



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

UMAE HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA

**CURSO DE ESPECIALIZACIÓN MÉDICA EN PATOLOGÍA CLÍNICA**

UTILIDAD DE LA MEZCLA DE PLASMAS EN DONADORES SANOS  
PARA ESTABLECER VALORES DE REFERENCIA EN PRUEBAS DE  
HEMOSTASIA DE ESCRUTINIO Y ESPECIALES EN POBLACIÓN  
ADULTA.

**TESIS DE POSGRADO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**ESPECIALIDAD MÉDICA EN PATOLOGÍA CLÍNICA**

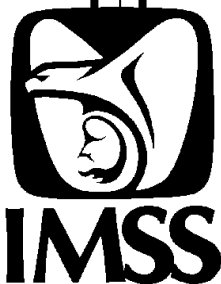
PRESENTA:

**DRA. ADRIANA CALZADA CONTRERAS**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. NOEMI PATRICIA CASTILLO TORRES

ASESOR: M EN C MANUEL MORENO HERNANDEZ

CO-ASESORA: DRA. GUADALUPE SOUTO ROSILLO



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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).

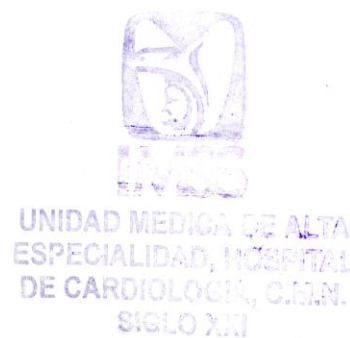
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Instituto Mexicano del Seguro Social  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Cardiología "Dr. Luis Méndez"

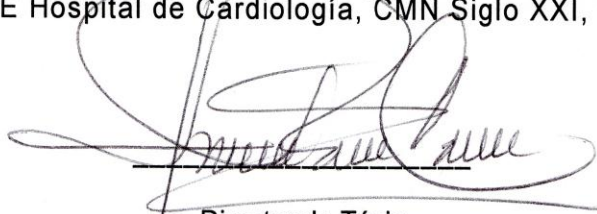
**AUTORIZACIÓN DE TESIS:**



**DR. MOISÉS CUTIEL CALDERÓN ABBO**  
Director General  
UMAE Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS



**DR. JESÚS SALVADOR VALENCIA SÁNCHEZ**  
Dirección de Educación e Investigación en Salud  
UMAE Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS



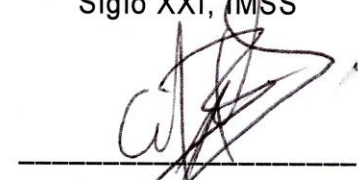
**DRA. NOEMÍ PATRICIA CASTILLO TORRES**  
Profesora Titular del Curso de Especialidad Médica en Patología Clínica



★ 16 AGO 2011 ★



**M. en C. MANUEL MORENO HERNANDEZ**  
Laboratorio Clínico, UMAE Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional  
Siglo XXI, IMSS



**CO-ASESORA DE TESIS**  
**DRA. GUADALUPE SOUTO ROSILLO**  
Laboratorio Clínico, UMAE Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional  
Siglo XXI, IMSS

## Índice

### **PRIMERA PARTE**

1. 1 Consideraciones Generales	7
1. 2 Antecedentes Científicos	9
1. 2. 1 Modelos de Coagulación	9
1. 2. 1. 1 Modelo Clásico de la Coagulación de Morawitz	9
1. 2. 1. 2 Modelo de la Cascada de la Coagulación	10
1. 2. 1. 3 Modelo Celular de la Coagulación	12
1. 2. 2 Pruebas de Hemostasia en el Laboratorio	14
1. 2. 2. 1 Conceptos Generales de las Pruebas de Hemostasia de Escrutinio	14
1. 2. 2. 2 Conceptos Generales de las Pruebas de Hemostasia Especiales	17
1. 2. 3 Control de Calidad en el Laboratorio de Hemostasia	27
1. 2. 3. 1 Fase Pre-analítica	27
1. 2. 3. 2 Fase Analítica	30
1. 2. 3. 3 Fase Post-analítica	31

### **SEGUNDA PARTE**

2. 1 Planteamiento del Problema	33
2. 1. 1 Justificación	34
2. 1. 2 Preguntas de investigación	36

2. 2 Objetivos	36
2. 3 Hipótesis	37
2. 4 Variables	37
2. 5 Material y Métodos	39
2. 5. 1 Tipo y diseño del estudio	39
2. 5. 2 Población y muestra	39
2. 6 Criterios de Selección	40
2. 7 Métodos	41
2. 8 Análisis estadístico	43
<b>TERCERA PARTE</b>	
3. 0 Resultados	44
<b>CUARTA PARTE</b>	
4. 0 Discusión	50
<b>QUINTA PARTE</b>	
5. 1 Conclusiones	53
5. 2 Bibliografía	54
5. 3 Anexos	60
5. 3. 1 Anexo 1 Técnicas de las pruebas de hemostasia	60
5. 3. 2 Anexo 2 Gráficas	62

## **PRIMERA PARTE**

### **1. 1 Consideraciones Generales**

El organismo cuenta con un sistema biológico que mantiene la sangre líquida mediante diferentes mecanismos, en el cual se involucran de manera equilibrada los siguientes componentes: vascular, plasmático, celular y mecanismos de regulación natural; (1) y se caracterizan por estar relacionados para mantener la integridad del vaso sanguíneo. (2) El endotelio es la base fundamental de este sistema; en condiciones normales, mantiene la sangre líquida debido a su función antiplaquetaria, anticoagulante y profibrinolítica. Ante un daño endotelial, el fenotipo anticoagulante cambia a procoagulante para evitar la pérdida hemática, (1, 3) fenómeno que recibe el nombre de hemostasia, y específicamente se compone: hemostasia primaria en donde intervienen las plaquetas, el Factor de von Willebrand (FvW) y el endotelio; hemostasia secundaria, donde actúan diversas proteínas (factores de coagulación) que colaboran en la formación del coágulo; y posteriormente, el sistema fibrinolítico que ayuda a la disolución del mismo, una vez reparado el endotelio. Las características del sistema de hemostasia requiere que las reacciones sean: localizadas, amplificadas, y moduladas.

La formación del coágulo ocurre solo cuando se requiere y se localiza únicamente en el sitio de daño vascular (3). Este equilibrio esta mediado por los sistemas anticoagulantes naturales, los principales son: el sistema de la proteína C (PC), antitrombina (AT) e inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI).

Después de que la hemorragia ha cesado, el coágulo debe ser degradado por el sistema fibrinolítico, para evitar la obstrucción del flujo sanguíneo (3,4). Existen dos grupos de activadores de este sistema, intrínsecos (fase de contacto) y extrínsecos

(t-PA); ambos tipos de activadores permiten la conversión del plasminógeno (Plg) a plasmina, enzima responsable de la degradación de la fibrina. (4) La plasmina se encuentra estrictamente regulada, y sus principales inhibidores son: el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-I) y la alfa 2 antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP) (4). Finalmente, se restablece el flujo sanguíneo y el endotelio mantiene nuevamente la sangre en estado líquido.

Cuando este sistema no funciona adecuadamente se da lugar a estados de hemofilia o trombofilia, repercutiendo en el estado de salud.

En México se ha incrementado el número de enfermedades crónico-degenerativas entre las que destacan: cáncer, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares (Infarto Agudo al Miocardio, Angina de pecho estable e inestable); así como enfermedades vasculares cerebrales, además de trombosis venosas y pulmonares; constituyendo un problema grave de Salud Pública. Hay que considerar, que no contamos con estadísticas precisas, que permitan evaluar la magnitud del problema, pero podemos inferir, que los problemas de trombosis en México, es de aproximadamente 300,000 casos, de los cuales fallecen 10-15% por problemas embólicos; por lo tanto, la mortalidad por trombosis es entre 30,000-45,000 casos. (5)

Trombofilia se define como un aumento en el riesgo de presentar trombosis; puede ser congénito o adquirido; en este caso, una gran variedad de trastornos, pueden ser la causa del estado de hipercoagulabilidad, por ejemplo: deficiencia o defectos de las proteínas anticoagulantes naturales; aumento de proteínas procoagulantes o fibrinólisis alterada. Por otro lado, la falta de proteínas procoagulantes como el Factor VIII (FVIII) o del Factor de von Willebrand (FvW), pueden originar

hemorragias. (6)

Las pruebas de coagulación son una herramienta sumamente importante para poder evaluar la fisiología de la hemostasia, (7) y de esta forma conocer la situación clínica del paciente, que permite la adecuada interpretación de los resultados. (8) Primero hay que tomar en cuenta que estas pruebas deben indicarse con base en: la condición clínica del paciente; para ello es necesario enfatizar dentro de la historia clínica los antecedentes hemorrágicos y/o trombóticos; o si el paciente será sometido a un procedimiento invasivo o quirúrgico, con el fin de conocer si puede presentar algún riesgo.

## **1. 2 Antecedentes Científicos**

### **1. 2. 1 Modelos de Coagulación**

#### **1. 2. 1. 1 Modelo Clásico de la Coagulación de Morawitz**

Para lograr que las pruebas de laboratorio de hemostasia sean eficientes y contundentes en la toma de decisiones clínicas, es necesario garantizar la calidad de las mismas en las diferentes etapas del proceso analítico; por lo cual es indispensable recordar el proceso de hemostasia desde el punto de vista de los diferentes modelos que se explican a continuación.

El primero en describir un modelo de coagulación fue Morawitz en 1904, mediante el esquema Clásico de la Coagulación, el mencionó que los tejidos vasculares liberan una tromboplastina tisular necesaria para iniciar el proceso de coagulación, y refiere que los componentes principales son: protrombina, fibrinógeno, calcio y



tromboplastina; además asumió la presencia de una antitrombina en la circulación que modula a la trombocinasa (actualmente conocida como Factor Tisular). (9) Este modelo es sumamente importante, debido a que ha dado la pauta para explicar muchos de los procesos actualmente descritos. (Ver Fig. 1)

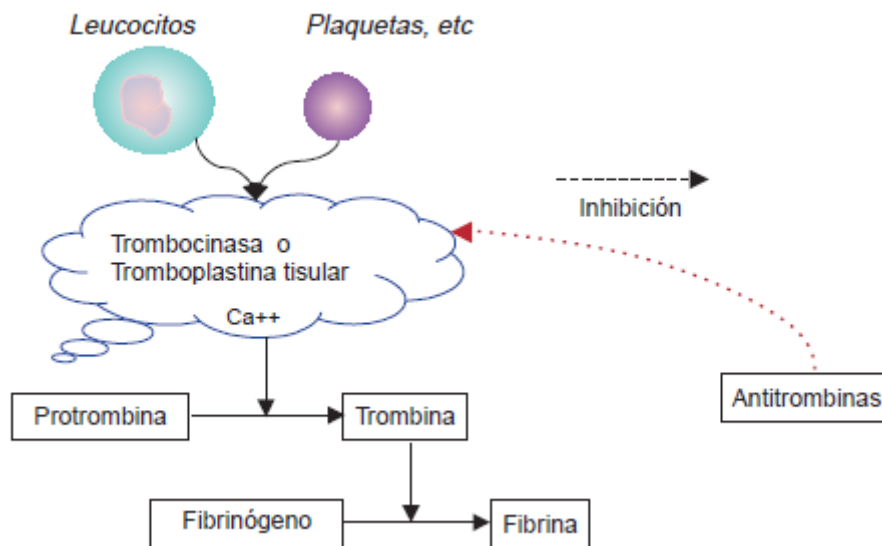


Fig. 1 Modelo Clásico de la coagulación de Morawitz. Se observa la tromboplastina tisular, la cual es capaz de iniciar el proceso de coagulación, y es regulada por la antitrombina.

