1. Teoría clásica de la coagulación. Representada con la nomenclatura Internacional que adjudica a cada factor un número romano.

SECUENCIA DE LA COAGULACIÓN

VÍA INTRÍNSECA

Cinínógeno de alto peso molecular  
ó Factor Fitzgerald  
ó Factor Williams

Calicreína ← Precalicroína  
ó Factor Fletcher

Factor Hageman  
ó F. De contacto  
ó F. De superficie  
ó F. Promotor del coágulo

F. Hageman<sub>a</sub>

Precursor de la tromboplastina plasmática(PTP)  
ó Antecedente plasmático de la Tromboplastina  
ó F. Antihemofílico C

TP<sub>a</sub>

Componente plasmático de la Tromboplastina  
ó componente tromboplastínico del plasma  
ó F. Christmas  
ó F. Antihemofílico B  
ó Cofactor plaquetario II  
ó Autoprotrombina II

F. Christmas<sub>a</sub>

F. Antihemofílico A  
ó Globulina Antihemofílica  
ó Cofactor Plaquetario II  
ó Tromboplastinógeno

F. Stuart  
F. Power

F. Lábil ó  
Proacelerina ó  
Globulina  
aceleradora  
del plasma  
ó Protrombinsa

Protrombina

VÍA EXTRÍNSECA

F. Tisular ó F. Hístico ó  
Tromboplastina ó Trombocinas  
ó Extracto hístico ó

Tromboplastina tisular

+  
F. Estable ó Proconvertina  
ó Acelerador sérico de  
conversión de protrombina  
ó Autoprotrombina I  
ó Protrombina del suero

F. Estable

Calcio  
Fosfolípidos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGE

F. Stuart

F. Power

Fosfolípidos

Fibrinolisasa  
ó F. Estabilizador  
de la fibrina

Fibrinógeno

Monómero  
De fibrina

Fibrinoligasa

POLIMERO DE FIBRINA

Esquema 2. -Teoría clásica de la coagulación. Compilación de sinónimos o nombres descriptivos que fueron establecidos a lo largo del tiempo.



La activación del mecanismo inicia con la unión del FXII a superficies extrañas cargadas negativamente, por ejemplo "in vivo" el colágeno subendotelial que queda al descubierto cuando se lesiona el endotelio vascular, los complejos antígeno-anticuerpo, las endotoxinas, ciertos lípidos, etcétera, e "in vitro", a las cargas negativas del vidrio, celite, caolín, etc.

Sobre esta superficie se produce una autoactivación: el zimógeno de FXII sufre un cambio conformacional y se transforma en una serino-proteasa activa (FXIIa). Los CAPM concentran PreCs y FXI sobre la superficie. Allí el FXIIa ya unido, transforma las PreCs en Calicreínas y el FXI en FXIa. Se produce luego una activación recíproca de las calicreínas que generan más FXIIa potenciando su propia activación en una reacción que se amplifica varias veces y conduciendo a la formación de suficiente cantidad de FXIa. Activado el FXI, actúa sobre el FIX en una reacción dependiente de calcio formando el FIXa. El FIXa forma un complejo enzimático con los fosfolípidos, FIV y FVIII, para transformar el FX en FXa. Los fosfolípidos ofrecen la superficie y el calcio los puentes de unión con los factores IX y X. El FVIII es el cofactor que acelera la velocidad de reacción unas 1000 veces, la FIIa (trombina) en pequeñas cantidades y el FXa incrementan la actividad de FVIII y constituye otro ejemplo de retroalimentación positiva. A partir de FXa se inicia la vía final común.

### b) MECANISMO O VÍA EXTRÍNSECA

Se denomina vía extrínseca por que en las pruebas de laboratorio, como la determinación del Tiempo de Protrombina, la tromboplastina se considera extrínseca al plasma.

Inicia cuando la sangre entra en contacto con elementos tisulares. Un factor tisular (Tromboplastina), relacionado con las membranas celulares, compuesto por fosfolípidos y una fracción proteica, se combina en forma estequiométrica con el FVII de cadena simple, en presencia de FIV formando un complejo enzimático capaz de activar FX. A su vez, activado el FX, convierte el FVII en FVIIa de dos cadenas, que es más activo que el FVII nativo. Al nivel de este complejo, se producen cortocircuitos de activación de ambas vías. La activación del FIX, además de ser posible por la activación de FXI, es activado por el FVIIa. A su tiempo, este último se puede activar por FIXa, FXa o por FXIa o por el complejo FXIIa-calicreína.

Sin embargo, pese a estas interrelaciones, cuando se altera la hemostasia por déficit de algún factor de una de las vías de activación, el defecto no es compensado por la integridad de la otra vía.

c) VÍA FINAL COMÚN

Inicia con la activación de FX, tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. In vitro puede ser activado por otras enzimas proteolíticas como la tripsina y el veneno de víbora de Russell en presencia o no de fosfolípidos. El FX se activa en forma secuencial sufriendo dos clivajes consecutivos. El FXa resultante forma un complejo con los fosfolípidos, el FIV, y el FV. El FV es el cofactor de la reacción y su actividad es incrementada por el FIIa. Por sus grupos hidrofóbicos se fija a la superficie hidrofílica de los fosfolípidos a la que también se unen por sus residuos  $\gamma$ -carboxi-glutámicos, el FX y el FII. El FV actúa sobre el FII, logrando la liberación final de trombina, ó FIIa. La misma trombina ejerce una retroalimentación negativa actuando sobre el FII liberando únicamente un fragmento del proceso de activación; de esta manera impide que el FII se active completamente por acción del FXa (Para mayor detalle de este proceso de activación consulte el Anexo a)

La trombina es la enzima coagulante por excelencia. Una vez formada, actúa sobre el FI para formar la malla de fibrina, también actúa sobre los cofactores FV y FVIII aumentado su actividad y sobre el FXIII. Participa además, en la adhesividad y agregación plaquetaria. Al mismo tiempo la Trombina constituye un mecanismo regulador de los fenómenos tromboticos al activar un sistema de inhibidores fisiológicos de la coagulación, el de las Proteínas C y S

EL MECANISMO DE LA FIBRINÓLISIS

En general se considera que la fibrinólisis es la principal responsable de la eliminación de la fibrina después de cumplida su función hemostática; por lo tanto sería fundamental en la cicatrización de las heridas y la recanalización de los vasos trombosados. La Fibrinólisis resulta de la conversión de una proenzima inerte - El Plasminógeno - en una enzima proteolítica - La Plasmina -, cuyo papel fisiológico más destacado sería la disolución de la fibrina. El plasminógeno y la plasmina, junto con sus activadores e inhibidores constituyen el sistema fibrinolítico. La proteólisis de la fibrina a cargo de la plasmina da origen a varios fragmentos proteicos solubles -Los productos de la degradación de la Fibrina (PDF), los métodos inmunológicos empleados para evaluar estas sustancias no permiten definir su tamaño u origen, de manera que para referirse a ellas se usa la abreviatura de PDF. Hay dos tipos fundamentales de activadores de la conversión del plasminógeno: el activador tisular (t-PA) y la Uroquinasa (u-PA). La liberación de t-PA y u-PA es inducida por la trombina, lo que ilustra la interacción de la pared vascular con otros sistemas. La degradación de la fibrina es escalonada y por consiguiente, el peso molecular de los PDF varía con la duración de la acción de la plasmina. En el paso inicial se separa cerca

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

del 20% de la molécula de FI, creando el Fragmento X o primer derivado. Sufre proteólisis y se obtiene un Fragmento Y, éste último se fracciona en los fragmentos D. Los PDF se eliminan de la circulación por efecto de los mecanismos depuradores del hígado, el riñón y el sistema reticuloendotelial.

## EL SISTEMA ANTICOAGULANTE O DE INHIBIDORES FISIOLÓGICOS

Las proenzimas que intervienen en la coagulación son excesivas, las concentraciones ínfimas de enzimas activan montos considerables de sustrato y una vez iniciada, la coagulación se torna autocatalítica. Como estas características amplifican la coagulación, es necesario contar con fuerzas opuestas de igual potencia para limitar el tamaño del tapón hemostático y neutralizar a los procoagulantes activos que pudieran ingresar en la circulación: los inhibidores fisiológicos. En primera instancia el flujo sanguíneo, restringe la propagación de los coágulos; los coagulantes activos se alejan del área dañada y se diluyen. El plasma normal revela varias sustancias que bloquean la coagulación in vitro. Los estudios iniciales se centraron en las antitrombinas (término que se refiere a la capacidad de la fibrina para absorber a la trombina), seis de las cuales se designan con número romanos. Sólo la antitrombina I no es un inhibidor humoral y sólo la III tiene valor fisiológico. La antitrombina III (AT III) es una proteína plasmática que inactiva a las proteasas de serina mediante una reacción irreversible dependiente del tiempo, de modo que a veces se considera un supresor progresivo. Se produce en el hígado. Reacciona con la trombina creando un complejo bimolecular que se elimina con rapidez de la circulación merced a la intervención de los hepatocitos. La heparina se liga a una lisina de la AT III y acelera la generación de complejos inhibidores. El resultado es la intensificación de la acción de la AT III, quizás a causa de un cambio en la configuración que expone los puntos de ligadura enzimática. Por lo tanto, la AT III es el anticoagulante y la heparina el cofactor, y no a la inversa como se decía antes. La AT III inactiva a los Factores Xa, IXa, Calicreína y otras enzimas con serinas activas, además de la trombina (FIIa). En consecuencia, podría considerarse como una antiproteasa de alto espectro. Otro componente es la Proteína C, fué descrita en 1966 con el nombre de autoprotrombina IIa, junto con sus cofactores e inhibidores constituye un modulador importante de la coagulación en la interfase sanguínea endotelial, también participa en la fibrinólisis y el sistema del complemento y efectúa la degradación proteolítica de los FVa y FVIIIa. La deficiencia de Proteína C o S se asocia a manifestaciones tromboembólicas serias. La Proteína S parece ser un cofactor necesario.

Algunas características de los factores de coagulación se mencionan en las Tabla 1.1. y 1.2.

TABLA DE IMPORTANTES CARACTERÍSTICAS DE LOS FACTORES DE COAGULACIÓN (I)

FACTOR	VIDA MEDIA	CARACTER ENZIMATICO	PROCESO DE ACTIVACIÓN	F activado
FI	3 a 5 días	SUSTRATO	Circula como dímero, es sustrato de la Trombina.	FI
FII	2.5 días	PROENZIMA DE SERINO PROTEASA	El complejo protrombinasa corta dos enlaces Arg 271-Thr y Arg 320-Ile	Trombina
FIII	No en plasma	COFACTOR TISULAR	Normalmente no está en circulación, no requiere proceso para su actividad	FIII
FIV	Metabolito	COFACTOR	Se requiere la fracción ionizada.	FIV
FV	12 a 36 hrs	PROCOFACTOR PLASMATICO	La trombina realiza varios cortes que interactúan y dan moléculas de dos cadenas (H y L). También el FXa.	FVa
FVII	4 a 6 hrs	PROENZIMA DE SERINO PROTEASA	Junto con el FIII alcanza su punto óptimo, aunque puede autoactivarse o el FXa transformarlo.	FVIIa
FVIII	8 a 12 hrs	PROCOFACTOR PLASMATICO	La trombina provoca disociación del factor de von Willebrand.	FVIIIa
FIX	24 hrs	PROENZIMA DE SERINO PROTEASA	Ruptura del puente interno y separación de un segundo producen una molécula de dos cadenas	FIXa
FX	1 a 2.5 días	PROENZIMA DE SERINO PROTEASA	Por vía intrínseca o extrínseca, ruptura del puente peptídico N-terminal y separación del C-terminal	FXa
FXI	3 días	PROENZIMA DE SERINO PROTEASA	Ruptura de la unión Arg-369-Ile dan moléculas con cadenas H y L.	FXIa
FXII	2 días	PROENZIMA DE SERINO PROTEASA	Ruptura de la unión Arg 353-Val dan moléculas de cadenas H y L. Puede autoactivarse.	FXIIa
FXIII	3 a 12 días	PROENZIMA DE TRANSGLUTAMIDASA	La trombina corta dos péptidos y por la presencia de calcio se separa en dímeros ( $\alpha$ y $\beta$ )	FXIIIa
CAPM	6.5 días	COFACTOR	Circula como complejo con la precalicreina	CAPM
Precali-creina	1.5 días	PROENZIMA DE SERINO PROTEASA	Ruptura de la unión Arg-Ile, da molécula de cadena (H y L).	Calicreina

Tabla 1.1.- Se muestran los datos de vida media (el FVII posee menor vida media), carácter enzimático (la mayoría son zimógenos principalmente, proteasas, y otros son cofactores) y proceso de activación (la ruptura proteolítica de uno o dos enlaces es lo que activa al factor).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

TABLA DE IMPORTANTES CARACTERÍSTICAS DE LOS FACTORES DE COAGULACIÓN (II)

Grupo 1 (Del Fibrinógeno)

	PM	Concentración Plasmática	Estructura	Lábiles a	Características de Grupo
FI	340,000	160-145mg/dL	Tres subunidades nodulares interconectadas Dimérico	Calor	- PM elevado - Presentes en los gránulos alfa de las plaquetas.
FVIII	267,000	100 ng/ml	Circula como complejo junto al factor de Von Willebrand	Calor	- Son No dependiente de vitamina K
FV	330,000	4 - 14 µg/ml	Cilíndrica de tres subunidades que rodean a una central	Calor y almacén	- Se consumen totalmente en la coagulación.
FXIII	320,000	10 µg/ml	Dos pares de subunidades, Dos cadenas α y β	Calor y almacén	- Son digeridos por plasma

Grupo 2 (Protrombínico)

	PM	Concentración	Estructura	Lábiles a	Características de Grupo
FII	72000	10 - 15 mg/dL	Cadena polipeptídica con un	Calor y	- Bajo Peso molecular - Puente disulfuro- - Poseen residuos de ácido
FVII	48000	0.5 µg/dL	Cadena única con un puente disulfuro	Calor	γ-carboxiglutamato.
FIX	54000	3 µg/ml	Cadena simple α o β globulina	Calor	- Son dependientes de vitamina K.
FX	59000	1.2 mg/dl	Dos cadenas polipeptídicas Una pesada y otra liviana	Calor	- No se consumen totalmente en la coagulación, excepto FII. - Precipitan Al(OH) <sub>3</sub> .

Grupo 3 (Sistema de activación por contacto)

	PM	Concentración Plasmática	Estructura	Lábiles a	Características de Grupo
XII	80000	23-47 µg/ml	Polipeptido de cadena pesada y liviana	Estable	- PM intermedio - No se consumen totalmente en la coagulación.
XI	140000	2 - 7 µg/ml	Dos cadenas polipeptídicas, Circula combinado c/CAPM	Estable	- Precipitan con Al(OH) <sub>3</sub>

Tabla 1.2.- Características bioquímicas de los factores de coagulación.

## 3.2. - ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA

Aunque Hemostasia signifique, por su etimología, contención de la extravasación sanguínea, su estudio ha revelado la existencia de compuestos que modifican la actividad de los vasos y de las plaquetas, de inhibidores de la coagulación y la capacidad de las células endoteliales de sintetizar un número importante de compuestos, lo que implica un conjunto de mecanismos con actividades opuestas en equilibrio, que se modifica según la situación patológica que puede alterar la contención y la libre circulación de la sangre en el aparato cardiovascular, por ejemplo, lesión de la pared vascular o proceso inflamatorio. La alteración de estos mecanismos por cambios cuantitativos o funcionales de los componentes participantes, da lugar a procesos hemorrágicos o procesos trombóticos.

### - PADECIMIENTOS HEMORRÁGICOS<sup>22</sup>

Los términos, enfermedad o síndrome hemorrágico, se han aplicado a la presencia de sangrado (o a la posibilidad potencial de sangrar), más intenso y/o de mayor duración, que el que se observaría en una persona normal o promedio, sometida a una situación traumática comparable, determinado por una alteración en el mecanismo de la hemostasia. Una persona normal requiere que una acción traumática alcance cierto grado de intensidad, para que le cause hemorragia, la intensidad y duración del sangrado guardan una relación evidente con las características del traumatismo; en cambio, el paciente con una alteración de la hemostasia, presenta hemorragia aun en ausencia de un traumatismo o con traumatismos de poca intensidad, con pérdida de sangre en mayor cantidad y/o de mayor duración. Como la alteración afecta todo el organismo, el sangrado tiene o puede tener múltiples localizaciones, lo que constituye otra diferencia con el sangrado por lesión local de un vaso.

La distinción entre enfermedad y síndrome hemorrágicos, se debe, a que la primera es una entidad patológica, en la que se han definido su etiopatogenia, el cuadro clínico y sus variantes, las complicaciones, el tratamiento y el pronóstico. En cambio, el síndrome está constituido por una serie sistematizada de manifestaciones hemorrágicas, que obedecen a diferentes causas, por lo que su evolución, pronóstico y tratamiento, varían en forma importante de un enfermo a otro.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

**CLASIFICACIÓN:** Los padecimientos hemorrágicos pueden ser adquiridos o hereditarios. Estos últimos son importantes en pediatría, porque se descubren durante la infancia. También se clasifican según el sector anormal de la homeostasia en:

- Alteraciones vasculares (Púrpuras vasculares)
- Alteraciones plaquetarias (Púrpuras trombocitopénicas)
- Alteraciones de las proteínas de la coagulación (Hemofilia)
- Alteración en otros sistemas relacionados (Inmunológico, Renal)

Es importante hacer notar que en un defecto hereditario de las plaquetas o de un factor de la coagulación, la alteración, ocupa el lugar central en la patogenia de las manifestaciones; en cambio, en las formas adquiridas, es muy frecuente que coincidan varias alteraciones. Es esencial no exagerar ni minimizar la importancia de la evaluación clínica del paciente que sangra. La valoración cuidadosa puede señalar el origen hereditario o adquirido del proceso. Para que los estudios de laboratorio proporcionen las máximas ventajas en términos de tiempo y dinero, deben suplementar y no suplantar al interrogatorio y la exploración clínica minuciosos.

### **CARACTERÍSTICAS DE LOS CUADROS HEMORRÁGICOS HEREDITARIOS:**

Las petequias son típicas alteraciones vasculares o plaquetarias; son hemorragias capilares puntiformes o mucho más grandes, aparecen y desaparecen en brotes y son más conspicuas en las áreas de mayor presión venosa como los miembros inferiores y las regiones sometidas a compresión por cinturones. La hemorragia articular (hemartrosis) es casi diagnóstica de las coagulopatías hereditarias, en particular la hemofilia A. En los individuos con coagulopatías, la hemorragia postraumática suele ser tardía, por ejemplo, después de la extracción de una pieza dentaria, el sangrado podría detenerse por completo, reaparecer al cabo de algunas horas y persistir a pesar del empleo de vasoconstrictores y taponajes. Este fenómeno, podría explicarse por la función hemostática adecuada temporaria del tapón hemostático, aún cuando la coagulación es deficiente.

### **CARACTERÍSTICAS DE LOS CUADROS HEMORRÁGICOS ADQUIRIDOS:**

La hemorragia generalizada podría ser un signo prominente de muchas patologías adquiridas que abarcan todos los campos de la medicina. En general, las manifestaciones son menos serias que en las formas hereditarias y en el cuadro clínico predomina la enfermedad de base, más que el sangrado. Los fármacos también pueden inducir coagulopatías, la lista de aquellos que son responsables de trombocitopenia es cada vez más larga, en particular la aspirina, que deteriora la función plaquetaria y provoca alteraciones de las pruebas de laboratorio.

La trombosis fue descrita por primera vez en 1856 por Virchow, quien propuso desde entonces la relación de tres factores:

- a) Cambios en la pared del vaso sanguíneo;
- b) Cambios en la coagulación sanguínea y;
- c) Cambios en el flujo sanguíneo.

Hasta la fecha siguen vigentes y se les conoce como la "triada de Virchow". El equilibrio entre estos tres factores condicionan básicamente, la homeostasis hemostática. Su desequilibrio determinará, según la preponderancia de cada uno de ellos, la formación de un trombo arterial o venoso. La activación de la coagulación está relacionada con las características del flujo y de las condiciones trombogénicas de las superficies. Es probable que la interacción de un flujo bajo con la pared venosa, produzca una importante activación del mecanismo de coagulación; en cambio, frente a una superficie no procoagulante en un sistema de alto flujo como el arterial, los mecanismos de formación del trombo dependan del depósito de plaquetas (la participación de las plaquetas se estableció a finales del siglo XIX).

Pero esta simplificación del mecanismo trombogénico es esencialmente didáctica, se debe admitir que muchos factores han de incidir en la triada mencionada para romper el equilibrio entre los mecanismos de trombo-resistencia y de trombogénesis y demás elementos que intervienen en la formación del trombo y que se han resumido en el Cuadro 3.2.1.

Estados hipercoagulables, es un término para referir problemas clínicos en pacientes con predisposición al tromboembolismo. Así, hipercoagulabilidad se define con base en dos situaciones:

1. Presencia de anomalías de laboratorio o condiciones clínicas asociadas a riesgo mayor para desarrollar trombosis, conocidos como estados pretrombóticos.
2. Situaciones clínicas con trombosis recurrentes sin un factor predisponente reconocido.

Los estados hipercoagulables se clasifican en primarios y secundarios:

- Los primarios implican defectos fijos y persistentes tanto en el sistema de la coagulación como en el fibrinolítico; de origen genético y con tendencia familiar. Los fenómenos trombóticos pueden ser asintomáticos y diagnosticados por datos de laboratorio, o bien precipitados por factores clínicos. Ejemplos son, deficiencia de AT III, Deficiencia de proteínas C y S, Disfibrinogenemia y la presencia de AL.

- Los secundarios son un grupo diverso de coagulopatías complejas, en las cuales el mecanismo fisiopatológico es difícil de precisar. Los principales ejemplos incluyen: anomalías de la coagulación y de la fibrinólisis, anomalías de las plaquetas y anomalías del vaso sanguíneo y reología



## ANTICOAGULANTE LÚPICO

(inmovilización, obesidad, senectud, estado postquirúrgico, prótesis cardiaca, vasculitis, enfermedad oclusiva crónica, hiperviscosidad, etcétera). Los estados hipercoagulables de mayor frecuencia son los asociados a malignidad, al embarazo y al uso de anticonceptivos.

### Factores que intervienen en la formación del trombo

- . - Lesión endotelial
- . - Productos liberados por el endotelio
- . - Plaquetas
- . - Eritrocitos
- . - Monocitos
- . - Sistema de coagulación
- . - Inhibidores de la coagulación
- . - Sistema fibrinolítico
- . - Inhibidores de la fibrinólisis
- . - Factores hemorreológicos

Cuadro 3.2.1. - Factores que intervienen en la formación del trombo

### LOS FACTORES DE TROMBOGÉNESIS

El endotelio, con una extensión de más de 1000 m<sup>2</sup> es un órgano con múltiples funciones reguladoras relacionadas con la coagulación, la fibrinólisis, la inflamación, con los fenómenos de proliferación celular, con modificaciones del flujo sanguíneo a través de su capacidad de inducir contracción y relajación, en la transferencia activa de sustancias metabólicas entre la sangre y el medio extravascular, etc. El endotelio es naturalmente, una superficie no trombogénica y su integridad condiciona su capacidad funcional relacionada con la hemostasia, la cual está dirigida hacia dos aspectos fundamentales: Evitar la hemorragia y prevenir la trombosis. La lesión endotelial pone en juego mecanismos por medio de los cuales el organismo trata de limitar una eventual pérdida de sangre. Esos mismos mecanismos determinan la formación local del trombo y favorecen el comienzo y la evolución de la placa aterosclerótica. Ante un daño endotelial, la interrelación del subendotelio con las plaquetas, los mecanismos de coagulación y fibrinólisis y la participación de otros elementos formes circulantes, constituyen la base fisiopatológica de la trombosis. En la trombogénesis los mecanismos de coagulación intrínseca y extrínseca, las modificaciones del sistema fibrinolítico y la activación plaquetaria juegan, como es de suponer un papel central.

MECANISMOS DE TROMBÓISIS

La lesión del endotelio vascular es el punto de inicio en la patogénesis de la trombosis y la arteriosclerosis. La magnitud de la lesión determinará una respuesta distinta ya que puede producir una activación y/o liberación de sustancias diferentes desde el endotelio, las plaquetas o los mecanismos de coagulación. Se inicia pues una serie de etapas sucesivas que corresponden a una hemostasia normal y también son el inicio de la trombosis. Pero no siempre la lesión interesa al colágeno vascular, muchas veces, las condiciones del vaso han sido modificadas por la enfermedad y reaccionan de modo diferente al de un endotelio sano. Las lesiones endoteliales pueden ser producto del tabaquismo, la hipertensión o reacciones inmunológicas localizadas en los vasos sanguíneos. Se han descrito tres tipos de lesión vascular: Consúltese el Cuadro 3.2.2.

TIPO DE LESIÓN	MECANISMO DE LESIÓN	PROTEÍNA AFECTADA
TIPO I. - Alteración funcional sin cambios morfológicos significativos.	Acumulación de lípidos: Moderada. Depósito de plaquetas: No Proliferación de células musculares: Mediana	Glucosa-aminoglicanos, Trombomodulina, PGI <sub>2</sub> , EDRF, t-PA
TIPO II. - Denudación endotelial con lesión de la íntima	Acumulación de lípidos: ?. Depósito de plaquetas: Escasa Proliferación de células musculares: Moderada	PAI-1, Fibronectina, Vitronectina, Tromboxano, Trombospondina.
TIPO III. - Denudación endotelial con lesión de la íntima y la media	Acumulación de lípidos: ?. Depósito de plaquetas: Moderada Proliferación de células musculares: Extensa	TROMBINA

Cuadro 3.2.2. Tipos de lesión vascular.

Es probable que ante una alteración del Tipo I, el endotelio que conserva sus características normales, ponga en juego los mecanismos de tromborresistencia ya que, al sólo verse afectada la íntima, no prevé situación de hemorragia pero sí la posibilidad de trombosis. Los mecanismos de coagulación no están comprometidos y no habría formación de trombina ni compromiso plaquetario. En el tipo II la lesión ha interesado la íntima y los mecanismos de tromborresistencia dejan lugar a los de trombogénesis para conjugar una eventual hemorragia. Las plaquetas se adhieren y agregan en el lugar de la lesión, se activan los mecanismos de coagulación hay formación de trombina y liberación de sustancias adhesivas y proagregantes. La liberación de PAI-1 produce la inhibición de la fibrinólisis para consolidar el coágulo en vías de formación. En el tipo III la formación de trombina es de máxima

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

importancia ya que la lesión interesa planos más profundos y las posibilidades de hemorragia, desde el punto de vista de la homeostasis hemostática son más acentuados. También acentuados la activación plaquetaria y los mecanismos de coagulación.

La heparina y el sulfato de heparán inhiben el crecimiento celular y este último se constituiría en el factor antiproliferativo natural del vaso. La AT III, neutraliza la capacidad que tiene la trombina de inducir la proliferación celular de las células musculares lisas. La heparina potencia este efecto inhibitorio de la AT III. El estudio anatomopatológico de las lesiones en el infarto agudo de miocardio y angina, han permitido establecer algunas circunstancias particulares en el mecanismo trombogénico: La activación de la coagulación a través del factor tisular y la activación plaquetaria son factores importantes en la formación del trombo que sigue a la ruptura de una placa aterosclerótica.

El flujo a través de la zona estenosada determina modificaciones en las distintas capas del endotelio vascular, que condicionan localmente un estado trombogénico, ésto es, fenómenos hemorreológicos: La presión sanguínea dentro de la arteria ejerce una fuerza radial que es contrarrestada por la pared arterial para mantener sus características físicas. Existe una relación entre el radio de la arteria y la presión intraarterial, siendo mayor ésta, cuanto mayor es aquella. De ahí que el diámetro aumentado de un aneurisma conlleve un aumento de la presión intra-arterial y puede terminar, finalmente, en la ruptura aneurismática.

La activación de los diferentes sistemas y de la pared arterial que participan en el mecanismo de trombosis da lugar a la aparición y/o incremento de la concentración plasmática de ciertos productos derivados de esa activación y que pueden constituir marcadores de trombosis capaces de ser detectados por métodos sensibles de laboratorio, como los que se muestran en el cuadro 3.2.3.

GENERACION DE TROMBINA	ACTIVACION PLAQUETARIA	ACTIVACION DE LA FIBRINOLISIS	LESION ENDOTELIAL
Fragmento 1+2 Fibrinopeptido A Complejos de trombina-antitrombina III	Tromboxano A2 Factor plaquetario 4 Beta trombomodulina	Dimero D	Activador tisular del plasminógeno (t-PA) Factor de Von Willebrand Proteína C

Cuadro 3.2.3 Marcadores de trombosis.

Para emplear estos marcadores en la orientación de un probable cuadro trombótico debe tenerse presentes factores como:

- Efecto de dilución.- La concentración de los productos derivados de la trombosis, la cual puede ser alta en la zona afectada, ha de sufrir una

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

dilución importante relacionada con la volemia plasmática del paciente al difundirse en el sistema vascular.

- Neutralización "*in situ*":- Algunos marcadores como el t-PA, son neutralizados "*in situ*" por su inhibidor el PAI-1 por lo que su actividad dependerá de la actividad del inhibidor

La oclusión total de un vaso, como sucede en el infarto agudo del miocardio, impedirá la expresión periférica de cambios producidos en el lugar de la oclusión.

Pero el crecimiento del trombo está limitado por una secuencia de factores que aparecen como reguladores de la hemostasia. En primer lugar las condiciones hemorreológicas han de modificar la concentración de las enzimas pretrombóticas por arrastre y dilución; segundo el TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) que es el único inhibidor del complejo FVIIIa/Factor Tisular que se forma durante la activación del sistema extrínseco de la coagulación y de FXa, actúa.

## - INHIBIDORES PATOLÓGICOS DE LA COAGULACIÓN<sup>23,24</sup>

Los inhibidores patológicos de la coagulación o anticoagulantes circulantes o anticoagulantes circulantes anormales o inhibidores adquiridos de la coagulación, son "componentes endógenos anormales" que generalmente, impiden la coagulación. Son habitualmente inmunoglobulinas y pueden ser autoanticuerpos. El anticoagulante circulante puede afectar a la coagulación, ejerciendo su función inhibitoria sobre:

- Un factor de la coagulación, inhibiendo su actividad procoagulante (sería un antifactor o inhibidor específico)
- Interfiriendo la formación de complejos activadores (fosfolípidos), ésto es, actúan contra ciertos lugares de reacción de la cascada de la coagulación.

En algunos casos, su presencia se debe a una respuesta inmune normal, como en el caso de las deficiencias congénitas de factores.

Los inhibidores patológicos de la coagulación pueden clasificarse en:

- Inhibidores de factores de coagulación e,
- Inhibidores de interferencia (Anticuerpos antifosfolípidos e inhibidores de la transformación fibrinógeno-fibrina).

Las manifestaciones clínicas provocadas por estos inhibidores adquiridos son variables, dependiendo del tipo de inhibidor, intensidad de su actividad, factores inhibidos, etc. Generalmente están asociados a una enfermedad de base, pero también pueden hallarse en personas sanas. Muchas veces, es la primera manifestación biológica, precediendo en meses o años a la enfermedad que lo produce.

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

Los anticoagulantes circulantes son infrecuentes en niños. Se encuentran en pacientes con LES o linfomas o en quienes sufren reacciones a la penicilina. Se han descrito inhibidores en niños después de infecciones virales recurrentes. Los inhibidores que suelen aparecer después de una infección viral, tienden a desaparecer después en pocas semanas o meses. Los inhibidores que se observan en relación con una enfermedad subyacente desaparecen con el tratamiento del proceso primario.

Los inhibidores contra factores de coagulación específicos más frecuentes suelen afectar a los factores VIII, IX u XI. Están dirigidos contra sitios o áreas (epitopes) de la molécula, necesarias para desarrollar su función. Pueden aparecer en pacientes con déficit congénitos por sensibilización a la proteína isóloga, que no poseen y que reciben con las transfusiones. En otros casos, su aparición está relacionada a tratamientos con ciertas drogas (penicilina, sulfonamidas, isoniazida, fenotiazina, etc.), neoplasias, enfermedades autoinmunes o con alteraciones inmunológicas. El TTPa está alargado y no se corrige añadiendo plasma normal. La determinación de factores específicos, identifica al factor afectado.

## ANTICOAGULANTE LÚPICO<sup>25,26,27,28,29</sup>

El inhibidor más frecuente contra un lugar de reacción es el denominado Anticoagulante Lúpico, también llamado Anticoagulante de tipo Lupus; pertenece al grupo de los anticuerpos antifosfolípidos, anticuerpos dirigidos contra ciertos fosfolípidos o tal vez contra ciertos grupos químicos (fosfodiéster) presentes en los fosfolípidos. Su actividad se manifiesta interfiriendo la unión a las superficies fosfolípidicas de los factores X y II y especialmente del FV, impidiendo la formación del complejo protrombinasa, complejo activador de la protrombina. Esto provoca una interferencia no específica de todas las pruebas de coagulación en las que intervienen los fosfolípidos.

Los AL son inmunoglobulinas de tipo IgG ó IgM, fueron descritos en 1952 por Conley y Hartman, al descubrir que la adición de plasma de pacientes con LES a plasma normal, prolongaba las pruebas de coagulación, fueron más tarde Feinstein y Rapaport en 1972 quienes lo llamaron por primera vez "Anticoagulantes Lúpicos", término que resultó completamente paradójico, e infortunado para la práctica Clínica, dado que estos autoanticuerpos ni son anticoagulantes in vivo ni aparecen solamente en LES.

El AL tiene efecto anticoagulante sólo *in vitro* sin inhibir específicamente alguno de los factores de la coagulación; de manera general se acepta que están dirigidos contra fosfolípidos aniónicos, principalmente fosfatidiliserina que es el fosfolípido más activo en el mecanismo intrínseco de la coagulación. Sin embargo, algunos estudios recientes sugieren que estos

autoanticuerpos no actúan directamente contra fosfolípidos, sino contra complejos de fosfolípidos y proteínas fijadoras de fosfolípidos, como la protrombina o la B<sub>2</sub>-glucoproteína-1.

En los trabajos de Conley y Hartman, y de Feinstein y Rapaport, se describía a pacientes con LES que tenían VDRL-falso positivo y además fenómenos trombóticos. Desde entonces, muchas investigaciones se han emprendido para descifrar el mecanismo de acción de este inhibidor. Se ha reconocido, por ejemplo, que el resultado positivo de la prueba de VDRL se debe a que la cardiolipina (un fosfolípido) presente en el sustrato antigénico de la prueba para sífilis, podía absorber la actividad del Anticoagulante Lúpico. Consistiendo este hecho, una evidencia de la presencia de anticuerpos que reaccionan contra fosfolípidos.

Aunque fué descrito en pacientes con LES, luego se observó en otras enfermedades de origen autoinmune y en asociación con trastornos mieloproliferativos, neoplasias, reacciones a drogas, infecciones y también en casos de aborto recurrente o muerte fetal intrauterina.

La correlación entre la presencia de AL y la aparición de fenómenos trombóticos se observó inicialmente en enfermos con LES. Aunque su presencia no es particular de alguna enfermedad, de todas las patologías en los que se encuentra asociado, sobresale frecuentemente en LES; por esta razón, se ha llegado a considerar que el AL puede pronosticar el desarrollo de una enfermedad autoinmune en el futuro, si es que no está diagnosticada en el momento de la determinación.

