

125
24



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

Determinación de Fibrinógeno, Proteínas Totales
y Albúmina en Crioprecipitados

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
María de Lourdes Sánchez Sánchez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1991



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 está 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.

I N D I C E

	pág.
I. INTRODUCCION	2
II. GENERALIDADES	4
III. MATERIAL Y METODOS	11
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	20
V. CONCLUSIONES	38
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40

OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración de fibrinógeno en los crioprecipitados preparados en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, para evaluar la -- posibilidad de su empleo como fuente de adhesivo de fibrina.

Adicionalmente se determinó la concentración de proteínas totales y albúmina de los crioprecipitados.

I. INTRODUCCION

La obtención del crioprecipitado es un procedimiento relativamente simple que se desarrolló en los Bancos de Sangre --- como una fuente de factor VIII de la coagulación. La obtención del crioprecipitado permite la separación simultánea de: Paquete de glóbulos rojos, concentrados plaquetarios y otros - componentes del plasma. (1,2)

El crioprecipitado constituye la fracción proteica del -- plasma insoluble en frío, que se recupera por centrifugación - cuando el plasma fresco congelado se descongela a 4°C (3,4). El crioprecipitado contiene los siguientes factores de la coagulación: F I (fibrinógeno), F VIII (factor antihemofílico), F VIII:R (factor von Willebrand), F XIII (factor estabilizante de la fibrina) y fibronectina.

La fracción de globulinas del plasma que precipita en -- frío contiene aproximadamente 400 mg/unidad de proteínas totales, que corresponden al 4% de las proteínas del plasma (5). El crioprecipitado en corrimiento electroforético difiere poco del que se observa en el plasma total. De los componentes del crioprecipitado, el factor VIII es de particular importancia - en el tratamiento de hemofilia y de otros padecimientos. La -- recuperación de la porción coagulante del F VIII (F VIII:C) es del orden de 55⁺ 13% de la actividad inicial del plasma, el - 30% queda en el plasma empobrecido en F VIII y el 15% restante se pierde (6). Existe una gran variabilidad en la recuperación

de F VIII:C, en particular atribuible a los niveles de -----
F VIII:C en el plasma de los donadores de sangre. Los indivi-
duos con grupo sanguíneo O tienen niveles más bajos de F VIII
que los otros grupos sanguíneos (7 y 8).

II. GENERALIDADES

El fibrinógeno humano es una glicoproteína con un peso molecular de 340 000 daltons. Es el precursor soluble de la proteína formadora del coágulo, la fibrina.

La molécula de fibrinógeno está compuesta por tres pares de cadenas de péptidos conectadas por puentes de disulfuro para formar un dímero compuesto de mitades simétricas. Esas cadenas generalmente se llaman $A\alpha$, $B\beta$ y γ . $A\alpha$ se designa a la cadena que produce los fibrinopéptidos del grupo A cuando es atacada por la trombina, $B\beta$ indica las cadenas que producen los fibrinopéptidos B, y γ se usa para las cadenas que no son atacadas por la trombina. Cuando los fibrinopéptidos A y B se liberan de la fibrina, a cada una de las resultantes se les llama alfa, beta y gamma. Empleando electroforesis en gel de poliacrilamida se ha demostrado que el peso molecular de las cadenas $A\alpha$ es de alrededor de 73 000, de las $B\beta$ de 60 000 y de las γ de 53 000. El análisis de los grupos libres aminoterminales del fibrinógeno y de la fibrina han mostrado seis residuos aminoácidos por molécula.

El fibrinógeno humano tiene un doble eje de simetría con las seis cadenas de tal manera que sus grupos aminoterminales finales están aproximados y se mantienen en ésta posición por puentes disulfuro intracadenas, así llamados "enlaces disulfuro".

El fibrinógeno parece tener una compleja estructura secundaria y terciaria, la cual es indefinida, pero que se sugiere -

por la presencia de neoantígenos durante la degradación de ---- fibrinógeno a fibrina por plasmina.

Los péptidos representan cerca del 3% del peso del fibrin-- nógeno y se liberan cuando éste se convierte a fibrina por la - trombina. La trombina hidroliza cuatro uniones de péptidos de - fibrinógeno humano, liberando dos moles, cada una de fibrinopéptidos A y B de las cadenas A α y B β respectivamente. La trombina libera fibrinopéptidos A del fibrinógeno a una mayor velocidad que los fibrinopéptidos B, sugiriendo que la estructura - de la molécula en la región de esta unión favorece la acción de la trombina.

El coágulo formado de fibrinógeno purificado y trombina, - en contraste con el que se forma en el plasma, es mecánicamente débil y es soluble en ácido diluido o en solución de urea concentrada. La diferencia se debe a la presencia en el plasma de un factor de coagulación adicional, el factor XIII. En presen-- cia de factor XIII (factor estabilizador de la fibrina), de --- trombina y calcio, el polímero de fibrina forma enlaces cruzados y el coágulo resultante no es soluble en urea. La unión --- cruzada ocurre entre las cadenas gamma y entre las cadenas alfa. En ausencia de factor XIII no se forman los enlaces cruzados de los filamentos de fibrina.

Las plaquetas contienen fibrinógeno, el cual constituye -- más del 15% de las proteínas plaquetarias, el fibrinógeno plaquetario parece existir tanto como fibrinógeno del plasma ab-- sorbido a la superficie plaquetaria como fibrinógeno intra----

plaquetario. El fibrinógeno plaquetario no es coagulado completamente por trombina. Se ha concluido que el fibrinógeno del plasma y de las plaquetas son producto de un mismo gen (9).

El fibrinógeno es una proteína, que existe en el plasma de sujetos normales en cantidades de 300-400 mg/dL. Es menos soluble que la mayoría de las otras proteínas plasmáticas y puede precipitarse en el plasma mediante una saturación al 25% de sulfato de amonio. Cuando se congela el plasma y luego se descongela, el fibrinógeno se encuentra como una sustancia en partículas, con un residuo de tirosina. El fibrinógeno se desnaturaliza en el plasma incubado a 56°C durante tres minutos. Su molécula tiene una longitud de 475 nm y que consiste de tres estructuras nodulares conectadas por un filamento. Los dos núcleos terminales tienen un diámetro aproximado de 65 nm, y el núcleo central es algo menor. El fibrinógeno no se adsorbe en el plasma oxalatado por el sulfato de bario y está ausente del suero.

El fibrinógeno se transforma en fibrina mediante la acción de la trombina. La trombina lo escinde en cuatro enlaces peptídicos a partir de cada molécula de fibrinógeno y se liberan cuatro péptidos, que son de dos tipos, el fibrinopéptido A y el fibrinopéptido B. La presencia de estos péptidos en la molécula de fibrinógeno inhibe la polimerización porque actúan como fuerzas que se repelen. Después de la liberación de los cuatro péptidos, la agregación de las moléculas de fibrina tiene lugar espontáneamente. En presencia del factor XIII los agregados de fibrina forman enlaces cruzados mediante un meca-

nismo de transpeptidización (10).

Se ha demostrado que el crioprecipitado, por su contenido de fibrinógeno, puede ser útil como parte de la preparación -- del adhesivo o sello de fibrina (fibrin glue). Cuando se mezcla con trombina el crioprecipitado aplicado tópicamente detiene el sangrado (11). El mecanismo del sistema del sello de fibrina semeja al estadio final de la cascada de la coagulación, en el que el fibrinógeno se convierte a fibrina en presencia de trombina, factor XIII, fibronectina y calcio ionizado (12,13). La reacción que ocurre es el rompimiento de los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno por la trombina, lo que da lugar a la formación de monómeros de la fibrina. La trombina también activa al factor XIII, el cual permite la estabilización de la fibrina (en presencia de iones calcio) y la formación de un coágulo firme. La fibronectina, proteína ---- opsónica, también participa en el entrecruzamiento de la fibrina y parece promover la migración celular y el crecimiento fibroblástico en las áreas de aplicación del sello de fibrina (12).

El interés en el uso de fibrinógeno como un adhesivo quirúrgico natural se inició en 1900 (12). El concepto de los -- sistemas sellantes de la fibrina se hizo una realidad en -- 1970, cuando se mejoraron las técnicas de aislamiento y concentración de los factores de la coagulación. La goma de fibrina depende de una fuente consistente y concentrada de fibrinógeno.

El riesgo de la transmisión de virus por los productos-- comerciales de goma de fibrina está aún en debate (7). Teó-- ricamente, los virus remanentes en las preparaciones tópicas se pueden absorber y retener por el paciente, lo que puede - ocasionar la transmisión de hepatitis B, hepatitis no A no B, virus de inmunodeficiencia humana (VIH-I) y posiblemente --- otros virus tales como el VIH-2 (12, 14, 15, 16).

Las fuentes alternativas de fibrinógeno comercial, como son crioprecipitados autólogos o de un único donador elimina el riesgo de la transmisión de virus (17, 18, 19). Aun cuando los crioprecipitados de un origen autólogo producen cantidades limitadas de fibrinógeno, las recuperaciones son usualmente suficientes para la mayoría de los procedimientos quirúrgicos.

En los términos más simples, el empleo de los crioprecipitados, como fuente de fibrinógeno, combinan la aplicación-directa del crioprecipitado descongelado en la superficie de sangrado y la aplicación tópica de trombina bovina (20, 21). La reacción de coagulación se aumenta cuando la trombina se reconstituye con cloruro de calcio (20, 22).

Estudios comparativos han demostrado que los preparados comerciales de fibrinógeno contienen generalmente las concentraciones más altas de fibrinógeno (70-100 mg/mL) (23, 24), y que los crioprecipitados de donadores seleccionados al azar contienen concentraciones más bajas (2.6-25 mg/mL) (24, 25). La centrifugación adicional a los crioprecipitados aumenta - la concentración de fibrinógeno a niveles que oscilan entre

21.6 y 40 mg/mL (17, 22).

En la literatura europea existen numerosos reportes de la aplicación de la goma de fibrina (17). Los estudios que revisan la experiencia en humanos no permiten comparar grupos tratados con goma de fibrina, de aquellos grupos de control.

Aun cuando existe considerable variación en el diseño experimental, los estudios han mostrado que los sistemas con sello de fibrina son eficaces para controlar el foco de sangrado lento, flúido difuso, sangrado de sitios con piquete de aguja, colección de líquido seroso y hemorragia difusa de órganos parenquimatosos. La goma de fibrina no controla la hemorragia rápida arterial o venosa, y no reemplaza una buena técnica quirúrgica (26).

La principal aplicación de la goma de fibrina es en el campo de la cirugía cardioráfrica y en el de cirugía vascular general. En cirugía cardíaca la goma de fibrina se ha usado exitosamente en la implantación de válvula prostética y además para sellar el foco de sangrado microvascular (27, 28). La aplicación directa de la goma de fibrina al injerto vascular sintético, ha dado como resultado un mejor sellado de los materiales del injerto que aquellos obtenidos con métodos antiquos tales como sangre total o pretratamiento con albúmina (29). En cirugía torácica se han reportado excelentes resultados en la reparación de sello de aire pulmonar (30) y en neumotórax experimentales (31).

El uso de la goma de fibrina se describió primero en la -
cirugía oral y maxilofacial y continúan apareciendo reportes
de su exitosa aplicación en este campo (32).

La goma de fibrina parece ser ideal para la reaplicación
de tejido cutáneo y subcutáneo en cirugía plástica y en ciru-
gía general (33). También se ha usado en procedimientos neuro-
quirúrgicos y en cirugía ortopédica (34).

En conclusión, evidencias clínicas y experimentales su-
gieren que la goma de fibrina tiene un amplio potencial para -
ser usado como hemostático quirúrgico y agente adhesivo.

En general, la aplicación de la goma de fibrina se ha -
restringido por la falta de familiaridad con el material y la
inexperiencia en su uso. La falta de disponibilidad de los --
productos manufacturados comercialmente, indudablemente ha ju-
gado un papel en la subutilización de goma de fibrina. La ob-
tención de fibrinógeno de un solo donador puede llenar las ne-
cesidades actuales (24, 25, 35).

III. MATERIAL Y METODOS

En el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, durante el periodo de junio a diciembre de 1989, se prepararon un total de 5642 crioprecipitados. De éstos, empleando números aleatorios, se seleccionaron 154 unidades, que correspondieron a 2.7% del total de crioprecipitados preparados.

Los crioprecipitados seleccionados se descongelaron, colocando las unidades en baño maría a 37°C. Se pesaron y se calculó el volumen considerando una densidad de 1.03 g/mL. A los crioprecipitados con volumen inferior a 15 ml se les adicionó 10 ml de solución salina isotónica, se homogeneizaron perfectamente y se tomaron dos alícuotas de 3 ml, las que se congelaron a -30°C.

Una alícuota se empleó para la cuantificación de fibrinógeno mediante el método de microprecipitación y en la segunda se cuantificaron proteínas totales y albúmina.

OBTENCION DEL CRIOPRECIPITADO

DEFINICION.- La fracción proteica del plasma que precipita mediante la congelación se conoce con el nombre de crioprecipitado, éste contiene los siguientes factores de la coagulación: factor I o fibrinógeno, factor VIII o globulina antihemofílica, - factor XIII o estabilizante de la fibrina y fibronectina.

Material biológico.- Una unidad de sangre total, contenida en - sistema de bolsa múltiple y anticoagulante con ACD o CPDA-I. La sangre total para obtención de crioprecipitado no debe tener más de 6 horas de extraída.

Reactivos

Acetona o etanol

Hielo seco

Material

Centrífuga refrigerada

Balanza de dos platillos

Extractor de plasma

Sellador dieléctrico o grapas metálicas

Refrigerador

Pinzas hemostáticas

Procedimiento

1. Colocar las unidades de sangre total en las camisas de la -- centrífuga refrigerada. Nivelar empleando una balanza de dos - platillos.

