

ARTICULO ORIGINAL

Obtención salina y estandarización del tiempo de protrombina utilizando tromplastina de placenta humana.**Saline obtaining and time standardization of prothrombin using thromplastine of human placenta.**

Dra. María de Jesús Sánchez Bouza¹, Dr. Pedro Sánchez Frenes², Dr. Albert Vera Razumova³, Téc. Miriam Soto González⁴, Téc. Deysi González Sarriá⁴, Junior Jáuregui Solís⁵

¹Especialista de I Grado en Bioquímica clínica. Profesora Instructora. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Raúl Dorticós Torrado". Cienfuegos. ²Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico. Profesor Instructor. Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos. ³Especialista de I Grado en Inmunología. Laboratorio Clínico. Hospital Provincial "Dr. Gustavo Aldereguía Lima". Cienfuegos. ⁴Técnico en Laboratorio Hospital Provincial "Dr. Gustavo Aldereguía Lima". Cienfuegos. ⁵Estudiante de Medicina.

RESUMEN

Fundamento: La determinación del tiempo de protrombina es un importante examen complementario en el estudio de los trastornos de la coagulación de la sangre. Para la realización del ensayo, se utiliza como reactivo principal tromboplastina, sustancia que se encuentra en varios tejidos y que habitualmente se ha obtenido de cerebro humano o de ciertos animales, pero su extracción en el laboratorio o su adquisición comercial en estos momentos se dificulta. **Objetivos:** Obtener tromboplastina a través de la extracción salina de placenta humana y estandarizar la determinación del tiempo de protrombina con el reactivo obtenido. **Métodos:** Se utilizó placenta de partos normales de la cual se obtuvo la tromboplastina utilizando extracción salina. Se comparó el reactivo con una tromboplastina de cerebro humano del Hospital "Hermanos Ameijeiras" de Ciudad de La Habana, en un grupo de pacientes con y sin tratamiento anticoagulante. Con la tromboplastina extraída se obtuvieron resultados similares o compatibles con los reactivos habituales, mediante un proceso más fácil y menos costoso.

Palabras Clave: Tiempo de protrombina; anticoagulantes; placenta; trastornos de coagulación sanguínea

Recibido: 2 de enero de 2003

Correspondencia:

Dra. María de Jesús Sánchez Bouza

ABSTRACT

Background: Determining prothombine 's time is an important lab test in the study of coagulation disorders. To develop this essay the main reactive was thromboplastin , a substance that is presented in tissue and that has been obtained habitually from the human brain or certain animals but its extraction in labs or its commercial acquisition is difficult at present. **Objective:** To obtain Thromboplastin throughout the extraction of human placenta and to standardise the determination of pro-time into the obtained reactive **Method:** Placenta from normal delivery was used from which thromboplastin was obtained using a saline extraction. The reactive was compared with thromboplastin from human brain from "Dr. Hermanos Ameijeiras" Hospital in Havana City in a group of patients with and without anticoagulant treatment . With the extracted thromplastin similar or compatible results were obtained than with the habitual reactivs by using easier and cheaper process.

Key words: Prottime; anticoagulants; coagulation disorders; placenta

INTRODUCCIÓN

Los fármacos anticoagulantes orales derivados de la Cumarina (y en algunos casos derivados de las

Aprobado: 14 de marzo de 2003

indandionas) son de uso común en el tratamiento y la profilaxis de los trastornos trombóticos. Los fármacos cumarínicos inhiben la biosíntesis hepática de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K y es preciso ajustar periódicamente la dosis para cada paciente con objeto de garantizar un grado de coagulación suficiente pero no excesivo. Los ajustes se basan en el tiempo de protrombina o en una prueba similar realizada en la sangre del paciente (1,2). Cuando a un plasma citratado se le agrega un exceso de tromboplastina hística y se recalifica, el tiempo que demore en formarse el coágulo se puede tomar como índice de los factores que intervienen en la fase extrínseca de la coagulación (factor II, V, VII, IX). Este constituye el fundamento del tiempo de protrombina. el cual se encuentra prolongado en diferentes estados tales como: déficit congénito de los factores II, V, VII, Y X; tratamiento con anticoagulantes dicumarínicos; daño hepático severo; en recién nacidos y prematuros; en la coagulación intra vascular diseminada (2-4).

De hecho esta prueba exige el uso del reactivo denominado tromboplastina, la cual se controla mediante el uso de tromboplastinas calibradas y plasma (5,6).

El término tromboplastina fue empleado por autores antiguos para designar la acción de extractos hísticos para acelerar la coagulación. Cuando es preparada con tejidos de mamíferos contiene proteínas y fosfolípidos. La que sólo contiene un extracto tisular recibe el nombre de simple, mientras que la que tiene otros componentes como fibrinógeno, factor V o calcio, se denomina combinada. También se pueden clasificar las tromboplastinas por tipos según el origen del tejido animal de que procedan (humano, bovino, de cerebro, de pulmón, de conejo o de placenta humana), teniendo en cuenta que sólo deben ser a partir de animales sanos.

Es importante tomar todas las precauciones para utilizar un material de partida lo menos contaminado posible y un procedimiento de fabricación que impida nuevas contaminaciones y la proliferación de microorganismos durante el mismo (7)

Se ha planteado que la conversión de protrombina en trombina es mediada por la acción enzimática de un complejo enzimático (Factor X/Factor Va) que se encuentra en la superficie de la membrana celular, el cual necesita de la presencia de los iones de calcio y tiene como sustrato la protrombina. El factor V circula como un cofactor inactivo. Este complejo tiene un PM =38 000188-191.

PROTOMBINA—Factor X/ factor Va —TROMBINA

El suministro del reactivo comercial por la empresa productora EPB Carlos J. Finlay se ha visto severamente afectado y la adquisición del órgano (cerebro humano) necesario para su producción de forma habitual en nuestro medio es sumamente difícil ya que debe reunir

determinadas características que son imprescindibles para ello, además de ser menos ético, por lo que es necesario buscar vías alternativas que ayuden a resolver esta dificultad, a través de la extracción salina de tromboplastina de placenta y la estandarización del tiempo de protombina con este nuevo reactivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó placenta humana obtenida del Servicio de Ginecoobstetricia del Hospital General Universitario Dr. "Gustavo Aldereguía Lima", seleccionada por el obstetra que asistió el parto, según criterios previamente acordados, sobre la base del análisis de estudio sobre placenta (8,9), con el fin de utilizar aquellas que pertenecieran a mujeres con embarazos y partos normales y con marcadores seroepidemiológicos negativos (VIH, HbsAg, VHC, VDRL).

Criterios que se tuvieron en cuenta para la selección de la placenta.: edad materna entre 20 y 30 años; pruebas durante el embarazo de VIH, antígeno de superficie, VHC, serología VDRL, con resultados negativos; no alteraciones durante el embarazo de: diabetes, toxemia, sepsis urinaria, otras; edad gestacional al parto entre 37 y 40 semanas; peso del recién nacido, entre 2500 g y 3000 g.

Se recogió además el nombre de la madre y el número de la historia clínica Inmediatamente después del alumbramiento se colocaron en un recipiente con suficiente solución salina al 0.9 % para cubrir todo el tejido placentario y se trasladará al laboratorio para proceder a la limpieza y preparación de la misma.

Material y cristalería necesarios: Cubeta, pinza, tijera, 2 beaker de 200 ml, guantes, papel de filtro, mortero.

Equipamiento: Homogeneizador de cuchillas o en su defecto batidora eléctrica, freezer de 20 oC, centrifuga de tubo, balanza analítica.

Reactivos: Solución salina (8 frascos 500cc), buffer veronal, H₂O destilada.

Obtención de la materia prima..

Se tomó la placenta y se lavó con suficiente solución salina al 0,9 % para eliminar la sangre hasta que quedó bien lavada y se pudieron eliminar con facilidad todas las membranas. Seguidamente se tomaron pequeños fragmentos de tejidos de la zona central y periférica para lograr una mayor representabilidad de este órgano. Estos tejidos fueron introducidos en un beaker que contenía solución salina al 0,9 %, la cual fue cambiada cada 1 hora y mantenida a 4 oC. Posteriormente se dejó en esta solución aproximadamente 24 horas a 4 oc. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución salina y se lavó abundantemente con la misma, hasta quedar libre de sangre, se secó bien con papel de filtro, quedando listo para ser pesado y homogeneizado.

Preparación del homogeneizado.

El tejido placentario fue pesado y por cada 100g de este se añadieron 150 ml de buffer salino (7 partes de

solución salina y 3 partes de Buffer Veronal) preincubado a 37°C, se procedió a su homogeneización en una batidora eléctrica durante 10 minutos. Posteriormente, utilizando un mortero, se maceraron las partículas en suspensión que quedaron después del proceso anterior. Esta mezcla se centrifugó a 3000 rpm en una centrifuga marca Electronic durante 10 min. El sobrenadante fue decantado y distribuido en alícuotas, que se mantuvieron refrigeradas a 20 °C.

Desarrollo de la técnica analítica.

Obtenida la tromboplastina se procedió a realizar la técnica del tiempo de protrombina en el departamento de coagulación del laboratorio clínico empleando la forma habitual (3).

Estandarización del ensayo con tromboplastina placentaria.

En general la calibración y/o estandarización de una tromboplastina es más precisa cuando se hacen comparaciones entre preparaciones análogas de la misma especie, (6) por ello basamos nuestro estudio en comparar los resultados del tiempo de protrombina utilizando extracto de tejido cerebral humano con el extracto salino de placenta, obtenido en el estudio. El extracto cerebral fue donado por el Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras. Las determinaciones fueron realizadas por un solo analista perteneciente a la sección de coagulación del Laboratorio Clínico. Para ello se seleccionaron aleatoriamente 145 pacientes que acudieron a la consulta del Laboratorio Clínico para realizarse este ensayo y/u otros, 91 de ellos eran pacientes sin tratamiento anticoagulante y 54 sometidos a tratamiento anticoagulante. Para el tratamiento estadístico nos apoyamos en el paquete estadístico SPSS (versión 9.0 castellano) aplicando la prueba T para muestras dependientes.

RESULTADOS

La tromboplastina humana obtenida tuvo un control de 13 seg. Al compararla con la de cerebro humano en ambos grupos observamos lo siguiente: Entre los pacientes del grupo 1 (sin tratamiento con anticoagulante) y grupo 2 (bajo tratamiento con anticoagulantes) existió poca diferencia en la media, presentaron su respectiva desviación típica y el error típico de la media. Comprobamos una menor desviación y error típico con la tromboplastina de placenta en ambos grupos en relación con la de cerebro.

Al comparar la correlación entre ambos métodos (tromboplastina de cerebro y tromboplastina de placenta) en cada uno de los grupos de estudio se comprobó que existe una correlación lineal, fuerte y

directa entre ambos métodos, pues están por encima de 0,65. (0,65 < X < 0,85).

Tabla 1. Comparación de la tromboplastina placentaria con la de cerebro humano entre pacientes sin tratamiento anticoagulante y con tratamiento anticoagulante. Hospital Provincial "Dr. Gustavo Aldereguía Lima". Cienfuegos.

Tromboplastina		X	n	Desv. típica	Error típico de la media
Par 1	Cerebro	14.32	91	0.99	9.94 E-02
	Placenta	13.63	91	0.80	8.00 E-02
Par 2	Cerebro	25.25	54	11.13	1.44
	Placenta	24.47	54	10.54	1.36

Fuente: Sección de coagulación del Laboratorio Clínico

Leyenda:

Par 1 Pacientes sin tratamiento anticoagulante.

Par 2 Pacientes con tratamiento anticoagulante.

La correlación existente entre los datos obtenidos al muestrear los pacientes aparentemente normales muestra que existe una similitud de los valores que se encuentran inmersos en un rango muy estrecho, casi superpuesto, existiendo muy poca diferencia entre ellos.