La particularidad de este tipo de inhibidor, es que no provoca manifestaciones hemorrágicas, a sus portadores, al contrario, se encuentran con un alto riesgo en desarrollar episodios trombóticos. La terapia con heparina o anticoagulantes orales, no causa complicaciones hemorrágicas.

Con respecto al posible mecanismo implicado en la asociación entre el inhibidor lúpico y un alto riesgo de sufrir eventos trombóticos, se ha señalado que el inhibidor podrá dañar el endotelio por interacción con los fosfolípidos de la membrana, aunque otros autores sugieren que el inhibidor actúa disminuyendo la producción de prostraciclina por la pared celular.

De estas complicaciones se ha confirmado que la trombosis arterial es la más frecuente, prácticamente cualquier territorio puede ser afectado, sin embargo, los sitios más involucrados son las arterias cerebrales, las arterias periféricas de extremidades inferiores o superiores, retina y aorta. Siguiendo a éstas en frecuencia, se encuentran los eventos trombóticos venosos, presentándose en venas superficiales y profundas de miembros inferiores, renales, hepáticas, vena central de la retina, cava superior e inferior y no es rara la complicación con tromboembolia pulmonar. La aparición de cualquiera de estas complicaciones, como es de suponerse, conlleva consecuencias

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

desastrosas en la integridad del paciente, por ello, si se alerta, es posible tomar medidas para evitarlas. No se estaría tratando la enfermedad de base, pero se está evitando que se anexas complicaciones.

Para su detección, organismos internacionales, como el Subcomité de Inhibidores de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis, han recomendado criterios de diagnóstico de laboratorio<sup>30,31,32</sup>, que hasta el momento, representan los requisitos que todo laboratorio debe buscar cumplir; los criterios se muestran en el cuadro 3.2.4.

---

### *CRITERIOS RECOMENDADOS PARA EL DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO DE ANTICOAGULANTE LÚPICO*

(Subcomité de Inhibidores Adquiridos de SITH)

1. Prolongación de una prueba de coagulación dependiente de fosfolípidos.
2. Evidencia de inhibición demostrada por estudios de mezcla.
3. Naturaleza o dependencia de fosfolípido confirmada.
4. Falta de inhibición específica a un factor de coagulación.

---

Cuadro 3.2.4. Criterios de laboratorio para determinar AL.

El Subcomité para la estandarización de la determinación de AL de la Sociedad internacional de Hemostasia y Trombosis también estableció las siguientes recomendaciones como guía para el diagnóstico de AL:

- a) Los plasmas del paciente y del testigo deberán estar libres de plaquetas, mediante doble centrifugación o filtración.
- b) Se deben emplear dos o más pruebas de escrutinio reconocidas como sensibles para detectar AL, por lo menos una deberá tener el principio de empleo de concentraciones bajas de fosfolípidos.
- c) La existencia del inhibidor debe ser bien documentada mediante los efectos que el plasma del paciente tiene sobre el testigo (estudio de mezcla alargado)
- d) La identificación del Anticoagulante Lúpico es posible con la existencia de pruebas de rastreo anormales junto con los estudios confirmatorios,

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

demonstrando la existencia de la dependencia de fosfolípidos por parte del inhibidor.

e) Las pruebas confirmatorias deberán ser en lo posible basadas en el mismo principio en que resultaron anormales las pruebas de escrutinio (Consúltese el cuadro 3.2.5)

f) Las pruebas de coagulación de rutina se deberán de emplear para evaluar la posibilidad de otra alteración diferente a AL, que sea capaz de resultar en pruebas de coagulación anormales.

g) Las pruebas inmunológicas de anticuerpos antifosfolípidos, que son frecuentemente positivos en pacientes con AL, no deberán considerarse como pruebas confirmatorias.

PRUEBA DE ESCRUTINIO	PRUEBA CONFIRMATORIA
.- Pruebas basadas en el TTPa	Neutralización con plaquetas Fosfolípidos hexagonales Dilución de fosfolípidos
.- Tiempo del veneno de Russell diluido	Tiempo de Russell Vesículas de plaquetas Neutralización con plaquetas
.- Tiempo veneno de serpiente de Taipán .- TP diluido .- Tiempo de coagulación con Caolín	Neutralización con plaquetas Diluciones con fosfolípidos Vesículas de plaquetas Fosfolípidos bovinos

Cuadro 3.2.5. Recomendación para la selección de prueba confirmatoria.

Las pruebas de escrutinio que generalmente se emplean<sup>33,34,35</sup>, se encuentran en el cuadro 3.2.6

1. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada
2. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada – alterando el Tiempo de incubación
3. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada Diluida
4. Tiempo de coagulación del veneno de la Víbora de Russell
5. Tiempo de Coagulación del veneno de la Serpiente de Taipán
6. Tiempo de Protrombina Diluida (o Prueba de Inhibición de la Tromboplastina Tisular)
7. Tiempo de coagulación con Caolín
8. Tiempo de coagulación con Sílice

Cuadro 3.2.6.- Pruebas de escrutinio para determinar AL.

Estas pruebas no son muy diferentes entre sí, en un inicio en realidad se trató sólo de modificaciones de una en especial, ésto es, desde que el AL



fue descrito en 1952 se han investigado un gran número de pruebas que señalen su presencia, siendo el TTPa la que entonces lo señalaba, se descubrió que realizando modificaciones a ésta se obtenía mayor sensibilidad, se modificó el Tiempo de incubación<sup>36</sup>, del rutinario de tres minutos, se permite la incubación una hora; disminuyendo la concentración de la fracción fosfolipídica ya no sólo en el TTPa si no también en el TP, se busca ACENTUAR el efecto del AL si éste se encuentra, y mejor aún si en la prueba están AUSENTES fosfolípidos externos al sistema de coagulación, se definió el Tiempo de Caolín, más tarde con más estudios, e intentando demostrar el sitio de inhibición en la secuencia de la cascada de coagulación, se aplicaron los venenos de las serpientes primero de Russell y luego de Taipán<sup>37</sup>.

Naturalmente dentro de este desarrollo se ha investigado modificaciones más profundas, como se demostró que el Tiempo de Caolín se mejora si el activador a emplearse no sea el caolín si no Sílica -Silice-, el primero posee un tamaño de partícula de 0.1- 4 $\mu$  mientras que la sílica micronizada (microcristalina) es menor a 0.1 $\mu$ , lo que permite mayor área de activación para los factores de coagulación, apoyando con esto la acentuación del efecto del AL, sin embargo este compuesto es de 2 a 3 veces más costoso que el caolín (100g de caolín cuestan \$2.87; 100g de sílica \$9.85). También el TPD ha presentado modificaciones, donde se ha desarrollado Tromboplastina completa por tecnología recombinante, y aunque ya se comercializa, en un laboratorio donde no se realizan más de 50 pruebas diarias en promedio de TP, resultaría incosteable.

Se observa que la mayoría de las pruebas de escrutinio se fundamentan en la disminución de la concentración de fosfolípidos, excepto el veneno de la Vibora de Russell que activa directamente al FX en la cascada de coagulación<sup>38,39</sup>, esta misma acción la efectúa el veneno de la Serpiente de Taipán, pero su prueba emplea la combinación de dos proteínas coagulables (Textarin/Ecarin) lo que hace a la prueba de mayor costo.

Las pruebas anteriores son reconocidas de gran sensibilidad, por este hecho, para complementar la determinación, es necesario combinarla con otras pruebas de alta especificidad, como la Prueba de Neutralización de Fosfolípidos en Fase Hexagonal.

Aunque el AL es un importante indicador de riesgo de trombosis, no es el único estudio que puede señalarlo, la determinación de AnACI, es más utilizada actualmente, para descartar este riesgo<sup>40,41</sup>. El empleo de dicha determinación obedece a que se realiza por métodos como el radio inmunoensayo en fase sólida o por la técnica del ELISA, ambas son 200 a 400 veces más sensibles que las pruebas de AL; tienen la ventaja de ser más fácilmente reproducibles y estandarizadas, además que se realizan en suero y no con plasma como el AL.

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto por el que los anticuerpos antifosfolípido (AL y AnACI) participan en el desarrollo de fenómenos trombóticos, y por lo tanto en condiciones óptimas, debe buscarse los anticuerpos antifosfolípidos por ambas determinaciones.

Al contar con métodos precisos para reconocer anticuerpos antifosfolípidos, se obtuvo adicionalmente, la definición de una nueva entidad nosológica, el Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido.

La conducta terapéutica en los pacientes con inhibidor lúpico depende de la enfermedad de base. El inhibidor responde, en general, al tratamiento con corticosteroides instituidos en el esquema de pacientes con LES<sup>42</sup>.

### 3.3. - AUTOINMUNIDAD

---

El sistema inmune, como todos los sistemas fisiológicos es un sistema regulado. Más aún, dada la peligrosidad potencial de un sistema especializado en la homeostasis y en la protección del individuo mediante la agresión contra lo externo, es lógico suponer que, junto con la evolución de cada una de sus funciones efectoras agresivas, hayan desarrollado mecanismos capaces de regularlas. Un concepto fundamental que hoy es aceptado universalmente, fue que el sistema inmune no reconoce y agrede directamente lo "extraño", si no que su funcionamiento está basado en el reconocimiento constante y no agresivo de lo "propio"<sup>13</sup>.

Se denomina autoinmunidad a la respuesta inmune contra componentes propios, debido a la presencia de linfocitos T o B autorreactivos. Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos y/o linfocitos T sensibilizados contra diferentes macromoléculas del organismo, que en individuos normales son reconocidas como propias y por lo tanto no desencadenan respuesta. La capacidad del sistema inmune para discriminar entre lo propio y lo extraño es adquirida en primer lugar en el Timo, durante la maduración de los linfocitos T.

La respuesta inmune a antígenos propios puede observarse en individuos normales, pero la potencialidad para desarrollar autoinmunidad está controlada por diferentes mecanismos: Linfocitos T supresores, bloqueo de receptores celulares por antígenos circulantes, etc.

Debe diferenciarse, por lo tanto, la respuesta autoinmune de la enfermedad autoinmune. La respuesta autoinmune es la demostración de la existencia de autoanticuerpos que reconocen antígenos propios o la reactividad de linfocitos sensibilizados contra un antígeno propio; esta respuesta puede estar asociada o no con una enfermedad autoinmune. En medicina clínica hay numerosos ejemplos de producción de autoanticuerpos sin que estén relacionados con una enfermedad autoinmune. Ciertos desórdenes de origen infeccioso y que tienden a la cronicidad, drogas o envejecimiento pueden estar asociados a una forma controlada de autoinmunidad. Luego de la eliminación del agente infeccioso o de la supresión de la droga las manifestaciones de autoinmunidad desaparecen. En cambio en las enfermedades autoinmunes, la presencia de autoanticuerpo o linfocitos T sensibilizados producen lesión tisular y disfunciones de los órganos blanco, mecanismos totalmente descontrolados y generalmente irreversibles.

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

---

Los desórdenes autoinmunes han sido ampliamente estudiados, éstas enfermedades son multifactoriales y en cada una de ellas puede estar comprendido más de un mecanismo de inducción. Se conocen numerosos factores que pueden contribuir al desarrollo de una enfermedad autoinmune, donde sin duda es el Factor genético, el más investigado.

Existe una amplia gama de enfermedades autoinmunes (Tabla 3.3.1), en cuyos extremos se encuentran las enfermedades órgano-específicas y no órgano-específicas, y las que quedan comprendidas entre estos dos tipos poseen características de ambos.

---

Órgano-específicas	Tiroiditis de Hashimoto
	Mixedema primario
	Tirotoxicosis
	Anemia perniciosa
	Gastritis atrófica autoinmune
	Enfermedad de Addison
	Diabetes Mellitus insulino-dependiente
	Miastenia gravis
	Pénfigo vulgar
	Esclerosis múltiple
	Anemia hemolítica autoinmune
	Púrpura trombocitopénica idiopática
	Artritis reumatoidea
	Dermatomiositis
Esclerodermia	
No órgano específica (sistémicas)	Lupus eritematoso Sistémico (LES)

---

Tabla 3.3.1. - Enfermedades autoinmunes más comunes

- En las enfermedades órgano-específicas, la respuesta autoinmune primaria es dirigida contra un único órgano, glándula o tejido, por tal motivo a esta categoría de enfermedades, también se la puede dividir tomando en cuenta el órgano blanco involucrado, como el sistema hematopoyético.
- Las enfermedades autoinmunes no órgano-específicas, también llamadas sistémicas, se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos circulantes que pueden ser patogénicos o no y están dirigidos contra autoantígenos presentes en todo el cuerpo, no siendo específicos de un órgano.

ETIOPATOGENIA.- Los factores genéticos más importantes involucrados en estas enfermedades son los relacionados con los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y los genes de las inmunoglobulinas.

La asociación genética relacionada con los antígenos del MHC no es sorprendente ya que las enfermedades autoinmunes son dependientes de los linfocitos T y las respuestas autoinmunes que dependen de los linfocitos T están restringidas por el MCH. Por tal motivo, el MCH puede afectar la predisposición a adquirir enfermedades autoinmunes por varios mecanismos.

La asociación de enfermedades autoinmunes con alotipos e idiotipos de inmunoglobulinas presenta un cuestion fundamental, la relacionada al origen de los anticuerpos, o sea: si estos provienen o no de genes de la línea germinal, si son el reordenamiento de genes diferentes de aquellos que codifican para anticuerpos de una respuesta inmune normal, o si son el resultado de mutaciones somáticas de genes de la línea germinal; la mayoría de los investigadores opinan que, tanto los autoanticuerpos patogénicos, como los autoanticuerpos naturales y los anticuerpos contra antígenos extraños, se originan por el reordenamiento de los mismos genes, ya que no se ha demostrado de manera fehaciente la existencia de una restricción genética para la síntesis de autoanticuerpos. La pregunta que cabe hacer es si los autoanticuerpos naturales son o no los precursores de los autoanticuerpos patogénicos. El estado actual de los conocimientos indican que autoanticuerpos naturales y autoanticuerpos que causan patologías se originan a partir de diferentes líneas celulares. Es evidente que la respuesta autoinmune es un complicado proceso que requiere una serie de factores, que incluyen activación de células T, pérdida de la supresión, efectos hormonales y factores genéticos.

Cada enfermedad autoinmune tiene una característica inmunopatogénica que involucra uno o más mecanismos de daño celular. La patología de la enfermedad está determinada por el antígeno o el grupo de antígenos contra los que está dirigida la respuesta autoinmune y el mecanismo por el cual el tejido que presenta dicho antígeno es dañado.

Una clasificación muy difundida (Tabla 3.3.2) de las enfermedades autoinmunes se basa en el mecanismo inmunopatogénico responsable de la lesión observada en las mismas.

La interacción antígeno-anticuerpo puede producir diferentes tipos de lesión tisular según que los anticuerpos estén dirigidos contra antígenos de la célula o se encuentren formando parte de complejos inmunes. El primer caso se observa en anemia hemolítica, debido a la presencia anticuerpos contra células de la sangre. En el caso de la lesión producida por complejos inmunes, los anticuerpos tipo IgG e IgM se combinan con el antígeno y forman complejos inmunes que fijan complemento. Los complejos inmunes pueden estar formados por antígenos solubles o antígenos que forman parte de la estructura de un tejido o una célula. Los complejos inmunes solubles pueden

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

producir nefritis por su depósito en el endotelio de los vasos o en el glomérulo renal.

### **1. LESIÓN MEDIADA POR ANTICUERPOS**

#### **1.1 Anticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie celular**

Anemia Hemolítica Autoinmune  
Púrpura Trombocitopénica Autoinmune  
Fiebre reumática aguda

#### **1.2 Lesión producida por complejos inmunes**

Glomerulonefritis  
Lupus eritematoso Sistémico

### **2. LESIÓN MEDIADA POR LINFOCITOS T**

Diabetes Mellitus insulino dependiente  
Artritis reumatoidea

---

Tabla 3.3.2. - Clasificación de las enfermedades autoinmunes de acuerdo al mecanismo inmunopatogénico involucrado.

Los factores del complemento, además de los monocitos y granulocitos, son atraídos a los sitios de depósito de los complejos inmunes, provocando muerte celular. Ese mecanismo es el principal responsable de las lesiones observadas en LES<sup>44,45</sup>.

### 3.4. - DIAGNÓSTICOS ABORDADOS

---

#### HEMOFILIA<sup>46</sup>

Definición.- Las hemofilias constituyen un grupo de enfermedades transmitidas genéticamente, en las cuales hay una deficiencia específica de un factor de la coagulación en el sistema intrínseco de la coagulación. Se transmite como un carácter recesivo ligado al cromosoma X, por tanto afecta a los varones. En la hemofilia clásica (Hemofilia A), hay una ausencia parcial o completa de globulina antihemofílica (Factor VIII), mientras que en la enfermedad de Christmas (Hemofilia B), el factor IX, está bajo.

Frecuencia y Genética.- La incidencia de hemofilia es probablemente de 20 por 100,000 varones; 1 por 10,000 de toda la población y en la forma grave 1 caso por 25,000 varones. En México se ha estimado un caso por 77,000 habitantes. La hemofilia A es ocho veces más común que la enfermedad Christmas.

Fisiopatología.- La deficiencia del Factor VIII o del FIX interrumpe la secuencia fisiológica de la activación intrínseca de la protrombina, por tanto impide o dificulta la formación del coágulo de fibrina, conduciendo a la alteración de la coagulación de la sangre, que genera las manifestaciones clínicas de hemorragia.

Diagnóstico.- Criterios clínicos: El diagnóstico se establece cuando se cuestiona lo siguiente: a) Presencia de hemorragias múltiples, b) No hay una relación entre el agente involucrado como causal y la magnitud, duración e intensidad de la hemorragia. Posteriormente, se debe plantear si se trata de una enfermedad hemorrágica adquirida o hereditaria.

Criterios de laboratorio: El diagnóstico se efectúa por medio de pruebas de hemostasia, que incluyen, TS (normal), cuenta plaquetaria (normal), TP (normal), TTPa (alargado significativamente), TT (normal) y fibrinógeno (normal). Un TTPa prolongado, el FVIII o el FIX se encuentran en un nivel aproximado de 30 a 40%, se administra entonces plasma normal y, en caso de corregirse el problema, hay bases para considerar que el sujeto cursa con un defecto de la coagulación (FVIII ó FV). Si la corrección se lleva a cabo con suero normal y hay efecto positivo, debe sospecharse una deficiencia de FIX o FVII. Una vez realizado lo anterior, se cuantifica el factor deficiente, en este caso FVIII o FIX, para determinar la gravedad de la hemofilia y clasificar a los pacientes.

**ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE<sup>46</sup>**

**Definición.-** Se denomina anemia hemolítica a todo aquel proceso en que se produce anemia, es decir, reducción de las cifras de hemoglobina por debajo de los valores de referencia, como resultado de la destrucción excesiva de eritrocitos. Cuando en los mecanismos de destrucción excesiva de eritrocitos participan anticuerpos, se puede hablar de anemia hemolítica inmunológica. Los anticuerpos responsables de aumentar la destrucción de los eritrocitos pueden ser autoinmunes, es decir, producidos por el paciente contra sus propios eritrocitos. El trastorno es primario cuando no existe otra enfermedad subyacente a la que se asocie y es secundario, cuando se relaciona con otras entidades, entre las que destacan los síndromes linfoproliferativos.

**Fisiopatología.-** Diversos agentes y procesos patológicos con capacidad para lesionar los eritrocitos pueden causar su destrucción prematura; entre todos ellos, los definidos con mayor claridad son los anticuerpos asociados a las anemias hemolíticas de origen inmunitario. La característica más importante de este grupo de enfermedad es la positividad en la prueba de Coombs que permite detectar la presencia de una cubierta de inmunoglobulinas o de componentes del complemento en la superficie del eritrocito. En la práctica pediátrica la anemia hemolítica de origen inmunitario más importante es la enfermedad hemolítica del recién nacido, secundaria a la transferencia de anticuerpos maternos; en este sentido, se trata de una anemia hemolítica isoimmunitaria. Otras anemias hemolíticas inmunitarias tienen un carácter autoinmunitario (Consúltese el cuadro 5.1) y pueden ser idiopáticas o secundarias a infecciones, enfermedades inmunitarias, inmunodeficiencias, tumores o fármacos.

En las anemias hemolíticas autoinmunitarias, los anticuerpos patológicos se dirigen contra los eritrocitos, pero no se ha demostrado cuáles son los mecanismos patogénicos. Los autoanticuerpos pueden originarse por una respuesta inmunitaria inadecuada frente a un antígeno de los hematíes o bien frente a algún otro epitopo antigénico similar a alguno de los antígenos eritrocitarios. Una explicación alternativa es que un agente infeccioso podría alterar la membrana del eritrocito de forma que ésta se convierta antigénica para el huésped.



I.	Anemia hemolítica autoinmunitaria por autoanticuerpos que reaccionan en calor: Primaria (idiopática) Secundaria. Procesos linfoproliferativos Enfermedades del tejido conjuntivo (especialmente LES) Tumores no linfoides Enfermedades inflamatorias crónicas
II.	Anemia hemolítica autoinmunitaria por autoanticuerpos que reaccionan en frío Enfermedad por crioaglutininas primaria (idiopática) Enfermedad por crioaglutininas secundaria Procesos linfoproliferativos Infecciones Hemoglobinuria paroxística por frío Primaria (idiopática) Sífilis congénita o terciaria Síndromes virales
III.	Anemia hemolítica inmunitaria inducida por fármacos Adsorción hapteno/fármaco Complejo ternario (inmunitario) Inducción de autoanticuerpos verdaderos

Cuadro 5.1. Enfermedades caracterizadas por destrucción de los eritrocitos mediante mecanismos inmunitarios.

**Diagnóstico.**

*Criterios clínicos:* Las anemias hemolíticas autoinmunitarias pueden presentar dos patrones clínicos generales. El primero es una forma transitoria aguda que dura tres a seis meses, aparece sobre todo en niños de 2 a 12 años de edad y representa el 70 – 80% de los casos. Suele estar precedida de una infección, habitualmente respiratoria. Comienza bruscamente con postración, palidez, ictericia, fiebre y hemoglobinuria. El bazo suele estar agrandado y es la zona en la que se produce principalmente la destrucción de los hematíes recubiertos por IgG. La otra forma sigue una evolución prolongada y crónica y es más frecuente en lactantes y niños mayores de 12 años. La hemólisis se mantiene durante meses o años, con un 10% de mortalidad atribuible a la enfermedad general subyacente.

*Criterios de laboratorio:* En muchos casos, la anemia es profunda con cifras de hemoglobina inferiores a 6 g/dL. Hay una considerable esferocitosis. Más del 50% de los eritrocitos circulantes pueden ser reticulocitos y suele haber hematíes nucleados. El recuento de plaquetas suele ser normal a veces, hay simultáneamente una púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (síndrome de Evans, de pronóstico desfavorable). La prueba de Coombs directa es positiva.

**PÚRPURA TROMBOCITOPENICA IDIOPÁTICA<sup>46</sup>**

Definición.- Es un trastorno hemorrágico adquirido de naturaleza inmunitaria y caracterizado por trombocitopenia aislada, púrpura típicamente petequeial, ausencia de hepatoesplenomegalia y casi siempre presencia de abundantes megacariocitos en médula ósea. En la actualidad se sabe que es producida por autoanticuerpos plaquetarios que inducen la destrucción de las plaquetas por el sistema mononuclear fagocítico, a pesar de esto, se sigue denominando en forma común a esta entidad patológica como "Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI)"

Causas y Fisiopatología.- La forma usual de púrpura en niños es aguda, de corta duración y la mayoría de las veces ocurre 10 a 21 días después de una infección viral. Esta vinculación ha sido documentada posterior a varicela, rubéola, faringitis, así como después de vacunación con virus vivos atenuados. Desde 1951 en que Harrington realizó experimentos con suero de pacientes con PTI aplicándolo a voluntarios sanos con reproducción de la enfermedad, se sospecho la naturaleza inmunitaria de ésta. Actualmente se sabe que hay producción de IgG que reacciona contra antígenos de la membrana plaquetaria, principalmente dirigidos hacia la glucoproteína (Gp) IIb/IIIa y a la Gp Ib/IX y en menor proporción contra fosfolípidos y glucolípidos, las IgG se fijan a las plaquetas por la fracción Fab y posteriormente se retiran de la circulación por el sistema fagocítico, predominantemente del bazo, pero la remoción puede ocurrir también en hígado, médula ósea, etcétera. Existen diferentes teorías en cuanto al origen de la producción de anticuerpos antiplaquetarios, de las más verosímiles es la de un factor infeccioso viral, el cual puede:

- Producir reactividad inmunitaria cruzada entre ciertas proteínas de la membrana plaquetaria y antígenos exógenos víricos o de otra naturaleza;
- Producción de anticuerpos antiidiotipo, y
- Modificación de las proteínas de la membrana plaquetaria inducida por el propio virus con formación de nuevos antígenos.

Diagnóstico.- Criterios clínicos: Aproximadamente 80% de los niños cursa con la forma aguda de la enfermedad, que se autolimita en el transcurso de cuatro a seis semanas. Su aparición es más frecuente en niños de dos a cinco años de edad y en los meses de invierno y primavera. El diagnóstico clínico de PTI se funda en la presencia de tres manifestaciones cardinales:

- a) Fenómenos hemorrágicos en piel;
- b) Hemorragias mucosas espontáneas, y
- c) Hemorragias viscerales.

Criterios de Laboratorio: Es indispensable contar con una biometría hemática completa que incluya cuantificación plaquetaria y, si es posible, el volumen

plaquetario medio (VPM). Habitualmente lo más llamativo es la trombocitopenia inferior a  $100 \times 10^9/L$ ; de acuerdo con su déficit la púrpura se puede clasificar como leve cuando la cifra de plaquetas es mayor de  $50 \times 10^9/L$ , por lo regular no se encuentran signos ni síntomas; moderada con cuenta de plaquetas entre 30 y  $50 \times 10^9/L$ , cursa con mínimas manifestaciones de sangrados; grave con plaquetas de 10 a  $30 \times 10^9/L$  con aparición de hemorragias espontáneas y púrpura marcada; muy grave cuando la cifra de plaquetas es menor de  $10 \times 10^9/L$  con sangrados espontáneos en piel y mucosas y un riesgo alto de hemorragia en sistema nervioso central. La morfología de las plaquetas suele estar alterada con aumento del VPM, lo cual manifiesta mayor liberación de plaquetas inmaduras a la circulación y, por tanto, su destrucción periférica exagerada. El nivel de hemoglobina se altera de acuerdo con la intensidad de las hemorragias que haya presentado y la cuenta de leucocitos suele ser normal o ligeramente aumentada con linfocitosis. El estudio de médula ósea está indicado principalmente para descartar otros trastornos que también cursan con trombocitopenia, como la anemia aplásica y las leucemias agudas. Habitualmente se observa una celularidad normal con aumento del número de megacariocitos en diferentes estadios de maduración que pueden o no producir plaquetas. El TP y el TTPa son normales, la prueba de retracción del coágulo y el tiempo de sangrado pueden estar alterados aunque en general es innecesario cuantificarlos para apoyar el diagnóstico de PTI. La cuantificación de anticuerpos antiplaquetarios confirma la existencia de un mecanismo inmunitario en la patogenia de la enfermedad; sin embargo, hasta el momento no ha tenido utilidad ni para el pronóstico ni para la terapéutica. Cuando los sujetos evolucionan con la forma crónica de la enfermedad, es necesario realizar estudios inmunitarios ya que aproximadamente 3% de este grupo de pacientes desarrollará una enfermedad autoinmunitaria sistémica.

Tratamiento.- Ya que 80 a 90% de los sujetos tienen remisión espontánea sin recurrencia de la enfermedad, el tratamiento inicial debe consistir en medidas generales que limiten la actividad con el fin de disminuir el riesgo de traumatismos, principalmente en la cabeza, durante el tiempo que dure la trombocitopenia grave. La esplenectomía se reserva para las formas crónicas que responden hasta en 80% de los casos al eliminar el sitio de mayor destrucción plaquetaria. La transfusión de plaquetas se reserva para los casos de hemorragias muy graves que pongan en peligro la vida, debe tenerse en cuenta que las plaquetas transfundidas se destruirán a la misma velocidad que las plaquetas del sujeto.

**COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA<sup>46</sup>**

**Definición.-** La coagulación intravascular diseminada (CID) es un trastorno de adquirido de la hemostasis, de causa múltiple, con manifestaciones clínicas variables y de consecuencias potencialmente devastadoras. Es un proceso patológico que actúa como mecanismo intermediario de enfermedad, aparece en el seno de una entidad patológica subyacente y resulta de una activación anómala del mecanismo de la coagulación, cuya consecuencia clínica es la formación de trombos de fibrina en la microcirculación con oclusión de los vasos pequeños. Esto último conduce a trastornos hemodinámicos, grados diversos de isquemia, necrosis tisular, eventualmente disfunción orgánica múltiple y activación secundaria conjunta de la fibrinólisis.

**Fisiopatología.-** El proceso patológico que subyace en CID es la activación masiva de la coagulación y de la fibrinólisis que sobrepasan a los mecanismos normales de regulación. La vía final común de esta entidad patológica es siempre la formación de trombina circulante y de plasmina que producen de manera simultánea trombosis y fibrinólisis. De hecho se ha comprobado que el cociente plasmina/trombina es alto en los enfermos con Leucemia Aguda Promielocítica (FAB M-3) lo que determina aumento de la fibrinólisis, mientras que en la sepsis existe un incremento del cociente trombina/plasmina lo cual ocasiona un predominio de fenómenos trombóticos. Aunque hasta la fecha no se dispone de un conocimiento preciso de los mecanismos patogénicos desencadenantes en los distintos procesos patológicos, se pueden hacer algunas generalizaciones. La endotoxemia, la suspensión de partículas insolubles, la presencia de complejos inmunitarios circulantes o cualquier alteración que acarrea una lesión endotelial pueden generar CID por activación anómala del mecanismo de coagulación en la primera etapa. La infección es la causa más frecuente de CID.

**Diagnóstico.- Criterios clínicos:** Las manifestaciones clínicas suelen ser la expresión de la enfermedad subyacente e incluyen fiebre, hipotensión arterial, acidosis, hipoxemia, estado de choque o la expresión de un amplio espectro de fenómenos trombóticos y hemorrágicos con evidencia de disfunción orgánica múltiple o el resultado de las manifestaciones de ambos procesos. Si el mecanismo múltiple desencadenante es agudo y origina una CID fulminante (coagulopatía por consumo descompensada), en la que el ritmo de consumo de los factores de coagulación y plaquetas es más rápido que la velocidad de síntesis, el cuadro clínico se caracteriza por hemorragias, esto no sucedería si la enfermedad de base produce CID crónica (Coagulopatía por consumo compensada) en la que el ritmo de consumo es similar al ritmo de formación. La septicemia es un proceso sistemático que se caracteriza por una coagulopatía por consumo generalizada. La hemorragia es el síntoma clínico

más evidente en la CID aguda. Las manifestaciones tromboticas suelen ser igualmente importantes. Los trombos en la microcirculación afectan fundamentalmente los órganos con un riego sanguíneo más rico (afección rena).

*Criterios de laboratorio:* El diagnóstico de CID depende de la perspicacia del médico, para sospecharla, se basa en las manifestaciones clínicas y los exámenes de laboratorio. Hay que tener presente que la gran variabilidad de las manifestaciones clínicas y de los exámenes de laboratorio se debe a la complejidad de la fisiopatología y a las numerosas enfermedades que pueden desencadenar CID. Los criterios para establecer el diagnóstico son:

- Identificación de enfermedad de base (mecanismo desencadenante)
- Cuadro Clínico compatible con CID (diátesis hemorrágica y fenómeno trombotico)
- Pruebas de laboratorio de escrutinio alteradas y confirmatorias positivas.

El TP y el TTPa y el tiempo de tromboplastina están prolongados en la mayoría de los casos de CID fulminante y el recuento plaquetario suele estar considerablemente disminuido al igual que el fibrinógeno, y de hecho los enfermos que tienen cifras de fibrinógeno inferiores a 50 mg/dL generalmente cursan o están predispuestos a hemorragias graves. Los PDF y los monómeros de fibrina (MF) son también positivos. Los PDF indican la biodegradación del fibrinógeno o fibrina por la plasmina, por lo que es un parámetro sensible de la fibrinólisis, mientras que los monómeros de fibrina indican activación de la trombina, pero ninguna de las dos pruebas es específica de la CID. Sin embargo la cuantificación de los dímeros D, que son PDF, es una prueba específica de CID, ya que sirve para confirmar que se ha formado trombina y fibrina. El frotis de sangre periférica puede mostrar eritrocitos por los filamentos de fibrina. La sospecha de CID moderada (compensada) se basa en la presencia de dímeros D, PDF o MF y alteración de una o varias de las pruebas de escrutinio, ya que las manifestaciones clínicas suelen ser mínimas.

Tratamiento.- Los tres componentes principales de la asistencia global de la CID son:

- Tratar la enfermedad de base (eliminación del mecanismo desencadenante).
- Administrar tratamiento de sostén.
- Métodos específicos encaminados a controlar el proceso de CID (anticoagulación sistémica).

**SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO**<sup>46,47</sup>

**Definición.**- Se trata de un síndrome de histiocitosis clase II, en la infancia. Las histiocitosis son trastornos, aunque raros, pueden ser graves en su expresión clínica, poseen en común una destacada proliferación y acumulación de células del sistema de monocitos macrófagos. Se ha desarrollado una clasificación sistemática de las histiocitosis de la infancia (Cuadro 5.2). La clasificación diagnóstica se basa en los hallazgos anatomopatológicos.

Clase I	Clase II	Clase III
Histiocitosis de células de Langerhans	Linfohistiocitosis eritrofagocitaria familiar	Histiocitosis maligna
	Síndrome de hemofagocitosis	Leucemia monocítica aguda

Cuadro 5.2 Clasificación de las histiocitosis infantiles

Las histiocitosis de Clase II se caracterizan por la acumulación de células procesadoras de antígenos, es decir, de macrófagos.

**Fisiopatología.**- La existencia de lesiones celulares mixtas tanto de las histiocitosis clase I como de las clase II sugiere que puede tratarse de trastornos de la regulación autoinmunitaria, resultante tanto de una estimulación antigénica inusual y no identificada como de una respuesta inmunitaria celular anormal y en cierto modo defectuosa. El síndrome hemofagocítico puede ser desencadenado por un amplio espectro de agentes infecciosos, virus, hongos, protozoos y bacterias, por lo general en el contexto de una inmunodeficiencia.

**Diagnóstico.**- Criterios clínicos: Presentan un proceso morboso generalizado, casi siempre con fiebre, pérdida de peso e irritabilidad. Los niños afectados suelen ser menores de cuatro años. La exploración física revela a menudo hepatoesplenomegalia, síntomas de afectación del Sistema nervioso central. Criterios de laboratorio: Los hallazgos de laboratorio presentan hiperlipidemia, hipofibrinogenemia, enzimas hepáticas elevadas, niveles extremadamente elevados de receptores de interleucina-2 solubles circulantes liberados por los linfocitos activados y, en ocasiones, citopenias.