2. Centrifugar durante 10 min. a 2 400 rpm a una temperatura de 4-6°C.
3. Colocar las unidades en el extractor de plasma. Transferir el plasma sobrenadante, libre de células, a una de las bolsas satélite.
4. Utilizando las pinzas hemostáticas, cerrar el flujo del plasma, sellar y cortar por encima de la unión (Y) de las bolsas satélite.
5. Sumergir las unidades de plasma en un baño de acetona (o etanol) y hielo seco a -70 °C durante 10 a 15 min.
6. Descongelar lentamente la unidad de plasma que contiene el crioprecipitado, colocándola en refrigerador a 4°C, durante 24 horas aproximadamente.
7. Cuando el plasma esté prácticamente descongelado (consistencia lodosa), centrifugar durante 10 min a 2 800 rpm a una temperatura de 4-6°C.
8. Colocar la unidad en el extractor de plasma y transferir el plasma a la bolsa satélite. Suspender la extracción cuando el crioprecipitado se encuentre suspendido en un volumen aproximado de 5 a 25 ml de plasma.
9. Congelar a -20 o -30°C los crioprecipitados obtenidos. En estas condiciones de almacenamiento tienen una vigencia de un año.

DETERMINACION RAPIDA DE FIBRINOGENO

Método de microprecipitación en tubo capilar (fibrinocrito)(36).

Fundamento.- El método se basa en la medición de altura en mm del paquete de fibrinógeno precipitado por acción de calentamiento del crioprecipitado a 58°C.

METODO

1. Descongelar la alícuota del crioprecipitado. Llenar 2/3 -- partes de un tubo capilar (sin anticoagulante). Sellar un extremo del tubo con calor. Centrifugar para empaquetar el plasma. Sellar con calor el otro extremo del capilar.
2. Introducir el capilar en baño maría a 58°C durante 15 minutos.
3. Centrifugar durante 3 minutos a 11 000 rpm.
4. Colocar el capilar en una microescala y leer la altura en mm del fibrinógeno precipitado (AF) y la altura total de la muestra de crioprecipitado (AC).

$$\text{fibrinocrito} = \frac{AF}{AC} \times 100$$

Convertir el fibrinocrito a mg/dL de fibrinógeno multiplicando por el factor K.

Obtención del factor

Empleando un método cuantitativo (gravimetría, colorimetría), determinar la concentración de fibrinógeno en 50 muestras de crioprecipitados.

2. Simultáneamente determinar fibrinocrito en las 50 muestras.
3. Dividir la concentración de fibrinógeno de cada muestra entre el fibrinocrito correspondiente.
4. Obtener el factor promediando los factores individuales.
5. La K obtenida es de 62.16

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

Fundamento

Las uniones peptídicas de las proteínas reaccionan con el sulfato de cobre en solución alcalina y producen un color violeta proporcional a su concentración.

Reactivos

Reactivo de Biuret: Tartrato de sodio y potasio 18 mmol/L;
iodato de potasio 10 mmol/L; sulfato
de cobre 12 mmol/L; hidróxido de sodio
200 mmol/L

Estándar de proteínas: 80 g/L

Procedimiento

TUBOS	BLANCO	ESTANDAR	PROBLEMA
Agua	0.1 ml	-	-
Estándar de proteínas 80 g/L	-	0.1 ml	-
Crioprecipitado problema	-	-	0.1 ml
Reactivo de Biuret	5 ml	5 ml	5 ml
Agitar y dejar en reposo 20 minutos a temperatura ambiente			

Leer a longitud de onda de 550 nm o con el filtro correspon--
diente (verde), ajustando a 100% de transmitancia o cero de --
absorbencia con el blanco de reactivos. El color es estable -
2 horas.

Convertir la lectura de absorbencia a concentración de proteí--
nas por cálculo o con la curva de calibración.

Cálculos

$\frac{A \text{ problema}}{A \text{ estándar}} \times 80 = \text{g de proteínas/L}$

A estándar

Curva de calibración

Medir exactamente las diluciones para la curva de acuerdo a la concentración del estándar.

Ejemplo:

TUBOS	ESTANDAR DE PROTEINAS CON 80 g/L	AGUA DESTILADA	EQUIVALENTE A g DE PROTEINAS/L
1	0.5 ml	3.5	10
2	0.5 ml	1.5	20
3	0.5 ml	0.5	40
4	1.5 ml	0.5	60
5	2.0 ml	0.0	80

Continuar con cada dilución como se indica en el procedimiento

DETERMINACION DE ALBUMINA

Fundamento

La albúmina del suero, cuando está en amortiguador y pH adecuados, tiene la propiedad de unirse a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waal's a ciertos colorantes e indicadores como el verde de bromocresol, formando complejos coloridos cuya intensidad es proporcional a la concentración de este medio biológico.

Reactivos

Reactivo cromógeno
para albúmina : Acido láctico 806 mmol/L; verde de bromocresol 1432 mmol/L; hidróxido de sodio 5000 mmol/L; "Tween 20" 20 ml/L

Estándar de albúmina 4 g/L

Procedimiento

Diluir cuidadosamente el crioprecipitado problema 1:10 con agua destilada			
TUBOS	BLANCO	ESTANDAR	PROBLEMA
Agua	0.1 ml	-	-
Estándar de albúmina 4 g/L	-	0.1 ml	-
Crioprecipitado problema diluido 1:10	-	-	0.1 ml
Reactivo para albúmina	1 ml	1 ml	1 ml
Agua	4 ml	4 ml	4 ml

Agitar y dejar en reposo 5 minutos a temperatura ambiente

Leer a longitud de onda de 630 nm o con el filtro correspondiente (rojo), ajustando a 100% de transmitancia o cero de absorbencia con el blanco de reactivos. El color es estable 2 horas.

Convertir la lectura de absorbencia a concentración por ----
cálculo o con la curva de calibración.

Cálculos

$A_{\text{problema}} \times 4 = \text{g de albúmina/L}$

A estándar

Curva de calibración

Reconstituir el estándar de acuerdo con lo marcado en la eti-
queta y preparar a partir de él una dilución de 1:10.

Medir exactamente las diluciones para la curva.

TUBOS	ESTANDAR DE ALBUMINA 8 g/L	AGUA DESTILADA	EQUIVALENTE ALBUMINA g/L
1	0.5 ml	7.5 ml	5
2	0.5 ml	3.5 ml	10
3	0.5 ml	1.5 ml	20
4	0.5 ml	0.5 ml	40
5	1.0 ml	0.0 ml	80

Continuar con cada dilución como se indica en el procedimiento

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se presentan los valores individuales de las determinaciones de fibrinógeno, proteínas totales y albúmina, de los 154 crioprecipitados estudiados.

En las gráficas 1 a 3 se muestra la distribución de frecuencias porcentuales en las determinaciones de fibrinógeno, proteínas totales y albúmina, expresadas en g/L en los 154 crioprecipitados. Ninguna de las mediciones mostró distribución gaussiana, en las tres se puede apreciar un sesgo a la izquierda.

En la gráfica 4 se encuentra la distribución de frecuencias de fibrinógeno en mg/Unidad, y en las gráficas 5 y 6 las de proteínas totales y albúmina en g/Unidad. También en estas gráficas se puede observar un sesgo a la izquierda en fibrinógeno, proteínas y albúmina.

En la tabla 2 se presentan los valores máximo y mínimo de las determinaciones en fibrinógeno, proteínas totales y albúmina, en los 154 crioprecipitados estudiados.

En la tabla 3 se encuentra el promedio y la desviación estándar de las mismas. El promedio y desviación estándar del volumen de los crioprecipitados fue de 15.11 y 10.09 ml respectivamente.

TABLA 1

	FIBRINOGENO		PROTEINAS TOTALES		ALBUMINA	
	g/L	mg/U	g/L	g/U	g/L	g/U
1	19.199	136.8	118	0.839	55	0.389
2	11.685	159.3	90	1.229	52	0.715
3	4.036	206.3	89	4.550	50	2.560
4	9.846	83.1	57	0.479	30	0.252
5	2.966	105.7	94	3.352	44	1.550
6	5.709	44.2	76	0.585	40	0.309
7	18.809	175.1	83	0.772	34	0.315
8	15.757	187.5	95	1.130	49	0.579
9	2.194	30.1	73	0.996	38	0.516
10	0	0	49	0.309	21	0.134
11	16.282	185.9	93	1.060	69	0.788
12	3.422	70.5	52	1.070	29	0.588
13	3.771	58.5	47	0.729	35	0.545
14	4.763	109.9	49	1.130	31	0.717
15	6.441	70.9	59	0.650	48	0.531
16	5.388	241.4	61	2.733	45	2.024
17	3.215	62.5	40	0.774	30	0.580
18	3.791	79.6	54	1.133	37	0.769
19	9.238	104.4	53	0.596	64	0.718
20	11.732	132.3	85	0.957	38	0.427
21	14.334	179.7	84	1.060	44	0.550
22	2.939	143.0	65	3.163	43	2.102
23	4.717	65.6	64	0.884	38	0.530
24	7.024	92.9	88	1.161	44	0.583
25	2.879	172.1	76	4.547	45	2.675
26	7.834	95.6	64	0.777	36	0.436
27	15.829	32.0	50	0.278	50	0.272
28	4.013	118.9	72	2.134	38	1.140
29	14.034	112.6	103	0.828	41	0.332
30	20.523	220.6	119	1.286	41	0.441
31	9.454	90.2	123	1.172	35	0.338
32	8.608	67.2	78	0.605	27	0.211
33	7.323	106.8	67	0.976	25	0.364

34	8.219	230.7	90	2.526	42	1.170
35	13.449	191.4	107	1.526	45	0.638
36	6.961	75.5	73	0.792	33	0.360
37	1.598	24.1	45	0.679	18	0.274
38	2.223	34.5	52	0.806	20	0.305
39	2.366	39.7	46	0.772	18	0.309
40	5.456	57.7	68	0.720	23	0.238
41	5.091	145.9	46	1.317	17	0.491
42	2.997	86.5	68	1.962	22	0.632
43	7.326	84.9	88	1.014	28	0.328
44	4.846	84.4	43	0.749	23	0.403
45	4.145	75.3	47	0.853	21	0.377
46	5.395	88.3	63	1.031	23	0.376
47	6.810	58.4	97	0.836	43	0.368
48	12.916	124.8	88	0.845	37	0.356
49	6.371	110.7	40	0.686	22	0.380
50	8.238	81.2	77	0.754	28	0.277
51	7.382	72.2	89	0.870	33	0.320
52	9.632	107.3	59	0.655	16	0.178
53	3.948	102.2	78	2.019	33	0.844
54	3.547	56.3	48	0.761	22	0.345
55	7.740	86.1	79	0.887	34	0.377
56	1.456	22.1	41	0.623	22	0.330
57	1.357	19.5	75	1.077	20	0.288
58	11.950	109.0	100	0.917	26	0.235
59	5.400	136.0	72	1.813	31	0.772
60	7.184	97.0	84	1.128	29	0.396
61	1.498	26.5	58	1.026	20	0.355
62	1.990	31.6	44	0.699	20	0.310
63	4.318	51.4	68	0.810	29	0.348
64	5.990	55.1	58	0.537	25	0.227
65	11.831	105.3	81	0.718	38	0.337
66	19.800	176.2	70	0.623	32	0.282
67	6.371	72.0	83	0.937	36	0.407
68	6.978	151.4	102	2.213	40	0.871
69	11.490	119.5	86	0.897	30	0.313

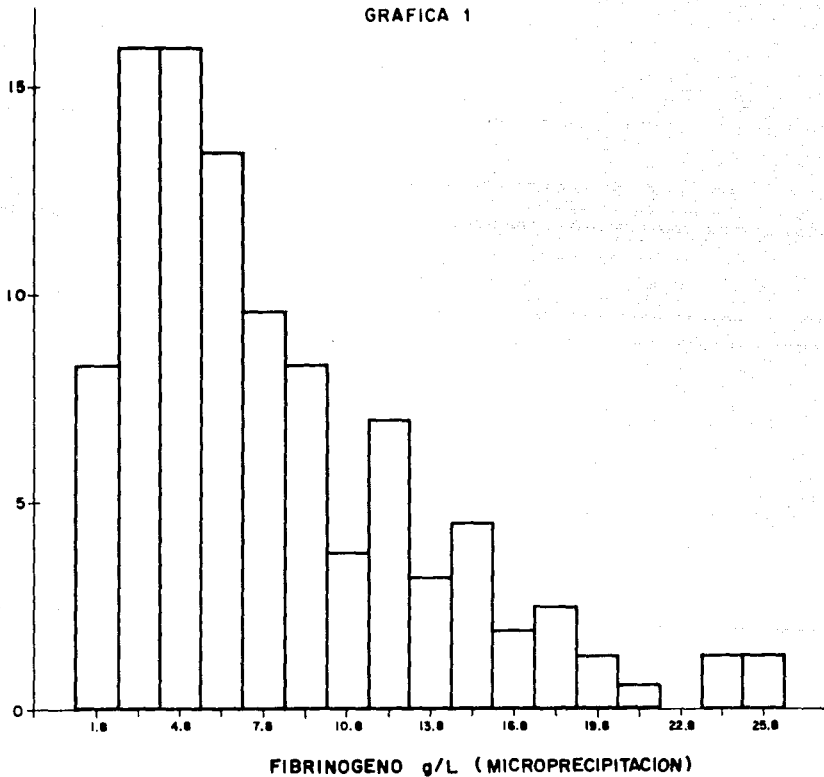
70	9.448	106.8	83	0.937	33	0.374
71	7.109	108.1	57	0.866	25	0.386
72	2.814	26.5	83	0.776	31	0.295
73	8.053	100.7	81	1.012	35	0.433
74	2.959	23.7	79	0.630	31	0.251
75	23.869	255.4	93	0.994	42	0.450
76	17.050	175.6	102	1.055	37	0.376
77	18.304	183.0	94	0.940	42	0.418
78	9.499	118.7	104	1.305	46	0.580
79	10.104	262.7	60	1.560	26	0.674
80	5.076	61.4	139	1.679	65	0.792
81	24.291	140.9	7.9	0.458	35	0.205
82	6.906	137.4	6.7	1.333	32	0.632
83	7.515	69.9	56	0.521	30	0.274
84	5.117	54.8	79	0.848	31	0.332
85	8.652	56.2	48	0.313	28	0.182
86	6.549	71.4	80	0.877	40	0.434
87	5.959	64.9	95	1.044	47	0.507
88	3.770	46.0	73	0.888	35	0.424
89	12.704	174.0	81	0.301	20	0.264
90	7.752	88.4	84	0.959	39	0.443
91	10.275	130.5	68	0.862	34	0.433
92	2.596	32.7	54	0.677	28	0.356
93	4.161	80.7	49	0.950	26	0.495
94	3.228	21.6	94	0.610	36	0.244
95	4.476	60.0	82	1.099	35	0.465
96	9.825	170.0	135	0.986	56	0.971
97	2.201	44.2	34	0.683	17	0.333
98	2.369	37.2	48	0.753	22	0.341
99	3.885	172.9	76	3.382	39	1.718
100	9.051	96.8	87	0.931	37	0.398
101	15.641	150.2	92	0.882	43	0.410
102	18.642	169.6	105	0.954	48	0.439
103	8.555	82.1	106	1.019	52	0.494
104	26.146	122.9	75	0.352	38	0.178

