



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

## **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**DETERMINACIÓN DE LOS VALORES POBLACIONALES PARA LAS  
PRUEBAS ESPECIALES Y DE ESCRUTINIO EN EL LABORATORIO DE  
COAGULACIÓN UTILIZANDO UNA MEZCLA DE PLASMAS DE  
DONADORES SANOS ADULTOS QUE ACUDEN AL BANCO DE SANGRE  
DEL C.M.N. SIGLO XXI.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A N:**  
**EDGAR HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**  
**PAULINA MARTÍNEZ FUENTES**

**ASESOR:**  
**M. en C. MANUEL MORENO HERNÁNDEZ**

**COASESOR:**  
**M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.**

**2014**



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Determinación de los valores poblacionales para las pruebas especiales y de escrutinio en el laboratorio de coagulación utilizando una mezcla de plasma de donadores sanos adultos que acuden al Banco de Sangre del C.M.N. Siglo XXI**

Que presenta el pasante: Edgar Hernández González  
Con número de cuenta: 304091012 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>VOCAL</b>	QFB. René Damián Santos	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Ma. de Lourdes Galván Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación de los valores poblacionales para las pruebas especiales y de escrutinio en el laboratorio de coagulación utilizando una mezcla de plasma de donadores sanos adultos que acuden al Banco de Sangre del C.M.N. Siglo XXI

Que presenta la pasante: Paulina Martínez Fuentes  
Con número de cuenta: 408037183 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de octubre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>VOCAL</b>	QFB. René Damián Santos	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Ma. de Lourdes Galván Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

---

## AGRADECIMIENTOS DE EDGAR.

A mi madre **Ana María González Quintero** por darme todo el amor del mundo y a mi padre **Roberto Hernández Monroy**, gracias a ustedes he llegado a estas instancias de poder cumplir una más de mis metas, todo esto gracias a su apoyo incondicional, a su esfuerzo, sacrificio y paciencia conmigo, y gracias a sus consejos y enseñanzas he llegado a ser lo que soy y siempre estaré en deuda con ustedes. ¡Los amo mucho!

A mi hermano **Roberto Antonio Hernández González**, porque el crecer junto a ti me ha dejado muchas experiencias, momentos divertidos, historias, vivencias y a pesar de la distancia siempre me ayudaste y apoyaste en los momentos cuando más te necesitaba, muchas gracias.

A **Paulina**, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, ni mucho menos para describir lo que significas para mí, gracias por todo el apoyo que me has brindado todos estos años y este reto lo hemos superado a pesar de todos los obstáculos y sé que juntos seguiremos teniendo varios logros. Por nosotros, por todos los planes que tenemos; porque para hacer reales los sueños que hemos construido debemos primero cerrar estos ciclos, y sé que a tu lado lograremos todas las metas y retos que nos propongamos. **¡Te amo muchísimo mi princesa hermosa (-\_-)!**

A mi mamá **Natalia Monroy** que le estaré eternamente agradecido por todo su amor, cariño, dedicación, sacrificio, consejos, enseñanzas, estos me ayudaron a ser una persona de bien y sé que me está viendo desde el cielo donde me protege y me bendice. ¡Siempre te amare mamá!

Al tierno **Antonio González**, por el legado que me dejó, su cariño, su amor que siempre me brindo, sus consejos, muchas gracias abuelito y aunque ya no está conmigo sé que desde arriba me cuida y me protege.

---

A mis abuelitos **Julia Quintero** y **Roberto Hernández**, por el amor que siempre me dan y todo el cariño que me brindan, por el apoyo y los consejos y enseñanzas que me siguen dando ya que estos me han marcado para ser una persona de bien.

A mis **tíos** que son como mis padres ya que siempre han visto por mí, gracias por el amor y el cariño, pero sobre todo por su enorme apoyo en momentos difíciles, por su tolerancia ya que cuando los he hecho enojar, han sido pacientes conmigo y con sus consejos y valores que me inculcaron desde niño han influido en mi para convertirme en lo que hoy en día soy.

A mi asesor **M. en C. Manuel Moreno Hernández**, en primer lugar por habernos aceptado ya que es un honor haber sido alumnos del MEJOR experto en coagulación del país, gracias por habernos compartido un poco de todo tu amplio conocimiento y experiencias las cuales nos servirán para seguirnos desarrollando, sabes que te estaremos muy agradecidos por todo el apoyo, enseñanzas, consejos y tiempo que nos brindaste para la realización de este trabajo, y más que como un asesor te comportaste como un gran amigo. ¡Muchísimas Gracias!

A mi asesora **M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez**, a la cual le debo la vocación ya que desde la conocí en la asignatura de Microbiología me cambio el rumbo de mi vida y fue por usted que decidí tomar la orientación clínica, me siento privilegiado de haber sido su alumno, muchísimas gracias por todo el apoyo, el conocimiento que nos compartió, sus enseñanzas, sus consejos y estamos muy agradecidos por toda la dedicación que nos dio para el desarrollo de este trabajo. ¡Muchísimas Gracias!

A todo el personal del laboratorio del área de Coagulación del Centro Médico Nacional SXXI Hospital de Especialidades: **Tania** y **Verito** las cuales estamos muy agradecidos con ustedes porque nos apoyaron en todo momento, nos compartieron sus conocimientos y nos brindaron su amistad y confianza, gracias por ser tan buenas amigas.

---

Al **personal del área de Hematología del CMN SXXI**, los cuales nos brindaron su apoyo y nos dieron la oportunidad para poder desarrollar este trabajo, siempre se comportaron a la altura y cada uno de ellos nos brindo su amistad, muchas gracias por todo.

Al **M. en C. Jesús Hernández Juárez**, el cual nos ayudo muchísimo en este trabajo, gracias por todo el apoyo que nos brindaste, tu tiempo, consejos y enseñanzas tu colaboración fue de suma importancia.

A los miembros del honorable jurado por sus comentarios y observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo. Y por ultimo un enorme y eterno agradecimiento a la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** y en especial a la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**, por habernos brindado una gran preparación y que siempre será un orgullo haber pertenecido a la máxima casa de estudios de este país.



---

## **AGRADECIMIENTOS DE PAULINA.**

Quiero agradecer y dedicar esta tesis especialmente a mis padres que me han brindado su cariño y apoyo durante toda la vida, que me han dado las **herramientas para defenderme contra cualquier cosa. A ti mama por ser "la mamá más mala del mundo" y convertirme en la persona que soy, a ti papá por estar ahí y apoyarme cuando más lo necesito.**

A Edgar por estar siempre apoyándome durante todo el proceso de este trabajo sé que no fue fácil cielo pero lo logramos!! Estoy muy orgullosa de ti, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis hermanos que siempre han visto por mí, gracias por su cariño incondicional.

A mi peque que me aguanto tantos desvelos y que siempre está a mi lado cuidándome.

A Manuel, nos sentimos muy privilegiados de que nos hayas permitido estar bajo tu cargo, gracias por darnos la oportunidad de hacer esta tesis, por tu tiempo, tus conocimientos y por tus consejos.

A la profesora Ana Laura por su apoyo y consejos, por abrirnos tantas puertas y habernos dado la oportunidad de conocer a gente tan maravillosa. Fuimos muy afortunados de tenerla como profesora pero somos más afortunados de contar con usted como amiga.

A Tania y a Verito por aguantarnos y compartirnos sus conocimientos, pero sobre todo gracias por ser tan buenas amigas y ayudarnos tanto, las quiero mucho.

A Jesús por brindarnos su tiempo, apoyo y sobre todo sus conocimientos, gracias por todo.

---

A el área de Hematología del CMN siglo XXI por habernos permitido realizar este trabajo sabemos que sin su apoyo y su ayuda esto no hubiera sido posible, mil gracias.

A la UNAM ha ella debemos nuestra formación, estaremos siempre orgullosos de formar parte de ella nuestra alma mater.

Y como diría mi papá "*Que prosigue.....* "

---

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Coagulación en la UMAE Hospital de Especialidades y en la UMAE Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI bajo la asesoría del M. en C. Manuel Moreno Hernández.



---

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
<b>i</b> ABREVIATURAS	<b>x</b>
<b>ii</b> ÍNDICE DE FIGURAS	<b>xii</b>
<b>iii</b> ÍNDICE DE TABLAS	<b>xii</b>
<b>iv</b> RESUMEN	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Hemostasia primaria	<b>1</b>
1.2 Hemostasia secundaria	<b>2</b>
1.3 Sistemas anticoagulantes naturales	<b>9</b>
1.4 Fibrinólisis	<b>14</b>
1.5 Anticoagulante lúpico	<b>16</b>
1.6 Valores de referencia	<b>17</b>
1.7 Determinación de los límites de referencia	<b>18</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVO</b>	<b>22</b>
5.1 Objetivo general	<b>22</b>
5.2 Objetivos particulares	<b>22</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
6.1 Muestra Biológica	<b>23</b>
6.1.1 Universo de trabajo	<b>23</b>
6.1.2 Tipo de estudio	<b>23</b>
6.1.3 Grupos de estudio	<b>23</b>
6.1.4 Criterios de inclusión	<b>23</b>
6.1.5 Criterios de exclusión	<b>23</b>
6.2 Métodos	<b>24</b>
6.2.1 Recolección de las muestras	<b>24</b>
6.2.2 Metodología analítica de las pruebas de coagulación	<b>24</b>
6.2.3 Pruebas de coagulación en el laboratorio	<b>26</b>
6.2.3.1 Pruebas de escrutinio en el laboratorio de coagulación	<b>27</b>
6.2.3.2 Pruebas especiales en el laboratorio de coagulación	<b>32</b>
<b>7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>35</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>36</b>
8.1 TP, TTPa, TT y Fib	<b>36</b>
8.2 DD	<b>37</b>
8.3 Actividad de los factores de la fase fluida de la hemostasia	<b>37</b>
8.4 Anticoagulantes naturales	<b>39</b>
8.5 Proteínas fibrinolíticas	<b>40</b>
8.6 Anticoagulante lúpico	<b>40</b>
8.7 Comparación de los equipos de diferentes casas comerciales	<b>41</b>
8.8 Gráficos de las pruebas del coagulograma básico	<b>42</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>54</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>59</b>

---

## **i. ABREVIATURAS.**

<b><math>\alpha_2</math>-AP</b>	<b><math>\alpha_2</math>-antiplasmina</b>
<b>A<math>\alpha</math>, B<math>\beta</math> y <math>\Upsilon</math></b>	<b>Fibrinopéptidos (<math>\alpha</math>, <math>\beta</math> y <math>\Upsilon</math>)</b>
<b>aa</b>	<b>Aminoácidos</b>
<b>AL</b>	<b>Anticoagulante lúpico</b>
<b>AT</b>	<b>Antitrombina</b>
<b>BCS</b>	<b>Banco central de sangre</b>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Iones calcio</b>
<b>CAPM</b>	<b>Cinínogeno de alto peso molecular</b>
<b>CID</b>	<b>Coagulación intravascular diseminada</b>
<b>CMN</b>	<b>Centro médico nacional</b>
<b>CV</b>	<b>Coeficiente de variación</b>
<b>DD</b>	<b>Dímero D</b>
<b>DE</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>FI</b>	<b>Factor I inactivo</b>
<b>FII</b>	<b>Factor II inactivo</b>
<b>FIIa</b>	<b>Factor II activo</b>
<b>FV</b>	<b>Factor V inactivo</b>
<b>FVa</b>	<b>Factor V activo</b>
<b>FVII</b>	<b>Factor VII inactivo</b>
<b>FVIIa</b>	<b>Factor VII activo</b>
<b>FVIII</b>	<b>Factor VIII inactivo</b>
<b>FVIIIa</b>	<b>Factor VIII activo</b>
<b>FvW</b>	<b>Factor de von Willebrand</b>
<b>FIX</b>	<b>Factor IX inactivo</b>
<b>FIXa</b>	<b>Factor IX activo</b>
<b>FX</b>	<b>Factor X inactivo</b>
<b>FXa</b>	<b>Factor X activo</b>
<b>FXI</b>	<b>Factor XI inactivo</b>
<b>FXIa</b>	<b>Factor XI activo</b>
<b>FXII</b>	<b>Factor XII inactivo</b>
<b>FXIIa</b>	<b>Factor XII activo</b>
<b>FXIII</b>	<b>Factor XIII inactivo</b>
<b>FXIIIa</b>	<b>Factor XIII activo</b>
<b>Fib</b>	<b>Fibrinógeno</b>
<b>FT</b>	<b>Factor tisular</b>
<b>Gp</b>	<b>Glucoproteína</b>
<b>Gp Ia</b>	<b>Glucoproteína Ia</b>
<b>Gp Ib/IX/V</b>	<b>Glucoproteína Ib/IX/V</b>
<b>Gp IIb/IIIa</b>	<b>Glucoproteína IIb/IIIa</b>
<b>Gp VI</b>	<b>Glucoproteína VI</b>
<b>Gránulos <math>\alpha</math></b>	<b>Gránulos alfa</b>

---

<b>IFCC</b>	<b>Federación Internacional de Química Clínica</b>
<b>IVFT</b>	<b>Inhibidor de la vía del factor tisular</b>
<b>Lac C</b>	<b>Prueba confirmatoria de AL</b>
<b>Lac S</b>	<b>Prueba de escrutinio de AL</b>
<b>LES</b>	<b>Lupus eritematoso sistémico</b>
<b>NA</b>	<b>No aplica</b>
<b>ND</b>	<b>No detectado</b>
<b>p-NA</b>	<b>p-nitroanilina</b>
<b>PAI-1</b>	<b>Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1</b>
<b>PC</b>	<b>Proteína C</b>
<b>PCa</b>	<b>Proteína C activa</b>
<b>PDF</b>	<b>Productos de degradación de la fibrina/fibrinógeno</b>
<b>PG</b>	<b>Proteoglicanos</b>
<b>PK</b>	<b>Precalicleína</b>
<b>Plg</b>	<b>Plasminógeno</b>
<b>PPP</b>	<b>Plasma pobre en plaquetas</b>
<b>PS</b>	<b>Proteína S</b>
<b>RALUP</b>	<b>Razón final del anticoagulante tipo lúpico</b>
<b>REPC</b>	<b>Receptor endotelial de la proteína C</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>SXXI</b>	<b>Siglo XXI</b>
<b>t-PA</b>	<b>Activador tisular del plasminógeno</b>
<b>TAFI</b>	<b>Inhibidor fibrinolítico activado por trombina</b>
<b>TEP</b>	<b>Tromboembolismo pulmonar</b>
<b>TEV</b>	<b>Tromboembolismo venoso</b>
<b>TM</b>	<b>Trombomodulina</b>
<b>TP</b>	<b>Tiempo de protrombina</b>
<b>TTPa</b>	<b>Tiempo de tromboplastina parcial activado</b>
<b>TT</b>	<b>Tiempo de trombina</b>
<b>VR</b>	<b>Valor de referencia</b>
<b>VR<sub>CC</sub></b>	<b>Valor de referencia de la casa comercial</b>
$\bar{x}$	<b>Media</b>

---

## ii. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Descripción	Pág.
<b>1</b>	Adhesión y agregación plaquetaria	2
<b>2</b>	Cascada de la coagulación	3
<b>3</b>	Modelo celular de la coagulación	9
<b>4</b>	Sistema de la Antitrombina / Heparinoides	11
<b>5</b>	Sistema de la Trombomodulina / Proteína C / Proteína S	13
<b>6</b>	Distribución normal de frecuencias en la que aparecen la media ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar (DE) y la distribución de los valores alrededor de la media $\pm 1$ DE, $\pm 2$ DE y $\pm 3$ DE	20
<b>7</b>	Cascada de la coagulación en donde se muestra que factores son evaluados en cada prueba	31

## iii. ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Descripción	Pág.
<b>1</b>	VR de las pruebas de TP, TTPa, TT y Fib del plasma testigo	37
<b>2</b>	VR de la prueba de Dímero D del plasma testigo	37
<b>3</b>	VR de los factores hemostáticos del plasma testigo	38
<b>4</b>	VR de los anticoagulantes naturales del plasma testigo	39
<b>5</b>	VR de las proteínas fibrinolíticas del plasma testigo	40
<b>6</b>	VR de las pruebas de AL del plasma testigo	40
<b>7</b>	Resultado de la comparación de dos equipos de diferentes casas comerciales del plasma testigo en las pruebas de TP (Basal, dilución 1:2 y dilución 1:4) y TTPa (Basal y dilución 1:2 y dilución 1:4)	41
<b>8</b>	Resultado de la comparación de dos equipos de diferentes casas comerciales del plasma testigo en la cuantificación plasmática de fibrinógeno	42

---

#### iv. RESUMEN.

**ANTECEDENTES.** En la población mexicana los problemas relacionados con hemostasia son una preocupación a la salud, sobre todo considerando los casos asociados con trombosis que cobran la vida de miles de personas anualmente. En México no contamos con valores de referencia (VR) de las proteínas que están relacionadas con trombosis y hemofilia lo que repercute en una mala calidad del diagnóstico de laboratorio y en tratamientos inadecuados para los pacientes.

**MÉTODOS.** Se procesaron 100 muestras obtenidas de una mezcla de donadores sanos (plasma testigo) en población adulta mexicana. Las pruebas de coagulación utilizadas en el estudio de trombofilia y hemofilia se realizaron en los sistemas de coagulación Sta-R Evolution (Stago<sup>®</sup>, Francia), en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI) y en el equipo ACL Elite Pro (IL<sup>®</sup>, España), en el Hospital de Cardiología del CMN SXXI. Se utilizaron métodos de estadística descriptiva e inferencial para establecer los VR.

**RESULTADOS.** Los VR de las proteínas utilizadas en el estudio de trombosis y hemofilia para el equipo Sta-R Evolution (Stago<sup>®</sup>) son: TP<sub>Basal</sub> (12.1-13.0 seg), TP<sub>1:2</sub> (17-18.8 seg), TP<sub>1:4</sub> (27.7-31.9 seg), TTPa<sub>Basal</sub> (28.4-30.8 seg), TTPa<sub>1:2</sub> (38.0-43.6 seg), TTPa<sub>1:4</sub> (70.7-84.8 seg), TT<sub>Basal</sub> (16.7-18.1 seg), TT<sub>1:2</sub> (15.4-17.8 seg), TT<sub>1:4</sub> (17.3-19.9 seg), Fib (299-376 mg/dL), DD (0.2-0.4 µg/mL), FII (92-110%), FV (79-109%), FVII (86-128%), FVIII (92-144%), FIX (107-139%), FX (94-117%), FXI (99-135%), FXII (84-123%), FvW (72-110%), PC (109-140%), PS (92-130%), AT (85-111%), α<sub>2</sub>-antiplasmina (91-121%), Plg (88-115%), Prueba de escrutinio de AL (Lac S) (34.2-40 seg), Prueba confirmatoria de AL (Lac C) (31.9-35.0 seg) y Razón final del AL (RALUP) (1.0-1.1). Los VR de referencia obtenidos se compararon con los valores reportados por la casa comercial Stago<sup>®</sup>, además se realizó la comparación de TP, TTPa y Fibrinógeno entre dos equipos de distinta casa comercial (Stago<sup>®</sup> e IL<sup>®</sup>).

**CONCLUSIONES:** Se establecieron VR de las proteínas involucradas en el estudio de trombofilia y hemofilia para la población que acude al Hospital de Especialidades del CMN SXXI. Los VR que nos proporciona la casa comercial (Stago<sup>®</sup>) discrepan a los encontrados en la población que acude al Banco Central de Sangre (BCS) del CMN SXXI, se demostró que existe diferencia en los resultados de las pruebas de TP, TTPa y Fibrinógeno entre los equipos Stago<sup>®</sup> e IL<sup>®</sup> y que esta se puede deber a los reactivos y métodos de detección empleados.

---

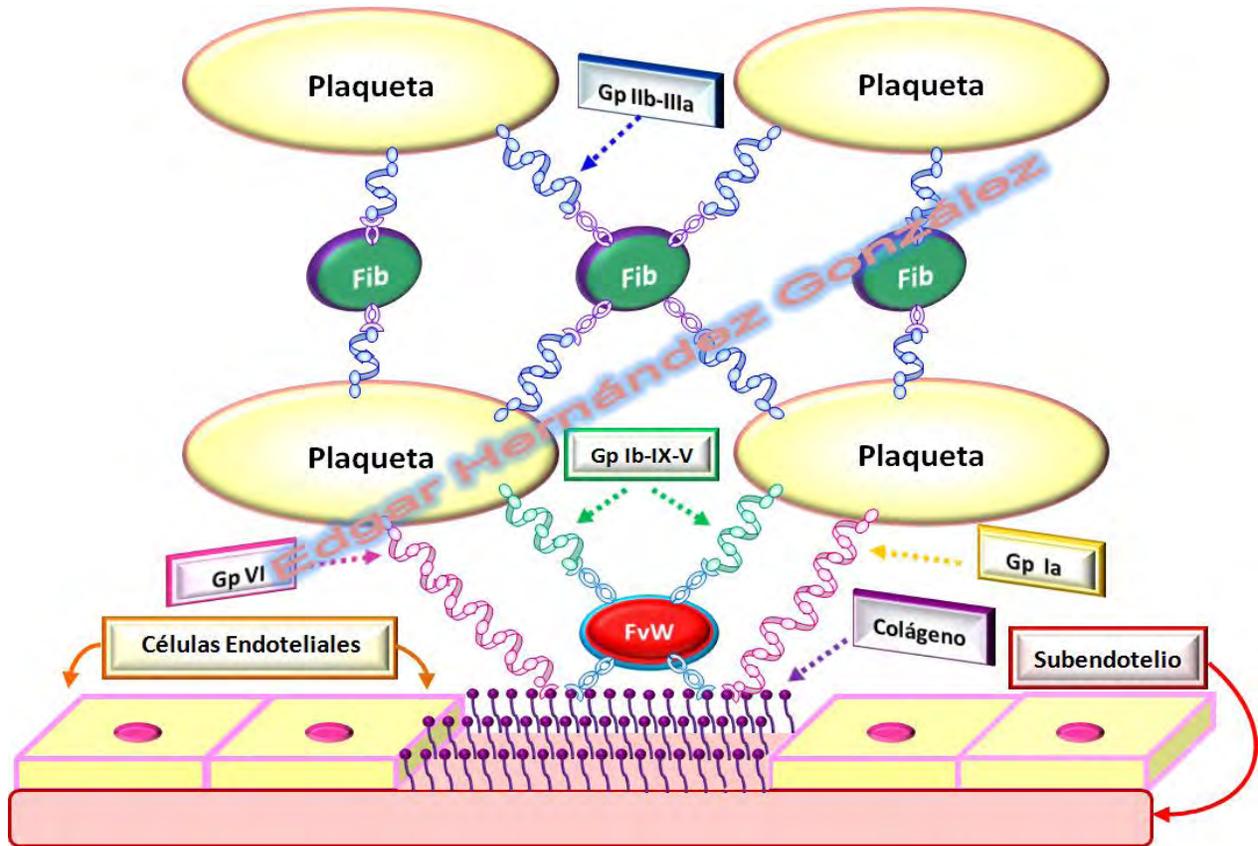
## 1. INTRODUCCIÓN.

**Hemostasia.** Término que procede de las palabras griegas *haima* que significa sangre y *stasis* que significa detener. (Mckenzie, 2000) Es un sistema biológico donde intervienen elementos celulares y plasmáticos para obturar lesiones y mantener la sangre líquida dentro de los vasos. (Martínez y Quintana, 2008).

Se divide en sistemas biológicos que funcionan en paralelo para lograr la obturación de las lesiones: la hemostasia primaria donde se lleva a cabo la interacción de las plaquetas con el vaso sanguíneo, la hemostasia secundaria donde fundamentalmente participan los factores de la coagulación y elementos celulares; (Martínez, 2003) y la fibrinólisis la cual se va a encargar de que una vez que se detuvo el sangrado el coágulo formado se degrade evitando la formación de trombos.

**1.1 Hemostasia primaria.** Constituye un sistema fisiológico que detiene la salida de la sangre, al sellar provisionalmente el sitio del daño vascular esto a través de la interacción entre las plaquetas y el vaso sanguíneo. (Martínez y Quintana, 2008)

Las células endoteliales que conforman el vaso sanguíneo y las plaquetas se van a encargar de reaccionar ante una lesión formando rápidamente un tapón plaquetario también conocido como tapón hemostático primario, esto va a ocurrir mediante los procesos de adhesión y agregación plaquetaria, deteniendo así la hemorragia. Sin embargo este tapón solo es temporal ya que es frágil y fácilmente se desprende de la pared vascular. (Martínez, 2003; Rao, 2004).



**Figura N° 1. Adhesión y Agregación plaquetaria.**

(En la adhesión la plaqueta es atraída hacia el colágeno mediante diferencia de cargas, la plaqueta se une al FvW que secretan las células endoteliales a través del complejo proteínico Gp Ib-IX-V, sin embargo, la plaqueta también se une al colágeno a través de las Gp Ia y Gp VI, en la agregación plaquetaria, la Gp IIb-IIIa se une al fibrinógeno que sirve como unión entre otra molécula de Gp IIb-IIIa de otra plaqueta activa).

**1.2 Hemostasia secundaria.** Representa el cese fisiológico de la hemorragia por medio de un mecanismo complejo que involucra un cambio de estado físico, de líquido a sólido con la formación de fibrina, y el enlace del coágulo en una malla insoluble. Las propiedades de la coagulación sanguínea requieren que los componentes que la conforman, reaccionen de una manera localizada, amplificada y modulada. En la actualidad se conoce la importancia que tienen las superficies celulares (plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y monocitos) en la interacción y acoplamiento molecular que da lugar a la coagulación sanguínea. Las células tienen dos papeles básicos en la hemostasia normal, proporcionar los factores de la coagulación que no están presentes en el plasma normal, y proporcionar una superficie para el ensamblaje de los complejos enzima/cofactor y su interacción con los sustratos para formar un coágulo de fibrina. (Quintana y Martínez, 2008).

## ■ Modelo de la Cascada de la Coagulación.

En 1964, dos grupos por separado Ratnoff y MacFarlane proponen un modelo de coagulación que contemplaba una "cascada" enzimática compuesta por una serie de etapas secuenciales, en las que la activación de un factor de coagulación activa al siguiente, para favorecer la generación de la trombina, que convierte una proteína soluble del plasma, el fibrinógeno (Fib), en una proteína insoluble, la fibrina, componente estructural del coágulo. (Páramo y cols., 2009) Según el modelo clásico, existirían dos vías de activación, intrínseca y extrínseca, iniciadas por el factor XII (FXII) y el complejo factor tisular (FT)/factor VII (FVII) respectivamente, que convergen en una vía común a nivel del factor X activo (FXa). (Páramo y cols., 2009).

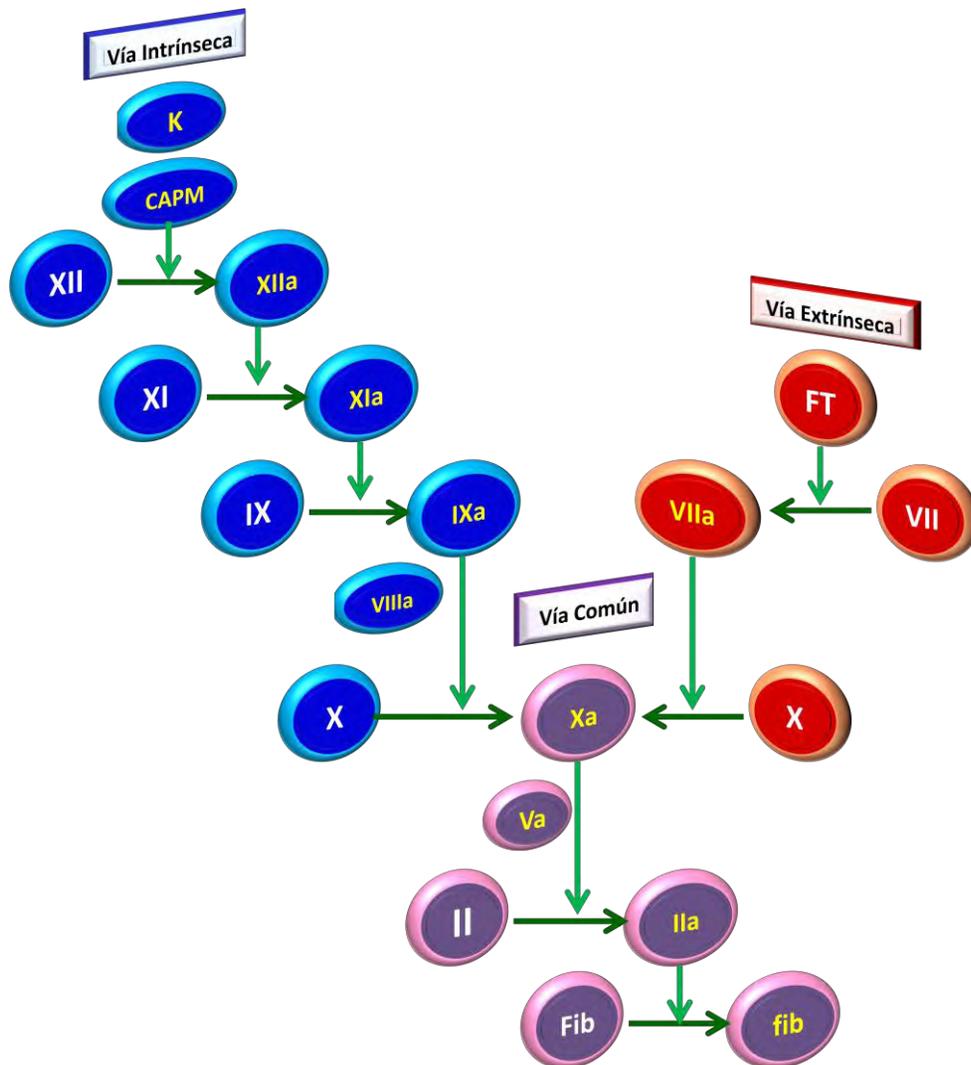


Figura N° 2. Cascada de la coagulación.

---

Sin embargo, la cascada de la coagulación no explica la hemostasia *in vivo*, esto se debe a las observaciones clínicas en los pacientes con deficiencia del FXII, el cininógeno de alto peso molecular (CAPM) y la precalicreina (PK) los cuales no causan hemorragia. A diferencia de estos factores de contacto la disminución del factor VIII (FVIII) y IX (FIX) que causan hemofilia A y B, respectivamente, se asocian con fenómenos hemorrágicos, al igual que estos factores las deficiencias de los factores X, V y VII (FX, FV y FVII) también producen hemorragias. En relación a la deficiencia del factor XI (FXI) es menos predecible para producir sangrados y conduce a un cuadro clínico menos severo que las deficiencias de los FVIII y FIX. Otro de los problemas que tiene la cascada de coagulación para explicar la hemostasia *in vivo* es que en el laboratorio un solo factor de coagulación no activa a su sustrato de manera importante. (Martínez y Quintana, 2008).

Aunque este modelo no puede explicar como ocurre la hemostasia *in vivo* es aceptado en el laboratorio para explicar las pruebas empleadas para monitorear la hemostasia, (Páramo y cols., 2009) como el tiempo de protrombina (TP) para la vía extrínseca, tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) para la vía intrínseca y el tiempo de trombina (TT) para la conversión de fibrinógeno (Fib) en fibrina. (Carrillo y cols., 2004).

#### ■ **Modelo Celular de la Coagulación.**

En 2001, Maureane Hoffman y Dougald Mac Monroe, proponen un modelo en el cual la coagulación está regulada por las propiedades de las superficies celulares. Este modelo se demostró *in vitro*, fue realizado por Harold Roberts y col; donde se utilizó a los monocitos como fuente de FT y plaquetas no activadas como superficie para la generación de trombina. (Martínez y Quintana, 2008) El modelo celular, a diferencia de los otros modelos establece que la coagulación es regulada por la interacción del complejo FT/FVIIa y las propiedades de la superficie celular y no por dos vías distintas. En éste, se enfatiza el papel que tienen los receptores específicos para factores de coagulación, sobre todo en la plaqueta y en la célula endotelial. (Carrillo y cols., 2004).

---

De acuerdo a esta teoría la coagulación es un proceso que ocurre en tres etapas interrelacionadas que se sobreponen una a otra y que son: (Carrillo y cols., 2004).

- ✦ **La fase de iniciación**, tiene lugar a nivel de células productoras de FT, el cual es el principal iniciador de la coagulación *in vivo*, en condiciones fisiológicas se localiza en la membrana de las células endoteliales y no está expuesto al flujo sanguíneo, tras la lesión endotelial de diversa etiología (Carrillo y cols., 2004) se produce el contacto de la sangre circulante con el subendotelio, lo que favorece la unión del FT con el FVII circulante y su posterior activación. El complejo FT/FVIIa activa a FIX y FX. (Páramo y cols., 2009) El FXa se combina en la superficie celular con el FVa para producir pequeñas cantidades de trombina. La trombina generada a su vez iniciará la fase de amplificación.
  
- ✦ **La fase de amplificación**, se lleva a cabo en la superficie de las plaquetas. El daño vascular favorece el contacto de las plaquetas y componentes plasmáticos con tejidos extravasculares. (Páramo y cols., 2009) Las plaquetas se adhieren a la matriz subendotelial, siendo activadas en lugares donde se ha expuesto FT. Las pequeñas cantidades de trombina generadas amplifican la señal procoagulante inicial activando a FV, FVIII (separación del FvW) y FXI, que se ensamblan en la superficie plaquetar para promover posteriores reacciones enzimáticas en la siguiente fase. (Páramo y cols., 2009).
  
- ✦ **La fase de propagación**, los factores activados junto con sus cofactores a nivel de la superficie de las plaquetas activadas amplifican de manera exponencial la generación de trombina, (Carrillo y cols., 2004) el FIXa formado en la fase de iniciación por las células que expresan FT, no permanece en la vecindad de esta célula, dirigiéndose a la superficie de las plaquetas activadas, donde se une a su cofactor, el FVIIIa formando el complejo Xasa o tenasa (FVIIIa, FIXa, Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos) el cual activara una mayor cantidad de FX. De manera inmediata, el FXa se une a su cofactor, el FVa; formando el complejo protrombinasa (FXa, FVa, Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos),

---

donde generan grandes cantidades de trombina. Por otro lado, la producción de FXIa a través de las pequeñas cantidades de trombina, convertirán mas FIX en FIXa, lo que contribuye a una mayor producción de trombina, (Martínez y Quintana, 2008) **a este fenómeno se le conoce como "explosión de trombina"**, necesaria para la formación de un coágulo estable de fibrina. La trombina generada convierte el fibrinógeno en fibrina, y activa al factor XIII (FXIIIa) el cual estabiliza la malla de fibrina, y a un inhibidor fibrinolítico (TAFI) necesarios para la formación de un coágulo de fibrina más duradero, estable y resistente a la lisis, de lo contrario el coágulo es poroso, frágil y se lisa fácilmente por acción enzimática. (Páramo y cols., 2009).

### **Factores Hemostáticos**

**FII.** Denominado también protrombina, es una glucoproteína (Gp) dependiente de la vitamina K, que se sintetiza en el hígado, compuesto de dos partes, la parte C-terminal responsable de la formación de trombina y la parte N-terminal contiene 10 residuos **Y**-carboxi-glutámicos necesarios para la fijación de la molécula de protrombina a los fosfolípidos. La protrombina es activada por el complejo protrombinasa.

**FV.** Conocido también como proacelerina, es una Gp de una sola cadena, el hígado es su principal fuente de producción (Samama y cols., 1990), también puede sintetizarse en los megacariocitos. Es activado por la trombina (FIIa) para convertirse en FVa, el cual es el cofactor del FXa, en conjunto con  $Ca^{2+}$  y fosfolípidos forman al complejo enzimático protrombinasa para convertir la protrombina a trombina hasta 300, 000 veces más. (Mann y cols., 1984; Brummel y cols., 2002) Otra de las funciones del FVa es participar como cofactor del complejo proteína C y proteína S; (PC-PS) en la inhibición del FVIIIa, por lo tanto el FVa participa activamente en la regulación antitrombótica de la hemostasia.

---

**FVII.** También conocido como proconvertina, es una Gp dependiente de la vitamina K, se sintetiza en el hígado. Se caracteriza por formar un complejo con el FT para activar a FX y FIX. No expresa su actividad al menos que este unida al FT. En el plasma aproximadamente 99% del FVII circula de manera inactiva y el 1% circula como FVIIa. (Osterud, 2001) Existe FVIIa en concentraciones biológicas sin función para activar a FIX y FX antes de unirse al FT. (Mann y cols., 2003).

**FVIII.** También conocido como factor antihemofílico A, es una Gp que se sintetiza en el hígado, la célula endotelial y el pulmón, también se puede encontrar en bazo y los linfocitos. El FVIII circula en el plasma con el factor de von Willebrand (FvW) para evitar que el FVIII el cual es lábil se desnaturalice, por lo tanto el FvW es la molécula que protege al FVIII de la destrucción de algunas enzimas presentes en el plasma y es el factor que le da estabilidad al FVIII. (Blostein y cols., 2003) La deficiencia congénita del FVIII se manifiesta como hemofilia A, cuya gravedad depende de la cantidad de FVIII presente. En ciertas condiciones el FVIII puede ascender drásticamente ocasionando complicaciones tromboembólicas.

**FIX.** También conocido como factor antihemofílico B, es una Gp que se sintetiza en el hígado y es dependiente de la vitamina K. El FIX es activado inicialmente por el complejo FT/FVIIa y posteriormente también es activado por el FXIa. La función principal del FIX es activar al FX, por medio del complejo enzimático Xasa o tenasa. (London y Walsh, 2000) La deficiencia congénita del FIX se manifiesta como hemofilia B cuya gravedad depende de la cantidad de factor IX presente. La deficiencia adquirida de este factor se produce durante el tratamiento con anticoagulantes orales, en hepatopatías, en caso de absorción trastornada de la vitamina K, por ejemplo en la enfermedad hemorrágica del recién nacido, en ictericia o tratamiento con antibióticos.

---

**FX.** También conocido como factor de Stuart-Prower, es una Gp que se sintetiza en el hígado y es dependiente de la vitamina K. El FX puede ser activado por dos complejos; el complejo FT/FVIIa y por el Xasa. El FXa puede también jugar un papel fisiológico en la activación del FVII, FVIII y FV. (Rao y Rapaport, 1988; Neuenschwander y Jesty, 1992; Monkovic y Tracy, 1990) Sus principales inhibidores son la antitrombina (AT) y el inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT).

**FXI.** También conocido como factor antihemofílico C, se sintetiza en el hígado y está presente en el plasma y en las plaquetas. El FXI puede ser activado por el FXIIa, la trombina y por el mismo factor XIa. La función principal del FXI es activar al FIX, la deficiencia de FXI también se conoce como hemofilia C difiere de la hemofilia A y B por el hecho de que no hay hemorragias en articulaciones y músculos. La deficiencia de FXI se caracteriza por un síndrome hemorrágico menos severo en comparación con las otras hemofilias y aparece después de una extracción dental o una intervención quirúrgica. (Bonno y Joost, 1999) La deficiencia de FXI es el más frecuente de los trastornos hemorrágicos poco comunes y el segundo trastorno hemorrágico que más comúnmente afecta a las mujeres (después de la enfermedad de von Willebrand).

**FXII.** También conocido como factor de Hageman, es un polipéptido monocatenario que es convertido a una forma activa por la ruptura de una sola unión polipeptídica, formándose dos moléculas, una de cadena pesada que contiene el sitio para unirse a la superficie cargada negativamente, participando así en el sistema intrínseco de la coagulación. (Revak y cols., 1978) Su disminución no va acompañada de síndromes hemorrágicos, sino por el contrario la deficiencia predispone el riesgo de presentar trombosis.

**FvW.** Se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos, una vez liberado por las células endoteliales al torrente sanguíneo, el FvW puede ser parcialmente digerido por la plasmina e incorporado por endocitosis a los gránulos  $\alpha$  (gránulos alfa) de las plaquetas. El FvW interviene en la hemostasia primaria y en el proceso de coagulación. Este factor juega un papel importante



---

Son tres los sistemas principales que participan en la regulación de la fase plasmática de la coagulación: el sistema de la antitrombina/heparinoides (AT/Heparinoides), el inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) y el de la trombomodulina, proteína C y proteína S (TM, PC y PS). Estos sistemas actúan en concierto para lograr evitar la actividad procoagulante plasmática y evitar así la propagación de trombos fuera del sitio donde son necesarios.

### ■ Sistema de la AT / Heparinoides.

La AT es una Gp que se sintetiza en el hígado, en las células endoteliales y posiblemente en los megacariocitos. Es el inhibidor más importante de la coagulación ya que no solo inhibe a la trombina (FIIa), también inhibe predominantemente al FXa y en menor medida a los factores IXa, XIa, XIIa, así como también la calicreina (K), al CAPM y la plasmina. Su deficiencia puede ser cualitativa o cuantitativa, originando un estado de hipercoagulabilidad y por lo tanto de trombosis. (Neubauer y cols., 1986; Menache y cols., 1992).

En ausencia de la heparina, la trombina y el FXa son inhibidos por la AT con una vida media de alrededor de 0.5-1.5 minutos, mientras que el FIXa es inhibido 10 veces más lentamente. Estas tasas de inhibición son demasiado lentas para afectar a la coagulación *in vitro*. El heparán sulfato vascular (heparinoide) se une a través de un pentasacárido de su molécula, a un residuo lisina de la AT y ocasiona un cambio en la conformación de la misma con lo que se aumenta la tasa de inhibición de la trombina, el FXa y otras proteasas aproximadamente 1000 veces con lo que dicha inhibición ocurre casi en forma instantánea. El endotelio vascular, es rico en proteoglicanos (PG) semejantes a la heparina como, por ejemplo, el heparán sulfato, sin embargo estos PG se encuentran predominantemente (> 90%) en la matriz extravascular y solamente en proporciones pequeñas (1-10%) fijados al sitio luminal del endotelio, (de Agostini y cols., 1990) estos últimos pueden tener un efecto anticoagulante basal al fijar moléculas de AT; sin embargo, cuando existe daño vascular, se produce liberación de los PG de la matriz extracelular con lo que la concentración de PG puede aumentarse significativamente y así evitar la extensión de la trombosis.

Estas sustancias heparinoides tienen efecto catalítico y se disocian una vez que se logra el complejo AT-proteasa-heparinoide para luego unirse a otras moléculas de AT lo que amplifica su capacidad antitrombótica.

La trombina y el FXa libres circulantes son rápidamente inhibidos por la AT-heparina, sin embargo, después de que el FXa es integrado en los complejos protrombinasa sobre la superficie plaquetaria y endotelial, o cuando la trombina se fija a la malla de fibrina, se tornan resistentes a la inhibición por la AT-heparina. Las observaciones de que la AT inhibe al FXa y a la trombina libres de forma más eficiente que cuando están fijados a los complejos de activación o a la fibrina, sugiere que una función fisiológica importante de la AT puede ser la de **"barredor o limpiador"**, y de esta forma, neutralizar las moléculas de trombina y de FXa que se han diseminado fuera de los complejos de activación y de los coágulos. La AT jugaría un papel relevante en los eventos procoagulantes localizándolos y previniendo la formación y el depósito de fibrina donde es innecesario. La deficiencia de la AT, sea congénita o adquirida, se asocia con una mayor tendencia para desarrollar trombosis (trombofilia) particularmente en el territorio venoso. (de Agostini y cols., 1990).

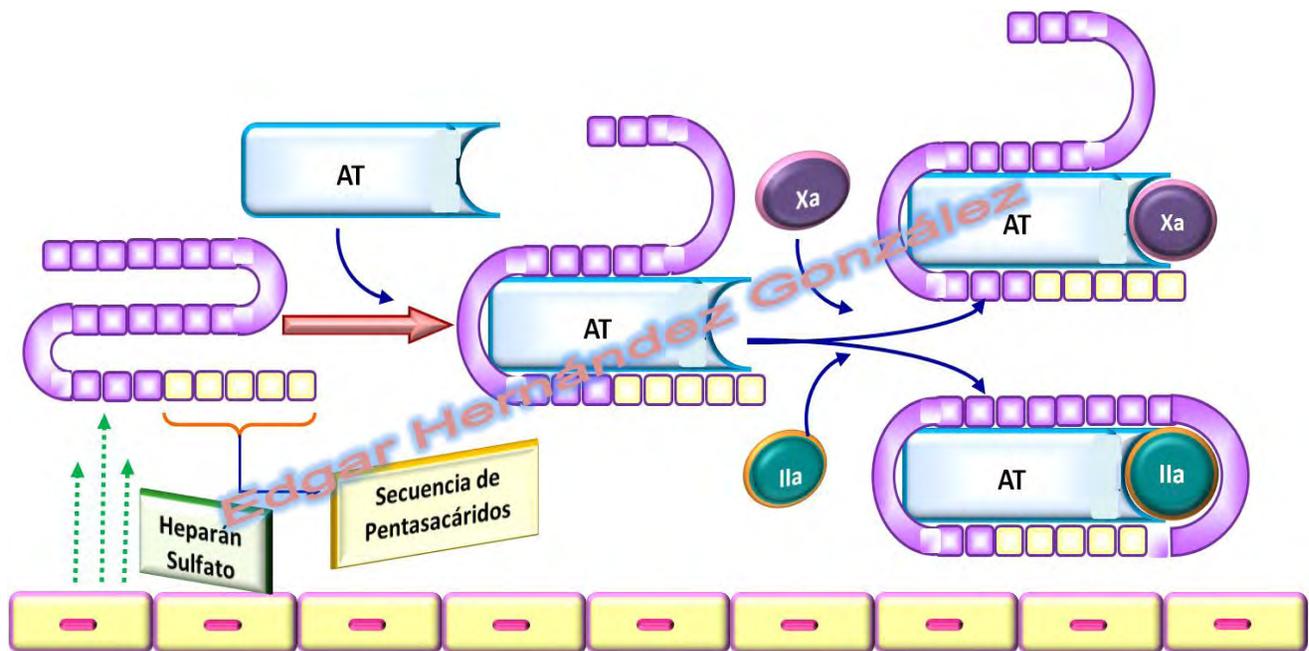


Figura N° 4. Sistema de la AT / Heparinoides

---

### ■ Sistema de la TM, PC y PS.

Este sistema está compuesto por tres elementos principales que son: la TM, que es una proteína transmembranal endotelial, la PC y PS, que son sintetizadas en el hígado por un mecanismo dependiente de vitamina K. (Meillón y Nacho, 2008).

**Proteína S.** Es una proteína dependiente de la vitamina K, que se sintetiza en el hígado, circula en dos formas: 60% se encuentra unida a la proteína de unión del componente C<sub>4b</sub> del complemento y es inactiva, mientras que el otro 40% está libre y esta funciona como cofactor de la PC para hacer más eficiente la inactivación del FVa y FVIIIa.

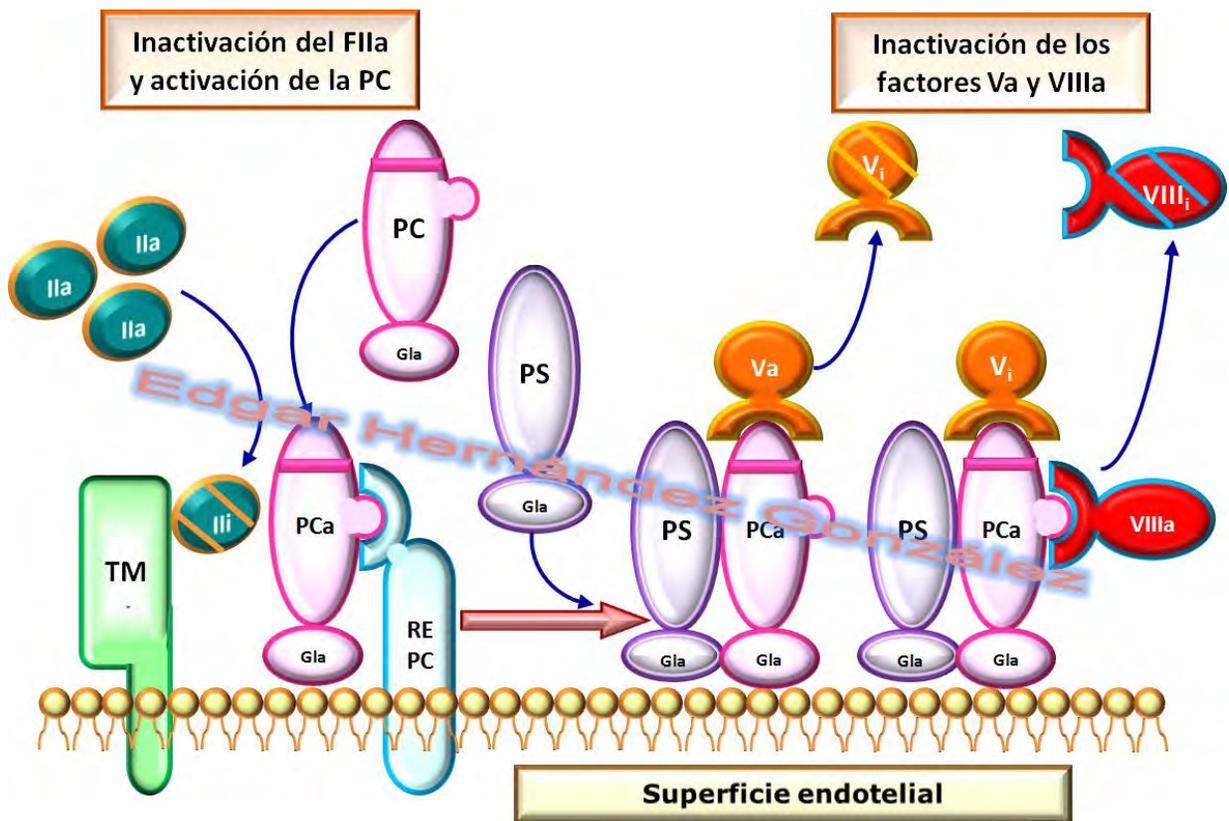
**Proteína C.** Es una proteína dependiente de la vitamina K que se sintetiza en el hígado, fisiológicamente desempeña una función anticoagulante. Al igual que los factores de la coagulación, la PC se encuentra en forma inactiva. Su activación depende de la trombina, Ca<sup>2+</sup>, fosfolípidos y se ve potenciada por la unión con la TM y el receptor endotelial de la proteína C (REPC). (Laszik y cols. 1997)

Cuando la trombina se une a la TM induce: 1) la pérdida de su capacidad para activar plaquetas y generar fibrina; 2) mayor inactivación de la trombina por la AT y 3) mayor eficiencia de la trombina para activar a la PC (PCa). Como resultado de estas tres acciones se produce una gran actividad antitrombótica. (Meillón y Nacho, 2008).

Para una función eficiente, la PCa requiere además de cofactores, entre los principales están.

La PS facilita la unión de la PCa a las superficies endoteliales y plaquetarias. Inhibe directamente la formación del complejo protrombinasa al unirse al FVa para inactivarlo. (Hackeng y cols., 1994). FV inhibido, puede tener una función antitrombótica al actuar, en conjunto con la PS, como cofactor de la PCa y favorecer la inactivación del FVIIIa. (Shen y cols., 1997).

Gracias a este mecanismo antitrombótico, se inhiben tres proteínas que tienen gran capacidad de amplificación procoagulante: la trombina (FIIa), el FVa y el FVIIIa. A diferencia del mecanismo de la antitrombina/heparinoides, que inhiben directamente a las proteasas procoagulantes, este sistema inactiva al FVa y el FVIIIa que son proteínas no proteolíticas y que funcionan como cofactores para regular dicha actividad procoagulante. La importancia de este sistema se manifiesta que la deficiencia de PC o de PS, son las causas más frecuentes de trombofilia. (Meillón y Nacho, 2008).



**Figura N° 5. Sistema de la Trombomodulina / Proteína C / Proteína S**

---

**1.4 Fibrinólisis.** La palabra fibrinólisis significa disolución de fibrina, es un proceso enzimático compuesto por una serie de activadores e inhibidores los cuales regulan la conversión de una Gp circulante, plasminógeno, en la enzima activo plasmina. La producción de plasmina libre en la superficie del trombo conduce a la lisis de la fibrina y esto es muy importante para el mantenimiento de la permeabilidad vascular. Este mecanismo ocurre de la siguiente manera.

- ⊕ **La fase de iniciación**, el fibrinógeno es una molécula compuesta por 3 pares de cadenas polipeptídicas o fibrinopéptidos ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $Y$ ) unidas por puentes disulfuro. La región amino terminal forma el nódulo central E a los extremos del cual, se encuentran las regiones nodulares D (D-E-D). (de la Peña D y Anglés C, 2008) La región E contiene los fibrinopéptidos A (cadena  $\alpha$ ) y B (cadena  $\beta$ ); la trombina (FIIa) los hidroliza, permite la formación del polímero de fibrina y expone los sitios de unión para el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el plasminógeno (Plg). (Mosesson, 1990).
  
- ⊕ **La fase de amplificación y aceleración**, en esta fase el Plg se une a la lisina de la fibrina, la unión simultánea del t-PA permite que aparezcan las primeras moléculas de plasmina en la superficie de la fibrina. La plasmina va a cortar el enlace de la lisina de la fibrina. (de la Peña D y Anglés C, 2008) La unión de mas moléculas de Plg y del t-PA aumentan la formación de plasmina y amplifica el proceso de disolución del coagulo. (Fleury y Anglés, 1991).
  
- ⊕ **La fase de inhibición de la plasmina**, la formación de plasmina y su actividad pueden inhibirse antagonizando a la plasmina formada o a los activadores del plasminógeno. (Potempa y cols., 1994). El inhibidor específico de la plasmina es la  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP) que forma un complejo estequiométrico 1:1 con la plasmina. La inhibición resulta de una doble interacción: una entre el extremo carboxilo terminal de la  $\alpha_2$ -AP y los sitios de unión a lisina presentes en la plasmina, y otra entre el sitio activo de la plasmina y el sitio reactivo del inhibidor. Es por ello que cuando los sitios de unión a la lisina en la plasmina están unidos a los residuos de lisina de la fibrina, la plasmina no puede liberarse. La inhibición de la plasmina que se

---

libera durante el proceso fibrinolítico hacia el plasma, constituye un mecanismo de control eficaz que impide la lisis excesiva del coágulo hemostático. (Rouy y Anglés, 1990).

**Proteínas fibrinolíticas.** Los principales componentes del sistema fibrinolítico son los siguientes.

**Plasminógeno (Plg).** Es una Gp presente en el plasma y se sintetiza en el hígado. (Wohl y cols., 1982) Por acción de activadores tisulares o plasmáticos, el Plg se convierte a plasmina, esta tiene como tarea principal la descomposición de la fibrina y después, del fibrinógeno formándose los productos de degradación de fibrina o de fibrinógeno (PDF). La determinación del Plg está indicada en la detección del estado de deficiencia que se considera como un factor de riesgo trombótico y durante el tratamiento trombolítico. (Matsuo y cols., 1980; Lasierra y cols., 1981; Aoki y cols., 1980).

**Activador tisular del plasminógeno (t-PA)** es una Gp que se sintetiza en las células endoteliales y liberado a la circulación por diversos estímulos, posee gran afinidad por la fibrina. El sitio de unión del t-PA se localiza en la región D-dimérica de la fibrina. En su estructura posee sitios de unión a la lisina, estos permitirán la unión del Plg con los residuos lisina de la fibrina. La fibrina al unirse con el t-PA le da cierta actividad proteolítica sobre el Plg, el t-PA va a escindir sobre él Plg convirtiéndolo a plasmina. Esta plasmina es capaz de 1) romper el enlace de fibrina y 2) convertir la cadena monocatenaria t-PA en una cadena bicatenaria. Las reacciones que se llevan a cabo en la superficie de la fibrina definen la eficacia y especificidad del sistema ya que por un lado la actividad del t-PA es prácticamente nula en ausencia de fibrina, y por otro lado, la plasmina, se forma *in situ* en la superficie de la fibrina, su acción es exclusiva para disolver a la fibrina que forma un coágulo sin producir fibrinogénesis. (De la Peña D y Anglés C, 2008).

---

**Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1):** es una Gp, se sintetiza en las células endoteliales, en los hepatocitos, está presente en el plasma y en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas. Es el principal inhibidor fisiológico del t-PA y juega un importante papel en la regulación de la fibrinólisis. En condiciones fisiológicas actúa a nivel de la pared vascular, reaccionando rápidamente con el t-PA inhibiéndolo y limitando por consiguiente, la disolución de la fibrina en los coágulos por el sistema fibrinolítico.

**$\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP).** Es una Gp, que se sintetiza en el hígado y está involucrada en la regulación del sistema fibrinolítico. Forma un complejo 1:1 con la plasmina en dos fases: una muy rápida y reversible y otra más lenta e irreversible regulando así la actividad fibrinolítica. (De Maistre y cols., 1995) La determinación de la  $\alpha_2$ -AP está indicada en trastornos funcionales de hígado, para vigilar el efecto del tratamiento fibrinolítico. Una reducción de su actividad indica que el tratamiento ha sido exitoso, como prueba adicional en el diagnóstico de la coagulación intravascular diseminada (CID) y para comprobar estados de deficiencia congénitos. Las concentraciones elevadas se relacionan con trombosis. (Aoki y cols., 1978; Soria y cols., 1978).

**1.5 Anticoagulante Lúpico.** El término anticoagulante lúpico (AL) surgió en 1972 por Fernstein y Rapaport, es mal nombrado ya que la mayoría de los pacientes no sufren de lupus eritematoso sistémico (LES). (Razo, 2000) El AL es un anticuerpo adquirido que tiene especificidad inmunológica contra los fosfolípidos aniónicos o complejos fosfolípidos-proteínas. Se denominan anticuerpos inespecíficos ya que no inhiben específicamente a alguna de las proteínas de la coagulación, por el contrario, están dirigidos a los fosfolípidos. (Razo, 2000; Calzada y Moreno, 2012). Actúa bloqueando la unión de los factores de la coagulación a las superficies fosfolípídicas de la tromboplastina, el AL interfiere con las pruebas de coagulación *in vitro* dependientes de fosfolípidos (TTPa y TP). La presencia del AL se asocia con trombosis arterial y venosa, así como pérdida fetal recurrente. (Calzada y Moreno, 2012).

---

**1.6 Valores de referencia.** Un valor de referencia (VR) se define como el resultado analítico obtenido de un individuo de referencia, este se va a caracterizar por presentar un estado de salud definido por el propio investigador. (Comisión valores de referencia de la SEQC, 1991).

Todos los individuos que cumplan con las condiciones de inclusión definidas por el investigador constituyen la población de referencia. (Comisión valores de referencia de la SEQC, 1991).

En 1987, la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) emitió un conjunto de términos cuya definición debe tenerse en cuenta para la obtención de valores de referencia:

1. Individuo de referencia: es el individuo seleccionado para una comparación a partir de un criterio definido.
2. Población de referencia: conjunto de los individuos de referencia.
3. Valor de referencia: valor obtenido por la observación o medición de un tipo particular de magnitud o de un individuo de referencia perteneciente al grupo muestra de referencia.
4. Distribución de referencia: es la distribución estadística del VR.
5. Límite de referencia: es el límite que se deduce a partir de la distribución de referencia y es usado para propósitos descriptivos.
6. Intervalo de referencia: es el intervalo entre los límites de referencia, incluyendo a estos.
7. Valores observados: son valores de un tipo particular de magnitud, obtenidos por observación o medición y producidos para obtener una decisión médica. Pueden ser comparados con los VR, distribuciones de referencia o intervalos de referencia. (Comisión valores de referencia de la SEQC, 1991).

---

## 1.7 Determinación de los valores de referencia

La IFCC ha propuesto tres clases de intervalos de referencia: intervalo de tolerancia, intervalo de predicción e intervalo interpercentil. Este último es el más fácil de calcular y el que más recomienda la IFCC. Se define como el intervalo limitado por dos percentiles de la distribución de referencia. La Federación sugiere que cuando el comportamiento no es normal se calcule por el método no paramétrico, limitado por los percentiles 2.5 y 97.5%. (González, 2004).

Como ya se mencionó para la obtención de los VR poblacionales se emplean diferentes métodos cuyo uso va a depender del comportamiento de los valores que se analizaran; estos pueden ser:

- **Paramétricos:** asume una distribución Gaussiana y los límites de referencia se determinan como los valores que están por encima y por debajo de 2 desviaciones estándar (DE) de la media.
- **No paramétricos:** no asume ningún tipo de distribución y determina los percentiles cortando en cada cola.

### ■ Método Paramétrico.

Cuando se empezaron a aplicar las técnicas estadísticas en el laboratorio se utilizó asimismo un concepto estadístico simple para el tratamiento de la zona normal. Este concepto estadístico fue la curva gaussiana, la cual, en la terminología estadística, es a menudo citada como curva normal.

Cuando una muestra se analiza varias veces, los valores obtenidos difieren unos de otros en mayor o menor cuantía, por lo que al final se obtiene un rango de valores que podrá ser estrecho o ancho. La distribución de los resultados se puede obtener si se construye un gráfico en el que se coloquen los valores ordenados de menor a mayor en el eje de las X, y la frecuencia en que aparecieron, en el eje de las Y.

---

Cuando se unen los puntos que corresponden a la frecuencia en la aparición de cada uno de los valores, se obtiene una campana que se conoce como: campana de Gauss, distribución normal o gaussiana. (Suardíaz y cols., 2004).

Los dos parámetros que la definen son la media ( $\bar{x}$ ) y la desviaciones estándar (DE):

- **La  $\bar{x}$**  (promedio de todos los valores), constituye una medida de la tendencia central e indica dónde se localiza el histograma de la distribución a lo largo del eje de las X.
- **La DE**, constituye una medida de la variabilidad de los datos de una distribución de frecuencia.

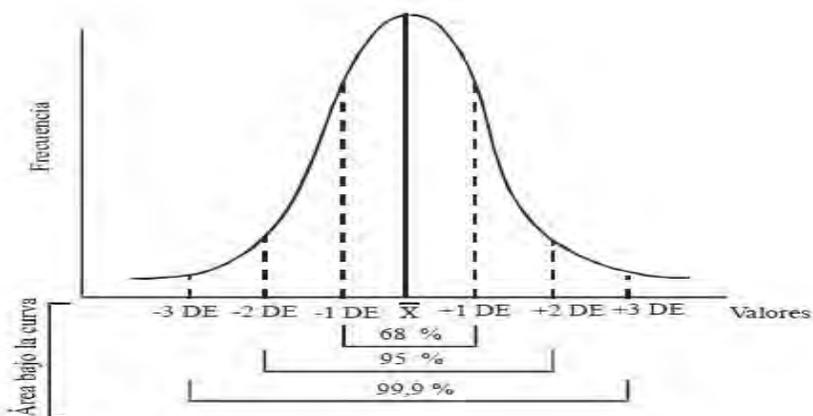
Otras medidas descriptivas están dadas por la **mediana** (que se define como la medición central, si existe, después que los valores se han dispuesto en orden de magnitud), y la **moda** (que se define como la medida, si existe, que se presenta con la máxima frecuencia). El **rango** es la diferencia entre el valor más alto y el más bajo de la distribución. El coeficiente de variación (CV) expresa la DE como un porcentaje de la media o promedio. (Suardíaz y cols., 2004).

En una distribución normal, alrededor del 68 % de los valores se encuentran en  $\pm 1$  DE, cerca del 95 % en  $\pm 2$  DE y el 97 %, aproximadamente, en  $\pm 3$  DE.

La distribución de frecuencias normal e ideal, se caracteriza por lo siguiente:

1. La media, la mediana y la moda coinciden.
2. La curva alrededor de la media es simétrica.
3. Los valores entre la media y  $\pm 1$  DE,  $\pm 2$  DE y  $\pm 3$  DE pueden ser calculados.

Si la curva es asimétrica, pierde su carácter normal y entonces los valores en el área debajo de ella se calculan de otra forma (métodos no paramétricos). (Suardíaz y cols., 2004).



**Figura No. 6 Distribución normal de frecuencias en la que aparecen la media ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar (DE) y la distribución de los valores alrededor de la media  $\pm 1$  DE,  $\pm 2$  DE y  $\pm 3$  DE.**

#### ■ Método No Paramétrico.

Si la distribución tiene un comportamiento no normal o no gaussiano los métodos no paramétricos dan, sin duda, resultados mucho más exactos.

#### ⊕ Determinación de los límites normales del 95% (Percentiles)

Se conoce como percentiles, a los 99 valores que dividen una serie (ordenada en forma creciente o decreciente), en 100 partes iguales. Un percentil equivale al 1% del total de observaciones de una serie estadística. (Walter y Martínez, 2003).

Se ordenan los resultados obtenidos en orden de magnitud creciente. Evidentemente, el percentil 2,5 de la distribución de frecuencias observada en la muestra es una estimación del percentil 2,5 de la población normal. El percentil 2,5 de la muestra es la muestra  $r$  comenzando a contar por el extremo más bajo, siendo  $r=0.025(n+1)$  y  $n$  el número de valores obtenidos, es decir, el tamaño de la muestra. De igual modo la estimación del percentil 97,5 corresponderá a la muestra  $r$  contando a partir del extremo más alto. Para la mayoría de los valores de  $n$ ,  $r$  no será un número entero, sino que deberá interpolarse entre los dos valores de la muestra más próximos al valor de  $r$ . (Suardíaz y cols., 2004).

---

## **2. Justificación.**

En la población mexicana los problemas relacionados con la trombosis son muy frecuentes. Por lo tanto, el diagnóstico de las enfermedades trombóticas debería ser un tema prioritario en nuestro sistema de salud. Sin embargo, para lograr este objetivo, requerimos que el laboratorio de análisis clínico, específicamente el de coagulación sanguínea realice una serie de pruebas que en su conjunto se denomina perfil de trombofilia. Desafortunadamente, en México, durante más de 50 años el diagnóstico de laboratorio para las enfermedades trombóticas no ha sido el adecuado debido a que carecemos de VR para todas las pruebas que conforman el perfil de trombofilia.

En México, los VR comerciales para las pruebas de escrutinio y especiales utilizadas en los laboratorios de coagulación se obtuvieron de poblaciones no mexicanas, por lo cual no deberían ser utilizados en la práctica clínica. En el laboratorio de coagulación se emplea una mezcla de plasmas de donadores de sangre que da como resultado un plasma testigo. Teóricamente esta mezcla tiene todas las proteínas que intervienen en la coagulación, pero además suponemos que la actividad resultante para todas las proteínas es cercana o igual a 100%. Por esta razón los resultados obtenidos del plasma testigo se utilizan como parámetros normales de referencia para establecer un diagnóstico en el estudio del sistema de la coagulación. Evidentemente, los resultados del estudio tendrán una aplicación inmediata ya que los laboratorios clínicos podrán emitir un mejor diagnóstico en el estudio de la trombofilia y hemofilia.

En esta investigación además de la obtención de los VR se compararon los resultados obtenidos de dos equipos comerciales para conocer si el empleo de diferentes tecnologías influía en los resultados de las pruebas de escrutinio.

---

### 3. Planteamiento del problema.

#### Pregunta de investigación.

¿Cuáles son los VR para las pruebas de coagulación utilizadas en el estudio de hemofilia y trombofilia?

### 4. Hipótesis.

- ⊕ **H<sub>0</sub>**: Los VR de las pruebas de escrutinio y especiales obtenidos con la mezcla de plasma de donadores sanos que acuden al BCS del CMN SXXI no son diferentes a los VR que proporcionan las casas comerciales extranjeras.
- ⊕ **H<sub>1</sub>**: Los VR de las pruebas de escrutinio y especiales obtenidos con la mezcla de plasma de donadores sanos que acuden al BCS del CMN SXXI son diferentes a los VR que proporcionan las casas comerciales extranjeras.

### 5. Objetivos.

#### 5.1 Objetivo General.

- ⊕ Establecer los valores de referencia (VR) para las pruebas de coagulación utilizadas en el estudio de hemofilia y trombofilia.

#### 5.2 Objetivos particulares.

- ⊕ Establecer los VR del tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) y tiempo de trombina (TT) basales y con sus respectivas diluciones.
- ⊕ Establecer el VR de la concentración plasmática del fibrinógeno (Fib).
- ⊕ Establecer los VR de la actividad de los factores hemostáticos: factor de von Willebrand (FvW), factor II (FII), factor V (FV), factor VII (FVII), factor VIII (FVIII), factor IX (FIX), factor X (FX), factor XI (FXI) y factor XII (FXII).
- ⊕ Establecer los VR de la actividad de las proteínas anticoagulantes naturales: antitrombina (AT), proteína C (PC) y proteína S (PS).

- 
- ⊕ Establecer los VR de la actividad de las proteínas fibrinolíticas:  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP) y plasminógeno (Plg).
  - ⊕ Establecer los VR para las pruebas que evalúan la presencia del anticoagulante lúpico (AL).
  - ⊕ Comparar los resultados de las pruebas de escrutinio TP, TTPa y Fib entre los equipos Stago<sup>®</sup> e IL<sup>®</sup>.

## 6. Material y Métodos.

### 6.1 Muestra Biológica.

**6.1.1 Universo de trabajo.** Población abierta de sujetos sin enfermedades conocidas, de ambos sexos y adultos, que acuden al BCS del CMN SXXI.

**6.1.2 Tipo de estudio.** Descriptivo, observacional, transversal, no aleatorizado.

**6.1.3 Grupos de estudio.** Para obtener esta muestra, se estudiaron adultos sanos donadores de sangre del BCS del CMN SXXI. Se seleccionaron donadores altruistas que reunieron todos los requisitos de acuerdo a la NOM-253-SSA1-2012 (Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos): tener entre 18 y 60 años, pesar >50 kg, estar aparentemente sano en el momento de la valoración clínica y no tener antecedentes que eviten la donación misma.

**6.1.4 Criterios de inclusión.** Mayores de 18 años sin enfermedad conocida.

**6.1.5 Criterios de exclusión.** Muestras mal aforadas, lipémicas, ictericas y hemolizadas.

---

## **6.2 Métodos.**

### **6.2.1 Recolección de las muestras.**

Durante el período de Septiembre de 2012 a Abril de 2013, se recolectaron diariamente, del BCS del CMN SXXI alrededor de 30 muestras sanguíneas de 15 hombres y 15 mujeres para cada mezcla de plasmas hasta obtener 100 plasmas testigos. Se obtuvo 1 muestra sanguínea por donador, mediante venopunción en el brazo utilizando tubos al vacío siliconizados con citrato de sodio 3.2 % (9:1, sangre: anticoagulante,  $^{vol}/_{vol}$ ) para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP) (Vacutainer<sup>®</sup>, Beckton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). La obtención del plasma se logró mediante centrifugación de los tubos de colección a 3500 rpm / 15 min / 4 °C. Una vez centrifugada, con una micropipeta, se recolectó el PPP de cada donador y se colocó en un frasco de plástico donde se hizo la mezcla de plasmas. El plasma testigo se analizó dentro de las primeras 4 horas de su preparación. Para el control de calidad se utilizó un plasma control normal y uno patológico proporcionados por la casa comercial. Con los resultados se realizaron las graficas de control Levey-Jennings y se verificó que entraran dentro de los parámetros correspondientes.

### **6.2.2 Metodología analítica de las pruebas de coagulación.**

La automatización en los laboratorios de coagulación está cada vez más difundida en casi todo el mundo, esto contribuyó a mejorar la estandarización y la simplificación de pruebas que requieren una capacitación específica y condiciones de trabajo especiales, de manera que los laboratorios puedan mejorar su eficiencia y ampliar la variedad de servicios que ofrecen. La automatización de la hemostasia es bastante reciente. Antiguamente, los métodos manuales que se basaban en la detección visual del coágulo de fibrina. Más adelante, en la década de 1970, surgieron equipos semiautomáticos que recurrían a principios fotométricos o mecánicos para detectar la fibrina.

---

Recientemente, se volvió frecuente el uso de instrumentos totalmente automáticos en los laboratorios modernos. En la actualidad, los equipos modernos conectados con sistemas específicos de procesamiento de datos pueden realizar pruebas de coagulación y ensayos cromogénicos e inmunológicos.

**Actualmente, se trabaja con dos metodologías:** Mecánica y Óptica

#### ■ Principio mecánico

**Coagulómetro**, el método coagulométrico utiliza un campo electromagnético aplicado a cubetas de prueba que detecta el movimiento de una esfera de acero inoxidable que se coloca en la muestra de plasma. La esfera de acero sigue un movimiento pendular, balanceándose de un lado a otro dentro de una solución reactivo de plasma con un movimiento constante. Cuando comienza a formarse la fibrina, aumenta la viscosidad y los movimientos de la esfera se retardan. Cuando el movimiento oscilatorio de la esfera llega a un nivel predeterminado, se detiene el cronómetro y se obtiene así el tiempo de coagulación del plasma. (Thomas y Sochynsky, 1999).

#### ■ Principio óptico.

**Principio cromogénico**, Se basa en el uso de sustancias generadoras de un color específico denominadas cromóforos, de las cuales la más común es la p-nitroanilina (p-NA), que tiene una absorbancia máxima a 405 nm. El principio de los ensayos cromogénicos reside en la adherencia de la p-NA a los sustratos sintéticos. (Rodak, 1995).

La p-NA se adhiere a una serie de aminoácidos (esto va a conformar al sustrato cromogénico), la proteína de coagulación segmenta el sustrato cromogénico en un sitio específico entre una secuencia definida de aminoácidos y libera la p-NA. La intensidad del color amarillo es proporcional a la cantidad de p-NA liberada. Se mide mediante fotodetección a una longitud de onda de 405 nm.

---

A medida que se segmenta y libera más p-NA, aumenta la capacidad de absorbancia de la muestra, lo que genera un cambio mayor en la densidad óptica de la solución. (Rodak, 1995).

**Principio inmunológico,** las partículas de látex recubiertas con un anticuerpo específico por lo general se utilizan contra el analito (antígeno) que se desea evaluar. Un haz de luz monocromática atraviesa una suspensión de micropartículas de látex. Cuando la longitud de onda es mayor que el diámetro de las partículas de la suspensión, las partículas absorben una pequeña cantidad de luz. Sin embargo, cuando las micropartículas de látex específicas recubiertas con anticuerpo entran en contacto con el antígeno presente en la solución, se adhieren al anticuerpo formando uniones entre las partículas, lo que produce la aglutinación. Cuando el diámetro de las partículas se acerca a la longitud de onda del haz de luz monocromática, se absorbe una mayor cantidad de luz. Este aumento en la absorbancia de la luz es proporcional a la aglutinación, que, a su vez, es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

### **6.2.3 Pruebas de Coagulación en el Laboratorio.**

El laboratorio de coagulación cuenta con diferentes pruebas que nos permiten evaluar las etapas de la coagulación y poder evaluar si existe alguna alteración en alguna de las proteínas participantes, además de que nos permiten monitorear el tratamiento con medicamentos anticoagulantes, o para conocer el estado de coagulación de un paciente antes de una intervención quirúrgica. Es por esta razón que es de suma importancia conocer las pruebas que el laboratorio nos ofrece, su fundamento, realización e interpretación con el fin de poder identificar que vía de la coagulación se encuentra alterada así como para monitorear el tratamiento de medicamentos anticoagulantes.

Las pruebas de coagulación se encuentran divididas en dos grupos:

- **Pruebas de escrutinio:** TP, TTPa, TT y Fib
- **Pruebas especiales:** Diluciones de TP, TTPa y TT, actividad de los factores hemostáticos, anticoagulantes naturales, proteínas fibrinolíticas, DD y FvW.

---

### 6.2.3.1 Pruebas de escrutinio en el laboratorio de coagulación.

Permiten tener un panorama general del estado de coagulación del paciente (Tiempos basales de TP, TTPa, TT y Fib).

**Tiempo de Protrombina (TP).** En 1932 el Dr. Bancroft y el Dr. Stanley estudiaban la coagulación de la sangre con el objetivo de resolver el problema de la trombosis post operatoria, razón por la cual ofrecieron un puesto al Dr. Armand Quick para que formara parte de su equipo de investigación, una vez formando parte del equipo Charlotte Breitung le enseñó a Quick la técnica del tiempo de recalcificación del plasma en donde observó que pacientes hemofílicos y con ictericia obstructiva mostraban tiempos de recalcificación alargados y correlacionó una tendencia trombotica cuando el tiempo se volvía más corto, sin embargo era obvio que la técnica tenía sus limitantes y necesitaba de estandarizarse. Para poder llevar a cabo la estandarización de la prueba Quick tuvo que aprender más acerca de la teoría de la coagulación de la sangre y fue durante esa investigación donde se topó con una masa de teorías conflictivas y confusas ya que algunos autores llegaban incluso a desconocer la existencia de la protrombina. La teoría de la coagulación de Morawitz fue la teoría que más le interesó, esta proponía un modelo de coagulación en dos etapas: la primera era la conversión de protrombina a trombina mediante la acción de lo que él denominó tromboquinasa (tromboplastina) en presencia de  $Ca^{2+}$  y la segunda la conversión de fibrinógeno a fibrina gracias a la acción de la trombina, con base en esto pronto apareció en las anotaciones de Quick una ecuación que presentaba tres variables y en donde solo el  $Ca^{2+}$  se podía controlar. (Quick, 1959).



***Ecuación del Dr. Armand Quick para resolver la problemática del uso de la tromboplastina en la prueba.***

---

La necesidad de encontrar un reactivo de tromboplastina adecuado se volvió en su primer prioridad, el único material del que disponía eran tejidos de pequeños animales de laboratorio y fue cuestión de suerte que el primer tejido que probó fuese el pulmón de conejo, el cual encontró tenía una actividad de tromboplastina relativamente alta (sin embargo pronto encontró que el cerebro de conejo daba resultados más constantes y reproducibles), realizó pruebas con plasmas de pacientes ictericos añadiendo los extractos de tejidos directamente y observó que presentaban tiempos menos prolongados de coagulación; llevó su descubrimiento a la práctica clínica y observó resultados similares en más pacientes con ictericia y fue entonces donde Quick comenzó a darse cuenta de la importancia de su descubrimiento que marcó una era en la historia de la coagulación. (Quick, 1959) El TP se emplea como una prueba de evaluación preoperatoria y se prolonga en la deficiencia congénita y adquirida de los factores II, V, VII y X, hepatopatías, tratamiento con antagonistas de la vitamina K, Hipovitaminosis K: deficiencia nutritiva, absorción o metabolismo deficiente de la vitamina K (enfermedad hemorrágica del recién nacido, colestasis, tratamiento con antibióticos), Fibrinólisis, Coagulación Intravascular Diseminada (CID), entre otros. Esta prueba también es utilizada para el monitoreo de los pacientes sometidos a tratamientos con anticoagulantes orales (anticoagulantes antagonistas de la vitamina K como acenocumarina y warfarina), anticoagulantes orales como la heparina afectan los resultados del TP ya que inhiben a la trombina y al FX observándose un falso alargamiento de los tiempos sin embargo reactivos actualmente empleados poseen inhibidores de la heparina por lo tanto la heparina en concentraciones terapéuticas no influirían en la medición.

**Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPa).** El TTP es una prueba diseñada en 1953 por Robert Langdell, R. Wagner y Kenneth Brinkhous (White, 2003) quienes trataban de purificar al factor antihemofílico (FVIII) para desarrollar concentrados utilizados en el tratamiento de pacientes con hemofilia, ellos observaron que la sangre de pacientes con hemofilia tardaba un tiempo considerablemente prolongado en coagularse en comparación de los individuos no hemofílicos; sin embargo al añadir el tejido de tromboplastina utilizado en la prueba de TP el plasma hemofílico coagulaba tan rápidamente como el de un

---

individuo sano. (White, 2003) El aporte crucial de Langdell y sus colaboradores fue el desarrolló de lo que le llamó una tromboplastina parcial (en contraste de la tromboplastina completa utilizada en el Tiempo de Quick), la realización de esta tromboplastina parcial se desarrolló con ultracentrifugación del extracto crudo del cerebro de conejo. (White, 2003) Este método resultaba en una reducción significativa de la actividad del factor tisular (TF) en la Tromboplastina lo que reducía la formación del complejo FT/FVII y por consecuente la activación del FX, esto permitía que la deficiencia del FVIII tuviera una velocidad más limitada de generación de trombina observándose tiempos de coagulación del plasma hemofílico prolongados. El FT como entidad bioquímica era desconocido en esa época por lo tanto los autores no tenían una idea clara de lo que sucedía durante la ultracentrifugación, ellos proponían que la ultracentrifugación de los tejidos causaba una separación parcial de la tromboplastina de otro acelerador de la coagulación. En 1961 Rapaport y Proctor describieron una modificación del TTP esta variación ofrecía una mayor reproducibilidad y una mejora de los tiempos de realización de la prueba, utilizaron el caolín como activador de los factores lo cual aceleraba la coagulación y reducía horas de trabajo considerando que en ese tiempo las pruebas se realizaban de forma manual. El TTPa se emplea para detectar deficiencias congénitas o adquiridas de los factores de la coagulación, presencia de inhibidores de la coagulación como el AL así como en el seguimiento de la terapia anticoagulante con heparina de alto peso molecular.

**Tiempo de Trombina (TT).** EL TT es una prueba que nos va a permitir evaluar la última fase de coagulación, es decir, la función y calidad del Fib. La trombina es una enzima altamente específica que actúa sobre el Fib, transformándolo en fibrina y no se encuentra en sangre circulante. También se utiliza como una prueba para evidenciar la presencia de heparina en la muestra del paciente siendo una de las causas de un tiempo prolongado. Se añade una cantidad estandarizada de trombina de origen bovino al plasma citratado y se mide el tiempo en segundos desde la adición de la trombina hasta la formación del coágulo. Se encuentra prolongada en los siguientes estados clínicos: disfibrinogenemia, hipofibrinogenemia, afibrinogenemia, efectos fisiológicos del

---

recién nacido, inhibidores de la coagulación como PDF, protamina y paraproteínas además de tratamientos fibrinolíticos.

**Fibrinógeno (Método de Clauss).** El método fue descrito por Von Clauss en 1957, es un tiempo de trombina modificado en donde para iniciar la coagulación se agrega un exceso de trombina al plasma del paciente que ha sido diluido 1:10, esta dilución lo que hace es disminuir el efecto de sustancias que interfieran en la reacción como la heparina y los PDF. El uso de una alta concentración de trombina asegura la coagulación ya que al haber un exceso la trombina se va a encontrar en una concentración superior sobre el nivel de fibrinógeno, por lo tanto la prueba no va a depender de la trombina, solamente de la cantidad de Fib presente. La prueba requiere de un plasma de referencia con una concentración conocida de Fib, este plasma esta calibrado contra un estándar internacional. La curva de calibración se construye realizando diluciones del plasma de referencia (de concentraciones 1:5 – 1:40) para dar un rango de concentraciones de Fib. El tiempo de coagulación de cada una de estas diluciones se establece (utilizando muestras por duplicado) y los resultados (tiempo de coagulación en segundos y concentración en mg/dL). Al agregar el exceso de trombina al plasma diluido del paciente se comienza a medir el tiempo que transcurre entre la adición y la formación del coágulo, este tiempo se va a interpolar en la curva de calibración para poder obtener los resultados expresados en [mg/dL]. La concentración de Fib se puede encontrar alterada en estados clínicos como afibrinogenemia, disfibrinogenemia, hepatopatías, diabetes, síndromes inflamatorios, obesidad, CID y fibrinólisis.

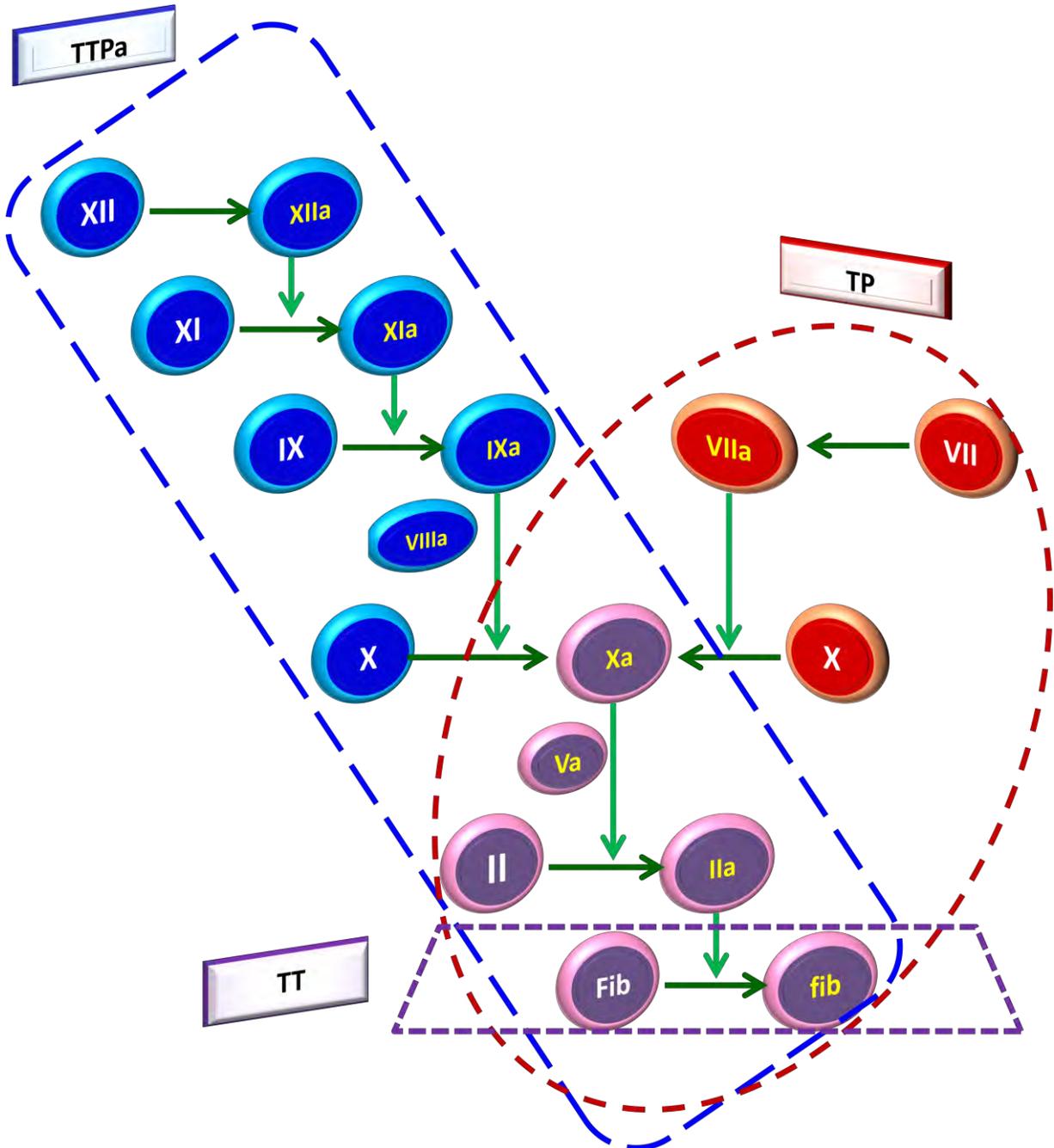


Figura N° 7. Cascada de la coagulación en donde se muestra que factores son evaluados en cada prueba.

---

### 6.2.3.2 Pruebas especiales en el laboratorio de coagulación.

Cuando las pruebas de escrutinio salen alteradas hay que realizar pruebas especiales empleando diluciones y correcciones de los tiempos, además debe de definirse la deficiencia o aumento de uno o más factores, así como la presencia de algún inhibidor, estas pruebas nos ayudan a diagnosticar problemas trombóticos.

**Diluciones.** En el laboratorio de coagulación las diluciones se realizan para hacer más evidente la deficiencia de factores, al diluir aun más el factor de por sí ya deficiente con un diluyente nos traerá como consecuencia un incremento o alargamiento de los tiempos.

**Actividad de los factores hemostáticos.** Para esta prueba se utilizó una técnica coagulométrica que emplea un plasma deficiente en cada uno de los factores analizados. Se realiza cuando se sabe que la alteración de las pruebas de escrutinio se debe ya sea a una deficiencia o a un aumento de los factores de la coagulación. Esta prueba nos va a permitir identificar qué factores se encuentran alterados y cuál es su porcentaje de actividad.

La actividad de los factores fue evaluada de la siguiente forma:

- ⊕ Factores de la Vía Extrínseca: FVII, y vía común (FX, FV y FII).
- ⊕ Factores de la Vía Intrínseca: FXII, FXI, FIX, FVIII y vía común.

**Anticoagulantes Naturales y Proteínas Fibrinolíticas.** Este grupo de pruebas nos permiten conocer el estado trombolítico del paciente, esto se logra a través de la determinación de la concentración plasmática y de la actividad de proteínas que antagonizan la iniciación, propagación y amplificación de diferentes puntos de la coagulación, así como de su regulación.

---

Entre este grupo de proteínas encontramos a las siguientes:

**Antitrombina.** La prueba se realizó por método colorimétrico en donde la AT se incubaba con un exceso de trombina en presencia de Heparina y se cuantifica a la trombina restante es decir la que no fue inhibida por la AT produciéndose la liberación de p-nitroanilina.

**Proteína C.** La prueba se realizó por método coagulométrico en donde a la muestra se le añade, plasma deficiente en PC y un activador específico de la PC (veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix*) que está liofilizado con reactivo de TTPa, esto va a activar la PC de la muestra y además al adicionar la solución de cloruro de calcio se iniciará la activación de la vía intrínseca de la coagulación. (Stocker y cols., 1987; Martinoli, 1986) El TTPa transcurrido bajo estas condiciones se determina únicamente mediante la actividad de la PC de la muestra, ya que después de añadir el plasma deficiente de PC, la mezcla de la reacción contiene los otros factores en exceso. La PC activada va a inhibir a los factores Va y VIIIa prolongando el TTPa. Cuando un plasma de paciente se mezcla con plasma deficiente en PC, la prolongación del tiempo de coagulación es proporcional a la cantidad de PC presente en el plasma de paciente.

**Proteína S.** La prueba se realizó mediante un método coagulométrico donde la PS actúa como cofactor de la PCa y aumenta su efecto inhibitorio sobre los factores V y VIII activados. De esta forma, la PS prolonga el tiempo de coagulación de un sistema enriquecido con FVa el cual es un sustrato fisiológico para la PCa.

**$\alpha_2$ -antiplasmina.** Es el principal de los inhibidores del sistema fibrinolítico. La deficiencia de esta proteína está relacionada con problemas de sangrado. La prueba se realizó con un método cromogénico en donde se añade plasmina a la muestra, la  $\alpha_2$ -AP contenida en la muestra inhibe una cantidad equivalente de plasmina. La plasmina restante reacciona con un sustrato cromogénico formando una p-nitroanilina que se lee a 405 nm. La actividad de la plasmina es inversamente proporcional a la de la  $\alpha_2$ -AP.

---

**Plasminógeno.** Es la proteína precursora que forma la plasmina, tras la acción de los activadores del plasminógeno como la estreptoquinasa. La prueba se realiza con un método cromogénico en donde se añadió estreptoquinasa en cantidad excesiva a la muestra. La cantidad del complejo estreptoquinasa-plasminógeno formado se calcula a partir de su acción sobre el sustrato cromogénico que forma una p-nitroanilina que se lee a 405 nm.

**Anticoagulante lúpico.** Son anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos aniónicos o complejos fosfolípidos-proteína. Estos anticuerpos fueron detectados por método coagulométrico, la técnica consiste en utilizar veneno de víbora de Russell este activa al factor X en presencia de calcio, y desencadena la coagulación a este nivel por lo tanto elimina la interacción de los factores situados en etapas anteriores. (Thiagarajan, 1986) Esta prueba es independiente de las anomalías de la fase de contacto y de las que afectan a los factores VIII y IX (déficits o inhibidores). Para incrementar la sensibilidad de la prueba se realiza una prueba de escrutinio en donde se disminuye la cantidad de fosfolípidos, lo que en presencia de AL, alarga el tiempo de coagulación. La diferenciación entre un inhibidor específico de un AL, se efectuó mediante una prueba confirmatoria como la neutralización del AL incrementando la concentración de fosfolípidos. (Martínez y cols., 2008). En consecuencia, el tiempo de coagulación observado con la prueba confirmatoria será más corto que el de escrutinio.

El resultado final se expresa en ratio normalizado, que es el cociente entre el resultado de escrutinio y el confirmatorio, en donde un valor de ratio superior o igual a 1.2 confirma la presencia de AL.

**Dímero-D.** Es una prueba útil en el diagnóstico de enfermedad tromboembólica y CID. Concentraciones elevadas indican la existencia de fibrinólisis anormal. La prueba se realizó mezclando a la muestra con una suspensión de partículas de látex recubiertas de anticuerpos monoclonales que aglutinan en presencia de los Dímeros D. Esta aglutinación provoca una mayor dispersión de la luz que se mide como un aumento de la densidad óptica.

---

**Factor de von Willebrand.** Esta prueba se realizó mediante la determinación cuantitativa del factor de von Willebrand en el plasma citratado con el método Inmunoturbidimétrico. Al añadir las partículas de látex recubiertas de anticuerpos policlonales específicos de FvW a la muestra (calibrador, control o pacientes) estas aglutinaron en presencia del antígeno FvW presente en la muestra. Esta aglutinación provocó una fuerte dispersión de la luz que se midió como un aumento de la densidad óptica. En el intervalo de medición, la densidad óptica cambia según la concentración del FvW.

## **7. Análisis estadístico.**

Los resultados se analizaron con medidas de tendencia central. Para conocer los VR se determinó el intervalo de confianza (95%), y se estableció su distribución mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov.

Para comparar los resultados obtenidos pruebas de escrutinio entre las 2 casas comerciales, se utilizó la prueba estadística de t de student o U de Mann Whitney, dependiendo de la distribución de las variables. Consideramos un resultado significativo cuando  $p < 0.05$ .

---

## 8. Resultados.

Se obtuvieron 100 plasmas testigo. A cada plasma testigo se le realizaron las pruebas de escrutinio y especiales con un sistema de medición Stago®. Las pruebas TP, TTPa y Fib fueron analizadas en dos equipos comerciales (Stago® e IL®). Los VR de las pruebas de escrutinio se muestran en la tabla 1 y en las tablas 2-6 se muestran las pruebas especiales. La comparación de los resultados entre los equipos se observan en las tablas 7 y 8, así como en las gráficas 1-6.

**8.1 TP, TTPa, TT y Fib.** El análisis de estas pruebas se realizó con medidas de tendencia central (Tabla 1). Para conocer los valores de referencia, se determinó el intervalo de confianza al 95 %. El VR para el TP<sub>Basal</sub> fue de (12.1-13.0 seg), de manera que el límite inferior fue mayor y el límite superior menor que el reportado por la casa comercial (12.0-16.0 seg), además se observa que el intervalo obtenido en este estudio es mucho más estrecho que el reportado por la casa comercial. Para la dilución 1:2 el VR fue de (17.0-18.8 seg) y para la dilución 1:4 fue de (27.7-31.9 seg). El comportamiento observado para el TP<sub>Basal</sub> fue no paramétrico o anormal ( $p < 0.05$ ).

El VR para TTPa<sub>Basal</sub> fue de (28.4-30.8 seg), el VR de la casa comercial es de (24.0-33.0 seg) de manera que el resultado de el límite inferior obtenido fue mayor que el reportado por la casa comercial, de modo contrario el límite superior obtenido fue menor que el reportado por la casa comercial, el comportamiento que mostró el TTPa<sub>Basal</sub> es normal ( $p > 0.05$ ). Nuestro valor de referencia para la dilución 1:2 de TTPa fue de (38.0-43.6 seg) y para la dilución 1:4 fue de (70.7-84.8 seg).

El VR para TT<sub>Basal</sub> fue de (16.7-18.1 seg), de manera que los límites inferior y superior fueron menores que los proporcionados por la casa comercial (17.0-22.0 seg). Para la dilución 1:2 de TT el VR fue de (15.4-17.8 seg) y para la dilución 1:4 fue de (17.3-19.9 seg). El comportamiento que mostraron el TT<sub>Basal</sub>, así como sus respectivas diluciones 1:2 y 1:4 fueron no paramétricos ( $p < 0.05$ ).

El VR para el fibrinógeno fue de (299-376 mg/dL), el valor de referencia de fibrinógeno que nos menciona la casa comercial se encuentra dentro de un rango de (200-400 mg/dL), el límite inferior obtenido fue mayor y el límite superior obtenido fue menor que el reportado por la casa comercial. El comportamiento que mostró el fibrinógeno fue no paramétrico ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 1. VR de las pruebas de TP, TTPa, TT y Fib del plasma testigo.**

Prueba	N	Distribución	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE	VR	VR <sub>cc</sub>
<b>TP Basal (seg)</b>	100	0.011	12.0	13.1	12.6	12.6	0.2	12.1 - 13.0	12.0 - 16.0
<b>TP 1:2 (seg)</b>	100	> 0.200	16.4	19.2	18.0	17.9	0.5	17.0 - 18.8	NA
<b>TP 1:4 (seg)</b>	100	> 0.200	27.4	33.3	29.8	29.8	1.1	27.7 - 31.9	NA
<b>TTPa Basal (seg)</b>	100	> 0.200	28.4	31.3	29.6	29.6	0.6	28.4 - 30.8	24.0 - 33.0
<b>TTPa 1:2 (seg)</b>	100	> 0.200	37.9	45.4	40.7	40.8	1.4	38.0 - 43.6	NA
<b>TTPa 1:4 (seg)</b>	100	0.055	71.8	89.2	77.4	77.7	3.6	70.7 - 84.8	NA
<b>TT Basal (seg)</b>	100	0.001	16.1	18.2	17.2	17.3	0.4	16.7 - 18.1	17.0 - 22.0
<b>TT 1:2 (seg)</b>	100	0.012	15.0	18.0	16.5	16.5	0.5	15.4 - 17.8	NA
<b>TT 1:4 (seg)</b>	100	< 0.001	16.4	21.2	18.6	18.6	0.7	17.3 - 19.9	NA
<b>Fib [ mg/dL ]</b>	100	0.036	282	388	334	331	18.7	299 - 376	200 - 400

**VR<sub>cc</sub>**, Valor de referencia de la casa comercial Stago<sup>®</sup>.

**8.2 DD.** El VR fue de (2.0-4.0  $\mu\text{g/mL}$ ), el comportamiento fue normal ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 2. VR de la prueba de Dímero D del plasma testigo.**

Prueba	N	Distribución	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE	VR [ $\mu\text{g/mL}$ ]	VR <sub>cc</sub> [ $\mu\text{g/mL}$ ]
DD	100	> 0.200	0.2	0.4	0.3	0.3	0.06	2.0-4.0	< 5.0

**VR<sub>cc</sub>**, Valor de referencia de la casa comercial Stago<sup>®</sup>.

**8.3 Actividad de los factores de la fase fluida de la hemostasia.** Para el FII el valor de referencia fue de (92-110 %), FV de (79-109 %), FVII de (86-128 %) y FX de (94-117 %), el valor de referencia que menciona el inserto de la casa comercial para los factores II, V y X es de (70-120 %) y para el factor VII el valor de referencia que menciona la casa comercial es de (55-170 %). Con base en esto observamos que los resultados del límite inferior obtenido para los factores II, V, VII y X fue mayor que el reportado por la casa comercial, de manera contraria el límite superior obtenido para los factores II, V, VII y X fue

menor que el reportado por la casa comercial; el comportamiento que mostraron los factores II, V, VII y X fue normal ( $p>0.05$ ). (Tabla 3).

El VR para el FVIII fue de (92-114 %), FIX de (107-139 %), FXI de (99-135 %) y FXII de (84-123 %), el valor de referencia que menciona la casa comercial para los factores de la vía intrínseca es de (60-150 %); los resultados del límite inferior obtenido para los factores VIII, IX, XI y XII fueron mayores que el reportado por la casa comercial, de manera contraria el límite superior obtenido para los factores VIII, IX, XI y XII fue inferior que el reportado por la casa comercial. El comportamiento que mostraron los factores VIII, IX y XI fue normal ( $p>0.05$ ), mientras que el comportamiento para el FXII fue no paramétrico ( $p<0.05$ ). El VR para el FvW:Ag fue de (72-110 %), el valor de referencia que menciona la casa comercial es de (50-160%), el límite inferior para el FvW:Ag fue mayor que el mencionado por la casa comercial, de manera contraria el límite superior fue menor que el reportado por la casa comercial, el comportamiento que mostró fue no paramétrico ( $p<0.05$ ). (Tabla 3).

**Tabla 3. VR de los factores hemostáticos del plasma testigo.**

Prueba	N	Distribución	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE	VR (%)	VR <sub>cc</sub> (%)
<b>FII</b>	100	> 0.200	88	113	100	101	5.6	92-110	70-120
<b>FV</b>	100	0.068	78	112	100	99	7.7	79-109	70-120
<b>FVII</b>	100	0.142	82	141	112	112	10.9	86-128	55-170
<b>FVIII</b>	100	0.078	87	145	124	123	12.5	92-144	60-150
<b>FIX</b>	100	0.16	106	141	126	125	8.6	107-139	60-150
<b>FX</b>	100	0.106	85	118	107	107	6.8	94-117	70-120
<b>FXI</b>	100	> 0.200	96	140	118	118	9.4	99-135	60-150
<b>FXII</b>	100	0.027	74	125	97	100	10.9	84-123	60-150
<b>FvW:Ag</b>	100	0.003	70	112	99	99	9.2	72-110	50-160

**VR<sub>cc</sub>**, Valor de referencia de la casa comercial Stago®.

**8.4 Anticoagulantes Naturales.** El VR para la PC fue de (109-140 %), PS de (92-130 %) y para la AT de (85-111 %), el valor de referencia reportado por la casa comercial para la PC y PS es de (70-130 %) y para la AT es de (80-120 %), por lo tanto el límite inferior para la PC fue mayor que el reportado por la casa comercial, de igual manera el límite superior de la PC fue mayor que el reportado en el inserto. Para la PS el límite inferior fue mayor que el reportado por la casa comercial, el límite superior para la PS fue igual que el reportado por la casa comercial. En el caso de la AT el límite inferior fue mayor que el reportado por la casa comercial, de manera contraria el límite superior de la AT fue menor que el reportado en el inserto. El comportamiento que tuvieron la PC y PS fue normal ( $p > 0.05$ ), mientras que el comportamiento que tuvo la AT fue no paramétrico ( $p < 0.05$ ). (Tabla 4).

**Tabla 4. VR de los anticoagulantes naturales del plasma testigo.**

Prueba	N	Distribución	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE	VR ( % )	VR <sub>cc</sub> (%)
PC	100	0.167	102	151	126	125	9.9	109-140	70-130
PS	100	> 0.200	89	135	113	112	10.7	92-130	70-130
AT	100	0.044	84	113	103	102	6.8	85-111	80-120

**VR<sub>cc</sub>**, Valor de referencia de la casa comercial Stago®.

**8.5 Proteínas Fibrinolíticas.** El VR para la  $\alpha_2$ -antiplasmina fue de (91-121 %) y para el plasminógeno de (88-115 %), los valores de referencia que menciona la casa comercial para el  $\alpha_2$ -AP y para el Plg fue de (80-120 %), el límite inferior y superior para el  $\alpha_2$ -AP fue mayor que el mencionado por la casa comercial; el límite inferior del Plg fue mayor que el mencionado por la casa comercial, de manera contraria el límite superior fue menor. El comportamiento de  $\alpha_2$ -AP fue normal ( $p > 0.05$ ), mientras que el comportamiento del Plg fue no paramétrico ( $p < 0.05$ ). (Tabla 5).

**Tabla 5. VR de las proteínas fibrinolíticas del plasma testigo.**

Prueba	N	Distribución	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE	VR ( % )	VR <sub>cc</sub> (%)
$\alpha_2$ -AP	100	> 0.200	89	126	107	107	7.9	91-121	80-120
Plg	100	< 0.001	85	118	109	108	7.0	88-115	80-120

**VR<sub>cc</sub>**, Valor de referencia de la casa comercial Stago®.

**8.6 Anticoagulante Lúptico.** El VR para Lac Screen fue de (34.2-40 seg), para Lac Confirm de (31.9-35 seg) y para RALUP de (1.0-1.1), el comportamiento que se observó para Lac Screen fue normal ( $p > 0.05$ ), mientras que el comportamiento que se observó para Lac Confirm y RALUP fue no paramétrico ( $p < 0.05$ ). (Tabla 6).

**Tabla 6. VR de las pruebas de AL del plasma testigo.**

Prueba	N	Distribución	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	DE	VR (seg)
Lac S	100	0.193	32.5	39.8	37.4	37.1	1.5	34.2-40.0
Lac C	100	0.012	31.4	35.2	32.8	33.0	1.0	31.9-35.0
RALUP	100	< 0.001	1.0	1.1	1.1	1.1	0.05	1.0-1.1

### 8.7 Comparación de los equipos de diferentes casas comerciales.

La comparación de los resultados de TP<sub>Basal</sub> y TTPa<sub>Basal</sub> con sus respectivas diluciones (1:2 y 1:4) entre los equipos Stago® e IL®, se muestran en la tabla 7. En la tabla 8 se observa la comparación para la determinación de la concentración plasmática del fibrinógeno. Para el TP<sub>Basal</sub>, TP<sub>1:2</sub>, TP<sub>1:4</sub>, TTPa<sub>Basal</sub> y Fib se aprecia una  $p < 0.001$ , que nos indica que estadísticamente si existe diferencia entre ambos equipos Stago® e IL®.

**Tabla 7. Resultado de la comparación de dos equipos de diferentes casas comerciales del plasma testigo en las pruebas de TP (Basal, dilución 1:2 y dilución 1:4) y TTPa (Basal, dilución 1:2 y dilución 1:4).**

Prueba	Casa comercial	Media	Mediana	D.E.	Mínimo	Máximo	p
TP <sub>Basal</sub> (seg)	Stago®	12.6	12.6	0.2	12.0	13.1	<0.001
	IL®	13.0	13.0	0.3	12.6	13.6	
TP <sub>1:2</sub> (seg)	Stago®	17.8	17.8	0.4	16.9	18.6	<0.001
	IL®	19.2	19.1	0.5	18.5	20.6	
TP <sub>1:4</sub> (seg)	Stago®	29.5	29.5	0.8	27.8	31.1	<0.001
	IL®	32.1	32.0	5.6	29.4	35.3	
TTPa <sub>Basal</sub> (seg)	Stago®	29.6	29.6	0.7	28.5	31.3	<0.001
	IL®	27.6	27.4	0.9	26.3	30.4	
TTPa <sub>1:2</sub> (seg)	Stago®	40.9	40.9	1.2	39.0	43.5	p= 0.248
	IL®	40.7	40.3	1.6	38.4	46.9	
TTPa <sub>1:4</sub> (seg)	Stago®	77.3	76.9	2.8	72.0	83.2	NA
	IL®	ND	ND	ND	ND	ND	

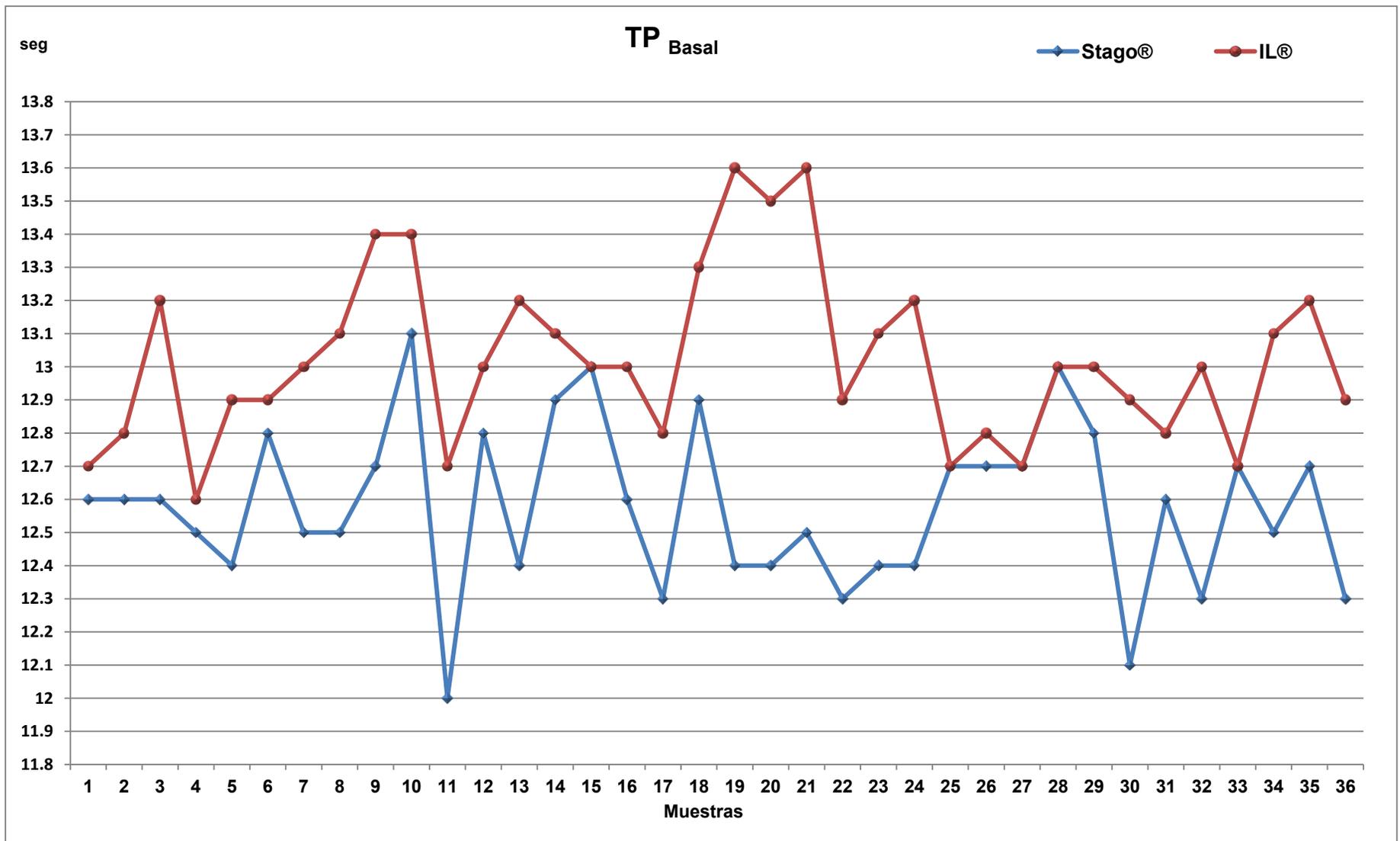
**Tabla 8. Resultado de la comparación de dos equipos de diferentes casas comerciales del plasma testigo en la cuantificación plasmática de fibrinógeno.**

Prueba	Casa comercial	Media	Mediana	D.E.	Mínimo	Máximo	p
<b>Fib</b> [ mg / dL ]	<b>Stago®</b>	344.6	337	23.2	307	409	<0.001
	<b>IL®</b>	372.7	377	39.4	289	483	

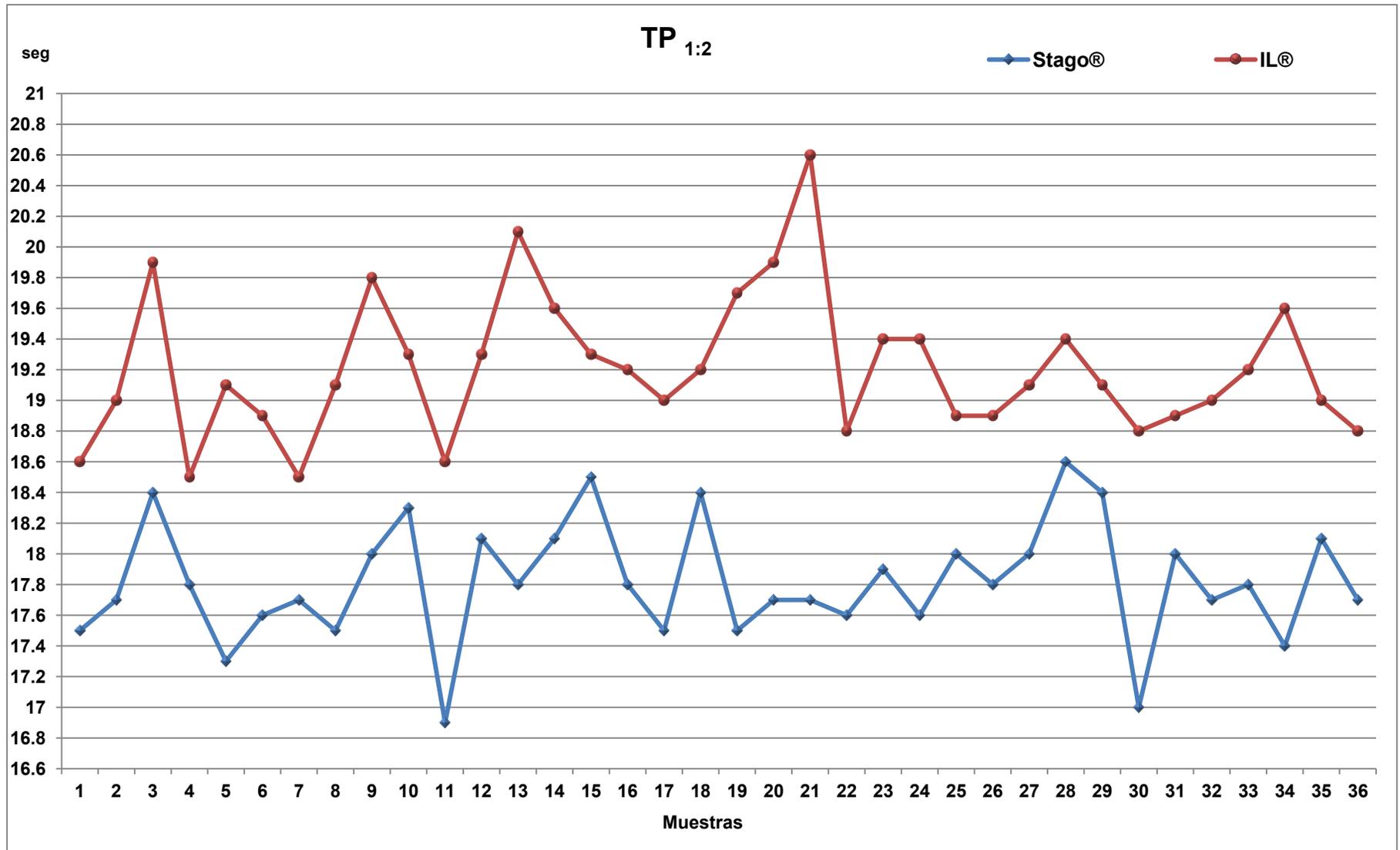
### **8.8 Gráficos de las pruebas del coagulograma básico.**

La comparación de los resultados de TP y TTPa con sus respectivas diluciones entre los equipos Stago® e IL®, se muestran en las siguientes tablas N° 01-05. Los resultados de estas pruebas se expresaron en segundo.

Gráfico 1. Resultados de la prueba de TP<sub>Basal</sub> en los equipos Stago® e IL® en el plasma testigo.



**Gráfico 2. Resultados de la prueba de TP<sub>1:2</sub> en los equipos Stago® e IL® en el plasma testigo.**



**Gráfico 3. Resultados de la prueba de TP<sub>1:4</sub> en los equipos Stago® e IL® en el plasma testigo.**

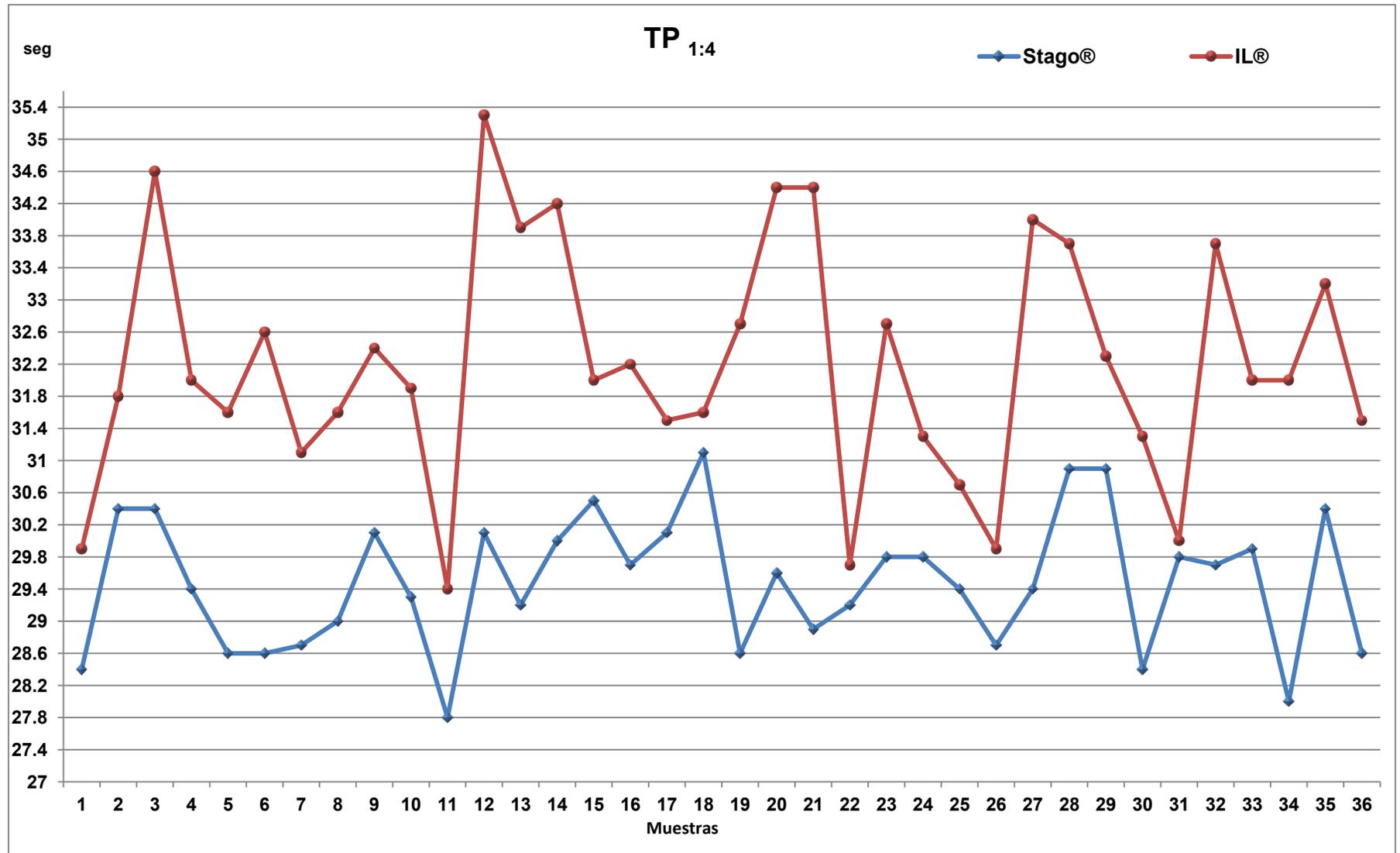


Gráfico 4. Resultados de la prueba de TTPa<sub>Basal</sub> en los equipos Stago® e IL® en el plasma testigo.

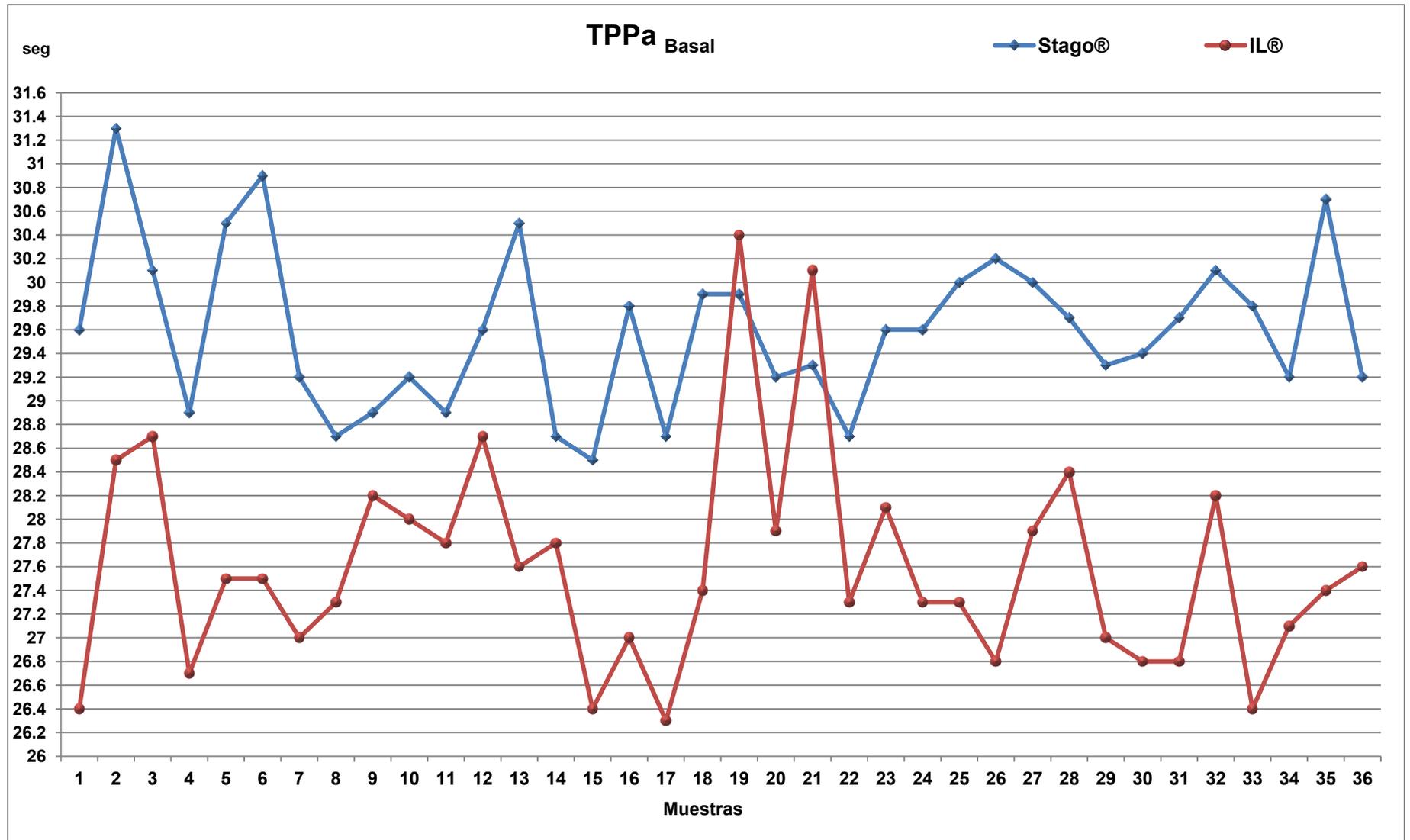
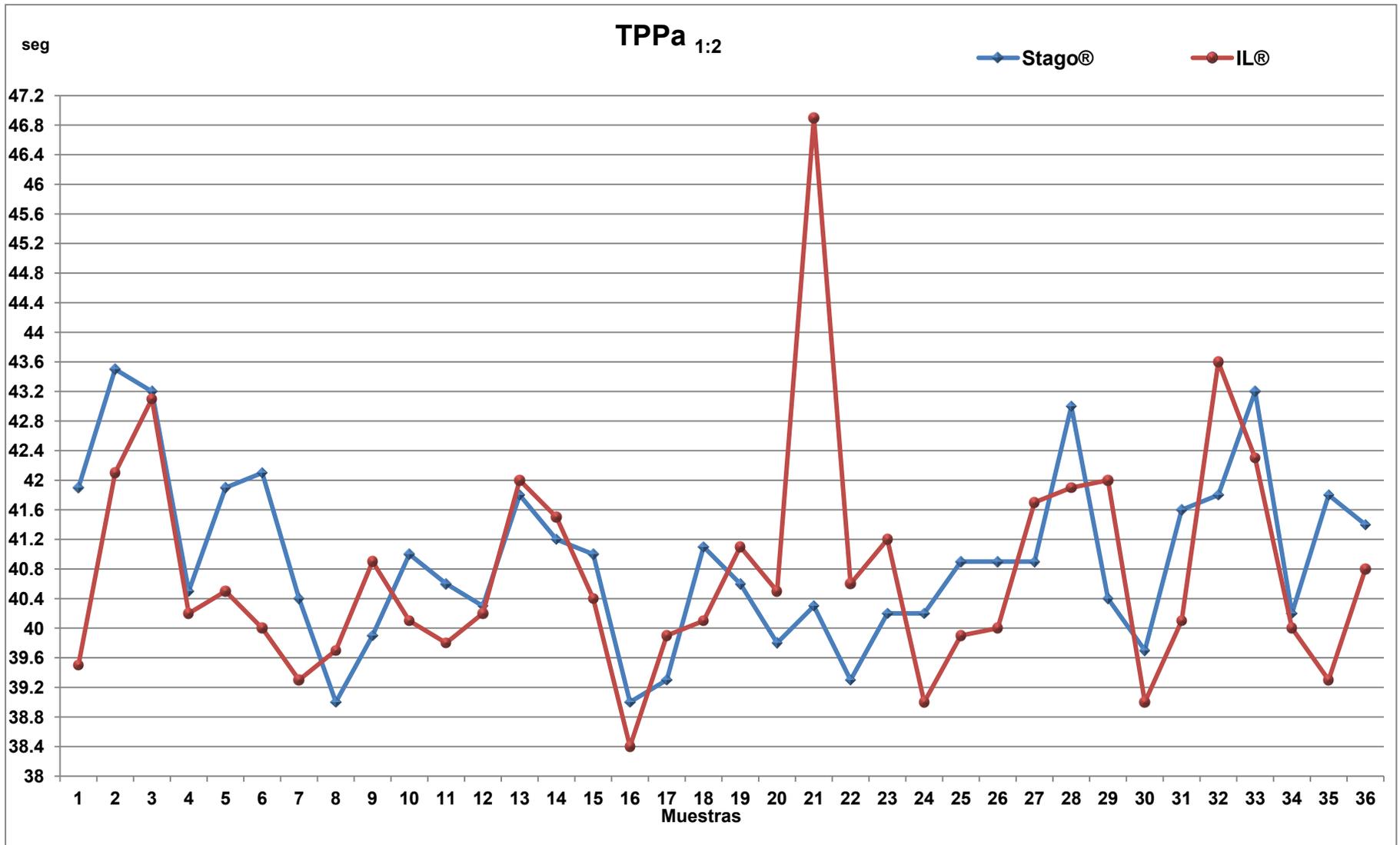
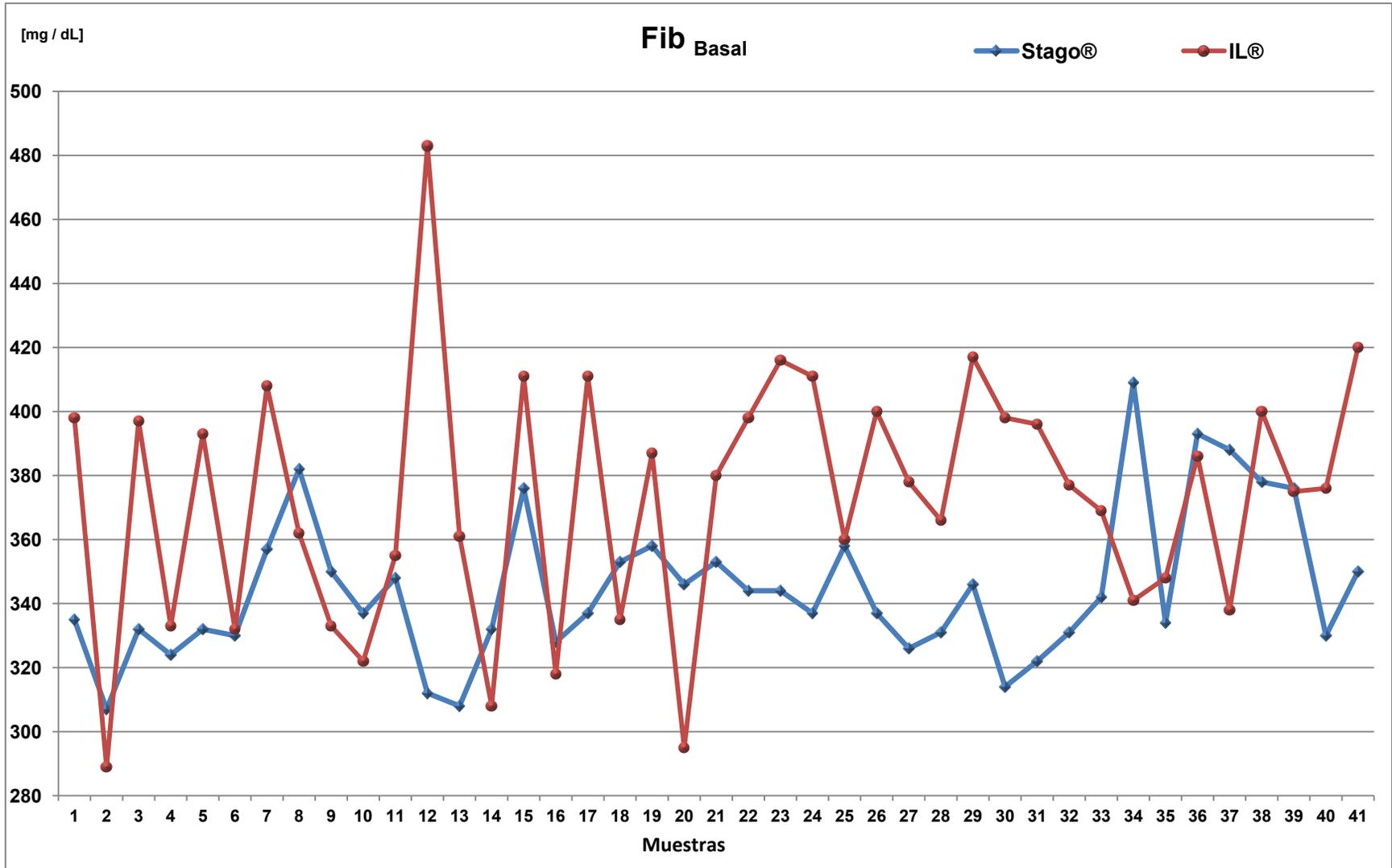


Gráfico 5. Resultados de la prueba de TPPa 1:2 en los equipos Stago® e IL® en el plasma testigo.



**Gráfico 6. Resultados de la determinación de fibrinógeno <sub>Basal</sub> en los equipos Stago® e IL® en el plasma testigo.**



---

## 9. Discusión.

Hasta hoy son pocos los trabajos que han evaluado la concentración de los factores hemostáticos y del sistema de la fibrinólisis en nuestro país. En un estudio realizado para establecer los valores de referencia de la actividad de los factores de la hemostasia en la población mexicana indígena y mestiza, se encontró que el intervalo normal de referencia para el FVIII y FIX de ambas poblaciones no corresponden al intervalo normal de referencia establecido por la Federación Mundial de Hemofilia (**Hernández, 2009**), estos resultados apoyan a la hipótesis de que las concentraciones plasmáticas de los factores hemostáticos difieren de las proporcionadas por las casas comerciales. Con base en estos resultados nos surgió el cuestionamiento acerca de, cuáles eran los valores de referencia de los factores hemostáticos y de la fibrinólisis en el plasma testigo, ya que es el parámetro comparativo para establecer un diagnóstico de laboratorio, al menos para las pruebas dependientes del tiempo de coagulación. Además, el uso del plasma testigo proporciona información valiosa para evaluar el control de la calidad de todas las pruebas realizadas en el diagnóstico de las alteraciones hemorrágicas y trombóticas. Por lo anterior decidimos establecer valores de referencia para las pruebas de coagulación de rutina y especiales realizadas en el laboratorio de especialidades del CMN SXXI, IMSS.

El plasma testigo en el coagulograma básico es un parámetro confiable para el diagnóstico ya que las pruebas que lo conforman presentaron intervalos muy estrechos. No solo eso, su análisis no es costoso, como podría ser el empleo continuo de medias poblacionales. Es decir para establecer una media poblacional se requeriría muestrear una cantidad considerable de individuos aparentemente sanos y de manera constante, lo que involucra inminentemente un costo elevado para cualquier laboratorio de coagulación, además se tendrían que considerar otras variables como son los cambios en los reactivos empleados para la determinación de cada una de las pruebas.

---

Los resultados de nuestro estudio muestran que para la mayoría de las variables estudiadas la distribución fue anormal. En el caso de las pruebas de escrutinio (TP, TTPa y TT) el comportamiento anormal se lo atribuimos a que estas no dependen solamente de un factor, sino que es la mezcla de todos los factores que participan en cada una de las vías los que causan este comportamiento; además de que la distribución de cada uno de ellos es anormal en su mayoría.

Debido a la distribución anormal de las pruebas de escrutinio la media no es un valor confiable para utilizar como testigo ya que un valor puede encontrarse alejado de ésta sin llegar a ser un valor patológico (**Calzada y Moreno, 2012**).

El fibrinógeno es un reactante de fase aguda, participa en la hemostasia secundaria y es considerado un factor de riesgo de enfermedad arterial coronaria, cerebrovascular y vascular periférica en la población general (**Sechi, 2000**). Aunque los valores de referencia obtenidos se encuentran dentro del rango que marcan las casas comerciales, el valor es más estrecho en la población de estudio que en la proporcionada por la casa comercial, la importancia de esto radica ya que se ha demostrado que el aumento en la concentración del fibrinógeno eleva el riesgo de complicaciones en los enfermos diabéticos y ya que la Diabetes mellitus tipo 2 ocupó el segundo lugar de causa de mortalidad en México en el 2004 según datos proporcionados por la Secretaria de Salud creemos que es de suma importancia que el laboratorio de coagulación tenga bien establecido el rango normal de la concentración plasmática de fibrinógeno.

La determinación del DD en el plasma testigo no es una práctica de rutina en el laboratorio de coagulación, sin embargo nosotros obtuvimos sus VR que pueden ser utilizados en la práctica clínica. Al comparar nuestros VR con los VR de la casa comercial Stago<sup>®</sup>, encontramos prácticamente que son los mismos. Es decir valores por arriba de 4 µg/mL incrementa la posibilidad de que el plasma en estudio refleje un estado híperfibrinolítico.

---

Entre las pruebas especiales de coagulación se encuentra la determinación del porcentaje de actividad de los factores hemostáticos en donde un aumento o disminución de estos determinan la tendencia que tiene el paciente a tener hemorragias o trombosis. En el caso de las personas hemofílicas en donde se encuentra disminuido dependiendo del tipo de hemofilia ya sea A (FVIII), B (FIX) y algunos autores postulan la hemofilia C cuya disminución se encuentra en el FXI, es de suma importancia que se cuente con el resultado de un plasma testigo que garantice que el diagnóstico de laboratorio sea el correcto. Hacemos énfasis en que los VR para los factores hemostáticos, anticoagulantes naturales y proteínas fibrinolíticas no deben de usarse para establecer el diagnóstico de hemofilia o trombofilia; por lo que los VR del plasma testigo deben limitarse al control de calidad. Por ejemplo si en un paciente con sospecha de hemofilia A, se determina en el laboratorio que tiene una actividad de FVIII = 59% y 164% para el plasma testigo, entonces si consideramos nuestros resultados no se podría realizar el diagnóstico debido a que la concentración de FVIII del plasma testigo se encuentra fuera de los rangos de referencia, independientemente de que el control de calidad del equipo haya sido satisfactorio.

Interesantemente observamos que el intervalo de referencia para las pruebas que evalúan la presencia de AL no fue estrecho, como para el resto de las pruebas coagulométricas (TP, TTPa y TT). En primera instancia se pensaría que usar la prueba de escrutinio de AL (Lac S) no sería lo más adecuado para emitir un diagnóstico de AL debido a la variabilidad analítica observada. Sin embargo cuando se emplea la prueba confirmatoria de AL (Lac C) se obtiene el cociente entre la prueba de escrutinio y la confirmatoria, que es el resultado final para establecer la presencia o ausencia de AL, observamos que el intervalo de referencia fue sumamente estrecho (1.0-1.1), lo que nos hace sugerir que esta es una prueba confiable para identificar esta trombofilia frecuente en nuestra población.

---

Por último quisimos comparar si existía diferencias en los resultados de las pruebas de escrutinio del plasma testigo al usar dos equipos comerciales. Encontramos que los resultados para el TP (basal, dilución 1:2 y 1:4) y TTPa (basal, dilución 1:2 y 1:4) fueron diferentes para los dos equipos comerciales. Probablemente esto se deba a la composición de los reactivos (en el caso de IL<sup>®</sup> su activador es sílice micronizada y sus fosfolípidos son de soya y en el caso de Stago<sup>®</sup> su activador es caolín y sus fosfolípidos son cefalina), además de que utilizan métodos de detección diferentes, Stago<sup>®</sup> (mecánico) e IL<sup>®</sup> (óptico). Sin embargo independientemente del análisis estadístico las diferencias entre los dos equipos comerciales son mínimas probablemente esto se deba al estricto control de calidad de cada casa comercial.

Por el contrario la diferencia estadística observada en el Fib no fue mínima ya que, independientemente de que método se haya utilizado para conocer su concentración esta última debería ser al menos muy parecida porque provenía del mismo individuo. La diferencia tiene una explicación sencilla y es que para una de las casas comerciales la concentración de fibrinógeno (derivado del TP) se obtiene a partir del resultado del TP por lo tanto cualquier modificación en el resultado de esta prueba modificaría la concentración de Fib, por lo que personalmente nosotros sugerimos no utilizar esta prueba para el diagnóstico de enfermedades hemostáticas por el laboratorio de coagulación.

---

## 10. Conclusiones.

- Se establecieron los V.R. de las pruebas de escrutinio y especiales de coagulación para el plasma testigo obtenido de donadores de sangre que asistieron al BCS del CMN SXXI.
- El VR obtenido para las pruebas TP, TTPa y TT demuestra que el plasma testigo es un parámetro confiable de laboratorio para establecer diagnóstico de las enfermedades del sistema de coagulación.
- Se establecieron los VR de los factores hemostáticos, anticoagulantes naturales y proteínas fibrinolíticas, por lo que por primera vez conocemos el comportamiento del plasma testigo, por consiguiente los resultados que se obtengan de este último podrán ser utilizados dentro de los parámetros de control de calidad del laboratorio y como un verdadero plasma control normal.
- Se establecieron los VR para el DD y el AL en el plasma testigo, no observamos diferencias respecto a los VR presentes en el inserto de la casa comercial, lo que se sugiere que estos resultados sean utilizados en la práctica clínica en México.
- Los VR de la pruebas de escrutinio y especiales que proporciona la casa comercial (Stago®) discrepan notablemente de los establecidos en el plasma testigo, lo que demuestra que al mezclar los plasmas de donadores de sangre las deficiencias o excesos en los factores de coagulación, anticoagulantes naturales y proteínas fibrinolíticas se compensan.
- Demostramos que los VR de las pruebas de escrutinio TP y TTPa fueron diferentes dependiendo de la casa comercial; sin embargo, la diferencia fue mínima.

- 
- Demostramos que la concentración de Fib no es la misma cuando se determina de un método analítico y otro derivado de un cálculo matemático obtenido a partir del TP que es una prueba que ni siquiera evalúa a esta proteína.

## **11. Perspectivas.**

- Evaluar si los VR establecidos en nuestro estudio serán los mismos con las diferentes casas comerciales establecidas en nuestro país y si estos se modifican con respecto al tiempo.
- Evaluar si es factible obtener un plasma testigo de igual calidad con un número menor de donadores de sangre.
- Conocer si los VR del plasma testigo serían los mismos obtenidos de población infantil.
- Determinar los VR para las pruebas de escrutinio y especiales en la población mexicana.

---

## 12. Bibliografía.

1. McKenzie S: **Hematología Clínica**, 2ª edición, México D.F., Editorial Manual Moderno, 2000; 15: 590-594.
2. Martínez M, Quintana G: **Fisiología de la hemostasia primaria**. En: Martínez M, Quintana G, 2ª ed, México D.F, editorial Prado, 2008; 2: 27-30.
3. Martínez Murillo C. 2003 **Bases de Hemostasia y Trombosis** Gac. Médica México; 139: 28-30.
4. Rao AK: **Molecular basis of platelet function**. Sem Thromb Haemost. 2004; 5:387-8.
5. Quintana G, Martínez M: **Fisiología de la hemostasia secundaria**. En: Martínez M, Quintana G, 2ª ed, México D.F, editorial Prado, 2008; 3: 59-84.
6. Páramo J, Panizo E, Pegenaute C, Lecumberri R: **Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia**. Rev Med Univ Navarra. 2009; 53: 19-23.
7. Carrillo E, Salmerón N, Carvajal R, Contreras D: **Rompiendo un paradigma: del modelo humoral al modelo celular de la coagulación. Su aplicación clínica en el enfermo grave**. Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica Y terapia Intensiva. 2004; 18: 17-23.
8. Samama M, Conard J, Horellou M, Lecompte T: **Physiologie et exploration de l'hémostase**. Paris; Doin, 1990; 81-82, 116-122, 148-149.
9. Mann K, Lawler C, Vehar G, Church W: **Coagulation factor V contains copper ions**. J Biol Chem. 1984; 259: 12949-12951.
10. Brummel K, Paradis S, Butenas S, Mann K: **Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation**. Blood. 2002; 100: 148-152.
11. Osterud B: **The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor**. Sem Hematol. 2001; 38: 2-5.
12. Mann K, Butenas S, Brummel K: **The dynamics of thrombin formation**. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 17-25.
13. Blostein M, Furie B, Rajotte I: **The Gla domain of factor IXa binds to factor VIIIa in the tenase complex**. J Biol Chem, 2003; 278: 31297-31302.
14. London F, Walsh P: **Zymogen factor IX potentiates factor IXa catalyzed factor X activation**. Biochemistry 2000; 39: 9850-9858.
15. Rao L, Rapaport S: **Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation**. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 6687-6691.
16. Neuenschwander P, Jesty J: **Thrombin-activated and factor Xa-activated human factor VIII: differences in cofactor activity and decay rate**. Arch Biochem Biophys 1992; 296: 426-434.

- 
17. Monkovic D, Tracy P: **Activation of human factor V by factor Xa and thrombin**. *Biochemistry* 1990; 29: 1116-1128.
  18. Bonno N, Joost C: **Fibrinolysis and the Contact System: A role for Factor XI in the Down-Regulation of Fibrinolysis**. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 243-250.
  19. Revak S, Cochrane C, Bouma B, Griffin J: **Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma**. *J. Exp. Med.* 1978; 147: 719-729.
  20. Ribba A, Lavergne J, Girma J, Meyer D: **Bases moléculaires de la maladie de Willebrand**. *Hématologie*, 1995; 3: 191-198. (FvW)
  21. Neubauer M, Ramschak H, Lanzer G: **Antithrombin III, the most important inhibitor of hemostasis**. *Physiology and clinical aspects*. *Wien Med Wochenschr* 1986; 136: 560-562.
  22. Menache D, Grossman B, Jackson C: **Antithrombin III: physiology, deficiency, and replacement therapy**. *Transfusion*. 1992; 32: 580-582.
  23. de Agostini A, Watkins S, Slayter H: **Localization of anticoagulant active heparin sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta**. *J Cell Biol* 1990; 11: 1293.
  24. Meillón G, Nacho V: **Regulación antitrombótica de la hemostasia**. En: Martínez M, Quintana G, 2ª ed, México D.F, editorial Prado, 2008; 5: 134-140.
  25. Laszik Z, Mitro A, Taylor F: **The human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway**. *Circulation* 1997; 96: 3633.
  26. Hackeng T, Veer C, Meijers J: **Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa**. *J Biol Chem* 1994; 269: 21051.
  27. Shen L, He X, Dahlbäck B: **Synergistic cofactor function of factor V and protein S to activated protein C in the inactivation of the factor VIIIA-Factor IXa complex**. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1030.
  28. De la Peña D, Anglés C: **El sistema de la fibrinólisis y mecanismos de regulación**. En: Martínez M, Quintana G, 2ª ed, México D.F, editorial Prado, 2008; 6: 149-154.
  29. Mosesson MW: **Fibrin polymerization and its regulatory role in hemostasis**. *J Lab Clin Med.* 1990; 116: 8-17.
  30. Fleury V, Anglés C: **Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines**. *Biochemistry.* 1991; 30: 7630-7638.

- 
31. Potempa J, Korzus E, Travis J: **The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation.** J Biol Chem. 1994; 269: 15957-15960.
  32. Rouy D, Anglés C: **The mechanism of activation of plasminógeno at the fibrin surface by tissue-type plasminógeno activator in a plasma milieu in vitro: role of  $\alpha_2$ -antiplasmin.** Biochem. J 1990, 271: 51-57.
  33. Wohl R, Sinio L, Robbins K: **Methods for studying fibrinolytic pathway components in human plasma.** Thromb Res 1982; 27: 525-535.
  34. Matsuo O, Kosugi T, Mihara H:  **$\alpha_2$ -plasmin inhibitor levels in relation to models of urokinase administration.** Thromb Res 1980; 19: 271-275.
  35. Lasierra J, Diez M, Perera C: **Plasmin inhibitors in different fibrinolytic treatment patterns.** Haemostasis. 1981; 10: 51-62.
  36. Aoki N, Sakata Y, Matsuda M: **Fibrinolytic states in a patient with congenital deficiency of  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor.** Blood 1980; 55: 483-488.
  37. De Maistre E, Wahl D, Lecompte T et al: **Déficit en plasminogéne et thrombophilie.** Sang Thromb Vaiss. 1995; 7: 493-498. (8)
  38. Aoki N, Moroi N, Sakata Y et al: **Abnormal plasminógeno. A hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis.** J Clin Invest. 1978; 61: 1186-1195. (9)
  39. Soria J, Soria C, Samama M: **A plasminógeno assay using a chromogenic synthetic substrate: results from clinical work and from studies of thrombolysis.** E: 3, Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Ed. Davidson J, Rowan R, Samama M, Desnoyers P, Raven Press New York, 1978: 337-346. (10)
  40. Razo D: **Síndrome antifosfolipidos y anticoagulante lúpico, anticuerpos antifosfolipidos.** Rev. Mex Patol Clin, México 2000; Vol 47, 3: 168-171.
  41. Calzada A, Moreno M: **Valores de referencia para las pruebas de coagulación en México: utilidad de la mezcla de plasmas de donadores de sangre.** Rev. Investigación clínica, México 2012; Vol 64, 5: 437-443.
  42. Comisión valores de referencia de la SEQC: **Concepto de valores de referencia en Química Clínica.** Quím Clín 1991; 10(1): 56-58.
  43. Comisión valores de referencia de la SEQC: **Producción y utilización de valores de referencia.** Quím Clín 1991; 6(1): 49-68.
  44. González J: **Técnicas y métodos de laboratorio clínico.** 2ª ed, Barcelona, España, Ed. Masson, 2004; 8: 95-99.
  45. Suardíaz J, Cruz C, Colina A: **Laboratorio Clínico.** 1ª ed, La Habana, Ed. Ciencias Médicas, 2004; 7: 61-65.
  46. Walter L, Martínez V: **Estadística descriptiva con énfasis en salud pública.** 1ª edición, Editorial La Hoguera, 2003; 6: 99-100.

- 
47. Thomas L, Sochynsky C: **Multiple measuring modes of coagulation instruments**. Clin Hemost Rev, 1999; 13: 8.
  48. Rodak B: **Diagnostic Hematology**. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 626-631.
  49. Quick A: **The Development and Use of the Prothrombin Tests**. Circulation. 1959; 19: 92-96.
  50. White G: **The partial thromboplastin time: defining an era in coagulation**. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003: 2267-2270.
  51. Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L: **Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the Southern Copperhead (Agkistrodon contortrix) snake**. Toxicon 25:239-252, 1987.
  52. Martinoli JL, Stocker K: **Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator**. Thromb Res 43:253-264, 1986.
  53. Thiagarajan P: **The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants**. Blood, 1986; 68, 4, 869-874.
  54. Martínez M, Gaminio G, Quintana G, Reyes M: **Evaluación e interpretación de las pruebas de hemostasia**. En: Martínez M, Quintana G, 2ª ed, México D.F, editorial Prado, 2008; 7: 205-206.

---

## ANEXO N° 01

### **TIEMPO DE PROTROMBINA (TP, STAGO®) Determinación Coagulométrica.**

Esta prueba evalúa la vía extrínseca y común de la coagulación es decir la actividad de los factores II, V, VII y X. Tras la adición de tromboplastina completa (Factor Tisular y fosfolípidos que sirven de anclaje para los factores) y calcio al plasma citratado, se van a desencadenar una serie de reacciones en cascada en donde el FT presente en la tromboplastina se une al factor VII presente en el plasma, el complejo FT/VIIa va a convertir al factor X en factor Xa luego el factor Xa/Va media la activación de protrombina a trombina seguida por la conversión de fibrinógeno a fibrina soluble que después por acción del factor XIII forma el polímero de fibrina insoluble resultando en la formación de un coagulo estable de fibrina , por lo tanto esta prueba mide el tiempo transcurrido en segundos entre la adición de tromboplastina-calcio y la formación del coagulo.

#### Técnica.

50 µL de plasma (calibrador, control, paciente o problema), incubar a 37 °C / 4 minutos, después añadir 100 µL de la solución de tromboplastina (TP) preincubada, en ese momento cronometrar y detener hasta la formación del coágulo.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.  
STA PreciClot Plus II plasma control patológico.  
Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas  
a -20 °C durante 4 semanas  
a -70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente)

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que los reactivos salen de refrigeración se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se disuelve el reactivo de tromboplastina con 10 mL de su diluyente (solución de cloruro de calcio). El plasma de calibración se reconstituye con 1 mL de agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 8 horas de 18 a 25 °C.

#### Bibliografía.

- Beese H: **Critical evaluation of the so far experience using th WHO model of prothrombin time calibration and outlook for further development.** Haemostasis 1988; 18:181-182.
- Calzada A, Moreno M: **Valores de referencia para las pruebas de coagulación en México: utilidad de la mezcla de plasmas de donadores de sangre.** Revista de Investigación Clínica 2012; 64: 437-446.
- Moreno M: **Consenso sobre la estandarización de las pruebas de coagulación. Las recomendaciones nacionales del grupo Cooperativo Mexicano de Hemostasia y Control de Calidad.** Hemostasia y Trombosis 2008; 2: 102-114.
- Martínez C; Quintana S: **Hemostasia y Trombosis.** 2ª edición, editorial Prado 2008; 7: 182.

---

## ANEXO N° 02

### TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (TTPa, STAGO®) Determinación Coagulométrica.

El TTPa nos va a permitir evaluar a la vía intrínseca y común de la coagulación es decir a los factores VIII, IX, XI, XII, X, V, II y Fibrinógeno. La prueba consiste en añadir al plasma una tromboplastina parcial y un agente activador como lo son el ácido eláxico, la sílica o el caolín esto iniciara la activación de los factores de contacto en donde los factores XII y XI son activados en presencia de cofactores, precalicreina y Cininogeno de Alto Peso Molecular (CAPM); después se agrega  $Ca^{2+}$  a la mezcla en donde el factor XIa va a convertir al factor IX en factor IXa y este a su vez formara un complejo con el factor VIIIa activando al factor X, luego el factor Xa/Va media la activación de protrombina a trombina seguida por la conversión de fibrinógeno a fibrina soluble que después por acción del factor XIII forma el polímero de fibrina insoluble. Por lo tanto esta prueba mide el tiempo transcurrido en segundos entre la adición del calcio y la formación del coágulo.

#### Técnica.

A 50 µL de plasma (calibrador, control, paciente o problema) se le agregan 50 µL de reactivo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPa), incubar a 37° C / 4 minutos, después añadir 50 µL de la solución de  $CaCl_2$  0.025 M preincubado, cronometrar y observar la formación del coágulo.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.  
STA PreciClot Plus II plasma control patológico.  
Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas  
a - 20 °C durante 4 semanas  
a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente)

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que los reactivos salen de refrigeración se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, se disuelve el reactivo de tromboplastina parcial activada (cefalina) con 10 mL de su diluyente (suspensión de caolín), el plasma de calibración se reconstituye con 1 mL de agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 8 horas de 18 a 25 °C.

#### Bibliografía.

- Langdell R, Wagner R, Brinkhous K: **Effect of antihemophilic factor on one stage clotting test.** J Lab Clin Med 1953; 41:637-647.
- Larrieu M: **Utilisation de la cephaline dans les tests de coagulation.** Nouv Rev Fr Hematol 1957; 12(2): 199-210.
- Martínez C; Quintana S: **Hemostasia y Trombosis.** 2ª edición, editorial Prado 2008; 7: 182.

---

## ANEXO N° 03

### TIEMPO DE TROMBINA (TT, STAGO®) Determinación Coagulométrica.

EL TT es una prueba que nos va a permitir evaluar la última fase de coagulación, es decir, la función y calidad del fibrinógeno. La trombina es una enzima altamente específica que actúa sobre el fibrinógeno, transformándolo en fibrina y no se encuentra en sangre circulante. También se utiliza como una prueba para evidenciar la presencia de heparina en la muestra del paciente siendo una de las causas de un tiempo prolongado, sin embargo existe una variante de esta prueba el Tiempo de Reptilasa que utiliza veneno de víbora del género *Bothrops atrox* en vez de trombina. Este veneno no se ve influenciado por la presencia de tratamientos con heparina, siendo muy útil para realizar diagnósticos de comprobación.

#### Técnica.

100 µl de plasma (calibrador, control, paciente o problema), incubar a 37 °C / 4 minutos, después añadir 100 µL de la solución de trombina (TT) preincubada, en ese momento cronometrar y detener hasta la formación del coágulo.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.  
STA PreciClot Plus II plasma control patológico.  
Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.  
a - 20 °C durante 4 semanas.  
a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37°C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan los reactivos de refrigeración se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve la Trombina con 2 mL de agua destilada, el plasma de calibración se reconstituye con 1 mL de agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 8 horas de 18 a 25 °C.

#### Bibliografía.

- Moreno M: **Consenso sobre la estandarización de las pruebas de coagulación. Las recomendaciones nacionales del grupo Cooperativo Mexicano de Hemostasia y Control de Calidad.** Hemostasia y Trombosis 2008; 2: 102-114.
- Bennett S, Lehman C, Rodgers G: **Laboratory Hemostasis.** Editorial Springer 2007; 5: 85-102.
- Silva M: **Laboratorio de hematología.** Editorial Eduforma, 2006; 155-192.

---

## ANEXO N° 04

### **DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO (Fib, STAGO®) Determinación Coagulométrica.**

El método fue descrito por Von Clauss en 1957, es un tiempo de trombina modificado en donde para iniciar la coagulación se agrega un exceso de trombina al plasma del paciente que ha sido diluido 1:20, esta dilución lo que hace es disminuir el efecto de sustancias que interfieran en la reacción como la heparina y los PDF´s. La alta concentración de trombina asegura la coagulación ya que al haber un exceso la trombina se va a encontrar en una concentración superior sobre el nivel de fibrinógeno, por lo tanto la prueba no va a depender de la trombina solamente de la cantidad de fibrinógeno presente. La prueba requiere de un plasma de referencia con una concentración conocida de fibrinógeno, este plasma esta calibrado contra un estándar internacional. Al agregar el exceso de trombina al plasma diluido del paciente se comienza a medir el tiempo que transcurre entre la adición y la formación del coagulo, este tiempo se va a interpolar en la curva de calibración para poder obtener los resultados expresados en [mg/dL].

#### Técnica.

Se diluye el plasma (calibrador, control, paciente o problema) 1:20, tomar 100 µl de plasma diluido, incubar a 37 °C / 4 minutos, después añadir 50 µL de trombina, cronometrar y observar hasta la formación del coágulo.

#### Valoración.

La curva de calibración se construye realizando diluciones del plasma de referencia (de concentraciones 1:5 – 1:40) para dar un rango de concentraciones de fibrinógeno. El tiempo de coagulación de cada una de estas diluciones se establece (utilizando muestras por duplicado) y los resultados (tiempo de coagulación en segundos y concentración en mg/dL ) se grafican en una papel logarítmico, se debe observar un comportamiento lineal dentro del intervalo de 10 a 50 segundos.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.

STA PreciClot Plus II plasma control patológico.

Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.

a - 20 °C durante 4 semanas.

a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan los reactivos de refrigeración se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve la Trombina con 2 mL de agua destilada, el plasma de calibración se reconstituye con 1 mL de agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 8 horas de 18 a 25 °C.

---

## ANEXO N° 05

### **DETERMINACION DE DIMEROS D (D-DI, STAGO®)** **Determinación Inmunológica.**

Son productos de degradación de la fibrina. Posterior a la formación del polímero de fibrina, el factor XIII lo estabiliza, después de la lisis del coagulo de fibrina la plasmina degrada el coagulo liberando fragmentos de diferentes tamaños (fragmentos X, Y, E, D y Dímeros D). Numerosos estudios han demostrado que el Dímero D puede ser usado para diagnosticar pacientes con tromboembolismo venoso, o tromboembolia pulmonar en combinación con los datos clínicos. La muestra (calibrador, control o pacientes) se mezcla con una suspensión de partículas de látex recubiertas de anticuerpos monoclonales que aglutinan en presencia de los Dímeros D. Esta aglutinación provoca una mayor dispersión de la luz que se mide como un aumento de la densidad óptica. Extraer el cambio de la densidad óptica a partir de la curva de calibración.

#### Técnica.

A 50 µl de plasma (calibrador, control, paciente o problema) se le agregan 100 µL del buffer de Dímeros D, incubar a 37 °C / 4 minutos, después añadir 150 µL de partículas de látex con los anticuerpos contra Dímeros D.

#### Valoración.

Se realizo una curva polinomial con un plasma de referencia de concentración exacta de Dímero D, se realizaron diluciones del plasma de calibración para obtener concentraciones a 0.01, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 µg/mL, se mide densidad óptica. Graficar los resultados obtenidos de densidad óptica (nm) en las ordenadas y la concentración de Dímero D en µg/ml en las abscisas.

#### Control de calidad.

STA Liatest Control Normal y patológico.

Plasma Testigo.

#### Valores de referencia del método.

< 5µg/ml.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.

a - 20 °C durante 4 semanas.

a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se mezclan los reactivos buffer TRIS y la suspensión de partículas de látex. Los reactivos son estables durante 15 días a 15-20 °C.

#### Bibliografía.

- Martínez C; Quintana S: **Hemostasia y Trombosis**. 2ª edición, editorial Prado 2008; 7: 191.
- Bounameaux H, Moerloose P, Perrier A: **Plasma measurement of D-Dimer as a diagnostic aid in suspect venous thromboembolism: An overview**. Thromb Haemost 1994; 71: 1-6.

---

## ANEXO N° 06

### **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES VIA INTRINSECA (VIII, IX, XI y XII, STAGO®) Determinación Coagulométrica.**

Estas pruebas se realizan cuando se sospecha de una alteración en uno o varios factores de la vía intrínseca de la coagulación (VIII, IX, XI y XII). La prueba consiste en medir el tiempo de coagulación de la muestra en un sistema que contiene todos los factores de coagulación de modo constante y en exceso, con excepción del factor que se esté evaluando (VIII, IX, XI y XII) ya que este factor va a ser aportado por la muestra analizada. La prueba tiene lugar en presencia del reactivo de TTPa.

#### Técnica.

Se diluye el plasma (calibrador, control, paciente o problema) 1:10 con STA Diluent Buffer. Tomar 50 µL del plasma diluido y agregar 50 µL del reactivo del factor que se esté analizando (VIII, IX, XI y XII), agregar 50 µl del reactivo de TTPa, incubar a 37°C / 4 minutos, después añadir 50 µl de CaCl<sub>2</sub>. Los resultados se expresan en graficas colocando los resultados obtenidos en segundos en las ordenadas contra porcentaje de actividad en las abscisas.

#### Valoración.

Se realiza una curva de calibración con un plasma de referencia de concentración exacta de Factor VIII, IX, XI y XII según sea el caso y se realizan diluciones del plasma con STA Diluent Buffer para obtener porcentajes de actividad (concentraciones) a 100%, 50%, 25% y 12.5%, se mide la actividad del factor y se expresan los resultados en graficas colocando los resultados obtenidos en segundos en las ordenadas contra porcentaje de valor normal abscisas.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.  
STA PreciClot Plus II plasma control patológico.  
Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.  
a - 20 °C durante 4 semanas.  
a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve el reactivo del factor que se está evaluando con 1 mL de agua destilada, se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituido el reactivo es estable 4 horas de 15 - 20 °C.

---

## ANEXO N° 07

### **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES VIA EXTRINSECA (II, V, VII, X, STAGO®) Determinación Coagulométrica.**

Estas pruebas se realizan cuando se sospecha de una alteración en uno o varios factores de la vía extrínseca de la coagulación (II, V, VII y X). La prueba consiste en medir el tiempo de coagulación de la muestra en un sistema que contiene todos los factores de coagulación de modo constante y en exceso, con excepción del factor que se esté evaluando ya que este factor va a ser aportado por la muestra analizada. Por ejemplo si está evaluando la actividad del factor VII el sistema va a tener todos los demás factores excepto el factor VII y la actividad del factor VII será proporcionada por la muestra (calibrador, control o pacientes) analizada.

La prueba tiene lugar en presencia del reactivo de TP.

#### Técnica.

Se diluye el plasma (calibrador, control, paciente o problema) 1:10 con STA Diluent Buffer. Tomar 50 µL del plasma diluido y agregar 50 µL del reactivo del factor que se esté analizando (II, V, VII y X), incubar a 37°C / 4 minutos, después añadir 100 µl del reactivo de TP. Los resultados se expresan en graficas colocando los resultados obtenidos en segundos en las ordenadas contra porcentaje de actividad en las abscisas.

#### Valoración.

Se realiza una curva de calibración con un plasma de referencia de concentración exacta de Factor II, V, VII y X según sea el caso y se realizan diluciones del plasma con STA Diluent Buffer para obtener porcentajes de actividad (concentraciones) a 100%, 50%, 25% y 12.5%, se mide la actividad del factor y se expresan los resultados en graficas colocando los resultados obtenidos en segundos en las ordenadas contra porcentaje de valor normal abscisas.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.

STA PreciClot Plus II plasma control patológico.

Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.

a - 20 °C durante 4 semanas.

a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve el reactivo del factor que se está evaluando con 1 mL de agua destilada, se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituido el reactivo es estable 4 horas de 15 - 20 °C.

---

## ANEXO N° 08

### DETERMINACION DE FACTOR DE VON WILLEBRAND (FvW, STAGO®) Determinación Inmunoturbidimétrico.

El factor de von Willebrand juega su papel en la adhesión de las plaquetas al unirse a la colágena presente en el subendotelio además participa transportando al factor VIII de la coagulación y protegiéndolo de la degradación por enzimas proteolíticas presentes en el plasma. Esta prueba *in vitro* nos sirve para la determinación cuantitativa del factor de von Willebrand en el plasma citratado con el método Inmunoturbidimétrico. Al añadir las partículas de látex recubiertas de anticuerpos policlonales específicos de FvW a la muestra (calibrador, control o pacientes) estas aglutinarán en presencia del antígeno FvW presente en la muestra. Esta aglutinación provoca una fuerte dispersión de la luz que se mide como un aumento de la densidad óptica. En el intervalo de medición, la densidad óptica cambia según la concentración del FvW.

#### Técnica.

Se diluye el plasma (calibrador, control, paciente o problema) 1:2 con STA Diluent Buffer. Tomar 50 µL del plasma diluido, mezclar con 100 µL de buffer de glicina, y agregar 150 µL del reactivo con partículas de látex y se mide la densidad óptica de la reacción.

#### Valoración.

Se realiza una curva de calibración con un plasma de referencia de concentración exacta de FvW se realizan diluciones del plasma de calibración con STA Diluyente Buffer para obtener concentraciones 1:2, 1:3 y 1:6 medir la actividad de FvW como se menciona anteriormente. Graficar los resultados obtenidos de densidad óptica (nm) en las ordenadas y la concentración de FvW en porcentaje en las abscisas.

#### Control de calidad.

STA Liatest Control Normal y patológico.  
Plasma Testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.

a - 20 °C durante 4 semanas.

a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador, los reactivos (buffer de glicina y partículas de látex) se dejan reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se resuspenden las partículas de látex con el buffer de glicina. Se mezclan los reactivos y se dejaron reposar 15 min a temperatura ambiente. Los reactivos son estables durante 15 días a 15-20 °C.

#### Bibliografía.

- Ribba A, Lavergne J, Girma J: **Bases moléculaires de la maladie de Willebrand.** Hématologie 1995; 3: 191-198.
- Verweij C: **Biosynthesis of human von Willebrand factor.** Haemostasis 1988; 18: 224-245.
- Nishino M, Girma J, Rothschild C: **New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII.** Blood 1989; 74, 5: 1591-1599.
- Newman D, Henneberry H, Price C: **Particle enhanced light scattering immunoassay.** Ann Clin Biochem 1992; 29: 22-42.

---

## ANEXO N° 09

### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA PROTEINA C (PC, STAGO®)

#### Determinación Coagulométrica.

La proteína C (PC) es un anticoagulante natural que regula la actividad procoagulante de los factores V y VIII. El reactivo de la PC abarca las funciones esenciales de la PCa, como la proteólisis de los factores V y VIII y su sinergia con la PS. A la muestra prediluida (calibrador, control o paciente) se le añade, plasma deficiente en proteína C y un activador específico de la proteína C (veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix*) que esta coliofilizado con reactivo de TTPa, esto va a activar la proteína C de la muestra y además al adicionar la solución de cloruro de calcio se iniciara la activación de la vía intrínseca de la coagulación. El TTPa transcurrido bajo estas condiciones se determina únicamente mediante la actividad de la proteína C de la muestra, ya que después de añadir el plasma deficiente de proteína C, la mezcla de la reacción contiene los otros factores en exceso. La proteína C activada va a inhibir a los factores Va y VIIIa prolongando el TTPa. Cuando un plasma de paciente se mezcla con plasma deficiente en Proteína C, la prolongación del tiempo de coagulación es proporcional a la cantidad de Proteína C presente en el plasma de paciente.

#### Técnica.

Se diluye el plasma (calibrador, control, paciente o problema) 1:10 con STA Diluent Buffer. Tomar 50 µL del plasma diluido, añadir 50 µL de plasma deficiente en proteína C y agregar 50 µL de activador de proteína C, incubar a 37 °C / 4 minutos, después adicionar 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 0.025 M preincubado y se determina el tiempo de formación del coágulo.

#### Valoración.

Se realiza una curva de calibración con un plasma de referencia de concentración exacta de PC, se realizan diluciones del plasma con STA Diluent Buffer para obtener porcentajes de actividad (concentraciones) a 100%, 50%, 25% y 12.5%, se mide la actividad de la PC como se menciona anteriormente, los resultados se expresan en graficas colocando los resultados obtenidos en segundos en las ordenadas contra porcentaje de actividad en las abscisas.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.  
STA PreciClot Plus II plasma control patológico.  
Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.  
a - 20 °C durante 4 semanas.  
a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve el activador de PC y el plasma deficiente en PC con 1 mL de agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 8 horas de 18 a 25 °C.

---

Bibliografia.

- Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L: **Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the Southern Copperhead (Agkistrodon contortrix) snake.** *Toxicon* 25:239-252, 1987.
- Martinoli JL, Stocker K: **Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator.** *Thromb Res* 43:253-264, 1986.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline—Fifth Edition.** CLSI document H21-A5 Vol. 28, No. 5, 2008.
- Stenflo J: **Structure and function of protein C.** *Semin. Thromb. Haemost.*, 1984; 10, 2, 109-121.
- Walker FJ: **Protein S and the regulation of activated protein C, Semin. Thromb. Haemost., 1984;10, 2, 131-138.**

---

## ANEXO N° 10

### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA PROTEINA S (PS, STAGO®)

#### Determinación Coagulométrica.

El principio de esta prueba se basa en que la PS actúa como cofactor de la PCa para aumentar su efecto inhibitor sobre los factores V y VIII activados. De esta forma, la PS prolonga el tiempo de coagulación de un sistema enriquecido con FVa el cual es un sustrato fisiológico para la PCa.

#### Técnica.

Se diluye el plasma (calibrador, control, paciente o problema) 1:10 con STA Diluent Buffer. Tomar 50 µL del plasma diluido, añadir 50 µL plasma deficiente en proteína S y agregar 50 µL de proteína C activada y 50 µL de factor Va bovino, se incuba a 37°C / 4 minutos, después adicionar 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 0.025 M y se determina el tiempo de formación del coágulo.

#### Valoración.

Se realiza una curva de calibración con un plasma de referencia de concentración exacta de PS y se realizan diluciones del calibrador con STA Diluent Buffer para obtener porcentajes de actividad (concentraciones) a 100%, 50%, 25% y 12.5%, se mide la actividad de la PS como se mencionó anteriormente y se expresan los resultados en graficas colocando los resultados obtenidos en segundos en las ordenadas contra porcentaje de actividad en las abscisas.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.  
STA PreciClot Plus II plasma control patológico.  
Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.  
a - 20 °C durante 4 semanas.  
a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan de refrigeración los reactivos se dejan durante 30 min a temperatura ambiente. Se disuelve el plasma deficiente de PS, el FVa y la PCa con 1 mL de agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente durante 60 min. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 4 horas de 15 a 20 °C.

#### Bibliografía.

- Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli J: **A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate.** Thromb. Haemostasis 1989; 62: 1144-1145.
- Boyer-Neumann C et al. **A new functional assay for human protein S activity.** Fibrinolysis 1990; 4: 1,61.
- Walker F: **Protein S and the regulation of activated protein C.** Semin. Thromb. Haemost. 1984; 10: 131-138.



---

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve la trombina con 6 mL de buffer tris con heparina, se deja reposar 60 min a temperatura ambiente. El sustrato cromogénico, se disuelve con 6 ml de agua destilada se deja reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Una vez reconstituidos la trombina es estable 7 días a 15-20 °C y 45 días de 2 a 8 °C el sustrato cromogénico.

#### Bibliografía.

- Neubauer M, Ramschak H, Lanzer G: **Antithrombin III, the most important inhibitor of hemostasis**. Physiology and clinical aspects. Wien Med Wochenschr 1986; 136: 560-562.
- Menache D, Grossman B, Jackson C: **Antithrombin III: physiology, deficiency, and replacement therapy**. Transfusion 1992; 32: 580-588.
- Thaler E: **Antithrombin-III-Mangel und Thrombophilie**. Hämostaseologie 1985; 5: 127-133.
- Lane D, Olds R, Thein S: **Antithrombin and its deficiency states**. Blood Coagul Fibrinolysis 1992; 3: 315-341.



---

Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 30 min a temperatura ambiente. Se disuelve la plasmina con 2 ml de disolvente con glicerol y el sustrato con 6 ml de agua destilada. Dejar reposar 60 min a temperatura ambiente.

Bibliografía.

- Wohl R, Sinio L, Robbins K: **Method for studying fibrinolytic pathway components in human plasma**. Thromb Res 1982; 27: 525-535.
- Matsuo O, Kosugi T, Mihara H:  **$\alpha_2$ -plasmin inhibitor levels in relation to models of urokinase administration**. Thromb Res 1980; 19: 271-275.
- Lasierra J, Diez M, Perera C: **Plasmin inhibitors in different fibrinolytic treatment patterns**. Haemostasis 1981; 10: 51-62.
- Samama M, Schlegel N, Cazenave B:  **$\alpha_2$ -antiplasmin assay: amidolytic Verstraete M**. La Haye: Martinus Nijhoff, 1980: 93-99.

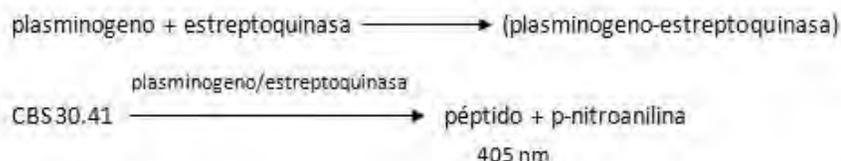
---

## ANEXO N° 13

### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL PLASMINOGENO (PLASMINOGENO, STAGO®) Determinación Colorimétrica.

El plasminógeno es la proteína precursora que forma la plasmina, tras la acción de los activadores del plasminógeno como t-PA, u-PA o la estreptoquinasa. La plasmina, una proteasa de serina, es una potente enzima con una amplia gama de funciones fisiológicas. Es importante determinar los niveles de plasminógeno, ya que la actividad anormal del plasminógeno se ha asociado con distintos cuadros clínicos. La determinación de los niveles de plasminógeno puede ayudar al diagnóstico de trastornos fibrinolíticos (de coagulación sanguínea).

La estreptoquinasa se añade en cantidad excesiva la muestra para determinar su contenido en plasminógeno. La estreptoquinasa y el plasminógeno forman un complejo con una actividad parecida a la plasmina. La cantidad del complejo estreptoquinasa-plasminógeno formado se calcula a partir de su acción sobre el sustrato CBS 30.41 (H-D-But-CHA-Lys-pNA-2AcOH) que forma una p-nitroanilina que se lee a 405nm.



#### Técnica.

Se diluye el plasma (calibrador, control, paciente o problema) 1:20 con STA Diluent Buffer. Tomar 100 µL del plasma diluido y agregar 100 µL de estreptoquinasa, incubar a 37 °C / 4 minutos, después añadir 100 µL de sustrato cromogénico y se determina la p-nitroanilina formada a 405 nm.

#### Valoración.

Se realiza una curva de calibración con un plasma de referencia de concentración exacta de plasminógeno, se realizaron diluciones del plasma de referencia con STA Diluyente Buffer para obtener concentraciones 1:20, 1:30 y 1:60, se mide la actividad del plasminógeno, graficar los resultados obtenidos de densidad óptica (nm) en las ordenadas y la concentración de plasminógeno en porcentaje en las abscisas.

#### Control de calidad.

STA PreciClot Plus I plasma control normal.  
STA PreciClot Plus II plasma control patológico.  
Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.  
a - 20 °C durante 4 semanas.  
a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

---

Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 30 min a temperatura ambiente. Se disuelve la estreptoquinasa y el sustrato cromogénico con 3 ml de agua destilada, se deja reposar 60 min a temperatura ambiente.

Bibliografía.

- De Maistre E, Wahl D, Lecompte T: **Déficit en plasminogène et thrombophilie**. Sang Thromb Vaiss 1995; 7: 493-498.
- Aoki N, Moroi N, Sakata Y: **Abnormal plasminogen. A hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis**. J Clin Invest 1978; 61: 1186-1195.
- Soria J, Soria C, Samama M: **A plasminógeno assay using a chromogenic synthetic substrate: results from clinical work and from studies of thrombolysis**. En: 3, Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Ed. Davidson J, Rowan R, Samama M, Desnoyers P. Raven Press New York, 1978: 337-346.
- Reddy K, Markus G: **Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex**. J Biol Chem 1972; 247: 1683-1691.

---

## ANEXO N° 14

### DETECCION DE LOS ANTICOAGULANTES LUPICOS (AL, STAGO®) Determinación Coagulométrica.

Los anticoagulantes lúpicos son anticuerpos dirigidos contra los complejos fosfolípidos/proteínas que presentan la capacidad de alargar los tiempos de coagulación de las pruebas dependientes de los fosfolípidos.

El STA® - Staclot® dRVV Screen y el STA® - Staclot® dRVV Confirm se utilizan para la detección en el plasma de los anticoagulantes lúpicos mediante el tiempo de veneno de víbora de Russell diluido.

Presente en los reactivos, el veneno de víbora de Russell, activador del factor X en presencia de calcio, desencadena la coagulación a este nivel y elimina la interacción de los factores situados en etapas anteriores.<sup>1</sup> Por tanto, esta prueba es independiente de las anomalías de la fase de contacto y de las que afectan a los factores VIII y IX (déficits o inhibidores).

El Staclot® dRVV Screen se realiza en presencia de una concentración baja de fosfolípidos lo que en presencia de AL, alarga el tiempo de coagulación.

El Staclot® dRVV Confirm contiene una concentración mayor de fosfolípidos que neutralizan los anticuerpos presentes en el plasma. En consecuencia, el tiempo de coagulación observado con el Staclot® dRVV Confirm será más corto que el Staclot® dRVV Screen.

El resultado final se expresa en ratio Screen:

$$\text{Ratio Screen} = \frac{\text{tiempo de coagulación Screen (s) del plasma a analizar}}{\text{tiempo de coagulación Screen (s) del pool}}$$

Si el ratio Screen del paciente es superior a 1.20 el resultado no es normal y se sospecha de la presencia de AL.

El resultado final se expresa en ratio normalizado:

$$\text{Ratio Confirm} = \frac{\text{tiempo de coagulación Confirm (s) del plasma a analizar}}{\text{tiempo de coagulación Confirm (s) del pool}}$$

$$\text{Ratio normalizado} = \frac{\text{ratio Screen}}{\text{ratio Confirm}}$$

La presencia de AL en la muestra se confirma cuando el valor del ratio normalizado es superior o igual a 1.20.

#### Técnica.

Se toman 100 µl de plasma (calibrador, control, paciente o problema) y se incuban a 37°C / 4 minutos, después añadir 100 µl de Staclot® dRVV Screen o Staclot® dRVV Confirm según sea el caso. Cronometrar hasta la formación del coagulo y realizar los cálculos correspondientes.

#### Control de calidad.

Control LA 1+2 (controles negativos y positivos de AL).

Plasma testigo.

---

Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas.

a - 20 °C durante 4 semanas.

a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente).

Estabilidad del reactivo.

Una vez que se sacan del refrigerador los reactivos se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se disuelve el reactivo de Staclot® dRVV Screen y Confirm con 2 mL de agua destilada, se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituido el reactivo es estable 4 horas de 15 - 20 °C.

Bibliografía.

- Thiagarajan P: **The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants**, Blood, 68, 4, 869-874, 1986.
- Triplett D: **A hexagonal phase phospholipid neutralization assay for lupus anticoagulant identification**. Thromb, Haemostasis, 1993. 70; 5: 787-793.
- Arnoux D, Boutiere B, Sanmarco M: **Les anticorps "antiphospholipides": intérêt Clinique et diagnostic biologique**. Ann. Biol. Clin. 2000; 58, 5: 557-574.

---

## ANEXO N° 15

### TIEMPO DE PROTROMBINA (PT-Fibrinogen, IL®) Determinación Coagulométrica.

Esta prueba evalúa la vía extrínseca y común de la coagulación es decir la actividad de los factores II, V, VII y X. Tras la adición de tromboplastina completa (Factor Tisular y fosfolípidos que sirven de anclaje para los factores) y calcio al plasma citratado, se van a desencadenar una serie de reacciones en cascada en donde el FT presente en la tromboplastina se une al factor VII presente en el plasma, el complejo FT/VIIa va a convertir al factor X en factor Xa luego el factor Xa/Va media la activación de protrombina a trombina seguida por la conversión de fibrinógeno a fibrina soluble que después por acción del factor XIII forma el polímero de fibrina insoluble resultando en la formación de un coagulo estable de fibrina , por lo tanto esta prueba mide el tiempo transcurrido en segundos entre la adición de tromboplastina-calcio y la formación del coagulo.

#### Técnica.

30 µL de plasma (calibrador, control, paciente o problema), incubar a 37 °C / 5 minutos, después añadir 60 µL de la solución de tromboplastina (TP) preincubada, en ese momento cronometrar y detener hasta la formación del coágulo.

#### Control de calidad.

Control normal.

Control patológico.

Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas

a -20 °C durante 4 semanas

a -70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente)

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que los reactivos salen de refrigeración se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se disuelve el reactivo de tromboplastina con su diluyente (solución de cloruro de calcio). El plasma de calibración se reconstituye con agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 8 horas de 18 a 25 °C.

#### Bibliografía.

- Miale J, Kent J: **Standardization for the therapeutic range for oral anticoagulants based on standard reference plasmas.** Am. J. Clin. Path. 1972; 57: 80-88.

---

## ANEXO N° 16

### TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA (APTT-SP, IL®) Determinación Coagulométrica.

El TTPa nos va a permitir evaluar a la vía intrínseca y común de la coagulación es decir a los factores VIII, IX, XI, XII, X, V, II y Fibrinógeno. Consiste en añadir al plasma citratado una tromboplastina parcial y un agente activador como el sílice esto iniciara la activación de los factores de contacto. El sílice estimula la activación de factor XII. Esta activación por contacto se realiza a 37 °C durante un determinado periodo de tiempo. La adición del cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) desencadena las reacciones posteriores que producirá la formación del coágulo. Los fosfolípidos son necesarios para la formación de los complejos que activaran al factor X y a la protrombina.

#### Técnica.

A 40 µL de plasma (calibrador, control, paciente o problema) se le agregan 40 µL de reactivo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPa), incubar a 37° C / 5 minutos, después añadir 40 µL de la solución de CaCl<sub>2</sub> 0.025 M preincubado, cronometrar y observar la formación del coágulo.

#### Control de calidad.

Control normal.

Control anormal.

Plasma testigo.

#### Estabilidad de la muestra.

Entre 18 - 25 °C durante 4 horas

a - 20 °C durante 4 semanas

a - 70 °C durante 6 meses (descongelar a 37 °C entre 5 y 10 minutos y procesar inmediatamente)

#### Estabilidad del reactivo.

Una vez que los reactivos salen de refrigeración se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, se disuelve el reactivo de tromboplastina parcial activada (fosfolípidos sintéticos) con su diluyente (sílice), el plasma de calibración se reconstituye con 1 mL de agua destilada, se dejan reposar a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos. Una vez reconstituidos los reactivos son estables 8 horas de 18 a 25 °C.

#### Bibliografía.

- Van den Besselaar, Neuteboom J, Bertina R: **Effect of Synthetic Phospholipids on the response of the Activated Partial Thromboplastin Time to Heparin.** Blood Coag. Fibrin. 1993; 4: 895-903.
- Ray M, Hawson G: **A Comparison of Two APTT Reagents Which Use Silica Activators.** Clin. Lab. Haemat. 1989; 11: 221-232.
- Turi D, Peerschke E: **Sensitivity of Three Activated Partial Thromboplastin Time Reagents to Coagulation Factor Deficiencies.** Am J. Clin. Pathol. 1986; 85: 43-49.