**Tratamiento.**- En el síndrome hemofagocítico cuando es posible demostrar y tratar eficazmente la infección, el pronóstico es bueno sin ningún tratamiento específico. Sin embargo cuando no es posible demostrar una infección susceptible de tratamiento, se recomienda etopósido. Se ha postulado que, por su efecto citotóxico sobre los macrófagos, el etopósido interrumpe el proceso hemofagocitario y la acumulación de macrófagos, situaciones ambas que contribuyen a la patogenia del síndrome.

**Definición.-** El LES es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por vasculitis multisistémica con necrosis fibrinoide en la pared de los vasos sanguíneos. Su incidencia ocurre entre 1 a 6 por cada 100,000 niños. Se presenta más frecuentemente en el sexo femenino y aumenta conforme avanza la edad; por arriba de los diez años su incidencia es cinco veces mayor.

**Fisiopatología.-** Aún no se conoce con exactitud; se piensa que la enfermedad tiene un origen multifactorial. Se ha observado lo siguiente:

**Componente hereditario.-** Aproximadamente 12% de los sujetos tiene antecedentes familiares de parientes de primer grado.

**Componente infeccioso.-** Se ha relacionado el cuadro con infección por mixovirus

**Componente hormonal.-** La prevalencia en mujeres, la exacerbación con la ingestión de estrógenos y el embarazo ponen de manifiesto esta relación.

**Componente farmacológico.-** El uso de medicamentos como hidralacina, difenilhidantoína, alfametildopa, clorpromazina, isoniazida, procainamida, penicilina, estreptomina, grisofulmina, fenilbutazona, metiluracilo y propiltiuracilo desencadenan el cuadro clínico.

**Relación con el Antígeno principal de histocompatibilidad humano (HLA).** El haplotipo de HLA DR2 o DR3 se presenta significativamente en estos pacientes.

**Alteraciones del complemento.-** La deficiencia de C1 y C2 se correlaciona con esta enfermedad.

**Trastornos de la inmunidad.-** Hay una desproporción de subgrupos de células T auxiliaadoras sobre las supresoras, lo cual da como resultado aumento de la producción de citocinas e hipergammaglobulinemia; esto produce autoanticuerpos sobre diversos tejidos y linfocitos, formando complejos inmunolesivos antígeno-anticuerpo-complemento, que se depositan en vasos de pequeño calibre.

#### Diagnóstico.

**Criterios clínicos:** El LES en la actualidad se debe estudiar como un síndrome con expresión clínica común, la cual debe basarse en criterios que no han sufrido modificaciones. Cuatro o más criterios (Consúltese el cuadro 5.3) permiten establecer el diagnóstico.

**Criterios de laboratorio:** En forma general, biometría hemática, con ésta se obtienen datos de leucopenia, linfopenia y plaquetopenia. También se obtienen pruebas de función renal, como el EGO, en el cual se halla hematuria macroscópica y microscópica con cilindruria y proteinuria. Se cuantifica la proteinuria de 24 horas para comprobar pérdida de proteínas y se solicita depuración de creatinina y pruebas de VDRL (falsamente positivas que se

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

asocian con síndrome antifosfolípidos). También se realizan pruebas de perfil inmunitario en búsqueda de autoanticuerpos:

- Anticuerpos anti-DNA (tipo IgM-IgG)
- Anticuerpos antinucleares
- Se busca el fenómeno de lupus eritematoso, que está dado por destrucción de la cromatina nuclear por IgG en los leucocitos, formando el complejo DNA, IgG y complemento.
- Complemento hemolítico.- 95% es positivo. Su disminución puede indicar incremento de su utilización para formar los inmunocomplejos

Criterio	Definición
Exantema malar	Eritema fijo, plano o alto, sobre la eminencia malares, que tiende a no afectar los pliegues nasolabiales.
Exantema discoide	Placas eritematosas altas con descamación queratósica, adherente y taponamiento folicular, puede haber cicatrización en lesiones antiguas
Fotosensibilidad	Exantema cutáneo, por reacción a la luz solar
Úlceras bucales	Úlceración bucal o nasofaríngea, por lo general indolora
Artritis	Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones periféricas; caracterizada por hipersensibilidad, inflamación o derrame.
Serositis	Pleuritis o pericarditis
Trastorno renal	Proteinuria persistente de más de 0.5 g/día o más de tres cruces. Cilindro celulares.
Trastorno neurológico	Crisis convulsivas o psicosis.
Trastorno hematológico	Anemia hemolítica, leucopenia (menos de $4 \times 10^9/L$ ) en dos o más cuantificaciones.
Trastorno inmunitario	Preparación de células LE + anti-DNA en títulos normales o anti-Sm o resultado falso positivo en pruebas treponémicas durante al menos seis meses.
Anticuerpos Antinucleares	Título normal de éstos por inmunofluorescencia o su equivalente.

Cuadro 5.3. Criterios clínicos de LES



INTRODUCCIÓN.

En la actualidad, el espectro de reumatoinmunología pediátrica se ha enriquecido con la descripción clínica y de laboratorio de una entidad denominada Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos (SAAF). Este padecimiento descrito inicialmente en adultos que sufren LES también se ha observado en la población infantil con esta enfermedad, con algunas similares y con otros padecimientos, no necesariamente de origen inmunitario. Los anticuerpos antifosfolípidos corresponden a una familia heterogénea de autoanticuerpos los cuales generalmente son de isotipos IgG y/o IgM, su diferencia estriba en el antígeno específico al que se relacionan, entre los cuales se han identificado: la B<sub>2</sub>-Glicoproteína I, la protrombina, la anexina V, proteínas del sistema cininógeno-caliceína, sistema proteína C y S, entre otros. El SAAF es una entidad autoinmune con características clínicas definidas, asociadas a autoanticuerpos medibles; dado que el fosfolípido más usado en la prueba diagnóstica es la cardiolipina, se le llama también "Síndrome anticardiolipina". El SAAF ocurre con frecuencia en pacientes con una enfermedad autoinmune de base, generalmente LES. En este contexto, la entidad es conocida como SAAF secundario. Cuando se detecta SAAF sin patología autoinmune subyacente se denomina SAAF primario. Las características clínicas del SAAF se han definido en dos grupos de criterios para su diagnóstico:

Criterios clínicos mayores.— Aborto recurrente, muerte fetal en el 2º-3º trimestre, trombosis venosa, trombosis arterial, trombocitopenia.

Criterios clínicos menores.— Prueba de anticuerpos antitreponema (VDRL) falso positivo, anomalías de válvulas cardíacas, Livedo reticularis, migraña, úlceras de piernas, mielopatía, corea.

El diagnóstico de SAAF requiere de al menos un criterio clínico mayor más una prueba de anticuerpos antifosfolípidos positivo (AL ó AnACI). Realizado el diagnóstico, se establece la terapia anticoagulante adecuada al paciente.

Se ha sugerido que los anticuerpos antifosfolípidos pueden predisponer principalmente a los niños al desarrollo de isquemia cerebral, por lo que dichos anticuerpos deberán ser estudiados de forma sistemática cuando se investiga la patogenia de la trombosis arterial en niños sin causa predisponente conocida.

Dos grupos de anticuerpos antifosfolípidos han sido identificados en el laboratorio por diferentes métodos. El primero denominado anticoagulante lúpico, cuya expresión más conocida es la prolongación "in vitro" de las

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos, tales como el TTPa, TVRd y algunas veces el TP. El segundo es clásicamente referido como anticuerpo antifosfolípido e incluye, a los anticuerpos anticardiolipina, antifosfatidilserina, antifosfatidiletanolamina, que son determinados por métodos tipo ELISA.

Definición.- Cuando no es factible precisar la existencia de algún padecimiento autoinmunitario o infeccioso que explique las alteraciones descritas, se denomina SAAF primario (SAFP). Cuando el cuadro clínico se presenta durante la evolución de una enfermedad inmunitaria (LES) o en el transcurso de un trastorno infeccioso específico, se habla de SAAF secundario (SAPS).

Fisiopatología.- Aunque el mecanismo fisiopatológico de este trastorno sigue siendo un rompecabezas, es posible señalar que las características básicas son la consecuencia de un estado de hipercoagulabilidad poco habitual que predisponen a sucesos trombóticos, venosos o arteriales, los cuales se pueden localizar en cualquier parte del organismo. A pesar de que cada día se agrega nueva información aún no es factible establecer el conocimiento exacto del mecanismo fisiopatológico del síndrome y mucho menos su causa.

### Diagnóstico

Criterios clínicos: En virtud de que el cuadro clínico puede ser muy variable ha sido necesario desarrollar criterios, aunque estos parámetros se han fijado a partir de la experiencia obtenida en adultos, conforme se adquieran más conocimientos de esta enfermedad en los niños, seguramente serán modificados con el tiempo. Consideraciones generales:

- El síndrome puede observarse a cualquier edad pediátrica y se ha señalado una frecuencia mayor en pacientes del sexo femenino.
- El hallazgo de anticuerpos antifosfolípidos en familiares aparentemente sanos de sujetos con LES, probablemente están en alto riesgo de desarrollar el síndrome aunque no es factible precisar cuándo puede ocurrir.
- Existe una clara vinculación entre la presencia del isotipo IgG con trombocitopenia y del isotipo IgM con anemia hemolítica, aunque en ocasiones estos hechos no ocurren así.

La propuesta de Alarcón Segovia y colaboradores (en adultos) puede servir de guía diagnóstica. En ella se conjugan datos clínicos y de laboratorio.

Tratamiento.- En virtud de que la causa del síndrome aún no se ha precisado, la terapéutica tiende a ser sintomática y dependerá del tipo de expresión clínica existente. En caso de SAFS, se trata fundamentalmente la enfermedad de base.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gran cantidad de estudios han sido descritos para la determinación de AL, pero hay considerables controversias acerca de cuál es el más apropiado, sumándose a esto se presenta gran variabilidad preanalítica y analítica en la ejecución de estos estudios a nivel mundial. Existen varias razones para esta situación, la principal es la dificultad para la evaluación de la validez y exactitud de la determinación, se requiere, de inicio, la comparación con un estándar ideal, o prueba de referencia, esto es, un procedimiento utilizado para diagnosticar, con certeza una enfermedad, y que en el caso de los anticuerpos antifosfolípidos no se ha definido. Enseguida, cuestionando la especificidad, se debe considerar que se ha demostrado, que la cardiolipina presente en el sustrato antigénico de la prueba para sífilis, puede absorber la actividad de AL, pone en evidencia la posibilidad de reacción cruzada entre las determinaciones de AnACI y AL. De esta manera la determinación de un anticuerpo antifosfolípido no asegura o exenta la presencia del otro; por lo que la determinación directa por radioinmunoensayo o ELISA de AnACI no puede ser considerada como prueba de referencia para Anticuerpos antifosfolípidos.

En años recientes se ha incrementado el interés por estudiar la posible relación entre algunas manifestaciones clínicas en pacientes con enfermedades autoinmunes<sup>53</sup>, principalmente LES y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y ya que la presencia de AL define en mayor proporción el riesgo de trombosis tanto arterial como venosa, una solicitud de anticuerpos antifosfolípido, no sólo debe contemplar determinación de AnACI, sino también de AL.

Este inhibidor de la coagulación, paradójicamente a su nombre, induce estados de hipercoagulabilidad<sup>54</sup>, complicando el cuadro inicial, donde se desarrolla. De esto se desprende la importancia de detectar AL en pacientes con sospecha de trombosis, no sólo porque podría ser el origen de las complicaciones, sino que también se encuentra relacionado con el pronóstico de la enfermedad de fondo. Así mismo detectarlo en pacientes sin enfermedad autoinmune, pero con datos, como la aparición de eventos trombóticos recidivantes, sirven de apoyo para establecer una entidad denominada Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos Primario<sup>55,56</sup>, para el cual el diagnóstico temprano también resulta importante, pues si bien no es posible eliminar o evitar el desarrollo del trastorno inmunitario, es posible evitar las manifestaciones trombóticas y sus complicaciones, que son causa de morbilidad y mortalidad.

Es por esto, que se han emprendido trabajos en todo el mundo para estandarizar la determinación de AL, sin embargo aún no se ha conseguido por completo, pero dentro de este proceso han resultado en 1991 por el Grupo

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

de trabajo de AL de la Sociedad Británica de Hematología y el Subcomité para la Estandarización de AL de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, recomendaciones y criterios de diagnóstico por laboratorio, para determinar e identificar este anticuerpo antifosfolípido inhibidor de la coagulación, con una revisión en 1995.

La implementación de los procedimientos recomendados ya se ha realizado en muchos laboratorios de nuestro país, así como la publicación de diversos estudios que presentan su utilidad en la evolución o resolución de padecimientos autoinmunes. La experiencia a estos aspectos ha sido obtenida en adultos, por lo que se hace necesario conocer lo que ocurre en niños<sup>57</sup>.

Por estas razones, con el presente trabajo, se busca establecer los procedimientos que cumplan y sean apropiados al laboratorio de Hematología del INP, para realizar la determinación de AL.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Establecer el perfil de pruebas sensibles y específicas, que permita, detectar Anticoagulante Lúpico, en el Instituto Nacional de Pediatría.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Implementar los siguientes estudios especiales de coagulación:
  - .-Tiempo de Tromboplastina Parcial activada de incubación prolongada (TTPa inc 1H)
  - .- Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada sensible a la presencia de anticoagulante lúpico (TTPa-AL)
  - .- Tiempo de caolín (TK)
  - .- Prueba de Inhibición de Tromboplastina Tisular (TPd)
  - .- Tiempo del veneno diluido de Russell (TVRd)
  - .- Prueba de Neutralización de Fosfolípidos en Fase Hexagonal
  
2. Establecer criterios de interpretación de los estudios especiales de coagulación, en la población atendida en el Instituto Nacional de Pediatría.
  
3. Verificar la utilidad y factibilidad de cada estudio como integrante del perfil, en la determinación de Anticoagulante Lúpico.
  
4. Proponer el perfil de estudios especiales de coagulación, confiable práctico y económico a aplicarse en la determinación de Anticoagulante Lúpico.

## **VI. TIPO DE ESTUDIO**

- 1) **OBSERVACIONAL**, se determinó la presencia de Anticoagulante Lúpico, sin modificar los factores que intervienen en su desarrollo.
- 2) **DESCRIPTIVO**, se estudió solo la población del Instituto Nacional de Pediatría.
- 3) **TRANSVERSAL**, se determinó la presencia de AL una sola vez.
- 4) **PROSPECTIVO**, los resultados de la determinación de Anticoagulante Lúpico se captaron para cumplir los objetivos de este trabajo.

### VARIABLES

1. Dependiente: Presencia de anticoagulante lúpico en la población a reunir.
2. Independiente: Sensibilidad y especificidad de las pruebas coagulométricas para determinar AL.

## VII. HIPÓTESIS

### HIPÓTESIS NULA:

La determinación de un inhibidor complejo de la coagulación, por el empleo de pruebas básicas es insuficiente, si se aplican pruebas de alta sensibilidad y mayor especificidad, se conseguirá identificar dicho inhibidor y se contará con un estudio que apoye un diagnóstico clínico.

### HIPÓTESIS ALTERNA:

La determinación de un inhibidor complejo de la coagulación, por el empleo de pruebas básicas es insuficiente, si se aplican pruebas de alta sensibilidad y mayor especificidad, no se conseguirá identificar dicho inhibidor y no se contará con un estudio que apoye un diagnóstico clínico.

## VIII. MÉTODO

### Pacientes:

Los estudios de coagulación fueron realizados en los pacientes que se reunieron para completar la meta estadística mínima (100 pacientes), y que cumplieron con los siguientes criterios:

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

I.— Que presentaran alguna de las siguientes patologías:

- Desorden autoinmune, particularmente Lupus Eritematoso Sistémico.
- Manifestaciones clínicas asociadas con la presencia de Anticoagulante lúpico.
- Antecedentes o eventos trombóticos inexplicables

II.— Que se encuentren dentro de los 1 a 18 años de vida.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

I.— Que estuvieran recibiendo tratamiento anticoagulante.

II.— Que sobrepasaran la edad.

### Muestras sanguíneas:

Fueron colectadas por venopunción con tubo VACUTAINER® (Becton Dickinson) con citrato de sodio 0.129 M (3.8%) en una proporción de nueve partes de sangre por una de anticoagulante. Se obtuvo por cada paciente, dos tubos con volumen de drenado 2.7-3 ml

### Preparación del plasma:

Se preparó plasma pobre en plaquetas por doble centrifugación a 2000g (2500 rpm) por 10 minutos a temperatura de 10°C (Si no se analizaron el mismo día de la recolección, se almacenaron a -70°C), posteriormente se separaron en dos alícuotas, una se congeló a -70°C, para realizar con ella -si se requiera- prueba confirmatoria, de lo contrario se descartó, y con la otra se realizaron los estudios de coagulación.



## ANTICOAGULANTE LÚPICO

### Población de referencia:

Los rangos de referencia para cada estudio fueron determinados previamente, por la evaluación de 30 pacientes pediátricos con estudios de coagulación "normales", que acudieron al laboratorio del Instituto para ser atendidos por el servicio de cirugía, y evaluados y autorizados por el personal médico del Servicio de Hematología.

### Pipetas:

Se trabajó con tres micropipetas automáticas: Finnpiquette Digital café, rango 40-200 $\mu$ l; Finnpiquette Digital morada, rango 200-1000 $\mu$ l y Eppendorf multipipette 4780 de 5 posiciones de selección, del equipo ST<sub>4</sub>. Se verificó la exactitud y precisión de cada una de ellas, siendo necesario recalibrar la pipeta Finnpiquette Digital café; el procedimiento se detalla en el Anexo d, verificación de la precisión y exactitud de micropipetas.

### Estudios de coagulación:

Se preparó un lote (pool) de plasmas normales, obtenido del número de pacientes "normales" que acudieron un día determinado, al Banco de Sangre del Instituto, y se almacenó en alicuotas a -70°C, empleándose como testigo en los estudios.

Se realizaron los siguientes estudios analizándose por duplicado en un coagulómetro ST<sub>4</sub> (Diagnóstica Stago):

1. Tiempo de Protrombina (TP) estándar o rutinario.
2. Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa) estándar o rutinario
3. Tiempo de Tromboplastina Parcial activada, incubación de una hora (TTPa 1H)
4. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada sensible a la presencia de Anticoagulante Lúpico (TTPa-AL).
5. Tiempo de caolín (TK)
6. Prueba de Inhibición de la tromboplastina Tisular (o Tiempo de Protrombina diluida TPD).
7. Tiempo de veneno diluido de la víbora de Russell (TVRd)
8. Prueba de neutralización de fosfolípidos en fase hexagonal (Prueba confirmatoria)

La especificación de la ejecución técnica de cada estudio se describe en el Anexo b, Pruebas coagulométricas.

Cumplida la meta estadística de captación de pacientes, se analizó la utilidad de cada una de las pruebas, por medio del análisis estadístico de las Curvas ROC.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**IX. RESULTADOS**

1. - Se implementaron seis estudios especiales de coagulación, para probar su utilidad, como un perfil en la determinación de AL, los cuales se muestran en la Tabla R1.

1)	TTPa de incubación prolongada
2)	TTPa sensible para AL
3)	Tiempo de caolín
4)	Prueba de Inhibición de Tromboplastina Tisular
5)	Tiempo del veneno diluido de Russell
6)	Prueba de neutralización de fosfolípidos en fase hexagonal

Tabla R1. Estudios especiales de coagulación implementados en el Laboratorio de Hematología, sección de coagulación, del Instituto Nacional de Pediatría.

2. - Para interpretación, se establecieron valores de referencia, expresándose en las unidades recomendadas en la literatura.

Los valores de referencia se establecieron con los resultados de un grupo de 20 niños "sanos"; en la Tabla R2, se muestran los percentiles 5 y 95 (P5 y P95) que se emplearon como márgenes de aceptación (intervalo de referencia). Se incluyen otros parámetros estadísticos importantes, como la Desviación estándar, moda, valores mínimo y máximo, con el fin de resaltar la dispersión, el resultado más frecuente y los límites inferior y superior respectivamente.

	Media	Desviación Estándar	Valor mínimo	Valor máximo	Moda	P5	P95
TTPa IH	45.4	4.47	36.2	51.8	46.0	36.5	54.4
TTP-AL	38.7	3.15	34.0	46.1	36.7	32.4	45.0
TK	88.6	10.9	74.6	110.8	85.3	66.8	110.4
TPd	82.1	8.97	69.9	104.7	83.4	64.2	100.1
TVRd	26.9	0.72	25.4	28.1	26.4	25.4	28.3
PFHx	5.2	0.85	3.9	6.4	5.6	3.5	6.9

Tabla R2. Valores de referencia de los estudios especiales de coagulación, expresados en segundos.

En la Tabla R3 se muestran los valores de referencia en la expresión recomendada en la literatura.

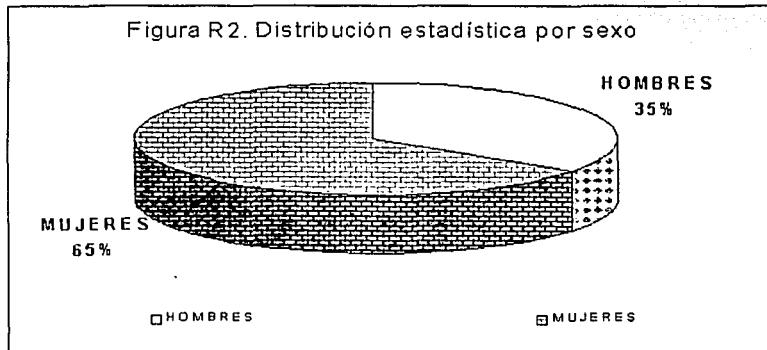
	EXPREsION	MEDIA	P5	P95
TTPa 1H	Índice de Rosner	3.7	-7.9	14.9
TTP-AL	Segundos	38.7	32.4	45
TK	Índice de Rosner	-2.0	-19.1	15.1
TPd	Cociente	1.09	0.8	1.2
TVRd	Segundos	26.9	25.4	28.3
PFHx	Segundos	5.2	3.5	6.9

Tabla R3. Valores de referencia para los estudios especiales de coagulación, en la expresión recomendada en la literatura.

En la Figura R1, se muestra el formato preliminar, que se utilizó para el manejo e interpretación de los resultados de un paciente.

3. - Se determinó la utilidad y factibilidad de cada estudio especial, al aplicarse la determinación de Anticoagulante Lúpico en un total de 114 pacientes, con siete diagnósticos distintos.

En la Figura R2, se muestra la distribución estadística obtenida por sexo.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**ANTICOAGULANTE LÚPICO**

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA  
 LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA SECCION: HEMOSTASIA Y TROMBOSIS  
 FORMATO PRELIMINAR PARA EL MANEJO INTERNO DEL LABORATORIO EN LA:

**DETERMINACION DE INHIBIDOR DE LA COAGULACION TIPO LUPICO**

\* = Datos del paciente:

Registro: \_\_\_\_\_  
 Nombre: \_\_\_\_\_  
 Servicio: \_\_\_\_\_

Fecha solicitado: \_\_\_\_\_  
 Fecha de resultado: \_\_\_\_\_

PRUEBAS	REFERENCIA	CONCLUSION
1) * TP (Tiempo de Protrombina) = _____ seg -TP Testigo (Pool de plasmas normales) = _____ seg -TP Mezcla 1:1 con Testigo = _____ seg	12 - 15 seg  Corrección	Si o No hubo Corrección*
2) *TTPA (Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada) = _____ seg -TTPA Testigo = _____ seg -TTPA Mezcla 1:1 con Testigo = _____ seg	25 - 36 seg  Corrección	Si o No hubo Corrección*
3) * TTPA incubado 1 Hora = _____ seg -TTPA Testigo incubado 1Hora = _____ seg -TTPA Mezcla 1:1 con Testigo incubado 1H = _____ seg mezcla testigo paciente I.R. = [ ( _____ / _____ ) ] [ 100 ] = _____	I.R. Igual o mayor de 15 indicativo de inhibidor de la coagulación	Negativo ó Positivo
4) *TTPA-AL (TTPA diluido y sensible a AL) = _____ seg -TTPAd Testigo = _____ seg -TTPAd Mezcla 1:1 con Testigo = _____ seg	Hasta 45 seg  Corrección	Si o No hubo Corrección*
5) * TK (Tiempo de Caolin) = _____ seg -TK Testigo = _____ seg -TK Mezcla 1:1 con Testigo = _____ seg mezcla testigo paciente I.R. = [ ( _____ / _____ ) ] [ 100 ] = _____	I.R. Igual o mayor de 15 indicativo de inhibidor de la coagulación	Negativo ó Positivo
6) * TPd (Inhibición de la Tromboplastina Tisular ó TTI) = _____ seg -TPd Testigo = _____ seg -TPd Mezcla 1:1 con Testigo = _____ seg mezcla testigo Ratio o Cociente = ( _____ / _____ ) = _____	Cociente de 1.3 o mas indicativo de inhibidor de la coagulación	Negativo ó Positivo
7) *TVRd(T, Veneno diluido de la Vibora de Russel) = _____ seg -TVRd Testigo = _____ seg -TVRd Mezcla 1:1 con Testigo = _____ seg	Hasta 28.3 seg  Corrección	Si o No hubo Corrección*
8) * Prueba de neutralización de fosfolípidos en fase hexagonal Tubo 1: _____ seg Tubo 2: _____ seg Diferencia = _____ seg	Diferencia mayor a 8 seg afirma la naturaleza anti/fosfolípida	Negativo/Positivo

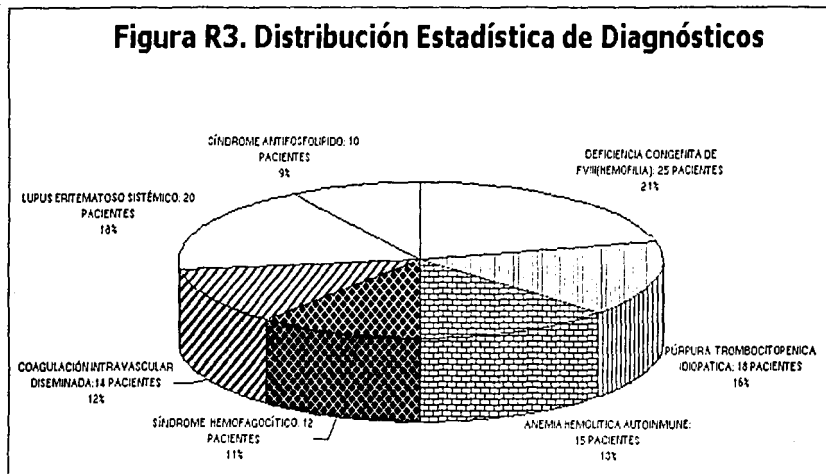
INTERPRETACION: \_\_\_\_\_

\* Se considera corregido, si el resultado del estudio en la mezcla no supera en más de cinco segundos, al valor del resultado del testigo.

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Figura R1. Formato preliminar para el manejo de los datos y resultados de un paciente en la determinación de Anticoagulante Lúpico.

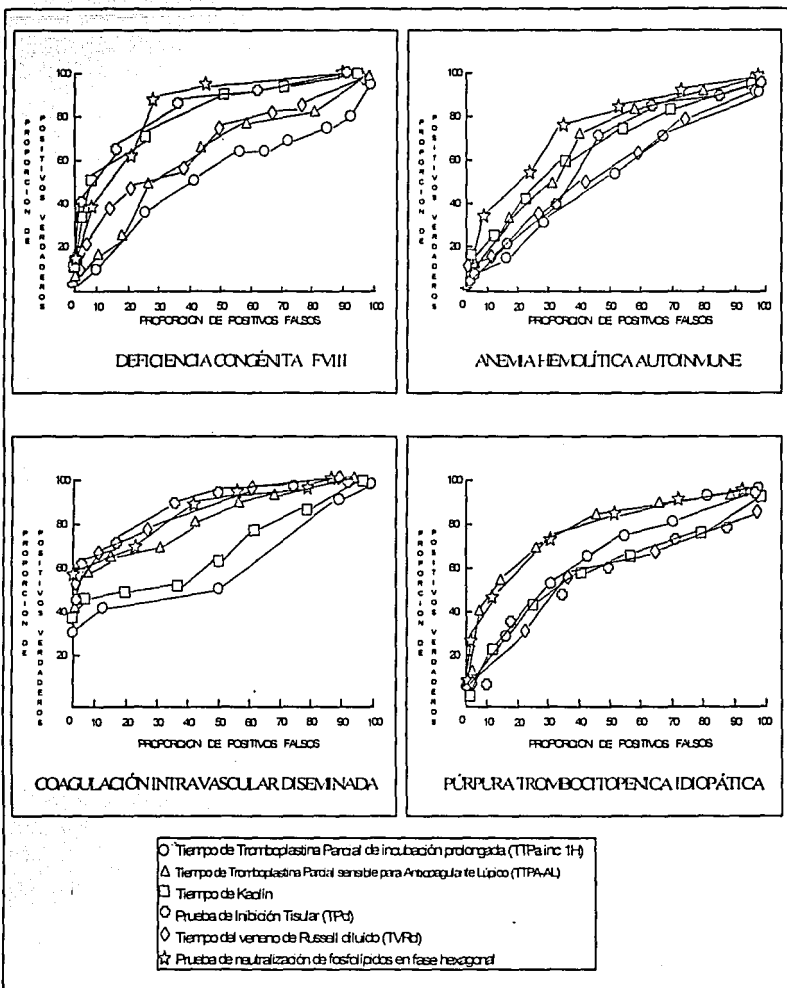
En la Figura R3, se muestra la distribución estadística obtenida, por diagnóstico.



4. - Se determinó el comportamiento de cada prueba en los distintos diagnósticos por el método de "Curvas ROC", observándose que la utilidad de las pruebas TTPa incubación de 1 Hora y el Tiempo del Veneno Diluido de Russell, es muy baja y baja, respectivamente, por lo que se descartan como pruebas útiles y factibles en la determinación de Anticoagulante Lúpico.

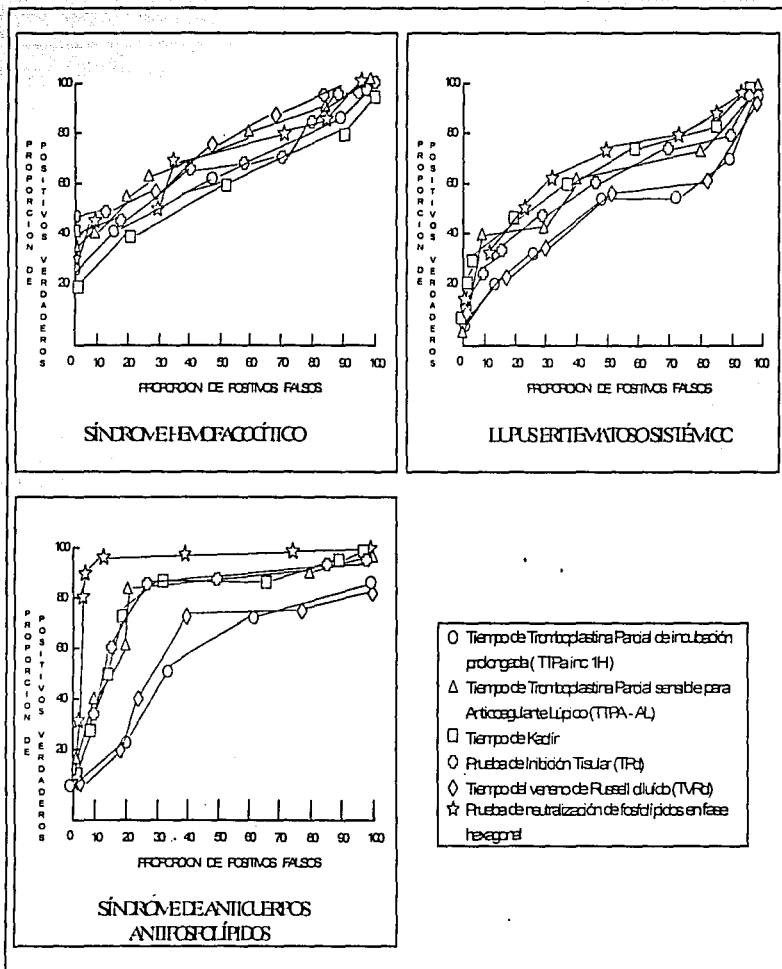
En la Figura R4 (I y II), se muestran las curvas ROC, del comportamiento de las pruebas especiales de coagulación, en los diagnósticos estudiados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

FIGURA R4 (I).- CURVAS DE CARACTERÍSTICAS DE OPERACIÓN (ROC) PARA LAS PRUEBAS ESPECIALES DE COAGULACIÓN EN LOS DIAGNÓSTICOS SEÑALADOS.



**FALTA DE ORIGEN  
TESIS CON**

FIGURA R4 (II).- CURVAS DE CARACTERÍSTICAS DE OPERACIÓN (ROC) PARA LAS PRUEBAS ESPECIALES DE COAGULACIÓN EN LOS DIAGNÓSTICOS SEÑALADOS.

# ANTICOAGULANTE LÚPICO

5. - De esta manera se integró el perfil definitivo para la determinación de Anticoagulante Lúpico y su formato final, para el manejo interno del laboratorio, el cual se muestra en la Figura R5.

INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIO DE HEMATOLOGIA SECCIÓN: HEMOSTASIA Y FORMATO PARA EL MANEJO INTERNO DEL LABORATORIO EN <b>DETERMINACION DE INHIBIDOR DE LA COAGULACION TIPO</b>			
* = Datos del Registro: _____		Fecha solicitado: _____	
Nombre: _____		Fecha de _____	
Servicio: _____			
PRUEBAS	REFERENCIA	CONCLUSION	
1) * TP (Tiempo de -.TP Testigo (Pool de plasmas -.TP Mezcla 1:1 con _____) = _____ seg = _____ seg = _____ seg	12 - 15 seg  Corrección	  Si o No hubo Corrección*	
2) *TTPA (Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada) -.TTPA Testigo _____ seg -.TTPA Mezcla 1:1 con _____ = _____ seg = _____ seg	25 - 36 seg  Corrección	  Si o No hubo Corrección*	
3) *TTPA-AL (TTPA diluido y sensible a -.TTPAd Testigo _____ seg -.TTPAd Mezcla 1:1 con _____ = _____ seg = _____ seg	Hasta 45 seg  Corrección	  Si o No hubo Corrección*	
4) * TK (Tiempo de -.TK Testigo _____ seg -.TK Mezcla 1:1 con _____ = _____ seg mezcla                      testigo                      paciente I.R. = [ ( _____ / _____ ) ( 100 ) _____ ] _____	I.R. Igual o mayor de 15 indicativo de inhibidor de la coagulación	  Negativo ó Positivo	
5) * TPd (Inhibición de la Tromboplastina Tisular ó TTI) -.TPd Testigo _____ seg -.TPd Mezcla 1:1 con _____ = _____ seg mezcla                      testigo Ratio o Cociente = ( _____ / _____ ) = _____	Cociente de 1.3 o más indicativo de inhibidor de la coagulación	  Negativo ó Positivo	
6) * Prueba de neutralizacion de fosfolípidos en fase Tubo 1: _____ Tubo 2: _____                      Diferencia = _____ seg	Diferencia mayor a 8 seg afirma la naturaleza antifosfolipida	  Negativo/Positivo	
INTERPRETACION: _____			
* Se considera corregido, si el resultado del estudio en la mezcla no supera en más de cinco segundos, al del resultado del			

Figura R5. Perfil definitivo y formato final para la determinación de Anticoagulante Lúpico en el Laboratorio de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tomar una decisión médica, es una actividad donde los resultados del laboratorio pueden tener un gran impacto. Para descartar una enfermedad, los médicos desean un resultado negativo que sea confiable; por tanto, una prueba debe tener pocos resultados negativos que sean falsos (baja proporción de falsos negativos). Para encontrar evidencias de una enfermedad, los médicos desean un resultado positivo que indique una probabilidad elevada de que el paciente tenga la enfermedad; por tanto es requerido que haya pocos resultados positivos que sean falsos (baja proporción de Falsos positivos)<sup>58</sup>.

