

8 de marzo 1979
18 horas !

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

**Control de Dos Derivados Sanguíneos en un
Banco de Sangre: Factor VIII y Plasma Rico
en Plaquetas**

T E S I S

Que para obtener el título de :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
ANA SILVIA ARIZPE Y OJEDA





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.

D I O S

A Dios le pedí fuerza para grandes logros y me hizo débil para que aprendiera a obedecer humildemente.

Le pedí salud para poder realizar grandes cosas y me dio enfermedad para que aprendiera a hacer cosas buenas.

Le supliqué me concediera riqueza para poder ser feliz y me dio pobreza para que fuera sabio.

Pedí poder para obtener las alabanzas de los hombres y El me dio debilidad para que sintiera la necesidad de Dios.

Pedí todo, para poder disfrutar de la vida y me dio vida para poder disfrutar de todo. No recibí nada de lo que pedí, pero sí todo lo que deseaba. A pesar de mí mismo, las peticiones que no hice me fueron concedidas.

Yo, entre todos los hombres, así me puedo considerar el más afortunado.

Con inmenso cariño a mis padres;

Las palabras no son suficientes para demostrarles mi agradecimiento, porque siempre me han procurado lo mejor, por alentarme y apoyarme haciendome el camino mas ligero. Y se que este trabajo es muy pequeño para compensarlos por todo lo que me han dado.

Al Dr. Hector Rodríguez Moyado.

**Director del Banco Central de Sangre
del Centro Médico Nacional.**

A su Sra. Esposa: Q.F.B. Elisa Q. de Rodríguez.

**Jefe del laboratorio del Banco Central de Sangre
del Centro Médico Nacional.**

**Con profundo cariño y agradecimiento, por haberme
brindado la oportunidad de realizar bajo su acertada
dirección este trabajo en la dependencia a su cargo;
Por sus sabios consejos y ejemplo que lograron
estimular mi estudio para mi superación.**

A la Sra. Q.F.B. Delfina Arrieta de Aguilera:

**Apreciable amiga que me obsequió con sus palabras
de aliento y valiosa ayuda.**

A mis maestros:

Con todo cariño y respeto.

**Al personal del Banco Central de Sangre
del Centro Médico Nacional:**

**Por la ayuda que me brindaron de una
u otra forma.**

S U M A R I O

INTRODUCCION

I. Sistemae hemostáticos.

- a) Fenómenos extravasculares.
- b) Fenómenos vasculares.
- c) Fenómenos intravasculares.

II. Interacción de las plaquetas y colágeno.

GENERALIDADES

I. Las plaquetas.

- a) Antecedentes.
- b) Morfología.
- c) Propiedades físicas y químicas.
- d) Orígen.
- e) Megacariocitos.
- f) Distribución, supervivencia y destrucción.

II. Agregación de las plaquetas.

- a) Posible papel de la trombostenina.
- b) Otros agentes agregantes.

III. Factor VIII.

- a) Medición de la actividad del factor VIII.
- b) Testigo normal para el ensayo del factor VIII.
- c) La unidad de factor VIII.
- d) Método de las dos etapas para el factor VIII.

IV. Crioprecipitado.

- a) Descripción del método para la obtención del factor - VIII en bolsa de plástico durante todo el procedimiento.
- b) Preparación de crioprecipitados; método realizado en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional.

V. Utilidad clínica de las fracciones de la sangre humana preparadas en el Banco de Sangre hospitalario.

MATERIAL Y METODOS

I. Agregación plaquetaria in vitro (método fotocolorimétrico).

- a) Fundamento.
- b) Material empleado.
- c) Técnica.

II. Cuenta de plaquetas.

- a) Material empleado.
- b) Técnica.
- c) Cálculos.

III. Retracción del coágulo.

- a) Material empleado.
- b) Técnica.
- c) Cálculos.

IV. Prueba en dos etapas para el factor VIII.

- a) Fundamento.
- b) Reactivos.
- c) Procedimiento para la prueba de factor VIII.
 - 1. Diluciones.

2. Preparación de la mezcla de incubación.

3. Prueba del activador de protrombina formado.

RESULTADOS

COMENTARIOS

RESUMEN Y CONCLUSIONES

REFERENCIAS

BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

Desde tiempos bíblicos, no se han aceptado los objetos defectuosos o de pobre calidad.

La calidad de un artículo, de un procedimiento o de una determinación, debe ser alta.

Los métodos utilizados para lograr precisión, pureza y exactitud, pueden agruparse dentro del término CONTROL DE CALIDAD. (1)

El control de la calidad y la regularización de los métodos de laboratorio, son temas que están relacionados y-- que tienen una conexión directa con el objetivo primario que debe lograrse en el laboratorio clínico y de salud pública: que el diagnóstico etiológico y/o los recursos terapéuticos sean confiables.

El control de calidad requiere de la disponibilidad de preparaciones de referencia y del conocimiento de los métodos estadísticos simples. Con el fin de asegurar un nivel adecuado de precisión, debe entrenarse al personal del laboratorio en estos procedimientos como parte de su entrenamiento general. (2)

Como ya se mencionó antes, la intención de un laboratorio es el de obtener resultados correctos, no obstante-- ocurren usualmente errores en forma insidiosa y acumulativa. Una pequeña desviación en la técnica o un error menor en los reactivos o el equipo, pueden desatar una cadena de circun-

tancias que llevarán a resultados incorrectos, a productos de pobre calidad o aún peligrosos. Los programas de actualización deben incluir el control de calidad, lo que permitirá probar reactivos, procedimientos e instrumentos y comprobar que los resultados se encuentran dentro de los límites deseados.

Si todos los procedimientos están correctos, el resultado final debe ser bueno; si no están correctos, las -- pruebas de control de calidad localizarán el error, el que podrá ser corregido de inmediato. (3)

La obtención de sangre humana para fines de transfusión, ya sea como sangre completa y/o sus fracciones, es un grave problema no resuelto aún en la mayor parte de los países en vías de desarrollo. El control de la sangre obtenida a nivel de banco de sangre y su empleo en los servicios de transfusión, debe ser hecho con rigor, ya que la sangre es un elemento sumamente valioso y difícil de obtener, por lo que errores en su obtención o en su fraccionamiento, redundan en una deficiente atención de los pacientes.

En nuestro país, la sangre se obtiene en su gran mayoría, de personas retribuidas, llamadas "donadores profesionales"; la cantidad de donaciones obtenidas es muy inferior a las necesidades hospitalarias.

La sangre que se emplea en la transfusión a enfermos es un producto perecedero que únicamente puede ser obtenido de otro humano; el donador de sangre debe ser una persona conciente de que su salud puede ser compartida al donar -

un poco de sangre a un enfermo que la requiere; este compromiso social no puede soslayarse.

Es obvio que ningún dinero puede pagar una donación sanguínea. Los pacientes sometidos a ciertas operaciones quirúrgicas, las mujeres, con problemas, que dan a luz, los enfermos que sangran por motivos de su enfermedad, como los hemofílicos, etc., son algunos de los enfermos necesitados de -- sangre o sus fracciones y su vida dependerá de la cantidad -- y calidad de la sangre que se obtenga de las personas sanas que la donan; el salvar la vida de un enfermo es el único -- precio de la sangre donada.

Los bancos de sangre son los lugares físicos en donde se colecta y procesa ésta. Son servicios complejos en los que los procedimientos para la obtención de sangre y sus -- fracciones deben ser óptimos, así como los reactivos extraídos de ella (sueros tipo, eritrocitos de fenotipo conocido, -- etc.).

La planeación del fraccionamiento de la sangre, debe ser cuidadosa y tener como objetivo, el máximo rendimiento de una unidad de sangre extraída, con el óptimo de calidad.

Los productos obtenidos en el Banco Central de Sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social son: concentrados de plaquetas, concentrado de eritrocitos, globulina anti-hemofílica, plasma rico en plaquetas, plasma pobre en globulina antihemofílica, plasma fresco congelado y gamma globulina.

De éstos, dos de ellos, la globulina antihemofílica y las plaquetas, son subproductos lábiles difíciles de manejar y su calidad depende de un sinnúmero de factores. Por lo que el objetivo de este trabajo es revisar su preparación y actividad en condiciones rutinarias en un banco de sangre.

I. SISTEMAS HEMOSTATICOS.

Hemostasia es el nombre que se dá al conjunto de fenómenos que actúan y detienen el sangrado por un vaso sanguíneo lesionado. El proceso no es sencillo, y debe considerarse como una progresión o cadena de modificaciones físicas y bioquímicas que normalmente son desencadenadas por la lesión de los tejidos y vasos sanguíneos, y que termina por la transformación de la sangre líquida en un trombo o coágulo sólido que tapa con gran eficacia los vasos rotos. El proceso entero puede dividirse en tres partes, las cuales se describen en las figuras 1 y 2.

a) FENOMENOS EXTRAVASCULARES.

Comprenden: 1) el efecto físico de los tejidos circunvecinos (piel, músculo, tejido elástico) que tiende a cerrar y ocluir la abertura en el vaso sanguíneo lesionado, y 2) los efectos bioquímicos de las sustancias liberadas por los tejidos lesionados, que reaccionan con el plasma y los factores de las plaquetas. Este segundo sistema de coagulación o "sistema extrínseco" tal vez desempeñe un papel importante en la activación del mecanismo de coagulación "in--

trínseco" de la sangre misma, en el caso de traumatismo y he
morragia in vivo.

b) FENOMENOS VASCULARES.

El vaso sanguíneo lesionado se cierra casi instantá
neamente. Este proceso, conocido como vasoconstricción, in--
terviene en las primeras fases del control de la hemorragia
después de la lesión del vaso. Esta vasoconstricción nervio-
sa refleja tiende a desaparecer al cabo de un tiempo relati-
vamente corto, pero es posible que se prolongue merced a la
liberación local de una sustancia vasoconstrictora: la sero-
tonina. Esta es liberada por las plaquetas al adherirse o pe
garse a los labios de la herida o a la sección de la pared -
del vaso; produce un estrechamiento local, directo, de origen
bioquímico, del vaso seccionado y de los vasos vecinos.

c) FENOMENOS INTRAVASCULARES.

Comprenden la serie muy compleja de reacciones fisi
coquímicas que transforman la sangre líquida en coágulo sól
ido de fibrina. (4)

II. INTERACCION DE LAS PLAQUETAS Y COLAGENO.

La primera fase de la formación de los trombos pri-
marios (la adherencia) de las plaquetas al colágeno expues-
to) se verifica muy rápidamente. Se conoce aún poco acerca -
de su mecanismo. En una reacción igualmente oscura, el con-
tacto con la colágena dá lugar a que las plaquetas libereb -

de su citoplasma y pongan a disposición de su membrana, unas sustancias específicas para la hemostasia. Estas sustancias comprenden: 1) nucleótidos de la adenina, en particular adenosin difosfato (ADP), 2) factor plaquetario, 3) actividad fosfolipídica necesaria para las reacciones intrínsecas de coagulación, y 4) serotonina y catecolaminas. (5)

TEORIA DE "LOS CUATRO FACTORES" DE LA COAGULACION SANGUINEA

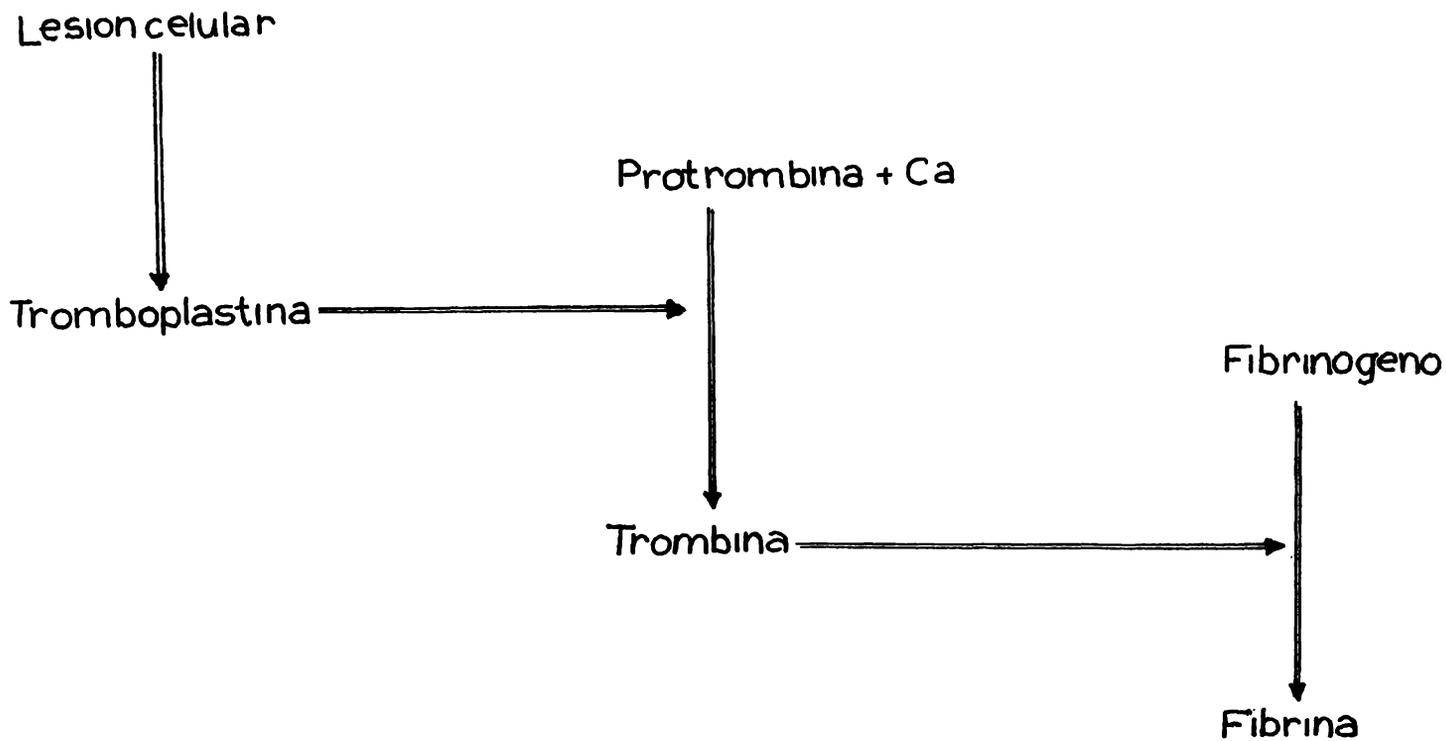
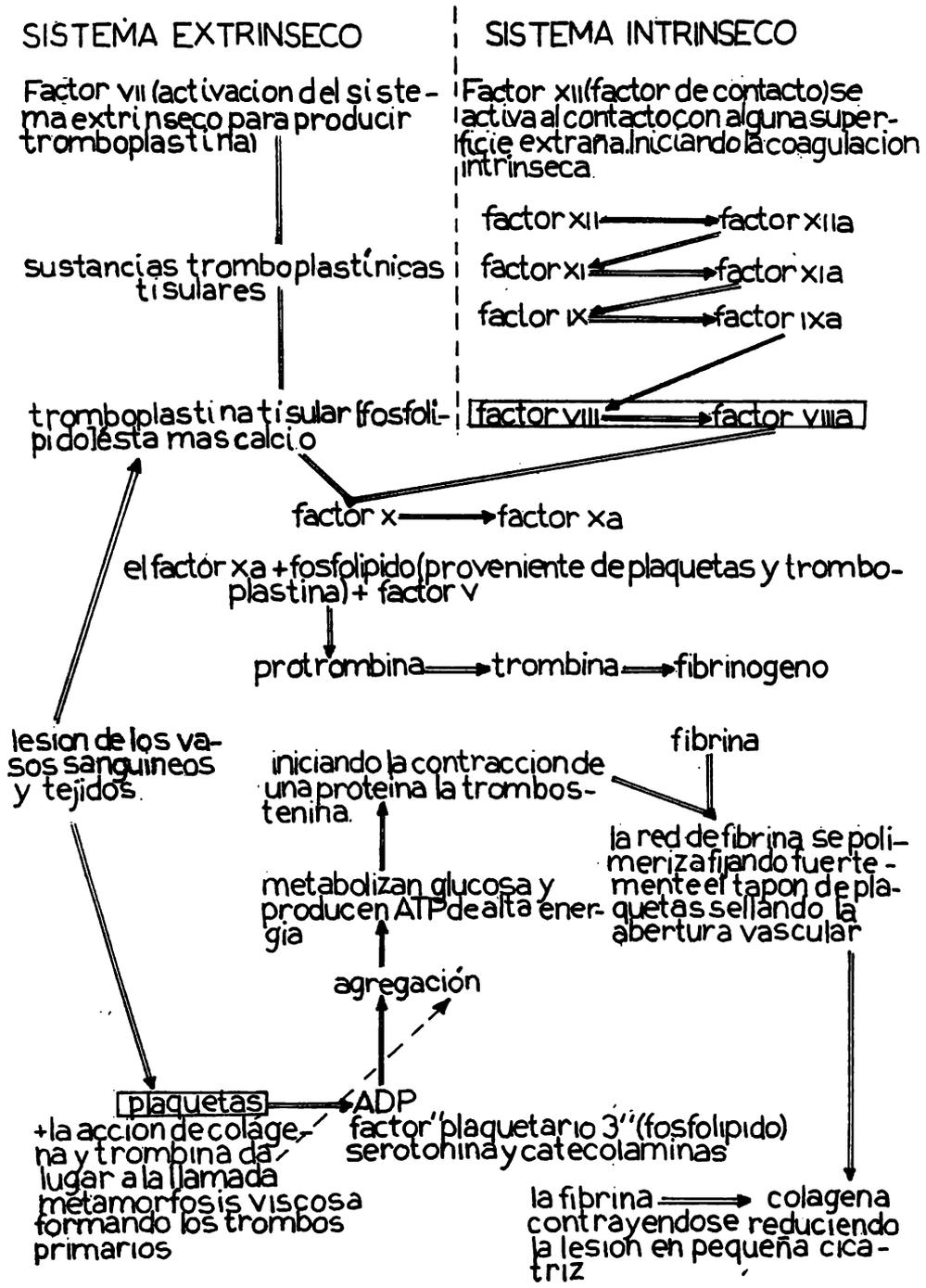


FIGURA No 1



TEORIA DE LA COAGULACION

FIGURA No 2

G E N E R A L I D A D E S

Para llegar a comprender mejor la importancia que tienen las plaquetas y el factor VIII dentro del fenómeno de la coagulación, a continuación se hace una descripción de éstos, y en el cuadro No. 2 quedan señalados estos dos elementos sanguíneos de acuerdo al momento en que participan en la coagulación.