Tabla 2. Correlación de los resultados obtenidos con las tromboplastinas de cerebro humano y de placenta. Hospital Provincial "Dr. Gustavo Aldereguía Lima". Cienfuegos.

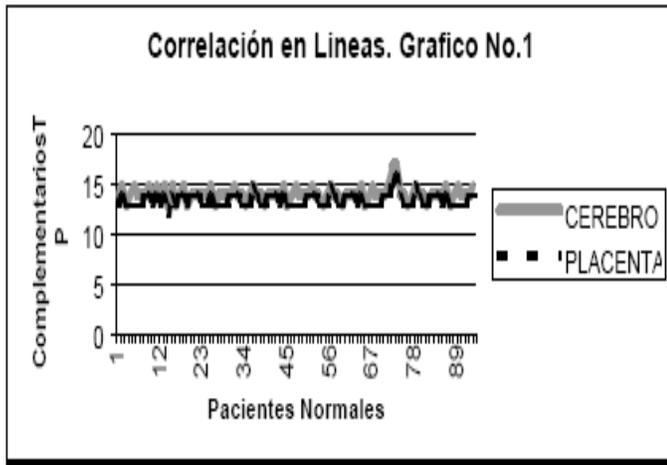
	N	Correlación	Sig.
Par 1			
Cerebro y Placenta	91	0.773	0.000
Par 2	54	0.871	0.000
Cerebro PT. Y Placenta PT			

Fuente: Sección de coagulación del Laboratorio Clínico

Leyenda:

Par 1 Pacientes sin tratamiento anticoagulante.

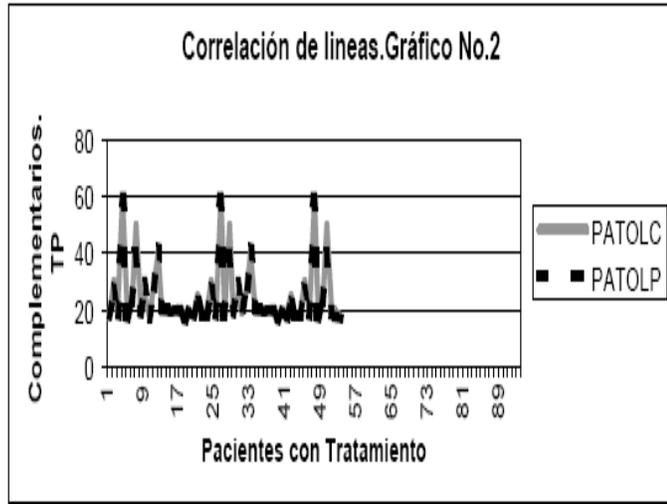
Par 2 Pacientes con tratamiento anticoagulante.



Fuente: Sección de coagulación del Laboratorio Clínico

Legenda: cerebro: grupo de pacientes aparentemente normales, a los que se les realizó la determinación con tromboelastina de cerebro. Placenta: grupo de pacientes aparentemente normales, a los que se les realizó la determinación con tromboelastina de placenta.

Gráfico 1. Correlación de los resultados del tiempo de protrombina utilizando tromboelastina cerebral y placentaria en el grupo de pacientes sin tratamiento anticoagulante. Hospital Provincial "Dr. Gustavo Aldereguía Lima". Cienfuegos.



Fuente: Sección de coagulación del Laboratorio Clínico

Legenda: patol c: grupo de pacientes con tratamiento, a los que se les realizó la determinación con tromboelastina de cerebro. Patol p: grupo de pacientes con tratamiento, a los que se les realizó la determinación con tromboelastina de placenta.

Gráfico 2. Correlación de los resultados del tiempo de protrombina utilizando tromboelastina cerebral y placentaria en el grupo de pacientes con tratamiento anticoagulante.

De forma similar ocurre en el caso de las muestras correspondientes a 54 pacientes con tratamiento anticoagulante. Los datos pertenecientes a las determinaciones del tiempo de protrombina realizadas con tromboelastina de cerebro y de placenta se encuentran casi en el mismo rango, no existen prácticamente variaciones entre las variables utilizadas llegando a ser todavía mucho más positiva y directa la correlación existente entre ellas si la comparamos con el par 1 constituido por los datos en pacientes aparentemente normales.

Al calcular el costo de producción y la ejecución analítica de nuestro producto y compararla con la tromboelastina comercial producida por la EPB "Carlos J. Finlay", apreciamos un ahorro de nueve centavos por cada determinación, si tenemos en cuenta que como promedio se realizan 700 determinaciones mensuales en el laboratorio clínico del hospital, esto representa un ahorro de sesenta y tres pesos al mes.

DISCUSIÓN

La tromboelastina obtenida de placenta humana mediante la extracción salina resultó útil para la realización del tiempo de protrombina, ya que los resultados obtenidos en ambos grupos de pacientes (sin tratamiento y con tratamiento) fueron comparables con la del reactivo estandarizado (tromboelastina de cerebro). Existió perfecta correlación entre ambos resultados por lo que podemos afirmar que no existe diferencia significativa en los resultados del ensayo utilizando la tromboelastina de placenta humana.

Adicionalmente se comprobaron algunas ventajas con la utilización de placenta para obtener tromboelastina. Una es la mayor accesibilidad al tejido, ya que para utilizar un cerebro humano, este debe provenir del cadáver de una persona joven, con menos de 24 horas de fallecida, sin ninguna enfermedad del sistema nervioso central, así como traumas u otras situaciones y el tejido no puede presentar signos de congestión o evidencias de pus o tumor. Mientras que la placenta se puede obtener de los disímiles partos que a diario se producen en las maternidades y es mucho más sencilla y fácil su manipulación y conservación. Otra ventaja es que la producción de esta tromboelastina es mucho menos costosa, si la comparamos con la tromboelastina de producción nacional de la EPB "Carlos J. Finlay".

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo podemos llegar a la conclusión que reactivo tromboelastina, utilizado para la determinación del tiempo de protrombina, puede ser obtenido de la placenta humana mediante extracción salina. Por otro lado, el control del tiempo de protrombina realizado con tromboelastina de la placenta humana es de 13 seg., resultado que es similar al encontrado cuando se utiliza productos del cerebro humano. Por último, El proceso de obtención de tromboelastina placentaria resulta poco costoso y de fácil adquisición.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.-George JN, Kolodzie MA. Evaluación of Hemostasis and Thrombosis: En: Stein JH, Hutton JJ, Kohler PO, Oburke RA, Reynolds HY, Samuel MA, Editores. Internal Medicine. 4ta ed. St Louis: Mosby-Year Book.; 1994.p.744- 8.
- 2- Reeiss RF. Normal hemostasis. En: Tilton RC, Balows A, Hohmadel DC, Reiss RF. Clinical laboratory medicine. St Louis: Mosby-Year Book; 1992. p 99-106.
- 3-Davidsohn I, Henry JB. Diagnóstico clínico por el laboratorio. T1. La Habana : Editorial Científico-Técnica; 1984. p. 433.
- 4- Fischbach F. Laboratory diagnostic test. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 1992..
- 5.- Burtis C. Fundamentals of clinical chemistry. 4th ed. Philadelphia: Saunders;1996.
- 6- Tilton B. Clinical Laboratory Medicine. St Louis: Mosby-Year Book;1992
- 7- Organización Mundial de la Salud. Comité de expertos de la OMS en patrones biológicos. Preparación de las tromboplastinas. Ginebra: OMS; 2000.p.70-90. (Serie Informes Técnicos, 889). .
- 8- Benedetti WL. La placenta: Su importancia en peri neonatología: Necesidad de su estudio. Rev Latinoam Perinatol 1988; 8(1): 26-32.
- 9- Prichard JA, McDonald PC, Gant NF. The placenta and fetal membranes. En: Ahlmark A, Benirschke K, Billingham RE, Bigazzi M, eds.Williams. Obsterics. 20th ed. Connecticut : Appleton Century Crofts; 1985.p. 97-104