La sensibilidad y especificidad de una prueba de laboratorio casi siempre se determina al seleccionar un grupo de pacientes que se sabe tienen la enfermedad y otro grupo que se sabe NO presentan la enfermedad y se practica el análisis de laboratorio a los dos grupos. En nuestro caso analizamos la respuesta de cada estudio especial de coagulación ante siete patologías, sugiriendo la sensibilidad y especificidad de las pruebas, por la interpretación de las curvas ROC.

### CURVAS ROC<sup>59</sup>

Una manera eficaz para mostrar la relación entre sensibilidad y especificidad para algunas pruebas, es el uso de las curvas de características de operación receptora o curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). La curva ROC es una gráfica de sensibilidad (ó índice de positivas verdaderas) en comparación con el índice de positivas falsas. Mientras una curva ROC, se localice más próxima al extremo superior izquierdo de la gráfica, es más precisa, ya que esta región indicaría que la tasa de verdaderas positivas es uno y la tasa de falsas positivas es cero. Un gráfico de esta naturaleza, se emplea para establecer un valor de corte, esto es, un valor con el cual, se define si el resultado de una prueba es positivo o negativo. Si se desea seleccionar un valor de corte estricto, se selecciona aquél punto de la curva que se encuentre en un sitio bajo y a la izquierda (menor sensibilidad, mayor especificidad); si se desea definir un criterio menos estricto, esto es, menos datos para una prueba positiva, el punto en la curva se seleccionará ubicado hacia arriba y a la derecha (sensibilidad mayor, especificidad menor).

Otra aplicación que se reconoce a esta herramienta estadística, es que son medios gráficos útiles, para comparar pruebas diagnósticas. Si la curva de una prueba está ubicada más próxima al extremo superior izquierdo de la gráfica, entonces será la prueba más precisa. Por tradición, las gráficas presentan a la proporción de falsos positivos en el eje de las abscisas (X) y la proporción de positivos verdaderos en el eje de las ordenadas (Y). Puede practicarse una prueba estadística para determinar si las curvas ROC son

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

significativamente distintas, un procedimiento usado con frecuencia es el cálculo del área por debajo de la curva.

Para la elaboración de las gráficas de este trabajo, se utilizó el programa de computo ORIGIN.

Analicemos la gráfica obtenida en el diagnóstico de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido (Figura AE1):

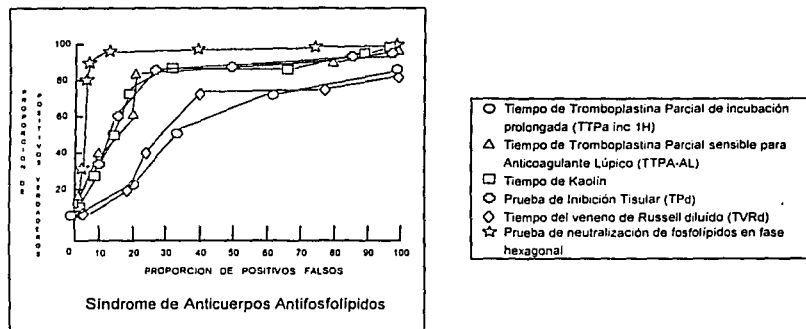


Figura AE1.- Curvas ROC para los seis estudios especiales de coagulación, en el diagnóstico de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos

Se observa que las curvas para las pruebas de TTPa incubación 1H y TVRd se encuentran ubicadas menos próximas al extremo superior izquierdo, de lo que se encuentran ubicadas el resto de las curvas; esta ubicación indica que son pruebas menos precisas para utilizarse en el Diagnóstico de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos. Para una perspectiva clínica, esto significa que para las pruebas de TTPa inc 1H y TVRd, alrededor del 20% de pacientes SIN el padecimiento, se clasificarían de manera incorrecta como “anormales” (Falsos positivos) y alrededor del 20% de pacientes con el padecimiento, se clasificarían incorrectamente como “anormales” (Proporción de positivos verdaderos baja). Estas estimaciones definen a las pruebas de TTPa inc 1H y TVRd como procedimientos diagnósticos menos sensibles y menos específicos, comparadas con el resto de las pruebas. La gráfica también informa que para este diagnóstico, las pruebas de TTPa-AL, TK y TPD son mutuamente intercambiables, ésto es, la proporción de respuesta es equivalente en las tres pruebas; para la prueba de PFHx, se observa que es la curva que se encuentra ubicada más próxima al extremo superior izquierdo en todo su trazo, aspecto que corrobora la naturaleza confirmatoria de este ensayo, señalando al inhibidor de tipo lúpico, si éste se encuentra.

IMPRESO CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

Es importante profundizar en la intercambiabilidad de las pruebas de TTPa-AL, TK y TPd, ya que esto significa que para aceptar o rechazar el diagnóstico de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido, se podría emplear alguna de las tres pruebas; es este punto, por el que se vuelve crucial, observar la respuesta de las pruebas, en los restantes diagnósticos investigados (consúltese la Figura R4 (I y II)).

En el diagnóstico de Hemofilia A, la prueba de TTPa-AL es francamente menos sensible (esto es, la proporción de positivos verdaderos disminuye considerablemente).

En el diagnóstico de Anemia Hemolítica autoinmune, la prueba de TPd, presenta considerablemente menor sensibilidad.

En el diagnóstico de CID, es franca la reducción de la proporción de sensibilidad que presenta la prueba de TK.

En los diagnósticos de Púrpura Trombocitopénica Idiopática y Síndrome Hemofagocítico, las pruebas de TK y TPd, presentan menor proporción de especificidad.

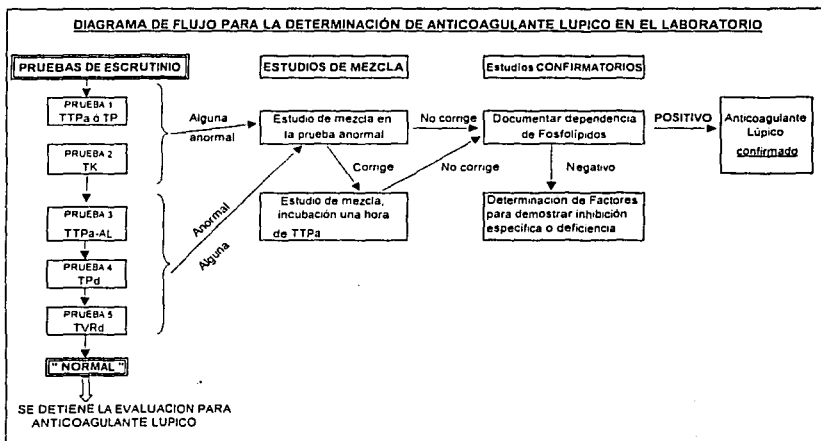
Las pruebas de TTPa inc IH y TVRd presentaron para la mayoría de los diagnósticos, el mismo comportamiento observado en el diagnóstico de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido, excepto en el diagnóstico de Síndrome Hemofagocítico, donde el comportamiento es intercambiable con el resto de las pruebas.

En el diagnóstico de LES, las pruebas no alcanzan la misma proporción de especificidad, que en los otros diagnósticos, sin embargo es aún muy buena, excepto para el TTPa inc IH y ligeramente menor para TVRd.

## XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La sección de Hemostasia y Trombosis del Laboratorio de Hematología del INP, realiza estudios rutinarios y especiales. Para estos últimos, se citan a los pacientes en días que la cantidad de muestras rutinarias se espera no sea mayor, y además para aprovechar lo mejor posible, los reactivos que se emplean para estos estudios, que por su labilidad sólo son estables el día que se preparan. El personal que se encarga de esta área posee amplia experiencia en la realización e interpretación de varias pruebas especiales, por lo que la integración, de la Determinación de AL, a su panel de pruebas especiales, no sería complicado, y sobre todo, porque la determinación de AL no requeriría adquirir metodología que no se manejara ya en el laboratorio.

Los formatos de manejo de datos que se elaboraron, buscan cumplir el diagrama de flujo que se presenta en la Figura DR1, para efectuar los estudios y cumplir con los criterios de laboratorio para determinar AL, en justa secuencia.



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Procedimiento recomendado en el II Workshop Internacional para la identificación de Anticoagulante Lúpico, celebrado en Nueva York en julio de 1993.

Figura DR1. Diagrama de flujo para la determinación de AL

Analizando la precisión obtenida de las pruebas, encontramos que el coeficiente de variación (CV) es bastante diferente: El TK posee el CV más alto, esto debido, a que la suspensión que se emplea como reactivo tiene que

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

agitarse vigorosamente antes de usarse y esta participación del operador no puede ser constantemente la misma. Sin embargo su magnitud no rechaza la prueba. A continuación se encuentra el TPD, seguramente por que el paso de la dilución que se efectúa con micropipetas de uso común en el laboratorio interfiere en este paso, sin embargo de igual manera que en el TK, no es rechazable. El menor CV lo posee el TTP-AL prueba que aunque hay que reconstituir el liofilizado con el solvente que está incluido y medido en el kit, no provoca mayor variación, quizás debido a que el vial reconstituido se emplea en 20 determinaciones, sería interesante también analizar la variación intravial.

Los intervalos de referencia obtenidos en el laboratorio se encuentran muy cercanos a lo reportado en la literatura, en ésta, también se informa, falta en la uniformidad de los criterios de evaluación de las pruebas con mezcla; son cuando menos tres criterios manejados; primero, comparar el resultado del estudio de mezcla con el intervalo de referencia, segundo, expresar el resultado del estudio en un cociente, con respecto al testigo y el tercero, determinar el índice de corrección o índice de Rosner (IR). No hay datos comparativos de la efectividad de uno sobre otro criterio, solo sobresale que el IR toma en consideración el grado de corrección relativo, probablemente importante para una anomalía de inicio y los otros dos criterios, no. En este aspecto los organismos internacionales aun tienen trabajo que realizar. En este trabajo, se definió para cada prueba el criterio que, según diferentes reportes, han empleado con mayor frecuencia. Contando con todos estos elementos se procedió a abordar otro criterio aún más relevante que el anterior, y que requirió gran inversión de tiempo en este trabajo; el análisis de la Exactitud:

Este parámetro es de difícil establecimiento, ya que para este tipo de pruebas, no hay una exactitud cuantificable; es posible considerar los resultados de algunos pacientes también estudiados en el Instituto Nacional de la Nutrición (una Institución externa que en la misma región realiza la determinación), donde también se realizó la misma prueba, pero los tiempos de coagulación de su laboratorio y el total de las pruebas realizadas son desconocidos, por otro lado ya que el fin del trabajo no es "Adoptar" la metodología de otra Institución, si no sino "Estandarizar" el método, el personal médico mantuvo comunicación con el laboratorio indicando de manera verbal cómo correlacionaban nuestros resultados, con los de aquella Institución; se consideró de gran importancia el análisis de la sensibilidad y especificidad de las pruebas, empleando muestras de pacientes con diagnósticos que, primero, se manejan dentro de la población del servicio de Hematología y segundo, de aquellos donde la determinación de AL se considera un dato imprescindible para cuidar el curso de la enfermedad.

Según el análisis estadístico realizado a los resultados de 114 muestras de pacientes con siete diagnósticos distintos, se observa lo siguiente:

Las pruebas de TTPa inc 1H y TVRd, son pruebas menos sensibles y específicas en la determinación de AL.

El TTPa inc 1H es una prueba diseñada para aumentar la probabilidad de observar la presencia de anticuerpos en baja proporción<sup>60</sup>; sin embargo parece que en los casos estudiados, esta es una situación poco frecuente y además para su realización, va en desuso emplear un Tiempo tan prolongado de incubación, por lo que se considera no necesaria, su participación en el perfil para determinar AL.

El TVRd es una prueba que presenta aún gran discusión para su estandarización<sup>61</sup>, en este trabajo se empleó la proteína coagulante que ofrece Diagnostica Stago, pero por su naturaleza enzimática, la preparación de amortiguadores y otras soluciones (no siempre presentes en un laboratorio clínico) para su manejo, representan procedimientos muy delicados. Al no encontrar respuesta relevante en alguno de los diagnósticos manejados (que apreciara su participación en el perfil), supongo que su sensibilidad para detectar AL, como se preparó la prueba, no es muy buena, a pesar de que en todos los procedimientos se siguieron las recomendaciones internacionales<sup>62</sup> y se cuidaron con mucho interés. Recientemente se han elaborado presentaciones comerciales —que incluyen todos los amortiguadores necesarios—, que defienden el mecanismo de acción específico del Veneno, sin embargo la controversia aún continúa, ahora sobre el establecimiento de un intervalo de referencia. Esta prueba, se considera como no necesaria en el perfil para determinar AL en el INP.

Ambas pruebas (TTPa inc 1H y TVRd) presentaron similar utilidad al resto de las pruebas, en el Diagnóstico de Síndrome Hemofagocítico, probablemente porque es el diagnóstico en el cual no se presenta una sobreproducción de inmunoglobulinas (al contrario, se sugiere se presenta bajo un contexto de inmunodeficiencia) que pudiera decrecer su respuesta (muy baja especificidad) como probablemente sucede en los otros diagnósticos.

La mayoría de los diagnósticos abordados, en alguna etapa, cursan con la producción “anormal” de diferentes tipos de inmunoglobulinas, esta característica ocasiona que las distintas pruebas tengan una respuesta diferente, hecho que a su vez, enfatiza la importancia de contar con un número de pruebas suficientes que conforme un perfil que totalice en un esfuerzo por no ignorar a ningún paciente que pueda cursar con AL.

De esta manera el perfil y la secuencia de ejecución de las pruebas para determinar AL, quedó conformado como sigue<sup>63,64,65,66</sup>:

- 1°. - Pruebas de escrutinio rutinarias (TP y TTPa), que busquen cumplir con el primer criterio de diagnóstico de laboratorio recomendado por la SITH. De no cumplir este primer criterio, no se encuentra evidencia experimental para sospechar la presencia de un inhibidor de la coagulación, por tanto, no se debe continuar con la determinación.
- 2°. - Tres pruebas especiales (que cumplen con el segundo y cuarto criterio, recomendados por la SITH), donde al obtenerse respuesta positiva, se han revelado las características necesarias para informar la presencia de un inhibidor de la coagulación, no específico de algún factor o indeterminado.
- 3°. - Señalar el tipo lúpico, realizando prueba confirmatorio (que cumple con el tercer criterio recomendado por la SITH).

De las 114 muestras analizadas, y bajo juicio médico, se observó que la positividad para AL se acerca más, cuando las tres pruebas especiales resultan positivas. Hubo un solo caso, donde una prueba especial resultó positiva (sólo TTPa-AL) y al continuar con la prueba confirmatoria, esta resultó negativa. Para éste caso, el resultado de la determinación se informó: Inhibidor de la coagulación dudoso de tipo lúpico. En este periodo, el médico manejó su Diagnóstico, como Reservado. Un mes después se repitió la determinación y se obtuvo positividad en dos pruebas especiales, la confirmatoria resultó positiva también. Dos meses después, el médico diagnóstico al paciente con LES. Por esta experiencia se recomienda que se considere al perfil concluyente, si se realizan las tres pruebas especiales y cuando menos dos, resulten positivas.

Así mismo, hay que considerar que la estimación de sensibilidad y especificidad que se realizó en este trabajo, puede estar afectada por la población de la cual derivó, ya que los estudios se evaluaron utilizando pacientes que tienen una enfermedad con curso agudo y otros pacientes con curso diferente. Así la sensibilidad y especificidad estimada se cumplirá en población similar y muy diferente en población general, donde se encuentre más de un espectro sano que enfermo.

## XII. CONCLUSIONES

1. La evaluación de un nuevo método forma parte importante de la preservación de la calidad de un laboratorio. Los nuevos métodos se evalúan tanto por su precisión como por su capacidad para diagnosticar en forma correcta las enfermedades.
2. Se implementaron y se evaluaron las siguientes pruebas especiales para determinar Anticoagulante Lúpico

1)	TTPa de incubación prolongada
2)	TTPa sensible para Anticoagulante Lúpico
3)	Tiempo de caolín
4)	Prueba de Inhibición de Tromboplastina Tisular
5)	Tiempo del Veneno diluido de Russell
6)	Prueba de neutralización de fosfolípidos en fase hexagonal

Eliminándose del perfil las siguientes dos pruebas: Tiempo del Veneno diluido de Russell y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada, de tiempo de incubación prolongado.

3. Se establecieron tiempos de referencia en cada prueba, así como un formato de manejo interno del laboratorio para el vaciado e interpretación de los resultados en la muestra de un paciente.
4. La prueba de Anticoagulante Lúpico, como una prueba especial de coagulación, posee una buena sensibilidad y especificidad, pero se requiere en todo momento que sea solicitada dentro de una adecuada orientación clínica, ya que el criterio médico debe prevalecer para la interpretación de la utilidad del resultado en un paciente.
5. Es indispensable seguir el diagrama de flujo para la determinación de AL en el laboratorio; observándose de manera rigurosa, que debe demostrarse anomalía en alguna de las pruebas de escrutinio rutinarias (TP ó TTPa) para ser incluida en esta determinación.
6. La preparación de la muestra, especialmente la prevención de la contaminación con plaquetas activadas (ser cuidadoso con la centrifugación), es una parte preliminar, en las pruebas de determinación de AL muy importante.
7. Los laboratorios del Instituto Nacional de Pediatría, cuentan con un presupuesto, donde contemplan la posibilidad de incrementar las pruebas que realizan, para beneficio del cuidado de los pacientes. La realización del presente trabajo, es muestra del cumplimiento de éste fin.



## ANEXO a

# BIOQUÍMICA Y ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA COAGULACIÓN<sup>67,68</sup>

### INTRODUCCIÓN

Los factores de coagulación integran uno de los más importantes mecanismos del proceso homeostático. Denominada su participación como coagulación plasmática o coagulación sanguínea o hemostasia secundaria, tiene como objetivo principal el generar fibrina, un polímero insoluble que dará consistencia y estabilidad al coágulo.

Para llegar a este punto, se requiere la participación de varios factores de la coagulación, los cuales son, en su mayoría, enzimas circulantes en forma inactiva (zimógenos) de actividad proteolítica (serinproteasas) que actúan de manera secuencial, en "cascada", uno sobre otro para cumplir su objetivo.

La razón de este conjunto de reacciones consecutivas, se ha supuesto que a semejanza de cómo sucede en las rutas metabólicas, la cascada de la coagulación se conforme de reacciones acopladas de tal forma que el producto de una enzima es el sustrato del siguiente debido a:

1. El compuesto inicial (FXII o FVII) es muy diferente al producto final (Fibrina) y como en cada reacción, el sustrato se modifica ligeramente (la comparación de la secuencia de los FV y FVIII muestran numerosas homologías e incluso se ha demostrado que la organización génica de los FIX y FX es idéntica), son necesarias varias reacciones, para obtener el producto deseado.
2. Las etapas secuenciales múltiples, son más versátiles y flexibles que una sola etapa. Aunque en este punto se pueden discutir que en la cascada de coagulación se presentan varios aspectos rígidos, como el que la activación de un factor sólo tiene lugar una vez en su vida (el cambio es irreversible) y que para interrumpir la actividad generada, se requiere de otro medio, como la participación de proteínas inhibidoras específicas; también se cuenta con que el inicio de la actividad enzimática se produce por cambios conformacionales discretos y altamente localizados que se desencadenan por la hidrólisis de un único enlace peptídico.

Analizaremos esta interesante naturaleza enzimática de los factores de la coagulación.

### ENZIMAS:

La palabra Enzima significa "en la levadura". Aun antes de tener conocimiento alguno sobre su estructura y funciones, el hombre ha empleado

enzimas desde los tiempos prehistóricos para producir vino, vinagre y queso. Pasteur pensó que las células vivas de la levadura eran necesarias para el proceso de fermentación. Ahora sabemos que las células, no son las necesarias.

El estudio de las enzimas en la práctica clínica es muy importante para el diagnóstico, control y la COMPRESION de algunos padecimientos.

**DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN.**- Las enzimas se definen como catalizadores biológicos esencialmente de naturaleza proteica, cuya función es la de incrementar la velocidad de las reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de la célula. Existen algunas enzimas cuya función es extracelular, como las que participan en la COAGULACIÓN DE LA SANGRE, en la digestión de los alimentos y en el metabolismo de las lipoproteínas, entre otras.

Las enzimas que se encuentran en el plasma pueden dividirse para su estudio en dos grupos:

1. - Enzimas funcionales.
2. - Enzimas no funcionales.

Las primeras tienen una **función definida y específica en este medio**, por lo que el **plasma** constituye su sitio de acción normal y, por consecuencia, su concentración plasmática es mayor que la del tejido donde se producen. A este grupo pertenecen las enzimas que intervienen en la coagulación sanguínea. Estas enzimas sintetizadas principalmente en el hígado se liberan constantemente hacia el plasma con el propósito de mantener una concentración fisiológica óptima.

Las enzimas no funcionales del plasma, no tienen una función conocida en este medio, su concentración plasmática es generalmente menor que la que se tiene en la mayoría de los tejidos y no disponen de la cantidad adecuada de sustratos, cofactores y activadores para la realización de su actividad enzimática. Estas enzimas pueden dividirse en dos grupos:

1. - Enzimas de secreción.
2. - Enzimas del metabolismo intermedio.

Las enzimas de secreción se producen en las glándulas exócrinas, como páncreas y próstata, así como en tejidos como mucosa gástrica y hueso. Las enzimas de este grupo tienen importancia clínica cuando su concentración plasmática aumenta o disminuye con respecto a su cifra normal, tal es el caso de la amilasa que se incrementa de modo notable en los casos de pancreatitis aguda.

Las enzimas del metabolismo intermedio se encuentran en tejidos en concentración miles de veces más alta que en el plasma. El daño tisular puede conducir a un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática o a necrosis, lo cual permite que una fracción de estas enzimas escape al plasma,

tal es el caso de la creatininas que se incrementa en los eventos de infarto agudo de miocardio.

El nombre de una enzima se deriva de la reacción que cataliza, y siempre termina con el sufijo *-asa*. "Tripsina" y "quimotripsina" son nombres comunes de enzimas clasificadas como *proteasas*, las cuales catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. *Triglicérido hidrolasa* es un nombre más descriptivo de una enzima, vulgarmente llamada "lipasa", que es capaz de catalizar la hidrólisis de los enlaces éster entre un grupo acilo y el glicerol de triglicéridos, un aspecto importante de su naturaleza es que la actividad de muchas enzimas puede ser modificada por la acción de sus propios sustratos o productos, o por la acción de sustancias procedentes de otras reacciones.

El estado proenzimático (zimógeno) de los factores de la coagulación, constituye la estrategia reguladora de su actividad enzimática, revisemos este punto:

### ESTRATEGIAS REGULADORAS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Un sistema biológico necesita modular la actividad de sus enzimas. La regulación precisa de su actividad catalítica, se realiza por una de cuatro vías principales:

- 1ª. - Control alostérico: Cuando la actividad enzimática se encuentra coordinada perfectamente por cambios conformacionales (característicamente plegamientos).
- 2ª. - Control de la estimulación y de la inhibición por proteínas: Las proteínas estimuladoras o inhibitoras, así como las moléculas pequeñas, regulan la actividad de las enzimas. Por ejemplo la coagulación de la sangre es acelerada notablemente por el factor antihemofílico (FVIII), una proteína que aumenta la actividad de una serinoproteasa (FII).
- 3ª. - Modificación química covalente: Las propiedades catalíticas de algunas enzimas se modifican profundamente por la unión covalente de grupos fosforilos, principalmente otorgados por el ATP.
- 4ª. - ACTIVACIÓN PROTEOLÍTICA: Las enzimas controladas por los mecanismos anteriores alternan entre los estados activo e inactivo, de forma cíclica. Se utiliza un tipo diferente de regulación para convertir de forma irreversible una enzima inactiva en activa. Muchas enzimas se activan por la hidrólisis de uno o unos pocos enlaces peptídicos (Proteólisis) de sus precursores inactivos, denominados proenzimas o zimógenos. Las actividades catalíticas de las enzimas de la coagulación son bloqueadas por la unión irreversible de proteínas inhibitoras específicas, que actúan como cebos irresistibles para sus voracidades moleculares. La activación proteolítica en contraste con la regulación reversible por fosforilación (Modificación química covalente), puede tener lugar en el exterior celular

ya que no necesita una fuente de energía (ATP) de forma continua; y en contraste con el control alostérico y la modificación covalente reversible, sólo tiene lugar una vez en la vida de una molécula enzimática.

La activación de enzimas por proteólisis específica, se repite frecuentemente en los sistemas biológicos, algunos ejemplos son:

1. Las enzimas digestivas que hidrolizan proteínas, se sintetizan como zimógenos en el estómago y el páncreas (pepsinógeno, quimiotripsinógeno, tripsinógeno, etc.).
3. LA COAGULACIÓN DE LA SANGRE viene mediada por una cascada de activaciones proteolíticas que aseguran una respuesta rápida y amplificadas a la lesión.
4. Algunas hormonas proteicas se sintetizan como precursores inactivos, por ejemplo la insulina se deriva de la proinsulina por separación proteolítica de un péptido.

La activación proteolítica es irreversible, en consecuencia, se requieren de otros sistemas para interrumpir las actividades de estas enzimas, principalmente de proteínas inhibitoras específicas que se unen muy fuertemente a estas enzimas y bloquean sus actividades.

No todos los factores de coagulación son proenzimas, se tiene que los FV y FVIII son procofactores y los factores FIV y FIII que ya se encuentran como cofactores.

Sin embargo establecida la razón del estado proenzimático y en similitud el estado de procofactor, analicemos lo siguiente:

### MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.

Aunque el mecanismo de activación de este tipo de enzimas ha sido ampliamente estudiado para la quimiotripsina, se han establecido pasos generales, que a continuación se describen:

1. El zimógeno comienza a ser atacado por una enzima proteolítica (ya activa), para liberar péptidos pequeños no participantes de la futura conformación proteolítica activa y dejando libre a fragmentos principales mayores.
2. El extremo amino-terminal recientemente formado efectúa invaginación o interacción con algún otro aminoácido del zimógeno, buscando estabilizar la molécula.
3. Protonaciones o interacciones electrostáticas subsecuentes determinan la formación o perfección del centro específico para el sustrato.
4. Hay formación de un estado de transición tetraédrico en la catálisis sufrida, (cavidad para un oxianión) que es estabilizado por puentes de hidrógeno o algún otro que mantenga unidos al zimógeno y a la enzima.

5. Los cambios conformacionales en el resto de la molécula son importantes. Por tanto al culminar el ataque enzimático, por la sola hidrólisis de un único enlace peptídico (pueden ser más), la nueva enzima queda lista.

Estos pasos o cambios pueden ser algo diferentes para otras enzimas, por ejemplo, los cambios estructurales pueden ser considerables o los dominios de activación (regiones donde se lleva a cabo) pueden ser muy fluctuantes (no tener una conformación bien definida) o que la cavidad para el oxianión esté demasiado lejos del sitio catalítico como para promover la formación del estado de transición tetraédrico.

De uno u otro modo, la activación de los factores de coagulación procede por estos pasos, como por ejemplo los factores FII, VII, IX, X, XII y XI, que al activarse se convierten en enzimas hidrolíticas, específicamente proteasas de serina o serinproteasas, esto es, una enzima proteolítica (ruptura de enlaces proteicos) cuya principal característica es la presencia de un único residuo de serina excepcionalmente reactivo hacia algunos sustratos, en el sitio activo.

Analicemos cómo: LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA SE PRODUCE POR UNA CASCADEA DE ACTIVACIONES DE ZIMÓGENOS.

Es en 1964 cuando MacFarlane, Davie y Ratnoff proponen una Teoría, para explicar la coagulación, como una secuencia interconectada de transformaciones de proenzimas en enzimas. A pesar de las discrepancias acerca de los detalles de cada paso, la esencia de la hipótesis de la cascada goza de aceptación general, ya que los datos experimentales han dado más a favor que en contra.

Se sabe que los coágulos sanguíneos se forman por una serie de activaciones de zimógenos. En esta cascada enzimática. La forma activada de un factor cataliza la activación del factor siguiente. Son suficientes muy pequeñas cantidades de los factores iniciales para desencadenar la cascada debido a la naturaleza catalítica del proceso de activación. Los numerosos pasos producen una gran amplificación asegurando ésta una rápida respuesta frente al trauma.

En 1863, Joseph Lister demostró que la sangre permanecía fluida en la vena yugular seccionada de un buey, pero que se coagulaba rápidamente cuando se transfería a un vaso de vidrio. Esta superficie no fisiológica activaba una secuencia de reacciones que se ha conocido como la vía intrínseca. Cuando la coagulación es iniciada por sustancias que son liberadas de tejidos como consecuencia de un traumatismo es denominada extrínseca. Ambas vías convergen en una secuencia común de etapas finales para formar un coágulo de fibrina.

La parte mejor conocida del proceso de coagulación es la conversión del Fibrinógeno (Factor I) en Fibrina mediante la trombina, una enzima

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

proteolítica. Analicemos dicha enzima, denominada por algunos la enzima central de la hemostasia, primero analizaremos su cambio del estado proenzimático a enzimático y enseguida su reacción enzimática sobre el Fibrinógeno (su sustrato).

La Trombina, se sintetiza como un zimógeno denominado Protrombina (FII, en la nomenclatura internacional).

### - Estructura de la protrombina (FII):

La protrombina es una glucoproteína que consiste en una cadena peptídica de 582 aa, PM 72Kd, presente en el plasma con una concentración aproximada de 10 – 15 mg/dL. Estructuralmente puede dividirse en dos partes con aproximadamente la misma masa: Una primer cadena, que corresponde a la mitad aminoterminal, con un peso de 35 Kd y una cadena B, que es la porción carboxiterminal, con un peso de 38Kd. La primer cadena se puede dividir en dos módulos (que realmente se separan en el proceso de activación): La cadena A y un péptido, llamado Fragmento 1+2. Este péptido posee tres dominios importantes para el proceso de activación:

1. Dominio Gla, que contiene 10 residuos de ácido  $\gamma$ -carboxilglutámico y que confiere al FII la propiedad de unirse al calcio; y que al efectuarse dicha unión se producen cambios en la estructura del péptido terminal, que permiten la unión del FII a los fosfolípidos de las membranas de las plaquetas.
2. Primer dominio en forma de lazo, bucle o “*Kringle*”, cuya unión al dominio Gla, es necesaria para que se dé una interacción normal entre el calcio y la protrombina.
3. Segundo dominio *Kringle*, responsable principalmente de la interacción con la mayoría de los componentes del complejo protrombinasa.

El resto de la cadena A y la cadena B conforman al precursor de la trombina, llamado PRETROMBINA

### -Activación del FII.

La formación de trombina a partir de protrombina se produce por la acción de cuatro componentes que conforman el complejo protrombinasa (Complejo enzimático activo que atacará el zimógeno FII):

- Factor Xa (enzima proteolítica)
- Superficie de fosfolípidos (de las membranas plaquetares, células endoteliales o sanguíneas)
- Factor Va (Cofactor)
- Factor IV (Calcio ionizado)

El papel de cada componente en el complejo es el siguiente (consúltese la Figura Aa1):

El calcio promueve las interacciones del FXa y el FII, sobre los fosfolípidos de superficies de membranas cargados negativamente, por medio de residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Sobre la superficie interactúan los Factores Xa, Va y II, lo que permite un aumento en la tasa de activación del último. El FVa incrementa la unión tanto del FXa con fosfolípidos, como del complejo con el FII.

Formado el complejo protrombinasa, el FII se une a él mediante puentes de calcio. Los iones calcio unen una de sus valencias al ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico del FII y la otra a los fosfolípidos de la membrana de las plaquetas. El FII puede unir hasta 10 iones calcio (FIV) por molécula. La unión induce un cambio conformacional que pone en contacto sus grupos hidrófobos con los grupos hidrófobos de los fosfolípidos.

En esta posición la Protrombina sufre la división de dos enlaces en su molécula: el enlace A, Arg271-Thr, que bisecciona la molécula de protrombina en el Fragmento1+2 y el precursor de la trombina, la pretrombina, y el enlace B, Arg320-Ile, que expone el sitio activo; estos dos residuos quedan unidos por un puente disulfuro. El orden de división de estos dos enlaces puede ser variable. Así, en el camino I, donde se divide primero el enlace A seguido del enlace B, se formarán como productos finales Fragmento1+2 y la trombina constituida por las cadenas A y B unidas por un puente disulfuro. La activación de la protrombina según la hipótesis de Esmon y colaboradores, únicamente sugería el camino I. Sin embargo, en 1980, Novoa y Seegers, observaron la formación de un intermediario catalíticamente activo antes de la aparición de la trombina, y en 1986 se demostró la existencia de meizotrombina (MT) como intermediario de la activación de la protrombina por el complejo protrombinasa; en esta segunda vía o camino II, la escisión primaria tiene lugar en el enlace b, que lleva a la formación de la MT, del mismo tamaño que la protrombina, formada por el fragmento 1+2 y la cadena A unidos por un puente disulfuro a la cadena B de la trombina, seguida de la división del enlace a que da lugar a la producción de trombina.

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

### I. Formación del complejo protrombina



### II. Cambios estructurales de FII a IIa

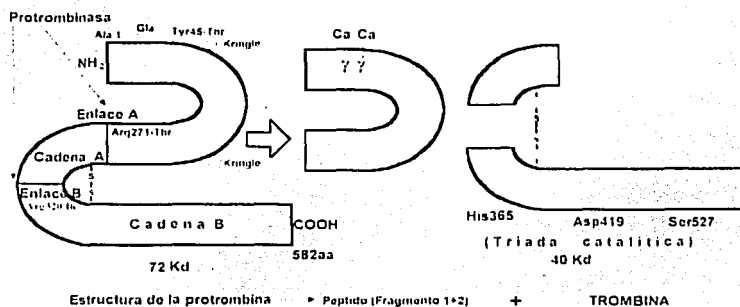


Figura Aa1.- Formación del complejo protrombina y cambios estructurales en la activación del FII.

En realidad, el camino a través del cual discurre la activación depende de la composición del complejo protrombina, el FVa es el elemento que más influye. Mientras que en ausencia del FVa la reacción procede principalmente a través de los intermediarios fragmento 1+2 y Pretrombina, en su presencia, el camino seguido primordialmente es el II, a través de MT. Por tanto, el FVa causa un cambio en la activación de la protrombina por FXa, desde un proceso en el cual se obtenía principalmente Pretrombina a otro en el cual se forman, predominantemente, trombina o MT.