105	2.577	26.0	86	0.864	39	0.389
106	15.459	92.8	79	0.479	34	0.205
107	5.812	34.6	123	0.734	49	0.291
108	11.675	49.0	91	0.383	36	0.150
109	11.367	69.3	105	0.643	42	0.256
110	5.911	284.1	75	3.600	33	1.586
111	3.864	41.0	95	1.009	42	0.442
112	14.368	165.2	89	1.032	36	0.405
113	3.531	41.3	67	0.781	31	0.360
114	1.709	10.4	61	0.370	31	0.191
115	17.810	146.0	104	0.852	45	0.373
116	6.903	85.6	99	1.231	41	0.506
117	8.310	72.3	86	0.747	43	0.370
118	15.174	62.2	83	0.338	36	0.149
119	16.348	112.8	117	0.811	51	0.353
120	8.607	102.4	77	0.919	35	0.421
121	5.939	55.8	85	0.795	37	0.352
122	12.788	117.6	83	0.765	40	0.369
123	5.104	32.2	78	0.488	33	0.207
124	12.889	166.3	115	1.489	49	0.629
125	5.292	58.2	78	0.860	33	0.366
126	4.664	56.9	73	0.888	30	0.371
127	15.728	129.0	99	0.818	37	0.299
128	12.347	109.9	93	0.831	41	0.361
129	6.467	25.9	84	0.336	35	0.140
130	13.606	176.9	74	0.966	34	0.439
131	6.923	83.8	71	0.861	39	0.468
132	10.220	109.4	108	1.159	50	0.540
133	4.123	44.1	56	0.600	26	0.280
134	6.073	51.6	72	0.610	29	0.248
135	5.167	61.0	68	0.806	35	0.410
136	10.178	126.2	79	0.985	42	0.518
137	3.692	20.7	67	0.374	38	0.215
138	2.774	45.2	41	0.668	22	0.352
139	2.699	116.1	66	2.838	34	1.444
140	4.109	82.6	72	1.447	36	0.728

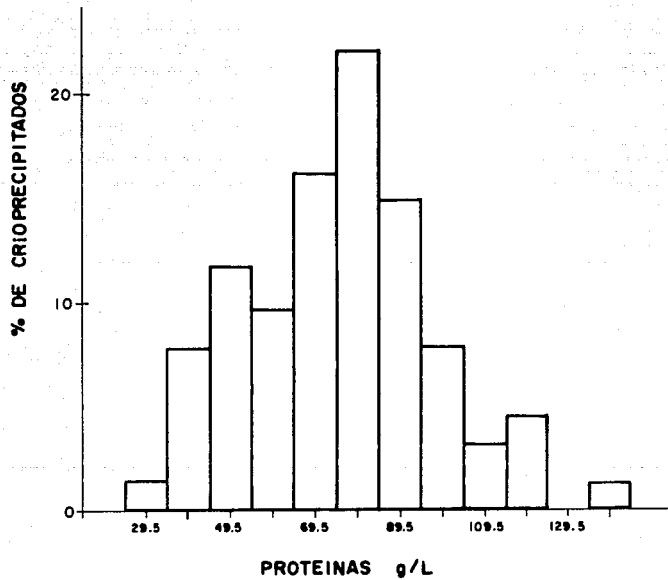
141	1.986	55.0	65	1.800	32	0.888
142	2.918	61.9	77	1.632	38	0.807
143	3.345	102.7	71	2.179	36	1.113
144	2.989	90.9	69	2.097	35	1.076
145	14.705	338.1	54	1.241	20	0.468
146	12.969	146.5	49	0.553	19	0.214
147	5.478	90.9	41	0.680	17	0.278
148	6.852	217.9	40	1.272	17	0.532
149	6.590	344.6	39	2.039	17	0.897
150	33.277	309.5	42	0.385	15	0.137
151	6.043	94.9	56	0.879	24	0.381
152	25.924	248.9	116	1.110	48	0.462
153	44.935	476.3	89	0.947	37	0.396
154	4.595	81.8	39	0.694	17	0.310

GRAFICA 1

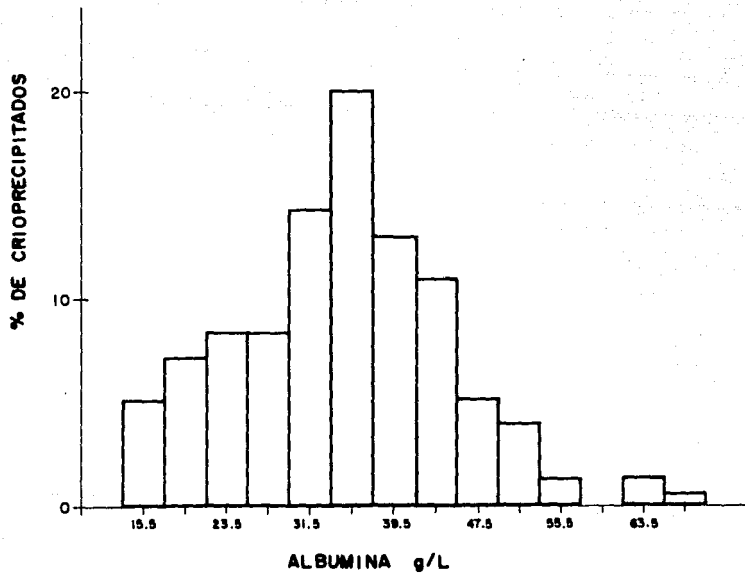
% DE CRIOPRECIPITADOS



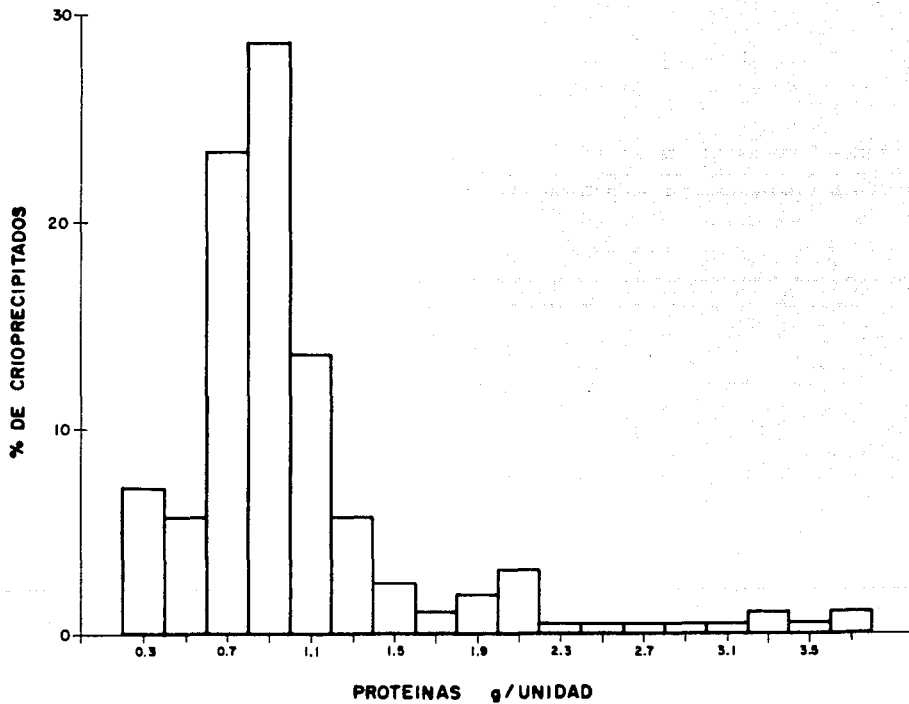
GRAFICA 2



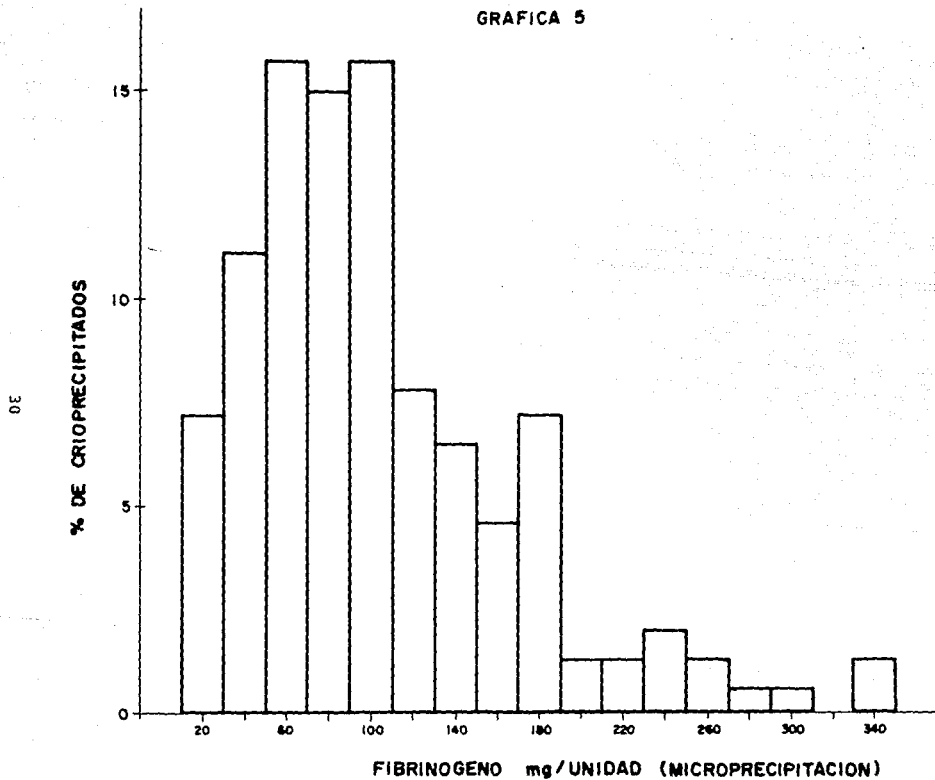
GRAFICA 3



GRAFICA 4



GRAFICA 5



GRAFICA 6

31

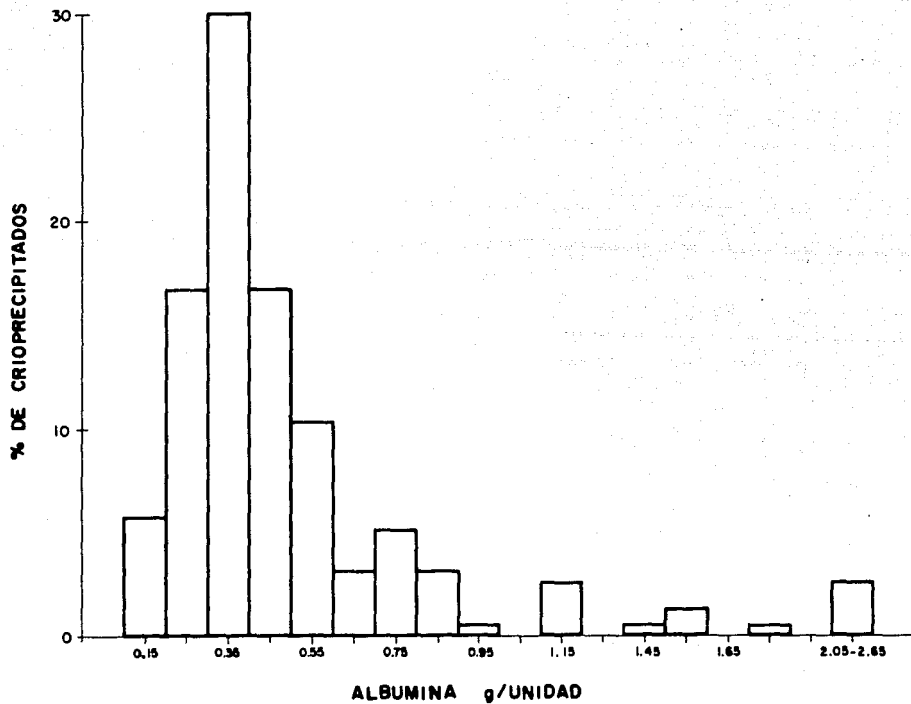


TABLA 2

Oscilación de la concentración de fibrinógeno, proteínas totales y albúmina en 154 crioprecipitados.

FIBRINOGENO 1.36 - 26.5 g/L 10.4 - 350 mg/unidad

PROTEINAS

TOTALES 34.0 - 139.0 g/L 0.28 - 4.55 g/unidad

ALBUMINA 15.0 - 69.0 g/L 0.13 - 2.68 g/unidad

TABLA 3

Promedio \pm desviación estándar y coeficiente de variación de las mediciones de fibrinógeno, proteínas totales y albúmina en los 154 crioprecipitados.

	\bar{X}	DE	CV	\bar{X}	DE	CV
FIBRINOGENO	8.558 g/L	6.473 g/L	75.6	106.89 mg/U	71.78 mg/U	67.2
PROTEINAS TOTALES	75.655 g/L	21.569 g/L	28.5	1.074 g/U	0.718 g/U	66.9
ALBUMINA	34.558 g/L	10.341 g/L	29.9	0.513 g/U	0.407 g/U	79.3
VOLUMEN	15.113 ml	10.09 ml	66.8			

En Europa se ha tenido una gran experiencia con preparados comerciales de fibrinógeno (Tissucol, Tisseel) para obtener fibrina adhesiva, preparada de mezcla de plasmas humanos. La FDA (Food and Drug Administration) no ha aprobado estos productos para su uso en los Estados Unidos de Norteamérica por el alto riesgo de transmisión de virus, en particular los causantes de hepatitis B y el síndrome de inmunodeficiencia humana.

El fibrinógeno necesario para obtener el sello de fibrina se puede obtener de crioprecipitados de unidades individuales de plasma humano, lo que disminuye el riesgo asociado de hepatitis o de síndrome de inmunodeficiencia humana de plasma de donadores sangre previamente estudiados.

En la tabla 4 se resume la información acerca de la concentración de fibrinógeno en crioprecipitados encontrada por diferentes autores. El promedio encontrado por Allain J.P. y cols. (37), 8.4 g/L y las cifras de Wan H. L. y cols. (24), -- 2.6 a 25.0 g/L, son similares a las encontradas por nosotros (\bar{X} = 8.56, oscilación 1.4 a 26.5 g/L. Cifras más bajas fueron encontradas por Dresdale A. y cols. (17), 2.6 a 9.4 g/L y -- más altas por Spotnitz W.D. y cols. (22) en sólo 10 crioprecipitados, 29.03 g/L y 371.9 mg/Unidad y por Ness P. y cols. (7) en 88 crioprecipitados, 266.4 mg/Unidad.

TABLA 4

Concentración de fibrinógeno en crioprecipitados, informados por diversos autores

AUTOR	OSCILACION	\bar{X}	DE	OSCILACION	\bar{X}	DE
	g/L			mg/unidad		
Ness P. (7)	---	---	---	63.0-417	266.4	---
Spotnitz W.D. (22)	---	29.03	14.59	---	371.9	213.5
Allain J.P. (37)	---	8.4	4.0	---	---	---
Wan H.L. (24)	2.6-25.0	---	---	---	---	---
Dresdale A. (17)	2.6-9.4	---	---	---	---	---
Presente estudio	1.4-26.5	8.56	6.47	10.4-350	106.9	71.8

La amplia variación en la concentración de fibrinógeno - en crioprecipitados (en g/L y en mg/Unidad), es similar a la que se observa en la actividad de factor VIII en el mismo componente. Esta variabilidad se puede atribuir a dos causas:

1) la amplia oscilación en la concentración de fibrinógeno en individuos normales (150 a 350 mg/dL) y 2) los diferentes métodos empleados en la producción de los crioprecipitados, aunado a los errores técnicos en la preparación de los mismos.

El contenido de fibrinógeno del Tisseel es de 70 a 100 - g/L. Así los crioprecipitados preparados por nosotros contienen aproximadamente 10 veces menos que el producto comercial. Una alternativa sería mezclar varios crioprecipitados para - obtener las dosis clínicas adecuadas. Otra alternativa sería el modificar la preparación de los crioprecipitados con el - fin de obtener mayor recuperación de fibrinógeno del plasma.

Al respecto, Dresdale y cols. publicaron un método de - preparación de fibrina adhesiva a partir de plasma fresco - congelado, de un solo donador, fraccionando el plasma en alícuotas de 50 ml, congelando a -80°C durante 12 horas y -- centrifugando a $1\ 000 \times g$ durante 15 min. Estos autores lograron elevar la concentración promedio de fibrinógeno a - 21.6 g/L.

Spotnitz W.D. y cols. empleando plasmas humanos almacenados sometidos a congelación a -80°C durante 24 horas y centrifugando a $6\ 500 \times g$ durante 5 min., obtuvieron una concen

tración promedio de 40.03 g/L.

Existe poca información en la literatura referente al -- contenido de proteínas y de albúmina en crioprecipitados, y al igual que lo que sucede en fibrinógeno, los datos son muy diferentes. El promedio de proteínas de 75.65 g/L encontrado en el presente estudio es superior al promedio informado por --- Allain J.P. y cols. de 13.9 g/L y al de Pool G. y cols. de -- 42 g/L.

V. CONCLUSIONES

Se concluyen en el presente documento las siguientes observaciones para la determinación de fibrinógeno, proteínas totales y albúmina en crioprecipitados:

1. Es posible el empleo de crioprecipitados por su contenido de fibrinógeno, como fuente de preparación del adhesivo de fibrina (fibrin glue)
2. El riesgo de la transmisión de virus (hepatitis, síndrome de inmunodeficiencia humana, etc.), por goma de fibrina - comercial, se puede disminuir utilizando la técnica de -- crioprecipitación para preparar fibrina adhesiva a partir del plasma fresco congelado autólogo o de un solo donador.
3. A pesar de que el contenido de fibrinógeno obtenido de -- los crioprecipitados es más bajo (2.6-25 mg/dL) que el de los preparados comerciales (70-100 mg/dL), éste es suficiente para su utilización como agente adhesivo y hemostático, aunque no sustituye a una buena técnica quirúrgica.
4. Una alternativa para aumentar el contenido de fibrinógeno en los crioprecipitados, es la centrifugación adicional - en la preparación de los mismos.
5. Existe una amplia variación en las concentraciones de fibrinógeno en los crioprecipitados, debido a la oscilación en los niveles de fibrinógeno de individuos sanos, a los diferentes métodos de preparación de los crioprecipitados y a los errores técnicos en los mismos.
6. La utilización de los crioprecipitados como fuente de pre

paración de la fibrina adhesiva se ha limitado por la -
falta de familiaridad con el material y la inexperien--
cia en su uso.

7. Existe poca información en la literatura referente al -
contenido de proteínas totales y albúmina en los crio--
precipitados.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Burka E. R., Harker L. A., Kasper C. K., Keyv S. V. and Ness P.M. A protocol for cryoprecipitate production. *Transfusion* 1975; 15:307-311
2. Pool J. G. and Shannon A. E. Production of high-potency concentrates of antihaemophilic globulin in a closed-bag system. *N. Engl. J. Med.* 1965; 273:1443-1447
3. Pool J. G. and Robinson J. Observations on plasma banking and transfusion procedures for haemophilic patients using a - quantitative assay for antihaemophilic globulin (AHG). *Br. J. Haematol.* 1959; 5:24-30
4. Pool J. G. The effect of several variables on cryoprecipitated factor VIII (AHG) concentrates. *Transfusion* 1967; ---- 7:165-168
5. Rock G., Tittley P. Variations in cryoprecipitate production. *Transfusion* 1977; 17:50-53
6. Burka E., Puffer E. R., Martínez J. The influence of donor characteristics and preparation methods on the potency of human cryoprecipitate. *Transfusion* 1975; 15:323-328
7. Ness P. M., Perkins H.A. Fibrinogen in cryoprecipitate and - its relationship to factor VIII (AHF) levels. *Transfusion* 1980;; 20:93-96
8. Jerry Kolins, Anthony F.H., Britten M.B., Arthur J. Products: use and management. *The American Association of Blood Banks.* Anaheim, California. 1982; Cu p3: 447-459
9. William J. Williams's, Ernest B. ,Allan J.E., Wayne R. *Hematology*, Mc. Graw-Hill Book Company. 2nd. ed. 1977 Cap. 134. 1227-1229
10. Tood, Sanford, Davinson. Diagnóstico clínico y tratamiento clínico por el laboratorio. Vol. II. Cía. Editorial Trillas. 7a. Ed. 1984; 432-433
11. Lupinetti F. M., Stoney W.S., Alford W. C. et al. Cryoprecipitate-topical trombin glue. Initial experience in patients undergoing cardiac operations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1985; 90:502-505
12. Matras H. Fibrin seal: The state of the art. *J. Oral Maxillo-- fac. Surg.* 1985; 43:605-611

13. Petersen J. K. Clinical experience in oral surgery with human fibrin scalant. *Int. Dent. J.* 1985; 35:277-279
14. Kram H. B., Nathan R. C., McKabee J. R., Klein S. R., Shomaker W. C. Clinical use of nonautologou fibrin glue. *Am. Surg.* -- 1988; 54:570-573
15. Durham I. H., Willatt D. J., Yung M. W., Jones I., Stevenson R. A., Ramadan R. F. A method for preparation of fibrin glue. *J. Laryngol. Otol.* 1987; 101:1182-1186
16. Clark D. B., Drohan W. N., Miekka S.I., Katz A.J. Strategy -- for purification of coagulation factor concentrates. *Ann.-- Clin. Lab. Sci.* 1989; 19:196-207
17. Dresdale A., Rose E.A., Jeevanandam V., Reemtsma K., Bowman - F.O., Malm J. R. Preparation of fibrin glue from single-do-- nor fresh-frozen plasma. *Surgery* 1985; 97:750-755
18. Moretz W. H., Shea J.J. Jr., Emmett J.R. Shea J.J. III. A simple autologous fibrinogen glue for otologic surgery. *Otolaryngol, Head, Neck, Surg.* 1986; 95:122-124
19. Dresdale A., Bowman F.O., Malm Jr., et al. Hemostatic effectiveness of fibrin glue derived from single-donor fresh frozen plasma. *Ann. Thorac. Surg.* 1985; 40:385-387
20. Moront M.G., Katz N.M., O'Connell J., Hoy G.R. The use of topical fibrin glue and cannulation sites in neonates. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1988; 166:358-359
21. Rousou J.A., Engelman R.M., Breyer R.H. Fibrin glue: an effective hemostatic agent for nonsuturable intraoperative bleeding. *Ann. Thorac. Surg.* 1984; 38:409-410
22. Spotnitz W. D., Mintz P.D., Avery N., Bithell T.C., Kaul S., Nolan S.P. Fibrin glue from stored human plasma. An inexpensive and efficient method for local blood bank preparation. *Am. Surg.* 1987; 53:460-2
23. Weisman R. A., Torsiglieri A.J., Schreiber A.D., Epstein G.H. Biochemical characterization of autologous fibrinogen adhesive. *Laryngoscope* 1987; 97:1186-1190
24. Wan H.L., Huang S.T., Eloyd D.M., McGowan E.L., Feldman D.S. Is the amount of fibrinogen in cryoprecipitate adequate for fibrin glue. Introducing an improved recycled cryoprecipitate method (abstract). *Transfusion* 1989; 29(Suppl): 41 S

25. Silberstein L.E, Williams L.J., Hughlett M.A., Magee D.A., Weisman R.A. An autologous fibrinogen-based adhesive for - use in otologic surgery. *Transfusion* 1988; 28:319-321
26. Gibble J.W. and Ness P.M. Fibrin glue: The perfect operative sealant?. *Transfusion* 1990; 30:741-747
27. Wlner E. Fibringluing in cardiovascular surgery. *Thorac. -- Cardiovasc. Surg.*1982; 30:236-237
28. Spotnitz W.D., Dalton M.s., Baker J.W., Nolan S.P. Reduction of perioperative hemorrhage by anterior mediastinal spray --- application of fibrin glue during cardiac operations. *Ann Tho rac. Surg.* 1987; 44:529-531
29. Gundry S.R., Behrendt D.M. A quantitative and cualitative -- comparison of fibrin glue, albumin, and blood as agents to pretreatporous vascular grafts. *J. Surg. Res.* 1987; 43:75-77
30. Mc Carthy P.M., Trastek V.F., Bell D.G., et al. The effecti-- veness of fibrin glue selant for reducing experimental pulmo-- nary air leak. *Ann. Thorac. Surg.* 1988; 45:203-205
31. Goldman C.D., Blocker S.H., Ternberg J.L., Crouch E.C. Mana-- gement of experimental pneumothorax in weanling rabbits with the use of fibrin glue sclerosant. *Arch. Surg.* 1986; 121:565-568
32. Matras H. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1982; 40:617.622
33. Ellis D.A.F., Pelausa E.D. Fibrin glue in facial plastic -- and reconstructive surgery. *J. Otolatyngol* 1988; 17:74-77
34. Schlag G., Redl H. Fibrin sealant in orthopedic surgery. *Clin. Orthop.* 1988; 227:269-685
35. Siedentop K.H., Harris D.M., Sánchez B. Autologous fibrin t*í* ssue adhesive. *Laryngoscope.* 1985; 95:1074-1076
36. Ruiz Reyes G. y Jiménez Vázquez P. Técnica rápida de micropre-- cipitación en tubo capilar para determinación de fibrinógeno. *Rev. Méx. Lab. Clín.* 1965; 17:204-208
37. Allain J.P., Verroust F. and Soulier J.P. In vitro in vivo characterization of factor VIII preparations. *Vox Sang.* 1980; 381:68-80