



TRABAJO PRÁCTICO Nº 3
FISIOLOGIA DE LA HEMOSTASIA
ESTUDIO DE LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS PUESTOS EN JUEGO
DURANTE LA HEMOSTASIA SECUNDARIA

1. OBJETIVOS

Con los conocimientos adquiridos en la **clase teórica**:

OBJETIVOS GENERALES

- Conocer los mecanismos fisiológicos involucrados en la hemostasia.
- Comprender el rol de los factores de coagulación en la regulación del proceso hemostático.

2. COMPETENCIAS

- Realiza la determinación del tiempo de protrombina de una muestra de plasma cumpliendo las normas de bioseguridad.
- Interpreta el resultado del tiempo de protrombina.
- Realiza la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada cumpliendo las normas de bioseguridad.
- Interpreta el resultado el tiempo de tromboplastina parcial activado.

3. CONOCIMIENTOS TEÓRICOS NECESARIOS

- Hemostasia Secundaria: Factores de la coagulación. Mecanismo de la coagulación. Teoría de la Cascada. Nuevo Modelo basado en superficies celulares.

4. DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

4.a. Fundamento

El término Hemostasia se refiere al conjunto de interacciones entre los componentes de la sangre y los de la pared vascular, responsables de impedir la fuga de la sangre de dicho compartimiento. El proceso hemostático a menudo es esquematizado en cinco fenómenos consecutivos que pueden superponerse: vasoconstricción localizada, adhesión de las plaquetas al subendotelio, formación del tapón plaquetario, reforzamiento de éste a través del depósito de fibrina y finalmente degradación del material depositado a través de la fibrinólisis.

4.b. Tiempo de Protrombina en una etapa

Muestra: el anticoagulante que se utiliza es citrato de sodio en una relación 1+9 ó dilución 1/10, entonces por ejemplo para 250 μ l de anticoagulante se necesita 2,5 ml de sangre. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min y separar el plasma en otro tubo de plástico, proceder a realizar una segunda centrifugación a 3000 rpm por 15 min, de esta manera se obtiene un plasma pobre en plaquetas. Es necesario que no haya plaquetas porque estas ya se estudian en las pruebas que evalúan la hemostasia primaria, ahora sólo se van a estudiar los factores de la coagulación.

El plasma además de no contener plaquetas no tiene calcio por que el citrato de sodio compleja el calcio.

El plasma se debe procesar dentro de las 4 horas después de obtener la muestra porque muchos factores se degradan in vitro con el transcurso el tiempo.

Evalúa la eficiencia del sistema extrínseco de la coagulación midiendo la formación del coagulo plasmático en presencia de extractos tisulares (fosfolípidos) y CaCl_2 .

Es más sensible al déficit de factores VII, X y V que a la deficiencia de protrombina. Se prolonga con déficit severo de fibrinógeno.

Materiales y Método

Citrato de Sodio 0,1 M

Baño termostatzado a 37 °C

Pipetas automáticas de 100 μ l y 200 μ l.

Tubos de vidrio para realizar las pruebas

Tubos de plástico para recolección de la muestra

Centrífuga

Cronómetro

Reactivo: Tromboplastina cálcica recombinante o tromboplastina cálcica de cerebro de conejo que aportan los fosfolípidos y el calcio. Estabilidad en días luego de reconstituida.

El reactivo se debe mantener a 37 °C durante la realización de las pruebas. A 37 °C sólo dura 60 min.

En un tubo de vidrio en baño a 37 °C colocar 100 μ l del plasma pobre en plaquetas. Incubar por lo menos 1 minuto.

Agregar 200 μ l de tromboplastina cálcica y simultáneamente poner en marcha el cronómetro. Mover el tubo suavemente por inclinación hasta que se forma el coágulo y detener el tiempo. Anotar el tiempo.

Los resultados se expresan en tiempo y en porcentaje de actividad interpolando el tiempo correspondiente a la muestra en una curva de calibración.

Valor de Referencia: 70 – 120%

4.c. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado

Muestra: plasma pobre en plaquetas anticoagulado con citrato de sodio.

Mide el tiempo de coagulación del plasma en presencia de: **cefalina** (tromboplastina parcial, sustituto plaquetario), aporta los fosfolípidos que son el sitio de anclaje donde se realizan las reacciones; **un activador** (caolín, ácido elágico, sílice, celita), aporta cargas negativas para activar la coagulación y los **iones calcio** que se agregan en forma de CaCl_2 .

Con esta prueba se estudian los factores de la vía intrínseca de la coagulación y se prolonga ante los descensos de los factores XII, XI, IX, VIII, X, II ó V.

La muestra que se utiliza es la misma que para el tiempo de protrombina, es decir un plasma pobre en plaquetas.

Materiales y método

Citrato de sodio 0,1 M

Reactivo de APTT comercial

CaCl_2 0,025 M

Baño termostatzado a 37 °C

Pipetas automáticas de 100 μ l

Tubos de vidrio

Tubos de plástico para recolección de la muestra

Centrífuga

Cronómetro

En un tubo de vidrio en baño a 37 °C colocar 100 μ l de muestra e incubar 1 minuto. Luego agregar 100 μ l de reactivo de APTT e incubar 3 minutos (etapa de activación)

Agregar 100 μ l de CaCl_2 y poner en marcha el cronómetro.



Controlar la formación del coágulo de plasma sumergiendo y sacando el tubo. Detener el cronómetro cuando se visualiza la red de fibrina.

El resultado se expresa en segundos.

Valor de Referencia: 25 – 35 seg.

Materiales de limpieza (por comisión):

Detergente – Rejilla – Alcohol gel – Cepillo

5. EVALUACIÓN

Para evaluar competencias procedimentales:

“Realiza la determinación del tiempo de protrombina (TP) de una muestra de plasma cumpliendo las normas de bioseguridad.”

“Realiza la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) cumpliendo las normas de bioseguridad”.

Realizar la prueba de TP y aPTT de una muestra de plasma, mientras un compañero lo observa y marca en una lista de cotejo. Coevaluación / criterios ver lista de cotejo.

Para evaluar las competencias:

“Interpreta el resultado del tiempo de protrombina.”

“Interpreta el resultado el tiempo de tromboplastina parcial activado.”

En grupo, analicen e intercambien opiniones sobre los resultados obtenidos fundamentándose en lo aprendido en la clase teórica. Criterios de evaluación ver rúbrica.

6. GUÍA DE ESTUDIO

1. ¿De qué factores depende la adhesión plaquetaria al endotelio?
2. ¿Cómo está formado el complejo protrombinasa? ¿Cuál es su función?
3. ¿Qué sucede con el coágulo de fibrina luego de la reparación de la injuria vascular?
4. ¿Por qué la sangre en condiciones fisiológicas y en ausencia de daño endotelial circula sin coagularse?
5. ¿Cuáles son las funciones procoagulantes y antitrombóticas de la trombina?
6. ¿Cuáles son las funciones antitrombóticas y procoagulantes del endotelio?



7. BIBLIOGRAFÍA

Textos de cabecera

- ✓ Cingolani, H. E.; Houssay, A. B. y Col: ***Fisiología Humana de Houssay***. 7ª Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. 2006.
- ✓ Dvorkin, M. A.; Cardinali, D. P.; Iermoli, R. H.: ***Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica***. 14ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2010.
- ✓ Guyton, A. C.: ***Tratado de Fisiología Médica***. 11ª Edición. Editorial Elsevier. Madrid. 2006.
- ✓ Koeppen, B.M.; Stanton, B.A.: ***Berne & Levy. Fisiología***. 6ª Edición. Editorial Elsevier Mosby. Madrid, 2009.
- ✓ Silvernagl, S; Despopoulos, A.: ***Fisiología. Texto y Atlas***. 7ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2009.
- ✓ Silverthorn, D. U.: ***Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado***; 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2007.
- ✓ Coppo, J. A.: ***Fisiología Comparada del Medio Interno***. 2ª Edición corregida y aumentada. Editorial Universidad Católica de Salta. Departamento Editorial EUCASA. Salta. 2008.

Textos de consulta

- ✓ Henry, J.B.: ***El Laboratorio en el diagnóstico clínico: homenaje a Todd-Stanford & Davidsohn***. Tomos I y II. Editorial Marbán. 2005.
- ✓ Gauna Pereira, María del Carmen: ***"Bioseguridad en el laboratorio"***. Curso "PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA. UTILIDAD E INTERPRETACIÓN". Resolución 811/08 C.D. Corrientes, 16 de octubre de 2008.
- ✓ Ióvine, E.; Atilio Selva, A.: ***El Laboratorio en la Clínica***. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 1985.
- ✓ Levy-Lambert: ***Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud***. Organización Panamericana de la Salud. 1983.
- ✓ J Sans Sabrafen; C. Besses; Raebel, J. L; Vives Corrons: ***"Hematología Clínica"*** 6º edición, 2008. Ediciones Harcourt, Barcelona, España.
- ✓ L. Kordich; A. Blanco; G. Cerrato y Quintana; A. Vazquez; M. Vizcargüenaga: ***"Fundamentos para el manejo práctico del laboratorio de Hemostasia"***. 2ª Edición 2005. Ediciones Grupo CAHT. Buenos Aires, Argentina.



-
- ✓ Colman et Al: "**Hemostasis and Thrombosis**" 4^o edición. J.B. Lippincott Co. Philadelphia, 2003.