#### - Estructura de la Trombina (FIIa)

Se ha transformado una molécula proteolíticamente inactiva (FII) en una proteasa totalmente activa, la trombina. Esta enzima consiste de dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro. La cadena A de 5 Kd y la Cadena B de 35 Kd, donde se encuentra el sitio activo. Pertenecen a la familia de las serinproteasa debido a la presencia de serina en su sitio activo. En la cadena B se encuentran los aa del sitio catalítico responsables de la actividad proteolítica: Histidina 365, Aspartato 419 y Serina 527, que comprenden la triada catalítica, además en el lado derecho del sitio catalítico existe una cavidad para el oxianión (región que da respuesta a muchas especificidades biológicas de la trombina y que se requiere para el

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



reconocimiento del FI, la incorporación en coágulos de fibrina y en la unión con la hirudina, un inhibidor de la trombina), y en el lado izquierdo y adyacente al sitio catalítico se encuentra un residuo de aspartato cargado negativamente en el fondo de una hendidura, estructura también denominada "hendidura lateral de la arginina" en la que se unirá al sustrato por medio de su arginina y que deberá estar cargado positivamente.

La trombina es una molécula con gran actividad enzimática sobre varios sustratos:

1. Actúa sobre el FI para generar Fibrina,
2. Activa el FXIII que dará estabilidad a la Fibrina,
3. Activa las plaquetas y estimula su agregación para acelerar el crecimiento del tapón hemostático.
4. Activa a los FVIII y FV, con lo que amplifica las reacciones de coagulación para incrementar su propia producción através de un mecanismo de retroalimentación.

#### - Acción proteolítica de la Trombina sobre FI

El FI está formado por tres unidades globulares conectadas por dos varillas. El Fibrinógeno, de 340 Kd, consta de parejas de tres tipos de cadenas: A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$ . Las regiones en forma de varilla están constituidas por enrollamientos que constan a su vez de tres hebras plegadas en forma de  $\alpha$ -hélice, una estructura frecuente en las proteínas. La Trombina rompe cuatro enlaces peptídicos arginina-lisina en el centro de la región globular del fibrinógeno para liberar un péptido A de 18 residuos de cada una de las dos cadenas  $\alpha$  y un péptido B de 20 residuos de cada una de las dos cadenas  $\beta$

Esto péptidos A y B se llaman fibrinopéptidos, una molécula de fibrinógeno sin estos fibrinopéptidos se denomina monómero de fibrina y tiene como estructura subunitaria ( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>2</sub>.

Los fibrinopéptidos poseen una gran carga negativa, en ellos abundan los residuos de aspartato y glutamato, la presencia de éstos y otros grupos negativamente cargados en los fibrinopéptidos es lo que probablemente mantiene separadas las moléculas de fibrinógeno. Su liberación por acción de la Trombina da a los monómeros de fibrina un reparto diferente en las cargas superficiales, lo cual les lleva a su agregación específica. El coágulo recién formado se estabiliza por la formación de enlaces amida entre las cadenas laterales de lisina y los residuos de glutamina en las diferentes unidades monoméricas. Esta reacción de entrecruzamiento es catalizada por la transglutaminasa (Factor XIIIa).

DEPENDENCIA DE VITAMINA K.

La vitamina K fue descrita por Dam en 1935, con el nombre de "Koagulation vitamin" por su actividad anihemorrágica en los pollos. Se conoce que en la naturaleza existen dos formas de vitamina K: K1 que se encuentra en varios aceites vegetales y plantas de hoja, y K2 que constituyen un grupo de compuestos relacionados y sintetizados por diversas bacterias, incluyendo las de la flora intestinal común. Las vitaminas K1 y K2 son liposolubles y en consecuencia sólo se absorben en presencia de sales biliares. En el plasma se transportan unidas a la albúmina.

La vitamina K es necesaria para la biosíntesis de seis factores de la coagulación bien definidos: IX, VII, X, II, Proteína C y S. Dichos factores requieren después de su síntesis hepática, la conversión de cierto número de sus moléculas de ácido glutámico (Glu) a ácido carboxiglutámico (Gla). Esta conversión tiene lugar en la posición gama, y convierte al glutamato (Consúltese la Figura Aa2), un quelante débil de Calcio, en  $\gamma$ -carboxiglutamato, un quelante más potente, permitiendo de esta manera la unión del factor a los fosfolípidos por medio de los iones Calcio. Por tanto el papel de la vitamina K es el de contribuir a la formación de factores **AFUNCIONALES** (llamados: descarboxifactor, ejemplo, descarboxiprotrombina) en **FUNCIONALES** (Protrombina), al adicionar postribosómicamente un segundo grupo carboxilo a tantos ácidos glutámico del zimógeno lo requieran.

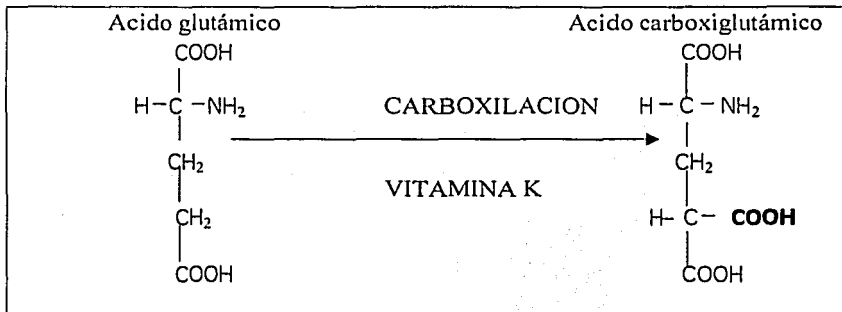


Figura Aa2.- Se presenta la adición del grupo carboxilo en la posición gama de la molécula de ácido glutámico.

Este procedimiento se realiza a través del siguiente mecanismo, bastante complejo:

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

La reacción (que es un ciclo) requiere, de forma general,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ , vitamina K en su forma reducida (Vitamina  $\text{KH}_2$ ) y una carboxilasa. El ciclo inicia con un ataque nucleofílico del anión hidroquinona de la vitamina KH al  $\text{CO}_2$  (lo que genera un compuesto intermedio, carboxi-vitamina KH), la enzima carboxilasa actúa facilitada por la activación de un protón en la posición del glutamato. Como consecutivo, la vitamina experimenta una oxidación a epoxi-vitamina K. En esta forma, epoxi-vitamina K, es reciclada por la vitaminaK-epóxido reductasa a Vitamina K, para que a su vez, a su turno, pueda ser reducida, por la vitamina K reductasa y participar así nuevamente en la carboxilación de otro glutamato.

Para el FII, capacitarse para la unión de iones calcio, le otorga la habilidad de adherirse a las membranas fosfolípídicas derivadas de las plaquetas, después de una herida.

La inducción intencional de un estado similar a la deficiencia de vitamina K (dicha carencia puede presentarse como un trastorno adquirido de la coagulación) constituye la base de la anticoagulación terapéutica con dicumarínicos o sus derivados, ya que actúan sobre la enzima vitaminoK-epóxido reductasa (Warfarina) o interfiriendo en la carboxilación del glutamato (Dicumarol), de manera que se perturba el ciclo citado y no se produce la transformación del descarboxifactor a factor, teniendo en cuenta que en el primer estado (ejemplo, descarboxiprotrombina) no puede actuar como factor de la coagulación. Este mismo mecanismo actúa con respecto a los factores VII, IX y X. Los factores, dependiente de vitamina K, no disminuyen en la sangre en forma simultánea, si no que primero lo hace el FVII, seguido por el FIX, luego el FX y finalmente el FII, ello se debe a la diferente vida media de estos factores en la circulación. Afectado como es el FVII, la medición de la prueba de TP se vuelve el método de elección para monitorear la dosis de anticoagulante a emplear.

## ANEXO b

## DE LA BIBLIOTECA

## PRUEBAS COAGULOMÉTRICAS

## INTRODUCCIÓN.

En general los problemas de hemostasis se dividen en dos categorías según el tipo de enfermedad:

- Deficiencia de tipo I, es una reducción de la CANTIDAD de proteína presente, generalmente de un 50% con respecto a lo "normal".
- Deficiencia de tipo II, son defectos del FUNCIONAMIENTO de la proteína, en este caso hay una cantidad normal de proteína, pero ésta no funciona de manera correcta y la afección con frecuencia se denomina mediante el prefijo DIS, por ejemplo, Disfibrinogenemia.

Considerando este sistema de clasificación, se requiere disponer de procedimientos de laboratorio que midan la CANTIDAD de una proteína dada y otros para medir su ACTIVIDAD FUNCIONAL<sup>69</sup>.

## ENSAYOS DE CANTIDAD

## ENSAYOS INMUNOLÓGICOS:

Los ensayos inmunológicos identifican y cuantifican la proteína presente, haciendo reaccionar un anticuerpo específico con una proteína dada (Antígeno). Estos complejos se miden por técnicas nefelométricas, de inmunoprecipitación, de ensayo inmunológico o de inmunodifusión.

## ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNCIONAL

Es más útil medir la actividad funcional de una proteína, ya que los métodos con los que se realiza, también (Indirectamente) DETECTAN disminución en la cantidad de proteína y además los métodos inmunológicos (que determinan cantidad) no permiten detectar la presencia de una proteína disfuncional.

La actividad funcional se mide mediante un sistema de ensayo, que se basa en formación de coágulos o utilizando un sustrato sintético. Los primeros requieren que el sistema de coagulación esté intacto y que los niveles del FI sean normales para alcanzar el punto final de formación del coágulo de fibrina. Los sustratos sintéticos no tienen estos requisitos, pero su costo es mucho mayor.

## DETERMINACIONES COAGULOMÉTRICAS

Para las determinaciones coagulométricas, es indispensable contar con una referencia que apoye, para la interpretación de los resultados, esta referencia generalmente es un POOL DE PLASMAS, pero no hay nada tan

complicado como la preparación y conservación de un POOL DE PLASMAS "NORMALES". Primero, porque no es sencillo establecer el estado "normal" de los pacientes que formarían parte del pool, y que debe ser nombrado correctamente como POOL DE REFERENCIA; el término "pool" se emplea probablemente de el idioma inglés, cuyo equivalente al español es "Juntar", enseguida, se encuentra la interrogante ¿cuántos individuos lo deben componer?, Algunos autores mencionan 5 a 10 donantes y que deben ser hombres y mujeres de entre 18 y 55 años de edad. A pesar de haber trabajado para población pediátrica, esto mismo se mantiene, por la dificultad y la ética que se involucran al conseguir las muestras de niños sanos.

El término Testigo se prefiere para sustituir pool de referencia, y no significa, que se empleó un sólo individuo como referencia, aunque en casos aislados es aceptable usar a un sólo individuo como referencia de otro, pero debe reunir ciertos requisitos, (como que no sea pariente)

La preparación del Testigo empleado en esta Tesis, se realizó de los pacientes que acudieron al Banco de Sangre del Instituto, un mes antes de iniciar las determinaciones, y se consideraron aptos para el pool (Según los criterios del Banco de Sangre para selección de sus donadores) 18 donadores, con lo que se reunieron 25ml de plasma pobre en plaquetas, obtenido por doble centrifugación a 3500 rpm. Esta cantidad se separó en alícuotas de 1.0 ml en copas eppendorf y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso. Para éste, se observó que el descongelamiento provocaba menor interferencia si se realizaba colocando la muestra en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$ , así como también que se mantuvo estable hasta cumplir ocho meses en congelación.

### **CUIDADOS ESPECIALES PARA REALIZAR PRUEBAS COAGULOMÉTRICAS**

El control metodológico de las variables que intervienen en la eficacia de las pruebas de hemostasia y trombosis, está basado en la estratificación de las variables en relación con el momento en que se efectúa el procedimiento técnico del estudio de laboratorio; se distinguen las fases: Preanalítica, analítica y postanalítica.

#### Fase preanalítica:

1. Paciente: debe tener un ayuno de cuando menos cuatro horas en el momento de la toma de la muestra sanguínea; al menos la última ingesta de alimentos debe ser baja en el contenido de grasas. También resulta conveniente registrar los medicamentos que recibe, sobre todo si se trata de anticoagulantes.
2. Extracción de muestra: La punción debe ser limpia para evitar la contaminación con factores hísticos que actuarían como material tromboplastínico. Puede utilizarse el sistema de tubos sobre volumen medido al vacío, empleando el segundo tubo de extracción de sangre, o

bien el sistema de doble jeringa en donde se deja la aguja dentro del vaso sanguíneo, se retira la primera jeringa para otros estudios (para ésta práctica el personal de enfermería es muy hábil) y se coloca una segunda jeringa que recibirá la muestra para estos estudios de coagulación.

3. **Recolección de la muestra:** Los tubos de ensaye para la recolección deberán ser de vidrio siliconizado o plástico, ya que el vidrio activa los factores de contacto (principalmente el FVII).
4. **Soluciones anticoagulantes:** El anticoagulante de elección es el citrato de sodio del 0.109-0.129M (3.2-3.8%) conservando la relación **sangre/anticoagulante** en 9:1. El anticoagulante fija el calcio, que se requiere en todas las vías de la coagulación, impidiéndose así, que ésta se continúe. El plasma así obtenido puede estudiarse mediante la adición (o reposición) suficiente de calcio para neutralizar el anticoagulante que se añadió. Dado que el anticoagulante actúa sobre el calcio en el plasma, la cantidad que ha de añadirse **depende del volumen plasmático de la muestra**. Se obtienen valores erróneos a causa de valores hematócrito no habituales (muy altos o bajos), puesto que **la relación entre anticoagulante y plasma varía** con el volumen del concentrado de células rojas.

El exceso de anticoagulante en los casos de hematócrito elevado, puede quelar también el calcio que se emplea durante el procedimiento técnico de las pruebas de coagulación, causando prolongación de los tiempos de coagulación. Así mismo no se debe colocar más sangre en el tubo que la calculada, pues pueden formarse microcoágulos resultando en tiempos falsamente alargados, por el consumo de cierta cantidad de factores de coagulación. Para llevar esto a la práctica, se han reportado métodos, como los siguientes:

- a) Una fórmula, donde se modifican cantidad de muestra y cantidad de anticoagulante:

$$\text{ml de anticoagulante} = \left[ \frac{\text{ml de anticoagulante } 100}{\text{por ml de sangre}} \right] - \left[ \frac{\text{Hematócrito del paciente}}{\text{Volumen plasmático normal}} \right]$$

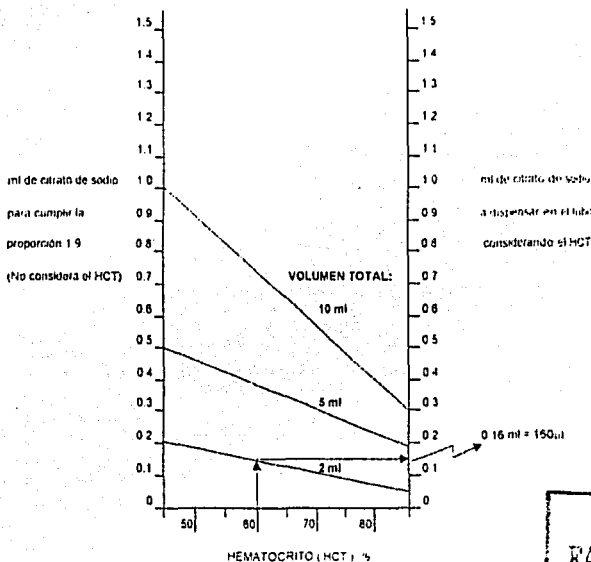
Ejemplo: Muestra de paciente con HCT conocido de 67%:

$$(0.3 \times 100) - (67 / 55) = 0.18 \text{ ml anticoagulante} + 2.7 \text{ ml de Sangre}$$

Pero tiene la desventaja, que se debe seleccionar un "volumen plasmático normal".

- b) Una gráfica, que se presenta en la Figura Ab1, en donde se intercepta el valor conocido de HCT que posee el paciente, con la línea del volumen total (Sangre + anticoagulante) que se desea manejar (Se fijaron 3 volúmenes 2, 5 y 10 ml, son volúmenes altos, probablemente por la época en la que fue elaborada, 1976) y de ahí, interceptar en la escala de la nueva cantidad de anticoagulante a trabajar.

GRÁFICA PARA DETERMINAR EL VOLUMEN DE CITRATO DE SODIO QUE DEBE EMPLEARSE CUÁNDO SE OBTENGA SANGRE DE PACIENTES CON HCT ELEVADO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Gráfica modificada de Tronb Haemost 36 230, 1976, para mostrar solo el rango alto de HCT. Se señala el caso para un volumen total de 2 ml (sangre anticoagulante) al que corresponde 200 µl de citrato, pero que al considerar un HCT de 60%, disminuye la cantidad de citrato a 160 µl.

Figura Ab1. Gráfico para determinar el volumen de citrato de sodio que debe emplearse en muestras de pacientes con hematocrito elevado.

Sin embargo su principal desventaja es precisamente su método gráfico ya que al analizarse la gráfica original publicada, presenta algunas imperfecciones (la escala de los ejes no es precisa), que dificultan su reproducción y además en la actualidad se manejan marcas comerciales que trabajan con volúmenes totales distintos a los que maneja la gráfica. Sin embargo, en general, es una gráfica correcta, ya que, como se muestra en la Figura Ab1, en el caso de un HCT alto, la cantidad de anticoagulante indicada, coincide con el siguiente método.

- c) Una segunda fórmula, en la que se establece la proporción de muestra que es aplicable a un mililitro de anticoagulante:

$$\text{Partes de sangre total, por una parte de anticoagulante} = \frac{5}{1 - (\text{HCT} / 100)}$$

Haciendo énfasis en esto veamos su aplicación. Tenemos dos casos muy comunes en nuestro hospital pediátrico:

- 1° - Pacientes con procesos oncológicos (Leucemia) que manejan, por su enfermedad o por su tratamiento -quimioterapia- HCT hasta de 25%
- 2° - El servicio de neonatos, que no pueden tomar más de 1.5 ml para el estudio y que además los pacientes poseen HCT de 60 a 67 %

Además se maneja un solo tipo de tubo, de la casa comercial VACUTAINER®, con las siguientes especificaciones en caja:

“Tubo sistema para toma y recolección de sangre de vidrio al vacío (10.25x64mm). Desechable, para adulto con citrato de sodio 0.129 molar (0.3ml). Líquido para determinaciones de coagulación. Tapón azul, el tapón y el interior del tubo recubiertos con silicón. Volumen de drenado 2.7 - 3ml (+-3ml). El rango menor establece el volumen de drenado a la altura del altiplano mexicano, el rango mayor a nivel del mar (Etiquetados individualmente con No. De lote y fecha de caducidad)”

¿Qué modificaciones debemos realizar a los tubos de tiempos para cumplir correctamente con las determinaciones?

Abordando el primer caso, aplicamos la fórmula:

$$\text{PST por una PA} = (5 / [1 - 0.25]) = 5 / 0.75 = 6.7, \text{ (Se indica relación 1:6.7)}$$

Esto es, que se debe utilizar 1ml de anticoagulante y 6.7ml de sangre para ésta muestra. Pero para el tubo vacutainer no se manejan estos volúmenes, en él se depositan 2.7ml de sangre, así que:

$$\begin{array}{l} 1\text{ml} \longrightarrow 6.7\text{ ml} \\ .? \text{ml} \longrightarrow 2.7\text{ml} \quad .? = 0.4\text{ ml o } 400\ \mu\text{l} \end{array}$$

Lo que es congruente, porque para una muestra donde hay mayor cantidad de plasma (hematócrito muy bajo) entonces hay que colocar mayor cantidad de anticoagulante, así que de los 300µl de citrato que posee el tubo, hay que agregar 100µl más de anticoagulante.

Atendiendo el segundo caso:

Los neonatos, por su edad y por que no es el único estudio que se les realiza, los médicos pueden destinar para este estudio un volumen alrededor de 1.5ml de sangre, y generalmente poseen HCT altos. De ambas situaciones, se determina inicialmente cuál es la proporción de anticoagulante-muestra con la que se debe manejar a estos pacientes y luego modificamos el volumen que en realidad es posible conseguir.



## ANTICOAGULANTE LÚPICO

Así que supongamos que el paciente maneja HCT de 60%, entonces aplicando la fórmula:

$$\begin{aligned} \text{PST por una PA} &= [ 5 / ( 1 - 0.60 ) ] \\ &= [ 5 / 0.40 ] = 12.5 \quad (\text{Se indica relación } 1:12.5) \end{aligned}$$

Esto es, 1ml de anticoagulante y 12.5 ml sangre

Pero ahora, atendiendo la situación que no es posible conseguir 2.7ml de sangre, si no sólo 1.5 ml, entonces obtengo que:

$$1 \text{ ml} \rightarrow 12.5 \text{ ml}$$

$$.7 \text{ ml} \rightarrow 1.5 \text{ ml}, \quad .? = 0.12 \text{ ml o } 120\mu\text{l},$$

Lo que corresponde con lo anteriormente manejado, pero ahora en que al ser menor la cantidad de plasma, se requiere menor cantidad de anticoagulante, así que al tubo Vacutainer se le extraen 80 $\mu\text{l}$  de anticoagulante para que queden en el tubo 120 $\mu\text{l}$ . y se marca en el tubo el volumen final, el cual se fija por los 120 $\mu\text{l}$ . de anticoagulante más los 1.5ml de sangre:

$$1500\mu\text{l} + 120\mu\text{l} = 1620\mu\text{l} \text{ volumen total.}$$

En estos casos se observa que la proporción 1:9 no se aplica; la fórmula obtiene que es 1:6.7 para el HCT alto, y de 1: 12.5 para el HCT bajo, algo que de inicio parece incongruente pero las consideraciones anteriores expresan que un ml de anticoagulante, en una muestra con HCT alto, alcanza o se aplica para más volumen de sangre y que en el caso de una muestra con HCT bajo, ese ml de anticoagulante, se aplica en menor volumen de sangre.

5. Manejo de la muestra: Después que se extrajo la muestra, ésta debe separarse antes de una hora, conservándose entre 4-6°C, esto mismo se continúa con el plasma, el cual debe analizarse antes de cuatro horas. Si no se procesan en éste lapso de tiempo, se deberá congelar a -20°C, aunque los especímenes congelados a -70°C tienen mayor estabilidad. Se centrifuga de 10-15 minutos a 1500g, para obtener un plasma pobre en plaquetas. Se debe manipular el plasma con material plástico.

### Fase Analítica:

1. Es importante que todas las técnicas que se realicen, incluyan controles normales y anormales (patológicos).
2. Equipos y reactivos: Seguir las instrucciones del fabricante para calibración y funcionalidad, atendiendo así mismo, los señalamientos para reconstitución y conservación. El pH y la fuerza iónica, son controlados a través de los reactivos químicos, donde es el TIPO de agua para la hidratación de los reactivos, la variable que más dificultades presenta.

### Fase Postanalítica:

1. Informe de resultados: Claros, sin error en cálculos.
2. Confrontación de los resultados obtenidos con los diagnósticos de los pacientes.

**MEZCLAS DE PLASMAS**

Gran mayoría de los estudios de coagulación especiales, requieren realizar el estudio pero con la adición de una parte de un plasma testigo al plasma problema. La adición de testigo al plasma problema, se denomina MEZCLA, consistiendo en diluir a volúmenes iguales (1+1), en la mayoría de los casos, el plasma problema con el testigo, y con lo obtenido realizar la prueba de coagulación. Para propósitos prácticos este procedimiento define, que un PLASMA es DEFICIENTE en algún factor de la coagulación, si el tiempo de formación del coágulo, SE CORRIGE, pero si se obtiene lo contrario, esto es, se mantiene alargado (NO CORRIGE), entonces está presente un inhibidor, la actividad inhibitoria sigue expresándose:

*LAS DEFICIENCIAS SE CORRIGEN, LOS INHIBIDORES NO.*

Existen diferencias en la interpretación de los resultados de las mezclas de plasmas. Al menos hay tres formas propuestas:

1. Comparar el tiempo de coagulación de la mezcla, con el rango esperado normal para el estudio  $\pm 3DS$ , se define corrección, si el tiempo obtenido se encuentra menor que o igual al límite superior de este rango.
2. La corrección se define cuando el resultado de la mezcla no supera en más de cinco segundos al resultado de la prueba del testigo solo.
3. Empleando el índice de Rosner (IR) o también llamado Índice de Corrección o Índice de anticoagulante circulante. La fórmula es la siguiente:

$$IR = [(M - T) / P] [100]$$

En donde:

P = Tiempo de coagulación del plasma del Paciente.

M = Tiempo de coagulación de la Mezcla.

T = Tiempo de coagulación del Testigo.

El último método toma en consideración el grado de corrección relativa a la anormalidad inicial. En general se considera que un valor mayor a 15 revela la presencia de un inhibidor.

No hay datos comparativos de la efectividad de estos métodos, en esta tesis para interpretar el resultado, se seleccionó, el método más frecuentemente empleado en la literatura. De esta manera, se encontró que para la interpretación de la prueba de inhibición tisular, aunque algunos autores emplean dividir el resultado del paciente entre el testigo, recientemente se ha propuesto, efectuar el cálculo de cociente como sigue:

$$\text{Cociente} = (M) / (T)$$

Donde: M = Tiempo de coagulación de la mezcla 1:1, Paciente y Testigo.

T = Tiempo de coagulación de Testigo

Considerándose como criterio de positividad, para la presencia de un inhibidor de la coagulación, un cociente mayor a 1.2 ó 1.3.

## I. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA.

### 1. - DEFINICIÓN Y UTILIDAD.

El Tiempo de Protrombina (TP) o también llamado Tiempo de Quick - por ser Quick A.J.J. quien lo definió en 1935-, es el tiempo necesario para la coagulación, de un plasma citratado después de agregar tromboplastina hística completa y calcio en condiciones óptimas de temperatura (37°C), pH (7.4) y fuerza iónica. Explora fundamentalmente la función de la vía extrínseca de la coagulación y de la común (FVII, FV, FX, FII, FI). Es el método adoptado para monitorear la terapia anticoagulante (tipo cumarínicos), esto es, a ciertos pacientes, se administra anticoagulantes orales, como tratamiento o como profilaxis de trastornos trombóticos, así que se emplea mayor dosis de anticoagulante oral para obtener en un paciente el TP recomendado.

Las tromboplastinas hísticas empleadas para estos casos deben tener incluidas en cada lote su Índice Internacional de Sensibilidad, ISI (Del inglés International Sensitivity Index). El ISI es la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal del análisis gráfico de correlación del logaritmo de los TP obtenidos, por una tromboplastina de referencia internacional (en el eje de las ordenadas) contra el logaritmo de los TP obtenidos con la tromboplastina en estudio (en el eje de las abscisas) en el mismo grupo de plasmas de personas normales y pacientes anticoagulados. La sensibilidad de la tromboplastina se refiere a la capacidad que tiene el reactivo para detectar las variaciones en la concentración plasmática de los factores de la coagulación, que se expresan en el laboratorio por una mayor diferencia en segundos entre el resultado del testigo contra el problema. La discordancia entre las diferentes tromboplastinas empleadas en todo el mundo ocasiona una gran diferencia entre las dosis de anticoagulación en diferentes países. Por eso al aprobarse en 1983 por la OMS el Cociente internacional Ajustado ó Razón Internacional Normalizada (INR por el idioma inglés, International Normalized Ratio), se cuenta con un esquema internacional estandarizado del TP que proporciona una terapia anticoagulante segura y efectiva<sup>69</sup>.

### 2. - FUNDAMENTO.

Cuando se añade Calcio y un extracto hístico (Tromboplastina), el FVII reacciona con el extracto hístico (Sustituto del FIII) y se forma un complejo que convierte el FX en FXa, continuando con la activación sucesiva de los consecutivos Factores, hasta culminar con la conversión de FI en Fibrina. Por tanto esta prueba mide la ACTIVIDAD total de todos los factores que intervienen en ambas vías (Vía extrínseca y Vía común).

### 3. - TÉCNICA.

#### Material y Reactivos:

1. Plasma Pobre en plaquetas, obtenido a partir de sangre recogida en Citrato de sodio 0.025M en la proporción de un volumen de citrato por cada nueve volúmenes de sangre.
2. Suspensión de Tromboplastina Hística calcificada, en nuestro caso, Neoplastine® Cl plus 5 Diagnóstica Stago

En la actualidad existen numerosas tromboplastinas comerciales preparadas a partir de tejidos animales, cuya sensibilidad suele variar según la firma comercial que la prepara. El tipo de tromboplastina que deberá utilizarse va a depender del tipo de población y estudio a realizar. Se emplean tromboplastinas de alta sensibilidad (Índice de sensibilidad lo más cercano a la unidad) para el seguimiento de la anticoagulación oral. Para estudios en población de consulta externa, o estudios preoperatorios, es adecuado emplear tromboplastinas de baja o mediana sensibilidad.

Para el empleo adecuado de las tromboplastinas éstas deben incubarse previamente cuando menos 10-15 min (lo que recomienda el fabricante) a 37°C, ya que el extracto hístico, está conformado con una fracción proteica que tiene actividad enzimática, y que para su óptimo desempeño debe estar a la temperatura recomendada.

3. Coagulómetro a emplear (ST<sub>4</sub>, Diagnóstica Stago).

#### Procedimiento

Pipetear en dos cubetas:

Plasma citratado, paciente o control 50 µl

Dejar incubar exactamente 60" a 37°C

Neoplastine® Cl Plus 5 100 µl

Inmediatamente se pone en marcha el cronómetro

y se registra el tiempo de formación del coágulo.

Si no se obtiene formación de coágulo después de 60 segundos de reacción, se detiene el ensayo y se registra que el TP es mayor de 60 seg.

#### Cálculo y expresión de los resultados

El resultado de la determinación de TP puede expresarse en segundos, si es del conocimiento general, los valores de referencia que se obtienen con plasmas "normales" (Generalmente se acepta de 12 a 14 s, pero el laboratorio debe establecer su propio rango con la tromboplastina y lote que se encuentre trabajando). Sin embargo durante mucho tiempo, se ha expresado el resultado en por ciento de actividad, debido esto principalmente a que, como ya se mencionó, es el método para monitorear la terapia anticoagulante, y en los años 60's, era recomendado como rango terapéutico que se alcanzara de un "25 a 15% de lo normal" y que alcanzado este nivel se mantuviera por la administración continua y controlada del anticoagulante. Dado que el TP es

prolongado, cuando están reducidos los NIVELES FUNCIONALES de los factores V, VII, X y II, los tres últimos vitamina K dependientes, y al actuar los anticoagulantes orales cumarínicos precisamente como antagonistas de la vitamina K (Consulte el Anexo a), reducen el nivel funcional de los factores VII, X y II, Factores involucrados en la vía extrínseca y común, evaluadas en la prueba del TP. Aunque hoy en día se ha recomendado, que sea expresado el resultado en segundos para el general de la población (como se realiza para el TTPa), aun es solicitada la expresión en por ciento de actividad, por lo que se explicará el trazado de la curva y los cálculos con los que se consigue, expresar, en tantos por ciento (%).

### TRAZADO DE LA CURVA PARA EXPRESAR EL TP EN %

Es importante primero considerar que la expresión en tanto por ciento mantiene una relación inversa a la magnitud del tiempo de formación del coágulo, esto es, que entre mayor sea el tiempo que tarda en formarse el coágulo de fibrina, menor será el porcentaje de actividad de TP que se reportará y así mismo, si el tiempo de formación del coágulo es corto, el porcentaje de actividad será mayor, como se muestra en la Tabla Ab1.

Tiempo de formación del coagulo	% Actividad de TP reportado	RELACIÓN
12"	100%	Menor tiempo, mayor porcentaje
27"	25%	Mayor tiempo, menor porcentaje

Tabla Ab1. Relación inversa de la expresión del TP en por ciento de actividad.

Procedimiento experimental de la obtención de los puntos de la curva:

1. - Se requiere contar con un pool de referencia, al que se le asigna el 100% de actividad de TP. Dado que para muchos laboratorios no es posible reunir a una población "normal" cada que el reactivo cambia de lote, se cuentan con preparados comerciales, en nuestro caso se empleó el Unicalibrador (Diagnóstica Stago), el cual es un preparado de plasma citratado humano (No especifican ni edad, ni número de donadores).
2. - La tromboplastina a utilizar, registrando el lote, Neoplastine® CL Plus®, lote 970775.
3. -Diluyente (Para las diluciones e hidrataciones), se aconseja agua destilada o mejor aún desionizada.

Procedimiento:

Se realizan tres diluciones al pool de referencia (Unicalibrador): La primera es 1:2, la segunda 1:4 y la última 1:8, éstas se pueden realizar sucesivamente como se muestra en la Tabla Ab2

Dilución	Volúmenes empleados
(1a)	Pool de referencia = 150 $\mu$ l + Agua desionizada = 150 $\mu$ l
(2a)	(1a) Dilución = 150 $\mu$ l + Agua desionizada = 150 $\mu$ l
(3a)	(2a) Dilución = 150 $\mu$ l + Agua desionizada = 150 $\mu$ l

Tabla Ab2. Diluciones del pool de referencia

Se realiza la determinación de TP por duplicado del unicalibrador y sus tres diluciones, se anotan los tiempos de formación de coágulo y se correlacionan con el Porcentaje de la concentración, como se muestra en la Tabla Ab3.

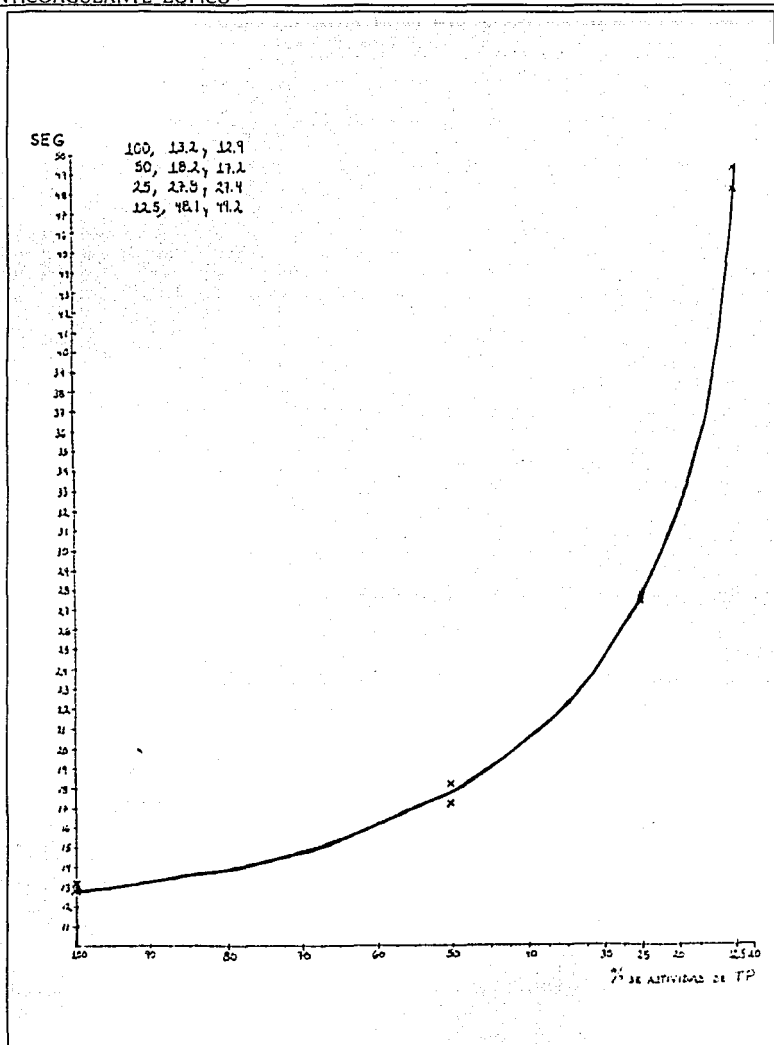
Muestra analizada	Segundos obtenidos	% Correspondiente
Unicalibrador	13.2 , 12.9	100
1a Dilución	18.2 , 17.2	50
2a Dilución	27.8 , 27.4	25
3a Dilución	48.1 , 49.2	12.5

Tabla Ab3. Determinación de TP del pool de referencia, sus diluciones y su porcentaje de actividad correspondiente.