I. LAS PLAQUETAS.

a) ANTECEDENTES.

En la primera parte del siglo XIX, varios investigadores observaron las plaquetas sanguíneas; Zimmermann (1860), Max Schultze (1865) y Osler (1874), reconocieron que estos corpúsculos no eran artefactos, aunque no pudieron reconocer su verdadera importancia. Hayem (1878), como Zimmermann, pensó que se desarrollaban en los glóbulos rojos. En 1882 Bizzozzero describió a las plaquetas como aparecen en los vasos mesentéricos de conejos y cuyos, demostró su cualidad de adhesividad, su participación en el trombo y su función en la coagulación de la sangre. En 1906 Wright hizo estudios muy importantes sobre ellas.

b) MORFOLOGIA.

Las plaquetas tienen un cuerpo citoplásmico pequeño. En un microscopio con campo obscuro se observan con un marc

do contorno, translúcidas, con gránulos inmóviles en su centro. Con la ayuda del microscopio electrónico se ha podido demostrar una estructura interna con fibras reticuladas. En los frotis teñidos por las técnicas de Wright o Leishman, se observan como cuerpos hialinos vidriosos, de color azul claro o púrpura, redondos, ovalados o irregulares con numerosos puntos azules; no tienen núcleo.

Las plaquetas miden de 2 a 4 micras de diámetro, y tienen un volúmen promedio de 7 a 8 micras cúbicas. En algunas enfermedades y cuando existe una producción excesiva de sangre se han encontrado plaquetas de mayor tamaño (hasta de 20 micras). Bajo estas circunstancias han aparecido formas grotescas como de palanquetas, coma, de cigarro, y otras formas poco comunes.

Si las plaquetas se mantienen por algún tiempo en preparaciones húmedas o en sangre oxalatada, puede observarse la formación de procesos filamentosos o en forma de espinas.

En el supuesto caso de que las plaquetas sufrieran un proceso de envejecimiento, este sería detectable por medio de un criterio morfológico. Estudios diferenciables de las plaquetas similares a los hechos en leucocitos, han sido hechos por varios investigadores. Las plaquetas se han clasificado en base a su tamaño, e intensidad y tamaño de tinción de los gránulos; a la forma, tamaño y tipo de los gránulos, y más recientemente, en base a la intensidad del color del hialoplasma de la plaqueta, la presencia o ausencia de vacuolas,

el tamaño, número, posición e intensidad de tinción de los gránulos, como también el tamaño y forma de las plaquetas como un todo.

Bajo estas bases se han distinguido formas jóvenes y viejas, formas degeneradas, formas normales o patológicas por irritación, y tipos primitivos. La tinción basófila del citoplasma hace suponer la evidencia de juventud; la vacuolización evidencia la vejez.

Las plaquetas grandes se observan cuando la producción plaquetaria ha sido muy activa. La tinción intensa de los gránulos y su posición excéntrica se considera como indicación de una madurez total. Se ha dicho que las plaquetas de menor tamaño que el normal presentan una alta aglutinabilidad, al contrario de las plaquetas mayores; por lo tanto, son funcionalmente más activas.

Nadie que haya examinado especímenes de sangre, de trastornos sanguíneos, ha fallado en observar alteraciones morfológicas en las plaquetas. Muchos de estos cambios sin duda, no son artefactos; su interpretación sin embargo, es difícil en vista de nuestra ignorancia en el mecanismo interno de la formación de las plaquetas. La clasificación diferencial de las plaquetas, aunque es un tema de gran interés y prometedor, es en el presente mera especulación.

c) PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS.

Existe la evidencia de que las plaquetas consumen oxígeno, por lo tanto, la plaqueta es un elemento vivo. Se

ha demostrado que las plaquetas pueden decolorar el azul de metileno diluido. Contienen oxidasa y como los leucocitos -- mieloides, catalasa; pero no contienen enzimas proteolíticas o lipoides. En su contenido de minerales, son similares a -- los leucocitos, y difieren del plasma sanguíneo y de los glóbulos rojos. Las plaquetas del caballo están compuestas de -- proteína (60% o más de peso seco) y lípidos (15%), de las -- cuales más de la mitad es cefalina. La plaqueta es el principal portador de la histamina sanguínea en el conejo. La propiedad más significativa de estos corpúsculos es la rapidez con la que se aglutinan. Esto, junto con su subsecuente disolución, es probablemente una parte de sus funciones. Por su propiedad de aglutinarse, sellan directamente el vaso sanguineo lesionado (trombo blanco); al liberar tromboplastina, inician la coagulación. Existe también evidencia de que liberan sustancias vasoconstrictoras que inducen a la contracción de vasos vecinos no lesionados y probablemente contribuyen a la contracción de los lesionados. La agregación de las plaquetas in vitro se favorece por soluciones coloidales, como la gelatina, peptona, lecitina, etc., y se impide por el oxalato y el citrato. Se ha observado que los anticoagulantes que actúan in vivo, tales como la heparina y el novirudin, previenen la agregación de las plaquetas.

El cambio que sufren las plaquetas, al entrar en -- contacto con una superficie extraña mojable, se puede compa-

rar con el incremento progresivo, en el área ocupada por una gota de agua cuando se deposita en una piedra presentando una sobredilatación y ruptura. Se ha observado también en preparaciones con gota colgante, que cambian primero al perder su refractibilidad, haciéndose obscuras y opacas e indistintas. Aparecen gránulos en el centro, la periferia se hincha y la membrana desaparece gradualmente. Algunas de las plaquetas pueden formar procesos del tipo flagelar que se pueden romper. (6)

d) ORIGEN DE LAS PLAQUETAS.

En la actualidad se acepta que las plaquetas se originan en la fracción de la médula ósea de donde proceden los megacariocitos.

En estado de equilibrio, cada megacariocito que madura en la médula ósea, ha de sustituirse por una célula procedente de una reserva de células tronco, orientadas y morfológicamente indiferenciadas. Cuando esta nueva célula puede reconocerse como MEGACARIOBLASTO, ha perdido ya la capacidad de dividirse en células hijas. Sin embargo, prosigue la síntesis de DNA y su núcleo se divide para dar lugar al PROMEGACARIOCITO multinucleado, con 2, 4, 8, 16 ó, rara vez 32 núcleos y citoplasma basófilo. Tras este período de división nuclear, el citoplasma aumenta, pierde su basofilia y desarrolla gránulos, es decir, la célula se convierte en megacariocito madura. Luego el citoplasma se fragmenta para formar plaquetas, y el núcleo desnudo del megacariocito es eliminado por células reticulo-endoteliales. En el ser humano, el ciclo completo requiere 10 días.

Cuanto más núcleos posee un megacariocito, tanto mayor cantidad de citoplasma acumula y más plaquetas puede formar. Por consiguiente, la producción de plaquetas puede incrementarse de dos formas:

1. Por aumento del número total de megacariocitos.
2. Por aumento de las divisiones nucleares en cada megacariocito en particular. (7)

e) MEGACARIOCITOS.

Estas células producen las plaquetas sanguíneas.- Normalmente comprenden aproximadamente el 0.5 por 100 de las células nucleadas de la médula ósea; también puede encontrárselas en el pulmón y el bazo. Son células muy grandes (35 a 70 micras) de forma irregular, con un grupo central de núcleos grandes, unidos en forma de anillo lobulado que parece un racimo de globos. En los megacarioblastos más pequeños de núcleo único, que comprenden del 1 al 15 % de las células gigantes de la médula ósea donde hay nucleólos. El citoplasma es abundante, gris pálido, con muchos gránulos acidófilos -- muy finos. Los megacariocitos introducen pseudópodos citoplásmicos entre las células de la pared de los sinusoides sanguíneos de la médula. Estos pseudópodos se separan del resto de la célula y se transforman en plaquetas libres en el plasma sanguíneo. (8)

f) DISTRIBUCION, SUPERVIVENCIA Y DESTRUCCION.

La plaqueta permanece dentro del sistema vascular y no se encuentra en los líquidos extracelulares. Aproximadamente el 80% de los trombocitos permanecen en circulación y el 20% se encuentran concentradas en el bazo. Las plaquetas se mueven libremente entre ambos compartimentos. Cuando existe gran esplenomegalia, la distribución se modifica, y a veces hasta el 80% de los trombocitos se concentran en el bazo. Por una razón desconocida, la producción de la médula ósea no aumenta lo bastante para compensar este desplazamiento, y se origina una trombocitopenia moderada (trombocitopenia hiperesplénica).

Las plaquetas envejecidas probablemente se eliminan por las células reticuloendoteliales del bazo y del hígado y las lesionadas, pueden eliminarse primeramente en el bazo, - de modo simultáneo en el bazo e hígado o sobre todo en el hígado, según los casos.

LA MEDULA OSEA NO CONTIENE RESERVA DE PLAQUETAS. Si por alguna razón la mayoría de las plaquetas circulantes se destruyen o pierden, la trombocitopenia resultante persiste durante varios días antes de que se sintetice una cifra suficiente de plaquetas para corregirla. (9)

II. AGREGACION DE LAS PLAQUETAS.

Las primeras plaquetas se adhieren al colágeno, pero la inmensa mayoría de ellas han de fijarse entre sí para formar la masa principal del trombo. Este segundo proceso -

(la adherencia mutua de las plaquetas) se llama AGREGACION -- PLAQUETARIA, que no ha de confundirse con la AGLOMERACION PLAQUETARIA, que es el arracimamiento de las plaquetas provocado por un anticuerpo plaquetario. (10)

El descubrimiento de que el ADP agrega a las plaquetas ha sido un gran paso para la comprensión de la función -- plaquetaria. El ADP es eficaz en concentraciones bajas (menores de 1.0 micromicras) que pueden obtenerse in vivo de medios endógenos en las plaquetas. El ADP puede obtenerse también de los eritrocitos. Debido a la dificultad en llevar a -- cabo estudios in vivo de la agregación plaquetaria, la mayoría de los estudios se han realizado in vitro, utilizando --- plasmas ricos en plaquetas preparados de sangre citratada. Se requiere de Calcio ionizado para la agregación de las plaquetas del cual hay más que suficiente en el plasma citratado, -- para permitir el proceso de agregación.

La agregación requiere del contacto entre las plaquetas y es necesario mezclar el plasma rico en plaquetas en estos experimentos. El plasma rico en plaquetas es obviamente -- un material no fisiológico y la interpretación de estudios -- realizados in vitro deben ser hechas con precaución, porque -- pueden haberse introducido artefactos. Con el ADP dependiendo de la concentración utilizada, la agregación puede ser reversible y ocurrir en dos fases o ser irreversible; con bajas -- concentraciones de ADP, hay una agregación reversible con una desviación inicial de descenso, del registrador, seguido por un regreso de la densidad óptica. Esta fase de agregación pla

quetaria produce cambios en la forma de disco de las plaquetas a esferas alargadas y a una formación de pequeños agregados. Con concentraciones mayores de ADP (1.0 micromicra), se observa una curva bifásica, seguida de una caída inicial en la densidad óptica; hay un regreso hacia la línea base, y -- después un segundo descenso en la densidad óptica, indicando la extensión de la agregación, y por último su terminación. Con concentraciones mayores de ADP (5.0 micromicras), la agregación ocurre únicamente en una fase y es marcada y prolongada.

Cuando se observa la agregación bifásica, la segunda fase va acompañada de una liberación de ADP endógeno, serotonina y factor 4 plaquetario, y por una degranulación plaquetaria. Estos cambios no preceden a la segunda fase, pero la acompañan, sugiriendo que la segunda gota en la densidad óptica representa contracción de los agregados, así como de la agregación renovada. La reacción requiere de una temperatura sobre 30°C y alrededor de 37°C como óptima. El contacto entre las plaquetas es también importante en la liberación de ADP endógeno y serotonina. Cualquier cosa que prevenga la agregación inducida por ADP previene la liberación inducida de ADP del ADP endógeno y de serotonina.

Aunque a temperaturas menores de 30°C y en algunos ejemplos de plasmas ricos en plaquetas de individuos normales, se observa una agregación reversible con la adición de ADP en una concentración que generalmente provoca una respuesta bifásica, y concentraciones mayores provocan una mar-

cada agregación pero no la liberación.

De las numerosas teorías hechas para explicar la agregación de las plaquetas por ADP, ninguna es generalmente aceptada, y el mecanismo molecular que lleva a la liberación de los constituyentes plaquetarios es desconocido. El ADP causa rápidamente que las plaquetas pierdan su característica en forma de disco, probablemente sin provocar que se hinchen. El efecto es reversible, y es evitado por la adenosina. El ADP por sí mismo no es incorporado a los agregados plaquetarios. La agregación inducida por ADP se previene al bloquear la glicolisis y la fosforilación oxidativa, pero no si se bloquea solamente una de ellas. También se inhibe por la adenosina y por algunos otros compuestos, muchos de los cuales también son vasodilatadores. La prostaglandina E es la más potente de éstas; las drogas pueden tener menor efecto in vivo que in vitro. Hay una gran evidencia de que muchos de los inhibidores actúan al elevarse los niveles del AMP cíclico de las plaquetas. Los mercuriales y otros químicos que reaccionan con grupos sulfhidrilos son también inhibidores de la agregación plaquetaria.

El papel de los constituyentes del plasma en la agregación inducida por ADP o en la liberación de éste es obscura, porque el anticoagulante inicial, la temperatura y la composición del líquido de suspensión, afectan la respuesta al ADP de las plaquetas lavadas, probablemente porque alteran las proteínas del plasma retenidas en su superficie. Algunas preparaciones de plaquetas humanas lavadas agregan con

ADP y Calcio, solamente cuando se les ha suspendido en líquido que contenga una baja concentración de fibrinógeno. El plasma de un paciente con fibrinogenemia congénita generalmente contiene unos cuantos miligramos de fibrinógeno por 100 ml; ésta cantidad aparentemente es adecuada para permitir que las plaquetas que se suspendan en su propio plasma, puedan agregarse normalmente con concentraciones altas de ADP, pero no con concentraciones bajas. (11)

a) POSIBLE PAPEL DE LA TROMBOSTENINA.

Las plaquetas (y también otras células, por ejemplo hematíes y células endoteliales) contienen una proteína contráctil llamada TROMBOSTENINA, que, al parecer, es idéntica a la actomicina que se encuentra en las células del músculo liso. La trombostenina quizá intervenga en la agregación inducida por ADP, pues 1) la trombostenina contribuye al mantenimiento de la forma normal en disco de la plaquetas circulantes; éstas, antes de agregarse toman en lugar de la forma de disco una forma ovalada, 2) la trombostenina se ha demostrado en la membrana plaquetaria y, por consiguiente, podría participar en una reacción de la membrana y, 3) la trombostenina es una ATP-asa y por esto se sabe que ejerce una acción mutua con los nucleótidos de la adenina. (12)

b) OTROS AGENTES AGREGANTES.

Además del ADP, in vitro se han hecho numerosos es-

tudios de compuestos que han demostrado que provocan agregación en las plaquetas. Estos agentes agregantes pueden dividirse en tres grupos generales:

1) Materiales particulares, tales como la colágena, la gamma globulina agregada, y complejos de antígeno anticuerpo. La fibrina no induce a la agregación, pero la agregación sí es inducida por la fibrina polimerizada parcialmente y complejos solubles del monómero de fibrina con los productos de digestión fibrinolítica.

2) Algunas enzimas proteolíticas tales como la trombina, la tripsina y acuéllas de algunos venenos de víboras.

3) Aminas biogénicas tales como la serotonina y la epinefrina. (13)

III. FACTOR VIII.

Es una proteína de peso molecular elevado, posiblemente mayor de 1,000,000, el factor VIII no se absorbe con $Al(OH)_3$, $BaSO_4$ etc. y está ausente en el suero. Aunque está presente en plasma tratado con $Al(OH)_3$. De esta manera la deficiencia de factor VIII será demostrada en el reactivo de plasma absorbido utilizado en la prueba de generación de tromboplastina. En los procedimientos de fraccionamiento se separa con el fibrinógeno, pero el fibrinógeno y el factor VIII pueden separarse uno del otro por una electroforesis de corriente continua. La sustancia es muy inestable en todas las condiciones, sin embargo algunas preparaciones, en particular las de sangre animal pueden almacenarse sin pérdida de su

actividad en un estado de congelación durante años, a una temperatura de $- 20^{\circ}\text{C}$. En el plasma se pierde un 20 % de su actividad, al almacenarse durante 24 horas a 4°C .

Su actividad desaparece durante la coagulación y es destruido rápidamente por la trombina y por las enzimas proteolíticas. La deficiencia congénita del factor VIII produce la hemofilia.

c) MEDICION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR VIII.