### 1. 2. 1. 2 Modelo de la Cascada de la Coagulación

Posteriormente en 1960 se identificaron dos grupos de estudio, quienes mencionan que la coagulación es un proceso enzimático, caracterizado por ser una cascada de reacciones, donde intervienen los factores que se encuentran como proenzimas y que se convierten en enzimas al ser activadas, lo cual les confiere la función catalítica. Más tarde hubo modificaciones, debido a que se observó que algunos factores actúan como cofactores (Factor V [FV], Factor VIII [FVIII]), y no como enzimas, ya que no poseen esta actividad catalítica. Este modelo se caracteriza por

presentar dos vías diferentes: una intrínseca y una extrínseca. La vía Intrínseca inicia cuando existe daño endotelial y hay interacción de superficies que poseen cargas negativas con tres proteínas plasmáticas (Factor XII [FXII], Precalicroína [PK] y Cininógeno de Alto Peso Molecular [CAMP]). (10) La vía Extrínseca inicia con el daño endotelial, hay exposición del subendotelio, en donde se ubica el Factor Tisular (FT), el cual, se une al factor VII (FVII), presente en la circulación sanguínea. Ambas vías convergen en el Factor X (FX), y junto con el Factor Va (FVa) convierten a la protrombina en trombina y finalmente en fibrina. Este modelo fue aceptado durante muchos años, sin embargo se llegó a la conclusión de que el sistema de la Hemostasia no puede funcionar de forma independiente. Hay que mencionar que no se trata de una cascada, sino de una serie de cambios bioquímicos y enzimáticos que tienen como fin la formación de trombina que culminará con un coágulo de fibrina. Sin embargo este modelo se sigue utilizando en el Laboratorio debido a que es útil para explicar y comprender las reacciones *in vitro*.

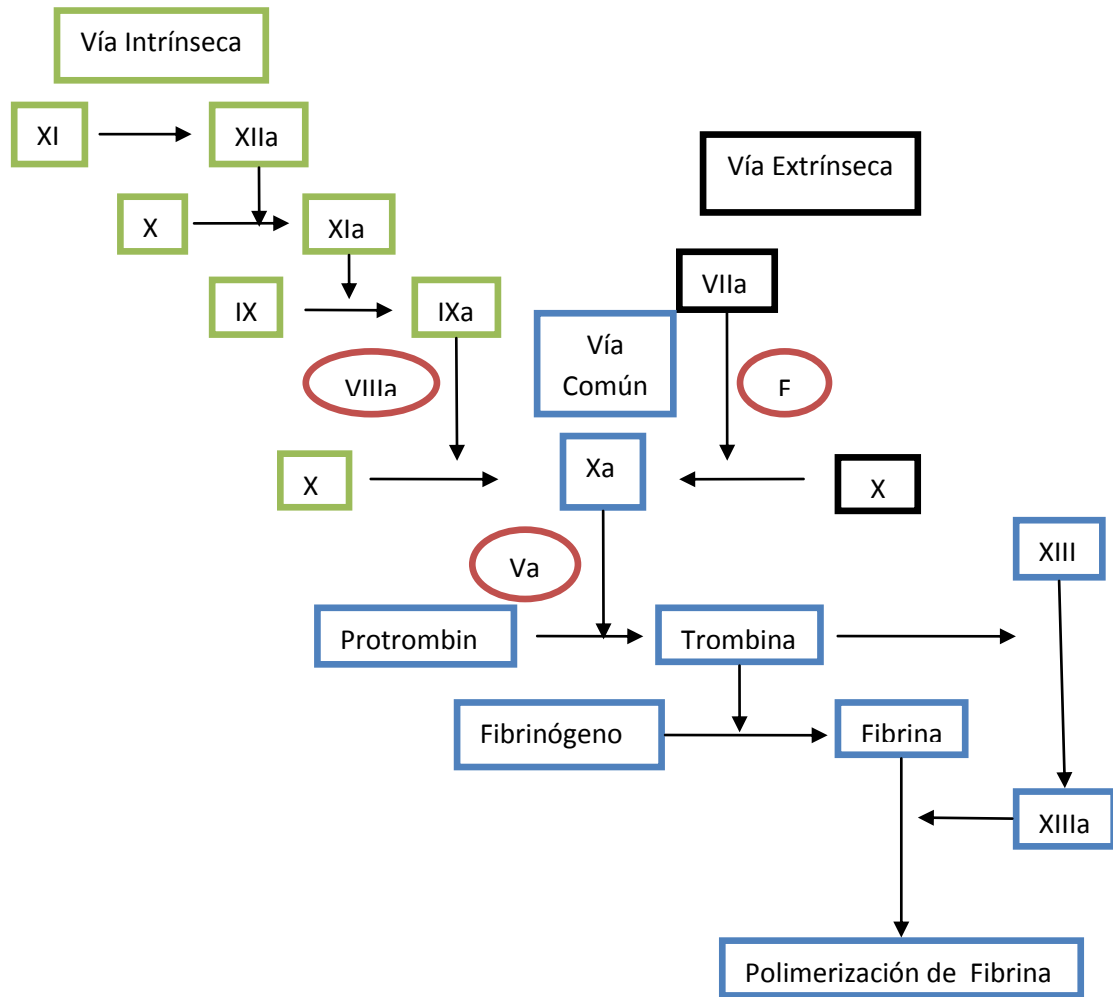


Fig. 2 Cascada de Coagulación. Esquema que demuestra las diferentes vías del modelo antes descrito.

### 1. 2. 1. 3 Modelo Celular de la Coagulación

El Modelo celular de la Coagulación, menciona que las superficies celulares proporcionan un ambiente natural, donde se lleva a cabo las reacciones del proceso hemostático; a diferencia de los de otros modelos antes mencionados, donde las funciones dependen solo de reacciones enzimáticas; para lo cual es importante contar con diferentes tipos de células, donde las plaquetas se encargan de proporcionar la superficie para la generación de trombina; y de otras células que

expresen FT, como los monocitos. Por lo tanto este modelo es dependiente de superficies celulares y del FT, que inicia cuando hay lesión o daño endotelial. Está formado por tres fases, en las cuales interactúan los diferentes componentes de la hemostasia, como se explica en el Cuadro 1, y la Fig. 3.

**Cuadro I. Características del Modelo Celular de la Coagulación**

FASES	CARACTERISTICAS
a) Iniciación	Modelo que inicia con la exposición del FT, al cual se une el FVII, y que es activado al realizarse esta unión; la formación del complejo Factor Tisular/Factor VIIa (FT/FVIIa) activa al FX, y también al FIX*. El FX es rápidamente bloqueado por la formación del complejo FT/FVIIa, quién se encarga de generar al Inhibidor de la Vía del Factor Tisular (IVFT), siendo su principal función la inhibición del FT como su nombre lo indica.
b) Amplificación	Esta fase que se caracteriza por presentar las pequeñas cantidades de trombina, previamente formadas, y que se encuentran en las superficies celulares, las cuales son utilizadas para activar otros componentes como el FV, FVIII, FXI y plaquetas.
c) Propagación	Comienza con las plaquetas activadas y con la expresión de sitios de unión para el FIXa, el cual es capaz de activar al FX, y de generar grandes cantidades de trombina y por lo tanto de la formación del coágulo de fibrina.(9)

\*El FX es necesario para la activación plaquetaria. El FIX es responsable de la producción suficiente de trombina

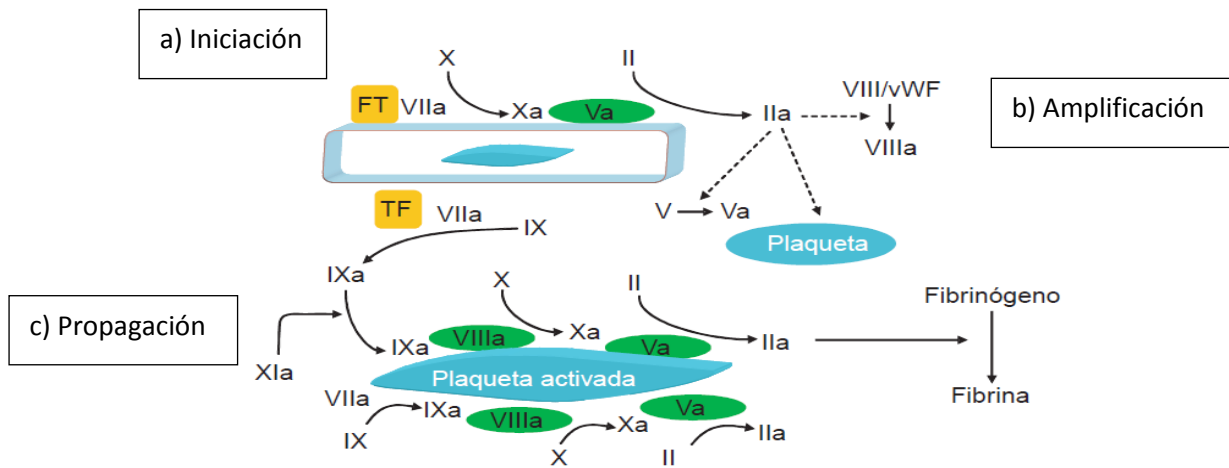


Fig 3. Modelo Celular de la Coagulación. Se observan las tres etapas de la fase fluida del modelo celular. a) Iniciación, b) Amplificación, c) Propagación.

### 1. 2. 2 Pruebas de Hemostasia en el Laboratorio

El laboratorio de hemostasia contiene una gran variedad de pruebas que permiten conocer los defectos en las diferentes etapas de la coagulación; o bien, monitorizar el estado de coagulación de un paciente antes de un procedimiento quirúrgico o para dar seguimiento de algún tratamiento específico. (11) Por lo cual es importante conocer las pruebas de escrutinio y las pruebas especiales.

#### 1. 2. 2. 1 Conceptos generales de las pruebas de escrutinio

##### a) Tiempo de Protrombina

Es la prueba de coagulación más antigua, fue descrita por el Dr. Armand Quick, en 1938, por lo que también es correcto denominar a esta prueba como Tiempo de Quick. Es una medida representada en tiempo, especialmente en segundos, y que nos ayuda a evaluar la vía extrínseca (FVII) y común (FX, FV, FII y fibrinógeno) del

Modelo de cascada de coagulación. (12) Por lo tanto analiza deficiencias de factores (FVII, FX, FV, FII) y fibrinógeno, además de que es útil para la monitorización de anticoagulantes orales del grupo de los antagonistas de la vitamina K.

Los valores de referencia deben de obtenerse en cada laboratorio, por medio del análisis de la población normal.

### **b) Índice Internacional Normalizado (INR).**

Se ha utilizado ampliamente desde la introducción del TP en 1935, en el control de la anticoagulación oral con medicamentos antagonistas de la vitamina K, principalmente en pacientes con diversas cardiopatías. A partir de 1948, la Asociación Americana de Cardiología recomendó un nivel terapéutico entre 2.0 - 3.0 para anticoagulación oral, sin embargo hubo la dificultad acerca del reporte de los resultados otorgados por cada laboratorio, debido al empleo de tromboplastinas comerciales obtenidas de diferentes tejidos y especies, originando que los pacientes emplearan mayores dosis de anticoagulante y presentándose un número mayor de complicaciones (hemorragias). En 1983, la Organización Mundial de la Salud (OMS) diseñó un esquema internacional del TP que proporciona una terapia anticoagulante segura y efectiva; utilizando un factor de corrección del INR, por las diferentes tromboplastinas empleadas, y denominado Índice de Sensibilidad Internacional (ISI), a partir del cual, el INR resulta de una conversión matemática de la razón del TP, elevada a la potencia del ISI. (13)

Fórmula para obtener INR:

$$\text{INR} = \left( \frac{\text{TP Paciente}}{\text{TP Testigo}} \right)^{\text{ISI}}$$

El TP testigo es la media geométrica de los resultados de TP de al menos 20 sujetos aparentemente sanos de ambos sexos. (14)

Es importante hacer énfasis que el INR se utiliza solo para proporcionar seguimiento de la anticoagulación oral (acenocumarina y warfarina).