Se cuentan con cuatro datos para construir una curva de dilución de TP, estos cuatro puntos son los mínimos recomendados. Si los cuatro datos se grafican en un papel milimétrico, colocando en el eje de las abscisas el porcentaje de actividad, comenzando desde el 100%, y en el eje de las ordenadas los segundos, se obtiene una curva de tipo potencial, como se muestra en la Figura Ab1. Como la interpolación en este tipo de gráfico resulta complicada, se prefiere linealizar la curva, empleando papel semilogarítmico al eje de las abscisas (%), el cual se muestra en la Figura Ab2.

En el gráfico con papel semilogarítmico, resulta curioso, que el último punto ya no se puede graficar (12.5%), naturalmente al linealizar los puntos, los segundos originales correspondientes a los porcentajes de la dilución, se mueven y ya no son los mismos, pero sí próximos.

La dificultad de graficar el último punto, en el papel semilogarítmico (proporcionado por Diagnostica Stago), no es mas que una exigencia técnica, porque realmente si se considera el objetivo de la conversión del tiempo obtenido de formación de coágulo a porcentaje de actividad, el cual es reportar al médico que dirige una terapéutica anticoagulante, y que el mayor interés se encuentra en que el paciente maneje un "TP de 25 a 15%", este último porcentaje, en nuestra curva, se encuentra perfectamente graficado y que corresponde, ya linealizada a 41.5 seg.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura Ab1. Trazo de la curva de TP, en papel milimétrico.

El gráfico en papel semilogarítmico considera graficar casi hasta 46 s, por lo que cubre sin mayor problema, el intervalo clínicamente importante, ya que se podría informar, si se obtuviera un tiempo mayor de 46 s, que el porcentaje de actividad de TP es menor del 15%.

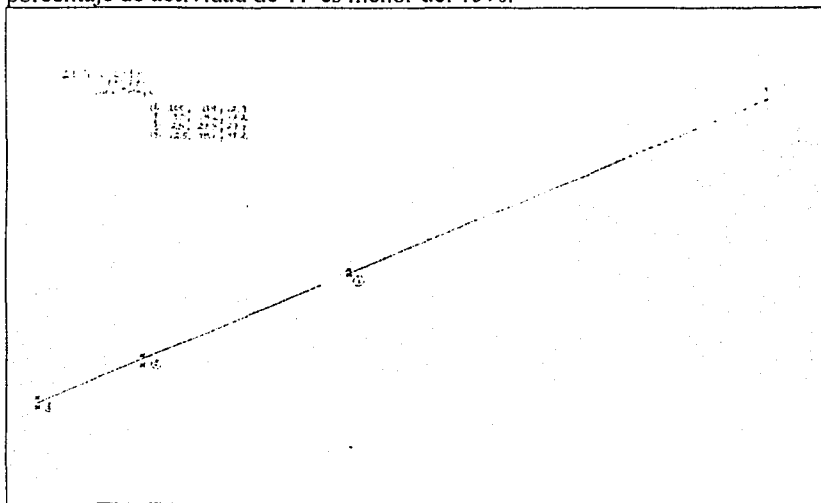


Figura Ab2.- Trazo de la curva de TP en papel semilogarítmico.

Sin embargo, si se requiere de la mayor exactitud para monitorear cualquier respuesta, aún en tiempos mayores de lo adecuadamente graficable, se cuenta con las consideraciones matemáticas, donde se linealiza la curva empleando la ecuación de una recta, obteniendo de los datos experimentales, la ordenada al origen (Tiempo de formación del coágulo) y el logaritmo de las abscisas (Porcentajes de actividad). Estos cálculos ya los realizan los equipos automatizados, en la Figura Ab3, se muestra la curva y cálculos, que reportaba el equipo ST8, Diagnostica Stago, utilizado anteriormente en el laboratorio de Hematología del INP, en ella se puede observar el planteamiento de la ecuación lineal y como el porcentaje de actividad, varía después de linealizar la recta (el inicialmente asignado, se nombra teórico, y el obtenido al linealizar, computado).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



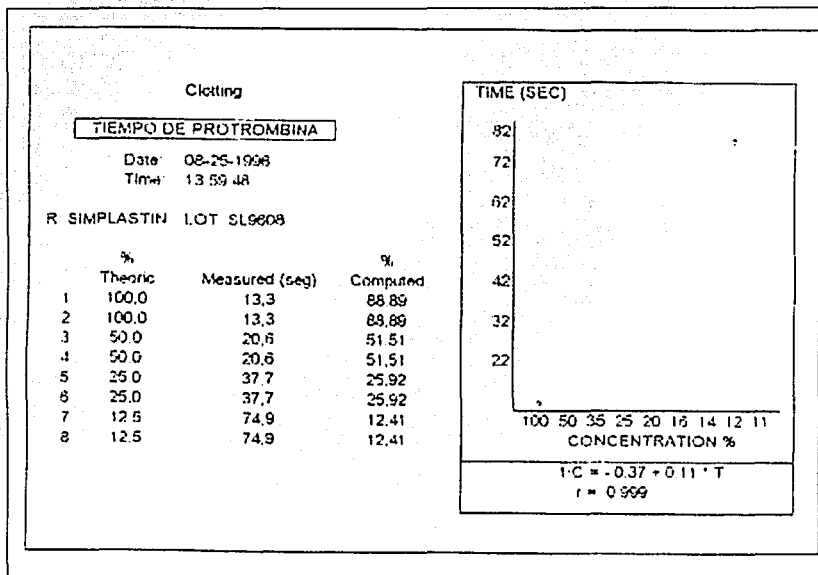


Figura Ab3.- Reporte de calibración del equipo ST8.

De esta manera, si la determinación de nuestro paciente de TP se obtiene de 55.0 s, la ecuación nos entrega una equivalencia de 10.8 %. Expresión que naturalmente pone de manifiesto la gravedad del estado clínico y que ante cualquier acción médica, el laboratorio puede apoyar su respuesta si ante una segunda determinación, esta se obtuviera de 47.0 s = 12.9 %, respuesta mínima, pero que el laboratorio puede precisar y al informar al médico, éste determinará las acciones a seguir. Si no se cuenta con el equipo automatizado que entrega junto con el resultado en segundos su equivalencia a porcentaje de actividad, se puede realizar el cálculo manual y realizar una tabla de equivalencias, donde se puede observar ante un resultado determinado, el % de actividad correspondiente, como se muestra en la Figura Ab4.

Algunos autores a la par de este sistema de por ciento de actividad, prefieren expresar los resultados como cociente (ó ratio) de protrombina, que corresponde al cociente entre el valor del tiempo de protrombina (en segundos) del paciente y el correspondiente al plasma de referencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA DE CONVERSIÓN DE TIEMPO DE FORMACIÓN DE COAGULO EN % DE ACTIVIDAD DE TP.

$$\% = \{ ( T \cdot 0.196 ) - 1.486 \} \exp -1 \} \{ 100 \}$$

seg	%	seg	%	seg	%	seg	%
12.6	101.7	17.1	53.6	21.6	36.4	26.1	27.6
12.7	99.7	17.2	53.0	21.7	36.1	26.2	27.4
12.8	97.8	17.3	52.5	21.8	35.9	26.3	27.3
12.9	95.5	17.4	52.0	21.9	35.6	26.4	27.1
13.0	94.2	17.5	51.4	22.0	35.4	26.5	27.0
13.1	92.5	17.6	50.9	22.1	35.1	26.6	26.8
13.2	90.8	17.7	50.4	22.2	34.9	26.7	26.7
13.3	89.2	17.8	49.9	22.3	34.7	26.8	26.5
13.4	87.7	17.9	49.4	22.4	34.4	26.9	26.4
13.5	86.2	18.0	49.0	22.5	34.2	27.0	26.3
13.6	84.8	18.1	48.5	22.6	34.0	27.1	26.1
13.7	83.4	18.2	48.0	22.7	33.7	27.2	26.0
13.8	82.0	18.3	47.6	22.8	33.5	27.3	25.9
13.9	80.7	18.4	47.2	22.9	33.3	27.4	25.7
14.0	79.5	18.5	46.7	23.0	33.1	27.5	25.6
14.1	78.3	18.6	46.3	23.1	32.9	27.6	25.5
14.2	77.1	18.7	45.9	23.2	32.7	27.7	25.4
14.3	75.9	18.8	45.5	23.3	32.5	27.8	25.2
14.4	74.8	18.9	45.1	23.4	32.3	27.9	25.1
14.5	73.7	19.0	44.7	23.5	32.1	28.0	25.0
14.6	72.7	19.1	44.3	23.6	31.9	28.1	24.9
14.7	71.7	19.2	43.9	23.7	31.7	28.2	24.7
14.8	70.7	19.3	43.5	23.8	31.5	28.3	24.6
14.9	69.7	19.4	43.2	23.9	31.3	28.4	24.5
15.0	68.8	19.5	42.8	24.0	31.1	28.5	24.4
15.1	67.9	19.6	42.5	24.1	30.9	28.6	24.3
15.2	67.0	19.7	42.1	24.2	30.6	28.7	24.2
15.3	66.1	19.8	41.8	24.3	30.5	28.8	24.0
15.4	65.3	19.9	41.4	24.4	30.3	28.9	23.9
15.5	64.4	20.0	41.1	24.5	30.2	29.0	23.8
15.6	63.6	20.1	40.8	24.6	30.0	29.1	23.7
15.7	62.8	20.2	40.4	24.7	29.8	29.2	23.6
15.8	62.1	20.3	40.1	24.8	29.6	29.3	23.5
15.9	61.3	20.4	39.8	24.9	29.5	29.4	23.4
16.0	60.6	20.5	39.5	25.0	29.3	29.5	23.3
16.1	59.9	20.6	39.2	25.1	29.1	29.6	23.2
16.2	59.2	20.7	38.9	25.2	29.0	29.7	23.1
16.3	58.5	20.8	38.6	25.3	28.8	29.8	23.0
16.4	57.9	20.9	38.3	25.4	28.6	29.9	22.9
16.5	57.2	21.0	38.0	25.5	28.5	30.0	22.8
16.6	56.6	21.1	3.7	25.6	28.3	30.1	22.7
16.7	56.0	21.2	37.5	25.7	28.2	30.2	22.6
16.8	55.3	21.3	37.2	25.8	28.0	30.3	22.5
16.9	54.8	21.4	36.9	25.9	27.9	30.4	22.4
17.0	54.2	21.5	36.7	26.0	27.7	30.5	22.3

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Figura Ab4.-Tabla de equivalencias de segundos a % de actividad de TP

Por ejemplo, si el TP de un paciente es 18 s y el plasma de referencia, 12 s, el cociente será de 1.5. Ambas expresiones, no son adecuadas para los pacientes que tratados con anticoagulantes orales, ya que con la adopción en 1983 del sistema INR o RIN -Radio Internacional Normalizado- los médicos requieren conocer el TP expresado en este sistema. Las recomendaciones indican rango terapéutico de 2.0 a 3.0 para manejar el riesgo y de 2.5 a 3.5 para mayor riesgo. Este sistema considera el ISI -Índice de sensibilidad- que el fabricante reporta de su tromboplastina, el INR se calcula como se muestra en la Figura Ab5.

$R = (\text{TP del paciente en s} / \text{TP normal en s}^*)$	$\text{INR} = R^{\text{ISI}}$
---	-------------------------------

Figura Ab5.- Cálculo de TP en el sistema INR.

Donde: R= radio o relación entre el TP del paciente y \*TP normal, que el laboratorio establece, con la tromboplastina usada y que conoce su ISI.

La casa comercial, Diagnostica Stago, entrega una tabla de equivalencia de TP al correspondiente INR, evitando realizar los cálculos, con el ISI de la tromboplastina, como se muestra en la Figura Ab6.

Determinación de INR					
LOTE NO : 970775					
ISI* = 1.28					
R <sup>(1)</sup>	INR <sup>(2)</sup>	R <sup>(1)</sup>	INR <sup>(2)</sup>	R <sup>(1)</sup>	INR <sup>(2)</sup>
1.00	1.00	1.85	2.20	2.70	3.57
1.05	1.06	1.90	2.27	2.75	3.65
1.10	1.13	1.95	2.35	2.80	3.74
1.15	1.20	2.00	2.43	2.85	3.82
1.20	1.26	2.05	2.51	2.90	3.91
1.25	1.33	2.10	2.58	2.95	3.99
1.30	1.40	2.15	2.66	3.00	4.08
1.30	1.47	2.20	2.74	3.05	4.17
1.40	1.54	2.25	2.82	3.10	4.26
1.45	1.61	2.30	2.90	3.15	4.34
1.50	1.68	2.35	2.99	3.20	4.43
1.55	1.75	2.40	3.07	3.25	4.52
1.60	1.83	2.45	3.15	3.30	4.61
1.65	1.90	2.50	3.23	3.35	4.70
1.70	1.97	2.55	3.31	3.40	4.79
1.75	2.05	2.60	3.40	3.45	4.88
1.80	2.12	2.65	3.48	3.50	4.97

Figura Ab6.- Tabla de equivalencia NEOPLASTINE® CL PLUS © en INR.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

#### 4. VALORES DE REFERENCIA.

Con el lote No. 970775 de Neoplastine Cl Plus<sup>®</sup> y 30 muestras analizadas de pacientes "normales", en el equipo ST<sub>4</sub>, se obtuvo el siguiente intervalo:           **12 - 15 seg.**

El Pool Testigo analizado en este mismo tiempo, coaguló en:           **13.9 seg.**

#### 5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Su utilidad clínica es la monitorización y control de la terapéutica anticoagulante. Se considera que por debajo del 85% debe estimarse patológico (de 12 seg. para nuestro caso), aunque es hasta cifras inferiores al 30% que se presentan síntomas clínicos.

Como prueba funcional hepática, se alarga en las hipoprotrombinemias: Por carencia de vitamina K, por déficit de absorción de dicha vitamina, por déficit de utilización de la vitamina K en insuficiencia hepática grave, por antagonismo químico.

El alargamiento también puede deberse a déficit del FVII, congénito o adquirido, o la presencia de inhibidor específico a éste factor, o alguno de todos los factores presentes en la vía común. Cuantificado un tiempo de coagulación alargado, se sugiere como causa, la presencia de un inhibidor de la coagulación, si al realizar una mezcla 1:1 (En un tubo colocar 50% de la muestra patológica y 50% del pool y de ahí medir lo necesario para repetir el estudio), el resultado de la determinación no corrige.

## II. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA.

(Rutinario y de incubación prolongada -anticuerpos de baja respuesta-)

### 1. - DEFINICIÓN Y UTILIDAD.

En 1953 Langdell introduce una prueba de laboratorio, el Tiempo de Tromboplastina Parcial (TTP), como estudio para detectar la ausencia del factor hemofílico. Se denomina Tromboplastina Parcial por que está constituida esencialmente por Fosfolípidos. Posteriores modificaciones al TTP como el agregado de "activadores" como el ácido elálgico o silicatos particulados como el celite o el Caolín (Silicato de aluminio -originario de yacimientos en *Kao Ling*, una ciudad de China), han logrado que sea una prueba definitiva de escrutinio de coagulación y el método de elección para determinar factores.

El Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa), es el tiempo en segundos que tarda un plasma citratado en coagular después de agregarle la fracción lipídica de la tromboplastina, más calcio, y más un activador, en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica. Mide la actividad coagulante de los factores que intervienen en la vía de generación lenta -VIA INTRINSECA-, excepto el FXIII, esto es, refleja la integridad global del sistema intrínseco de la coagulación. Además se utiliza como prueba para evaluar y vigilar la acción de los anticoagulantes no orales (heparina). La heparina potencializa el efecto anticoagulante de la antitrombina III. La antitrombina III inhibe a todas las serinoproteasas (Kaliceína, FXIIa, FXIa, FIX, FXa y FIIa que pertenecen a la vía intrínseca).

### 2. - FUNDAMENTO.

Cuando se recalifica la mezcla de plasma problema y el fosfolípido (Generalmente cefalina, fosfolípido similar al factor plaquetario 3), la tasa de formación de fibrina, sólo es "normal" cuando los factores involucrados en las vías intrínseca y común, son "normales". Las tromboplastinas parciales son incapaces de inactivar la vía extrínseca, que requiere de tromboplastina completa (Factor tisular). Es así que el TTPa "sortea" la vía extrínseca y el factor VII no lo modifica.

Se ha demostrado que cuando se incrementa el tiempo de incubación con el reactivo de TTPa, el comportamiento de los plasmas con inhibidores débiles es revelado de manera importante.

### 3. TÉCNICA.

#### Material y Reactivos

1. Plasma Pobre en plaquetas, obtenido a partir de sangre recogida en Citrato de sodio 0.025 M en la proporción de un volumen de citrato por cada nueve volúmenes de sangre.
2. Tromboplastina Parcial (Fosfolípido), en nuestro caso CK Prest®, Diagnostica Stago. Dado que los Fosfolípidos son insolubles en agua, y que los activadores tienden a sedimentarse, estas Tromboplastinas siempre deben agitarse antes de su uso y no es riguroso la incubación previa a 37°C, solo que esté a temperatura ambiente.
3. Coagulómetro a emplear (ST<sub>1</sub>, Diagnóstica Stago).

#### Procedimiento

Pipetear en dos cubetas:

- |  |      |
|--|------|
| Plasma citratado, paciente o control   | 50µl |
| CK Prest (recientemente homogeneizado)   | 50µl |
| Dejar incubar exactamente 180" a 37°C  |      |
| CaCl <sub>2</sub> 0.025M preincubado a 37°C  | 50µl |
| Inmediatamente se pone en marcha el cronómetro y se registra el tiempo de formación del coágulo. |      |

Si no se obtiene formación de coágulo después de 120 segundos de reacción, se detiene el ensayo y se registra que el TTPa es mayor de 120 seg.

Para la determinación de inhibidores débiles, el tiempo de incubación se permite de 60 minutos, cubriendo con parafilm la copa de reacción, y se continúa con la determinación del mismo modo que el rutinario, sólo que si no se obtiene formación de coágulo después de 200 seg., se detiene la determinación y se registra que el tiempo es mayor de 200seg. Como parte de la especificación del método se determinó el CV de la prueba, obteniéndose de 0.8.

### 4. VALORES DE REFERENCIA.

Con el lote No. 971511 de CK Prest y 30 muestras analizadas de pacientes, en el equipo ST<sub>1</sub>, se obtuvo el siguiente intervalo: **25 - 36 seg.**  
El pool Testigo analizado en este mismo tiempo, coaguló en: **34.4 seg.**

Para la incubación prolongada (una hora) se obtuvo el tiempo de formación de coágulo para el Testigo de: **45.0 seg.**

Se registra su tiempo ya que la interpretación de la prueba TTPa incubado una hora, es indicada por medio del Índice de Rosner, donde de obtenerse mayor o igual a 15, se apoya la presencia de inhibidor de la coagulación.

## 5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Para el TTPa rutinario, en general, se considera que un alargamiento de ocho segundos respecto al testigo, expresa una alteración, y donde de inicio se pueden considerar como responsables, a los factores antihemofílicos (FVIII y FIX) de los restantes participantes de la vía intrínseca (FXII, FXI) o de la común (FX, FII, FI). Se prolonga también si el FI es inferior a 100 mg/ml.

Tiempos cortos se pueden observar, después de una punción venosa deficiente, o si el plasma aún contiene plaquetas, o en la Coagulación Intravascular Diseminada. Cuando los valores son anormales se aconseja realizar repetición del estudio, con la mezcla 1:1 con pool, para descartar la presencia de inhibidor de la coagulación; la cual se revelaría si aún así el tiempo de coagulación se mantuviera alargado (Cuando menos cinco segundos arriba del tiempo que emplea el pool sólo en el mismo estudio). Si en el estudio de mezcla hay corrección del tiempo de coagulación entonces se aconseja efectuar las pruebas diferenciales para determinar el factor deficiente.

La primer prueba que ayuda a señalar el factor (ó Factores, en los casos más complicados) deficiente, es el Tiempo de Protrombina, ya que si éste no se encuentra alargado, entonces se está apuntando a que se encuentra en la vía intrínseca (El TP respalda como buenas la extrínseca y común). Y de aquí se procede a determinar él o los Factores que más comúnmente se conocen pueden estar deficientes, como son el FVIII y FIX.

Para la determinación de inhibidores débiles, éste procedimiento se puede considerar como el último a realizar, dentro de una fase de escrutinio inicial en su búsqueda, ya que conociéndose que en la determinación de TTPa son muchas las variables analíticas que afectan el resultado, por ejemplo, el tipo y concentración de activador y la composición y concentración del fosfolípido, las cuales pueden determinar el tiempo de incubación óptimo del reactivo para obtener una activación completa del plasma, con resultados reproducibles; por lo que se están modificando las condiciones estándares para incrementar las posibilidades de revelar cualquier actividad, de algún anticuerpo, por débil que sea.

### III. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA SENSIBLE A LA PRESENCIA DE ANTICOAGULANTE LÚPICO (TTP-AL)<sup>76</sup>.

#### 1. - DEFINICIÓN Y UTILIDAD.

Se trata de una determinación de TTPa, pero con modificaciones, ya sea de la concentración del fosfolípido o el tipo de activador que contenga o en ambos. Se conoce que aumenta la sensibilidad de la prueba para detectar AL, al modificar ambos componentes, en especial, si el fosfolípido es cefalina y el activador es sílica.

#### 2.- FUNDAMENTO.

Consiste en diluir la Tromboplastina parcial, generalmente 1:20, para evidenciar un inhibidor, probablemente de tipo lúpico, que no puede manifestarse porque el reactivo contiene altas concentraciones de fosfolípidos. Al diluirse el antígeno (Tromboplastina parcial) se consigue una zona de equivalencia de la reacción. El activador más empleado es el caolin (Silicato de aluminio -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si -) generalmente con un tamaño de 0.1- 4 μ, aunque se han obtenido mejores resultados con Sílica micronizada (SiO<sub>2</sub>, Dióxido de silicio que microcristalizado mide 0.5 - 1.0 μ) pero su costo es mayor (Los 100g se cotizan en \$9.15, los 100g de Caolin en \$2.87). El ácido Elálgico (C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>) no aumenta la sensibilidad en la detección de AL<sup>70</sup>

#### 3. - TÉCNICA.

Material y Reactivos:

1. Plasma Pobre en plaquetas, obtenido a partir de sangre recogida en Citrato de sodio 0.025M en la proporción de un volumen de citrato por cada nueve volúmenes de sangre.
2. Tromboplastina Parcial sensibilizada para determinar un inhibidor de la coagulación, probablemente del tipo lúpico. De manera casera, se puede realizar la dilución de la Tromboplastina parcial que se usa en la determinación del TTPa, pero debe establecerse qué dilución es la más adecuada; en nuestro laboratorio se realizaron diluciones al CK Prest, Diagnostica Stago y se lograron resultados comparables, con la dilución 1:20 observándose que el rango de referencia es más alto, con respecto al preparado comercial. El preparado comercial TTP-AL, emplea cefalina (Fosfolípido) diluida (1:10) y como activador sílica. Se reconstituye según instrucciones del fabricante. Por la presencia del activador, el reactivo debe agitarse antes de usarse.
3. CaCl<sub>2</sub> 0.025M incubado a 37°C.
4. Coagulómetro, ST<sub>4</sub>, Diagnóstica Stago.



Procedimiento :

Pipetear en dos cubetas:

Plasma citratado, paciente o control 50  $\mu$ l

TTPa-AL (bien resuspendido) 50  $\mu$ l

Dejar incubar exactamente 180" a 37°C

CaCl<sub>2</sub> 0.025M preincubado a 37°C 50  $\mu$ l

Inmediatamente se pone en marcha el cronómetro

Y se registra el tiempo de formación del coágulo.

Si no se obtiene formación de coágulo después de 180 segundos de reacción, se detiene el ensayo y se registra que el TTP-AL es mayor de 180 segundos. Como parte de la especificación del método se determinó el CV de la prueba, obteniéndose de 0.5.

#### 4. - VALORES DE REFERENCIA.

Con el lote No. 980101 de TTP-AL y 30 muestras analizadas de paciente seleccionados, en el equipo ST<sub>1</sub>, se obtuvo como límite de referencia de coagulación el siguiente: **Hasta 45.0 seg.**

El pool Testigo analizado en este mismo tiempo, coaguló en: **38.9 seg.**

#### 5. - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Una prolongación en la prueba de TTP-AL no es definitiva para asegurar la presencia de AL. Debe repetirse la determinación, con la mezcla 1:1 con testigo, de esta manera se descarta la deficiencia de algún factor de la coagulación.

**Se definió corrección, cuando el resultado del estudio de mezcla no superó en más de cinco segundos al resultado del testigo.**

Si se obtiene nuevamente prolongado el tiempo del estudio, sólo se ha establecido la presencia de un inhibidor de la coagulación **PROBABLEMENTE** de tipo lúpico. Ya que es una prueba especial que entrega un dato importante para asegurar su presencia.

Aunque el rango de referencia indica hasta 45.0 segundos, en la práctica se ha encontrado, que los pacientes positivos a AL entregan resultados mucho mayores (130 segundos o más).

IV. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE CAOLIN (TK)<sup>60, 62</sup>.

1. DEFINICIÓN Y UTILIDAD.

Consiste en realizar un tiempo de coagulación usando exclusivamente caolín, hecho que hace a la prueba particularmente sensible a agentes, que como el AL, se ven afectados por la actividad procoagulante de los fosfolípidos residuales, en las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos.

2. FUNDAMENTO.

La completa ausencia de fosfolípidos en el medio de reacción asegura al sistema del plasma a coagular con la sola vía intrínseca, sorteando cualquier inhibidor a los factores de la vía extrínseca y sobre todo a ejercer su mecanismo inhibitorio SOLO en la cascada de coagulación.

3. TÉCNICA.

Material y Reactivos

Los aparatos fotoópticos no pueden usarse para el método, porque la suspensión de caolín (Fuertemente turbia) interfiere en la detección del coágulo.

1. Plasma pobre en plaquetas, con menos de  $1 \times 10^9/L$ , obtenido por doble centrifugación a 2000-2500g por 10 minutos, es muy importante asegurarse que se cumpla con este requisito.
2. Suspensión de caolín (Silicato de Aluminio,  $Al_2O_3Si$ ) en concentración de 20mg/ml, preparada con caolín J.T.Baker (No. de catálogo 2242-20) Lote H08477, con solución salina. Se ha recomendado la preparación con buffer Owren, sin embargo una evaluación comparativa con ambas soluciones, demostró que la solución salina es igualmente aplicable.
3. Debido a que la suspensión sedimenta rápidamente, hay que agitarla inmediatamente antes de usarse. Se prepesaban 300mg de caolín y se agregaban 15ml de solución salina al inicio de las determinaciones. Se encontró que es estable hasta los 15 días de haberse preparado.
4. Coagulómetro a emplear (No fotoóptico) -ST<sub>4</sub>, Diagnostica Stago.

Procedimiento:

Pipetear en dos cubetas:

Plasma citratado, con  $<1 \times 10^9/L$  plaquetas 100 $\mu$ l

Suspensión de caolín (recién homogeneizado) 50 $\mu$ l

Dejar incubar exactamente 180"

CaCl<sub>2</sub> 0.025M preincubado a 37°C 50 $\mu$ l

Poner inmediatamente en marcha el cronómetro y se registra el tiempo de formación del coágulo.

Si no se obtiene formación de coágulo después de 180 segundos de reacción, se detiene el ensayo y se registra que el TK es mayor de 180 seg.

La preparación de la suspensión debe realizarse lo más precisa posible, y se debe solo aceptar su preparación si el control o testigo no varía en más de cinco segundos, del tiempo en promedio obtenido. Como parte de la especificación del método se determinó el CV de la prueba, el cual resultó de 4.4.

#### **4. VALORES DE REFERENCIA.**

Con la suspensión de caolín 20mg/ml y 30 muestras analizadas de pacientes seleccionados, en el equipo ST<sub>4</sub>, se obtuvo el siguiente intervalo de referencia: **66.8 a 110.4 seg.**

El pool testigo coaguló en: **90.2 seg.**

La prueba se recomienda interpretar según el cálculo del **Índice de Rosner**, donde el intervalo queda: **-19.1 a 15.1**

Lo que representa que nuestro IR de corte es también 15, como el generalmente reportado en la literatura.

#### **5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**

Un resultado prolongado (IR>15) en la prueba de TK no es definitivo para asegurar la presencia de AL, solo se ha establecido la presencia de un inhibidor de la coagulación, pero que aporta un dato positivo hacia su presencia.

**V. PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA TROMBOPLASTINA TISULAR**  
(o Tiempo de Protrombina diluido TPd)<sup>8,35</sup>

**1. DEFINICIÓN Y UTILIDAD.**

Se trata de una prueba de TP, pero con modificación de la concentración del extracto tisular (Tromboplastina completa, fracción proteica y lipídica). Se conoce que aumenta la sensibilidad de la prueba para detectar AL, por la gran dilución que se realiza, esto es, la sensibilidad, depende de la dilución de la tromboplastina.

**2. FUNDAMENTO.**

Para evidenciarse un inhibidor que no puede manifestarse porque el reactivo contiene altas concentraciones de fosfolípidos, se realiza dilución 1:500 de la tromboplastina completa, llegando a una zona de equivalencia de la reacción. Recientemente se ha conseguido mayor sensibilidad para detectar un inhibidor de la coagulación, por el uso de las tromboplastinas humanas recombinantes.

**3. TÉCNICA.**

Material y Reactivos

1. Plasma pobre en plaquetas, obtenido a partir de sangre recogida en citrato de sodio 0.025M en la proporción recomendada.
2. Tromboplastina completa (Diluida), sensibilizada para determinar un inhibidor de la coagulación, probablemente de tipo lúpico. La dilución se realiza en el laboratorio, a la Tromboplastina utilizada para la determinación del TP (Neoplastine® Cl Plus®) empleando como solvente, solución salina. En la literatura es recomendada una dilución muy alta, 1:500; en el laboratorio se realiza primero una dilución 1:10 y a su vez de ésta, otra de 1:50 (Dilución final 1:500). Por la presencia de la fracción proteica, la tromboplastina diluida debe preincubarse a 37°C antes de usarse.
3. CaCl<sub>2</sub> 0.025M incubado a 37°C.
4. Coagulómetro ST<sub>4</sub>, Diagnóstica Stago.

Procedimiento:

Pipetear en dos cubetas:

Plasma citratado, paciente o control	50µl
Tromboplastina diluida 1:500	50µl
Dejar incubar exactamente 300'' a 37°C	
CaCl <sub>2</sub> 0.025M incubado a 37°C	50µl
Inmediatamente se pone en marcha el cronómetro	
Y se registra el tiempo de formación del coágulo.	

Si no se consigue formación de coágulo después de 180 segundos de reacción, se detiene el ensayo y se registra que el TPD es mayor de 180seg. El tiempo de incubación de 300 segundos (o cinco minutos) es fundamental, debido a que se encuentran muy dispersos los elementos bioquímicos (Fracción proteica y lipídica) y su interacción es más lenta. La elaboración de la dilución debe ser lo más exacta posible y se debe solo aceptar su preparación, si el control o testigo no varía en más de cinco segundos. Como parte de la especificación del método se determinó el CV de la prueba, el cual se obtuvo de 2.6.

#### 4. VALORES DE REFERENCIA.

Con el lote No. 970775 de Neoplastine® CL Plus®, diluido 1:500 con solución salina y 30 muestras analizadas de pacientes seleccionados, en el equipo ST<sub>4</sub>, se obtuvo el siguiente rango de referencia: **64.2 a 100.1 seg.**

El Pool Testigo analizado, coaguló en: **80.5 seg.**

La literatura recomienda expresar el resultado de la prueba, como cociente o proporción (ratio), esto es, dividir el resultado de la mezcla 1:1 (Paciente y Testigo) entre el resultado del testigo, de esta manera el rango de referencia quedó como sigue:

**Cociente de referencia para TPD = 0.8 a 1.2**

#### 5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Una prolongación en la prueba de TPD no es definitiva para asegurar la presencia de AL. Debe continuarse el estudio, con la determinación de la mezcla 1:1 con testigo, de esta manera se descarta la deficiencia de un factor de la coagulación. Si se obtiene nuevamente prolongación del estudio, se ha establecido la presencia de inhibidor de la coagulación, convirtiéndose en un dato positivo en la determinación del AL. El límite superior de referencia, coincide con el más frecuentemente reportado en la literatura, aunque se conoce que el tipo de tromboplastina influye en este valor, encontrándose en 1.3 ó 1.5 en algunos casos.

## VIII. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DEL VENENO DILUIDO DE LA SERPIENTE DE RUSSELL (TVRd)<sup>39</sup>.

### INTRODUCCIÓN.

Desde tiempos remotos es un hecho conocido que la picadura de una serpiente es mortal para el individuo que la sufre, en muchos casos no se cuenta con el tiempo suficiente para prestar una ayuda. Son la Cobra y el Aspid, las dos serpientes más peligrosas, son la causa principal de unas 20,000 muertes anuales en la India. Sin embargo se conocen cerca de 250 especies de serpientes venenosas, distribuidas en todo el mundo. Popularmente se les llama víboras, esto debido a que la gran mayoría de ellas nacen de huevos, denominándose seres vivíparos, nombre otorgado por que procede de dos palabras latinas que significan "hijuelos paridos vivos". Al contar con técnicas de caza segura y de aislamiento de sus venenos, se permitió iniciar la caracterización de ellos. Todos los venenos son muy complejos y consisten de numerosos componentes, principalmente enzimas (Neuro o hematotóxicas): Enzimas proteolíticas, Hialuronidasas, Colagenasas, Fosfolipasas, etc. En los venenos ricos en enzimas proteolíticas, hay componentes que afectan la coagulación sanguínea de la presa<sup>71</sup>. Algunos de estos componentes, son de tipo trombina o son enzimas fibrinolíticas, algunas pueden solo activar al FX y otras a las plaquetas; todas ellas tienen un atractivo interés, en vista de su potencial uso clínico y su aplicación como herramienta para elucidar el complicado mecanismo de la coagulación.

La serpiente de Russell (*vipera russelli* y quizás por esto la literatura la nombra Russell's Viper – Víbora de Russell-), habita en amplias regiones de la India, al sudeste de China y algunas partes de Indonesia. Es un animal fuerte que puede medir hasta un metro de longitud y que al atacar puede inyectar grandes cantidades de su potente veneno, por lo que es un animal temido en términos generales, aunque algunos habitantes la consideran parte de los animales sagrados y se niegan resueltamente a matarles. La Serpiente de Russell es frecuentemente causa de muertes fatales en Tailandia y también es un gran problema en la India.