Existen dos métodos para medir la actividad del factor VIII.

El método de una etapa, y el de dos etapas, este último, fué el empleado para realizar este trabajo y está basado en la prueba de generación de tromboplastina.

En este sistema de prueba. Las diluciones de la muestra problema, se comparan con un normal, para ver la habilidad que tienen para formar el activador intrínseco de protrombina.

Ambos métodos dan resultados similares, el primero es más simple que el segundo, sin embargo este último, por estudios comparativos realizados, se ha encontrado más exacto. (14)

b) TESTIGO NORMAL PARA EL ENSAYO DEL FACTOR VIII.

Está bien establecido, que el rango de variación para el factor VIII, en personas normales, se encuentra entre 50

200 % y en un principio el nivel de factor VIII en un individuo permanece casi constante. Puede presentar marcadas fluctuaciones de tiempo en tiempo. Por lo tanto no es apropiado utilizar como testigo de referencia una sola muestra normal, aunque el nivel de factor VIII de un individuo haya sido medido en varias ocasiones.

Existen cuatro posibilidades en la selección de un testigo adecuado de factor VIII.

1. Un pool (mezcla) de plasmas normales. Un pool pequeño probablemente de seis muestras frescas normales, pueden utilizarse con razonable precisión, pero no es conveniente el sangrar diariamente este número de donadores para este propósito.

2. Un pool mayor de 20 a 30 muestras de plasma normal, puede almacenarse congelado a -40°C en pequeñas alícuotas y descongelarse diariamente. Pero el factor VIII no es muy estable en plasma congelado y éste perderá una cantidad significativa de actividad durante el almacenamiento, aparte de la constante pérdida de actividad alrededor del 20 %, ocasionada por el congelamiento y descongelamiento del plasma.

3. Un pool mayor de plasma normal, puede ser liofilizado, en cantidades de 0.5 ml ó 1 ml y almacenarse a -40°C . La actividad de factor VIII en plasma liofilizado es considerablemente más estable que en el plasma congelado.

4. El uso de un concentrado de factor VIII humano o de origen animal liofilizado, en alícuotas o en volumen que

que se reconstituye para su uso, y diluido en plasma hemofílico.

La Dra. Biggs, (Directora del Centro de Hemofilia en Oxford) ha utilizado este último método desde hace 10-15 años con buenos resultados. Se ha encontrado que las preparaciones de factor VIII bovino liofilizado y almacenadas a -20°C retienen su actividad en términos de plasma normal fresco por un lapso de 10 años.

Recientemente se ha demostrado (Bangham et al, 1970), por medio de estudios de degradación acelerada, que la pérdida de factor VIII en un concentrado humano liofilizado, al almacenarse a -20°C es de 0.1 % al año.

El pool mayor de plasma humano con amortiguador, liofilizado y almacenado en cantidades de 1 ml y a -20°C o menos, es un buen testigo para el laboratorio durante 1-2 años con poco deterioro. (15)

c) LA UNIDAD DE FACTOR VIII.

La unidad original de factor VIII como se definió en Oxford, es la actividad en 1 mg de una preparación seca de globulina antihemofílica bovina en particular (Biggs et al, 1955). Esta unidad fué equivalente a la actividad en aproximadamente 4 ml de plasma fresco normal. Ahora que la unidad de actividad está relacionada con el tratamiento de los enfermos, la unidad se define como la actividad de factor VIII en un ml de plasma promedio normal, (como se recolecta en el laboratorio),

obteniéndolo al agregarse 9 ml de sangre a 1 ml de citrato de sodio al 3.8 %. (16)

d) METODO DE LAS DOS ETAPAS PARA EL FACTOR VIII.

El método de las dos etapas, consiste, de una etapa de preincubación, donde se forma el factor X activado, al incubar diluciones de la muestra problema o del plasma normal con: suero, factor V, fosfolípido proveniente de tromboplastina y cloruro de calcio; después de incubar esta mezcla, se pasa a un tubo que contiene cloruro de calcio; cuando se ha alcanzado una meseta de actividad, es decir, cuando el activador de protrombina está presente en cada uno de los tubos, finalmente se le adiciona un plasma sustrato normal, registrándose el tiempo de coagulación. Cuando todos los factores de coagulación, menos el factor VIII están en exceso, se considera que el tiempo de coagulación del plasma sustrato y en consecuencia la cantidad formada de factor X activado, es proporcional a la cantidad o concentración del factor VIII en plasma normal o en la muestra problema. La presencia de intermediarios activos, puede acortar ligeramente el tiempo en que ocurre la meseta del máximo de factor X activado, y en forma similar, la presencia de un inhibidor del tipo observado en el LES, puede prolongar el tiempo en el que se forma la meseta, de actividad máxima; la cantidad exacta de factor X activado no es afectada fácilmente por cualquiera de estos dos hechos. Por lo tanto, en teoría, el ensayo de dos etapas es más preciso que el ensayo de una etapa.

DIAGRAMA REPRESENTATIVO PARA EL ENSAYO EN
DOS ETAPAS DE EL FACTOR VIII

MEZCLA DE REACTIVOS

	XII	
incubación	XI	
10-25 seg.	IX	PRIMERA ETAPA
	VIII	
	X	
	Xa	
incubación	+	
15-30 seg.	V	SEGUNDA ETAPA
	II	
	I	
	FIBRINA	

(17)

IV. CRIOPRECIPITADO.

El método más simple para su obtención, se deduce de la observación de que cuando el plasma congelado se descongela a una temperatura baja (0-8°C), una pequeña cantidad de material gelatinoso que contiene en exceso hasta un 3 % de las proteínas del plasma, permanece sin disolverse. Se supo por el trabajo de Ware, Guest y Seegers (1947) que este material contiene una alta cantidad del fibrinógeno del plasma original. Brinkhous (1954), afirmó que conteria algo de actividad de fac-

tor VIII y se refirió a la globulina antihemofílica como una crioglobulina. En base a esta observación, se instruyó a las personas que descongelaban el plasma fresco congelado para que "estuvieran seguros que la crioglobulina se disolviera porque contiene algo de la globulina antihemofílica".

Pero fué la Dra. Judith Pool y colegas (Pool y Robinson 1959; Pool, Jershgold y Pappenhagen, 1964; Pool y Shannon, 1965) la que encontró que la cantidad de factor VIII concentrado en esta fracción (que ella llamó "crioprecipitado"), era lo suficientemente alto como para permitir el desarrollo de un método para la producción de factor VIII concentrado y parcialmente puro, para llevarse a cabo en un laboratorio de un hospital o en un centro de transfusión. (18)

El crioprecipitado rico en factor VIII obtenido de un solo donador, es la fracción del plasma que se recupera por centrifugación al descongelar a 4°C el plasma fresco congelado, proveniente de una bolsa aproximadamente de 500 ml de sangre. Este material se almacena en estado de congelación a - 20°C y se mantiene en reserva para uso futuro.

El crioprecipitado contiene alrededor del 56 % de la globulina original del factor VIII en menos del 3 % del volúmen original del plasma. El crioprecipitado es una fuente de almacenamiento del factor VIII, útil en el tratamiento de la deficiencia de este factor (clásico paciente hemofílico) y ha demostrado su eficacia en el tratamiento de otras enfermedades como la de Von Willebrand. El crioprecipitado, debe administrarse cuando se presenta la primera señal de he-

morragia.

Este preparado contiene una pequeña cantidad de fibrinógeno, pero ninguno de los otros factores de la coagulación, se encuentra en cantidades apreciables.

La baja concentración de proteína y el pequeño volumen de esta preparación, permite, aplicar una terapia sostenida e intensiva.

Cada bolsa de crioprecipitado rico en factor VIII, contiene cerca de 130 (128 \pm 58) unidades de crioprecipitado, dependiendo esto de la actividad original en el plasma del donador. Se define una unidad, como la cantidad de material necesario para aumentar la actividad de 100 ml de plasma deficiente en 1 %, o como la actividad presente en 1 ml de plasma fresco normal. (19)

a) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE FACTOR VIII EN BOLSA DE PLÁSTICO DURANTE TODO EL PROCEDIMIENTO.

El método fué descrito con detalle por Pool y Shannon (1965).

Se recolecta la sangre en una bolsa que contenga ACD de un juego estandar de dos bolsas con las debidas precauciones, se hace un cuidadoso mezclado con el anticoagulante, tan pronto como sea posible, se centrifuga la sangre y el plasma es pasado a la bolsa satélite. La preparación del crioprecipitado se realiza al congelar el plasma a una temperatura baja de - 30°C por inmersión en una mezcla de etanol-CO₂, utilizando una bolsa de protección para evitar la difusión del etanol

a través de la bolsa de plástico. Para este propósito se utiliza una charola. El plasma congelado se descongela en un cuarto frío ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) sin permitir que la temperatura se eleve a más de 8°C . El crioprecipitado se separa por centrifugación a 4°C , durante 15 minutos a 5,000 G. El plasma sobrenadante se deshecha de la bolsa, dejando atrás la pequeña cantidad de crioprecipitado gelatinoso. Al menos que se requiera para uso inmediato, el crioprecipitado se almacena a una temperatura de -30°C . Para preparar una dosis, se disuelven cada uno de los crioprecipitados requeridos en 10-20 ml de salina citratada estéril y se calienta a una temperatura que no sea mayor de 30°C .
(20)

b) PREPARACION DE CRIOPRECIPITADOS. METODO REALIZADO EN EL
BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO MEDICO NACIONAL.^(*)

1. Procedimiento de obtención del crioprecipitado.

a) Toma de la sangre en anticoagulante ACD y en bolsa doble (Bolsang JD-2M Fenwall). Debe tenerse especial cuidado en que la mezcla sangre-anticoagulante sea lo más perfecta posible para evitar la formación de pequeños coágulos que afectarían la producción final de factor VIII. En cuanto al anticoagulante, debe preferirse el ACD sobre CPD. J.C. Pool ha observado pérdida de actividad en los crioprecipitados obtenidos de plasma CPD, después de 6 meses de conservación a -20°C , (21,22,23)

(*) Dr. Héctor Rodríguez Moyado.; Dr. José Antonio Uribe Cortés.-
PREPARACION DE CRIOPRECIPITADOS.- México, D.F. 1973.

b. Centrifugación de la sangre durante 20 minutos a 3500 r.p.m. ó 6 minutos a 4800 r.p.m. a $+ 4^{\circ}\text{C}$. De preferencia la centrifugación debe hacerse lo más pronto posible después de la toma de sangre; si ésto no es posible, se recomienda que no transcurran más de 6 horas y la sangre debe mantenerse en refrigeración. Después de 18 horas a 4°C , se ha reportado una pérdida de 20 % de actividad de factor VIII (24) Con objeto de reducir la contaminación del plasma con glóbulos rojos, es recomendable aplicar una grapa en el tubo de extracción en el sitio cercano a su implantación en la bolsa; ésto impedirá el paso de eritrocitos hacia la bolsa matriz, durante la separación del plasma.

c. Separación del plasma en la bolsa transfer. Es importante no pasar el máximo del plasma sino llenar la bolsa a $3/4$ de su capacidad para evitar el rompimiento de las mismas durante la congelación, esto favorecerá igualmente la menor contaminación del plasma con eritrocitos.

d. Congelación rápida del plasma. En la mezcla hielo seco-acetona ó etanol-hielo seco. Nosotros usamos la primera mezcla. Se recomienda iniciar la congelación de los plasmas cuando se ha obtenido un buen enfriamiento de la mezcla y seguir agregando trozos de hielo seco en cuanto deja de burbujear. El tiempo de congelación recomendado es variable. En algunos sitios, con etanol-hielo seco, congelan el plasma durante 20-30 minutos. Nosotros con hielo seco y acetona observamos que 10 a 12 minutos son suficientes para una buena congelación y se reduce la frecuencia de rotura de bolsas.

e) Descongelación lenta del plasma a 4°C. Esto se obtiene en 20 a 24 horas. Existe un método rápido de descongelación a 8°C durante 90 minutos (25), que nosotros no hemos utilizado, aunque en términos de producción de factor VIII no hay diferencia significativa entre ambos métodos. Sin embargo el menor consumo de tiempo en la preparación de los crioprecipitados, es una ventaja importante que debemos considerar.

f) Centrifugación del plasma descongelado durante 20 minutos a 3500 r.p.m. ¡si no se separa la bolsa satélite, el plasma puede regresarse al concentrado de globulos rojos. En la bolsa satélite quedaría una sustancia blanquecina: es el crioprecipitado rico en factor VIII con una parte del fibrinógeno plasmático.

g) Almacenamiento del crioprecipitado. No hay un acuerdo unánime respecto a la temperatura del almacenamiento. Se han utilizado temperaturas variables: entre - 18°C y - 90°C las más comunmente usadas son entre - 20°C y - 30°C. (26)

h) estabilidad en el almacenamiento. La experiencia reportada es en el sentido de que después de 2 años a - 20°C no se ha observado pérdida de actividad IN VITRO, aunque ha sido más difícil de disolver. (26)

2. Manejo del crioprecipitado antes de su aplicación.

a) descongelación del crioprecipitado. Se lleva a cabo a temperatura ambiente y se puede acelerar dejándolo unos minutos a 37°C.

b) Reconstitución con solución salina, 10-20 ml. por

bolsa. En la práctica, se acostumbra colectar una bolsa transfer con capacidad de 300 ml. (bosang transfer T-A 1 Fenwall) a un frasco de solución salina estéril y pasar a aquélla la cantidad calculada de acuerdo con el número de crioprecipitados y transvasarla a cada uno de los crioprecipitados sucesivamente, de manera que al final, en la bolsa transfer, quedan todos los crioprecipitados y la mezcla está disponible para su aplicación. La Dra. Pool actualmente realiza la mezcla de los crioprecipitados en un frasco vacío al vacío y menciona buen resultado en cuanto a que reduce pérdida de factor VIII en las bolsas que lo contienen. Considera que si no se tiene buen cuidado en este paso, puede perderse hasta 10 % de actividad. Algunos lavan las bolsas con salina citratada para recuperar el remanente.

Estabilidad del crioprecipitado reconstituido. Es muy buena, se han reportado, por autores diversos, tiempos como los siguientes: 4 días a 4^oC, 24 horas a temperatura ambiente y 3 horas a 37^oC, sin pérdida de actividad. (27)

Velocidad de administración. En general se administra lentamente, en 20 a 30 minutos ya que con la administración rápida se han reportado algunas complicaciones que han consistido fundamentalmente en dolor, calor, enrojecimiento en el trayecto venoso y en un caso, fiebre, pulso rápido y shock. (28)

Más comunmente la administración de los crioprecipitados se ha hecho en forma intermitente, dependiendo la fre-

cuencia de la respuesta clínica y de los resultados de laboratorio.

PREPARACION DEL CRIOPRECIPITADO

SANGRE - ACD (BOLSA DOBLE)

CENTRIFUGACION 20 ' A 3500 r.p.m. A + 4°C

SEPARACION DEL PLASMA

CONGELACION RAPIDA DEL PLASMA A - 70°C (10')
(hielo seco + acetona)

DESCONGELACION LENTA DEL PLASMA A + 4°C
(20-24 horas)

SEPARACION DEL PLASMA SOBRENADANTE

HACIA LA BOLSA MATRIZ

CON ERITROCITOS

HACIA UNA BOLSA TRANS-

FER PARA UTILIZACION

POSTERIOR

CRIOPRECIPITADO RICO EN FACTOR VIII

ALMACENAMIENTO A - 20°C ó - 30°C

**V. UTILIDAD CLINICA DE LAS FRACCIONES DE LA SANGRE HUMANA
PREPARADAS EN EL BANCO DE SANGRE UCSPITALARIO. (27)**

PRODUCTO Y PRESENTACION	CONDICION CLINICA
1. Plasma fresco (congelado): bolsas de aproximadamente 250 ml.	Coagulopatías por consumo hemofilia A (deficiencia de factor VIII). Deficiencia de factor V. Hipoprotrombinemia (deficiencia del factor II)severa. Otras deficiencias (factores I, VII, IX, X, XIII,etc. Pseudohemofilia (Von Willebrand)
2. Plasma rico en plaquetas: bolsas de aproximadamente 150 ml.	Púrpura trombocitopénica "activa". Coagulopatía por consumo. Pseudohemofilia. Deficiencia funcional plaquetaria
3. Concentrado plaquetario bolsas de 300 ml de capacidad que contienen aproximadamente 25 ml.	Púrpura trombocitopénica "activa". Deficiencia funcional plaquetaria.
4. Concentrado de f. VIII (crioprecipitado):bolsas de 300 ml de capacidad que contienen aproximadamente 10 ml.	Hemofilia A. Pseudohemofilia.
5. Paquete globular: bolsas de aproximadamente 250 ml.	Anemia crónica con hipoxia; anemia aguda sin hipovolemia severa y con hemorragia controlada

Factores que influyen la liberación de ADP de los trombocitos, durante la hemostasia

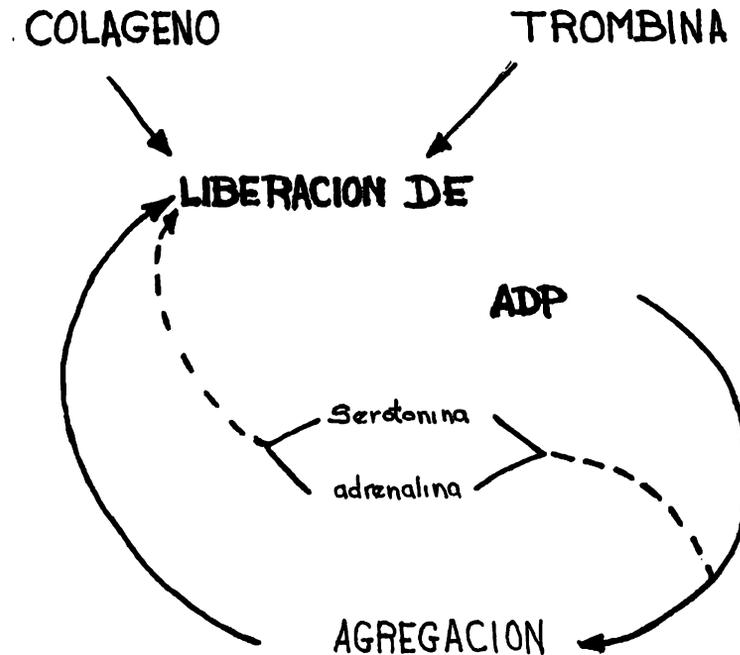


FIGURA No. 3

M A T E R I A L Y M E T O D O S

I. AGREGACION PLAQUETARIA IN VITRO (método fotocolorimétrico).

a) FUNDAMENTO.

El papel fundamental de las plaquetas en una persona normal, es el de contribuir a detener el sangrado cuando existe lesión en los vasos sanguíneos. Es un elemento importante en la hemostasia o suspensión del sangrado.

Su contenido en serotonina, adrenalina y noradrenalina, facilita la vasoconstricción en el lugar de la lesión. Ver figura No. 3.

Se aglutinan y adhieren en poco tiempo a los tejidos lesionados; después de su ruptura se disuelven y liberan otros factores químicos, como la cefalina, también llamada "tromboplastina de plaquetas".

Cuando se ha completado la coagulación sanguínea, las plaquetas contribuyen también a la retracción del coágulo de fibrina. (28)

Las técnicas para estudiar la operación de las plaquetas, o sea si funcionan o no en la hemostasia son:

- a) Cuenta de plaquetas.
- b) Adhesividad al vidrio.
- c) Retracción del coágulo.
- d) Agregación simple.
- e) Agregación por el método fotocolorimétrico.

El estudio fotocolorimétrico de la agregación de las plaquetas se ha facilitado al determinar los cambios en la

transmisión de la luz a través de un plasma rico en plaquet--tas, después de la adición de un agente agregante.

El plasma rico en plaquetas es opaco, ya que las plaquetas desvían la luz incidente. Conforme las plaquetas se agregan y forman grandes masas, la concentración de plaquetas en el plasma se reduce fuertemente y la transmisión de la luz se incrementa, es decir, la densidad óptica disminuye. Estos datos se pueden representar en una gráfica como densidad óptica y debe tenerse en cuenta que una disminución de este valor indica un incremento en la agregación plaquetaria. (29)

Su principal aplicación en relación con las enfermedades ha sido el definir anomalías en la respuesta de las plaquetas al estímulo agregante en:

1. Estados trombóticos.
2. Enfermedad hemorrágica.
3. Atribuible a la ingestión de drogas.
4. En nuestro estudio se ha empleado como una

de dos técnicas para medir la viabilidad funcional plaquetaria en los plasmas ricos en plaquetas.

b) MATERIAL EMPLEADO.

Sustancias: Citrato Trisódico.

Adenin Di Fosfato

Dietil Barbiturato de Sodio

Acido Clorhídrico q.p.

Reactivos: Solución de Citrato de Sodio al 3.8 %.

Solución de reserva de ADP.

Solución amortiguadora de Owren.

Preparación de los reactivos:

Solución de citrato de sodio al 3.8 %:

Citrato Trisódico	3.8 g
Disolver y aforar con agua destilada c.b.p.	100 ml

Solución amortiguadora de Owren:

Dietil Barbiturato de Sodio	1.175 g
NaCl	1.467 g
N/10 HCl	43 ml

Aforar a 200 ml, ajustar el pH a 7.35 con el HCl al N/10.

Solución de reserva de ADP:

ADP	2.5 g
Agua Destilada	5 ml
Solución amortiguadora de Owren	5 ml

Esta solución de reserva debe renovarse cada 2-3 meses, ya que se deteriora en una proporción de 1.3 % al mes, aún conservándose a temperaturas de - 0°C. Las soluciones de reserva deben llevarse a un pH de 6.8 con HCl y guardarse en pequeñas alícuotas congeladas para prolongar su actividad, sellando los tubos con parafilm y de inmediato colocadas a una

temperatura de $- 20^{\circ}\text{C}$, almacenándose hasta ser utilizadas. Generalmente las alicuotas de 0.5 ml son apropiadas para el trabajo de un día en el que se trabajan aproximadamente 25 curvas. Antes de emplear la solución de reserva debe ponerse sobre cada alicuota 4.5 ml de la solución amortiguadora de Owen (0.5 + 4.5 ml).

Aparatos: Un agregómetro Bryston modelo AG-2, equipado con un registrador gráfico de cinta de 5 pulgadas, rollos de papel especial, celdillas, imanes especiales de dos tamaños, unos para agitar 1 ml de plasma y otros para agitar 0.5 ml, pluma para graficar.

Material biológico: Se estudiaron 84 plasmas ricos en plaquetas, obtenidos y preparados de la siguiente forma.

Plasma rico en plaquetas obtenido en bolsa doble (Bolsang).

Plasma rico en plaquetas obtenido en tubo de plástico.

Plasma libre de plaquetas.

Plasma rico en plaquetas: Obtenido en bolsa de 300 ml en el laboratorio de fraccionamiento del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional.

Las preparaciones de plasma rico en plaquetas se procesan a partir de una donación individual de sangre total fresca que se toma en una bolsa doble especial de plástico en circuito cerrado, que contiene ACD como anticoagulante, la cual

se coloca en un agitador automático (AGITATOR HEMOLATOR) el cual evitará que la sangre se coagule al mezclarla bien con el anticoagulante. Esta sangre tarda aproximadamente media hora en pasar al laboratorio de fraccionamiento, donde se le procesa para la obtención de plasma rico en plaquetas.

La sangre así obtenida se centrifugó en centrifugas (SORVALL GENERAL PURPOSE RC- 3 automatic refrigerated centrifuge), a las siguientes velocidades y tiempos:

10' a 1500 r.p.m.

15' a 1500 r.p.m.

2' a 5000 r.p.m.

5' a 1000 r.p.m.

10' a 1000 r.p.m.

10' a 1600 r.p.m.

Es importante dar el tiempo y las revoluciones de centrifugación a la sangre de acuerdo con la fracción que se desea obtener, para lograr una buena calidad. En la siguiente tabla se muestra el tiempo y las revoluciones que debe darse a cada fracción.

CARACTERISTICAS DE TIEMPO Y REVOLUCIONES POR MINUTO NECESARIOS PARA OBTENER LAS DIFERENTES FRACCIONES DE SANGRE, CON UNA CENTRIFUGA CON CABEZA DE 17 cm DE RADIO. (30)

Producto	revoluciones por minuto	duración minutos	G (fuerza de gravedad)
PLASMA	2820 5147 (alta velocidad)	30 6	1500 5000
PLASMA RICO EN PLAQUETAS	1410 4883 (alta velocidad)	15 a 20 2	375 4500
CONCENTRADO PLAQUETARIO	2820 4883 (alta velocidad)	15 4	1500 4500
PLASMA RICO EN LEUCOCITOS	460	20	40

Para calcular la aceleración de una centrifuga expresada en G se aplica la siguiente fórmula: $N = 1,11 \times 10^{-5} \times R$, en donde R = radio medio de rotación y N = revoluciones por minuto.

Despues de centrifugada la sangre, se pasa el plasma rico en plaquetas por medio de un extractor (Fenwall Plasma Extractor) a la bolsa satélite, teniendo cuidado de no dejar pasar globulos rojos. Las bolsas con el plasma rico en plaquetas se mantienen en ambiente estéril en una campana de bacteriología (VECCO) cuya temperatura osciló entre los 20°C y los

26°C, antes de entregarse para ser utilizados en transfusión. Para probar la efectividad de estos plasmas ricos en plaquetas se extrajo de cada bolsa, en medio estéril, una cantidad aproximada de 2 ml de la siguiente manera: se agitó la bolsa con suavidad durante un minuto para obtener un plasma homogéneo rico en plaquetas; se pinzó el conducto por donde salió el plasma antes de quitarle la grapa de aluminio con la que se selló anteriormente, quitada ésta, se abre la pinza para dar salida al plasma rico en plaquetas, y una vez obtenida la cantidad deseada, se vuelve a cerrar el conducto con otra grapa de aluminio. Cuando las muestras contenían gran cantidad de eritrocitos se centrifugaron a 1000 r.p.m. durante 5', para retirar el exceso de eritrocitos ya que estos obstruyen el paso de la luz en el agregómetro.

Plasma rico en plaquetas obtenido en tubo: Este plasma rico en plaquetas se obtiene de los mismos donadores a los cuales se les extrae en un tubo de plástico que contiene 0.5 ml de anticoagulante (Citrato de Sodio al 3.8 %) 4.5 ml de sangre, mezclándose suavemente por inversiones repetidas. La mezcla se centrifuga durante 10' a 1000 r.p.m.

Plasma libre de plaquetas: Para la obtención de este plasma se tomaron de 4 a 5 plasmas, empleados para la determinación de hemoglobina (plasma con E.D.T.A.) se mezclaron y se tomó un volumen el cual se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 20 minutos y se decantó cuidadosamente para separarlo del botón de plaquetas.

El agregómetro es un instrumento sensible que actual-

mente se está utilizando para el estudio de la agregación plaquetaria en condiciones bajo control.

Su principio está basado en medir los cambios de transmisión de luz a través de una muestra de plasma rico en plaquetas o de una suspensión lavada de plaquetas, las cuales se colocan en una cubeta especial, y que al agregarse en respuesta al estímulo agregante permiten que la transmisión de la luz se incremente a través de la muestra. El grado en el cambio de transmisión luminosa o de la luz, el cual es un reflejo del grado de agregación plaquetaria, se registra en un registrador gráfico.

1. La oscilación horizontal de la pluma registradora nos indica que las plaquetas están interrumpiendo el paso del rayo de luz.

2. Al agregar el estímulo pueda haber un lapso de registro horizontal antes de que exista un incremento en la transmisión de luz de acuerdo con el tipo y concentración del estímulo empleado.

3. Cuando la agregación plaquetaria empieza se incrementa la transmisión de luz y la pluma registradora se desvía, esto generalmente va seguido de fuertes oscilaciones de la pluma, que nos indica una interrupción intermitente del rayo de luz, debido a grandes agregados plaquetarios.

c) TECNICA.

1. Se conecta el agregómetro y el registrador gráfico por separado, a la fuente de electricidad.

a) se hace pasar la corriente poniendo en ON los interruptores de POWER y HEATER.

b) se dejan transcurrir 15 a 30 minutos hasta que el marcador de temperatura (TEMPERATURE METER) indique 37°C .

c) se calibra la velocidad del motor a 1000 r.p.m. en el marcador de velocidad (SPEED METER).

d) se gira el control de salida (OUTPUT) una revolución completa en dirección contraria a las manecillas del reloj.

e) se enciende el registrador gráfico (STRIP CHART RECORDER).

2. Se ajusta la pluma del registrador usando el control ZERO o POSITION, a la posición deseada en la línea de base. (generalmente con una desviación de 10 %).

a) se conecta el agregómetro a la terminal de entrada (INPUT) del registrador.

b) se ajusta el registrador en la línea de 10 mv.

3. Se depositan 0.5 ml de plasma rico en plaquetas en una celdilla, la cual se coloca en el compartimento especial del agregómetro.

a) se avanza el control del (OUTPUT COARSE) un tercio de revolución en dirección de las manecillas del reloj.

b) se emplean los controles (ZERO COARSE y FINE) para ajustar la pluma del agregómetro en la misma posición del paso 2.

4. Se pone una muestra de plasma libre de plaquetas en el compartimento especial del agregómetro.

a) se usa el (OUTPUT COARSE y FINE) del agregómetro para ajustar la pluma del registrador en la máxima desviación

deseada (usualmente 90 % de desviación).

5. Los controles del agregómetro han quedado ajustados de esta manera y no deben ser reajustados, a menos que se hayan ejecutado los pasos 2 y 4.

6. Entre prueba y prueba es recomendable dejar algo opaco (un plasma ya estudiado) en el compartimento para evitar que la fotocélula se rompa o que haya influencia en el ajuste.

7. Al colocar el plasma rico que se va a estudiar, se prende el botón del graficador que mueve el papel y se espera un mínimo de un minuto antes de añadir el estimulante a la muestra de plasma rico en plaquetas.

8. Se utiliza una pipeta calibrada para agregar tres gotas de estimulante (0.1 ml) al plasma rico en plaquetas contenido en la cubeta. (la pipeta debe emplearse perfectamente perpendicular a la mesa de trabajo).

a) se debe tener cuidado de no formar burbújas. Esto asegura la dispersión rápida del estimulante y un contacto máximo con las plaquetas.

9. Se deja que la pluma funcione el tiempo necesario para que la reacción alcance su máximo nivel. Por ejemplo en el caso del ADP no hay retraso de fase, un rápido descenso tomará lugar, indicando la agregación de plaquetas y se obtendrá una curva característica al regresar la pluma a la línea de base a medida que las plaquetas se desagregan.(31)

II. CUENTA DE PLAQUETAS.

Se han descrito anotaciones y modificaciones a los

métodos para la cuenta de plaquetas, pero ningún método puede considerarse totalmente satisfactorio. Esto es de esperarse al tratar con estructuras cuya propiedad estriba en que se aglutinan y desintegran rápidamente. Las plaquetas son difíciles de discernir de otras partículas, debido a su pequeño cuerpo. Se adhieren fácilmente a partículas de la cristalería empleada o a partículas del diluyente empleado. Sin embargo, con cuidado y experiencia, puede realizarse la cuenta de plaquetas, que es de mucha utilidad.

Generalmente los errores tienden a dar cuentas bajas de plaquetas. Sin embargo este no es siempre el caso, porque la fragmentación de ellas cuando no se disuelven completamente, o el contar partículas de suciedad, cristales de algunas sales del diluyente, el colorante, bacterias, estroma de eritrocitos o leucocitos rotos, pueden dar cuentas erróneamente altas.

Debe señalarse que toda la cristalería empleada debe estar escrupulosamente limpia, que los líquidos de dilución deben ser frescos y filtrados o centrifugados a alta velocidad.

La cámara de Neubauer, Figura No. 4, debe estar perfectamente limpia y de tiempo en tiempo debe hervirse en agua destilada con un poco de Bicarbonato de Sodio. (32)

Cuando se cuentan las plaquetas, en microscopio de fase, el observador, debe tener los dedos de una de sus manos en el ajuste fino del microscopio, de manera de poder obtener el enfoque crítico, que revelará la característica el-

CAMARA DE NEUPAUER

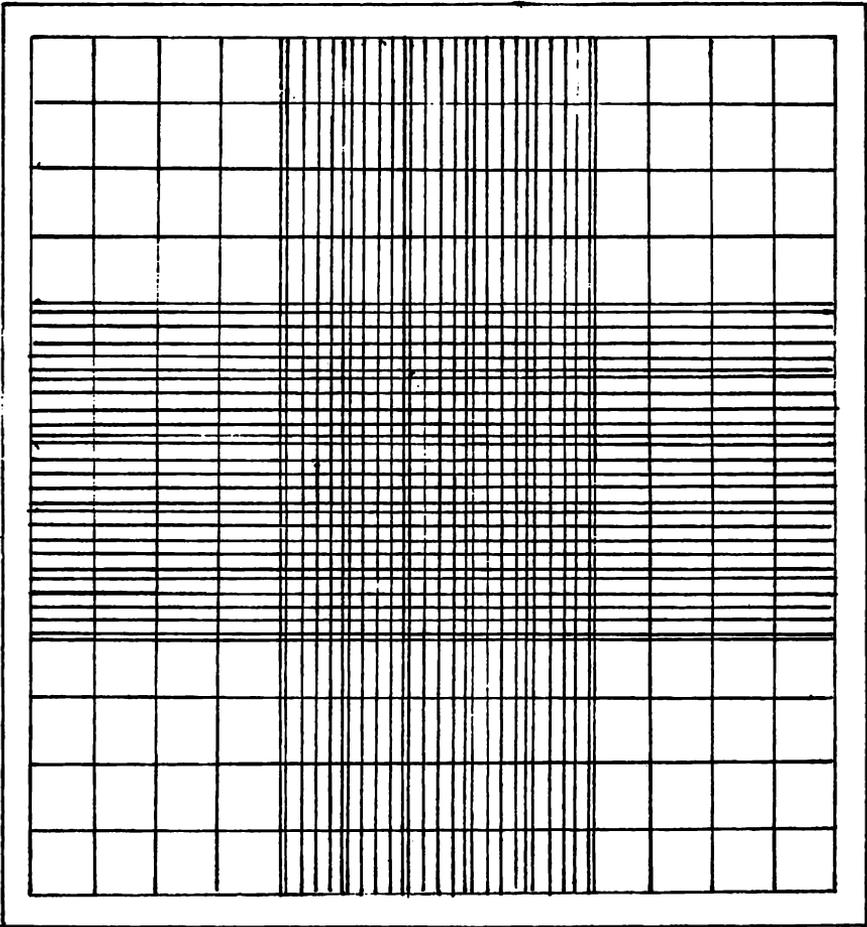


figura No.4

tamente refringente y de apariencia plateada de las plaquetitas. Es muy importante saber distinguir las plaquetitas de formas irregulares de basura que pueden floar en la parte superior del líquido, así como pequeñas partículas de aceite que se adhieren a la cámara de Neubauer cuando ésta está mal manipulada. En los métodos directos, el inconveniente es el no poder utilizar la lente de inmersión para ver el contenido de la cámara. Las plaquetitas presentan un color liláceo cuando se observan en frotis teñidos con colorante, su tamaño es de un séptimo a un medio del diámetro de los glóbulos rojos; generalmente presentan formas ovaladas, de bastón o forma de coma. Pueden verse aisladas o en grupos.

Valores normales para las plaquetitas: La cuenta de plaquetitas puede realizarse por medio de métodos automatizados, pero se hace más frecuentemente en forma manual. Usualmente se utiliza el método de Brecher y Cronkite, este método utiliza el microscopio de contraste de fase y Oxalato de Amonio como líquido diluyente. El rango normal para la cuenta de plaquetitas en sangre total es de 130,000 a 360,000 por mm^3 . El promedio por mm^3 que se ha reportado en personas sanas se dice que es de 250,000 aproximadamente, pero se han obtenido cuentas diferentes al efectuar diferentes procedimientos para enumerarlas. En 64 personas normales, con las que se utilizó el método de REES y ECKER, AGGELER et al; encontraron un valor promedio de 409,000 con una desviación estandar de 68,000; en 40 adultos masculinos; Tocantis, utilizando su método en-

contró las siguientes cuentas: sangre capilar, 250,000 \pm 7,458, con una desviación estandar de 58,500; sangre venosa, 310,000 \pm 11,937, desviación estandar 110,750; sangre arterial, 350,000 \pm 13,889, desviación estandar 128,000. Estos resultados concordaron razonablemente con los registrados por otros investigadores. Algunos, sin embargo, utilizando otros métodos, registraron resultados mucho más altos, algunos tan altos como 650,000 y 862,000. Olef, utilizando su método encontró una cuenta promedio de 544,000 (437,000 a 586,000). Por el método de DAMESHEK se encontraron normalmente de 500,000 a 900,000 por mm^3 . Como ya se dijo anteriormente, las cuentas registradas como altas no tienen que ser precisamente correctas.

Autor	No. de mm^3 plaquetas por mm^3	Promedio
Rees y Ecker	409,000	68,000
	sangre capilar:	
	250,000	7,458
	sangre venosa:	
Tocantis	310,000	11,937
	sangre arterial:	
	350,000	13,889
Olef	437,000 a 586,000	544,000
Dameshek	500,000 a 900,000	

El volumen del paquete de plaquetas, en la sangre normal es aproximadamente de 0.3 cc por 100 cc de sangre

(aproximadamente 0.3 mm en el hematocrito). (33),(34)

Cuando la cuenta de plaquetas es baja, el coágulo de sangre formado presenta menor adhesividad, firmeza, rigidez y retracción que un coágulo normal.

La cámara de Neubauer consiste de una lámina de vidrio grueso, en el centro de la cual se localizan dos plataformas con escala, como en la figura No. 4.

La distancia entre la superficie inferior del cubre-objeto, colocado sobre la cuadrícula y ésta (profundidad de la cámara) es de 0.1 mm; la superficie total de la cuadrícula es = 3 mm X lado; dividida en 9 cuadros.

Cada cuadro = 1 mm X lado; de superficie = 1mm^2 .

El cuadro central está dividido en 400 cuadros dispuestos en 25 grupos de 16, limitados por líneas triples.

C/u de los 400 = 0.05 mm X lado; de superficie = 0.0025 mm^2 .

C/u de los 25 cuadrados = 0.2 mm X lado; de superficie = 0.4 mm^2 .

a) MATERIAL EMPLEADO.

Oxalato de Amonio al 1 % como líquido para diluir plaquetas.

Cámara de Neubauer.

Pipetas calibradas.

La solución de Oxalato de Amonio al 1 % (1g de Oxalato de Amonio disuelto en c.l.p. 100 ml de agua destilada) se centrifuga a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos, para eliminar residuos que puedan afectar la lectura. La solución de

Oxalato de Amonio destruye a los eritrocitos, permitiendo contar unicamente plaquetas.

Material biológico. Plasmas ricos en plaquetas que se emplearon anteriormente en la agregación plaquetaria.

b) TECNICA.

Se toma 0.03 ml de plasma rico en plaquetas y se colocan en un tubo que contenga 2.97 ml de Oxalato de Amonio bien centrifugado, obteniéndose así una dilución 1/100. De esta dilución se toma 0.5 ml y se colocan en un tubo que contenga 2.0 ml de Oxalato de Amonio para obtener una dilución 1/500. Se mezcla perfectamente la suspensión y antes de cargar la cámara de Neubauer se desechan las dos primeras gotas que salen de la pipeta Pasteur; y llena la cámara, que debe estar perfectamente cargada y sin burbújas, se deja reposar durante 10 minutos en un ambiente húmedo. La cuenta de plaquetas se hace como ya se mencionó antes en un microscopio de contraste de fase; contando para este caso la quinta parte de la cuadrícula central, por duplicado.

c) CALCULOS.

Se obtiene el número de plaquetas de la manera siguiente:

No. de plaquetas X 10 X dilución X 5

III. RETRACCION DEL COAGULO.

La prueba de retracción del coágulo se ha utilizado ampliamente para medir la función de las plaquetas. (35)

Cuando el plasma se coagula en presencia de plaquetas el coágulo empieza a contraerse hasta que ocupa una cuarta parte o menos del volumen original de la muestra de sangre; al mismo tiempo, se exprime un suero claro. (36)

El mecanismo de la retracción del coágulo ha sido muy estudiado (Budtz-Olsen, 1951). La retracción no tiene lugar en ausencia de plaquetas, y su número determina normalmente el grado de retracción. Por lo tanto las plaquetas son importantes para el proceso. (36)

Cuando las plaquetas funcionan bien, otros factores además de su número que afectan a la retracción del coágulo son: a) la temperatura, ya que la retracción es más rápida y más completa conforme la temperatura se va elevando hasta 40°C b) el volumen de globulos rojos y de leucocitos juegan un papel de obstrucción pasiva, existe una relación casi lineal, inversa, entre el volumen del paquete celular y la retracción del coágulo y c) la concentración de fibrinógeno la que también es inversamente proporcional a la retracción del coágulo. (35)

Las plaquetas deben ser viables, es decir, intactas metabólicamente. La inhibición en la energía de su metabolismo, en particular de su glicolisis, evita la retracción del coágulo (Lüscher, 1956). El motivo de ello es que la retracción depende de una reacción entre el ATP en las plaquetas y

su proteína la contráctil trombostenina (Bettex-Galland y - Lüscher, 1956). En el plasma humano, la retracción está asociada con la desaparición de cerca de la mitad del ATP en -- las plaquetas y con un incremento proporcional de fosfato inorgánico en el plasma (Born, 1958). En analogía con la contracción muscular, el ATP se utiliza en reacciones que llevan a cabo el cambio en la forma de las plaquetas, en las -- que se basa el mecanismo de la retracción del coágulo. Los -- pseudópodos salientes se adhieren a las fibras de fibrina -- juntándose unas a otras, cuando posteriormente los pseudópodos se contraen. Si el trabajo hecho durante la retracción -- del coágulo está asociado con el consumo de ATP, hay más que suficiente de éste en las plaquetas para lograrlo. (Born y - Enouf, 1961).

La función de la retracción del coágulo es incierta. Como la contracción de un agregado de plaquetas, la retracción del coágulo en un vaso lesionado proveería la hemostasia si las paredes del vaso se juntaran para estrechar el lúmen. La retracción de un trombo puede evitar la completa oclusión del vaso, dando lugar a la reapertura a la corriente sanguínea. (36)

a) MATERIAL EMPLEADO.

Material biológico: plasma rico en plaquetas,
trombina,
fibrinógeno.

Preparación de los reactivos:

Solución amortiguadora de fosfato para la preparación de Fibrinógeno (modificado de Jaguer, 1943).-

El amortiguador de fosfato 2M a 6.6 de pH se hace di solviendo 817 g de KH_2PO_4 anhidro en 1000 ml de agua destilada a la cual se le ha agregado 750 ml de 4N de KOH (168 g). - Después de calentar hasta que se disuelva el volúmen se lleva a 3000 ml en un matraz aforado, y la solución se filtra. De esta solución madre se hacen las soluciones 1M y M/4.

Fibrinógeno.-

A 1000 ml de plasma sanguíneo se le agregan 50 ml de $\text{Al}(\text{OH})_3$. La mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga y el sedimento se descarta. El plasma resultante se prueba por el método de una etapa del tiempo de protrombina y el tiempo de coagulación debe de exceder de un minuto. Si se obtiene un tiempo de coagulación más corto, debe repetirse la absorción con el $\text{Al}(\text{OH})_3$. Se enfría el plasma a una temperatura aproximada de $12-14^\circ\text{C}$, y se le agrega un volúmen igual de la solución amortiguadora de fosfato 2M, la cual ha sido previamente enfriada a $2-4^\circ\text{C}$ en el refrigerador. La mezcla se mantiene por 15 minutos para permitir la formación de un precipitado. La mezcla se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante. Se lava el precipitado con 1000 ml de la solución amortiguadora de fosfato 1M, recuperándose el precipitado por centrifugación. Se di suelve entonces el precipitado en 500 ml de la solución amortiguadora de fosfato M/4. Se mide el volúmen del precipitado

en 500 ml de solución amortiguadora y el fibrinógeno se precipita agregándole un volumen igual de solución amortiguadora 2M. Se centrifuga de nuevo para sedimentar el precipitado, se lava con 500 ml de solución amortiguadora de fosfato 1M y se redisuelve en 500 ml de M/4 de solución amortiguadora de fosfato. Se repite la precipitación y el lavado una vez más, disolviéndose el precipitado final en 100-150 ml de salina citratada (9 partes de salina al 0.85% y una parte de citrato trisódico al 3.8%). La solución se dializa en frío durante la noche contra 5000 ml de salina citratada; el líquido dializante debe ser agitado durante este tiempo. El producto obtenido se vuelve a centrifugar para remover cualquier precipitado que pueda haberse formado y se seca por congelación. El secado se completa en un desecador al vacío con P_2O_4 ; el producto secado se pesa y, para su uso, se pesan y disuelven porciones en agua destilada a fin de reconstituir la solución original. Por ejemplo, si el producto total de material seco fué de 2 g y esto fué disuelto originalmente en 100 ml, la concentración apropiada sería de 20 mg/ml. Esta solución es demasiado concentrada para usarse en la mayoría de las pruebas de coagulación; adicionalmente se diluye 1/2, 1/5 con salina al 0.85% para usarse. La mejor concentración se determina por prueba y error para un lote, es decir, se ajusta la dilución de acuerdo a la actividad que nos dé el fibrinógeno. La solución debe ser la menor concentración que dé un coágulo firme y sólido a la adición de trombina. Las solu

ciones que dan coágulos finos en pequeños manojos o hilos de fibrina son demasiado débiles.

Si no se desea congelar en seco el producto, cantidades más pequeñas, como por ejemplo 100 ml de plasma, pueden ser usadas y el precipitado final disuelto en 50 ml de salina citratada.

Trombina.-

Se diluyen 100 ml de plasma en 1000 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 5.3 con ácido acético al 2%. El precipitado obtenido se disuelve en 25 ml de solución salina al 0.85% y se ajusta el pH a 7 con Na_2CO_3 al 2%. Se agregan 3 ml de CaCl_2 al 0.25M y se retira el fibrinógeno coagulado. Para obtener la formación completa de trombina, se deja reposar durante dos horas; ésta solución cruda se purifica al agregarle un volumen de acetona a un volumen de trombina a temperatura ambiente. Se separa el precipitado por centrifugación. Se extrae la trombina del precipitado con 25 ml de solución salina y se desecha el precipitado. La solución de trombina obtenida de esta manera puede tener un poder aproximado de 1/5 de la solución más concentrada de trombina tóptica (1000 unidades/ml).

b) TECNICA.

De cada uno de los plasmas ricos que se prueban, se hacen diluciones por duplicado: 1 a 2, 1 a 4, 1 a 8, en solu

ción salina. Se deja una serie de diluciones durante una hora a temperatura ambiente, y la otra serie se congela a ---
-20°C durante una hora. Las muestras congeladas son las que se emplean como testigo "de plaquetas maltratadas"; después -
de una hora se procede a colocar 0.2 ml de plasma puro en un tubo, de la dilución 1-2 en otro tubo y así sucesivamente pa
ra las siguientes diluciones; a cada una de ellas se les a--
grega una gota de trombina equivalente a 0.05 ml y por últi-
mo se agrega 0.2 ml de fibrinógeno. Esta mezcla se coloca en un baño de agua a 37°C durante una hora, al cabo de la cual se sacan los tubos y se mide el volúmen sobrenadante.

c) CALCULOS.

El volúmen total _____ 100 %

El volúmen obtenido después de la retracción _____ X %.

IV. PRUEBA EN DOS ETAPAS PARA EL FACTOR VIII (basado en el método de Biggs et. al. 1955).

a) FUNDAMENTO.

El método está basado en la prueba de generación de tromboplastina y consiste, en nuestro caso, en probar seis diluciones de plasma normal absorbido y crioprecipitados o globulina antihemofílica. Se presume que el tiempo mínimo de coagulación obtenido es proporcional a la cantidad de factor VIII en la mezcla, con tal de que los otros factores conocidos sean constantes y en exceso. Las mezclas de generación de tromboplastina se prueban por duplicado en alícuotas de plasma normal sustratado cuando se ha alcanzado una meseta estable de protrombina. Esto sucede generalmente a los 15 y 21 minutos después de haber recalcificado, pero debe determinarse para cada lote de reactivos,

b) REACTIVOS.

Suero normal: formado por un pool de cinco sueros con el que se hace una dilución 1 en 10 con amortiguador de imidazol.

Fosfolípido: Se emplea en una dilución adecuada dependiendo de su actividad; en este trabajo se empleó una dilución 1 en 100.

Salina citratada.

Plasma absorbido: de la muestra que se probará (1 ml de plasma con 0.5 ml de $Al(OH)_3$ a $37^{\circ}C$ durante 10 minutos).

Crioprecipitado absorbido: en la misma forma que el plasma normal anterior.

Sustrato plasma: obtenido de un pool de 5 plasmas -- normales.

Cloruro de Calcio: 0.05M y 0.025M.

Factor V.

Preparación de los reactivos.-

Suero normal: formado de un pool de 5 sueros.

Fosfolípido: técnica para obtener fosfolípido a partir de tromboplastina (referencia obtenida por la técnica de Bell Alton). Se ponen 8 ampolletas de tromboplastina de Difco en 25 ml de acetona. Se agitan durante 2 horas a temperatura ambiente. Se centrifugan 5 minutos a 5000 r.p.m. y se descarta el sobrenadante. Se seca el residuo a temperatura ambiente y se resuspende en 25 ml de cloroformo; se agita durante 2 horas, se filtra y se desecha el precipitado. El filtrado se deja evaporar a temperatura ambiente (es un precipitado gelatinoso); éste se homogeneiza perfectamente en 12 ml de solución salina normal, se fracciona en pequeñas alícuotas y se pone en congelador a $-40^{\circ}C$.

Salina citratada: una parte de citrato de sodio al 3.8% en 5 partes de salina fisiológica.

Plasma absorbido: obtenido de un pool de plasmas.

Crioprecipitado absorbido: muestras de las obtenidas en el laboratorio de fraccionamiento del Banco Central de San gre del Centro Médico Nacional.

Sustrato plasma obtenido de un pool de plasmas normales citratados.

Cloruro de Calcio 0.05M:

147.02 g1M

x g0.5M

x = 7.35 g en 500 ml 3.675 g de -
CaCl₂

Cloruro de Calcio 0.025M:

147.02 g1M

x g0.025M

x = 3.675 g en 500 ml 1.837 g de -
CaCl₂

Factor V:

Reactivos.- BaSO₄

Oxalato de Sodio: 1.34% 0.1M; disolver 1.34 g en 100 ml de agua destilada.

Salina citratada: a 4.25 g de NaCl y 19.0 g de citrato de Sodio, agregar 3-4 litros de agua destilada; al disolverse llévase a 5 litros con agua destilada.

Solución saturada de amonio: a 400 g de (NH₄)₂SO₄ agregar 500 ml de agua destilada; se calienta para disolver y se enfría. Si el sulfato de amonio se convirtió en solución, se le agregan 100 g más; se vuelve a calentar y se enfría. Se

repite este procedimiento hasta que el sulfato de amonio no se disuelva y puedan verse cristales después de calentar y enfriar. El pH debe estar entre 4.0 y 5.0.

Método para obtener factor V:

Se recolectan 1000 ml de sangre de bovino en 100 ml de oxalato de Sodio y se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 40 minutos. El plasma se absorbe con 10% P/V de BaSO_4 durante 20 minutos a temperatura ambiente; centrifugar a 2000 r.p.m. durante 40 minutos y decantar el sobrenadante.

Se miden 360 ml de plasma sobrenadante y se le agregan 240 ml de sulfato de amonio saturado. Esto eleva la concentración del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 40% de saturación. Agitar suavemente durante 10 minutos (el precipitado formado es globulina antihemofílica). La mezcla debe mantenerse a 4°C durante todo el procedimiento. Se centrifuga a 2000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C . Se vacía el sobrenadante y se centrifuga en un cabezal angular a 5000 r.p.m. durante 15 minutos. Se desecha el sedimento. Es importante obtener un sobrenadante limpio y claro. Se mide el volumen del sobrenadante. Se le agrega una quinta parte de su volumen de sulfato de amonio saturado. Esto eleva la solución a 50% de saturación y el precipitado es el factor V. Se centrifuga en un cabezal de ángulo a 5000 r.p.m. durante 30 minutos; el precipitado se disuelve con salina citratada en un cuarto del volumen original de plasma.

Se dializa con tres cambios de salina citratada a -

4°C durante 12 horas.

El factor VIII se precipita a 40% en vez de a una sa turación de 33%. Esto es para asegurar que el factor VIII se ha extraído por completo. Hay una pérdida de factor V pero el material resultante está libre de factor VIII. Se necesita te ner precaución a la hora de vertir el sobrenadante del precipitado de globulina antihemofílica, ya que el precipitado es ligero y no se retiene bien.

La solución final dializada se prueba como factor V, y debe tener un valor de dos a tres veces más que el plasma humano normal. Se prueba en diluciones de 1 en 10, 1 en 20, y 1 en 50 en la prueba de globulina antihemofílica para asegu-- rar que dé un valor blanco por abajo de 40 segundos.

Al(OH)₃ para absorber: se vierten 100 ml de una solución de amonio (diluídos 1 a 2) en 600 ml de agua que con tenga 22 g de sulfato de amonio y que ha sido previamente calentada a una temperatura de 63°C; esta temperatura se baja rápidamente a 58°C. La mezcla se agita vigorosamente y se --- vierte rápidamente de una sola vez en una solución de 76.7 g de alúmina de amonio en 1000 ml de agua destilada y que se en cuentra a una temperatura de 58°C; la temperatura se eleva a 61°C, sin permitir que la temperatura baje a más de 58°C. Se mezcla durante 10 minutos, separando el precipitado por cen-- trifugación. Este precipitado se lava 5 veces con 1500 ml de agua destilada; se separa el precipitado por centrifugación - en cada ocasión. A la primera agua que se utiliza para lavar

se le agregan 0.22 ml de la solución de amoníaco y a la segunda se le agregan 0.44 ml antes de empezar el lavado. Todo el procedimiento se lleva a cabo en 5 horas aproximadamente. El precipitado se mantiene en la menor cantidad de agua que se requiere para formar una suspensión gelatinosa que pueda ser pipeteada. La adición de esta suspensión al plasma remueve los factores X, IX, VIII de la protrombina.

c) PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DEL FACTOR VIII.

Se estudiaron 74 crioprecipitados de una cosecha de 1270 (6%) de la siguiente manera:

1. DILUCIONES.

El plasma y el crioprecipitado absorbidos se diluyen en salina citratada. Las diluciones exactas que se harán dependerán de la actividad de los reactivos en el sistema. Las diluciones deben arreglarse de tal manera que los tiempos de coagulación den entre 18 y 32 segundos. Las diluciones deben prepararse inmediatamente antes de emplearse y no deben permanecer a temperatura ambiente más de 30 minutos antes de probarse. Las diluciones que se emplearon en este trabajo fueron:

	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
salina citratada	0.7 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml
muestras a probar	0.1 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml

Ver figura No. 5.

Diluciones para el problema y el testigo

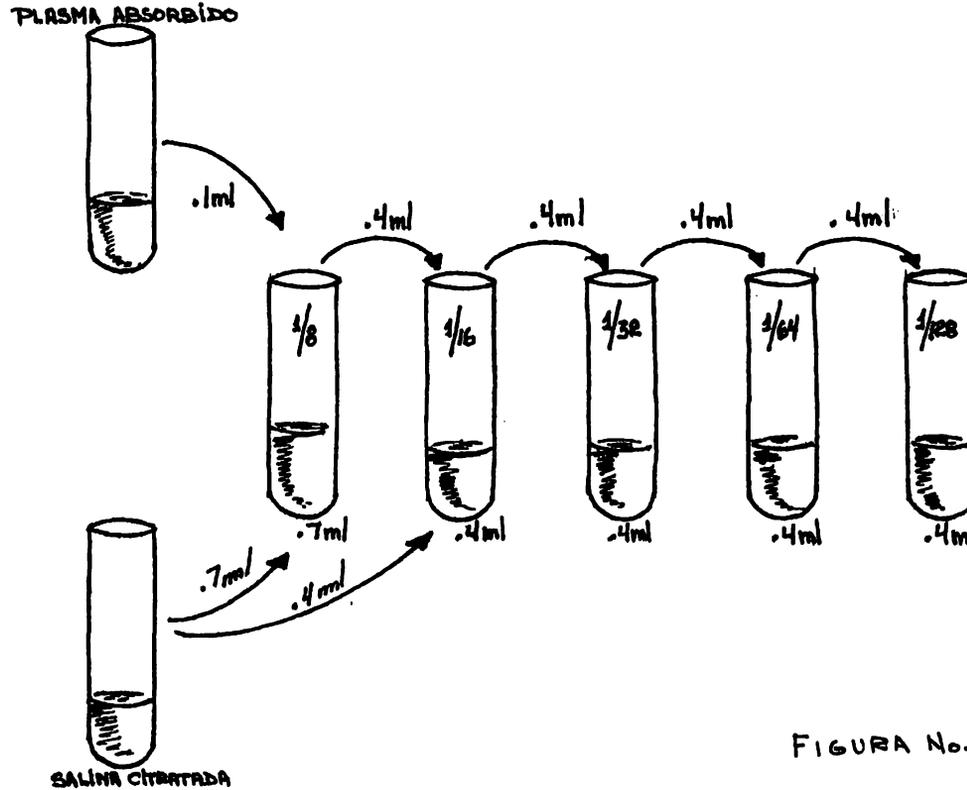


FIGURA No. 5

Las diluciones deben hacerse con mucho cuidado porque pequeños errores pueden afectar grandemente el resultado. Las diluciones para muestras anormales deben ajustarse a tiempos de coagulación convenientes, es decir, entre 18 y 32 segundos, dependiendo de las concentraciones esperadas del factor VIII.

2. PREPARACION DE LA MEZCLA DE INCUBACION.

Se pipetea 0.1 ml de factor V, fosfolípido y suero en cada uno de cinco tubos. Al primer tubo se agregan 0.1 ml de la dilución más alta. Se pone la mezcla en un baño a 37°C, se agregan 0.1 ml de CaCl_2 0.05M y se echa a andar un cronómetro. Durante el siguiente minuto se agregan 0.1 ml de la segunda dilución más alta a un segundo tubo que se pone en el baño y se recalcifica al minuto. El procedimiento se repite para las siguientes diluciones hasta llegar a la más baja, las cuales se recalcifican entre los 2 y 5 minutos. Ver figura No. 6.

3. PRUEBA DEL ACTIVADOR DE PROTROMBINA FORMADO.

Se pipetea 5 cantidades de 0.2 ml de CaCl_2 0.025M en tubos de coagulación. Ver figura No. 7. A los 14 minutos se meten en el baño de agua, junto con 1.5 ml de sustrato plasma. Nuestra prueba se realizó entre los 18-24 minutos, y se siguió el siguiente procedimiento:

A los 17 minutos 40 segundos, como se ha registrado en el reloj, de incubación, 0.1 ml son sacados del primer tubo de incubación que se habrá de probar y son agrega-

Preparación de la mezcla de incubación

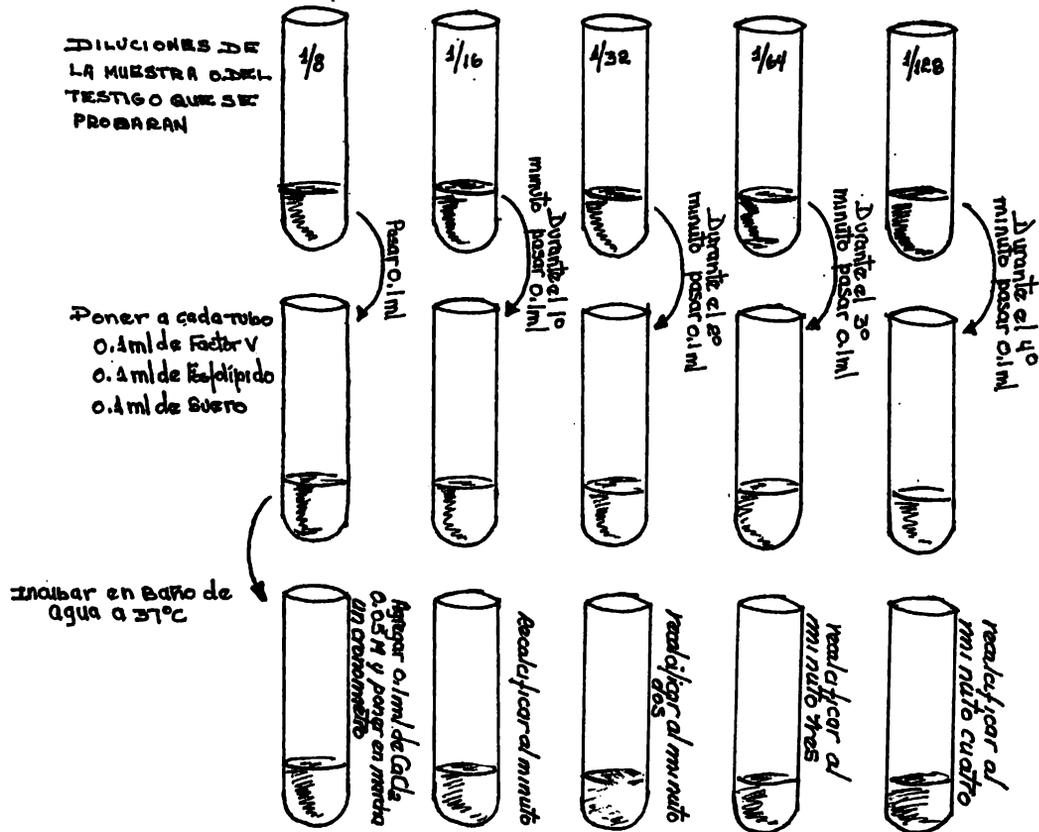
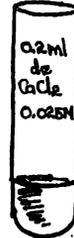
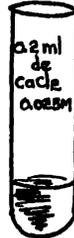
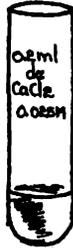
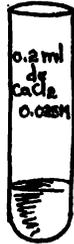
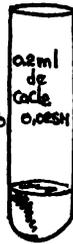


FIGURA No. 6

Probando el activador de protrombina

Poner a cada uno de los tubos 0.2 ml de CaCl_2 0.025 M. Meterlos al 15 minutos al baño de agua Jumbo con 3 ml de sustrato plasma.



3 ml de sustrato plasma

Efectuando la prueba entre los 18 y 24 minutos se sigue el siguiente procedimiento: en el minuto:

1) 17:40 pasar 0.1 ml de la 1ª dilución al tubo con CaCl_2
a los 18:00 agregar 0.2 ml de sustrato plasma y cronometrar

2) 19:40 pasar 0.1 ml de la 2ª dilución al tubo con CaCl_2
a los 20:00 agregar 0.2 ml de sustrato plasma y cronometrar

3) 21:40 pasar 0.1 ml de la 3ª dilución al tubo con CaCl_2
a los 22:00 agregar 0.2 ml de sustrato plasma y cronometrar

4) 23:40 pasar 0.1 ml de la 4ª dilución al tubo con CaCl_2
a los 24:00 agregar 0.2 ml de sustrato plasma y cronometrar

5) 25:40 pasar 0.1 ml de la 5ª dilución al tubo con CaCl_2
a los 26:00 agregar 0.2 ml de sustrato plasma y cronometrar

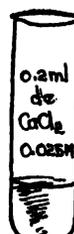
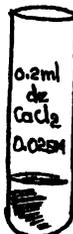
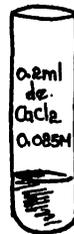
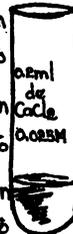
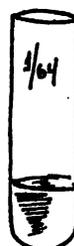


FIGURA No 7

dos a uno de los tubos con 0.2 ml de M/40 CaCl_2 . Se mezclan los contenidos, y a los 18 minutos se agrega a esa mezcla -- 0.2 ml de sustrato plasma, registrándose el tiempo de coagulación. Los otros tubos se prueban en forma similar en intervalos de un minuto.

El tiempo de incubación dependerá del sistema y debe ajustarse para dar tiempos mínimos de coagulación.

Las pruebas pueden llevarse a cabo en:

12:18 minutos

15:21 minutos

18:24 minutos

21:27 minutos

dependiendo del sistema; el objetivo es el de obtener una meseta estable de tromboplastina durante -- los seis minutos entre los dos tiempos de prueba. -

(37)

R E S U L T A D O S

I. ESTIMACION DE LA CIFRA DE PLAQUETAS EN LOS PLASMAS RICOS EN PLAQUETAS SEGUN LA FUERZA RELATIVA DE CENTRIFUGACION (G)

4162 G (2' a 2'30")	6666 (5' a 10')	166 a 374 G (10' a 15')
300,000	700,000	750,000
425,000	925,000	875,000
225,000	675,000	2,100,000
325,000	475,000	1,350,000
460,000	400,000	1,500,000
318,750	400,000	1,150,000
350,000	450,000	1,725,000
150,000	675,000	1,287,000
200,000	550,000	700,000
325,000	612,000	650,000
525,000	600,000	925,000
175,000	825,000	1,025,000
175,000	425,000	825,000
225,000	700,000	975,000
425,000	500,000	775,000
<u>412,500</u>	<u> </u>	1,300,000
		425,000
		925,000
		1,450,000
		900,000
		1,250,000
		1,075,000
		950,000
		1,425,000
		1,225,000
		1,000,000
5,016,250	8,912,000	<u>28,537,500</u>
Media 313.43×10^3	594.13×10^3	1,097.61 $\times 10^3$
Desviacion Estandar 114.36×10^3	157.74×10^3	362.48 $\times 10^3$

CUADRO No. 1

II. FUERZA RELATIVA DE CENTRIFUGACION PARA LA OBTENCION DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN UNA CENTRIFUGA REFRIGERADA DE 15 cm. DE RADIO.

N	N ²	G	TIEMPO
5000	25000000	4162	2' a 2'30"
2000	4000000	666	5' a 10'
1000	1000000	166	10' a 15'
1500	2250000	374	10' a 15'

Para calcular las revoluciones por minuto expresadas en G se aplica la siguiente fórmula.

$$N = \sqrt{\frac{G}{1.11 \times 10^{-5} \times R}}$$

Para calcular la G de una centrifuga expresada en revoluciones por minuto N se aplica la siguiente fórmula.

$$G = 1.11 \times 10^{-5} \times R \times N^2$$

En donde R = radio medio de rotación.

N = revoluciones por minuto.

G = a la fuerza de gravedad.

III. ESTIMACION DE LA RETRACCION DEL COAGULO EN LOS PLASMAS RICOS EN PLAQUETAS DE 0 HORAS.

PROBLEMA: 1 hora a temperatura ambiente				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
76	76	82	82	
76	76	76	70	
82	76	82	76	
80	70	76	82	
76	70	82	70	
76	76	76	64	
64	82	76	82	
82	88	82	88	
88	82	76	76	
76	76	76	76	
76	82	82	76	
82	82	76	76	
76	76	70	76	
76	76	76	70	
76	76	76	76	
82	70	70	70	
70	76	76	70	
76	76	76	70	
76	70	70	70	
76	82	82	82	
88	82	88	88	
88	88	82	82	
76	82	82	82	
88	88	82	82	
82	82	88	82	
82	82	82	76	
PROMEDIO	78.76	78.76	78.07	76.69
DEVIACION ESTANDAR	5.68	5.68	4.13	6.19
LIMITE SUPERIOR	84.44	84.44	82.20	82.88
LIMITE INFERIOR	73.08	73.08	73.94	70.50

TESTIGO: 1 hora a -20°C				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
54	41	47	47	
64	52	47	58	
47	52	52	52	
52	47	52	52	
64	58	70	47	
58	58	52	58	
76	64	64	70	
70	64	70	64	
52	58	52	52	
70	70	64	52	
64	64	58	64	
58	58	58	58	
70	58	52	58	
70	58	64	64	
58	58	58	58	
64	58	52	52	
58	64	52	52	
64	58	64	52	
64	58	58	52	
70	58	47	47	
88	70	58	62	
64	82	64	52	
58	58	58	58	
64	52	58	58	
58	58	58	58	
64	82	76	76	
PROMEDIO	63.11	58.76	57.88	56.26
DEVIACION ESTANDAR	8.52	7.86	7.50	6.98
LIMITE SUPERIOR	71.63	66.62	65.28	63.24
LIMITE INFERIOR	54.59	50.87	50.38	49.28

CUADRO No. 3

III ESTIMACION DE LA RETRACCION DEL COAGULO EN LOS PLASMAS RICOS EN PLAQUETAS DE 24 HORAS CONSERVADOS A 4°C

PROBLEMA: 1 hora a				
temperatura ambiente				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
76	76	76	64	
82	76	76	70	
76	76	82	76	
88	88	82	88	
82	88	94	82	
88	88	88	88	
82	82	82	82	
82	82	82	82	
76	82	82	82	
64	82	82	82	
PROMEDIO	79.6	82	82.6	79.6
DESVIACION ESTANDAR	7.04	4.89	5.25	7.58
LIMITE SUPERIOR	86.64	86.89	87.85	87.18
LIMITE INFERIOR	72.56	77.11	77.35	72.02

TESTIGO: 1 hora a				
-20°C				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
64	70	64	52	
64	64	58	64	
52	58	64	47	
64	70	52	58	
58	58	58	52	
70	64	64	70	
58	64	70	58	
64	70	64	64	
58	58	58	58	
52	58	58	64	
PROMEDIO	60.4	63.4	61	58.7
DESVIACION ESTANDAR	5.79	5.25	5.09	6.99
LIMITE SUPERIOR	66.19	68.65	66.09	65.69
LIMITE INFERIOR	54.61	58.15	55.91	51.71

CUADRO No. 3₁

III ESTIMACION DE LA RETRACCION DEL COAGULO EN LOS PLASMAS RICOS EN PLAQUETAS DE 48 HORAS CONSERVADOS A 4°C

PROBLEMA: 1 hora a temperatura ambiente				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
76	76	76	76	
70	82	76	76	
82	70	82	76	
82	82	76	82	
76	70	70	70	
76	82	82	76	
76	76	70	76	
76.85	76.85	76	76	
4.14	5.39	4.89	3.46	
80.99	82.24	80.89	79.46	
72.71	71.46	71.11	72.54	

PROMEDIO
 Desviacion Estandar
 Limite Superior
 Limite Inferior

TESTIGO: 1 hora a - 20°C				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
70	70	64	58	
64	76	64	64	
58	64	58	58	
64	58	52	64	
58	58	58	58	
64	58	64	64	
58	58	52	70	
62.28	62.14	58.85	62.28	
4.53	7.28	5.39	4.53	
66.81	70.42	64.24	66.81	
57.75	55.86	53.46	57.75	

CUADRO No. 32

III ESTIMACION DE LA RETRACCION DEL COAGULO EN LOS PLASMAS RICOS EN PLAQUETAS DE 72 HORAS CONSERVADOS A 4°C.