### **c) Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado**

Fue desarrollado en 1953 por Langdell, Wagner y Brinkhous. En 1961, Proctor y Rapaport modificaron esta prueba utilizando caolín como un activador de contacto. (15) Mide la integridad de la vía intrínseca (FVIII, FIX, FXI y FXII), así como la vía común (FX, FV, FII y fibrinógeno). Es una medida representada en segundos. Se trata de una prueba que utiliza una tromboplastina parcial, debido a que no contiene FT. La utilidad de esta prueba consiste en la identificación de deficiencias de factores (XII, XI, X, IX, VIII, V, II y fibrinógeno); y monitorizar tratamiento con heparina; así como en pacientes que presenten anticoagulante lúpico. (16)

### **d) Tiempo de Trombina**

Esta prueba, mide la relación de conversión de fibrinógeno a fibrina polimerizada, después de la adición de trombina al plasma, la medición se reporta en segundos hasta que se forma el coágulo. Es útil para valorar los defectos (calidad) y deficiencias (cantidad) de fibrinógeno (ej. disfibrinogenemia, hipofibrinogenemia y

afibrinogenemia); para el seguimiento del tratamiento con heparina; y para la detección de productos de degradación de fibrinógeno (PDF). (16)

### **e) Fibrinógeno**

Es la principal proteína de coagulación en el plasma, es sintetizada en el hígado, su medición es inmunológica o mediante el método de Clauss. Se reporta en mg/dL. Se trata de un dímero y cada molécula tiene tres compuestos idénticos denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , conectadas por un puente disulfuro. Su importancia radica en que nos permite detectar problemas de anomalías congénitas como afibrinogenemia o disfibrinogenemia, así como trauma, hepatopatías, CID, enfermedad renal, etc. (11)

Existe una marcada variación entre los resultados en los diversos laboratorios, lo cual se podría explicar por los diferentes reactivos que se utilizan, el perfil de fosfolípidos, etc. Por lo tanto es de vital importancia determinar valores de referencia en nuestra población. (16)

### **1. 2. 2. 2 Conceptos generales de las Pruebas de hemostasia especiales**

Cuando en las pruebas de escrutinio se encuentra prolongación, hay que realizar diluciones y correcciones, las cuales son pruebas que se deben hacer de forma simultánea en pacientes nuevos en los que debe definirse la deficiencia de uno o más factores, o a la presencia de inhibidores, además, siempre se debe corroborar el resultado haciendo comparación con una muestra control. (17)



**Tabla 1. Características generales de los principales factores hemostáticos, fibrinolíticos y anticoagulantes naturales.**

<b>Factor</b>	<b>PM (kDa)</b>	<b>Vida media (h)</b>	<b>Concentra ción (mg/dL)</b>	<b>Síntesis</b>	<b>Características</b>
<b><i>FI</i></b>	340	72-120	200-400	Hígado	Sustrato de la Trombina
<b><i>FII</i></b>	71	50-80	1-2	Hígado	Activa a FV, FVIII, FX y FXI
<b><i>FV</i></b>	330	12-15	0.4-1.4	Hígado	Cofactor de FX y PC
<b><i>FVII</i></b>	48	6	0.05	Hígado	Activa a FX, FIX y FXI
<b><i>FVIII</i></b>	330	12	0.02	Hígado/endotelio	Cofactor del FIX
<b><i>FIX</i></b>	56	24	0.5	Hígado	Activa a FX
<b><i>FX</i></b>	58	25-60	1	Hígado	Activa a FII
<b><i>FXI</i></b>	160	40-80	5	Hígado	Activa a FIX
<b><i>FXII</i></b>	76	50-70	3	Hígado	Activa a FXI y fibrinolisis
<b><i>PC</i></b>	62	10	0.04	Hígado	Inhibe a FV y FVIII
<b><i>PS</i></b>	77		0.2	Hígado/endotelio	Cofactor de PC
<b><i>AT</i></b>	58		14	Hígado/endotelio	Inhibe proteasas de Serina
<b><i>t-PA</i></b>	72	0.08	0.002	Endotelio	Activador de fibrinolisis
<b><i>Plg</i></b>	88	50	2.1	Hígado	Sustrato del t-PA

<b><i>PAI-I</i></b>	50		0.025	Endotelio	Inhibe a t-PA
<b><i>α2-AP</i></b>	68	58	6.9	Hígado	Inhibe a la plasmina

Tabla 1. Muestra las principales características de los factores hemostáticos, fibrinolíticos y anticoagulantes naturales que a evaluarse en este trabajo. PM: peso molecular.

### **a) Diluciones**

Las diluciones se realizan por medio de la colocación de solución (solución salina o buffer) de forma progresiva al plasma citratado del paciente, para conocer si la prolongación de los tiempos es causada por la deficiencia de factores o la presencia de inhibidores los cuales son anticuerpos que bloquean la actividad de los factores de coagulación. (18)

### **b) Correcciones**

Son estudios que se realizan en forma conjunta con las diluciones. La muestra del paciente se mezcla en proporciones iguales con un pool de plasmas normal, y se repite la medición de los tiempos. Se dice que una muestra corrige cuando el tiempo de coagulación se acorta en relación a la muestra original, como consecuencia de que el pool de plasmas proporciona el factor deficiente en el paciente. Una muestra no corrige, cuando el tiempo de coagulación es mayor que el primer resultado de la muestra, el origen puede ser la presencia de inhibidores (anticuerpos contra un factor específico). (19)

### **c) Dosificación o Cuantificación de Factores**

Esta prueba se realiza cuando se tiene claro que la causa de la prolongación de las pruebas de escrutinio se debe a una deficiencia de factores, nos permite identificar cuál o cuáles son los factores alterados, y cuál es su concentración. La actividad

funcional de los factores se miden por medio de técnicas: coagulométricas, las cuales se encargan de medir el tiempo en que tarda en formarse el coágulo a través de un sensor que capta cambio en la luz del plasma; y cromogénicas, son pruebas que miden la reacción producida por la liberación de un compuesto colorido mediante fotometría. La cuantificación de los Factores se relaciona con el modelo de cascada de coagulación, y serán evaluados de la siguiente forma:

Vía Extrínseca: FVII, y vía común FX, FV, FII

Vía Intrínseca: FXII, FXI, FIX, FVIII, y vía común

Es importante recalcar que una concentración disminuida de estos factores puede condicionar hemorragias y un exceso originar trombosis; con excepción del FXII, que al haber deficiencia hay riesgo de trombosis. (20)

- **Factor II**

Se conoce como protrombina, es una glicoproteína con un PM aproximadamente de 72 kDa; sintetizada en el hígado. Su formación requiere la presencia de Vitamina K. La protrombina es un polipéptido monocatenario compuesto por dos partes: 1) Parte C-terminal, responsable de la formación de la trombina; 2) Parte N-terminal, que puede descomponerse por la trombina, liberando su dominio catalítico del resto del factor (fragmento 1+2 de la protrombina). La protrombina es activada por un complejo enzimático que se compone del FXa, iones de calcio, fosfolípidos y FV. Durante la activación de la protrombina, la trombina liberada puede convertir el fibrinógeno en fibrina. Tiene un efecto procoagulante al participar en la retroalimentación positiva que activa las plaquetas, y a los FV, VIII, XI y XIII. Además de presentar actividad fibrinolítica al activar al TAFI. (21)

- **Factor V**

Se sintetiza en megacariocitos e hígado. Es una glicoproteína monocatenaria, con un PM de 330 kDa. Se encuentra también en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, y se libera en forma de procofactor. Es activado por la trombina para convertirse en FVa, el cual es un cofactor del FXa, en conjunto con iones de calcio y fosfolípidos. Puede haber deficiencia congénita (Enfermedad de Owren); o adquirida, relacionada con deficiencia de FVII, FX y FII, presente en hepatopatías, fibrinólisis y Coagulación Intravascular Diseminada (CID). (22)

- **Factor VII**

Es una glicoproteína que depende de la Vitamina K. Tiene un PM de 50 kDa. Se caracteriza por formar un complejo con el FT para activar los factores X y IX. Es sintetizado en el hígado. Un ejemplo de deficiencia adquirida es mediante terapias con antagonistas de la Vitamina K. El FVII provoca complicaciones hemorrágicas clínicamente relevantes cuando las concentraciones son menores al 10%, y severas con niveles menores del 1%. (23)

- **Factor VIII**

Se sintetiza en hepatocitos, bazo y ganglios linfáticos. Es una glicoproteína con un PM de 280 kDa. El FvW transporta y estabiliza al FVIII; una molécula de FVIII se une a 50-100 moléculas de FvW, por lo cual su concentración depende de la cantidad de este. El FVIII circula en plasma formando un complejo no covalente con el FvW. La trombina y el FXa activan al FVIII para que realice la activación del FX junto con el FIXa. La deficiencia congénita se manifiesta como Hemofilia A, en algunas condiciones, este factor puede aumentar, ocasionando complicaciones

tromboembólicas. (24)

- **Factor IX**

Es una glicoproteína con un PM de 56 kDa aproximadamente, sintetizado en hígado, dependiente de Vitamina K. Es activado por dos factores: 1) FXIa, en presencia de iones de calcio; y 2) FVIIa, junto con iones de calcio y fosfolípidos. Forma un complejo en presencia de su cofactor, el FVIIIa, para activar al FX. La deficiencia congénita se manifiesta como Hemofilia B; y la adquirida es producida: durante tratamiento con anticoagulantes orales, hepatopatías, alteración en la absorción de Vitamina K, como: enfermedades hemorrágicas de recién nacido, ictericia, o tratamiento con antibióticos. El principal inhibidor plasmático del FIX es la AT en presencia de la heparina. (23)

- **Factor X**

Es una glicoproteína, vitamina K dependiente, con un PM de 60 kDa, es sintetizado en el hígado. Formado por dos cadenas de aminoácidos, unidas entre sí por un puente disulfuro. El FXa junto con el FV, calcio y fosfolípidos forman el complejo protrombinasa, el cual transforma la protrombina en trombina, liberando el fragmento 1+2. También se encarga de activar al FVII. Su principal inhibidor es la AT, y también el IVFT. La deficiencia del FX puede ser congénita o adquirida, los cuales van acompañados de deficiencia de otros factores vitamina K dependientes. También puede estar alterado en trastornos hepáticos, fibrinólisis y CID. (25)

- **Factor XI**

Es una proteasa de serina con un PM de 160 kDa. En el plasma, el FXI forma un complejo con el Cininógeno de Alto Peso Molecular (CAPM). Se sintetiza en hígado

como una sola cadena, aunque circula como un homodímero formado por dos polipéptidos idénticos de 83 kDa, unidos por un puente disulfuro. Es activado por el FXIIa y la trombina. Tiene diferentes inhibidores:  $\alpha$ 1-antitripsina, AT, inhibidor del C1, inhibidor de  $\alpha$ 2-antiplasmina. La deficiencia fue descrita por Rosenthal en 1953, se caracteriza por un síndrome hemorrágico y aparece después de una extracción dental o una intervención quirúrgica. (26)

- **Factor XII**

El FXII se caracteriza por participar en la vía intrínseca de la cascada de la coagulación; circula en la sangre como un polipéptido monocatenario de 80 kDa, que al romperse, forma dos cadenas: una pesada, con el sitio de unión a la superficie cargada negativamente; y una ligera con el sitio activo. Su síntesis es hepática. El FXIIa puede transformar la precalicreína en calicreína, capaz de activar a los CAPM. La calicreína formada contribuye a activar al FXII, terminando este mecanismo de retroalimentación positiva. La activación del FXII desencadena el sistema fibrinolítico, debido a que la calicreína activa la pro-urocinasa a urocinasa. La deficiencia predispone el riesgo de presentar trombosis. (27)

**d) Factor de von Willebrand**

Es una proteína sintetizada en células del endotelio vascular y megacariocitos, comprende de una subunidad de 2,050 aminoácidos, los cuales procesan grandes polímeros de la proteína. Cada subunidad tiene sitios de unión al colágeno, al FVIII, y a las plaquetas. Una vez sintetizado, el FvW puede ser secretado al plasma o subendotelio, o almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade y las plaquetas (gránulos alfa). El FvW funciona como una proteína adhesiva que se une a varios

ligandos, que son componentes importantes en el proceso hemostático, como: 1) plaquetas y subendotelio, para fomentar la adhesión plaquetaria; 2) Plaquetas activadas, con el fin de fomentar la agregación plaquetaria; y 3) FVIII, para evitar la degradación prematura de este cofactor. Una deficiencia cualitativa o cuantitativa de esta proteína procoagulante origina Enfermedad de von Willebrand o Síndrome de Bernard-Soulier, que se caracteriza por la presencia de hemorragias principalmente mucocutáneas; mientras que concentraciones elevadas están relacionadas con riesgo de trombosis, principalmente cardiovascular. (28)

#### **e) Anticoagulantes naturales: Proteína C, Proteína S y Antitrombina**

- **Proteína C, Proteína S**

La Proteína C es una glucoproteína dependiente de la Vitamina K, sintetizada por el hígado, importante para la anticoagulación natural; se encarga de regular la actividad procoagulante de los cofactores FVa y FVIIIa, por medio de su inhibición irreversible, de esta forma modula la actividad de los complejos Xasa y protrombinasa. (29) La trombina se une a la trombomodulina (proteína endotelial), esto permite la activación de la PC, junto a su cofactor, la Proteína S libre, degradando proteolíticamente los FVa y FVIIIa. Las deficiencias de estas proteínas se asocian con una mayor tendencia a procesos tromboembólicos. La deficiencia de PC puede ser cuantitativa o cualitativa. La determinación se realiza por medio de técnicas inmunológicas, como por ejemplo, la Inmunoelectroforesis de Laurell o por ELISA; también se puede determinar por pruebas funcionales, las cuales requieren de trombomodulina, por medio de métodos cromogénicos.

La Proteína S se describió y caracterizó por Di Scipio y colaboradores; como una

glicoproteína Vitamina K-dependiente, sintetizada en hígado; se encuentra en la circulación en dos formas: una libre, y otra unida a la proteína de complemento, C4b. El principal papel de la PS es como anticoagulante; actúa como cofactor del sistema de la PC: aumentando la afinidad de la PC por las membranas y cambia la especificidad de la ruptura proteolítica del FVa. Una deficiencia de PS se relaciona con incremento de enfermedad tromboembólica venosa. (30)

- **Antitrombina**

Es una glucoproteína compuesta de una sola cadena polipeptídica, codificada en el cromosoma 1, contiene 432 aminoácidos, un peso molecular de 58kd, es sintetizada en el hígado, tiene una vida media de 3 días aproximadamente. La función es como potente inhibidor de la trombina y de otras proteasas de serina como XIa, IXa, Xa, plasmina y calicreína. El déficit de AT puede ser cuantitativo o cualitativo, originando un estado de hipercoagulabilidad, y por lo tanto de trombosis. (31)

**f) Resistencia Proteína C activada**

La resistencia a la actividad de la proteína C ha sido descrita por Dahlbäck y col en 1993, como un nuevo mecanismo para la trombofilia familiar; se caracteriza por una actividad anticoagulante disminuida del sistema de la Proteína C, resultando en un incremento de la generación de trombina y por lo tanto, de un estado hipercoagulable. El 90% de los casos la causa es por una mutación puntual en el gen del FV que ocasiona un cambio de un aminoácido. Esta modificación incrementa el riesgo de 5-10 veces para presentar trombosis. (32)

**g) Plasminógeno**

Es una molécula constituida por 791 aminoácidos, es transformado en plasmina por



acción hidrolítica de sus activadores. La plasmina se forma en la superficie de la fibrina o de las membranas celulares, y se encarga de la degradación de los polímeros de fibrina para disolver el coágulo, previamente formado. (33)

#### **h) $\alpha$ 2-Antiplasmina**

Es una glucoproteína de 70 kd, consiste en una cadena de 464 aminoácidos, es el principal inhibidor de la plasmina y juega un papel importante en la lisis del coágulo; se encuentra en la circulación sanguínea. Concentraciones elevadas se relacionan con trombosis. (33)

#### **i) Anticoagulante Lúpico**

Los anticuerpos antifosfolípidos son una familia heterogénea de Inmunoglobulinas dirigidas contra fosfolípidos aniónicos o complejos fosfolípidos-proteínas (por ejemplo:  $\beta$ 2-Glicoproteína I y protrombina). Incluye al anticoagulante lúpico (AL) y anticuerpos anticardiolipina (ACA). El anticoagulante lúpico (AL) es un grupo heterogéneo de anticuerpos que se comporta como un inhibidor adquirido que prolonga las pruebas de hemostasia dependientes de fosfolípidos, sin embargo, no están dirigidos contra proteínas de la coagulación, por lo que se denominan “anticuerpos inespecíficos”. (34)

La presencia de AL se asocia con un estado de trombofilia, que se caracteriza por trombosis venosa o arterial, pérdidas fetales recurrentes y/o trombocitopenia, que en conjunto forman el Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos (SAAF). (35)

### **1. 2. 3 Control de Calidad en el Laboratorio de Hemostasia**

Control de Calidad: es un sistema diseñado para incrementar la probabilidad de que cada resultado reportado por el laboratorio, sea válido y pueda ser utilizado con confianza por el médico para tomar una decisión diagnóstica o terapéutica. (36)

Para garantizar la Calidad de las pruebas de hemostasia es importante cuidar las diferentes fases, ya que existen factores que pueden causar un detrimento en la eficacia, precisión y exactitud de los resultados.

#### **1. 2. 3. 1 Fase Pre-analítica**

Inicia con la solicitud del paciente, preparación del paciente, la toma de muestra, así como la identificación de la muestra, hasta el transporte a la sección donde será procesada dentro del laboratorio; (37) en ella existe la mayoría de los errores que repercuten en el resultado de los estudios, por lo que es imperativo para obtener el máximo beneficio de los estudios, que el médico y el laboratorio aseguren que el paciente esté en condiciones controladas, para lograr que los resultados sean útiles, (38) así como: muestras debidamente recolectadas, transportadas y almacenadas; como se describe a continuación.

- La solicitud del estudio debe estar justificada con el cuadro clínico del paciente, por lo tanto es necesario vigilar las reglas de cada unidad hospitalaria, y que se cumpla con los estándares de identificación del paciente y los datos clínicos necesarios.
- Una vez que se cuente con la solicitud es importante dar instrucciones al paciente, ya que algunos factores alteran los resultados de las pruebas de laboratorio, como por ejemplo: edad (por ejemplo, en el nacimiento los

factores de coagulación están disminuidos), embarazo (aumenta fibrinógeno, FvW, FVII, FVIII, FIX, y FX), medicamentos, estrés, ejercicio, etc.

- Por otro lado es necesario que el paciente cuente con un ayuno de por lo menos 4 horas antes de que se realice la toma de muestra, debido a que la mayoría de los instrumentos de laboratorio detectan la formación de coágulos con sistemas automáticos de detección foto-óptico, los cuales registran los cambios en la transmisión de la luz; si un plasma presenta turbidez por lipemia, ictericia o hemólisis, esto puede interferir con la lectura del sistema del instrumento óptico.
- La colección de la toma de muestra se debe realizar por medio de un sistema de recolección, y en todo caso de que no se cuente con este sistema, la toma se realizará con jeringa. Se requiere la aplicación de un torniquete para facilitar la toma de muestra, el cual de preferencia debe ser ancho (tipo cinturón) y no permanecer por más de un minuto, ya que puede activar el sistema de coagulación (pueden aumentar FVIII, FvW, t-PA y activar la fibrinólisis) y afectar los resultados. (39) La aguja debe ser de un calibre 21 y en caso de niños se puede utilizar calibre 22 o 23. (15) El utilizar una aguja de mayor calibre puede traumatizar la vena, y una de menor calibre puede ocasionar que la recolección sea muy lenta y ocasionar hemólisis y activación plaquetaria o que la muestra se coagule, y no se pueda procesar el estudio. La toma de muestra de catéter venoso central de preferencia no se debe utilizar por que puede prolongar los tiempos de coagulación (principalmente TTPa y TT), ya que la mayoría contiene heparina para que permanezcan permeables; sin embargo si es la única opción, se utilizará siempre y cuando

se desechen 7-10 ml de sangre para evitar la contaminación o dilución por líquidos en la línea. (40) Los tubos para la toma de muestra deben de ser de plástico y en todo caso de que sean de vidrio deben estar siliconizados, para no producir activación del sistema de coagulación.

- El anticoagulante más utilizado es el citrato trisódico, el cual actúa como quelante de calcio, impidiendo que se active el sistema de coagulación. La relación que se necesita de sangre total con anticoagulante es 9:1. La concentración del anticoagulante debe ser 0.105-0.109 M (3.2%). Los valores de Hematocrito cuando se encuentran por debajo de 30% o arriba de 55% pueden alterar los resultados, por lo tanto hay que hacer ajustes de la concentración del anticoagulante en estas situaciones. (11)
- Una vez obtenida la muestra sanguínea, debe mezclarse con suavidad mediante mecanismos de inversión, aproximadamente 5 movimientos con el fin de homogeneizar la sangre con el anticoagulante, y así evitar la formación de coágulos que interfieran con el análisis.
- La centrifugación permite la obtención de plasma rico en plaquetas (150-200 g o 1000 rpm por 10 minutos), se utiliza principalmente para la evaluación plaquetaria; y/o plasma pobre en plaquetas (2000 g o 3500 rpm por 15 minutos). (15)
- El plasma debe permanecer entre 15-20°C hasta su procesamiento; temperaturas elevadas destruyen la actividad de los factores lábiles (FVIII, FV), mientras que temperaturas bajas pueden activar al FVII.

### **1. 2. 3. 2 Fase analítica**

Es la etapa que considera, las variaciones relacionadas con el proceso técnico y que pueden afectar el resultado del estudio. Abarca la metodología, uso de equipos, calibración, control y validación de los resultados. Muchos procedimientos de control de calidad interno se basan en la introducción de muestras control, que serán sometidas a las mismas mediciones y pasos que las muestras de los pacientes. En el laboratorio de Hemostasia se cuenta con plasmas controles para la realización de las pruebas, y se obtienen de la siguiente forma:

- Plasma control liofilizado, el cual es obtenido comercialmente.
- Mezcla de plasmas provenientes de un mínimo de 20 personas.

Los controles son muestras manipuladas, procesadas y analizadas usando técnicas idénticas a las que se usaron con las muestras de los pacientes. (41)

### **1. 2. 3. 3 Fase postanalítica**

Es la confrontación de todas las fases del análisis, con la finalidad de correlacionar los resultados obtenidos con los diagnósticos del paciente. Incluye el reporte de resultados, los valores de referencia en base a la variabilidad biológica, y la interpretación adecuada

Para todos los resultados de laboratorio es necesario contar con un parámetro de referencia, es indispensable, por lo tanto conocer un límite entre lo normal y lo patológico, lo cual debe estar fundamentado en un enfoque estadístico y epidemiológico (42). El concepto de límites de referencia, es aceptado desde 1979 por el panel de expertos de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

Intervalo de referencia: es el conjunto finito de valores, desde un límite inferior hasta uno superior, contra el cual comparamos el valor obtenido en una medición; para determinar si dicho valor pertenece o no a la población de la que se obtuvo el intervalo de referencia. Se obtiene cuando se hacen mediciones en una población bien caracterizada por sexo, edad, raza, y principalmente sana. Una vez que se tenga a la población, hay que estandarizar las condiciones fisiológicas y ambientales en que se toma la muestra y el procesamiento de la misma, además del método analítico utilizado. (43)

El establecer un límite de referencia entre lo normal y lo patológico, influyen:

1. Características intrínsecas del grupo de pacientes que se va a estudiar: edad, sexo, nutrición, cultura, nacionalidad.
2. Incidencia y frecuencia epidemiológica de un padecimiento determinado.
3. Precisión, exactitud, sensibilidad, y especificidad de los métodos empleados.

Se ha demostrado que los límites de referencia son susceptibles a múltiples variaciones y dependen de diversos factores, de los cuales uno de los más importantes es la edad. Las casas comerciales han realizado diversos estudios que expresan valores de referencia, sin embargo estos valores son hechos en otras poblaciones y por tal motivo no deben ser aplicados a nuestra población, esta es la razón por la cual se deben de hacer estudios en población mexicana para conocer cuáles son los valores, y poder emplearlos tanto en las pruebas de escrutinio, como en pruebas especiales.

Para establecer los valores de referencia se debe de hacer una selección del mismo número de sujetos del sexo masculino y femenino, el número de personas mínimo

es 20; el utilizar 40 personas o más proporciona un nivel mayor de confianza de estos valores. (44)

Para establecer los valores de referencia se debe de hacer una selección del mismo número de sujetos del sexo masculino y femenino, el número de personas mínimo es 20; el utilizar 40 personas o más proporciona un nivel mayor de confianza de estos valores (32). Para estudiar VR poblacionales, el valor mínimo de individuos es 120 (NCCLS document C28-A2, 2000).

## **SEGUNDA PARTE**

### **2. 1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existe una amplia variedad de pruebas en el laboratorio de hemostasia, que podemos dividir en pruebas de escrutinio y especiales las cuales nos permiten valorar los tiempos de coagulación, cuantificación de factores, perfil de trombofilia y fibrinólisis. Estas pruebas son utilizadas con el fin de detectar cualquier anomalía que condicione algún proceso patológico. Al obtener los resultados de los pacientes, siempre debemos contar con valores de referencia para poder detectar a la población que presente alteraciones, con el propósito de realizar diagnósticos, y tomar decisiones sobre el manejo terapéutico. La diversidad en los reactivos y sistemas de medición dificulta la estandarización de valores de referencia para una población determinada, por lo cual de manera universal se utiliza una mezcla de plasmas obtenida de una población aparentemente sana, para el coagulograma básico (TP, TTPa, TT y Fibrinógeno), sin embargo, para las pruebas especiales no hay evidencia de estudios similares, y por lo tanto la mayoría de los laboratorios se basan en los valores que proporcionan las diferentes casas comerciales de los reactivos.



### **2. 1. 1 JUSTIFICACION**

En la población mexicana los problemas de hemostasia constituyen un porcentaje elevado de enfermedades, por lo cual es indispensable que todas las unidades de atención médica cuenten con un laboratorio donde se realicen pruebas de hemostasia que nos permitan garantizar una evaluación correcta, un diagnóstico certero y un tratamiento adecuado de la población. Otro problema es la poca difusión en el personal médico sobre la gran variedad de pruebas de hemostasia que se realizan en el laboratorio de coagulación y la falta de personal especializado en el área, en la mayoría de los laboratorios, por lo tanto, hay pruebas que no se solicitan, o bien no son tomadas en cuenta para la evaluación del paciente, provocando interpretaciones erróneas, y esto repercute, en los costos dentro del laboratorio y del hospital.

Por otro lado, no existen estudios que demuestren el comportamiento de nuestra población sana, con respecto a las pruebas de coagulación, lo que impide establecer valores de referencia.

Lo anterior justifica la necesidad de realizar este tipo de evaluaciones, para poder establecer puntos de corte y obtener valores de referencia confiables, facilitar el proceso analítico, además de la adecuada interpretación de los resultados por parte del clínico. Los valores de referencia varían dependiendo del reactivo y los sistemas de medición utilizados (equipos y metodología analítica); por lo tanto es importante hacer énfasis en que cada laboratorio establezca sus propios intervalos. Existen diferentes metodologías para establecerlos una de ellas consiste en obtener una mezcla de plasmas de personas aparentemente sanas, voluntarias, a las cuales se

les determinarán las pruebas de escrutinio, las pruebas especiales.

En México se desconoce cuáles son los valores de referencia de la totalidad de las proteínas del sistema de la coagulación. Por tal motivo es importante realizar estudios que aporten información sobre este tema. Además su conocimiento permitirá facilitar el proceso analítico y la adecuada interpretación de los resultados. El empleo de la mezcla de plasmas, comúnmente denominada pool, se utiliza en el laboratorio clínico como el parámetro comparativo para establecer un diagnóstico de laboratorio, específicamente en las pruebas basadas en el tiempo de coagulación y en la búsqueda del AL. Teóricamente, una mezcla de plasmas aseguraría tener la máxima actividad de cada una de las proteínas involucradas en la formación, regulación y disolución de un coágulo (aproximadamente 100% de actividad); sin embargo no existe evidencia científica que los sustente. Por otro lado, considerando que la mezcla de plasmas proporciona un plasma idóneo para estudiar la coagulación sanguínea quizás puede ser utilizada como un parámetro más del control de la calidad, con coeficientes de variación similares a los que presenta el plasma control normal proporcionado por las casas comerciales.

Este trabajo nos permitirá estandarizar una metodología, que podrá ser utilizada posteriormente por otros laboratorios. Las prueba más utilizadas son TP, TTPa, y TT, y el resultado se compara siempre con un valor de un pool de plasmas normal; con una diferencia mínima en segundos; sin embargo es sumamente importante explicar el gran número de pruebas que actualmente se realizan en los laboratorios de hemostasia especial, estableciendo valores de referencia en nuestro sitio de trabajo.

## **2. 1. 2. PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Cuáles son los rangos de los resultados de las pruebas de escrutinio y especiales del laboratorio de coagulación en la mezcla de plasmas de donadores sanos en población adulta?

## **2. 2 OBJETIVOS**

### **Generales**

- Establecer los Valores de Referencia de las pruebas de escrutinio y especiales del laboratorio de coagulación a partir del estudio de la mezcla de plasmas de donadores sanos en población adulta.

### **Específicos**

- Conocer los rangos de los resultados de las pruebas de escrutinio y especiales del laboratorio de coagulación de la población estudiada.
- Analizar el comportamiento de los resultados para cada prueba estudiada y compararlos con los valores de referencia sugeridos por el fabricante del reactivo utilizado.
- Establecer los valores de referencia de cada una de las pruebas analizadas.

## **2. 3 HIPÓTESIS**

Los valores de referencia de las pruebas de escrutinio y especiales del laboratorio de coagulación en la mezcla de plasmas son diferentes de los valores de referencia poblacionales establecidos por el proveedor.

## **2. 4 Variables**

### **Descripción de las variables.**

- Independientes. Mezcla de plasmas de donadores sanos.
- Dependientes. Valores de referencia de las pruebas de escrutinio y especiales del laboratorio de coagulación.

### **Descripción operacional de las variables**

Pruebas de Escrutinio.

- a) Tiempo de protrombina (TP), tromboplastina parcial activada (TTPa) y de trombina (TT); expresado en segundos.
- b) Fibrinógeno. Concentración plasmática de fibrinógeno presente en la mezcla de plasmas, expresada en mg/dL.

Pruebas especiales.

- a) Factores hemostáticos. Concentración de los factores hemostáticos en estudio en comparación con un plasma de calibración, expresada en porcentaje de actividad.

- b) Proteínas anticoagulantes naturales. Concentración de la Proteínas C (PC), Proteína S (PS), Antitrombina (AT) en la mezcla de plasmas en comparación con un plasma de calibración, expresada en porcentaje de actividad.
- c) Proteínas fibrinolíticas. Concentración del plasminógeno (PLG) y alfa 2 antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP) en la mezcla de plasmas en comparación con un plasma de calibración, expresada en porcentaje de actividad.
- d) Anticoagulante lúpico. Tiempo del veneno de la víbora de Russel (TTVR) de escrutinio y confirmatorio de la mezcla de plasmas, expresado en segundos.

## **2. 5 MATERIAL Y METODOS**

### **Universo de trabajo.**

- Mezcla de plasmas provenientes de donadores clínicamente sanos mexicanos.

### **2. 5. 1 Tipo y Diseño del Estudio**

- Estudio descriptivo, observacional, transversal, no aleatorizado

### **2. 5. 2 Población y Muestra**

- Muestra de plasmas de donadores aptos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 003 SSA2-1993, “Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos”, proveniente del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

## **2. 6 Criterios de Selección**

### **Selección de la muestra**

- Tamaño. 72 mezclas de plasmas de donadores sanos mexicanos. Cada mezcla se preparó con el plasma de al menos 20 donadores, 10 hombres y 10 mujeres.

### **Criterios de inclusión.**

- Muestras de plasma obtenidas en tubos al vacio con citrato de sodio al 3.2% de al menos 20 donadores sanos, 10 hombres y 10 mujeres.
- Muestras con una relación de 1:9 de citrato de sodio al 3.2% con respecto a la sangre obtenida.

### **Criterios de exclusión.**

- Muestras mal aforadas, lipémicas, ictéricas o hemolizadas en la mezcla de plasmas.

## 2. 7 Métodos

Durante el periodo del 15 de febrero del 2010 al 27 de junio del 2011, Se utilizaron las muestras que el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI otorga semanalmente para utilizarse como testigos en la interpretación de los estudios de escrutinio como se describe a continuación:

Una vez recibidas, se verifica que correspondan a muestras de 10 hombres y 10 mujeres. Posteriormente se valida que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión. Los tubos se centrifugaron por 15 min a 2000 g (3,500 rpm). Al terminar, las muestras de plasma de los 20 sujetos se mezclaron para obtener una sola muestra. Dicha mezcla se procesó dentro de las primeras 4 horas de extraída. Las pruebas de coagulación se realizaron en los sistemas de medición StaCompaq (Stago Asniers, Francia), con la metodología descrita en el anexo 1 para las diferentes pruebas de escrutinio y especiales, de acuerdo con las pruebas realizadas y estandarizadas en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Hospital General Regional No 1 del IMSS “Carlos McGregor Navarro”.

Los resultados obtenidos se registraron en una base de datos en el programa Excell, Windows, SPSS.

Para el control de calidad se utilizó un plasma control normal y otro patológico comercial. Con los resultados se realizaron las gráficas de control de Levey-Jennings y se interpretaron en cada corrida de muestras. En relación a la estabilidad del reactivo, una vez que fueron retirados del refrigerador, se dejaron por una hora a temperatura ambiente. El vial que contenía el liofilizado del plasma de la



proteína en estudio y los plasmas citratados para control normal y patológico se reconstituyeron con 1 mL de agua inyectable. Todos se dejaron reposar a temperatura ambiente por 1 hora para permitir la hidratación adecuada. Transcurrido el tiempo se mezclaron suavemente para homogeneizarlos, sin formar espuma. Una vez reconstituidos, los reactivos fueron estables por 8h entre 15 y 19°C. Lo anterior de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

## **2. 8 Análisis Estadístico**

Se realizó estadística descriptiva de cada una de las pruebas realizadas. Los resultados de todas las variables se analizaron con medidas de tendencia central, además se estableció su distribución mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov.

## TERCERA PARTE

### 3. 0 Resultados

Se obtuvo 72 mezclas de plasma, provenientes del BCS CMN SXXI, de donadores sanos, los cuales fueron aceptados de acuerdo a los estándares establecidos por la NOM-003-SSA2-1993. A las muestras se les realizaron las pruebas de hemostasia de escrutinio y especiales para conocer el rango de referencia, en una población específica, y evaluada con un sistema de medición Stago. Para determinar la fiabilidad de la media de referencia se recomienda como mínimo 20 o más valores, para poder hacer la determinación.

El análisis de estas pruebas se realizó con medidas de tendencia central: (media, mediana y moda), se buscaron los resultados mínimos y máximos, con el fin de representar los valores extremos; además, se evaluó la desviación estándar. Para conocer los valores de referencia, se determinó el intervalo de confianza al 95%, en base a la realización de percentiles 2.5 y 97.5; además se realizaron histogramas, lo cual nos permitió conocer la distribución de dichos valores en la población evaluada.

Para todas las variables estudiadas, se muestran los resultados del análisis descriptivo y los valores de referencia obtenidos (Tablas, 2-5).

**TP, TTPa, TT y Fibrinógeno.** Los valores de referencia obtenidos para estas pruebas se muestran en la Tabla 2. La actividad de los tiempos de coagulación se expresa en segundos, y el fibrinógeno es evaluado en mg/dL. También se presentan las diluciones practicadas al TP y TTPa, 1:2 y 1:4, expresadas en segundos.

**Tabla 2. Resultados de las pruebas TP, TTPa, TT y fibrinógeno en la mezcla de plasmas de donadores sanos en población adulta.**

PRUEBA	N	MIN	MAX	MEDIA	DE	CV	MEDIANA	VR
TP (s)	72	12.3	14.0	13.1	0.3	2.5	13.0	12.5-13.7
TP 1:2 8 (s)	72	16.7	24.0	18.8	0.9	4.8	18.8	17.4-20.0
TP 1:4 (s)	72	26.6	36.2	31.8	1.9	6.0	32.0	27.6-35.1
TTPa (s)	72	28.0	33.7	31.6	0.8	2.6	31.5	30.0-33.0
TTPa 1:2 (s)	72	37.9	73.9	43.4	4.2	9.7	42.9	39.5-48.7
TTPa 1:4 (s)	72	67.0	89.4	77.2	5.7	7.4	76.7	65.9-88.4
TT (s)	72	17.5	20.0	18.6	0.6	3.3	18.5	17.7-20.0
FIB (mg/dL)	72	250	367	316.3	22.5	7.1	317.0	279.8-355.0

**Factores hemostáticos.** Los valores de referencia obtenidos para estas pruebas se muestran en la tabla 3. La concentración de cada variable se expresa en porcentaje de actividad.

**Tabla 3. Resultados de los factores hemostáticos en la mezcla de plasmas de donadores sanos en población adulta.**

PRUEBA	N	MIN	MAX	MEDIA	DE	CV	MEDIANA	VR
Fwv (%)	72	78	119	98	8.1	8.2	99	85-114
FII (%)	72	87	122	101	7.5	7.4	102	88-116
FV (%)	72	82	132	100	10	10.0	99	84-119
FVII (%)	72	92	133	112	9.9	8.9	113	93-129
FVIII (%)	72	84	150	118	18.1	15.3	118	87-148
FIX (%)	72	94	151	124	13.2	10.6	125	98-150
FX (%)	72	90	117	103	5.9	5.8	102	93-113
FXI (%)	72	77	154	108	17.0	15.8	106	79-138
FXII (%)	72	61	133	87	11.3	13.0	86	65-105

**Proteínas anticoagulantes naturales y RPCa.** Los resultados de la concentración de estas proteínas se expresaron en porcentaje de actividad; para la RPCa, los resultados se expresaron en segundos (tabla 4).

**Tabla 4. Resultados de las proteínas anticoagulantes naturales y resistencia a la proteína C activada en la mezcla de plasmas de donadores sanos en población adulta.**

PRUEBA	N	MIN	MAX	MEDIA	DE	CV	MEDIANA	VR
PC (%)	72	80	132	117	8.6	7.3	118	98-128
PS (%)	72	77	126	105	9.8	9.3	107	86-121
AT (%)	72	87	121	109	6.5	5.9	110	97-118
RPCa (s)	72	125	177	148	11.9	8.0	149	130-173

**Anticoagulante lúpico.** El resultado de cada prueba se expresó en segundo. La tabla 5 muestra los resultados del análisis descriptivo y los valores de referencia.

**Tabla 5. Resultados de las pruebas de anticoagulante lúpico en la mezcla de plasmas de donadores sanos en población adulta.**

PRUEBA	N	MIN	MAX	MEDIA	DE	CV	MEDIANA	VR
ALS (s)	72	36	45	41	1.9	4.6	41	37-44
ALC (s)	72	31	37	34	1.2	3.5	34	32-36
PTT-LA (s)	72	38	50	44	2.5	5.7	44	39-49
AL-1 (s)	72	46	71	60	5.0	8.3	60	52-69
AL-2 (s)	72	44	68	57	4.9	8.5	57	49-66

**Proteínas de la fibrinólisis.** Ambas se expresaron en porcentaje de actividad. La tabla 7 muestra los resultados.

**Tabla 7. Resultados de las proteínas de la fibrinólisis en la mezcla de plasmas de donadores sanos en población adulta.**

PRUEBA	N	MIN	MAX	MEDIA	DE	CV	MEDIANA	VR
Plg (%)	75	96	118	106	5.2	4.9	105	98-117
$\alpha$ 2AP (%)	75	90	129	111	9.9	8.9	113	92-128



## **CUARTA PARTE**

### **4. 0 Discusión**

Los valores de referencia deben ser calculados para cada población en particular usuaria de un laboratorio clínico, ya que son dependientes de la genética, raza, estilos de vida y ambientales; y de otras características más específicas como la edad, género; así como del método analítico con que son evaluados y equipo utilizado, etc. Se obtienen a partir de una población clínicamente sana y homogénea, y su importancia radica en que se trata de una descripción de la población a la que se le otorga atención médica, con una metodología utilizada, y estandarizada; por lo tanto sirven de guía para considerar a la población normal; tomando en cuenta, que un valor fuera de este rango, no indica enfermedad, sino que el valor obtenido no se encuentra dentro del 95% de las personas en las que se calculó el estudio; este es el motivo, por lo cual no es conveniente utilizar los datos reportados en los insertos de las casas comerciales, ya que la población en donde realizan sus estudios es muy diferente en cuanto nutrición, estilos de vida, y variables fisiológicas y biológicas. (Solberg HE, IFCC, 1987)

En los resultados de las pruebas de coagulación realizadas a las 72 mezclas de plasma analizadas, no se encontró diferencia a los valores de referencia reportados por el fabricante; sin embargo podemos observar que en los resultados que obtuvimos podemos observar un rango menor a lo establecido, lo que nos permite realizar una mejor discriminación y un análisis adecuado, para la interpretación correcta de las pruebas; así como conocer el comportamiento de la población estudiada.

La población mexicana está compuesta por individuos mestizos en los que la mayor participación genética corresponde a las poblaciones indígenas y española. Por lo tanto, las características genéticas de la población mexicana son extraordinariamente específicas y nos hacen un país homólogo genéticamente, pero muy diferente a otras poblaciones. Por lo tanto es imprescindible conocer las características de nuestra población. Hasta hoy, existen pocos trabajos relacionados con el estudio del sistema de la coagulación sanguínea en población mexicana. En un estudio realizado para establecer la prevalencia de la resistencia a la proteína C activada (RPCa) y del FV de Leiden en México, se constató, que estas alteraciones no se encuentran en población indígena, mientras que en población mestiza se documentó una prevalencia muy baja (Majluf et al., 2008), mucho menor a la estimada en otros países. A pesar de ser el único trabajo realizado en la población indígena mexicana, sus resultados apoyan la hipótesis de la diferencia en las concentraciones plasmáticas de los factores hemostáticos encontradas en la población mexicana, debida al patrón de mestizaje.

Particularmente, las concentraciones de los factores son importantes porque determinan las tendencias hemorrágicas o trombóticas de una población. También sabemos que estas concentraciones impactan en la posibilidad de sufrir eventos isquémicos. Por ejemplo, se ha demostrado que el aumento, genéticamente determinado en la concentración del FVIII se asocia con Infarto Agudo de Miocardio (Majluf et al., 2008; Hernández et al., 2003) y con Infartos Cerebrales. Otro ejemplo, es el aumento en la concentración del fibrinógeno que eleva el riesgo de complicaciones en los enfermos diabéticos. Por lo tanto, la demostración de los valores de referencia nos permiten considerar a un individuo como portador de una

deficiencia, o un aumento (trombofilia) de la concentración de un factor, son diferentes en México, en comparación con los estándares ofrecidos por las casas comerciales que producen los reactivos para estas pruebas.

## **QUINTA PARTE**

### **5. 1 Conclusiones**

Se establecieron los valores de referencia de las pruebas de hemostasia de escrutinio y especiales en población adulta.

Los valores de referencia establecidos por las casas comerciales demuestran rangos muy amplios, y, por lo tanto, no deben ser utilizados para establecer un diagnóstico de laboratorio.

Es importante poder difundir la información obtenida a los laboratorios que realizan pruebas de hemostasia, para que cada uno de ellos pueda establecer sus propios valores de referencia de la población a la que otorga atención médica, y con respecto al sistema de medición utilizado, debido a la variabilidad biológica, que existe en la población mexicana.

Se sugiere realizar más estudios en donde se puedan obtener valores con respecto a los diferentes grupos de edad, por género, y por sexo.

## 5. 2 Bibliografía

1. Majluf A. Fisiología del sistema de la coagulación. Capítulo IV en Hematología básica. 2006. Editado por Majluf A, Pérez O. Editorial Garmarte. DF, México. Pag: 163-164.
2. Lippi G, Favarolo EJ. Activated Partial Thromboplastin Time: New Tricks for an Old Dogma. Seminars in Thrombosis and Hemostasis; Vol 34, Number 7, 2008; 604-611
3. Majluf A. Mecanismos hemostáticos. Capítulo 18 En Fundamentos de Hematología. 2003. Editado por Ruiz G. 3ª Edición. Editorial Panamericana. DF, México. Pág. 369-375
4. Majluf A. Fisiología del sistema de la coagulación. Capítulo 36 en Hematología básica. 2010. Editado por Majluf A, Pérez O. Editorial Garmarte. DF, México. Pag: 479-493.
5. Martínez MC. El problema trombótico. Incidencia. Enfermedad tromboembólica venosa, Guía Práctica. Editorial Alfil, México DF. 2007; 24-28.
6. Bonar R, Favalaro EJ, Adcock DM. Quality in coagulation and haemostasis testing. Biochemia Medica, 2010; 20 (2): 184-199.
7. Moreno HM, Luna GAR, Magaña PJA, Ochoa RMA, Méndez TMS, Ramírez PS, Reyes ME, Rosenfeld MF, Pérez GDP, Trueba GR, Zavala HC, Girón RV, Quintana GS, Gaminio GE, Martínez MC. Consenso sobre estandarización de las pruebas de coagulación. Las recomendaciones Nacionales del Grupo Cooperativo Mexicano de Hemostasia y Control de Calidad. Revista de Hemostasia y Trombosis, 2008; 2 (2,3

y 4): 102-114.

8. Martínez MC, Quintana GS, Collazo JJ. Las Pruebas de Laboratorio para evaluar la hemostasia. El presente y el futuro. *Revista de Hemostasia y Trombosis*, 2008; 2 (1): 66-75.

9. Martínez MC. Mecanismo de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006; 44 (Supl 2): 51-58

10. Gailane D, Renné T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1106–1112

11. Plebani M, Sanzari MC, Zardo L. (2008). Quality control in coagulation testing. *Seminars In Thrombosis And Hemostasis*, 34 (7), 642-646.

12. Kamal AH, Tefferi, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82 (7): 864-873

13. Van Den Besselaar AMHP, Barrowcliffe TW, Houbouyan-Re VLL, Jespersen J, Johnston M, Poller L, Tripodi A. Guidelines on preparation, certification, and use of certified plasmas for ISI calibration and INR determination. *Journal of Thrombosis and Hemostasis* 2004; 2: 1946-1953.

14. D'Angelo A, Galli L, Lang H. Comparison of mean normal prothrombin time with PT of fresh normal pooled plasma or of a lyophilized control plasma (R82A) as denominator to express PT results. *Clinical Chemistry*, 1997; 43 (11); 2169-2174.

15. Giuseppe Lippi, M.D.,<sup>1</sup> and Emmanuel J. Favaloro. Activated Partial Thromboplastin Time: New Tricks for an Old Dogma. *Seminars in Thrombosis and*

Hemostasis 2008; 34 (7): 2008: 604-611

16. Kitchen S, Makris M. Laboratory tests of hemostasis. Practical Hemostasis and Thrombosis 2005, Chapter 2: 8-17

17. Ruiz CAA, Nuñez PE, Muñoz MB, Majluf CA. El control de calidad en el laboratorio de coagulación. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2008; 46 (3): 339-348

18. Ruiz CAA, Girón RV, Moreno HM, García GE, Ortiz CLA, Cortez YMA. Conversando sobre coagulación y hemostasia. Noticonaquic 2008; 43: 11: 1-5

19. Ruiz CAA, Girón RV, Moreno HM, García GE, Ortiz CLA, Cortez YMA. Conversando sobre coagulación y hemostasia. Noticonaquic 2008; 42: 21-24

20. Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8: 1670–1674.

21. Vijayalakshmi J, Padmanabhan KP, Mann KG, Tuilinsky A. The isomorphous structures of prethrombin 2, hirugen-, and PPACK – thrombin: changes accompanying activation and exosite binding to thrombin. Protein Sci. 1994; 3: 2254-71.

22. Tracy PB, Mann KG. Abnormal formation of the prothrombinase complex: factor V deficiency and related disorders. Hum Pathol. 1987; 18: 162-169

23. Beutle E. Kipss TJ, Coller BS, Seligsohn U. Williams Hematología. 2005. 6<sup>a</sup> Edición, Tomo II, Marbán, Madrid, España. Pag. 1409-1426.

24. Eaton D, Rodríguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. Biochemistry. 1986; 25:

505-512.

25. Rao L, Rapaport SI. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 6687-6691.

26. Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*. 1991; 253 (5022): 909-912.

27. Endler G, Marsik C, Jilma B, Schickbauer T, Quehenberger P, Mannhalter C. Evidence of a U-shaped association between factor XII activity and overall survival. *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 1143-1148.

28. Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* 2008; 14 (5): 11-26.

29. Zavala HC, Hernández ZE, Martínez MC, Arenas SM, González OAE, Reyes ME. Asociación de la RPCA con mutaciones Leiden y Cambridge del factor V de la coagulación en pacientes mexicanos con trombofilia primaria. *Cir Cir* 2010; 78: 131-136

30. Lippi G, Favaloro EJ, Franchini M, Guidi GC. Milestones and Perspectives in Coagulation and Hemostasis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2009; 35 (1): 9-22

31. Aich M, Gandrille S, Emmerich J. A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost* 1995; 1: 81-89

32. Mettine HA Bos1 and Rodney M Camire. Blood Coagulation Factors V and VIII: Molecular Mechanisms of Procofactor Activation. *JCD* 2010; 2 (2): 19-20



33. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic System. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7: 4–13
34. Mackie JL, Donohoe S, Machin SJ. Lupus anticoagulant measurement. En: Khamashta MA, ed. *Hughes Syndrome. Antiphospholipid syndrome*. London: Springer; 2000. p. 214-24.
35. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342: 341-4.
36. Cooper WG. *Sistemas de Control de Calidad Básico e Intermedio para el Laboratorio Clínico*. Bio-Rad Laboratories, Segunda Edición; 1997; p.p. 1-14.
37. Ochoa RMA. Control de Calidad en el Laboratorio de Hemostasia. *Revista de Hematología* 2006; 7 (1): 1-5.
38. Terrés SAM. Estimación de la incertidumbre y de la variabilidad total en el laboratorio clínico. *Rev Mex Patol Clin*, 2006; 53 (4): 185-196.
39. Echenagucia ME, Ruiz SA. Garantía de la Calidad en el Laboratorio de Coagulación.
40. Polack B, Schved JF, Boneu B. Preanalytical Recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose' (GEHT) for Venous Blood Testing in Hemostasis Laboratories. *Haemostasis* 2001; 31: 61–68
41. Bolton MP, Perry D. The rare coagulation disorders-review with guidelines for management from UK haemophilia centre doctors organization. *Haemophilia* 2004; 10: 593-628
42. Terrés-Speziale AM. Estimación de la Incertidumbre y de la Variabilidad Total en

el Laboratorio Clínico. Rev Mex Patol Clin, 2006; 53 (4): 185-196

43. Paredes GR. ¿Quién posee rango para establecer la normalidad de los Intervalos de Referencia? Medigraphic, 2007; 32 (3): 81-82.

44. Bennett ST, Lehman CM, Rodgers GM. Laboratory Hemostasis. A Practical Guide for Pathologists. Springer, 2007: 58-84.

## 5. 3 Anexos

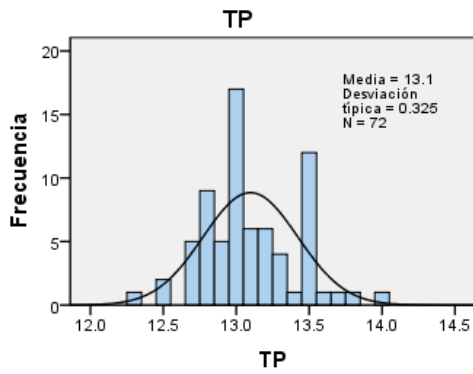
### Anexo 1. Técnicas de las pruebas de hemostasia

- a) TP: el fundamento de esta prueba consiste en adicionar una tromboplastina completa a un plasma citratado. La técnica consiste en agregar 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de TP (tromboplastina liofilizada obtenida de cerebro de conejo + cloruro de calcio 0.025M) a 100  $\mu\text{L}$  anticoagulado con citrato de sodio 3.2 %, se incuba de 2-3 min a 37°C y se mide el tiempo hasta la formación de una malla de fibrina.
- b) TTPa: esta prueba utiliza una tromboplastina parcialmente activada como la cefalina que tiene un efecto equivalente al factor 3 plaquetario. Para realizar la prueba se mezcla el plasma problema con calcio y fosfolípidos, y un activador del mecanismo intrínseco como: sílice, caolín, celite o ácido eláxico. El cloruro de calcio aportará el calcio secuestrado por el anticoagulante. Se utilizó una técnica coagulométrica que consiste en adicionar 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla de cefalina liofilizada (sustituto plaquetario preparado de tejido de cerebro de conejo) y una suspensión de caolín como activador (suspensión de caolín tamponado 5mg/mL) a la muestra de plasma anticoagulado con citrato de sodio 3.2%; se incuba por 2-3 minutos y se adicionó cloruro de calcio 0.025 M para medir el tiempo que tarda en formarse la malla de fibrina.
- c) TT: el principio consiste en agregar trombina generalmente bovina, a una mezcla de plasma anticoagulado y se registra el tiempo en que tarda en aparecer la fibrina. La técnica es coagulométrica; consiste en mezclar volúmenes iguales, 100  $\mu\text{L}$  de plasma con anticoagulante citrato 3.2%, con

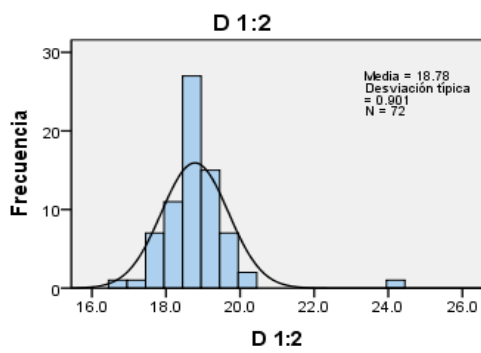
100  $\mu$ L de trombina, previamente incubado a 37°C.

- d) Fibrinógeno: se utilizó un método coagulométrico, tiene como fundamento la adición de trombina en exceso a un plasma problema previamente diluido (1:10); mide el tiempo que tarda en formarse la fibrina, es inversamente proporcional a la concentración plasmática del fibrinógeno. Para realizar esta prueba se requiere una curva de calibración que se obtiene de preparar diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 del plasma calibrador con solución diluyente. A 200  $\mu$ L del plasma problema diluido 1:10 e incubada a 37°C durante 120 s, se adiciona 200  $\mu$ L del reactivo de fibrinógeno (Tr liofilizada a 18-25°C). Se inicia el conteo al añadir el reactivo de fibrinógeno y se detiene al momento de iniciar la formación de fibrina. El resultado se extrapola en una curva de calibración para conocer la concentración plasmática de fibrinógeno.
- e) Actividad de los factores: se utilizan técnicas coagulométricas, el reactivo que se emplea puede ser TP (factores de vía extrínseca y vía común) o TTPa (factores de la vía intrínseca); ambos, se caracterizan por que presentan deficiencia de cada uno de los factores a evaluar. El cronometro se detiene al momento de iniciar la formación de fibrina. El tiempo que tarda el plasma en producir el coágulo se extrapola en una curva de calibración (emplea diluciones del plasma, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80); y se hace una gráfica en papel semilogarítmico para conocer el porcentaje de actividad del factor evaluado

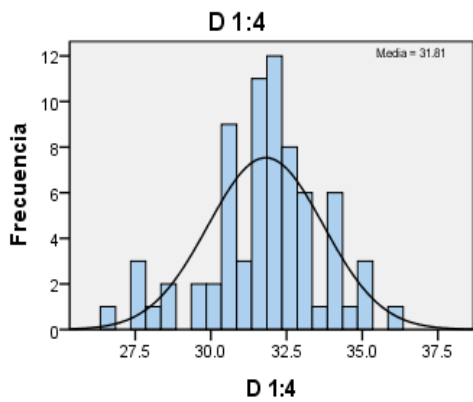
## Anexo 2. Gráficas



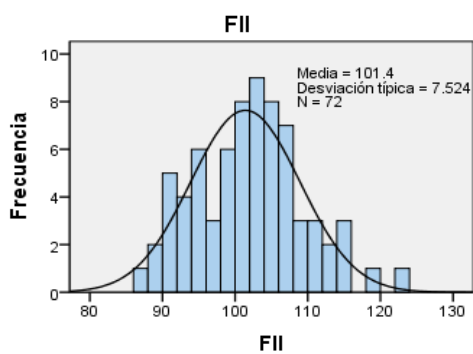
Gráfica 1. Distribución bimodal



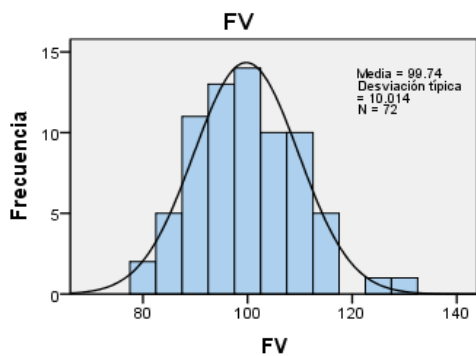
Gráfica 2. Distribución normal



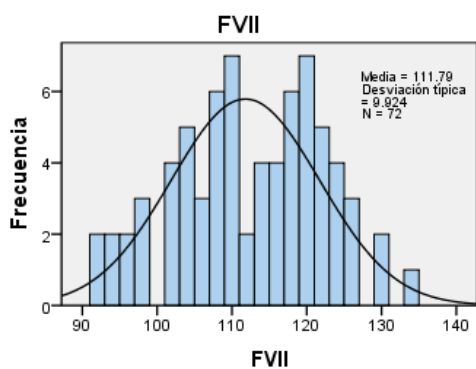
Gráfica 3. Distribución bimodal



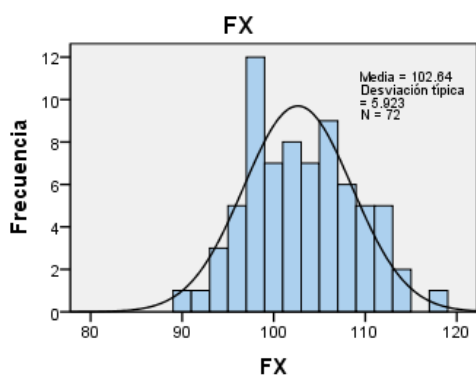
Gráfica 4. Distribución normal



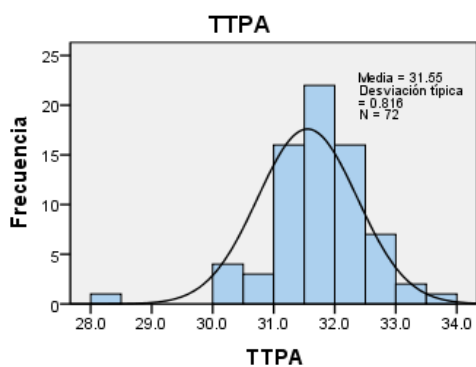
Gráfica 5. Distribución normal



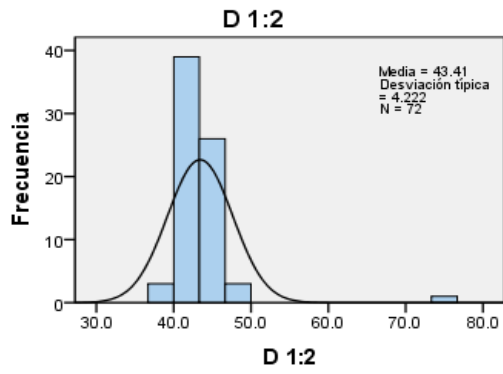
Gráfica 6. Distribución bimodal



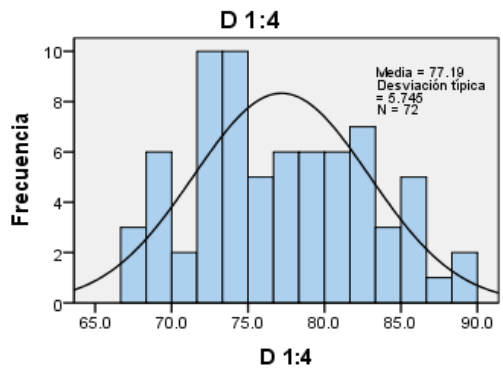
Gráfica 7. Distribución normal con un pico de mayor frecuencia ligeramente hacia la izquierda



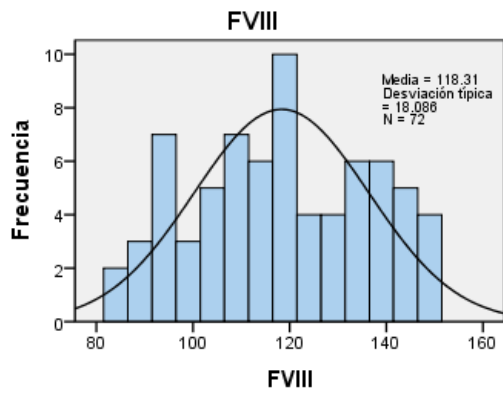
Gráfica 8. Distribución sesgada hacia la derecha.



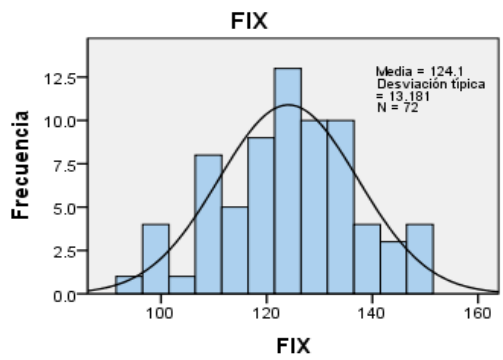
Gráfica 9. Distribución normal



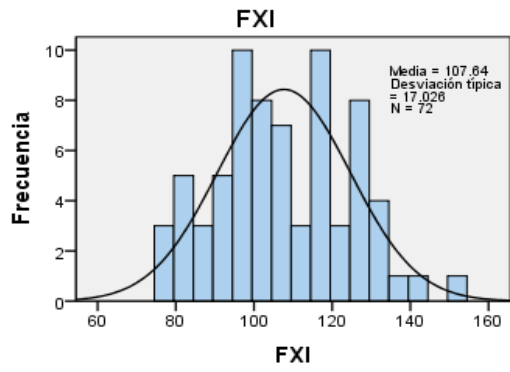
Gráfica 10. Distribución positiva



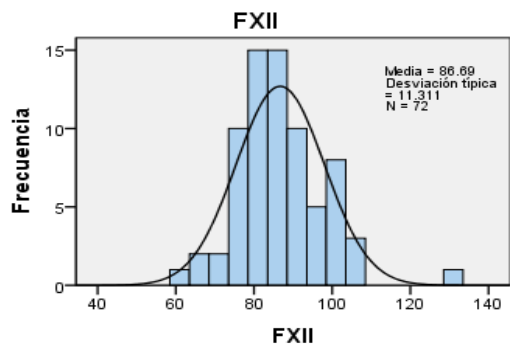
Gráfica 11. Distribución normal



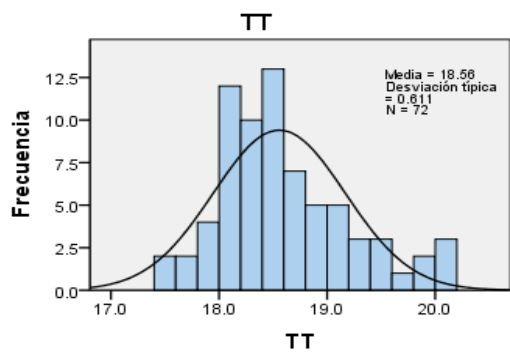
Gráfica 12. Distribución normal



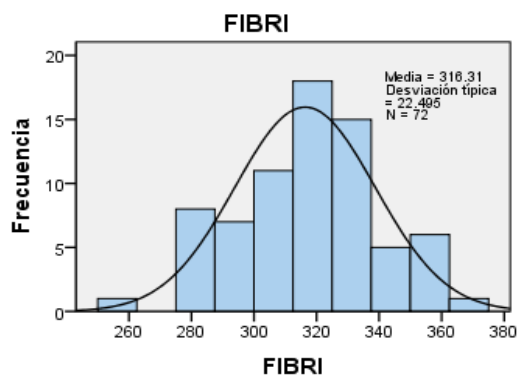
Gráfica 13. Distribución bimodal



Gráfica 14. Distribución normal

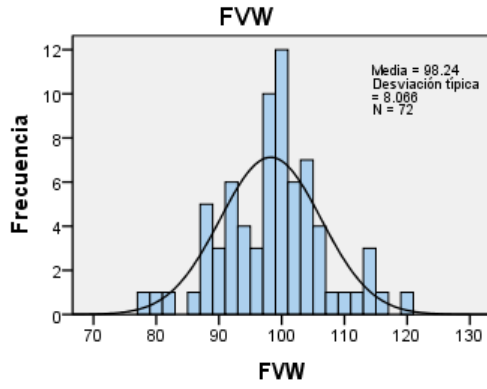


Gráfica 15. Distribución positiva

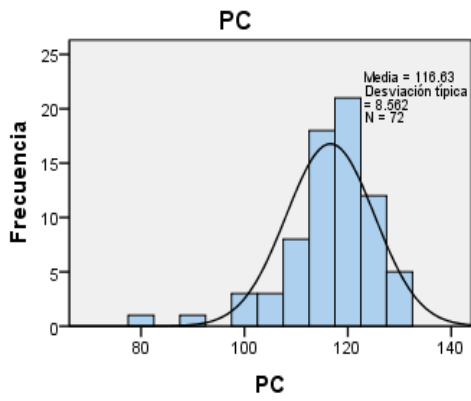


Gráfica 16. Distribución normal

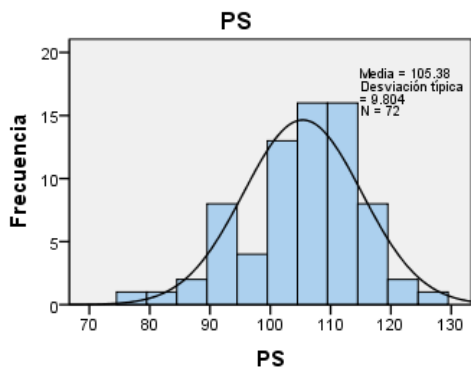




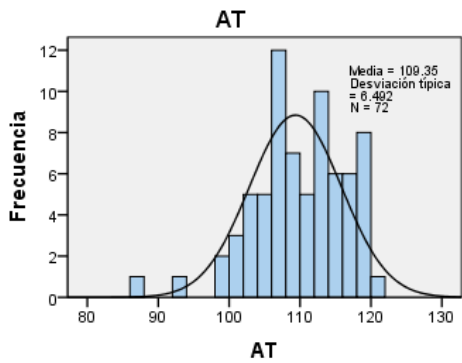
Gráfica 17. Distribución normal



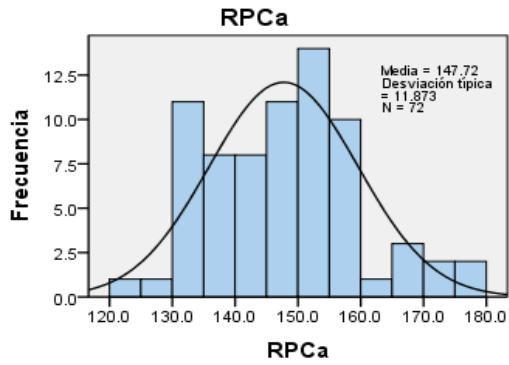
Gráfica 18. Distribución normal



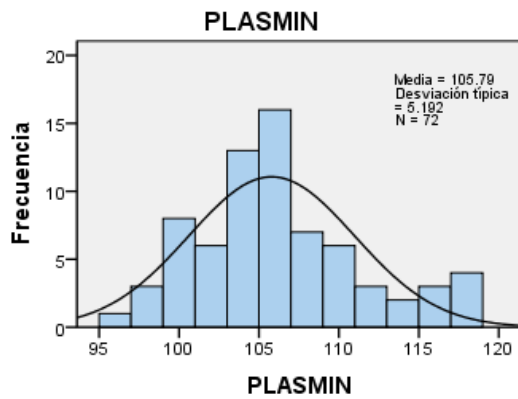
Gráfica 19. Distribución normal



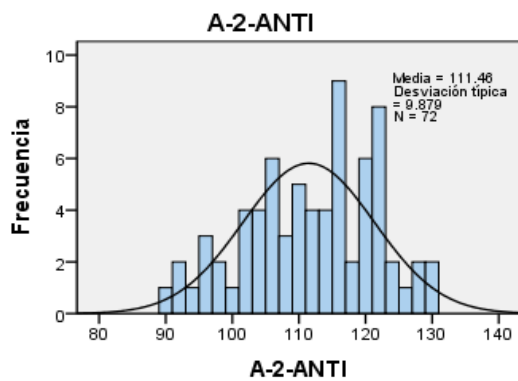
Gráfica 20. Distribución bimodal



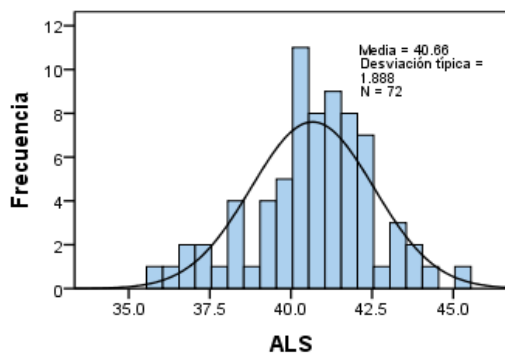
Gráfica 21. Distribución normal



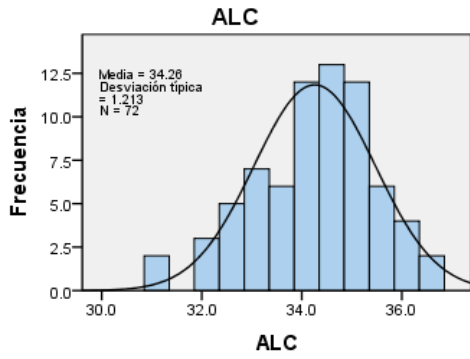
Gráfica 22. Distribución normal



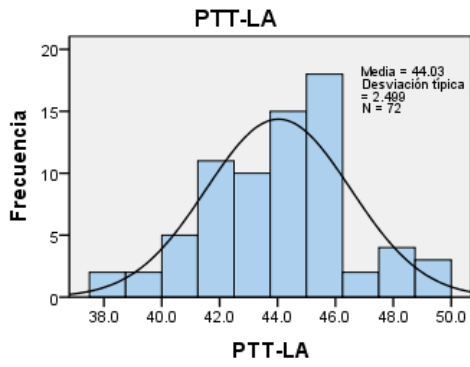
Gráfica 23. Distribución bimodal



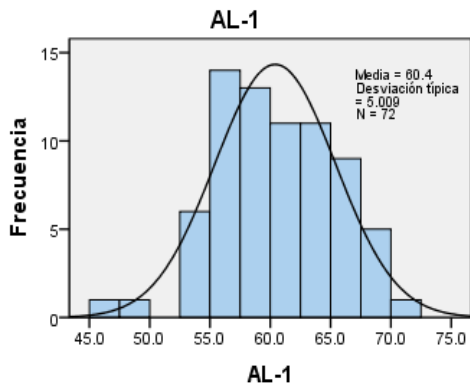
Gráfica 24. Distribución normal



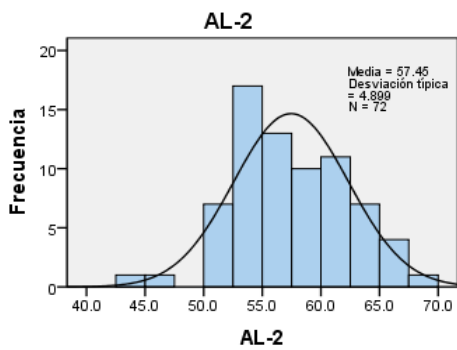
Gráfica 25. Distribución normal



Gráfica 26. Distribución normal



Gráfica 27. Distribución normal



Gráfica 28. Distribución normal