### I. DEFINICIÓN Y UTILIDAD.

Es una prueba de coagulación especial, donde se agrega una proteína coagulable (proteasa multimérica) del veneno de la serpiente de Russell al plasma anticoagulado. La proteína coagulable del veneno activa directamente al FX. Además de ser útil para analizar la deficiencia de FX, FV, FII, FI y cofactor VIII, sirve para investigar la presencia del inhibidor AL pues éste inhibe al veneno.

## 2. FUNDAMENTO.

La activación del FX involucra un clivaje proteolítico en el enlace Arg-Ile de la cadena pesada de dicho factor, produciéndose dos fragmentos, uno pequeño con un peso molecular de 11,000 D y uno grande que posee el sitio activo, con un peso de 44,000 D. Estos fragmentos integran posteriormente, un complejo proteico no covalente que participa en la activación del FII. El FX es activado por el veneno de Russell diluido, con lo que se favorece la formación del complejo protrombinasa, la presencia de AL, evita que dicho complejo actúe adecuadamente y el tiempo de coagulación se prolonga por hacer la superficie catalítica, inaccesible al curso de activación de los factores de la vía intrínseca.

## 3. TÉCNICA.

Debido a que el plasma es requerido pobre en plaquetas y que la participación del veneno de la Víbora de Russell emplea presencia de fosfolípidos, es necesaria la participación de una Tromboplastina Parcial (CK Prest®) en una concentración adecuada.

### Material y Reactivos

1. Plasma Pobre en plaquetas.
2. Veneno diluido de Víbora de Russell, en concentración de cuando menos 0.50µg/ml de proteína coagulable, en la dilución adecuada de tromboplastina parcial que logre coagular un control entre 25-30 seg.

La proteína coagulable, esencialmente por su calidad de proteasa (enzima proteolítica) requiere de un medio que le entregue el pH y fuerza iónica adecuados para actuar, estos requisitos los cumple el buffer TRIS a pH 7.6, por lo que tanto la preparación del veneno como de la tromboplastina parcial, debe realizarse con este buffer. La presentación comercial del veneno indica (el inserto se presenta en la Figura AB8) que se encuentra a una concentración de 0.170mg/ml, se selecciona la dilución 1:300 que consigue la concentración más cercana a lo recomendado (consúltese la Tabla AB2).

Considerando que 0.170mg=170µg/ml de proteína coagulable, en una:

Dilución	concentración obtenida en µg/ml
1:250	0.68
1:300	0.56
1:350	0.49

Tabla AB2. Selección de la dilución del veneno, se muestra que la dilución 1:300 se acerca a lo recomendado en la literatura.

F. 10000000  
10000000**R.V.V.**

Russell's Viper Venom


**DIAGNOSTICA  
STAGO**

Cat. No. 00361

 Cat. No. 00361  
 Size of 2.0 ml

- **PRODUCT ORIGIN**

R.V.V. is a coagulant protein extracted from Russell's viper venom (*Vipera russelli*).

- **PRODUCT OFFERING**

1 x 1 ml vial; 1 ml of this solution corresponds approximately to 0.170 mg of coagulant protein.

- **PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS**

- Molecular weight: about 60,000
- Optimal pH: 7.7 (7 to 9)
- Km: 0.25 mM at 25 °C

- **BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS**

R.V.V. is a highly specific endopeptidase whose only known substrate is factor X.

The activation of factor X involves the proteolytic cleavage of an Arg-Ile bond on the heavy chain which yields a small activation fragment with a molecular weight of 11,000, and a large activation fragment containing the active site with a molecular weight of 44,000. These fragments appear to form a non-covalent protein complex. This mechanism is strictly calcium dependent.

Analisis 17.1.8  
 Analisis FERRIS  
 Leticia 900102

January 1992

Figura Ab8. Información de las características bioquímicas que posee la proteína coagulable del veneno de la víbora de Russell.



3. Tromboplastina Parcial diluida 1:64 en TRIS, la selección de la dilución se muestra en la Tabla Ab3.
4. Coagulómetro a emplear, ST<sub>4</sub>, Diagnostica Stago.

<u>Dilución</u>	<u>Tiempo de Coagulación en segundos del Testigo</u>
1:16	15.4 , 16.1
1:32	20.3 , 20.7
1:64	26.9 , 26.5
1:138	37.2 , 37.8

Tabla Ab3. Selección de la dilución de Tromboplastina Parcial empleada en el laboratorio, se muestra que la dilución 1:64, utilizada con la dilución 1:300 del veneno de la víbora de Russell, se acerca a lo recomendado en la literatura.

#### Procedimiento:

Pipetear en dos cubetas:

Plasma citratado, paciente o control 50 $\mu$ l

Veneno diluido 50 $\mu$ l

Tromboplastina parcial diluida 50 $\mu$ l

Dejar incubar exactamente 180" a 37°C

CaCl<sub>2</sub> 0.025M preincubado a 37°C 50 $\mu$ l

Inmediatamente se pone en marcha el cronómetro y se registra el tiempo de formación del coágulo

Si no se obtiene formación de coágulo después de 180 segundos de reacción, se detiene el ensayo y se registra que el TVRd es mayor de 180 segundos. Como parte de la especificación del método se determinó el CV de la prueba, el cual fue de 1.0.

#### **4. VALORES DE REFERENCIA.**

Al analizar 30 muestras de pacientes seleccionados y con los lotes No. 960462 de Veneno de la Serpiente de Russell (R.V.V., Russell's Viper Venom, Diagnóstica Stago) diluido 1:300 y el No. 980112 de CK Prest<sup>®</sup> diluido 1:64, se obtuvo el siguiente rango de referencia: 25.4 a 28.3 s

El Pool Testigo analizado, coaguló en: 26.5 s

#### **5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**

Una prolongación en la prueba de TVRd no es definitiva para asegurar la presencia de AL, también puede deberse a deficiencia de FII, FV o FX. Debe repetirse la determinación, con la mezcla 1:1 con testigo, donde si se corrige el resultado de la mezcla (se considera que no supere en más de 5

segundos el resultado del testigo) se está presente a una deficiencia de un factor de la coagulación de la vía común. Sin embargo el cálculo más aceptado para evaluar el resultado de esta prueba, es con el cálculo del siguiente cociente:

$$\text{Cociente o ratio} = \frac{\text{TVRd de la mezcla}}{\text{TVRd del testigo}}$$

Donde:

TVRd de la mezcla, es el tiempo de formación del coágulo, de la mezcla 1:1 de plasma problema y testigo.

TVRd del testigo, es el tiempo de formación del coágulo del pool testigo.

La interpretación de los resultados se hace de acuerdo al cociente obtenido, siendo positivo si este es mayor de 1.3

## VII. PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS EN FASE HEXAGONAL (PFHx)<sup>65</sup>.

(PRUEBA CONFIRMATORIA DEL TIPO LÚPICO)

### INTRODUCCIÓN.

La distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica y los fosfolípidos aniónicos no se encuentran expuestos en su superficie; solo que la célula sea activada, estos fosfolípidos cargados negativamente tienen cambios estructurales que los hacen asequibles para participar en varias funciones celulares. Debido a su naturaleza anfipática, en un medio acuoso los fosfolípidos tienden espontáneamente a formar bicapas. De esta manera es posible obtener membranas fosfolipídicas artificiales, como los liposomas, en los cuales los fosfolípidos exponen sus cabezas polares al contacto con el agua mientras que ocultan sus cadenas no polares en el interior de las membranas, donde se estabilizan por interacciones hidrofóbicas. El tipo de disposición de las moléculas de fosfolípidos en agua, depende en realidad de muchos factores, que a su vez dependen de la forma de sus moléculas. Por ejemplo:


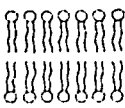
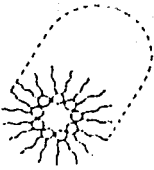



- . Los fosfolípidos NEUTROS (que constituyen la mayor parte de los fosfolípidos de las membranas), suelen poseer moléculas cilíndricas que tienden a formar bicapas.
- . Los lisofosfolípidos (fosfolípidos a los que se les ha extraído un ácido graso) tienen moléculas de forma cónica que tienden a agruparse en micelas (pequeñas gotitas dispersas en agua) con los grupos polares en contacto con el medio acuoso.
- . Los fosfolípidos ÁCIDOS y los que poseen ácidos grasos poliinsaturados, también presentan moléculas cónicas, pero con la cabeza polar más pequeña que el resto de la molécula, por lo que constituyen en agua la llamada **fase hexagonal** caracterizada por la formación de cilindros fosfolipídicos con el agua contenida en su interior, en contacto con las cabezas polares y obligando a los extremos lipídicos a permanecer en el medio externo (Consúltese la Figura AB9). La manipulación para la construcción de uno u otro tipo de configuración es relativamente fácil, y su aplicación en diferentes campos es ya un hecho cotidiano.

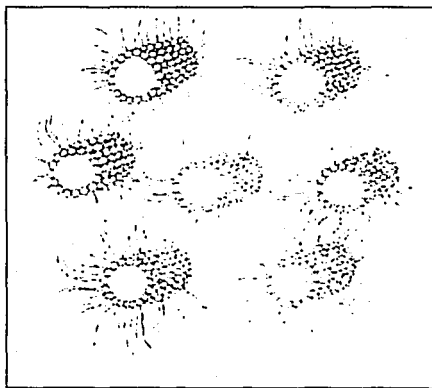
### 1. DEFINICIÓN Y UTILIDAD.

La prueba es un conjunto de reacciones, donde se pretende neutralizar la acción del AL, lo que confirmaría su presencia, empleando

## ANTICOAGULANTE LÚPICO

fosfatidiletanolamina en fase hexagonal, observándose este efecto al continuar con el procedimiento de TTPa. Esto se realiza incubando el plasma problema

	Micelar	Bicapa	Hexagonal
Fase			
Forma molecular			
Lípidos	Detergentes Lisofosfolípidos	Fosfatidilcolina Esfingomielina Fosfatidilserina	Cardiolipina Ácidos fosfatídicos



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIGURA AB9.- Tipos de disposición de las moléculas de Fosfolípidos, en el esquema superior se muestra de qué manera influyen la forma molecular de los lípidos y los extremos polares y no polares en el tipo de fase que se produce (micelar o hexagonal), en la parte inferior, se muestra la disposición en conjunto de fosfolípidos en fase hexagonal.

CON y SIN fosfolípido aniónico y después realizando TTPa sensible a la presencia de AL (cefalina diluida y partículas de sílice). Se procede entonces, a comparar los resultados CON y SIN fosfolípidos, donde para considerarse positiva la prueba, el primer resultado debe ser menor comparado con el resultado del segundo. Es una prueba considerada de alta categoría por CLIA, desde 1988 y con registro en el CDC.

## 2. FUNDAMENTO.

La prueba se realiza en plasma documentado con sospecha de AL, al cual se agrega un fosfolípido (Fosfatidiletanolamina) arreglado en su configuración geométrica hexagonal, de tal manera que el anticuerpo buscado (AL) sea capaz de fijarlo. Como la mezcla del plasma problema con un plasma normal liofilizado es parte de este procedimiento, los estudios de mezcla posterior a la realización del estudio de Staclot LA, ya no son requeridos.

## 3. TÉCNICA.

### Material y Reactivos

1. Plasma pobre en plaqueta.
2. Preparado comercial: Staclot-LA, que contiene los siguientes reactivos:

Reactivo 1. - Amortiguador

Reactivo 2. - Fosfatidiletanolamina en fase hexagonal liofilizada

Reactivo 3. - Plasma normal liofilizado

Reactivo 4. - TTPa sensible a AL (Cefalina y sílice) liofilizado

Reactivo 5. - Solvente para reconstitución del reactivo 4.

Se reconstituyen los reactivos según las instrucciones del fabricante.

3. Coagulómetro a emplear, ST<sub>4</sub>, Diagnostica Stago.

### Procedimiento

Modificado (del que aparece en el inserto del reactivo), para determinar Staclot® LA, en el equipo ST<sub>4</sub>:

	Cubeta 1 Sin fosfolípido	Cubeta 2 Con fosfolípido
Plasma, paciente o control	25 µl	25 µl
Reactivo 1	25 µl	NO
Reactivo 2	NO	25 µl
Reactivo 3	Dejar incubar exactamente 540" (ó 9 minutos)	
	25 µl	25 µl
Reactivo 4	Mezclar e incubar exactamente 60"	
	25 µl	25 µl
	Mezclar e incubar exactamente 300"	
CaCl <sub>2</sub> 0.025M incubado a 37°C	50 µl	50 µl

Inmediatamente se pone en marcha el cronómetro y se registra el tiempo de formación del coágulo en cada cubeta.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Dado que en la cubeta 1 (o tubo 1, como se refiere en el inserto) no contiene fosfolípido, y en caso de que se encontrara presente AL, y que posteriormente se realiza un TTPa sensible a AL, este tubo debe obtener tiempos de coagulación prolongados, con respecto a la cubeta 2, donde al encontrarse al fosfolípido el AL, se neutraliza, al retarce con la configuración especial del fosfolípido y que al realizarse TTPa sensible a AL no hay prolongación.

Es improbable obtener NO formación de coágulo, cuando menos en el tubo 2, ya que es donde se neutraliza el AL y como se encuentra presente plasma normal (reactivo 3) entregará un tiempo de coagulación. Por lo que de cualquier manera, se puede realizar el siguiente cálculo:

$$(TC1 - TC2) = \text{Diferencia en s}$$

Donde:

TC1 = Tiempo de coagulación de la cubeta 1

TC2 = Tiempo de coagulación de la cubeta 2.

En los casos donde no se consigue tiempo de coagulación de la cubeta1 entonces se anota que fue mayor de 180segundos y la diferencia queda como mayor a 8 segundos (>8seg).

El equipo ST<sub>4</sub> cuenta con la programación de esta prueba, en el submenú OTROS, donde es importante tener en cuenta lo siguiente:

Del procedimiento alterno para determinar Staclot LA en el equipo ST<sub>4</sub>, se menciona que al disminuir a 25 µl cada reactivo (de 50µl mencionados en el inserto) el tiempo de incubación será mayor, de 540 s que menciona el inserto, en este procedimiento alterno, se establece de 600 seg. ; pero porque a los 510 segundos empezará una señal sonora para que a más tardar a los 540seg se hallan agregado los 25 µl del reactivo 3, para que 60 segundos más tarde, esto es, al cumplirse los 600 seg. , otra señal sonora indicará la adición del reactivo 4; seguido de la incubación por 300 seg. para que una vez cumplidos, se dispensa CaCl<sub>2</sub>. Como parte de la especificación del método se determinó el CV de la prueba, el cual fue de 2.4.

#### **4. VALORES DE REFERENCIA.**

Con el Lote No. 981265E de Staclot LA y 20 muestras analizadas de pacientes seleccionados, en el equipo ST<sub>4</sub>, se obtuvo como limite de referencia de coagulación, la diferencia de: **8 segundos**

El pool Testigo se analizó, con el fin de control, obteniendo los siguientes valores:

Cubeta 1: 43.3 seg.

Cubeta 2: 38.7 seg.

$$\text{Diferencia} = (43.3 - 38.7) = 4.6 \text{ seg.}$$

## **5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.**

Una diferencia mayor a ocho segundos demuestra la dependencia de fosfolípidos por parte del inhibidor, lo que constituye el cumplimiento con todos los criterios establecidos para demostrar que es:

### **INHIBIDOR DE TIPO LÚPICO: POSITIVO**

El criterio para positividad se ha establecido como mayor al límite superior del rango de referencia. El resultado de un paciente en este límite o menor (Negativo) y que obtuvo cuando menos una prueba sensible positiva, es denominado "DUDOSO" de inhibidor DE TIPO LÚPICO (otros lo prefieren llamar INDETERMINADO).

La presencia de otros anticuerpos antifactor pueden alargar el tiempo de coagulación de Staclot LA. Cuando se sospecha la presencia de estos anticuerpos antifactor, se recomienda aplicar la prueba apropiada para el anticuerpo antifactor.

AUTOMATIZACIÓN EN HEMOSTASIA<sup>72</sup>

Los laboratorios de hemostasia y coagulación no son áreas limitadas al ejercicio de la monitorización de formación o disolución de coágulos; las pruebas actuales están fundamentadas en los principios bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos e inmunológicos que permiten identificar el sitio y la naturaleza de un defecto hemostático. De manera sencilla, para la detección de la formación del coágulo, se considera, para laboratorios de capacidad intermedia y que cuyas facilidades se limitan a la **práctica de pruebas básicas**, un método que emplea el uso de un gancho -y baño maría a 37°C-, donde se mide el tiempo requerido para la formación del coágulo, bajando y subiendo el gancho dentro del tubo cada segundo. Sin embargo a la par del desarrollo de pruebas con distintos fundamentos, numerosos instrumentos también han sido desarrollados, que operan de acuerdo con diferentes principios. Su sistema de detección y la técnica empleada son dos aspectos que permiten distinguir a los equipos, por ejemplo véase la siguiente Tabla Acl:

## Clases de equipos

Detector	}	Detección <u>mecánica</u> :
		Electromecánico, Fibrómetro, Electromagnético.
Detector de coágulo (coagulométrico)	}	Registro <u>Fotoóptico</u> de la opacidad del coágulo por intensidad del haz de luz.
Espectrofotómetro (Cromogénicas)		Fotométrico de transmisión de Luz
Contador de partículas	}	Impedancia, Rayo Láser, Conteo de Plaquetas, Agregómetro

Figura Acl. Clases de equipos según el tipo de detector que posea.



El desarrollo de métodos de coagulación en instrumentos automatizados permitió mejorar la información obtenida no sólo en términos de tiempo y costo si no que además los parámetros son informados con mayor veracidad al conseguirse mayor especificidad y sensibilidad.

Técnicas coagulométricas.

En 1950 el primer equipo de coagulación fué introducido: El Fibrómetro (BBL, una división de Becton Dickinson), un equipo semiautomatizado que empleaba un sistema mecánico sujeto a electrodos que median el punto final de la coagulación. El Fibrómetro representó un medio objetivo para comparar los datos de un laboratorio a otro o de un técnico a otro. Para la década de 1960 los laboratorios de coagulación de casi todo el mundo dependían de un Fibrómetro. El camino hacia la automatización completa, tuvo lugar en la década de 1970, por el incremento de la solicitud de estudios de coagulación, debido probablemente a un incremento de las incidencias de trombosis y con ello el uso de anticoagulantes orales o al desarrollo de cirurgías más sofisticadas. La nueva generación de equipos de coagulación incorporó, a semejanza de un espectrofotómetro, el registro de la transmisión de luz, para monitorear el punto final de la coagulación. El mecanismo de estos equipos está basado en el principio (FOTOÓPTICO) de que un cambio en la transmisión de luz ocurre cuando el plasma pasa de una fase líquida a un estado de gel (cuyo aspecto es opalescente). Aunque este principio puede trabajar bajo casi todas las condiciones (Lipemia, hemólisis y cierto grado de ictericia), algunas reacciones anormales pueden causar lecturas falsas. El siguiente paso, para saltar estos inconvenientes, consistió en el desarrollo del detector ELECTROMAGNETICO, donde la formación del coágulo es detectado ya sea porque un "balín" ya no se desplaza dentro del tubo o cubeta de reacción, o porque es cerrado un circuito eléctrico. Más tarde otros detectores fueron considerados y desarrollados:

Luz ultravioleta, fluorescencia, láser, etcétera, pero que son, propiamente, del campo de las técnicas cromogénicas. Sin embargo, la medición de la transmisión de luz visible o la interrupción de movimiento del "balín", en la generalidad de los casos, parecen ser los métodos más prácticos y económicos.

Diversas compañías han desarrollado equipos que son capaces de realizar determinaciones de tiempos de coagulación tanto coagulométricos como cromogénicos.

Técnicas cromogénas y fluorométricas.

El avance en el conocimiento del sistema de la coagulación condujo a la necesidad de requerir diferentes tipos de equipos. Para la medición de

enzimas de manera individual era importante saltar las interferencias que algunas variables (Inhibidores, coágulos deleznable) causan en las determinaciones coagulométricas. Se desarrollaron las determinaciones cromogénicas, algunas veces llamadas determinaciones aminolíticas, en las que por el uso de péptidos artificiales que liberan cromógenos o fluoróforos cuando se someten a clivaje enzimático, se detecta como reacción bioquímica específica un solo Factor del Sistema de la Coagulación, sin la necesidad de que éste se encuentre intacto. La hidrólisis de estos péptidos a cargo de los factores de coagulación activados ofrece un medio novedoso para explorar las diferentes reacciones. Merced a estos procedimientos es factible evaluar al FII, FVII, FIX y FX, así como a otros componentes del sistema fibrinolítico. El espectrofotómetro es requerido. Estos métodos parecen ser más precisos y rápidos que los tradicionales, no obstante, las técnicas cromogénicas y fluorométricas son costosas.

### EQUIPOS.

Las casas comerciales han desarrollado una gran variedad de instrumentos de coagulación. Por lo que para la adquisición de uno, es importante conocer las necesidades específicas del laboratorio, por ejemplo, la carga de trabajo, el tipo de paciente que se atiende (Pacientes pediátricos) o que si el equipo requiere del operador presente todo el tiempo durante el proceso, para adicionar el plasma y reactivos a intervalos específicos, así como la disponibilidad de recursos económicos.

### **DIAGNÓSTICA STAGO:**

#### STA COMPACT.

Es un equipo, completamente automatizado, el operador se encarga de colocar muestras y reactivos y de programar los estudios solicitados, el equipo se encarga completamente de pipetear y desechar las muestras leídas; puede realizar determinaciones por el método coagulométrico y por el método fotométrico, éste último para técnicas cromogénicas y es el que se explica a continuación:

La detección de las técnicas cromogénicas está basada en la absorbancia o densidad óptica de la luz monocromática (405 nm o 540 nm) obtenida por una lámpara de tungsteno-halógeno, que pasa a través de la cubeta que posee la reacción cromogénica.

El principio de la medición de la absorbancia está representado en la Figura Acl:

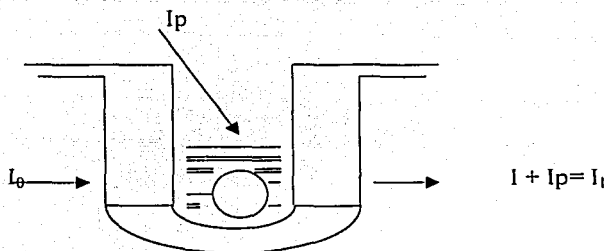


Figura Acl...- Principio de medición de la absorbancia.

El haz de luz que incide ( $I_0$ ) es parcialmente absorbido (405 o 540 nm) por la mezcla reacción cuando es pasado a través de la cubeta. El haz de luz transmitido es medido y se convierte (primero como resultado del haz incidente que pasó a través de la cubeta, más la cantidad de haz de luz que se pierde en el paso) a absorbancia por la fórmula:

$$A = -\log (I_1/I_0)$$

Donde :

$I_1 = I + I_p$  (primer medición que incluye el haz que incide y la luz ambiente)

$I_2 = I_p$  (Segunda medición, solo de la luz ambiente)

Cuando  $I_2$  es restada de  $I_1$ , el resultado es  $I$ , la cual es solamente el haz de luz transmitido que incidió y que verdaderamente se absorbió.

### ST<sub>4</sub>:

El equipo utilizado para la realización de este trabajo. Cumpliendo con la NOM 166-SSA-1997, dentro de esta tesis, se elaboró el siguiente:

#### MANUAL DE MANEJO DEL EQUIPO

<u>Nombre del equipo:</u>	ST <sub>4</sub>
<u>Fabricante:</u>	Diagnostica Stago, Francia
<u>Patente:</u>	Japón, 6-64068
<u>Número de serie:</u>	7032516
<u>Fecha de recibo:</u>	15 Junio 1997
<u>Fecha de inicio de operaciones:</u>	1° Agosto 1997
<u>Fechas de mantenimiento preventivo:</u>	Una visita por semestre
<u>Procedimientos de uso:</u>	

Descripción del equipo - Principios de operación -:

El equipo realiza exclusivamente determinaciones coagulométricas y comparte el mismo principio que el equipo STA Compact para este tipo de determinaciones.

El principio de detección del coágulo está basado es el incremento de la viscosidad de la muestra problema. Este incremento de la viscosidad es medido a través del movimiento de un balín de acero inoxidable, fabricado para efectuar un movimiento pendular a través de la longitud de la cubeta. El constante movimiento pendular del balín es efectuado por un campo electromagnético que es aplicado alternadamente en sitios opuestos de la cubeta, por dos bobinas independientes. La intensidad del campo electromagnético varía, dependiendo de la prueba a realizar, para determinar fibrinógeno ésta fuerza es débil y para las restantes es normal (Véase la Figura Ac2.).

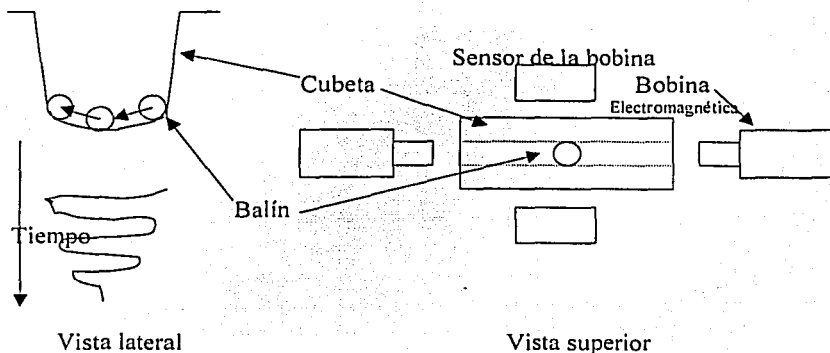


Figura Ac2.- Esquema de movimiento del balín y de los dispositivos que lo monitorean.

El principio de operación del equipo, permite analizar, sin problema, muestras que presenten hemólisis, lipemia o ictericia. Sin embargo, en plasmas en que se encuentra baja concentración de Fibrinógeno, es posible que no formen coágulo con la consistencia requerida y sea difícil determinar el tiempo de formación de coágulo (Coágulo deleznable).

Posee un termoblok a 37°C para la incubación de las muestras, y los reactivos. Las cubetas son de plástico para usar una sola vez, y aunque tienen una capacidad total de 400 µl, para la agitación efectiva se recomienda no sobrepasar los 300µl; por ello para algunas pruebas, como en Staclot LA, donde el inserto del reactivo marca un volumen participante total de 350 µl, se

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

ha diseñado un procedimiento alternativo, donde el volumen final es 175 µl. La señal de arranque o de inicio de la prueba coagulométrica es dada, cuando al medir la cantidad de reactivo para la prueba, y ser dispensado a la cubeta de reacción con la pipeta Eppendorf multipipette 4780 que se encuentra conectada al equipo, por medio de un cable eléctrico, se libera un señal que inicia el conteo del tiempo de coagulación.

INSTRUCCIONES DE OPERACIÓN.

El equipo se enciende al oprimir el botón de encendido, el cual se encuentra en la parte posterior, junto a la salida del cable de alimentación. En la pantalla se despliegan mensajes de revisión de su programación, hasta que se detiene en el menú principal (véase Figura Ac3.). Es necesario esperar 20 minutos para que el equipo alcance la temperatura adecuada; esta situación se señala, cuando se accede al modo de pruebas, donde despliega el mensaje "Temperature Too Low, Please wait or press esc, 35.2 °C". Se coloca una punta Combitip a la pipeta Eppendorf y se realiza un procedimiento de verificación preoperacional al comprobar que la pipeta Eppendorf entrega la señal que arranca el mecanismo electromagnético. Otra punta Combitip, para un segundo reactivo, se coloca también en el equipo.

Menú principal de la programación del Equipo ST4

MAIN MENU

1)TES MODE

3)TEST PARAMETERS

2)CALIBRATION

4)SYSTEM CHECK

ENTER CODE NUMBER: \_\_

Figura Ac3.- Se muestra el menú principal de la programación del equipo ST4.

Como todas las pruebas requieren la adición de calcio, una de las puntas Combitip se asigna para éste reactivo y se coloca, al lado del pozo donde se colocará el frasco con solución de CaCl<sub>2</sub> 0.025M, en este pozo el reactivo alcanza y se mantiene a 37°C. En el segundo pozo, generalmente se coloca el reactivo de Tromboplastina completa (para la determinación de TP) que se utiliza sólo ha esta misma temperatura; a un lado se coloca la Combitip con la que se dispensará este reactivo. Para la realización de la prueba de TTPa, la medición de la Tromboplastina parcial (CK Prest®, en éste caso) se realiza con otra micropipetas, que no forma parte del equipo ST4, el reactivo se coloca en un tercer pozo, que se mantiene entre 5-8 °C. Los pozos donde se colocan las tromboplastinas, están diseñados para mantener en movimiento un

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

balín recubierto con teflón, que se coloca dentro de éstos reactivos, para asegurar su homogeneidad en el momento de su uso. Junto al pozo para la tromboplastina parcial, se ubica el dispositivo dispensador de balines de acero inoxidable, necesarios para la detección de la formación del coágulo.

El procedimiento de calibración, se realiza según se menciona en cada prueba, la casa comercial Stago, maneja un pool de plasmas llamado Unicalibrador, para facilitar la elaboración de curvas, que como en el caso de la prueba de TP, el resultado se reporta en por ciento de actividad. Analizado el Unicalibrador, los datos se ingresan en el submenú o modo "programación de parámetros de pruebas", y el equipo imprimirá los tiempos obtenidos en una muestra determinada, junto con su conversión en porcentaje de actividad.

La pipeta eppendorf del equipo ST<sub>4</sub> cuenta con cinco topes, que en conjunto con la punta combitip se dispensa los tantos en volumen como el mínimo que marque la punta, en nuestro caso, la punta combitip, puede dispensar como mínimo en el primer tope, 25 µl, por lo que para dispensar 50 µl, en el caso de pipetear Neoplastine para la prueba de TP, se selecciona la posición 2 de la pipeta eppendorf, y para dispensar 100 µl de CaCl<sub>2</sub> para la prueba de TTPa, se selecciona la posición número 4.

El equipo emplea cubetas de plástico transparente, cuatro cubetas están unidas en una fila. La base de la cubeta es ligeramente redondeada para facilitar el movimiento pendular del balín. Tiene una capacidad máxima de 500 µl, se recomienda tener cubetas en las filas de incubación para que estén precalentadas al momento de su uso, junto con su balín de acero inoxidable. Difícilmente se ocupan las cuatro filas de incubación, ya que sólo hay una fila de lectura. El diseño de cuatro cubetas por fila, obedece a que una muestra es analizada por duplicado y que la fila alcanza para determinar el estudio en dos muestras.

Las filas de incubación, señaladas como A B.C y D, cuentan con un cronómetro que se pone en marcha, cuando se oprime el punto lila debajo de la fila correspondiente; cuando falten cinco segundos para llegar al tiempo establecido de incubación (el que se haya programado previamente) comienza a sonar un timbre, el cual alerta para continuar con la determinación, lo que implica llenar la punta combitip con el reactivo requerido y colocar la posición de la pipeta eppendorf para dispensar el volumen requerido. La fila de cubetas es entonces colocada en la fila de lectura, esto se señala al equipo oprimiendo el punto lila debajo de la fila de lectura, esto activa el movimiento de los balines dentro de las cubetas y es en este momento cuando se dispensa el volumen del reactivo final dentro de las cubetas, la adición de éste reactivo, pone en marcha el cronómetro que registrará el tiempo de formación del coágulo. El comportamiento en general del coagulómetro, se verifica junto con el estado de los reactivos, al analizarse los controles (propiamente, al

verificar el control de calidad). Para las pruebas rutinarias de TP y TTPa se emplean los controles normal y patológico (alargado), Coag Control N y P, Diagnostica Stago. Las pruebas se realizan como se señala en el anexo correspondiente. No se requirió programación especial para las pruebas, ya que el equipo cuenta con los tiempos estándares para las pruebas de TP y TTPa, pruebas 1 y 2 y para el Staclot, prueba seis. Véase la Figura Ac4, aunque en el submenú "OTROS", es posible diseñar la programación – específicamente los intervalos de tiempo de incubación y límites de espera de respuesta de formación de coágulo - de alguna prueba en especial.

---

Pruebas programadas en el equipo ST4

Test Mode

1) TP

2) TTPa

3) Fibrinogen

4) Factors

5) Heparin

6) Others

Enter code Number: \_\_\_\_\_

---

Figura Ac4.- Pruebas programadas en el equipo por la casa comercial.

Al finalizar la determinación, el equipo imprime un reporte, el analista, puede engrapar el resultado a la solicitud del médico.

El mantenimiento diario del equipo así como los procedimientos de limpieza que requiere son mínimos:

- Limpieza externa de superficies, de pozos de reactivos, de celdas de incubación y de lectura.
- Limpieza externa de la pipeta Eppendorf
- Verificar la cantidad de papel
- Cambio de las puntas combitip

## VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN Y EXACTITUD DE MICROPIPETAS SEMIAUTOMÁTICAS<sup>73,74,75</sup>

Los dispositivos de pipeteo automático permiten realizar repetidas determinaciones y vertidos de volúmenes iguales. Se han creado para asegurar el vertido más eficaz de volúmenes iguales de muestra y su posterior dilución en una proporción constante. Las pipetas automáticas comerciales son de tipo "muestreo", que por lo general se manejan manualmente. Las pipetas automáticas manuales suelen ser de la variedad por desplazamiento de aire, con unos márgenes en cuanto a capacidad de volumen de 1 a 6000  $\mu\text{l}$ . Para mayor comodidad se han creado modelos de puntas eyectoras, pipetas digitales de distintos tipos y pipetas de dispensación repetida. Las pipetas automáticas eliminan gran parte del tedio que representan los trabajos de muestreo y dilución repetitivos. Incluso cuando se trata de un número limitado, la velocidad con que funciona una pipeta automática constituye una gran ventaja. Como la fatiga del técnico se reduce al mínimo, la pipeta automática suele propiciar una mayor precisión en los trabajos de muestreo y dilución múltiple. Para los estudios de coagulación se emplean volúmenes pequeños de muestra y reactivos, se conoce que el deterioro de precisión de las micropipetas automáticas ocurre a un ritmo más rápido en los volúmenes menores, por lo que es importante contar con una buena calibración. Por esta razón se procedió a evaluar la calidad de los sistemas de medición, empleados para este desarrollo experimental. Las características de cada micropipeta se presentan en la Tabla Ad1.

MARCA	MODELO	EDAD	RANGO VOLUMEN ( $\mu\text{l}$ )
Finnipipette	28685Morada	2 años	200-1000
Finnipipette	3132Cafe	6 años	40 - 200
Eppendorf	4780	1 año	4 posiciones

Tabla Ad1. Características de las micropipetas automáticas empleadas.

Para conocer el volumen que deposita cada pipeta, se usó el método gravimétrico con agua desionizada como solución de densidad 1 y una balanza analítica Sartorius Research Modelo R200D (Precisión de 0.00001g -0.01mg-); así mismo se consideró, que la expulsión del volumen medido reduce su Coeficiente de Variación (CV) si se realizan cinco expulsiones adicionales (cuatro más al primero realizado) para tratar de expulsar el máximo posible de agua, y conseguir abatir en lo posible el efecto de operador y juzgar mejor el comportamiento de la pipeta.