PROMEDIO
 DESVIACION ESTANDAR
 LIMITE SUPERIOR
 LIMITE INFERIOR

PROBLEMA: 1 hora a temperatura ambiente				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
82	82	82	76	
76	76	70	76	
79	79	76	76	
4.24	4.24	8.48	0	
83.24	83.24	84.48	0	
74.76	74.76	67.52	0	

TESTIGO: 1 hora a -20°C				
DILUCIONES				
P	1/2	1/4	1/8	
64	64	58	64	
58	58	58	58	
61	61	48	61	
4.24	4.24	14.14	4.24	
65.24	65.24	62.14	65.24	
56.75	56.75	33.86	56.75	

CUADRO No. 33

IV ESTIMACION DE LA PERDIDA DE ACTIVIDAD EN LOS PLASMAS RICOS EN PLAQUETAS CONSERVADOS A 4°C DURANTE 24, 48, 72 HORAS CON LA TECNICA DE AGREGACION PLAQUETARIA EN 12 MUESTRAS TIPO.

0 HORAS		24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
ACTIVIDAD	PERDIDA	ACTIVIDAD	PERDIDA	ACTIVIDAD	PERDIDA	ACTIVIDAD	PERDIDA
63 = 100%		58 = 92%	8%	54 = 85%	15%	48 = 76%	24%
75 = 100%				50 = 66%	34%	20 = 26%	74%
61 = 100%		48 = 78%	22%	47 = 77%	23%	25 = 40%	60%
68 = 100%		50 = 80%	20%	46 = 74%	26%	4 = 6%	94%
69 = 100%		49 = 71%	29%	35 = 50%	50%	14 = 20%	80%
90 = 100%				46 = 51%	49%	44 = 48%	52%
72 = 100%		53 = 73%	27%	56 = 77%	23%	6 = 8%	92%
54 = 100%		50 = 92%	8%	45 = 83%	17%	15 = 27%	73%
55 = 100%		45 = 81%	19%	47 = 85%	15%	40 = 72%	28%
52 = 100%				45 = 86%	14%	8 = 15%	85%
55 = 100%		40 = 72%	28%	40 = 72%	28%	11 = 20%	80%
54 = 100%		40 = 74%	26%	37 = 68%	32%	18 = 33%	67%

CUADRO No. 4

**V EL PH EN LOS PLASMAS RICOS EN PLAQUETAS
ALMACENADOS A 4°C**

0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
7.1	7.0	6.95	7.0
7.0	7.0	6.95	6.9
7.15	7.05	7.0	6.9
7.0	7.0	7.0	7.0
7.2	7.15	6.95	6.9
7.2	7.05	7.0	7.0
7.0	7.0	7.0	7.2
7.15	7.05	6.9	7.15
7.05	7.0	7.0	7.15
7.15	7.15	7.0	6.9
7.1	7.04	6.97	7.01

CUADRO No. 5

CURVA TIPO DE LA AGREGACION CON ADP DE UN PLASMA RICO EN PLAQUE- TAS ALAS 0 HORAS

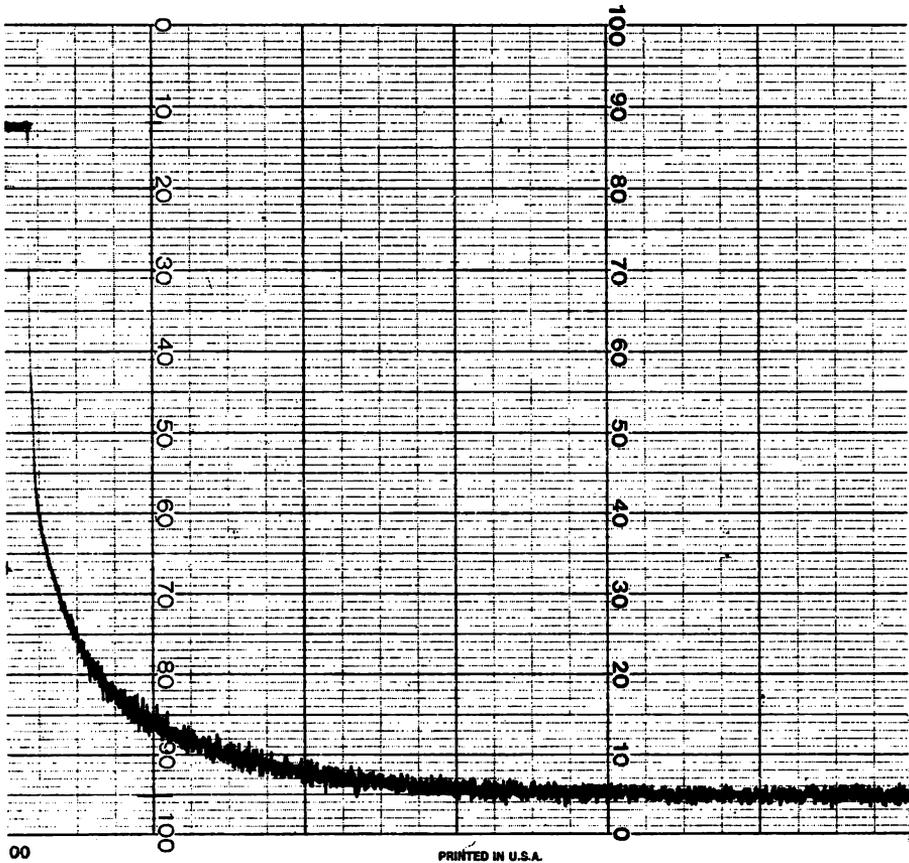
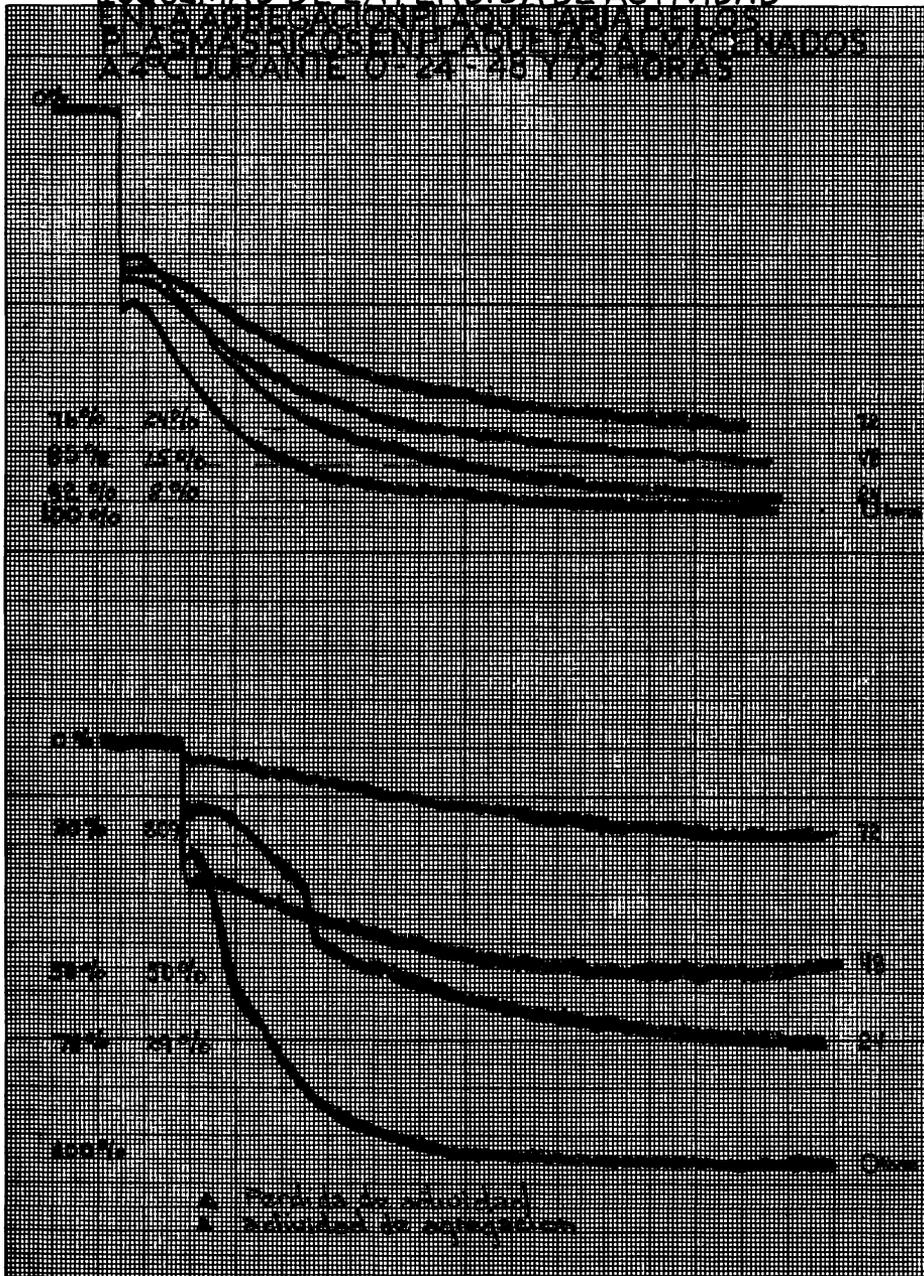


FIGURA No.8

ESQUEMAS DE LA PERDIDA DE ACTIVIDAD
 EN LA APLICACIONE ACUICOLA DE LOS
 ELASMASINTOS EN LA OJALAS ALMACENADOS
 A 25°C DURANTE 0-24-48 Y 72 HORAS



FACTOR ASSAY GRAPH PAPER



Factor _____ curve
 Products used _____
 Lot Numbers _____

Date _____
 Notes _____

- 74 -

FIGURA No 9

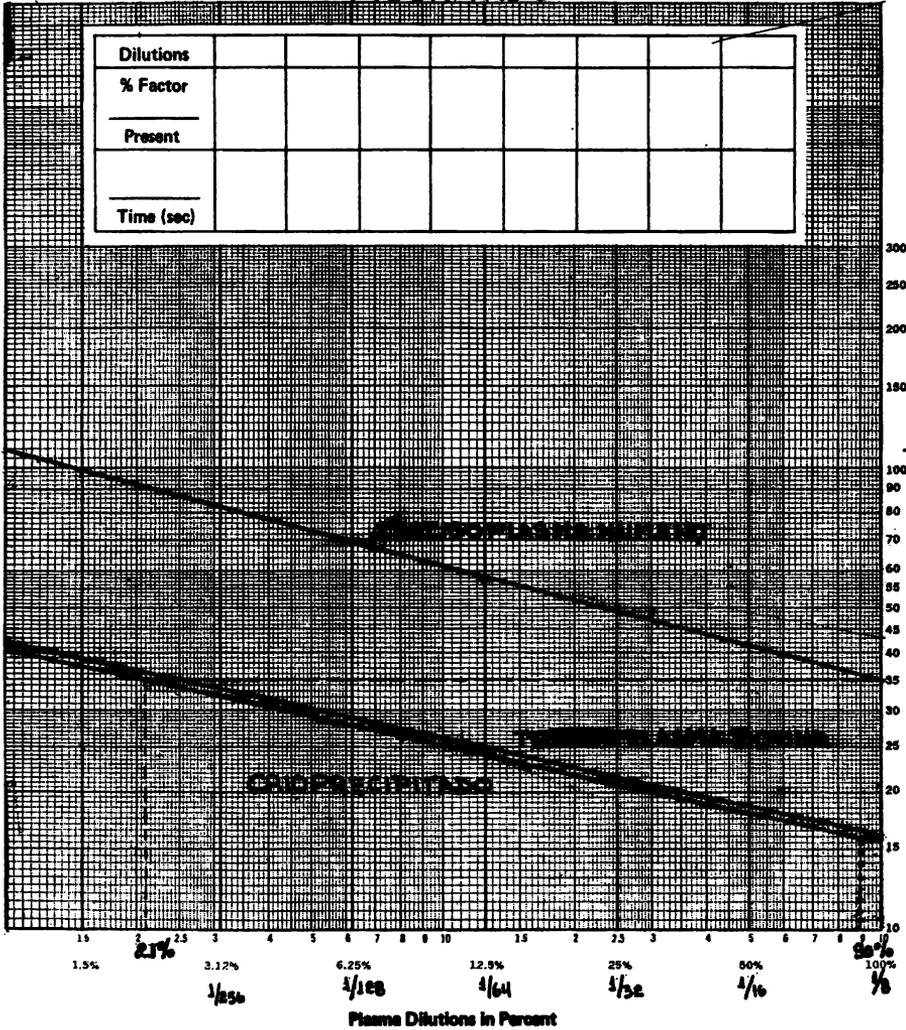
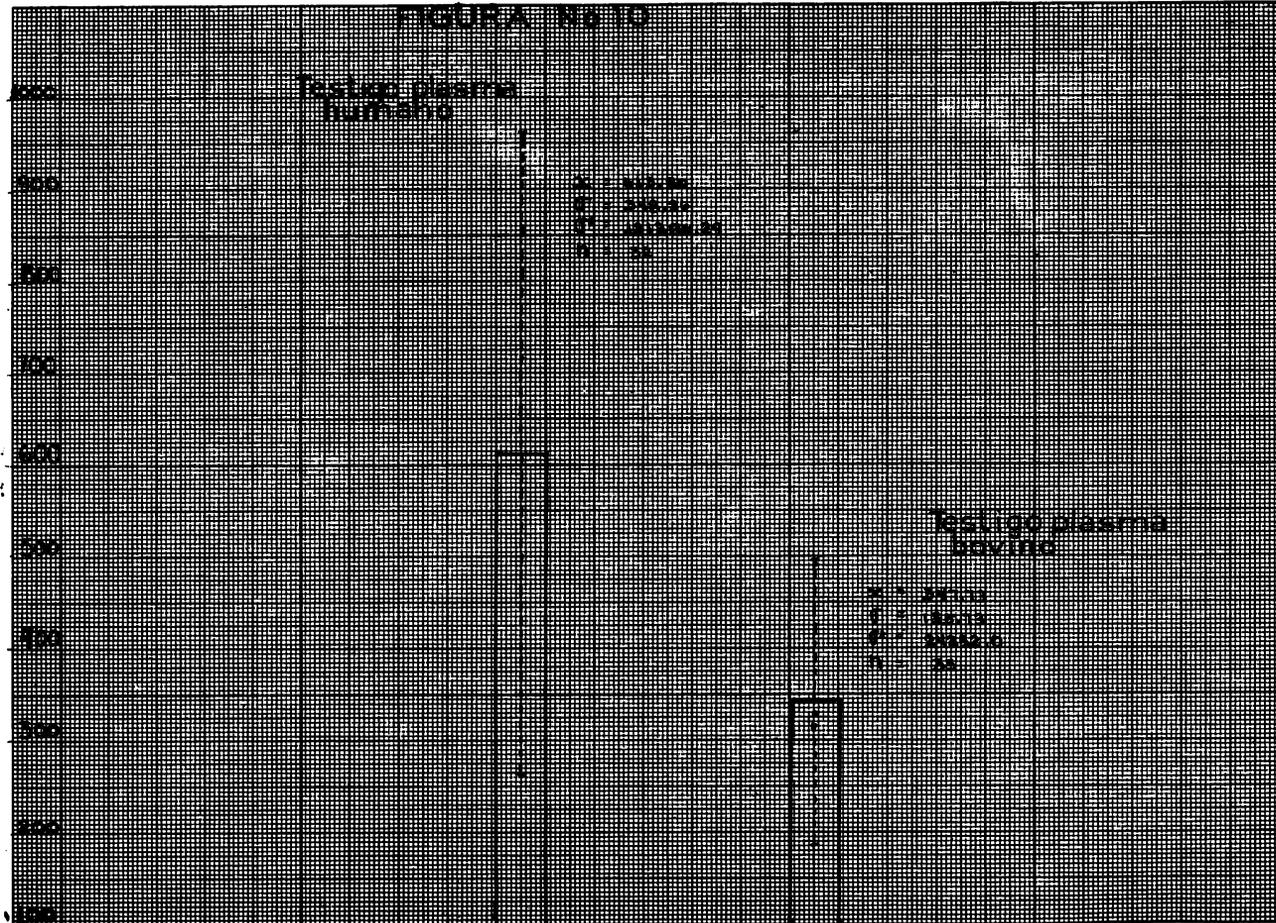


FIGURA Nº 10



75 -

C O M E N T A R I O S

El control de la actividad del PLASMA RICO EN PLAQUETAS se ha efectuado tanto IN VITRO, como IN VIVO; en este trabajo la estimación de los valores importantes se llevó a cabo sólo para la calidad IN VITRO. (38)

En las condiciones de trabajo del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional, fué evidente que el número de plaquetas obtenidas en este producto, centrifugado a 166 y 374 G, fué óptimo. Ver cuadro No. 1 y 2.

Esto contrasta con la mayoría de los artículos recientes donde se menciona, que utilizando una fuerza centrífuga de 1,000 G, el número de plaquetas es de $415,000 \pm 15,000$ (39) en nuestro caso obtuvimos un número de $594,130 \pm 157,740$ con una fuerza de centrifugación de 666 G, en cambio al emplear una fuerza centrífuga entre 166 y 374 G, la cifra de plaquetas obtenidas fué de $1,097,000 \pm 300,000$. La ventaja de utilizar preferentemente plasma rico en plaquetas y no el concentrado plaquetario que han empleado en esos trabajos, es el que al hacer una sola centrifugación el procedimiento es menos oneroso.

El control de los aparatos (en nuestro caso centrifugas refrigeradas) es muy importante, en el laboratorio se emplean centrifugas de características diferentes, ejemplo:

- 1) una de ellas cuenta con un reloj que marca de 1 minuto a 30 minutos en intervalos de 1 minuto;
- 2) otra que marca de 1 minuto a 120 minutos con intervalos de 5 minutos y
- 3) otra

C O M E N T A R I O S

El control de la actividad del PLASMA RICO EN PLAQUETAS se ha efectuado tanto IN VITRO, como IN VIVO; en este trabajo la estimación de los valores importantes se llevó a cabo sólo para la calidad IN VITRO. (38)

En las condiciones de trabajo del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional, fué evidente que el número de plaquetas obtenidas en este producto, centrifugado a 166 y 374 G, fué óptimo. Ver cuadro No. 1 y 2.

Esto contrasta con la mayoría de los artículos recientes donde se menciona, que utilizando una fuerza centrífuga de 1,000 G, el número de plaquetas es de $415,000 \pm 15,000$ (39) en nuestro caso obtuvimos un número de $594,130 \pm 157,740$ con una fuerza de centrifugación de 666 G, en cambio al emplear una fuerza centrífuga entre 166 y 374 G, la cifra de plaquetas obtenidas fué de $1,097,000 \pm 300,000$. La ventaja de utilizar preferentemente plasma rico en plaquetas y no el concentrado plaquetario que han empleado en esos trabajos, es el que al hacer una sola centrifugación el procedimiento es menos oneroso.

El control de los aparatos (en nuestro caso centrifugas refrigeradas) es muy importante, en el laboratorio se emplean centrifugas de características diferentes, ejemplo:

- 1) una de ellas cuenta con un reloj que marca de 1 minuto a 30 minutos en intervalos de 1 minuto;
- 2) otra que marca de 1 minuto a 120 minutos con intervalos de 5 minutos y
- 3) otra

que marca de 10 minutos a 120 minutos con intervalos de 10 minutos. Es obvio que si el técnico tiene que centrifugar 2 minutos en la centrifuga número 2, evidentemente tendrá que calcular más o menos el tiempo y el producto no será centrifugado correctamente y estará fuera del control de tiempo, factor muy importante en la obtención del número de plaquet--tas, por lo que las instrucciones sobre los procedimientos para la obtención de estos productos, tienen que estar a la: vista de los técnicos que obtienen estas fracciones, con las características de cada centrífuga y cuáles son los productos que pueden ser obtenidos en ellas.

En relación con los resultados de la calidad de este producto, juzgada a través de la prueba de la Retracción del coágulo, no hay en la literatura reciente datos con los cuales compararlos. Nuestros resultados pueden indicar que la función plaquetaria, en relación con la retracción del coágulo, está bien conservada. Ver cuadros No. 3, 3₁, 3₂, 3₃.

Por lo que respecta a la función plaquetaria estimada a través de la Prueba de agregación, otros grupos han encontrado que se conserva especialmente en las plaquetas almacenadas a 37°C; en nuestro caso, las plaquetas han sido almacenadas sin agitación a 4°C hasta por 72 horas. Su facultad de agregación se conserva del 71 % al 92 % a las 24 horas. A las 48 horas se aprecia de un 14 % a un 50 % de abatimiento de esta propiedad. Pero ya a las 72 horas el abatimiento de esta actividad es mayor e irregular, restan--do sólo del 6 % al 76 %. Ver cuadro No. 4.

Probablemente es más trascendente la conservación de la propiedad de agregación, ver figuras 8,8₁, en tanto que es la que interviene en la hemostasia primaria; en nuestro caso no se ha confirmado esto con estudios IN VIVO, pero en otros reportes en la literatura, la agregación es una de las mediciones del estado de la función plaquetaria que guarda relación con su buen efecto hemostático IN VIVO. (40) Por último el rango de pH, ver cuadro No. 5, que encontramos en los plasmas ricos en plaquetas frescos conservados hasta 72 horas, es satisfactorio, en virtud de que se ha reportado que la sobrevivencia de las plaquetas es mejor cuando este no es menor de pH 6.

En relación con los CRIOPRECIPITADOS RICOS EN FACTOR VIII, las medidas de control de calidad aplicadas en ellos, nos permitieron observar algunas discrepancias que al corregirlas nos permiten asegurar una mejor calidad de este producto. La técnica de preparación sufre algunas irregularidades, atribuibles directamente a la diferencia en la manera de trabajar de cada técnico, las cuales evidentemente no son de la magnitud que alteren grandemente la calidad del producto. La mayoría de los técnicos trabajan dentro de los tiempos óptimos de obtención del plasma, congelación, descongelación y almacenamiento del producto, los menos, trabajan dentro de un rango aceptable de tiempo y temperatura en el manejo del producto; por supuesto estas diferencias, hacen que el contenido de factor VIII no sea de todo homogéneo.

Para estudiar la cantidad del contenido del factor VIII en los crioprecipitados, hubo necesidad de emplear

alternativamente como testigo del 100 %, plasma humano y factor VIII bovino, remanente de la obtención del factor V bovino, en virtud de que pudimos apreciar que este último tiene dos veces la actividad del plasma humano normal y es muy estable, lo cual contrasta con la variabilidad e inestabilidad del sustrato humano, ver figura No. 9, que ha sido observada por todos los investigadores dentro de este campo. (41) En este trabajo es de notar las cifras relativamente menores de actividad, observadas cuando se comparan con el testigo bovino; ver figura No. 10, esto no es de trascendencia para el control IN VITRO del producto, considerando que la dosificación del factor VIII en los crioprecipitados se efectúa mejor contra testigo de origen bovino, en base a su estabilidad.

La diferencia en los valores de actividad de factor VIII, observados con el testigo humano y el testigo bovino, nos hace pensar que si bien con el testigo humano el límite mínimo de buena actividad está alrededor de 200 %, el límite con el testigo bovino está alrededor de 100 %.

R E S U M E N Y C O N C L U S I O N E S

1.El control de calidad obligado, en lo que se refiere a los componentes obtenidos de la sangre humana, es natural en cualquier banco de sangre.

2.El análisis de las medidas de control aplicables para asegurar una buena calidad del PLASMA RICO EN PLAQUETAS y de los CRIOPRECIPITADOS RICOS EN FACTOR VIII, separados de la sangre en el Banco Central de Sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social, confirma la obligatoriedad de esta medida en nuestros servicios hospitalarios.

3.En este trabajo se analizaron productos obtenidos en la separación rutinaria de los componentes sanguíneos en un lapso de un año y seis meses: 84 plasmas ricos en plaquetas para los cuales se concluyó:

3. a)Que en nuestras manos, la velocidad relativa de centrifugación para una cosecha óptima de plaquetas es de 169 a 374 G, de 10' a 15'.

3. b)La cifra de plaquetas por milimetro, en un plasma rico en plaquetas, obtenidos con esta velocidad en ese tiempo, es de $1 \times 10^6 \pm 3 \times 10^5$.

3. c)El pH de este plasma obtenido en ACD fórmula A^(*) debe ser similar dentro del rango aquí encontrado: 7.0 - 7.15 de las 0 horas a las 24 horas de preparación en las condiciones de trabajo actual, en los plasmas ricos en plaquetas con-

(*) Fórmula A: Dextrosa FNEUM 2.45 g , Acido Citrico FNEUM 800 mg , Citrato Trisódico FNEUM 2.2 g , Agua inyectable c.b.p. 100ml

servados a 4°C sin agitación.

3. d) Se estudiaron 74 crioprecipitados ricos en factor VIII de 1,270 (6%) para los cuales se concluyó: que para el testigo de actividad del 100 % de factor VIII es mejor emplear el de origen bovino, ya que es sumamente estable cuando se conserva en congelación a - 20,-30°C.

3. e) Utilizando el testigo bovino, la actividad mínima que deberán tener los crioprecipitados es de 100 % IN VI--TRO.

4. Considerando que la variación en la calidad de un producto depende de una serie de factores, algunos de ellos de difícil control, se recomienda:

4. a) Verificar cotidianamente la fuerza centrífuga de manera indirecta, que habrá de emplearse para la separación de los componentes sanguíneos. Para ello, el responsable de este control, tomará al azar un plasma rico en plaquetas y hará la cuenta plaquetaria, anotando el resultado en la hoja de control; si se emplean varias centrífugas deberá hacerse con plasma rico en plaquetas de cada una de ellas, anotando los datos de identificación de cada centrífuga.

4. b) En relación con los crioprecipitados, consideramos que si el técnico encargado de la preparación es siempre el mismo, el estudio de uno de cada 100 crioprecipitados, es suficiente para controlar las variables atribuibles al técnico. Cuando son varios los técnicos que periódicamente se encargan de la preparación del crioprecipitado, creemos que el análisis de un crioprecipitado, obtenido de un lote que ha sido procesado en un lapso de una semana, es suficiente.

B I B L I O G R A F I A

1. Byron A. Myhre, M.D., Ph.D.:QUALITY CONTROL IN BLOOD BANKING. First Edition. John Wiley and Sons, New York,London, Sydney,Toronto, 1974.
2. S.M. Lewis and J.F. Coster:QUALITY CONTROL IN HAEMATOTOLOGY, symposium of the international committee for standarization in haematology. First Edition. Academic Press Inc., London,New York, San Francisco, 1975.
3. Byron A. Myhre, M.D., Ph.D.:QUALITY CONTROL IN BLOOD BANKING. First Edition. John Wiley and Sons, New York,London, Sydney,Toronto, 1974.
4. Dr. Matthew J. Lynch,Dr. Stanley S. Raphael,Dr. Leslie D. Mellor,Dr. Peter D. Spare,Dr. Martin J.H. Inwood:METODOS DE LABORATORIO. Segunda Edición. Nueva Editorial Interamericana,S.A. de C.V.,México,Argentina,España,Brasil,Columbia,Chile,Ecuador,Perú,Uruguay,Venezuela, 1972.
5. Samuel I. Rapaport, M.D.:INTRODUCCION A LA HEMATOLOGIA. Reimpresión. Salvat Editores, S.A.,Barcelona,Madrid,Bogotá,Buenos Aires,Caracas,México,Quito,Rio de Janeiro,San Juan de Puerto Rico,Santiago de Chile; 1977.

6. Maxwell M. Wintrobe, M.D., Ph.D.:CLINICAL HEMATOLOGY.
Third Edition. Lea and Febiger, Philadelphia, 1953.

7. Samuel I. Rapaport, M.D.:INTRODUCCION A LA HEMATOLOGIA.
Reimpresión. Salvat Editores, S.A., Barcelona, Madrid,
Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México, Quito, Rio de Janeiro,
San Juan de Puerto Rico, Santiago de Chile, 1977.

8. Dr. Matthew J. Lynch, Dr. Stanley S. Raphael, Dr. Leslie D.
Mellor, Dr. Peter D. Spare, Dr. Martin J.H. Inwood:METODOS
DE LABORATORIO. Segunda Edición. Nueva Editorial Inter--
americana, S.A. de C.V., México, Argentina, España, Brasil,
Colombia, Chile, Ecuador, Perú, Uruguay, Venezuela, 1972.

9. Samuel I. Rapaport, M.D.:INTRODUCCION A LA HEMATOLOGIA.
Reimpresión. Salvat Editores, S.A., Barcelona, Madrid,
Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México, Quito, Rio de Janeiro,
San Juan de Puerto Rico, Santiago de Chile, 1977.

10. Samuel I. Rapaport, M.D.,:INTRODUCCION A LA HEMATOLOGIA.
Reimpresión. Salvat Editores, S.A., Barcelona, Madrid,
Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México, Quito, Rio de Janeiro,
San Juan de Puerto Rico, Santiago de Chile, 1977

11. William J. Williams, M.D., Ernest Beutler, M.D., Allan J.

- Erslev, M.D., R. Wayne Rundles, M.D., Ph.D.:HEMATOLOGY.
McGraw Hill, Inc., New York,1972.
12. Samuel I. Rapaport, M.D.:INTRODUCCION A LA HEMATOLOGIA.
Reimpresión. Salvat Editores, S.A., Barcelona, Madrid,
Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México, Quito, Rio de Janeiro,
San Juan de Puerto Rico, Santiago de Chile, 1977.
13. William J. Williams, M.D., Ernest Beutler, M.D., Allan J.
Erslev, M.D., R. Wayne Rundles, M.D., Ph.D.:HEMATOLOGY.
McGraw Hill, Inc., New York, 1972.
14. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.:HUMAN BLOOD COAGULATION,
HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell
Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Mel-
bourne, 1976.
15. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.:HUMAN BLOOD COAGULATION,
HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell
Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Mel-
bourne, 1976.
16. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.:HUMAN BLOOD COAGULATION,
HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell

Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.

17. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.: HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.
18. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.: HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.
19. MANUAL DE TERAPIA CON COMPONENTES SANGUINEOS. Primera Edición. Asociación Americana de Bancos de Sangre, Chicago, Illinois, 1971.
20. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.: HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.
21. Pool J.G., Shannon A. E.: Production of high potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. New Eng. J. of Med. 273:1443, 1965.

22. Rosemary Biggs:International Forum.Vox Sang.22:554,1972.
23. Pool J.G.:The preparation an use of crioprecipitated factor VIII in haemofilia.International symposium.Bruselas. Pags.24-25,1967.
24. Preston A.E.:The preparation an use of crioprecipitated factor VIII in haemofilia.International symposium.Bruse- las.Pag.30.
25. Brown, D.,Hardisty,R.M.,Kosoy,M.H.,Bracken,C.:Antihemofi- lic globulin:preparation by an improved crioprecipita- tion method and clinical use. Brit.Med.J.22:79,1967.
26. Verstraete,M.,Servais,O.,Pool J.G.:The preparation an use of crioprecipitated factor VIII in haemofilia.Internatio- nal symposium.Bruselas.Pags.39-41,1967.
27. H. Rodríguez Moyado; J.A. Uribe Cortes:IMPORTANCIA DEL FRACCIONAMIENTO DE LA SANGRE HUMANA PARA UN MEJOR RENDI- MIENTO CLINICO DE LA TERAPEUTICA TRANSFUSIONAL.Sangre,18, Pag.459,1973.
28. Dr. Matthew J. Lynch,Dr. Stanley S. Raphael,Dr. Leslie D. Mellor,Dr. Peter D. Spare,Dr. Martin J.H. Inwood:METODOS

DE LABORATORIO. Segunda Edición. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, Argentina, España, Brasil, Colombia, Chile, Ecuador, Perú, Uruguay, Venezuela, 1972.

29. William J. Williams, M.D., Ernest Beutler, M.D., Allan J. Erslev, M.D., R. Wayne Rundles, M.D., Ph. D.: HEMATOLOGY. McGraw Hill, Inc., New York, 1972.

30. H. Rodríguez Moyado; J.A. Uribe Cortes. Sangre, 18, Pag. 456, 1973.

31. J.A. Blakely, M.D.: Basic techniques of platelet aggregation, utilizing the BRYSTON AGGREGOMETER. Sunnybrook Hospital, Bayview Avenue, Toronto.

32. Maxwell M. Wintrobe, M.D., Ph.D.: CLINICAL HEMATOLOGY. Third Edition. Lea and Febiger, Philadelphia, 1953.

33. William J. Williams, M.D., Ernest Beutler, M.D., Allan J. Erslev, M.D., R. Wayne Rundles, M.D., Ph.D.: HEMATOLOGY. McGraw Hill, Inc., New York, 1972.

34. Maxwell M. Wintrobe, M.D., Ph.D.: CLINICAL HEMATOLOGY. Third Edition. Lea and Febiger, Philadelphia, 1953.

35. J.V. Dacie, M.D., S.M. Lewis, M.D.: PRACTICAL HAEMATOLOGY. Third Edition. J. and A. Churchill Ltd., London, 1963.
36. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.: HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.
37. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.: HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.
38. Holme Stein, Kalpana Vaidya and Scott Murphy: Platelet storage at 22°C: "Effect of type of agitation on morphology, viability, and function In Vitro". Blood. 52:425-435, 1978.
39. S.J. Slichter and L.A. Harker: "Preparation and storage of platelet concentrates. I Factors influencing the harvest of viable platelets from whole blood". British Journal of Haematology. 34:395-402, 1978.

40. Rosemary Biggs, M.D., Ph.D.: HUMAN BLOOD COAGULATION, HAEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1976.
41. Sherrill J. Slichter: Efficacy of platelets collected by semicontinuous flow centrifugation (HAEMONETICS MODEL 30). British Journal of Haematology. 38:131, 1978.