De igual manera se recomienda controlar la temperatura del agua, en la medición de la precisión y exactitud de las pipetas, ya que por ejemplo, a 20°C, 1ml de agua pesa 0.9982g, por otro lado, se conoce que hay una clara correlación inversa de volumen y CV, de modo que la precisión mejora a medida que aumenta el volumen, por tanto, se recomienda evaluar a la pipeta por los volúmenes menor y mayor en los que habitualmente se emplea (Se acepta sin embargo, que una pipeta se calibre a un volumen y el segundo volumen sólo se considera para verificar que se ha realizado de manera adecuada la calibración). Nuestras evaluaciones giraron en torno a los volúmenes empleados en las determinaciones coagulométricas (50 y 100µl).

El método usado consistió en cargar 50 o 100µl de agua con la micropipeta, considerando la técnica de uso descrita por el fabricante, para luego expulsar accionando cinco veces el mecanismo de expulsión en un vaso de precipitados de 50ml previamente pesado (Tarado en la balanza analítica). La punta se humedeció antes de iniciar las pesadas, se realizó la aspiración y antes de expulsar se secó con papel absorbente mediante dos movimientos suaves hacia abajo a 90° uno con respecto al otro. Se registró el peso obtenido y la temperatura del agua. El procedimiento anterior se repitió por el mismo operador 20 veces, para cada micropipeta. Los pesos obtenidos se registraron y se realizaron los cálculos necesarios para conocer la imprecisión (CV) e inexactitud (Por ciento de error), de cada pipeta. Se tomó en cuenta el factor temperatura, según la Tabla Ad2.

TEMPERATURA °C	FACTOR
18	0.9986
19	0.9984
20	0.9982
21	0.9980
22	0.9978
23	0.9986
24	0.9973
25	0.9971
26	0.9968
27	0.9965
28	0.9963
29	0.9960
30	0.9757

Tabla Ad2. Factor de conversión de gramos a ml según la temperatura del agua. (Tomado del manual del diploma de la mejoría continua de la calidad en el laboratorio clínico de la AMBC del 8-31 Agosto de 1997 pag. 15/20).

LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA-SECCIÓN DE COAGULACIÓN Y FIBRINÓLISIS

CALLE 10 DE OCTUBRE  
DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICA

FECHA: 22 Septiembre 1977

DESCRIPCIÓN: Finnipipette digital café No. 3231 rango 40-200 µl

Temperatura: 25 °C

50 µl 100 µl

g	0.4471 Factor	ml	g	0.4471 Factor	ml
1	0.06304	> 0.06322	1	0.11352	> 0.11380
2	0.06314	> 0.06337	2	0.11353	> 0.11385
3	0.06246	> 0.06314	3	0.10435	> 0.10462
4	0.06309	> 0.06327	4	0.11343	> 0.11377
5	0.06284	> 0.06307	5	0.11293	> 0.11325
6	0.06341	> 0.06359	6	0.11332	> 0.11364
7	0.06282	> 0.06300	7	0.11281	> 0.11313
8	0.06315	> 0.06333	8	0.11314	> 0.11346
9	0.06337	> 0.06355	9	0.11311	> 0.11343
10	0.06324	> 0.06342	10	0.11293	> 0.11325
11	0.06320	> 0.06338	11	0.11342	> 0.11374
12	0.06331	> 0.06349	12	0.11353	> 0.11386
13	0.06300	> 0.06318	13	0.11325	> 0.11360
14	0.06324	> 0.06342	14	0.11308	> 0.11340
15	0.06327	> 0.06347	15	0.11285	> 0.11317
16	0.06323	> 0.06341	16	0.11272	> 0.11304
17	0.06313	> 0.06331	17	0.11315	> 0.11347
18	0.06334	> 0.06349	18	0.11347	> 0.11380
19	0.06325	> 0.06343	19	0.11260	> 0.11292
20	0.06343	> 0.06351	20	0.11285	> 0.11318

x̄ = 0.06333 ml = 63.33 µl

DS = 0.00164

CV = 0.26%

INEXACTITUD = 26.72%

x̄ = 0.11311 ml = 113.11 µl

DS = 0.00131

CV = 1.23%

INEXACTITUD = 13.41%

CONCLUSIONES: Pipeta fuera de especificaciones, depende de la  
solución del que se está haciendo la lectura con pipeta  
comercial de origen...

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

Figura Ad1.- Datos de verificación de la calibración de la pipeta Finnipipette digital café.

## DATOS DE CALIBRACIÓN DE LAS PIPETAS FINNIPETTE

INTERVALO DE LA PIPETA	VOLUMEN DE CALIBRACIÓN	VARIACIÓN PERMITIDA	CV
0.5 - 10 $\mu$ l	2 $\mu$ l	1.75 - 2.25	$\pm$ 0.25
5 - 40 $\mu$ l	10 $\mu$ l	9.8 - 10.2	$\pm$ 0.20
40 - 200 $\mu$ l	70 $\mu$ l	69.4 - 70.6	$\pm$ 0.60
200 - 1000 $\mu$ l	300 $\mu$ l	298 - 302	$\pm$ 2.0

## DATOS DE CALIBRACIÓN DE LA PIPETA MULTIPETTE 4780

PUNTA	INEXACTITUD	IMPRECISIÓN: MÍNIMO	IMPRECISIÓN: MÁXIMO
1 - 5 $\mu$ l	$\pm$ 2.5%	5.0 %	2.5%
10- 50 $\mu$ l	$\pm$ 0.8%	1.4 %	0.6%
25 - 125 $\mu$ l	$\pm$ 0.8%	0.8 %	0.3%
50 - 250 $\mu$ l	$\pm$ 0.7%	0.8 %	0.2%

Figura Ad2.- Especificaciones de precisión y exactitud de las pipetas.

En esta evaluación se encontró inexactitud de más de 10% de la pipeta Finnipette 3132Cafe (la de mayor empleo en las determinaciones coagulométricas, en los estudios de urgencias), consulte las Figura Ad1 y Ad2, por lo que se realizó mantenimiento (limpieza y lubricación de todos sus componentes), para ésto, es importante contar con el apoyo de Personal que tenga experiencia en desarmado de pipetas y contar con el esquema que muestre el número y orden de piezas. El esquema de la pipeta Finnipette 3132Cafe se muestra en la Figura Ad3. La limpieza se realizó con Extran y agua, y se engrasó las partes que así lo requieren, con el lubricante que acompaña a la pipeta. Se armó y recalibró el tope de aspiración hasta que dispensó el volumen solicitado. La forma de realizar el ajuste se muestra en la Figura Ad4.

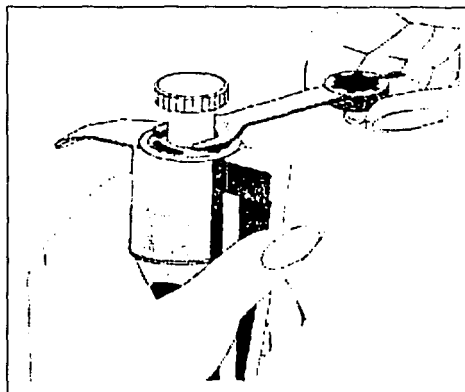


Figura Ad4.- Procedimiento de ajuste -recalibración-.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Se realizó nuevamente la evaluación, y se determinó satisfactorio el nuevo volumen dispensado. De nuestras tres pipetas era esperado que ésta fuese la que se encontrara en malas condiciones, debido a su edad y programa de trabajo. Para esta pipeta el fabricante declara, por ciento de error o inexactitud de 0.6%, establecido para un volumen de 70  $\mu\text{l}$ ; pero al recalibrarse y evaluarse a dos volúmenes uno mayor (100  $\mu\text{l}$ ) y uno menor (50  $\mu\text{l}$ ), obtenemos CV de 0.37 y 0.7, respectivamente.

Una mayor precisión (0.26%) al volumen menor, con respecto al obtenido en el volumen mayor (1.23%) - Contrario a lo que se hubiera esperado, que el volumen menor se comportara con un CV mayor, con respecto al del volumen mayor, el cual se espera con CV menor-, esto probablemente se deba a que su mayor uso se encuentra con el volumen menor y por tanto el tope de expulsión o los mecanismos para el desplazamiento (Pistones) han adquirido cierto hábito para reproducir mejor el volumen menor. Sin embargo no es alarmante el CV obtenido (Ya que no supera el 2%). Se consideró que la pipeta, a pesar de su edad, no estaba deteriorada en sus partes internas, aunque no se contaba con el registro de la fecha del último mantenimiento, pero los resultados sugieren que era la falta del mantenimiento, precisamente, el que la había llevado a esa situación.

En cuanto a la inexactitud observada tenemos que se consigue obtener la inexactitud recomendada por el fabricante al volumen de 70  $\mu\text{l}$  y sin observarse diferencia significativa (0.55% y 0.6% a 50  $\mu\text{l}$  y 100  $\mu\text{l}$  respectivamente), lo que interpretamos, que se mantiene lineal el error de exactitud. Punto que apoya que fue la falta de mantenimiento y no deterioro de sus mecanismos; sin embargo, por la edad de sus piezas, se debe mantener en observación su desempeño. También se considera como otro punto que daña el funcionamiento de la pipeta, el seleccionar sin precaución el volumen a medir, aunque esta pipeta presenta su mayor uso en 50 y 100  $\mu\text{l}$ , puede medir HASTA 200  $\mu\text{l}$  y al poderse emplear hasta este volumen y por la premura del tiempo, no se ajusta adecuadamente y al desenroscar el pistón, se sabe que se ha alcanzado el máximo volumen, por que se llega a un tope en que ya no da más, pero la escala marca más de 200  $\mu\text{l}$  (Es conocido que para ajustar el volumen deseado es adecuado pasar por no más de cinco unidades el volumen deseado y luego retornar, ya que así se ajusta mejor el mecanismo de la pipeta, esto es, deseando medir 200  $\mu\text{l}$ , llevo la escala a 205 y luego regresar a 200).

No tomar esta precaución es grave, ya que forza a los pistones y a los topes más allá para lo que fueron fabricados y por tanto, con el tiempo, la pipeta medirá más de lo que está marcando en la escala seleccionada. Por tanto, se necesitan estudios para conocer mejor el papel de las variables que participan en el deterioro de las micropipetas semiautomáticas.

## GLOSARIO

**Absorción:** Proceso en el que una sustancia penetra y se difunde en otra.

**Activación:** Paso del estado proenzimático (Zimógeno) de una molécula al estado enzimático catalítico, por la ruptura de uno más enlaces.

**Adquirido:** Relativo a una característica, situación o enfermedad, que se origina después del nacimiento y que no se debe a factores hereditarios ni relacionados con el desarrollo, si no que aparece como respuesta a influencias ambientales ajenas al organismo.

**Adsorción:** Unión química lábil de tipo superficial, que se establece entre partículas de un sólido o de un líquido con los átomos, iones o moléculas existentes en el medio

**Agregometría:** Medida cuantitativa de la cohesión plaquetaria en un fotómetro que registra cambios de transmisión de luz a través de una suspensión de plaquetas. La suspensión se prepara con sangre completa que se activa con varios agonistas.

**Aloanticuerpo:** Anticuerpo presente en el suero o en el plasma de un individuo, capaz de reaccionar con antígenos de otro individuo de la misma especie.

**Anticoagulante:** Sustancia que inhibe la formación de coágulos. En la obtención de sangre se usa el EDTA, el citrato de sodio y el oxalato, que se unen al calcio para evitar la coagulación.

**Anticoagulante Lúpico:** Anticuerpo circulante o adquirido que causa alargamiento en las pruebas de coagulación dependientes de fosfolípidos. Se observa de un 5 a 10% en los pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. También se asocia con otro tipo de enfermedades autoinmunes, neoplasias, infecciones, tratamiento con drogas así como en personas sin ninguna patología asociada.

**Anticuerpo circulante:** Anticuerpos patológicos que son "componentes endógenos anormales" que impiden la coagulación, en su mayoría son anticuerpos que podrían actuar en cualquier etapa de la coagulación.

**Antitrombina III:** Globulina alfa sintetizada por el hígado e inhibidor natural de la coagulación.

**Anuria:** Incapacidad para orinar; interrupción de la producción de orina o producción de un volumen inferior de 100-250ml por día. Aunque es posible vivir hasta dos semanas en estado de anuria, puede sobrevenir la muerte en las 24 horas siguientes a la pérdida total de la función urinaria.

**Automatización:** Método mecánico para llevar a cabo procesos analíticos.

**Calibración:** Conjunto de operaciones analíticas que asigna, bajo condiciones específicas, el valor numérico correspondiente a un componente, según el estándar de medición y su relación con las lecturas respuestas obtenidas en su proceso de medición.

**Cardiolipina:** Fosfoglicérido aniónico, esto es, aquellos que no tienen base nitrogenada, siendo sustituida por alcoholes. Al carecer de estos constituyentes de carga positiva, confieren al conjunto de la molécula de fosfoglicérido carga negativa, que es aportada por el fosfato. Fosfolípido que representa más del 10% de los fosfolípidos en la membrana interna de las mitocondrias.

**Catálisis:** Un fenómeno en el cual una cantidad de sustancia, aumenta la velocidad de una reacción química, sin ser ésta misma consumida.

**Cefalina:** Fosfolípido procoagulante.

**Celite:** Compuesto particulado de tipo plástico. También es llamada tierra de diatomeas.

**CLIA:** Clinical Laboratory Improvement Amendments. Ley americana en materia de Laboratorio Clínico.

**Clivaje:** Sinónimo de corte o escindir enlaces.

**Coagulación:** Proceso mediante el cual varias glicoproteínas interactúan con las plaquetas para formar un coágulo sanguíneo insoluble para evitar el flujo o la pérdida de sangre.

**Coágulo:** Masa gelatinosa que se forma o de sangre total que consta de fibrina, plaquetas y eritrocitos o de plasma en los ensayos de determinación y que consta de fibrina.

**Coágulo deleznable:** Coágulo inconsistente o que se deshace fácilmente. En las determinaciones coagulométricas rutinarias, donde el punto final es la formación de un coágulo inestable de Fibrina, sucede que la muestra posee un nivel del Factor I (Fibrinógeno) por debajo de lo normal.

**Cofactor, Coenzima:** Para la actividad catalítica, algunas enzimas requieren grupos prostéticos o cofactores. Estos cofactores son porciones no proteicas que pueden unirse a la molécula de manera fuerte o débil. Un cofactor puede ser un simple ion metálico; por ejemplo, el ion calcio en la cascada de coagulación, pero también puede ser de naturaleza orgánica, como algunos factores de la coagulación, denominándose entonces como Coenzima y en cuyo caso la parte proteica de la enzima se llama *apoenzima* y a la enzima activa completa (coenzima+apoenzima) se le denomina *holoenzima*. Un cofactor o coenzima cumple con una o más de las siguientes funciones: Contribuir hacia la correcta alineación del sustrato con relación al centro activo; ofrecer un sitio adicional de enlace y/o participar directamente en el mecanismo químico de la catálisis enzimática, por interacciones directas con el sustrato.

**Control:** Material para monitorear el desempeño analítico.

**Cromógeno:** Sustancia que absorbe la luz produciendo color.

**Cumarina (Warfarina):** Antagonista de la producción de factores dependientes de la vitamina K utilizada rutinariamente como anticoagulante terapéutico.

**Diátesis hemorrágica:** Predisposición o tendencia a sangrar.

**Disfibrinogenemia:** Anomalía cualitativa de la molécula de fibrinógeno, posiblemente debida a la sustitución de un aminoácido. Generalmente es de origen autosómico dominante. Se han reportado más de 40 fibrinógenos anormales, sin embargo, se han identificado pocos defectos moleculares. Los defectos pueden provocar agregación anormal de los monómeros de fibrina, liberación anormal de fibrinopéptidos o entrecruzamientos anormales. El Tiempo de trombina y protrombina se encuentran prolongados en estos casos.

**Eficacia:** Que tiene la virtud de producir el efecto deseado.

**Equimosis:** Hemorragia en la piel mayor de tres centímetros de diámetro.

**Éstasis:** Trastorno en el cual se produce demora o detención del flujo normal de un líquido (sangre arterial, venosa, linfa) a través de un vaso del cuerpo.

**Especificidad:** Es la capacidad de una prueba de ser modificada únicamente por la alteración que se mide y no por otras causas y puede definirse como la frecuencia de resultados negativos en sujetos sanos. Si la especificidad de un procedimiento es alta, su tasa de positivas falsas es baja.

**Estandarización:** Actividad de establecer, con consideración de los problemas actuales o potenciales, provisiones para uso común y repetido, enfocadas hacia el logro del grado óptimo de orden, en un contexto determinado.

**Etiopatogenia:** Estudio de todos los factores implicados en el desarrollo de una enfermedad, incluyendo la determinación de la fuente o causa.

**Exactitud:** Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor real (obtenido por mediciones perfectas) de una cantidad mensurable

**Extravasación sanguínea:** Salida de sangre del espacio vascular.

**Extrínseco:** Que es externo o añadido y no depende de la esencia o naturaleza de algo. Relativo a lo externo o lo originado fuera de una estructura del organismo.

**Factible:** Disponibilidad de los recursos humanos, físicos, técnicos, materiales, etc., para practicar la prueba diagnóstica.

**Factor de Von Willebrand:** Parte de la molécula del factor VIII responsable de la adhesión y la función plaquetarias.

**Factor plaquetario 3:** Fragmentos de fosfolípido de la membrana plasmática liberados de la plaqueta al activarse que funcionan como centro de ensamblaje para algunos de los complejos que reaccionan en la coagulación plasmática.

**Fulminante:** Sobre un proceso o enfermedad, rápido, repentino, grave, como una infección, la fiebre o una hemorragia.

**Hemostasia:** (Del griego αιμα -aima-, sangre y στασις -éstasis- detención). Conjunto de mecanismos fisiológicos que detienen la salida de sangre desde el espacio vascular mediante un cambio de estado físico

**Hidrólisis:** Ruptura de un enlace con la adición de agua.

**Idiopático:** Sin causa conocida.

**Isoenzimas:** Las isoenzimas o isozimas son diferentes formas estructurales de una enzima, que se originan en diferentes tejidos de la misma especie y catalizan la misma reacción. Se cuenta con el caso de Lactato Deshidrogenasa, la cual es una enzima tetramérica de dos subunidades diferentes posibles: H y M, y cuyo ensamblaje puede formar cinco isoenzimas: H4, H3M, H2M2 y M4. La isoenzima M4 predomina en la musculatura esquelética y su actividad molecular con su sustrato (el piruvato) son más altas que en el caso de la isoenzima H4.

**Inexactitud:** Discrepancia entre el resultado de una medición y un valor real de lo medido. Se expresa generalmente como "error de medición"

**Intrínseco:** Propio, que lo lleva consigo, constitutivo, que es propio de algo por sí mismo. Que se origina en un órgano o tejido o está situado en su interior,

**Lactante:** Producto de embarazo en la primera fase de vida extrauterina.

**Material de referencia:** Material o sustancia en la que uno o más valores de propiedades, se encuentran suficientemente bien establecidos para utilizarse en calibraciones, para la evaluación de un procedimiento o para asignar valores.

**Neonato:** Lactante desde el nacimiento (prematureo o a término) hasta las cuatro semanas de edad.

**Oliguria:** Diseminación de la capacidad para formar y eliminar orina, menos de 500 ml en 24 horas de forma que los productos finales del metabolismo no se pueden excretar de una forma eficaz.

**Opalescente:** De aspecto lechoso, con reflejos a la luz.

**Pertinencia:** Seguridad en cuanto al riesgo para la salud o vida del paciente con relación al beneficio que se le ofrece.

**Petequia:** Mancha diminuta de color violáceo o rojo que aparece en la piel como consecuencia de mínimas hemorragias en la dermis o en la submucosa.

**Precursor:** Molécula que empieza algo o que tendrá su desarrollo o culminación posteriormente.

**Problema:** Dificultad que no puede resolverse automáticamente, esto es, con la sola intervención de los reflejos condicionados o aprendidos.

**Provisión:** Conjunto de cosas necesarias o útiles.

**Púrpura:** Trastorno hemorrágico grave caracterizado por hemorragias en los tejidos, especialmente bajo la piel o mucosas provocando la aparición de petequias.



**Recalcificado:** Reponer el calcio sustraído a una muestra, generalmente se realiza al adicionar un cierto volumen de cloruro de calcio al 0.025M

**Sensibilidad:** Representa la mínima concentración o actividad que una prueba puede medir o bien puede definirse como la frecuencia de resultados positivos en sujetos definidos como enfermos. Si un procedimiento tiene sensibilidad elevada, su tasa de negativas falsas será baja.

**Serpina:** Inhibidor de proteasas de serina (**SER**ino Protease Inhibitors)

**Traumatismo:** Lesión física causada por una acción violenta.

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

**Tromboplastina simple:** Suspensión de tejido cerebral en suero salino.

**Tromboplastina combinada:** Suspensión de tejido cerebral en suero salino o suspensión amortiguadora con una concentración apropiada de Fibrinógeno, Factor V y Cloruro de Calcio añadidos.

**Trombosis:** Formación de un coágulo dentro de un vaso sanguíneo.

**Validación:** Confirmación por análisis y provisión de evidencia objetiva de que se reúnen los requerimientos particulares para efectos de un uso específico. Proceso por el cual queda establecido que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

**Validez:** Expresa el grado en que se mide lo que realmente se quiere medir.

**Valor de referencia:** Valor obtenido mediante la observación o medición de un determinado tipo de propiedad, sobre un individuo de referencia.

**Vasculitis:** Proceso inflamatorio de los vasos sanguíneos característico de ciertas enfermedades sistémicas o producido por una reacción alérgica.

**Verificación:** Confirmación por análisis y provisión de evidencia objetiva, de que se reúnen los requerimientos específicos.

**Zimógeno:** También llamado Proenzima, es un precursor de una molécula enzimática que se encuentra inactivo, pero que se activará por la hidrólisis de uno o unos pocos enlaces peptídicos.

## REFERENCIAS

1. Marín GG y Rodríguez B. *Semblanza y metas del INP*. Gaceta del INP. Año VII, 7(3), 1997: 1 - 5.
2. Loredó AA. *Instituto Nacional de Pediatría 1970 - 2000*, ediciones médicas. 1ª ed, México D.F. 2000: 129- 167.
3. Rodríguez W. MA. *El Instituto Nacional de Pediatría a 30 años de su fundación*. Acta Pediátrica México 2000; 21(6): 199-200.
4. Loredó AA. *La centralización de los laboratorios Clínicos*. Gaceta del INP. Año V, 5(59), 1995: 6-7.
5. Evatt BR, Gibbs WN, Lewis SM, McArthur JR. *Fundamentos de diagnóstico hematológico*. Los trastornos hemorrágicos y de la coagulación. 2ª edición. Presentado en español por el Comité Organizador del XXV Congreso de la Sociedad Internacional de Hematología celebrado en Cancún México en abril de 1994, con el permiso otorgado por la OMS.
6. Kordich LC, Sánchez AJ, Vidal HO. *Manual de hemostasia y trombosis*. 2ª ed.; Argentina: Grupo cooperativo Latinoamericano de hemostasia y trombosis, 1990:143-145.
7. Martínez MC, Quintana GS. *Manual de hemostasia y trombosis*. México: Editorial Prado, 1996; 351-369.
8. Schleider MA, Nachman RL, Jaffe EA, Coleman M. *A clinical study of the lupus anticoagulant*. Blood 1976; 48(4): 499-509.
9. Rosner E, Pauzer R, Lusky A, Modan M, Many A. *Detection and quantitative evaluation of Lupus Circulating anticoagulant activity*. Thromb Haemost 1987; 57:144-147.
10. Green D, Hougie C, Kazmier FJ, Lechner K, Mannucci PM, Rizza C, et al. *Report of the working party on acquired inhibitors of coagulation: Studies of the "lupus" anticoagulant*. Tromb Haemost 1983; 49(2): 144-146.
11. McNeil HP. *Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics*. Br J Haematol 1989; 73:506-13.
12. Bravo VMG, Lavalle CM. *Anticuerpos anticardiolipina y su significado en enfermedades reumáticas*. Rev Med IMSS 1990; 28:193-203.
13. Harris EN, Pierangeli S. *Anticardiolip Antibodies, specificity and function*. Lupus 1994; 3:217-222.
14. PelKonen P, Simell O, Rasi V, Vaarala O. *Venous thrombosis associated with Lupus Anticoagulant and Anticardiolipin Antibodies, case report*. Acta Paediatr Scand 1988; 77:767-772.

15. Berubé C, Laxer R, Silverman E, Adams M, Vegh P, Andrew M. *The relationship of antiphospholipid antibodies to thromboembolic disease in systemic lupus erythematosus in children: across-sectional study.* Lupus 1994; 3:360-365.
16. Horbach DA, Oort EV, Donders RCJ, Derksen RHW, Groot PG. *Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus.* Throm Haemost 1996; 76(6):916-24.
17. Bevers EM, Galli M, Barbui T., Comfurius P, Zwaal RFA. *Lupus anticoagulant IgG are not directed to phospholipids only but to a complex of lipid-bound human protrombin.* Throm Haemost 1991; 66:629-32.
18. Izaguirre ARA, Meillon LA, Pizzato CH, Walenga J. *Actualidades en coagulación.* Rev Invest Clin (Suplemento 1) 1995; 47:103-114.
19. Exner T, Triplett DA, Taberner DA, Howard MA, Harris NE. *Comparison of test methods for the lupus anticoagulant: International Survey on lupus anticoagulants-I (ISLA-I).* Thromb Haemost 1990; 64 (3): 478-484.
20. Wintrobe, M.M., Lee G.R., Boggs, D.R., et al: *Hematología Clínica.* 9ª ed. Filadelfia, Lea Febiger, 1989: Tomo I: - 443 -532, Tomo II:1133-1157 y 1241-1281.
21. Henry JB. *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio.* 9ª ed. Panamericana, 1995: 757-918.
22. Colman RW. et al. *Hemostasis and Thrombosis.* Philadelphia, 1987: 1274-1320.
23. Armitage JB, Hernández JA, Kaplan HS. *Laboratory assessment of circulating anticoagulants.* Clin Lab Medicine 1994; 14(4):795-812.
24. Harris NE. *Antiphospholip antibodies.* Br J Haematol 1990; 74:1-9.
25. Gastineau DA, Kazmier FJ, Nichols WA, Bowie EJW. *Lupus anticoagulant: An Analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases.* Am J Hematol 1985; 19:265-275.
26. Esmon NL, Smirnov MD, Esmon CT. *Thrombogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies.* Throm Haemost 1997; 78(1):79-82.
27. Mompel SA, Gosalbez AA, García PA, Vera MP. *Presentación de veinte casos de anticoagulante lúpico, propuesta de una metodología para su estudio.* Sangre 1988; 33(4):306-309.
28. Working Group on Hemostasis of the Société Française de Biologie Clinique. *Comparison of a Standardized procedure with current laboratory practices for the detection of lupus anticoagulant in France.* Thromb Haemost 1993; 70(5): 781-786.

29. Clyne L, White PF. *Time dependency of lupuslike anticoagulants*. Arch Intern Med 1988; 148: 1060-1063.
30. Machin SJ, Giddings JC, Hutton RA, Greaves M, MacKie IJ, Malia RG, et al. *Guidelines on testing for the lupus anticoagulant*. J Clin Pathol 1991; 44: 885-889.
31. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. *Criteria for the Diagnosis of lupus anticoagulants: An update*. Thromb Haemost 1995; 74(4): 1185-90.
32. Triplett D, Brandt J. *Laboratory identification of the lupus anticoagulant*. Br J Haematol 1989; 73:139-142.
33. Vallespi ST. *Métodos diagnósticos de los trastornos hemorrágicos*. En: Lluís VJ, Lluís AJ. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. España: Ed. Científicas y técnicas S.A., 1992:401-437.
34. Robert A. *Two different incubation times for the Activated Partial Thromboplastin Time (APTT): a new Criterion for diagnosis of lupus Anticoagulant*. Thromb Haemost 1994; 71 (2): 220-224.
35. Lazarchick J, Kizer J. *The laboratory diagnosis of lupus anticoagulants*. Arch Pathol Lab Med 1989; 113:177-180.
36. Forastiero R, Cerrato G, Carreras L. *Evaluation of recently described test for detection of the lupus anticoagulant*. Thromb Haemost 1994; 72 (5): 728-733.
37. Kaczor D, Bickford N, Triplett D. *Evaluation of different mixing study reagents and dilution effect in lupus anticoagulant testing*. Am J Clin Pathol 1991; 95 (3): 408-411.
38. Alving B, Barr Ch, Johansen L, Tang D. *Comparison between a one-point dilute phospholipid APTT and the dilute Russell Viper venom time for verification of lupus anticoagulants*. Thromb Haemost 1992; 67:672-678.
39. Thiagarajan P, Peng V, Shapiro S. *The use of the Dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants*. Blood 1986; 68(4): 869-874.
40. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, MacKworth CG, Loizou, S, et al. *Anticardiolipin antibodies; detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus*. Lancet 1983; 2(1):211-214.
41. Galli M, Finazzi G, Barbui T. *Antiphospholipid Antibodies, predictive value of laboratory test*. Thromb Haemost 1997; 78(1):75-78.
42. Bowie WEJ, Thompson JH, Pascuzzi CA. *Thrombosis in Systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants*. J Clin Invest 1963; 62:416-430.

43. Margni, R.A. *Inmunología e inmunoquímica, fundamentos*. 5ª ed. Panamericana, 1996: 559-592.
44. Fariñas MC. *Autoanticuerpos en el Lupus eritematoso sistémico*. Med Clin 1993; 100:98-100.
45. Cervera R, Font J. *Actividad o inactividad: ¿Es esa la cuestión en el lupus eritematoso sistémico?*. Med Clin 1993; 101:255-257.
46. Loredó Abdala A. *Manual de Pediatría, Instituto Nacional de Pediatría*. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana, 1999:488-505.
47. Nelson, J.G. *Tratado de medicina pediátrica*, 8ª ed. Panamericana, 1999: 898-950.
48. Carbajal RL, Cota EAR, Loredó AA, Reynés MJN, Rodríguez HR. *Espectro neurológico del LES y su asociación con anticuerpos antifosfolípido*. Rev Mex Pediat 1994; 61(3):130-136.
49. Alarcon-Segovia D, Delezé M, Oria CV, Sanchez GJ, Gomez PL, Cabiedes J, et al. *Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid Syndrome in Systematic Lupus Erythematosus*. Medicine 1989; 68 (6): 353-364.
50. Alarcon SD, Sánchez GJ. *Primary Antiphospholipid Syndrome*. J. Rheumatol 1989; 16(4):482-487.
51. Vivancos J, López SA, Font J, Balasch J, Cervera R, Reverter JC, et al. *Síndrome antifosfolípido primario: estudio clínico y biológico de 36 casos*. Med Clin 1994; 102:561-565.
52. Asherson RA, Munther A, Ordi RJ, Derksen RH, Machin SJ, Path FC, et al. *The "Primary" antiphospholipid Syndrome: Mayor clinical and serological features*. Medicine 1989; 68 (3): 366-374.
53. Forastiero RR, Falcon C, Rodríguez S, Kordich LC, Carreras LO. *Anticuerpos antifosfolípido e infarto isquémico cerebral en un niño de seis años*. Sangre 1993; 38(2):147-149.
54. Salazar LS, Atmetlla FM. *Detección del anticoagulante lúpico en pacientes con trastornos trombóticos*. Rev. Cost Cienc Med 1991; 12(3):15-21.
55. Trejo DW, Amigo MC, Bañales JL, Nava AH, Reyes PA. *Síndrome antifosfolípido primario, estudio prolectivo en 23 casos*. Med Int (Mex) 1997; 13(1):17-25.
56. León S, Amigo MC, Casanova JM, Reyes PA. *El Síndrome de antifosfolípidos primario, experiencia clínica en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez*. Arch Inst Cardiol Mex 1991; 61:149-155.
57. Carbajal RL, Nuredim JA, Cota EAR, Espino VJ, Amigo MC, Loredó AA, et al. *Manifestaciones cardiovasculares en el lupus*

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

- eritematoso sistémico y su relación con anticuerpos antifosfolípido.* Rev Mex Pediat 1995; 62(1):21-27.
58. Moreno AL. *Validación de procedimientos de diagnóstico.* Rev Med Pediat 1995; 62(1):31-37.
  59. Dawson-Saunders, B. Trapp R.G. *Bioestadística médica.* 2ª ed.El manual moderno, 1997: 275- 294.
  60. Exner T, Rickard AK, Kronenberg H. *A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns.* Br J Haematol 1978; 40:143-151.
  61. Brandt JT, Triplett D. *The effect of phospholipid on the detection of lupus anticoagulants by the dilute Russell Viper Venom Time.* Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 1376-1378.
  62. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. *Guidelines for testing and Revised Criteria for lupus anticoagulants.* Thromb Haemost 1991; 65 (3): 320-322.
  63. Brandt JT, Barna LD, Triplett A. *Laboratory identification of lupus anticoagulants: Results of Second International Workshop for identification of lupus anticoagulants.* Throm Haemost 1995; 74(6): 1597-1603.
  64. Exner T. *Diagnostic methodologies for circulating anticoagulants.* Thromb Haemost 1995; 74(1): 338-344.
  65. Triplett DA, Barna LK, Unger GA: *A hexagonal (II) phase phospholipid neutralization assay for lupus anticoagulant identification.* Throm Haemost 1993; 70(5):787-793.
  66. Rosove MH, Ismail M, Koziol BJ, Runge A, Kasper C. *Lupus anticoagulants: Improved Diagnosis with a Kaolin Clotting time using rabbit brain phospholipid in Standard and High concentrations.* Blood 1986; 68(2): 472-478.
  67. De Robertis EM, Hibs J, Ponzio R. *Biología celular y molecular.* 12ª ed. El Ateneo, 1996. Argentina: 92-105.
  68. Lopez, D.A. y Williams R.M. *Enzimas, la fuente de la vida.* EdikaMed, Barcelona, 1995: 146-156.
  69. Hirsh J, Dale JE, Deykin D, Poller L. *Oral anticoagulants, mechanism of action clinical effectiveness and optimal therapeutic rang.* CHEST 1992, 102(4): 312s-326s.
  70. Exner T. *Comparison of two Simple test for the lupus anticoagulant.* Am J Clin Pathol 1985; 83(2): 215-218.
  71. Edstrom A. *Venomous and poisonous animals.* Florid, USA, Krieger Publishing Company. 1992:133-156.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

ANTICOAGULANTE LÚPICO

72. Walenga JM. *Automation in hemostasis*, en: Schoeff CE, Williams RH: *Principles of laboratory instruments*. Mosby Year Book Inc. 379-395, 1993.
73. Salas R, Loria A. *Precisión y exactitud de micropipetas automáticas*. Rev Invest Clin 1988; 40: 207-210.
74. Loria A, Salas R. *Evaluación de sistemas de pipeteo II. Precisión y exactitud de vertidores de precisión*. Rev Invest Clin 1990; 42(2): 157-160.
75. Salas R, Loria A, Rocha C. *Evaluación de sistemas de pipeteo III. La precisión de una micropipeta en el trabajo rutinario*. Rev Invest Clin 1995; 47(6): 461-465.
76. Alving BM, Baldwin PE. *The dilute phospholipid APTT: a sensitive assay for verification of lupus anticoagulants*. Thromb Haemostasis 54,3,709-712, 1985.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN