



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA  
PERUANA**



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**INFORME DE PROYECTO DE TESIS**

**“ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE *IN-VITRO* DEL LÁTEX DE *Ficus insípida* (Willd.) “OJÉ” SOBRE LA CASCADA DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA – C.S. SAN JUAN 2012”.**

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTORES :**            **Bach. Jorge Manrique ARÉVALO ROMAYNA.**  
                             **Bach.Selene Katuska UBILLUS RIOS.**

**ASESORES:**            **Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong.**

**IQUITOS – PERÚ**

**2013**



UNAP

Facultad de Farmacia y Bioquímica

"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

ACTA DE SUSTENTACION

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 12 días del mes de JUNIO de dos mil trece, siendo las 12 horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designados según Resolución de Coordinación N° 104-FFB-UNAP-2013, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. LUÍS ALBERTO VÍLCHEZ ALCALÁ
ING. CLETO JARA HERRERA
M.C. CHARLES OCAMPO FALCÓN

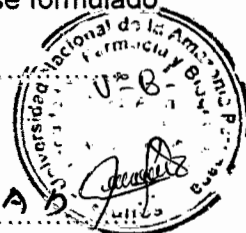
Presidente
Miembro
Miembro



Se constituyeron en el Auditorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE IN VITRO DEL LÁTEX DE Ficus insipida (Willd) "OJÉ" SOBRE LA CASCADA DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA - C.S. SAN JUAN 2012" presentado por los Bachilleres: JORGE MANRIQUE ARÉVALO ROMAYNA y SELENE KATIUSKA UBILLUS RIOS, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición del sustentante, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

SATISFACTORIAMENTE



Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido APROBADO POR UNANIMIDAD
2.- Observaciones NINGUNO

Siendo las 13 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a las sustentantes por su ACERTADA DISERTACION.

[Signature]
Q.F. LUÍS ALBERTO VÍLCHEZ ALCALÁ
Presidente

[Signature]
ING. CLETO JARA HERRERA
Miembro

[Signature]
M.C. CHARLES OCAMPO FALCÓN
Miembro

## RESUMEN

---

### **“Actividad Anticoagulante *in-vitro* del látex de *Ficus insípida* W. “Ojé” sobre la Cascada de la Coagulación Sanguínea – C.S. San Juan 2012”.**

*Arévalo Romayna, Jorge M.; Ubillus Rios, Selene K.\**

---

Los trastornos de la coagulación constituyen un grupo de alteraciones muy complejas y cada año aumenta la tasa mortalidad debido a terapias ineficaces o tratamientos costosos para estas enfermedades. Basándonos en esto resulta imprescindible el estudio de nuevas especies vegetales que pueden aportar principios farmacológicos activos para ser utilizados como una alternativa terapéutica segura y efectiva. Por este motivo nos propusimos estudiar a *Ficus insípida* W., cuyo látex posee una gran variedad de sustancias activas con diferentes propiedades, pero existe poca información acerca de estudios sobre efecto anticoagulante *in vitro*. El objetivo del presente proyecto fue comprobar la actividad anticoagulante *in-vitro* y determinar cuantitativamente la vía de la coagulación sobre la que actúa el látex de *Ficus insípida* W. mediante las pruebas de coagulación TTPa y TP. Se obtuvo el látex de *Ficus insípida* W. y se prepararon diferentes diluciones del mismo. Se extrajeron muestras de sangre de 5 donantes voluntarios, en tubos con Citrato de Sodio al 3,2% para la anticoagulación. Luego, se centrifugaron las muestras y se extrajo el plasma; éste, se mezcló con las diluciones del látex, obteniéndose un pool de plasma para cada dilución. Se realizó las mediciones del Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo Parcial de Tromboplastina activada (TTPa), respectivamente, haciendo 3 repeticiones para cada tubo en las diferentes concentraciones del látex y así determinar la mínima concentración a la cual éste pueda ejercer su actividad anticoagulante. De acuerdo a los resultados obtenidos se prepararon sub-diluciones del látex y se determinó si el efecto anticoagulante es dosis-dependiente a las concentraciones del látex.

Se comprobó que el látex de *Ficus insípida* W. prolonga el TP a una concentración mayor o igual a 3,125% (V/V), y ambas, pruebas (TP y TTPa) a una concentración mayor o igual a 6.125% (V/V). Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que el látex de *Ficus insípida* W. presenta mayor actividad anticoagulante en condiciones *in-vitro* y de manera dosis dependiente sobre la vía extrínseca de la coagulación sanguínea desde una concentración igual o mayor a 1.5625%% (V/V) y que a una concentración igual o mayor a 6.125% (V/V) posee un potente efecto anticoagulante sobre ambas vías de la coagulación.

**Palabras clave:** Látex, tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina, ficus.

---

\* Bachilleres en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana – UNAP.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	N° Pág.
<b><u>CAPITULO I</u></b> .....	01
1. INTRODUCCIÓN.....	02
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	03
3. OBJETIVOS.....	04
3.1 General .....	04
3.2 Específicos .....	04
<b><u>CAPITULO II</u></b> .....	05
1. MARCO TEÓRICO .....	05
1.1 Antecedentes .....	06
1.2 Fundamento Teórico .....	06
1.2.1 La coagulación sanguínea o hemostasia .....	11
1.2.2 Trastornos de la coagulación.....	12
1.2.3 Coagulopatías de relevancia clínica.....	14
1.2.4 Métodos y pruebas <i>in-vitro</i> para evaluar alteraciones de la coagulación.....	17
1.2.5 Muestras en estudio.....	18
A. Características de la especie.....	18
B. Descripción botánica .....	19
C. Usos tradicionales .....	19
D. Estudios químicos.....	19
2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS OPERACIONALES .....	20
2.1.VARIABLES .....	20
2.1.1. Variable independiente.....	20
2.1.2. Variable dependiente .....	20

2.2.INDICADORES .....	20
2.2.1. Indicadores variable independiente.....	20
2.2.2. Indicadores variable dependiente.....	20
2.3.OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	23
3. HIPÓTESIS .....	24
<b><u>CAPITULO III</u></b> .....	<b>25</b>
1. METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	25
1.1.Tipo de estudio.....	25
1.2.Diseño de Investigación.....	26
2. POBLACIÓN Y MUESTRA .....	26
2.1 Población biológica.....	26
2.2 Muestra biológica .....	26
2.3 Población vegetal .....	27
2.3 Muestra vegetal .....	27
3. MATERIALES E INSTRUMENTOS .....	28
3.1 Material vegetal .....	28
3.2 Material biológico.....	28
3.3 Materiales de laboratorio .....	28
3.4 Equipos.....	29
3.5 Reactivos e insumos químicos .....	29
4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTAL .....	30
4.1 Selección y extracción del Látex de <i>Ficus Insípida</i> (Willd.). .....	30
4.2 Filtración y conservación del Látex de <i>Ficus Insípida</i> (Willd.).....	30
4.3 Preparación de las diluciones del látex de <i>Ficus Insípida</i> (Willd.). .....	31
4.4 Obtención de la muestra biológica.....	32
4.5 Procesamiento de la muestra biológica. ....	32
4.6 Determinación de la actividad anticoagulante. ....	33
5. PROCEDIMIENTO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS .....	34
6. ANÁLISIS DE DATOS.....	35
7. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS.....	35

<b><u>CAPITULO IV.</u></b> .....	<b>36</b>
<b>1. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>2. DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>3. CONCLUSIONES.</b> .....	<b>45</b>
<b>4. RECOMENDACIONES.</b> .....	<b>46</b>
<b>5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b> .....	<b>52</b>
<b>6. ANEXOS.</b> .....	<b>53</b>

## DEDICATORIA

*A nuestra amazonía, por poseer una gran diversidad de recursos naturales y ser una fuente importante en el conocimiento de la terapéutica tradicional de nuestras comunidades sirviendo de este modo con en el desarrollo del presente proyecto.*

*JORGE ARÉVALO R.*

*El presente proyecto se lo dedico primeramente a Dios por las cosas, situaciones y experiencias buenas o malas que se suscitaron a lo largo del desarrollo de nuestra investigación.*

*SELENE UBILLUS R.*

*A mi querido padre Carlos Enrique Ubillus Briones, por ser un ángel en mi vida que siempre me ilumina y me protege...*

*A nuestras familias, por el apoyo moral y económico brindado, por las enseñanzas y consejos impartidos a lo largo de nuestra vida y que de alguna u otra manera llenaron nuestra mente de sabiduría y fortaleza para ayudarnos a formarnos como personas y profesionales.*

*JORGE AREVALO R. & SELENE UBILLUS R.*

*A todas y cada una de las personas a quienes acudimos y nos brindaron parte de su tiempo y apoyo incondicional y que contribuyeron desinteresadamente con la realización de este trabajo.*

*JORGE AREVALO R. & SELENE UBILLUS R.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradecemos al Centro de Salud San Juan por acojernos y brindarnos los ambientes e instrumentos del establecimiento y facilitarnos el desarrollo del presente proyecto de tesis. Un agradecimiento de manera especial al Jefe de laboratorio del Centro de Salud San Juan Nolberto Tangoa y su colaborador en el área, Daniel Sánchez, expresarles nuestra inmensa gratitud por los conocimientos impartidos y la confianza brindada a lo largo de estos meses durante nuestra permanencia como tesisistas en el establecimiento de salud.*

*A nuestros prestigiosos miembros del jurado examinador: Q.F. Luis Vilchez Alcalá (Presidente del Jurado), Ing. Cleto Jara Herrera (1er Miembro) y Dr. M.C. Charles Ocampo Falcón (2do Miembro) por impartirnos sus conocimientos y brindarnos parte de su valioso tiempo en la redacción y revisión de nuestro proyecto de tesis.*

*A nuestras familias por el apoyo moral y económico brindado durante el desarrollo de nuestro proyecto de tesis y por invertir en nuestra formación profesional y como personas de bien.*

*A nuestro querido asesor Q.F. Henry Delgado Wong, por su apoyo incondicional y por orientarnos a lo largo del desarrollo del presente trabajo siempre con esmero y profesionalismo afianzándonos cada día en la formación de nuestra carrera.*

*Finalmente, quiero agradecer a quien es mi fuerza vital, mi energía positiva y mi eterna inspiración en cada día de mi vida, a mi madre querida Juana Romayna Mendoza que esta siempre conmigo en cada circunstancia, gracias por ser quien ilumina mi camino y quien me da la fuerza necesaria cuando me siento vencido, gracias por ser mi confidente, por haberme dado la vida, este trabajo es para ti, porque es lo quisiste ver en mi, un gran profesional.*



## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos de la coagulación constituyen un complejo grupo de alteraciones de la hemostasia sanguínea. La complejidad de estos trastornos y la falta de drogas efectivas contribuyen a que muchas de estas enfermedades no sean resueltas de manera eficaz; debido a esto, cada año aumenta la tasa de mortalidad por estas causas en las diferentes poblaciones del mundo <sup>(1,2)</sup>.

La farmacología moderna en su afán de encontrar alternativas terapéuticas más efectivas y seguras para la cura de estos males, se apoya en el estudio de la medicina tradicional a través de la búsqueda de especies vegetales utilizadas empíricamente por los pobladores de nuestra amazonia, sabios conocedores de sus bondades terapéuticas.

Nuestra amazonia al poseer una variedad de especies vegetales con innumerables propiedades curativas, ofrece un gran potencial para el estudio y descubrimiento de nuevas sustancias con actividad terapéutica y poder aplicarlas en las principales afecciones de nuestra población.

El Ojé (*Ficus insípida* W.), posee un látex que desde tiempos remotos ha sido utilizado por los pobladores de las comunidades amazónicas, principalmente como un agente antiparasitario, demostrando un excelente efecto terapéutico<sup>(3-6)</sup>; pero debido a la diversidad de moléculas presentes en su composición, también es utilizado para otras afecciones, como por ejemplo en la leishmaniasis, como hematopoyético, depurativo de la sangre, antianémico, dolor de muelas, fiebre e incluso como un agente anticoagulante en mordeduras de serpiente<sup>(7,8)</sup>. Dentro de esta variedad de moléculas, se encuentra la Ficina como componente principal, la cual pertenece a la familia de enzimas de las cistein-proteasas<sup>(9-12)</sup>. Esta enzima, a su vez se encuentra relacionada a otras cistein-proteasas de la misma familia como la Bromelaina, que es conocida por sus propiedades antiinflamatorias y su efecto anticoagulante *in-vitro*<sup>(13,14)</sup>.

Dada la gran similitud entre estas dos sustancias resulta interesante comprobar si la ficina, al ser de la misma familia de enzimas que la bromelaina, pudiera intervenir en la cascada de coagulación sanguínea, ya sea retardando sus parámetros normales o interactuando con alguna de las proteínas que allí participan.

Basándonos en anteriores investigaciones sobre plantas que demostraron tener actividad anticoagulante, además de la poca información que existe de estudios similares con el *Ficus insípida* W. y teniendo en cuenta la necesidad actual del aprovechamiento de los recursos que nos brinda la flora amazónica en beneficio de nuestras comunidades, resulta imprescindible estudiar la actividad anticoagulante *in-vitro* de látex de *Ficus insípida* W. como un estudio preliminar, enfatizando su uso racional y poder garantizar su evaluación para estudios clínicos en los trastornos de la coagulación, a fin de que pueda ser empleado como una alternativa terapéutica segura y efectiva con mínimos efectos adversos, contribuyendo de esta forma con nuevos datos e información valiosas para posteriores investigaciones.

## **2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

**¿Tendrá actividad anticoagulante *in-vitro* el látex de *Ficus insípida* Willd. (Ojé) sobre la cascada de coagulación sanguínea – C.S. San Juan 2012?**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. General

- Determinar la actividad anticoagulante *in-vitro* del látex de *Ficus insípida* Willd. “Ojé” sobre la cascada de la coagulación sanguínea – C.S. San Juan 2012.

#### 3.2. Específicos

- Extraer el látex de *Ficus insípida* Willd. “Ojé” y preparar diferentes diluciones del mismo en solución salina fisiológica.
- Determinar cuantitativamente el Tiempo de Protombina (TP) *in-vitro* según una técnica automatizada en las diferentes concentraciones del látex de *Ficus insípida* Willd.
- Determinar cuantitativamente el Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (TTPa) *in-vitro* según una técnica automatizada en las diferentes concentraciones del látex de *Ficus insípida* Willd.
- Determinar la mínima concentración cuantificable a la que el látex de *Ficus insípida* pueda ejercer su efecto anticoagulante.
- Identificar la vía de coagulación sobre el cual presente mayor actividad anticoagulante el látex de *Ficus insípida* Willd.

## CAPÍTULO II

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Antecedentes

Concha-Benavente F. (2010), desarrolló un estudio sobre el efecto anticoagulante del látex de *Ficus insípida* sobre la coagulación sanguínea en condiciones *in-vitro*, comprobándose que presenta dicho efecto sobre la vía extrínseca e intrínseca de la coagulación.

Francisco J., Rodríguez M., Ricardo O., Guerrero J., Amador M.C. (2007), analizaron 22 especies de plantas medicinales de la selva del Caribe, llegándose a identificar 17 especies utilizadas de manera tradicional por la población, con potenciales efectos sobre la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea.<sup>(15)</sup>

Tutucayo M. (2005), en un estudio realizado en la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa con el látex de *Ficus antihelmíntica* (sinónimos *F. glabrata*, *F. insípida*), refiere que dicho látex presenta un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la formación del coágulo sanguíneo.<sup>(16)</sup>

Apecechea M., Larionova M., Garrido M., Sebazco C., Alcorta V. (2002), en un ensayo realizado en el Laboratorio de Medicina Herbaria del Hospital Militar Central de Cuba, comprobaron que el extracto acuoso de las hojas de *Ricinus communis*L. (higuereta), también presenta actividad anticoagulante *in-vivo* logrando prolongar los tiempos de coagulación en las pruebas de Tiempo de Protrombina, Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada y Tiempo de Howell.<sup>(17)</sup>

Chen J.H., Chen H.I., Tsai S.J., Jen C.J., Wang J. S. (2000), mencionan en su estudio sobre la evaluación del efecto antitrombótico del extracto del cebollín (*Allium schoenoprasum*) en ratas Sprague-Dawley, que dicho extracto logró prolongar el tiempo de sangría y disminuir la agregación plaquetaria.<sup>(18)</sup>

Ali M., Bordia T., Mustafa T. (1999), en la Universidad de Michigan Estados Unidos llevaron a cabo una serie de ensayos para estudiar el efecto *in-vitro* sobre la agregación plaquetaria de extractos acuosos, crudos y hervidos de ajo y cebolla con plasma rico en plaquetas de conejo y de humanos, mostrando diferentes grados de inhibición. <sup>(19)</sup>

Apechea M., Fano R., Garrido M. (1998), ensayaron en un estudio *in-vitro* en el Laboratorio de Medicina Herbaria del Hospital Militar Central de Cuba el efecto anticoagulante del extracto acuoso de las hojas de *Ricinus communis* L. (higuereta) y se demostró que ejerce un evidente efecto sobre el coágulo sanguíneo retardando su formación. <sup>(20)</sup>

Fernández M. (1998), realizó un estudio en la Universidad Nacional de San Agustín en Arequipa con el *Chenopodium murale* L. como anticoagulante *in-vitro* y su utilización en hemogramas, demostrando que presenta actividad anticoagulante. <sup>(21)</sup>

Pierola R. (1995), realizó un estudio similar en la Universidad Nacional de San Agustín en Arequipa con *Chenopodium pertiolare* HBK (Hípica) como anticoagulante *in-vitro* y su utilización en hemogramas, mostrando también un marcado efecto anticoagulante. <sup>(22)</sup>

Sanz J. (1993), en la Universidad Nacional de San Agustín - Arequipa utilizó el extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) para evaluar su actividad anticoagulante mediante el método de Lee White, comprobándose que presenta dicha actividad. <sup>(23)</sup>

## **1.2. Fundamento Teórico**

### **1.2.1. La Coagulación Sanguínea o Hemostasia.** <sup>(24)</sup>

Es un mecanismo del que dispone nuestro organismo y por el cual es posible detener la hemorragia o pérdida de sangre producida por la rotura de la pared vascular. Una vez que se ha producido el coágulo y se ha restaurado el daño vascular, debe existir un mecanismo que destruya el coágulo sanguíneo ya inservible, este proceso se denomina fibrinólisis. La

falta del equilibrio adecuado entre ambos procesos puede dar lugar a una hemorragia cuando falla la hemostasia o una trombosis cuando lo que se ve alterado es el proceso fibrinolítico. Por otro lado cuando se produce la rotura de un vaso sanguíneo tienen lugar una serie de acontecimientos destinados a detener la pérdida de sangre, así se pueden estudiar las siguientes 3 fases del proceso de hemostasia:

- **Espasmo vascular o contracción.** Cuando un vaso se lesiona, el músculo liso de la pared se contrae de inmediato, respuesta denominada vasoespasmo o espasmo vascular. Este proceso reduce el flujo sanguíneo a la zona dañada y la pérdida de sangre por varias horas y durante ese período se ponen en marcha los otros mecanismos hemostáticos. Es un proceso reflejo de naturaleza simpática, donde además se liberan sustancias como la serotonina que intensifican la vasoconstricción, de este modo se mantiene el espasmo vascular. Sin embargo, la reducción de la luz vascular aunque sea importante, es insuficiente para por sí misma detener la hemorragia.

- **Formación del tapón plaquetario.** Cuando las plaquetas se ponen en contacto con las porciones del vaso sanguíneo expuestas en el sitio lesionado, sus características cambian de manera drástica y rápidamente se unen entre sí para formar el tapón que ocupa el espacio dejado por la superficie vascular alterada.

Al principio, las plaquetas contactan y se adhieren a partes de la pared dañada, como las fibras de colágeno. Luego, interaccionan unas con otras y comienzan a liberar sustancias químicas agregantes. Éstas, activan plaquetas cercanas y mantienen el vasoespasmo, que disminuye el flujo sanguíneo a través del vaso lesionado. La liberación de estas sustancias hace que otras plaquetas se tornen pegajosas, con lo cual se adhieren en las plaquetas ya activadas. A medida que el proceso continúa un gran número de plaquetas forman una masa denominada ***tapón plaquetario***, el cual puede bloquear con éxito pequeñas roturas vasculares, pero si el daño es mayor se hace necesaria la formación de un verdadero coágulo sanguíneo para detener la hemorragia.

- **Coagulación sanguínea.** Comprende una serie de reacciones químicas con la intervención de numerosos componentes de la sangre, los factores de la coagulación

sanguínea (Tabla 1). La mayor parte de ellos se encuentran en el plasma en forma de proenzimas, se nombran con números romanos y con el sufijo “a” para indicar que están activados. Se sintetizan en el hígado, donde la vitamina K es necesaria para la producción de los factores II, VII, IX y X. En el proceso de coagulación sanguínea se distinguen tres etapas:

- a) Formación de la protrombinasa (activador de protombina).
- b) Formación de trombina.
- c) Conversión de fibrinógeno en fibrina.

Tabla 1. Factores de la coagulación sanguínea

FACTOR DENOMINACIÓN	FUNCIÓNES
I: Fibrinógeno	Sintetizado por el hígado. Actúa en la etapa 3 de la coagulación, en la que se transforma en fibrina.
II: Protrombina	Sintetizado por el hígado, para lo cual se requiere la vitamina K. importante en la etapa 2 de la coagulación, en la que se transforma en trombina.
III: Tromboplastina plaquetaria	Se sintetiza por desintegración de las plaquetas, lo que conlleva a la terminación de la etapa 1 de la coagulación.
IV: Calcio	Participa en las tres etapas de la coagulación; la ausencia de $Ca^{++}$ en el plasma inhibe la coagulación.
V: Proacelerina o factor lábil	Se sintetiza en el hígado. Es necesario en las etapas 1 y 2 de los mecanismos extrínseco e intrínseco.
VI:	Actualmente no considerado. Ha sido asignado a otro factor.
VII: Acelerador de la Conversión de Protrombina en Trombina (proconvertina)	Se sintetiza en el hígado, en presencia de vitamina K.
VIII: Factor antihemofílico A o de Von Willebrandt	Se sintetiza en el hígado, y se le requiere en la etapa 1 del mecanismo intrínseco. Su deficiencia causa la hemofilia A (Hemorragia espontánea o después de traumatismos menores).
IX: Factor Christmas, antihemofílico B, componente de la tromboplastina del plasma.	Se sintetiza en el hígado, también en presencia de vitamina K, y es necesario en la etapa 1 del mecanismo intrínseco.
X: Factor Stuart-Prower	Se sintetiza en el hígado, y su formación depende de la presencia de vitamina K. Este factor es necesario en las etapas 1 y 2 de los mecanismos extrínseco e intrínseco.
XI: Antecedente plasmático de la tromboplastina	Se sintetiza en el hígado y es necesario en la etapa 1 del mecanismo intrínseco, la deficiencia de este factor origina hemofilia C.
XII: Factor Hageman o de contacto	Necesario en la etapa 1 de la vía intrínseca. Se activa por contacto con el vidrio de los tubos de ensayo. Desencadena la coagulación extra-corporal.
XIII: Factor estabilizador de la fibrina (FSF)	Necesario en la etapa 3 de la coagulación.
PfI: Factor Plaquetario 1 o Acelerador Plaquetario	Similar al factor V o Proacelerina.



Pf2: Factor Plaquetario 2 o Acelerador de Trombina	Acelera la formación de trombina en la etapa 1 del mecanismo intrínseco, y la conversión del fibrinógeno en fibrina.
Pf3: Factor Plaquetario 3 o Factor Tromboplástico Plaquetario	Participa en la etapa 1 del mecanismo intrínseco.
Pf4: Factor Plaquetario 4	Se combina con la heparina, que es un anticoagulante, durante la coagulación.

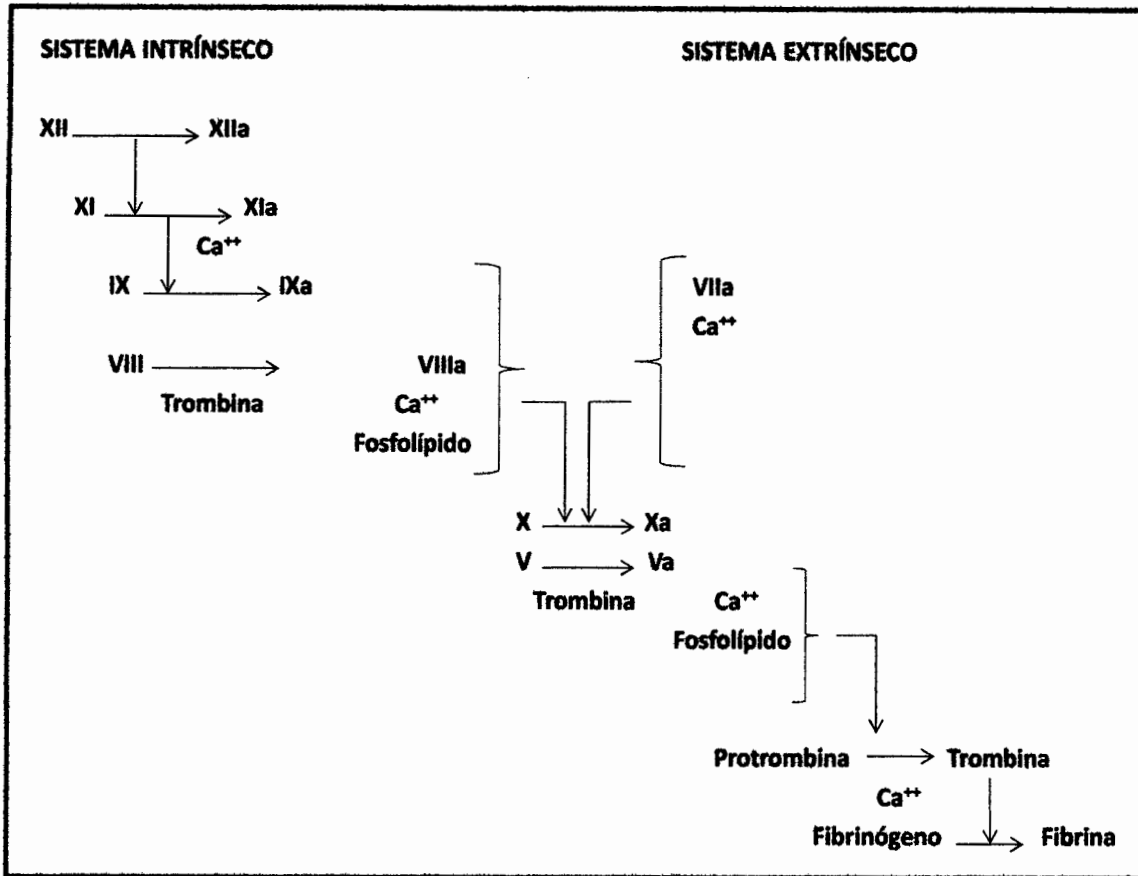
**a) Formación de la protombinasa.**

El activador de protrombina (protrombinasa), puede sintetizarse por dos vías diferentes aunque estrechamente relacionadas: la intrínseca y extrínseca de la coagulación. Ambos mecanismos o vías deben considerarse como sistemas complementarios y nunca competidores, ya que su existencia garantiza la reparación de los traumatismos a que están expuestos los vasos sanguíneos.

**La vía extrínseca**, ocurre a gran velocidad en cuestión de segundos. Su nombre se debe a que el daño causado a las células tisulares permite que liberen *desde afuera* (extrínseco) hacia la sangre una proteína llamada **factor tisular (FT)**. Luego de una serie de reacciones que requieren de iones  $Ca^{++}$  y numerosos factores de la coagulación, el factor tisular se convierte en protrombinasa. Esto completa la vía extrínseca.

**La vía intrínseca**, es una vía más compleja y más lenta; por lo general, tarda unos minutos. Se llama así porque sus activadores son tanto el contacto directo con la sangre como el contenido *dentro* (intrínseco) de ella con la capa de células endoteliales que reviste a los vasos y la sangre puede entrar en contacto con las fibras de colágeno del tejido conectivo adyacente. Tal contacto activa los factores de la coagulación y la lesión de las células endoteliales activa las plaquetas, lo que hace que liberen fosfolípidos que a su vez pueden activar ciertos factores de la coagulación. Luego de sucesivas reacciones que requieren calcio y otros factores, se forma la protrombinasa.

**CUADRO N° 01. Esquema de los sistemas de activación de la coagulación (cascada de la coagulación)**



**b) Formación de trombina**

La trombina se forma a partir de la escisión de la molécula de protrombina ( $\alpha_2$ -G1b). La velocidad de la formación de la trombina es el factor más importante de los que determinan el tiempo necesario para la coagulación. La acción del FXa en presencia  $Ca^{++}$  pero sin la participación de otros cofactores es excesivamente lenta, sin embargo la activación de la protrombina se acelera unas 1000 veces cuando el FXa interviene junto con el FVa, fosfolípidos e iones  $Ca^{++}$ . Para que el FV pueda participar como cofactor en esta reacción debe ser activado mediante la acción proteolítica limitada de la propia trombina, del FXa o de ambos, de forma similar a lo que ocurre en la vía intrínseca con el FVIII. La trombina formada puede catalizar la conversión del fibrinógeno en fibrina en la tercera fase del proceso de coagulación.

*c) Conversión de fibrinógeno en fibrina*

El fibrinógeno es una proteína dimérica (340.000 daltons) producida en el hígado. La formación de la fibrina tiene lugar por la acción enzimática de la trombina limitada a enlaces Arg-Gli del fibrinógeno. La trombina libera fragmentos peptídicos pequeños (fibrinopéptidos A y B), fase a la que sigue la agregación de los monómeros de fibrina, el polímero de fibrina así formado es todavía soluble y forma una malla, inicialmente poco compacta. Posteriormente, y gracias a la intervención del FXIII, ésta se hace insoluble y la red de fibrina se compacta. El FXIII es activado por la trombina en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . El FXIIIa cumple una doble función la de estabilización del coágulo de fibrina y la de protección del mismo al impedir la fibrinólisis excesiva. De esta forma, se produce finalmente, el coágulo sanguíneo que consiste en una malla o red de hilos de fibrina que aprisionan en su interior a GR, GB y plaquetas, y que se adhiere a los bordes lesionados de la pared vascular para detener la pérdida de sangre.<sup>(25)</sup>

### **1.2.2. Trastornos de la Coagulación**

Las coagulopatías o trastornos de la coagulación constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que cursan con diátesis hemorrágica, y que son producidas por alteraciones de las proteínas plasmáticas de la hemostasia primaria (por ejemplo el factor de von Willebrand [FvW]), de la coagulación o de la fibrinólisis. Estos trastornos se clasifican en congénitas o hereditarias y adquiridas (tabla 2). Pueden coexistir ambos tipos en un mismo paciente, como ocurre en la deficiencia hereditaria de un factor asociada a inhibidor circulante de dicho factor tras tratamiento sustitutivo. La deficiencia puede afectar a un factor procoagulante (factor VIII [FVIII]) o a un inhibidor natural ( $\alpha$ 2-antiplasmina). Las coagulopatías congénitas, a su vez, pueden ser consecuencia del defecto selectivo de un factor o, más raramente, de una combinación de 2 o más defectos. Finalmente, las alteraciones de la hemostasia pueden ser de tipo cuantitativo o cualitativo (moléculas disfuncionales o variantes).

**TABLA 2. Clasificación de las coagulopatías.**

<b>Congénitas</b>	<b>Adquiridas</b>
Enfermedad de von Willebrand	Déficit vitamina K
Hemofilia A y B	Enfermedad hepatocelular
Otras deficiencias (menos frecuentes): Fibrinógeno, protrombina, FV, FVII, FX, FXI, FXII, FXIII, Precalicroína, etc.	Coagulación intravascular diseminada
	Amiloidosis
	Anticoagulantes circulantes
	Hiperfibrinólisis primaria
	Síndrome de von Willebrand

Dentro de las coagulopatías congénitas merecen mención especial la enfermedad de von Willebrand (EvW), ya que afecta al 1%-3% de la población, y la hemofilia, con una frecuencia de 1/8-15.000 varones nacidos vivos, pero que es de gran relevancia sanitaria. En lo que respecta a trastornos adquiridos el más frecuente es el déficit de vitamina K. Por el contrario la Coagulación Intravascular Diseminada (CID), aunque menos frecuente, es de gran interés por su trascendencia clínica. <sup>(26,27)</sup>

### **1.2.3. Coagulopatías de mayor relevancia clínica:**

**Enfermedad de von Willebrand:** Esta enfermedad constituye el desorden hemorrágico hereditario más frecuente, causado por una deficiencia o anomalía del Factor de Von Willebrand que se transmite con herencia autosómica dominante o, más raramente, recesiva. El gen del FvW se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12, existiendo un pseudogén no funcionante en el cromosoma 22. El Factor de Von Willebrand es una glucoproteína formada por multímeros de distinto peso molecular, que circula en plasma unida no covalentemente al Factor VIII impidiendo su rápido aclaramiento. Actúa como mediador en la adhesión plaquetar al endotelio lesionado interaccionando con 2 glucoproteínas de membrana plaquetar (GPIIb y GPIIb/IIIa). En la tabla 3 se definen los diferentes tipos de enfermedades de Von Willebrand <sup>(28,29)</sup>.

### **Manifestaciones clínicas**

Principalmente mucocutáneas (epístaxis, gingivorragias y metrorragias). Las hemorragias gastrointestinales acontecen en los 10% de los casos, generalmente asociadas a malformaciones vasculares o angiodisplasias. Las hemorragias musculares y las hemartrosis sólo se observan en el tipo 3 y, ocasionalmente, en el tipo 2.

**Hemofilia:** La hemofilia es una enfermedad hereditaria caracterizada por una deficiencia de la actividad del F-VIII (hemofilia A o clásica) o del FIX (hemofilia B o enfermedad de Christmas), la primera es unas 6-8 veces más frecuente. El tipo de herencia es recesiva ligada al cromosoma X, por ello las mujeres pueden transmitir la enfermedad pero no padecerla (salvo raros casos de homocigocias o en portadoras con alto grado de lyonización del cromosoma normal). El FVIII es sintetizado en el hígado (sinusoides) y el FIX es uno de los factores vitamina K-dependiente, que se sintetiza en el hepatocito.

**Manifestaciones clínicas:** Existen una serie de parámetros clínico-biológicos propios de cada paciente que incluyen: modo de presentación, nivel basal del factor deficitario y presencia o ausencia de historia familiar. Las diátesis hemorrágicas afectan sobre todo a articulaciones, músculos, sistema génito-urinario y sistema nervioso central (SNC).<sup>(30-33)</sup>

### **Coagulación Intravascular Diseminada (CID).**

Este síndrome consiste en la generación extensa de trombina y formación de fibrina, con el consiguiente consumo de factores de la coagulación y plaquetas y aceleración de la fibrinólisis por activación de la plasmina. Todo ello conlleva la aparición de hemorragias, trombosis, necrosis de tejidos y disfunciones orgánicas. Existen factores desencadenantes directos (el factor tisular como consecuencia de lesión tisular o de expresión de células tumorales, monocitos, etc.) e indirectos (virus, bacterias gramnegativas e inmunocomplejos). Las citocinas desempeñan un importante papel en la patogénesis de la CID. Gran cantidad de situaciones clínicas pueden conducir al desarrollo de una CID.

La CID se clasifica en crónica o compensada cuando la velocidad de consumo de factores y plaquetas no excede a la producción y generalmente los tiempos de coagulación son

normales o acortados; y CID aguda o descompensada con importante repercusión clínica y en los estudios de coagulación.

**Manifestaciones clínicas:** Consisten en hemorragias (80%) cutáneas y en los tejidos lesionados por intervenciones quirúrgicas, fiebre (en caso de infección) o cianosis de partes acras. La trombosis se debe a la formación de fibrina y a los microagregados en los pequeños vasos. Las alteraciones orgánicas se evidencian por: coma en las lesiones del SNC, hipoxia en la CID pulmonar, paro cardíaco o hipotensión cuando se afecta el corazón, púrpura y hematomas en las alteraciones cutáneas (incluso púrpura fulminante con gangrena de dedos o extremidades), oliguria o anuria en las injurias renales y acidosis u oligohemia cuando la sangre se almacena en el músculo. La aparición de shock sin síndrome hemorrágico que lo justifique es característico de la CID.<sup>(31-34)</sup>

#### **1.2.4 Métodos y pruebas para evaluar las alteraciones de la coagulación *in-vitro*.**

##### **A. Tiempo de protrombina o de Quick.**

Mide el tiempo de coagulación del plasma de la muestra tras haberle añadido el factor tisular y calcio, estudiando las alteraciones de la vía extrínseca y la común. Es muy útil para saber la actividad del FVII, teniendo una sensibilidad del 100% en descensos inferiores al 25% en los niveles normales de este factor. Si sus valores son normales podremos descartar una alteración de este factor. Está elevado en paciente con anticoagulantes orales.

##### **a. Técnica**

- Centrifugar la muestra de sangre para separar el plasma.
- Calentar el plasma a 37°C y añadir tromboplastina cálcica a la misma temperatura.
- Cronometrar el tiempo de coagulación; los valores normales oscilan entre 12 y 17 segundos.

## **b. Resultados**

Los resultados obtenidos no se expresan en segundos, ya que valor obtenido depende mucho de la calidad de la tromboplastina añadida al plasma. Para dar valores representativos se debe realizar la calibración de cada lote de tromboplastina, mediante la curva de calibración de ese lote. Los resultados obtenidos en el plasma problema estarán relacionados con la curva realizada para cada lote, y se pueden expresar como porcentaje del plasma problema respecto al plasma control, o como la relación entre el TP del plasma problema y el TP del plasma control.

Si se expresa en porcentajes los valores normales oscilarán entre el 70 y el 100%, y si se expresa como razón estarán comprendidos entre 0,9 y 1,2.

## **B. Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPA)**

Calcula el tiempo de coagulación en el plasma estudiado tras añadirle calcio, cefalina (sustituto del FP3) y el activador de contacto, activándose la vía intrínseca y la común de la coagulación. El activador de contacto podemos añadirlo en forma sólida: caolín, sílice o celite, o en forma líquida: ácido elágico.

Es la prueba más sensible para estudiar la vía intrínseca. Sus valores están aumentados cuando los niveles de los factores implicados son inferiores al 20- 40% o la concentración de fibrinógeno es inferior a 50-80 mg/dl. Presenta una sensibilidad del 90-100% para niveles inferiores al 25% del FVIII, por lo cual, si los valores son normales, podemos descartar una alteración de este factor. Al contrario que el anterior, sus niveles se ven afectados por la acción de la heparina de los anticoagulantes orales.

### **a. Técnica**

- Centrifugar la muestra de sangre problema para separar el plasma.
- Mezclar en un tubo de hemólisis el plasma, la cefalina y el activador de contacto.
- Incubar durante 4 minutos a 37°C.
- Añadir calcio para que se inicie la coagulación.

- Cronometrar el tiempo transcurrido desde que se añade el calcio hasta que se realiza la coagulación.

#### **b. Resultado**

También es necesario un plasma de control, y determinar a partir de éste los valores normales de la TTPA.

Los resultados se pueden expresar en:

- Segundos: comparando el TTPA del plasma problema con el plasma con valoración de la supervivencia plaquetaria; una desviación inferior a +8 segundos no será significativa, y una determinación superior a 8 segundos respecto al suero control indicará una alteración patológica. En el caso de que apareciesen valores muy inferiores deberemos repetir la medición, ya que podemos encontrarnos ante un problema de hipercoagulabilidad.

- Relación entre el TTPA del plasma problema y el TTPA del plasma control, considerándose como patológica una relación superior a 1,20.

#### **C. Dosificación del fibrinógeno**

Realizar esta determinación cuando los valores de TP o TTPA se encuentren elevados, así como ante la sospecha de un CID (Coagulación Intravascular Diseminada).

Los valores normales de fibrinógeno en sangre oscilan entre 200 y 400 mg/dl, aunque pueden verse afectados por diversos estados de inflamación aguda. Por esta razón lo ideal es realizar varias determinaciones seriadas y no una sola determinación puntual.

**a. Técnica:** Centrifugar la muestra problema para separar el plasma, calentar el plasma a 37°C, calentar la trombina cálcica bovina a 25°C y añadir al plasma, cronometrar el tiempo de coagulación desde que añadimos la trombina.

#### **b. Resultados**

Se debe determinar una recta de calibrado para cada lote de trombina. Esto se realizará con un plasma control.



#### **D. Tiempo de coagulación**

La prueba se realiza por el método de Lee-White.

**a. Técnica:** Poner al baño maría dos tubos de 10 x 75 mm, depositar en cada uno 1 ml de la sangre problema y conectar el cronómetro. Tras 30 segundos se saca el tubo 1 y se inclina suavemente para ver si la sangre fluye por la pared o permanece inmóvil, esta prueba se repite cada 30 segundos. Cuando la sangre no se mueva comenzaremos las pruebas con el tubo 2, repitiendo la misma operación cada 15 segundos.

#### **b. Resultados**

Los valores normales oscilan entre 8-12 minutos.

#### **E. Tiempo de Howell**

Consiste en medir el tiempo de coagulación en un plasma citratado.

#### **a. Técnica**

- Recoger la sangre sobre citrato.
- Centrifugar a 1.800 rpm durante 5 minutos.
- Depositar en 3 tubos de hemólisis 0,2 ml de plasma.
- Incubar a 37°C durante 3 minutos.
- Añadir 0,2 ml de  $Cl_2Ca$  atemperado .Conectar el cronómetro.
- Poner al baño María y observar la aparición del coágulo cada minuto.
- Los valores obtenidos serán la media de los obtenidos en los 3 tubos.

#### **b. Resultados**

Los valores normales oscilan entre 90 y 120 segundos. <sup>(35-37)</sup>

### 1.2.5. MUESTRA EN ESTUDIO

#### *Ficus insípida* Willd “Ojé”

#### *Clasificación taxonómica planteada por Epíteto Específico (Willd.):*

Reino	: Plantae
Phylum	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Rosales
Familia	: Moraceae
Género	: Ficus
Especie	: <i>Ficus insípida</i>
Nombre Científico	: <i>Ficus insípida</i> Willd.
Nombre Común	: Ojé, Higuerón, Pota, Caucho, Huitoc.

#### **A. Características generales de la especie**

El Ojé (*Ficus insípida* Willd; Moraceae) produce un látex con propiedades antihelmínticas y es usado en la medicina tradicional por la gente local e indígena de las regiones amazónicas. Varias sustancias están ligadas con su actividad, entre ellas: Ficina, Filoxantina,  $\beta$ -amirina, Lupeol, Lavandulol, Phyllantel, Eloxantina, Filantelol y Doxantina. Sin embargo, la sobredosis ha producido varios casos de intoxicación en el ser humano. <sup>(38)</sup>

#### **B. Descripción botánica**

El árbol mide 8-35 m de altura, hasta 70 cm. de diámetro; tronco recto y cilíndrico, con raíces tabulares bien desarrolladas en la base; corteza externa gris o blanca, con fisuras longitudinales, corteza interna blanca; con látex abundante, se desarrolla en climas tropicales y subtropicales, con precipitaciones entre 1 500 a 4 500 mm o más por año y en la región amazónica hasta 800 o 1 000 msnm a temperaturas medias anuales entre 22 y 30°C; habita en suelos Franco-arenosos y areno-arcillosos con abundante materia orgánica. Su época de siembra es durante todo el año, con un distanciamiento de 10 m x

10 m. Se debe realizar deshierbos esporádicos durante los primeros 6 meses de plantación. Establecer el Ojé en restingas en combinación con especies arbustas que resistan la inundación y el sombreado tales como el cacao, arazá y carambola. Se propaga mediante semilla sexual y a través de estacas y rebrotes. El plantón está apto para el trasplante cuando presenta 15 cm de altura. <sup>(39,40)</sup>

Las partes aprovechadas son el látex, la hoja, el fruto y la madera, la extracción del látex se realiza mediante incisiones en la corteza, en forma de V tipo shiringa, para el mejor aprovechamiento y rendimiento, similar a las indicaciones dadas para las otras resinas o látex. La floración se presenta en mayo y la fructificación en agosto. El látex, después de cosechado, debe ser envasado de preferencia en un recipiente de vidrio, previamente desinfectado con agua hirviente; agregarle aguardiente 1/8 parte del líquido total para su conservación y evitar la contaminación. <sup>(40)</sup>

### **C. Usos tradicionales**

El látex ha sido empleado como purgante, aparentemente es muy fuerte y puede llegar a ser muy tóxico si no se sabe suministrar. La aplicación del látex fresco en las partes afectadas se usa para curar y aliviar la leishmaniasis, mordedura de serpiente, picadura de hormiga y raya; también es usado como hematopoyético, depurativo de la sangre, antianémico, dolor de muelas, fiebre y antireumático.

**Otros usos:** El látex previamente calentado es empleado contra la mordedura de peces, los frutos son alimento de peces, aves (especialmente loros), sachavaca y venado. Al fruto se le atribuye propiedades afrodisíacas y mejoradoras de la memoria. Debido a que los frutos son consumidos por animales silvestres, los cazadores utilizan el árbol como lugar de espera para la caza. La madera es empleada para la confección de cajones <sup>(7,41)</sup>.

### **D. Estudios químicos**

El látex posee metabolitos secundarios que están ligadas con su efectividad: ficina, filoxantina,  $\beta$ -amirina, lupeol, lavandulol, phyllantel, eloxantina, filantelol y doxantina.

## **2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS OPERACIONALES.**

### **2.1. VARIABLES**

#### **2.1.1. Variable independiente**

Látex de *Ficus insípida* (Willd.)

#### **2.1.2. Variable dependiente**

Actividad anticoagulante.

### **2.2. INDICADORES**

#### **2.2.1. Indicadores variable independiente**

Diluciones del Látex de *Ficus Insípida* en Solución Salina Fisiológica % (V/V).

#### **2.2.2. Indicadores variable dependiente**

Valores del Tiempo de protrombina (TP)*in-vitro* según técnica automatizada.

Valores Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (TTPa) *in-vitro* según técnica automatizada.

### 2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Látex de <i>Ficus insípida</i> (Willd.)	Sustancia lechosa, de color blanco y consistencia viscosa, producto de la extracción del árbol de <i>Ficus insípida</i> mediante incisiones en la corteza y muy usada en la medicina tradicional por la población local e indígena de las regiones amazónicas.	El látex fue extraído del tallo del árbol mediante incisiones en la corteza en horas de 5 a 7 de la mañana, luego fue filtrado y envasado en un contenedor estéril sin aditivos y conservándose hermético y refrigerado por 24 horas, para su posterior utilización.	Diluciones del Látex de <i>Ficus insípida</i> en Solución Salina Fisiológica % (V/V).	Dilución 1: 50% Dilución 2: 25% Dilución 3: 12.5% Dilución 4: 6.25% Dilución 5: 3.13% Dilución 6: 1.56% Sub-dilución A: 2.81% Sub-dilución B: 2.50% Sub-dilución C: 2.18% Sub-dilución D: 1.87%	Intervalar  -Tipo : Cuantitativo

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Actividad anticoagulante.	Mecanismo por el cual una sustancia es capaz de detener la hemorragia o pérdida de sangre producida por la rotura de la pared vascular impidiendo así la formación de coágulos excesivos mediante la inhibición de los factores de coagulación sanguínea.	Se obtiene el látex de <i>Ficus insípida</i> y se preparan diferentes diluciones del mismo. Se extrae las muestras de sangre de 5 donantes voluntarios, en tubos con Citrato de Sodio al 3,2% para la anticoagulación. Luego, se centrifugan las muestras y se extrae el plasma; éste, se mezcla con las diluciones del látex, obteniéndose un pool de plasma para cada dilución. Se realiza las mediciones del Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo Parcial de Tromboplastina activada (TTPa), respectivamente, haciendo 3 repeticiones	<ul style="list-style-type: none"> <li>Valores de Tiempo de protrombina (TP) según técnica automatizada en Segundos.</li> <li>Valores de Tiempo Parcial de Tromboplastina</li> </ul>	<p><i>No posee actividad anticoagulante:</i> Valor TP Normal* ≤ TP Basal</p> <p><i>Posee actividad anticoagulante:</i> Valor TP Normal* &gt; TP Basal</p> <p><i>Posee actividad anticoagulante:</i> Valor TTPa normal** ≤ TP Basal</p> <p><i>No posee actividad</i></p>	Intervalar -Tipo : Cualitativo

		para cada tubo en las diferentes concentraciones del látex y así determinar la mínima concentración a la cual éste pueda ejercer su actividad anticoagulante y de acuerdo al tiempo que logre prolongar cada prueba (TTPa y TP) identificar la vía de la coagulación sobre el cual actúa.	Activada (TTPa) según técnica automatizada en segundos.	<i>anticoagulante:</i> Valor TTPa Normal** >TTPa Basal	
--	--	---	---	---	--

\*Valor de referencia de TP Wiener Lab (10-14Seg.)

\*\*Valor de referencia de TTPaWiener Lab (33-48Seg.)

### 3. HIPÓTESIS

El látex de *Ficus insípida* Willd. tiene actividad anticoagulante *in-vitro* sobre la cascada de coagulación sanguínea.



## CAPÍTULO III

### 1. MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1 Tipo de estudio

El estudio será *Experimental, Descriptivo*.

- ***Experimental-analítico:*** Porque existirá manipulación deliberada de variables, con el fin de investigar las posibles relaciones causa – efecto.
  
- ***Descriptivo:*** Porque el estudio describirá e interpretará en forma detallada los hechos obtenidos en la investigación.

#### 1.2 Diseño de Investigación

El estudio se llevó a cabo con muestras de sangre venosa extraídas de pacientes voluntarios del área de Medicina General del Centro de Salud San Juan, previo consentimiento informado, clínicamente sanos y sin tratamiento farmacológico alguno. Las muestras, tanto vegetal como el plasma de los donantes fueron procesadas en el laboratorio de análisis clínico del Centro de Salud de San Juan. El látex una vez recolectado, fue filtrado conservado a una temperatura menor a 24°C, luego se prepararon diferentes diluciones del mismo en suero fisiológico a 37°C. Las muestras de sangre extraídas fueron anticoaguladas con citrato de sodio 3.2%, se procedió a centrifugar las muestras, obteniéndose un pool de plasma por cada donante; luego, se mezcló con las diluciones respectivas del látex y finalmente se procedió a determinar la actividad anticoagulante a través de las mediciones del Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo Parcial de Tromboplastina activada (TTPa) por cada dilución, y a partir de los tiempos registrados para cada prueba se identificó la vía de la coagulación más alterada y sobre la cual existe mayor actividad anticoagulante (Ver Flujiograma– Anexo 01).

Las determinaciones de TP y TTPa en plasma y sangre total son prácticamente similares; por lo tanto, la utilización de plasma o sangre total para tal fin no altera significativamente

los resultados para una muestra sanguínea determinada, pudiendo trabajarse con cualquiera de las dos formas. <sup>(42)</sup>

## **2. POBLACIÓN Y MUESTRA**

### **2.1 Población Biológica**

Para este estudio se trabajó con pacientes voluntarios del Centro de Salud San Juan, procedentes de consulta ambulatoria con previo consentimiento informado y que cumplan con los criterios de inclusión correspondientes para la presente investigación, mediante la ficha de encuesta para selección de donantes (Ver anexo 03).

### **2.2 Muestra Biológica:**

Se utilizaron muestras de sangre venosa periférica extraídas de 5 donantes voluntarios, las que posteriormente serán centrifugadas y el plasma obtenido servirá para la medición de las pruebas respectivas (TTPa y TP). La selección de los donantes se realizó tomando en cuenta los criterios de inclusión para la presente investigación; para esto, se evaluó la Historia clínica de los pacientes de Medicina General del Centro de Salud de San Juan por el médico del Área e inicialmente se seleccionó a 20 posibles pacientes que no habían acudido a consulta externa en los últimos 6 meses y por ende se encontraban en condiciones óptimas de salud y sin haber recibido terapia farmacológica alguna. Se hizo una visita domiciliaria a los pacientes y se entrevistó a cada uno de ellos para corroborar si cumplían con los criterios de inclusión correspondientes, llegándose a seleccionar a 5 de estos para el presente estudio.

#### **• Criterios de Inclusión:**

- Personas adultas de ambos sexos y clínicamente sanas, sin signos evidentes de alguna enfermedad.
- Personas que no hayan recibido tratamiento farmacológico alguno durante los últimos 3 meses y/o otra sustancia que interfiera con los procesos de coagulación normales (AINEs, anticonceptivos orales, anticoagulantes, etc).
- Mujeres que no se encuentren gestando o con sospecha de embarazo.

- **Criterios de Exclusión.**

- Personas que padezcan de trastornos de la coagulación o con antecedentes del mismo o alguna otra enfermedad y que muestren signos evidentes de alguna patología.
- Personas que hayan recibido tratamiento farmacológico y/o otra sustancia que interfiera con el proceso normal de coagulación en los últimos 3 meses.
- Mujeres en estado de gestación o con sospecha de embarazo.

### **2.3 Población Vegetal:**

Estará conformada por el conjunto de árboles de *Ficus insípida* (Willd.) de los alrededores de la facultad de Farmacia y Bioquímica ubicada en la carretera Zungarococha en el caserío de Nina Rumi distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas departamento de Loreto, que cumplan con los criterios de inclusión correspondientes.

### **2.4 Muestra Vegetal:**

Estará constituida por el látex de *Ficus insípida* (Willd.), recolectado de las áreas aledañas a la facultad de Farmacia y Bioquímica con sede en la ciudad de Iquitos en las primeras horas de la mañana (5 a 7 am), luego será filtrado y conservado herméticamente en un contenedor estéril, sin aditivos y refrigerado por un máximo de 24 horas antes de su utilización.

- **Criterios de Inclusión:**

- Plantas en buen estado sin presencia de hongos en la corteza.
- Árboles con una madurez suficiente como para la producción y extracción adecuada de látex (entre 8-30 mts. de altura) y con un grosor adecuado de la corteza.

- **Criterios de Exclusión.**

- Plantas con presencia de hongos en la corteza.
- Árboles con longitud menor a 8 mts. de altura y una corteza muy inmadura que imposibilite la extracción del látex.

### **3. MATERIALES E INSTRUMENTOS**

#### **3.1 Material vegetal: Látex de *Ficus insípida* Willd.**

#### **3.2 Material biológico: Muestras de sangre venosa.**

#### **3.3 Materiales de laboratorio:**

- Algodón hidrófilo 500gr.
- Jeringas descartables (5ml, 10 ml).
- Agujas N° 21 x 1 1/2.
- Guantes quirúrgicos N° 6 ½ y 7 ½.
- Ligadura de goma.
- Bolsas de bioseguridad.
- Gradillas metálicas.
- Baguetas e vidrio.
- Pipetas de vidrio (1ml, 5ml).
- Tubos de ensayo (1ml, 3ml, 5ml, 10ml).
- Marcador de vidrio.
- Papel filtro.
- Mascarillas descartables.
- Piscetas.
- Papel toalla.
- Tips para micropipetas (0,5 – 10/20 µl).
- Tubos con Citrato de Na 3.2% de 5ml (Vacutainer®).

#### **3.4 Equipos:**

- Baño maría. Selecta Precistern.
- Micropipeta x 10 – 100 µL (Genex beta).
- Micropipeta x 0,5 – 10 µL (Genex beta).
- Centrifuga Hematológica (Greetmed GT119-300).
- Refrigeradora FRIO LUX.

- Cronómetro digital VWR-Modelo EU 809
- Cámara Fotográfica Digital Kodak 18megapixeles.

### **3.5 Reactivos e insumos:**

- Alcohol 96° 1 L
- Solución Salina 0.9‰
- Agua destilada.
- Lejía.
- Set de TTPa de 60 determinaciones (WienerLab.).
- Set de TP 60 determinaciones (WienerLab.).

#### 4. PROCEDIMIENTOS Y EXPERIMENTAL.

##### 4.1 Selección y extracción del Látex de *Ficus insípida* (Willd.):

La muestra vegetal se recolectó de las inmediaciones de la facultad de Farmacia y Bioquímica, ubicada en la carretera Zungarococha en la comunidad de Nina-Rumi, distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a orillas del Río Amazonas en la Selva Baja, a una altitud aproximada de 130 msnm, a 3° 50' 11.22" de latitud Sur y 73° 22' 81" de longitud Oeste.

La muestra fue recolectada teniendo en cuenta la edad de la planta, el estado de la corteza y la hora de recolección del mismo. Se realizó incisiones a nivel del tallo en la corteza de la planta, en un ángulo de aproximadamente unos 45° de inclinación y utilizando un cuchillo, el látex que se recibió en un contenedor estéril sin aditivos en las primeras horas la mañana (5 a.m.) para su adecuada obtención.

El látex fue identificado por un taxonomista experto en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, mediante una ficha técnica descriptiva de la especie de la planta con la que se trabajó.

##### 4.2 Filtración y conservación del Látex de *Ficus insípida* (Willd.):

La muestra una vez extraída, se filtró a través de una gasa para eliminar las partículas extrañas y/o contaminantes; el producto filtrado fue conservado lo más fresco posible en un ambiente seco y refrigerándolo a una temperatura no mayor de 25°C, en un frasco con tapa hermética y debidamente rotulado. <sup>(43)</sup>

##### 4.3 Preparación de las diluciones del látex de *Ficus insípida* (Willd.):

Se procedió a preparar diferentes diluciones del látex de *Ficus insípida* en solución salina fisiológica (NaCl 0.9‰) a 37°C. Las diluciones se realizaron a partir del tubo N° 04, ya que el tubo 01 fue usado como control (tiempo normal de las coagulaciones) sin adición de ningún componente más que el plasma solo, el tubo 02 como blanco para las diluciones del látex, conteniendo solo suero fisiológico; en tanto, que en el tubo 03 se usó el látex puro sin

ser sometido a dilución alguna. Se prepararon diluciones en serie, es decir, se hizo una reducción progresiva de las concentraciones del látex (Anexo 14) con la finalidad de determinar la mínima concentración a la cual el látex pueda ejercer su actividad anticoagulante y comprobar si este efecto es dosis-dependiente.

Para calcular las diferentes concentraciones del látex, se utilizó la siguiente expresión:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

**Donde:**

$C_1$  = Concentración inicial del Látex.

$V_1$  = Volumen deseado del Látex.

$C_2$  = Concentración deseada del látex.

$V_2$  = Volumen total de la solución.

#### **4.4 Obtención de la muestra biológica**

Se extrajeron muestras de sangre venosa periférica de los donantes voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión correspondientes, utilizando para esto, tubos de 2.7ml (Vacutainer®) conteniendo 0.3ml de Citrato de Sodio al 3,2% para la anticoagulación, según la técnica propuesta por el manual de procedimientos de laboratorio para técnicas de hematología del INS-MINSA de la siguiente manera:

Se limpia la zona elegida con alcohol al 70%, en un área de 2 pulgadas. Se retira el estuche protector de la aguja y éste se enrosca al dispositivo para extracción de sangre al vacío. Seguidamente se coloca la ligadura cuatro dedos por encima de la flexión del codo o 10 cm por encima de éste y pedir al paciente que abra y cierre la mano varias veces, para favorecer la dilatación de las venas; una vez escogida la vena, desinfectarla con una pieza de algodón embebido en etanol al 70%; colocar la aguja en dirección paralela a la vena, perforar la piel haciendo avanzar la aguja entre 0,5 cm y 1 cm en el tejido subcutáneo, luego insertar el tubo al vacío por la parte posterior para realizar la extracción. Retirar la ligadura tirando del extremo doblado y colocar un pedazo de algodón seco sobre la parte donde se encuentra oculta la aguja. Sacar la aguja con un movimiento rápido y depositarla en el recipiente de

metal con desinfectante. Pedir al paciente que presione firmemente el algodón durante 3 minutos, con el brazo extendido. No se recomienda que se flexione el brazo a causa del riesgo que se forme un hematoma. Mezclar por inmersión suave la sangre con el anticoagulante contenido en el tubo. <sup>(44)</sup>

#### **4.5 Procesamiento de la muestra biológica**

La sangre una vez extraída será centrifugada para separar los elementos formes y el plasma, repitiéndose este procedimiento para todas las muestras obtenidas del resto de los donantes. A partir de este procedimiento obtendremos un pool de plasma por cada muestra. El plasma será distribuido para los tubos control, blanco, el látex puro y para cada una de las diluciones (6 diluciones), obteniéndose un pool de once tubos por cada donante.

#### **4.6 Determinación de la actividad anticoagulante**

Para determinar la actividad anticoagulante del látex de *Ficus insípida*, se realizaron las mediciones del Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (TTPa) con el pool de plasma obtenido de la sangre de cada donante, siguiéndose estrictamente las instrucciones del protocolo provisto por el laboratorio fabricante (Anexos 06 y 07).

Se realizaron 3 repeticiones en la medición del TP y TTPa con el pool de plasma de cada paciente en las diferentes concentraciones del látex, con la finalidad de obtener un porcentaje de error mínimo en las determinaciones respectivas.

Los tubos N° 01 fueron utilizados como control, tomándose como rango normal para determinar la actividad anticoagulante el tiempo el promedio obtenido de estas 3 mediciones  $\pm 0,37$  segundos para el TP; y para el TTPa, el promedio de las 3 determinaciones  $\pm 1,80$  segundos, teniendo en cuenta que los valores en ambas pruebas estén dentro de los rangos normales estandarizados (NationalCommitteeonClinicalLaboratoryStandards)<sup>(42)</sup>.



Los tubos N° 02 fueron utilizados como blanco para las diferentes diluciones del látex ya que en este tubo se mezcló la sangre con 25 µl. de suero fisiológico, siendo el máximo volumen de suero adicionado sin tener la sustancia problema.

En los tubos N° 03 se usó solo látex puro, esperándose obtener los máximos valores de prolongación del coágulo y a partir de allí realizar diluciones en serie en ambas pruebas.

A partir de los tubos N° 04 se prepararon las diferentes diluciones, partiéndose de una dilución de 1 parte de látex por 2 partes de SSF 0.09% (dilución 50%), siendo ésta la máxima concentración de la muestra utilizada para las diluciones. Se realizaron diluciones en serie con la finalidad de determinar la mínima concentración a la que el látex pueda ejercer el efecto anticoagulante y saber si este efecto es dosis-dependiente o variable en cada dilución. Las muestras fueron diluidas gradualmente a razón 1/2, hasta llegar a una dilución mínima en que la actividad anticoagulante se detiene (tiempo en el que las pruebas dejen de prolongarse).

Se obtuvo los valores de las pruebas de los 5 donantes y se sacó un promedio de los mismos. De acuerdo a los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones en los tubos 4 al 9 (Tabla3), se decidió realizar nuevas diluciones del látex entre las diluciones 1:32 y 1:64 (tubos A al D), con el objetivo de determinar con mayor precisión hasta qué concentración del látex era cuantificable la prolongación del TP y del TTPa. El procedimiento para determinar los tiempos en las sub-diluciones es idéntico al utilizado para las muestras anteriores. Luego, a partir de los tiempos registrados se identificó la prueba en donde hubo mayor alteración de los tiempos de coagulación y a partir de allí se determinó la vía de coagulación en la que se presentó mayor actividad anticoagulante.  
(16,20,45,46)

Para el análisis estadístico los datos fueron procesados mediante el Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), usando el programa estadístico SPSS v. 18. Se calculó los valores promedios y la desviación estándar como medidas de tendencia central, las que fueron presentadas mediante tablas y gráficos, además de una prueba de significancia bilateral para

determinar la relación entre las diferentes concentraciones del látex y su respectivo efecto anticoagulante sobre el TP y TTPa. Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS v.18.

## **5. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS:**

Las muestra vegetal se recolectó de las inmediaciones de la facultad de Farmacia y Bioquímica, ubicada en la carretera Zungarococha en la comunidad de Nina-Rumi, distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a orillas del Río Amazonas en la Selva Baja, a una altitud aproximada de 130 msnm, a 3° 50' 11.22" de latitud Sur y 73° 22' 81" de longitud Oeste, posteriormente fue identificada por un taxonomista experto en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (Iquitos-Perú).

En la selección de los donantes de sangre, se realizó una entrevista a través del llenado de la ficha para la selección de donantes y de consentimiento informado para donación de las muestras sanguíneas respectivas (Anexo 02).

Para la evaluación de la actividad anticoagulante del látex de *Ficus insípida* (Willd.), los resultados del tiempo de coagulación para TTPa y TP con las diferentes diluciones fueron registrados en la tarjeta de recolección de datos (Anexos N° 04 y 05). El registro de los tiempos de coagulación se realizó inmediatamente después de adicionar los reactivos correspondientes (reactivos para TTPa y TP) a las muestras de plasma conteniendo las diluciones del látex, activando de manera simultánea un cronómetro o coagulómetro de acuerdo al protocolo descrito por el laboratorio fabricante.

Para la recopilación de datos de las se utilizó la observación directa y registro de los coágulos formados en cada prueba y el tiempo de formación de éstos.

## 6. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos en cada prueba fueron expresados en términos de los valores resultantes, así, se determinó el grado de actividad anticoagulante en relación a los tiempos de formación del coágulo tanto en el TP como en el TTPa.

Se procedió a calcular la media y la desviación estándar como medidas de tendencia central para representar la actividad anticoagulante del látex de *Ficus insípida*, las mismas que fueron representadas mediante tablas y gráficos.

Los datos fueron procesados mediante el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Todos los procedimientos se realizaron mediante la utilización del programa SPSS versión 18.0

## 7. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS

Para la presente investigación correspondiente al área de salud, se tomó en cuenta los principios éticos y normas para la protección de los derechos humanos durante la realización del proyecto, dispuesto en el Informe Belmont (18 de Abril de 1979). Así mismo, por tratarse de un estudio *in vitro* con muestras de sangre humana, se dispone de la aprobación del Comité de ética de la secretaría académica de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, para estudios de esta índole en institutos y centros de investigación a nivel nacional; por lo que a los sujetos participantes del mismo, se les brindará toda la información requerida antes de dar su autorización respectiva. A los sujetos seleccionados se les invitará a participar mediante un consentimiento informado y posteriormente una entrevista a través del llenado de una ficha de encuesta (Anexo 03), sin ningún tipo de presión, respetando su autonomía expresada en su decisión de aceptar o no. Para la recolección de datos se mantendrá un grado de confidencialidad, protegiendo la anonimidad y respetando la integridad física y moral de los sujetos participantes.

## CAPÍTULO IV

### 1. RESULTADOS

En la tabla 03, se muestran las concentraciones (V/V) utilizadas para el estudio. Se muestra el volumen de plasma utilizado para cada prueba, el volumen de látex y suero fisiológico (NaCl0.09%) según la concentración por cada dilución, para su evaluación respectiva.

**TABLA 03: Volúmenes utilizados para las concentraciones de látex de *Ficus insípida* Willd.**

TUBOS		PLASMA(μL)	LÁTEX(μL)	NaCl 0.09%(μL)	CC Látex- Suero(v/v)%
DILUCION	SUB- DILUCION				
1	-	375	12.5000	12.5000	50.0000
2	-	375	6.2500	18.7500	25.0000
3	-	375	3.1250	21.8750	12.5000
4	-	375	1.5625	23.4375	6.2500
5	-	375	0.7813	24.2188	3.1250
	A	375	0.7031	24.2969	2.8125
	B	375	0.6250	24.3750	2.5000
	C	375	0.5469	24.4531	2.1875
	D	375	0.4688	24.5313	1.8750
6		375	0.3906	24.6094	1.5625

En las tablas N° 04 y 05 se presentan los valores obtenidos para el Tiempo de protrombina (TP) y Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) por cada paciente, así como el tiempo promedio de estas mediciones en segundos, respectivamente.

En la Tabla N°04, el Tiempo de Protrombina(TP) promedio para el Tubo N°1: BASAL (Plasma) fue de 12.492 segundos; para el Tubo N°2: BLANCO (NaCl0.09% + Plasma), el TP fue de 12,517segundos y en el Tubo N°3: Látex (Látex puro + Plasma), el TP fue mayor de 24 horas; mientras que a partir del Tubo N°4, se muestran las diluciones a diferentes concentraciones del látex de *Ficus insípida*, donde se evidencia el incremento del TP hasta el Tubo N°7, y disminuyendo en los Tubos N°8 y N°9.

**TABLA 04: Valores de Tiempo de Protrombina (TP) por paciente y tiempo promedio.**

Nº TUBO	Tiempos de Coagulación por paciente en Segundos					
	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	t(Prom)
1	12.5433333	13.07	12.6466667	11.83	12.37	12.492
2	12.6166667	13.1733333	12.77	11.8466667	12.3133333	12.5166667
3	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
4	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
5	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
6	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
7	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
8	91.67	98.7333333	85.3833333	86.7133333	91.1133333	90.7226666
9	12.5566667	15.35	13.0433333	12.9833333	14.9433333	13.7753333

TUBO 01: CONTROL

TUBO 02: BLANCO

TUBO 03: LÁTEX

TUBOS 04 – 09: DILUCIONES DEL LÁTEX

En la Tabla N°05, el Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) promedio para el Tubo N°1: BASAL (Plasma) fue de 36.327 segundos; para el Tubo N°2: BLANCO (NaCl0.09%+ Plasma), el TTPa promedio fue de 37.098 segundos y para el Tubo N°3: Látex (Látex puro + Plasma), el TTPa fue mayor de 24 horas. A partir del Tubo N°4, se muestran las diluciones a diferentes concentraciones del látex de *Ficus insípida*, donde se evidencia el incremento del TTPa hasta el Tubo N°7, tendiendo a disminuir en los Tubos N°8 y N°9.

**TABLA 05: Valores de Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) por paciente y tiempo promedio.**

Nº TUBO	Tiempos de Coagulación por paciente en Segundos					
	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	t(Prom)
1	36.5366667	38.4266667	36.71	34.5433333	35.4166667	36.3266667
2	38.64	38.7066667	36.8833333	34.9333333	36.3266667	37.098
3	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
4	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
5	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
6	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
7	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs	> 24 hrs
8	43.7866667	42.3966667	41.3933333	40.3366667	56.16	44.8146667
9	36.5766667	38.4766667	36.6766667	34.32	35.69	36.348

TUBO 01: CONTROL

TUBO 02: BLANCO

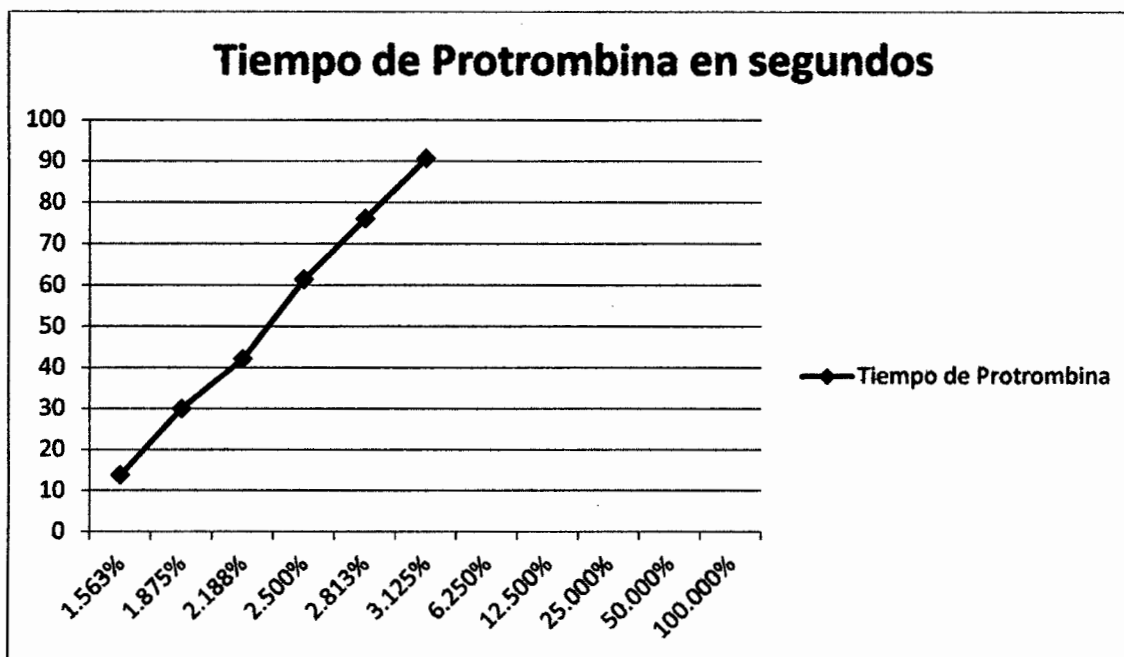
TUBO 03: LÁTEX

**TUBOS 04 – 09: DILUCIONES DEL LÁTEX**

En el cuadro N°02: Se muestra la variación del Tiempo de Protrombina (TP) en segundos, según la concentración (Látex/NaCl0.09%) de *Ficus insípida*, en las sub-diluciones (Tubos A al D) durante todo el proceso de evaluación.

A partir de la primera concentración 3.125% (0.7813ml látex/ 24.218ml NaCl0.09%), se evidencia un tiempo promedio de 90.723 segundos, al disminuirla concentración a 2.8125% (0.7031ml látex/ 24.297 ml NaCl 0.09%), se obtiene un ligero descenso del tiempo de coagulación (77.93seg.). Al seguir disminuyendo las concentraciones en las sub-diluciones del látex, los tiempos de coagulación también disminuyen de manera directamente proporcional a estas concentraciones, y esta característica se mantiene hasta el tubo 09 (13.775 segundos).

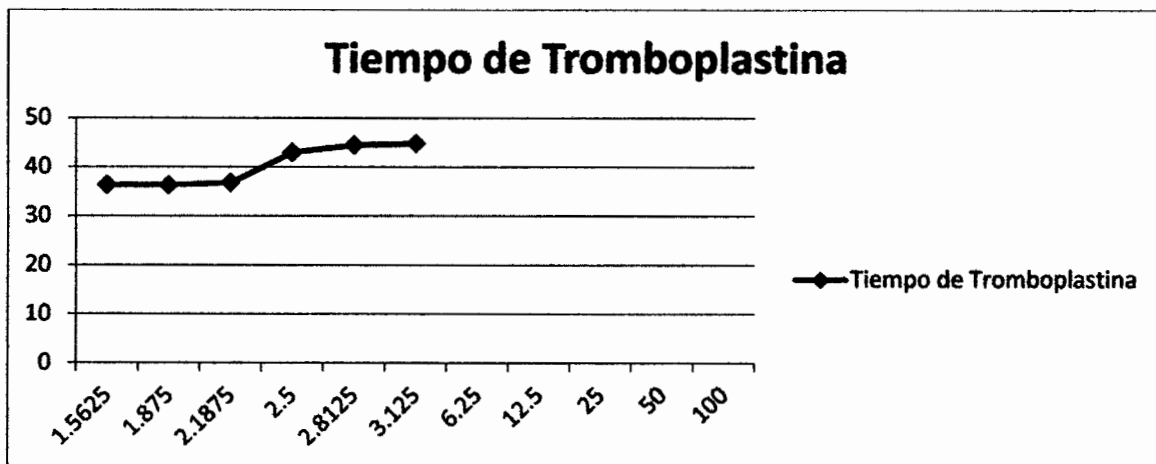
**CUADRO N°02: Variación del Tiempo de Protrombina (TP) según concentración de Látex de *Ficus insípida* Willd. (Ojé).**



En el Cuadro N°03 se presentan las variaciones del Tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) en segundos, de acuerdo a las concentraciones (Látex/NaCl 0.09%) de *Ficus insípida*, en las sub-diluciones (Tubos A al D) durante todo el proceso de evaluación.

En la primera concentración 3.125% (0.7813 ml látex/ 24.218 ml NaCl 0.09%), se evidencia un tiempo promedio de 44.815 segundos, al disminuir la concentración en las primeras sub-diluciones se obtuvo un ligero descenso en los tiempos de coagulación. Para la sub-dilución 2.8125% (0.7031ml látex/ 24.297 ml NaCl0.09%) el TTPa fue de 44.507 segundos y en la sub-dilución 2.50% fue de 43.01 segundos. Al seguir disminuyendo las concentraciones del látex, se observa que no existe mucha variación del TTPa por debajo de esta concentración (2.50%), lo cual puede observarse en la gráfica con la tendencia de la curva

**CUADRO N°3: Variación del Tiempo Parcial de Tromboplastina activada (TTPa) según concentración de Látex de *Ficus insípida* Willd. (Ojé).**



En la tabla N° 06 se muestran las comparaciones entre el Tiempo de Protrombina promedio con las diluciones y sub-diluciones del látex. Se puede apreciar que existe diferencia estadística significativa desde la dilución 01 (50% V/V) al existir valores de significancia bilateral por debajo del nivel crítico establecido  $p < 0.05$ ; esta misma tendencia se mantiene para las sub-diluciones del látex (A,B,C,D). En cambio, en la dilución 06 (1.56% V/V), se obtuvo un valor de  $p = 0.063$ , lo que nos indica que no se encontró diferencia estadística significativa.

**TABLA N° 06: Tiempo de Protrombina promedio y desviaciones estándar Vs. Diluciones del látex.**

TP BASAL (segundos)	NÚMERO DILUCIÓN	TP DILUCIÓN (segundos)	CONCENTRACIÓN (V/V)	SIGNIFICANCIA BILATERAL p<0.05
X ± SD		X ± SD		
12.492 ± 0.451	DIL-1	86000 ± 0.000	50.00%	0.000*
	DIL-2	86000 ± 0.000	25.00%	0.000*
	DIL-3	86000 ± 0.000	12.50%	0.000*
	DIL-4	86000 ± 0.000	6.250%	0.000*
	DIL-5	90.723 ± 4.76	3.125%	0.000*
	SUBDIL-A	77.933 ± 4.35	2.813%	0.000*
	SUBDIL-B	61.382 ± 2.29	2.500%	0.000*
	SUBDIL-C	42.174 ± 2.83	2.188%	0.000*
	SUBDIL-D	30.009 ± 1.85	1.875%	0.000*
	DIL-6	13.775 ± 1.27	1.563%	0.063

**TP BASAL: Tiempo de Protrombina control**

**X ± SD: Promedio y Desviación estándar**

**\*Significancia bilateral para un nivel crítico de p<0.05 Vs. Control**



En la tabla N° 07 se muestran las comparaciones entre el Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada promedio con las diluciones y sub-diluciones del látex. Se aprecia que existe diferencia estadística significativa desde la dilución 01 (50% V/V) hasta la dilución 04 (6.25% V/V) al existir valores de significancia bilateral por debajo del nivel crítico establecido  $p < 0.05$ ; esta misma tendencia se mantiene para las sub-diluciones A y B con valores de  $p = 0.04$  y  $p = 0.028$  respectivamente. Para las diluciones 05 y 06 (3.125% y 1.563% V/V de látex) y sub-diluciones C y D (2.188% y 1.875% V/V), se obtuvo valores de significancia por encima del nivel crítico permitido  $p > 0.05$ , lo que nos indica que no existe diferencia estadística significativa a estas concentraciones del látex.

**TABLA N° 07: Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada promedio y desviaciones estándar Vs. Diluciones del látex.**

TTPa BASAL (segundos)	NÚMERO DILUCIÓN	TTPa DILUCIÓN (segundos)	CONCENTRACIÓN (V/V)	SIGNIFICANCIA BILATERAL $p < 0.05$
$X \pm SD$		$X \pm SD$		
36.327 ± 1.468	DIL-1	86000 ± 0.000	50.00%	0.000*
	DIL-2	86000 ± 0.000	25.00%	0.000*
	DIL-3	86000 ± 0.000	12.50%	0.000*
	DIL-4	86000 ± 0.000	6.250%	0.000*
	DIL-5	44.816 ± 6.47	3.125%	0.053
	SUBDIL-A	44.508 ± 5.65	2.813%	0.040*
	SUBDIL-B	43.004 ± 3.98	2.500%	0.028*
	SUBDIL-C	36.778 ± 2.39	2.188%	0.683
	SUBDIL-D	36.306 ± 1.57	1.875%	0.679
	DIL-6	36.350 ± 1.52	1.563%	0.794

TTPa BASAL: Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada control

$X \pm SD$ : Promedio y Desviación estándar

\*Significancia bilateral para un nivel crítico de  $p < 0.05$  Vs. Control

## 2. DISCUSION

El análisis de los resultados nos permite afirmar que el látex de *Ficus insípida* presenta actividad anticoagulante sobre las dos vías de la cascada de coagulación sanguínea y que posee principios activos capaces de interferir con la actividad de los factores que actúan en estas vías, pero también se demuestra que afectan de modo diferente a una vía de la otra. Esto se puede evidenciar a través de las variaciones en el TP de manera dosis-dependiente y desde concentraciones muy pequeñas, lo que nos indica que los factores de coagulación presentes en la vía extrínseca son afectados en mayor grado en comparación con los factores de la vía intrínseca, pues la prolongación de los tiempos de coagulación existentes en las pruebas de TTPa son mínimas y de un modo intermitente y variable.

Esto se respalda en las teorías descritas por Baglin T. y Jones I. (2006), quienes señalan que el TP es una prueba para evaluar los factores II, V, VII y X presentes en la vía extrínseca de la coagulación, por lo tanto, inhibiría la actividad de dichos factores. El efecto anticoagulante cuantificable sobre esta vía se produce a partir de una concentración de 3.125%(v/v), ya que a una concentración superior (6.125%) el látex prolonga intensamente los tiempos de coagulación de ambas pruebas y por ende de ambas vías.

Este efecto puede explicarse de la siguiente manera: A partir de una concentración de 3.125% los componentes enzimáticos (cistein-proteasas) presentes en el látex provocarían la disociación de los factores presentes en la vía extrínseca, inactivándolos de manera directamente proporcional a las concentraciones del látex. En la vía intrínseca la variación mínima del TTPa indica que los factores presentes en esta vía no fueron afectando del mismo modo corroborándose lo descrito por Baglin T. y Jones I. (47,48)

En el tubo N°02 el TP promedio fue de 12,517 segundos, es decir no hubo una variación significativa en relación al tubo control. Para el TTPa el tiempo promedio fue de 37.098 segundos, ligeramente mayor al tubo control, lo que indica que el suero fisiológico actuaría como un interferente indirecto del TTPa, alterando la sensibilidad de los resultados para esta prueba pero sin inhibirla actividad de los factores de coagulación. (49-51)

Al utilizarse látex puro (tubo 03) sin diluciones previas, se pudo evidenciar la intensa actividad anticoagulante del látex, al registrarse tiempos de coagulación extensos sobre ambas pruebas por un tiempo indefinido mayor de 24 horas. Del mismo modo en las diluciones de los tubos del 4 al 7, los tiempos de coagulación se prolongaron de modo similar a la del tubo con látex puro, lo cual indica la marcada actividad anticoagulante del látex y su efecto inhibitorio sobre los factores presentes en ambas vías de la cascada coagulación sanguínea (TP y TTPa), pero sin aún poder ser cuantificable.

A partir de una concentración de 3.125% (tubo 08) se pudo cuantificar la actividad anticoagulante del látex tanto en la vía extrínseca (TP = 90.723 seg.), como en la intrínseca de la coagulación (TTPa = 44.815 seg.). Se continuó con las diluciones en serie hasta una concentración de 1.5625% (Tubo 09) del látex en SSF. En este punto el efecto inhibitorio del látex continúa descendiendo en ambas pruebas hasta alcanzar los tiempos basales en el caso del TTPa; no siendo así para el TP en el que los tiempos de coagulación si bien se encuentran levemente prolongados, no exceden el rango normal ( $12.492 \pm 0,37$ seg.) como para considerar que aún presentan una actividad anticoagulante marcada.

En las sub-diluciones (tubos del A al D) hay una disminución progresiva de los tiempos de coagulación en el TP, esto se aprecia al observar que en la medida que la dilución del látex aumentaba, los tiempos de coagulación se fueron acortando, con lo cual se confirma que el látex de *Ficus insípida* prolonga los tiempos de coagulación sobre la vía extrínseca (TP) de manera dosis dependiente desde concentraciones muy pequeñas. En cambio, para el TTPa (vía intrínseca) dicho efecto no ocurre en la misma magnitud, al presentarse una variación mínima en los tiempos de formación del coágulo en las sub-diluciones. Se sabe que el Tiempo de Protrombina es una prueba de laboratorio para evaluar los factores II, V, VII y X, componentes de la vía extrínseca de la coagulación por lo tanto el látex inhibiría dichos factores y a su vez la vía extrínseca.

La actividad anticoagulante cuantificable del látex sobre la vía extrínseca se produce a partir de una concentración de 3.125%, ya que una concentración de 6,25%, es decir, 0,78125µl. más de látex, prolonga ambas pruebas por un tiempo indefinido mayor de 24 horas; lo cual explica la inhibición intensa de los factores de ambas vías de la coagulación sanguínea. Esto significa que hasta una concentración de 3.125%, los componentes enzimáticos: cistein-proteasas, presentes en el látex de *Ficus insípida* provocarían la disociación de los factores de la coagulación de la vía extrínseca,

inactivándolos de una manera directamente proporcional a la concentración del látex; no actuando de la misma forma con los factores de la vía intrínseca de la coagulación, pues la poca variabilidad del TTPa indica que los factores de dicha vía no fueron afectados de la misma forma. Pero a una concentración de 6.25% la cantidad de cistein-proteasas presentes en el látex sería tal que sobrepasaría un umbral de actividad proteolítica y disociarían a todos los factores de ambas vías en su totalidad, impidiendo así la formación del coágulo de fibrina, efecto que se plasmó con la prolongación del TP y TTPa por más de 24 horas.

Debemos señalar que en la literatura científica consultada no se reporta estudios concretos sobre la función anticoagulante del látex de esta planta, sólo se mencionan estudios sobre su efecto antiparasitario, demostrando ser un excelente agente terapéutico<sup>(52-54)</sup>. Pero, se destaca la función reconocida y demostrada científicamente del contenido enzimático (ficina) del látex y su estrecha relación con la bromelaína, perteneciente a la misma familia y con la cual comparte propiedades fisicoquímicas similares. Existen reportes de que la Bromelaina tiene un efecto anticoagulante producido por la reducción del factor X y factor II (protrombina) coagulación sanguínea, y también provoca una reducción dosis dependiente del quinínogeno de alto peso molecular y pre-caliceína, los cuales participan como aceleradores del inicio de la vía intrínseca de la coagulación<sup>(55)</sup>. La Bromelaina en concentraciones altas prolonga marcadamente el TP y TTPa, y su efecto fibrinolítico se debe a que estimula la conversión del plasminógeno en plasmina<sup>(55)</sup>.

Debido al alto contenido de Ficina en el látex de *Ficus insípida* y que ésta posee propiedades similares con la Bromelaina, podríamos asumir que esta enzima sería la responsable de producir la acción anticoagulante en condiciones *in-vitro*. Existe poca información sobre otras plantas o derivados de esta especie que demuestren tener actividad anticoagulante *in-vitro* a nivel local. A nivel internacional, aunque la metodología no sea comparable ya que se usa el extracto alcohólico de las hojas de otras especies como las de *Ricinus communis*, podemos destacar los estudios realizados en Cuba por Apechea M. et al<sup>(17)</sup> donde se demuestra que el mencionado extracto, prolongó el TP y TTPa. En nuestro país se ha estudiado el extracto acuoso de hojas de *Chenopodium murale* L.<sup>(21)</sup>, *Chenopodium pertiolare* HBK<sup>(22)</sup>, y *Chenopodium ambrosoides*<sup>(23)</sup>, aplicando el método de Lee White, demostrando que tienen acción anticoagulante *in-vitro*. El único estudio reportado donde se usó el látex de *Ficus insípida* fue realizado por Tutucayo M, donde se demuestra su efecto inhibitorio sobre la formación del coágulo sanguíneo en condiciones *in-vitro*<sup>(16)</sup>, pero no se investigó qué vía de la coagulación era la afectada.

### 3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación nos permiten afirmar que el látex de *Ficus insípida* posee principios activos capaces de inhibir *in vitro* la vía extrínseca de la coagulación sanguínea a una concentración igual o mayor a 3.125% y que posee un potente efecto anticoagulante *in vitro* sobre ambas vías de la coagulación sanguínea a una concentración igual o mayor a 6.25%.

Se pudo determinar y comprobar la actividad anticoagulante *in-vitro* del látex de *Ficus insípida* sobre la cascada de la coagulación sanguínea, a partir de los tiempos de coagulación obtenidos en las pruebas de TP y TTPa con las diferentes diluciones del látex, comprobándose dicho efecto con la formación de los coágulos por encima de los tiempos normales en ambas pruebas.

Se pudo evidenciar la intensa actividad anticoagulante que presenta el látex de *Ficus insípida* sobre ambas vías de la coagulación sanguínea, a partir de una concentración de 6.25% (v/v), en la que se prologaron los tiempos de coagulación por más de 24 hrs. y por debajo de esta dosis la actividad fue menos intensa y variable en una vía de otra.

El látex de *Ficus insípida* ejerce un mayor efecto inhibitorio sobre la actividad de los factores presentes en la vía extrínseca de la coagulación sanguínea, al presentarse una mayor variación en los tiempos de coagulación de esta vía (TP) y de manera dosis dependiente desde una concentración de 1.56% (v/v), a diferencia de la vía intrínseca en la que hubo variaciones mínimas y de un modo irregular desde una concentración de 2.5% (v/v). Con esto se confirma que el látex presenta mayor actividad anticoagulante sobre la vía extrínseca de la coagulación sanguínea afectando a los factores presentes en ésta.

#### 4. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en esta investigación y la variedad de sustancias presentes en esta especie, resulta necesario continuar investigando el látex de *Ficus insípida* para determinar si su contenido de cistein-proteasas podría lisar también los enlaces peptídicos del polímero de fibrina una vez formado.

Al existir diversos trastornos de la coagulación y la falta de terapias efectivas para un tratamiento adecuado, consideramos muy importante elaborar estudios *in-vivo* en modelos animales para determinar su efecto tras la administración oral o parenteral y así establecer si este podría ser usado en la terapia farmacológica anticoagulante o fibrinolítica en el futuro.

Realizar estudios de toxicidad *in-vitro* e *in-vivo* sobre el látex de esta especie a fin de determinar su dosis tóxica y poder establecer la dosis adecuada en la terapia farmacológica, y de este modo contribuir con una alternativa terapéutica tradicional segura y efectiva.

Crear nuevos métodos y aislar los componentes enzimáticos del látex de *Ficus insípida* realizando nuevos ensayos y determinaciones *in-vitro* sobre la coagulación sanguínea, y de este modo, afirmar categóricamente que el compuesto responsable de la anticoagulación es la Ficina.

Profundizar los estudios de investigación sobre esta especie mediante la aplicación de este y otros métodos, e incentivar a las futuras generaciones a seguir indagando, y de esta manera contribuir con información valiosa para posteriores investigaciones sobre las propiedades terapéuticas de esta planta.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de La Salud. Enfermedades Cardiovasculares (Nota informativa). [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>. Consultado: 4 de junio de 2012.
2. MedlinePlus. Trastornos Hemorrágicos. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.nlm.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001304.html>. Consultado: 22 de junio de 2012.
3. Oporto L. Efecto antihelmíntico del látex de *Ficus glabrata*. Tesis de Bachiller. Arequipa, Perú. Universidad Nacional de San Agustín, 1988. 65pp.
4. Amorin A, Borba J, Carauta J, Lope D, Kaplan M. Antihelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *J Ethnopharmacol* 1999;64:255-58.
5. Cárdenas W, Cabieses F. Algunas plantas antihelmínticas. Lima: Instituto de Medicina Tradicional; 1997.p.11-17.
6. Stepek G, Behnke J, Buttle J, Duce R. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics *Trends Parasitol* 2004;20(7):322-27.
7. Schöngart J. et al. Management criteria for *Ficus insipid* Willd. (Moraceae) in Amazonian white-water floodplain forests defined by tree-ring analysis. 2007. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.uni-goettingen.de/de/document/.../Schöngart%20et%20a.%202007.pdf>. Consultado: 10 de julio de 2012.
8. Duran-R C, Fonseca-J R, Ibarra-M G. Estudio florístico de *Ficus* (Moraceae) en el estado de Guerrero, México. 2010. *Rev. Mex. Biodiv.* . vol.81, n.2, pp. 239-262. ISSN 1870-3453.
9. Naquira C, Arroyo M, Hansson A. Preclinical and clinical studies with latex from *Ficus glabrata* HBK, a traditional intestinal antihelmintic in the Amazon area. *J Ethnopharmacol* 1986;17(2):105-138.
10. Maurer H. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1234-1245.

11. Hale L, Greer P, Sempowski G. Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell surface molecules involved in cellular adhesion and activation. *ClinImmunol* 2002;104(2):183-90.
12. Gaspani L, Limiroli E, Ferrario P, Bianchi M. *in vivo* and *in vitro* effects of bromelain on PGE(2) and SP concentrations in the inflammatory exudates in rats. *Pharmacology* 2002; 65(2):83-6.
13. Metzsig C, Grabowska E, Eckert K, Rehse K, Maurer H. Bromelain proteases reduce human platelet aggregation *in vitro*, adhesion to bovine endothelial cells and thrombus formation in rat vessels *in vivo*. *In Vivo* 1999;13(1):7-12.
14. Felton G. Fibrinolytic and antithrombotic action of bromelain may eliminate thrombosis in heart patients. *Med Hypotheses* 1980;6(11):1123-33.
15. Francisco J., Rodríguez M., Ricardo O., Guerrero J., Amador M.C. Plantas medicinales caribeñas con potencialidad para inhibir la agregación de las plaquetas. *Rev. Cubana PlantMed* 2007;12(2).
16. Tutucayo M. Efecto *in vitro* del látex de *Ficus antihelmíntica* (Ojé) sobre la formación del coágulo sanguíneo. Tesis de Bachiller. Arequipa, Perú. Universidad Nacional de San Agustín, 2005. 68 pp.
17. Apechea M.R., Larionova M, Garrido M.J., Sebazco C., Alcorta V., Efecto anticoagulante *in vivo* del extracto acuoso de las hojas de *Ricinuscommunis*. *Rev. Cubana PlantMed* 1998;7(3):135-7.
18. Chen J.H. Chen H.I. Tsai S.J. Jen C.J. Chronic consumption of raw but not boiled Welsh onion juice inhibits rat platelet function. *JNutr* 2000; 130(1): 34-37 - Chen J. H. Chen H. I. Wang J. S. Tsai S. J. Jen C. J. Effects of Welsh onion extracts on human platelet function *in vitro*. *LifeSci* 2000; 66(17): 1571-1579.
19. Ali M., Bordia T., Mustafa T. Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and onion on platelet aggregation. *ProstaglandinsLeukotEssentFattyAcids* 1999; 60(1): 43-47.
20. Apechea M, Fano R, Garrido M. Efecto *in vitro* de un extracto acuoso de las hojas de *Ricinuscommunis* sobre la formación del coágulo sanguíneo. *Rev. Cubana PlantMed* 1998;3(2):62-63.



21. Fernández M. *Chenopodium murale* L. como anticoagulante in vitro y su utilización en hemogramas. Tesis de Bachiller. Arequipa, Perú. Universidad Nacional de San Agustín, 1998. 69 pp.
22. Pierola R. *Chenopodium pertiolare* HBK (Hípica) como anticoagulante in vitro y su utilización en hemogramas. Tesis de Bachiller. Arequipa, Perú. Universidad Nacional de San Agustín, 1995. 65 pp.
23. Sanz J. *Chenopodium ambrosoides* (paico) como alternativa anticoagulante in vitro. Tesis de bachiller. Arequipa, Perú: Universidad Nacional de San Agustín, 1993. 74 pp.
24. Quick A.J., "Fisiopatología y Patología de la Hemostasis". Edit. El Ateneo, Buenos Aires, 1992. 224 pp.
25. Friedman k, Rodgers G. (2004). Inherited coagulation disorders. In: Wintrobe's clinical hematology, Greer J, Foerster J, Luken J (eds). 11 ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA. pp 1619-1712.
26. Tortora G., Anagnostatus N., Fisiología Humana. Editorial McGraw Hill. VII Ed. México D.F. 2009.
27. Castillo R, Maragall S, Monteagudo J. (2001). Hipocoagulabilidades congénitas. Hemofilia, enfermedad de Von Willebrand y procesos afines. En: Hematología clínica, Sans-Sabrafen, Raebel C, Corrons J (eds), 4ed, Elsevier Science, España. pp 640-658.
28. Lannoy N, Hermans C. The royal disease-haemophilia A or B. A haematological mystery is finally solved. Haemophilia. 2010 Nov;16(6):843-7. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02327.
29. Biggs R, Douglas AS, Mac Farlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey. Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. Br Med J. 1952 Dec 27;2(4799):1378-82.
30. Castillo R, Ordinas A, Reverter JC, Vicente V, Rocha E. Enfermedades de la hemostasia. En: Rozman, ed. Tratado de Medicina Interna. Doyma, 1998; 1.770-1.804.

31. Santagostino E, Mannucci PM (for the Italian Association of HaemophiliaCentres) and Bianchi Bonomi A. Guidelines on replacement therapy for haemophilia and inherited coagulation disorders in Italy. *Haemophilia* 2000; 6: 1-10.
32. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999; 341: 586-592.
33. Pavlovsky A. Contribution to the pathogenesis of hemophilia. *Blood*. 1947 Mar;2(2):185-91.
34. Mannucci PM. Ham-Wasserman Lecture: hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology Am SocHematolEducProgram*. 2002:1-9. PMID: 12446416.
35. Suñer Cadevall, F. "Nuevas normas internacionales para la expresión del tiempo de Quick". *Análisis Clínicos X*. 40:240-245 ()1985.
36. Young, D.S.. "Effects Of Drugs On Clinical Laboratory Test". AACC Press, 4ª Edición, 2001.
37. Sociedad española de enfermedades infecciosas. Técnicas de obtención, conservación y transporte de muestras para estudio: Pruebas para el diagnóstico y seguimiento de alteraciones de la hemostasia. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.editorialcep.com/oposicionessanitarias/avs/temasmuestra/05%20tema%20laboratoio.pdf>. Consultado: 10 de julio de 2012.
38. Giraldo J, Rojas J, Huamaní L, Espinoza S. & Girio Z. 2006. Efecto antihelmíntico de *Ficus antihelmíntica* Mart (Ojé) (Moraceae) y *Cyclantherapedata* (L.) Schrad (Caigua) (Cucurbitaceae) sobre *Hymenolepisnana* (Siebold, 1852) (Cestoda: Hymenolepididae). *Biologist (Lima)*. 4: 1-2.
39. Villar Martha. Programa de Enfermedades Crónicas y No Transmisibles. ESSALUD, 2005, 2009, 2010.
40. López-C R, Navarro-L. J, Montero-G. M, Amaya-V. K, Rodríguez-C. M. Manual de identificación de especies no maderables del corregimiento de Tarapacá, Colombia. 2006.
41. Hansson A, Zelada J.C. & Noriega H. 2005. Reevaluation of risk with use of *Ficus insipid* látex as a traditional anthelmintic remedy in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 98: 251-257.

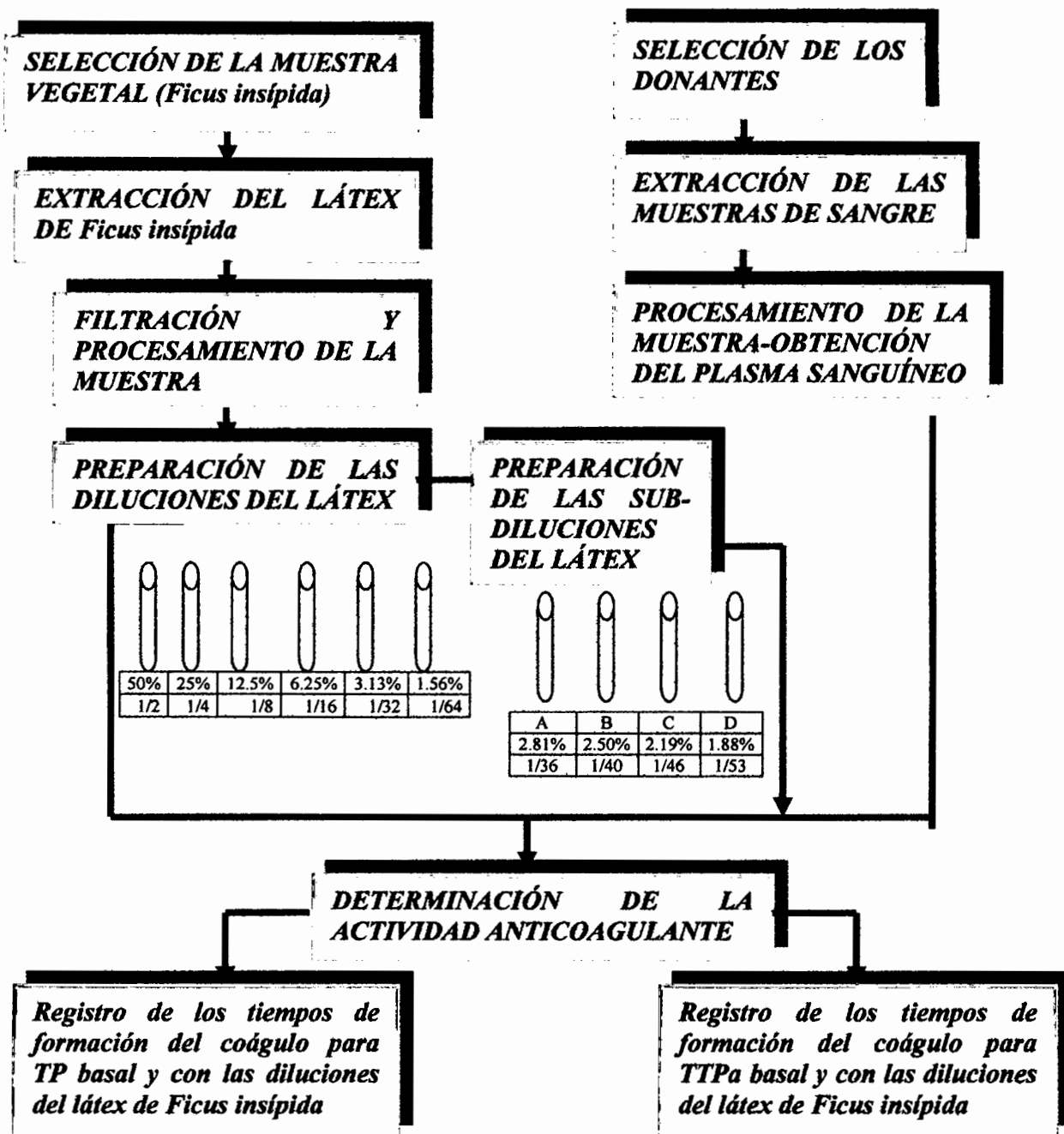
42. Araldi, H.T., *et al.* "Primer reactivo argentino de referencia de tromboplastina de Tromboplastina de cerebro humano." *Acta Bioquímica Clínica. Latinoamérica.* 1:81 (1997).
43. Cárdenas W, Cabieses F. *Plantas antiparasitarias intestinales.* Lima: Instituto de Medicina Tradicional; 1999.pág.10.
44. Ministerio de Salud (MINS), Instituto Nacional de Salud (INS). *Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología. Serie de normas técnicas N° 40.* Lima, 2005. 88 p.: 15 cm.
45. Fernando Concha-Benavente. Efecto in vitro del látex de *Ficus insípida* sobre lacascada de la coagulación sanguínea. *Rev. MedHered* 21, 2010.
46. Ruiz-Bedolla E., López B., Dionisio-Abraján I. Evaluación del tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial en sangre total. Laboratorio Clínico del Hospital Infantil de México, «Federico Gómez». *Rev. Mexicana de Patología Clínica, Vol. 54, Núm. 3, pp 136-143 • Julio - Septiembre, 2007.*
47. Comité de expertos de la OMS en Patrones Biológicos. Informe N° 31. Requerimiento para Tromboplastinas y Plasmas usados en la Terapia anticoagulante. *Serv. Inf. Téc. N° 658:202-223 (1981).*
48. Comité de expertos de la OMS en Patrones Biológicos. Informe N° 28. Normalización de la terapia de tratamiento anticoagulante. *Serv. Inf. Téc. N° 610:49-56 (1977).*
49. Dacie, J.B.; Lewis, S.M. *Hematología Práctica.* Ediciones Toray, Segunda Edición (1970).
50. Wintrobe, M. *Hematología Clínica 3ª Edición intermédica (1969).*
51. Ypung, D.S. "Effects pf Drugs on Clinical Laboratory Test". AACC Press. CuartaEdición (2001).
52. Robbins B, Lamson P. Further studies on the proteolytic enzyme content of latex from the fig and related trees. *J BiolChem* 1934;106(2):725-27.
53. Jones I, Glazer A. Comparative studies of four Sulfhydryl Endopeptidases ("Ficins") of *Ficusglabrata* Latex. *J BiolChem* 1970; 245(11):2765-72. 25.

54. Williams D, Whitaker J. Multiple molecular forms of FicusglabrataFicin. Their separation and RelativePhysical, Chemical, and Enzymatic Properties. *PlantPhysiol* 1969;44:1574-83.
55. Kelly G. Bromelain: A literature review and discussion of its therapeutic applications. *Altern Med Rev*1996;1(4):243-57.

## 6. ANEXOS

### **GRÁFICOS, ESQUEMAS Y FIGURAS**

**ANEXON°01: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE DATOS.**



**ANEXO 02: FICHA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS  
DONANTES**

**FICHA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Por la presente afirmo haber obtenido la información adecuada sobre la posibilidad de participar como donante de sangre para el anteproyecto **“ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE *IN-VITRO* DEL LÁTEX DE *Ficus insípida* (Willd.) “OJÉ” SOBRE LA CASCADA DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA – C.S. SAN JUAN 2012”**,y doy mi autorización al personal investigador para los fines correspondientes en la realización del presente proyecto, así mismo; pueda realizarme la entrevista correspondiente, manteniendo la confidencialidad absoluta de los datos consignados en el cuestionario adjunto a este documento. Por lo que doy mi consentimiento y autorizo voluntariamente a participar en este trabajo de investigación y firmo el presente documento.

La presente investigación ayudará a determinar si el látex de *Ficus insípida* (Ojé) presenta o no actividad anticoagulante sobre la cascada de la coagulación sanguínea y la concentración mínima a la que este producto pueda ejercer esta actividad y de este modo contribuir como una alternativa terapéutica segura en la búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de las coagulopatías, por lo que es importante la realización de este trabajo de investigación en el C.S. San Juan, durante los meses de julio a diciembre del 2012.

NOMBRES: \_\_\_\_\_

-----  
N° DNI:



**ANEXO 03:FICHA DE ENCUESTA PERSONAL PARA LOS DONANTES**

**FICHA DE ENCUESTA PARA SELECCIÓN DE DONANTES**

FICHA N°: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

**DATOS PERSONALES:**

NOMBRES: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_

***LEER CUIDADOSAMENTE CADA PREGUNTA Y RESPONDER  
MARCANDO CON UN ASPA:***

**A. Padece Ud. de alguna enfermedad?**

SI  NO

- De qué enfermedad padece (especifique):  
-----

- Ha recibido tratamiento farmacológico para esa enfermedad?

SI  NO

- Que medicamentos ha recibido para su tratamiento (especifique):  
-----

**B. En caso de ser de sexo femenino responda la pregunta:**

- **Recibe Ud. terapia con anticonceptivos orales?**

SI  NO

- Cuanto tiempo lleva recibiendo esta terapia:  
-----

**C. Ha recibido terapia medicamentosa en los últimos tres meses?**

SI  NO

- Qué tipo de medicamentos (especifique):  
-----



**D. Actualmente está recibiendo terapia con algún medicamento?**

SI  NO

- Qué medicamentos consume (especifique):

-----

**E. Tiene Ud. algún familiar que padezca de enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión o similar) o algún trastorno de la coagulación?**

SI  NO

- Si su respuesta es "SI", especifique de que enfermedad o problema de coagulación padece su familiar:

-----

**ANEXO 04:**

**A. Tarjeta de Recolección de datos para los tiempos de coagulación (TTPa)**

**Donante** : \_\_\_\_\_

**Edad** : \_\_\_\_\_ **Sexo** : \_\_\_\_\_

**Fecha de registro** : \_\_\_\_\_

Nº TUBO	TIEMPO DE COAGULACIÓN EN SEGUNDOS			
	t1	t2	t3	promedio)
01*				
02**				
03***				
04 <sup>(+)</sup>				
05 <sup>(+)</sup>				
06 <sup>(+)</sup>				
07 <sup>(+)</sup>				
08 <sup>(+)</sup>				
A <sup>(++)</sup>				
B <sup>(++)</sup>				
C <sup>(++)</sup>				
D <sup>(++)</sup>				
09 <sup>(+)</sup>				

\* Tubo control.

\*\* Tubo blanco para las diluciones del látex.

\*\*\* Tubo con látex puro.

(+) Diluciones en serie del látex.

(++) Sub-diluciones del látex.

**ANEXO 05:**

**B. Tarjeta de Recolección de datos para los tiempos de coagulación (TP)**

**Donante** : \_\_\_\_\_

**Edad** : \_\_\_\_\_ **Sexo** : \_\_\_\_\_

**Fecha de registro** : \_\_\_\_\_

N° TUBO	TIEMPO DE COAGULACIÓN EN SEGUNDOS			
	t1	t2	t3	promedio)
01*				
02**				
03***				
04 <sup>(+)</sup>				
05 <sup>(+)</sup>				
06 <sup>(+)</sup>				
07 <sup>(+)</sup>				
08 <sup>(+)</sup>				
A <sup>(++)</sup>				
B <sup>(++)</sup>				
C <sup>(++)</sup>				
D <sup>(++)</sup>				
09 <sup>(+)</sup>				

- \* **Tubo control.**
- \*\* **Tubo blanco para las diluciones del látex.**
- \*\*\* **Tubo con látex puro.**
- (+) **Diluciones en serie del látex.**
- (++) **Sub-diluciones del látex.**

**ANEXO 06: PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE TTPA  
(INSERTO- LABORATORIOS WIENER LAB.)**

# APTTtest

**Reactivo para la determinación del tiempo de Tromboplastina Parcial Activada. WienerLab.**

## **SIGNIFICANCIA CLÍNICA**

El tiempo de Tromboplastina parcial activada, es una prueba sensible a la deficiencia de factores procoagulantes del plasma así como a la presencia de ciertos inhibidores de la coagulación.

Sirve para detectar anomalías en la vía intrínseca de la coagulación, como son los factores necesarios para la formación del activador intrínseco de la protrombina, o sea los factores VIII, IX, XI y XII; también detecta deficiencias severas de los factores II, V, X y fibrinógeno. La rapidez y sencillez de la prueba la hacen adecuada para el control de la terapéutica anticoagulante.

## **FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

El ensayo se basa en la medida del tiempo que tarda en coagular un plasma descalcificado, colocado en un baño a 37°C y en presencia de un exceso de cefalina, activador y calcio.

## **REACTIVOS PROVISTOS**

- A. **Reactivo A:** viales conteniendo cefalina con tierra de diatomeas como activador particulado.  
B. **Reactivo B:** solución de cloruro de calcio 0,025mol/l.

## **REACTIVOS NO PROVISTOS**

Agua bidestilada o desionizada.

## **INSTRUCCIONES PARA SU USO**

**Reactivo A,** preparación:

- Abrir un vial quitando el precinto metálico y retirando lentamente el tapón de goma para evitar pérdidas de material.
- Agregar el volumen de agua bidestilada indicado en el envase.
- Verificar que la temperatura del agua no sea mayor a 37°C.
- Tapar y agitar suavemente hasta obtener una suspensión homogénea. Volver a homogeneizar cada vez que se emplee.

**Reactivo B:** Listo para usar.

## **MUESTRA**

Plasma.

- a) **Recolección.** Obtener sangre cuidadosamente (evitando estasis o traumas) y colocar en un tubo con anticoagulante en proporción 9+1 exacta (ejemplo: 4,5 ml de sangre + 0,5 de coagulante TP de Wiener lab.) Mezclar suavemente, centrifugar a 2500 g y separar el plasma antes de los 30 minutos. Es recomendable efectuar la extracción con jeringas plásticas.
- b) **Aditivos:** Para obtener el plasma debe emplearse anticoagulante TP de Wiener lab. o citrato de sodio 0,130 mol/L.
- c) **Sustancias interferentes conocidas:**
- Las contaminaciones visibles o no, son causa de tiempos falsamente prolongados.
  - No debe emplearse EDTA o heparina para obtener plasma.

- Hemólisis visible dificulta la medición foto-óptica de los resultados.
  - d) **Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** El plasma debe mantenerse en refrigerador hasta el momento de efectuar la prueba. Este periodo no debe prolongarse más de 4 horas. En caso de no poder procesarse en este lapso, el plasma debe congelarse a -20 °C. Este procedimiento al igual que el descongelado debe realizarse con rapidez (Sumergiendo en Baño a 37°C) previo a la determinación.
- La muestra debe conservarse hasta el momento de sus análisis en tubo plásticos para minimizar los efectos de activación por contacto que pueden ocurrir con los tubos de vidrio.

#### **MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO**

- Tubos de hemólisis
- Pipetas y micropipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- Baño de agua a 37 °C
- Cronómetro
- Fuente luminosa, para la observación del coágulo.

<b>PROCEDIMIENTO</b>	
Precalentar el cloruro de calcio antes de realizar la prueba en baño de agua a 37 °C	
En un tubo de hemólisis colocar:	
Muestra (plasma desconocido o control)	100 µl
Reactivo APTT (Homogeneizado)	100 µl
Mezclar e incubar 3 minutos a 37 °C, luego agregar:	
Reactivo B (Cloruro de calcio) a 37°C	100 µl
Disparar simultáneamente un cronómetro. Agitar brevemente para homogeneizar el contenido, mantener en el baño unos 25 segundos, luego sacar el tubo e inclinar suavemente una vez por segundo y detener el cronómetro en el momento de la formación del coágulo. Tomar nota del tiempo de coágulo	

#### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Los resultados pueden expresarse de distintas formas:

- 1) Como tiempo de tromboplastina parcial activada en segundos.
- 2) Como relación entre el tiempo obtenido con el desconocido y el de un plasma control.

#### **METODO DE CONTROL DE CALIDAD**

Pool de plasmas frescos normales.

#### **VALORES DE REFERENCIA**

El intervalo de valores observados en individuos normales oscila entre 33-48 segundos. Se considera fuera de lo normal valores que difieran en más de 6 segundos de un plasma control. Para técnicas manuales los valores oscilan entre 27.3-41 segundos. Es recomendable que cada laboratorio procese un plasma control con cada lote de reactivos empleado y que correlacione los valores obtenidos para los pacientes con el de dicho plasma, haciendo constar estos resultados en el informe.

**ANEXO 07: PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE TP  
(INSERTO - LABORATORIOS WIENERLAB.)**

# Soluplastin TP

**Tromboplastina cálcica para la determinación del tiempo de  
Protrombina en una etapa. Wiener Lab.**

## **SIGNIFICACION CLINICA**

El fenómeno de la coagulación puede desencadenarse por una "vía extrínseca" (lesión tisular) o por una "vía intrínseca" (contacto de la sangre con epitelios distintos del vascular normal). La determinación del tiempo de protrombina o tiempo de Quick es una prueba global para evaluar la coagulación extrínseca, siendo sensible a: factor II o protrombina, Factor V o proacelerina, factor VII o proconvertina y factor X o Stuart-power.

Por lo tanto la determinación se aplica a:

- estudios en rutina en los análisis prequirúrgicos.
- detección de alteraciones en los niveles de uno o más factores involucrados en la vía extrínseca.
- Control de la terapéutica con anticoagulantes orales.

## **FUNDAMENTOS DEL METODO**

Este ensayo se basa en la medida del tiempo que tarda en coagular un plasma descalcificado, colocado a 37°C y en presencia de un exceso de tromboplastina tisular y calcio.

El método no detecta deficiencia de factores de la vía intrínseca (VIII, XI, XII).

## **REACTIVO PROVISTO**

A. Reactivo A. viales conteniendo tromboplastina de cerebro de conejo, cloruro de calcio para una concentración final de 0,0125 mol/l y cloruro de sodio para una concentración final de 0,1 mol/l.

## **REACTIVO NO PROVISTO**

Agua bidestilada o desionizada.

## **INSTRUCCIONES PARA SU USO**

- Abrir un vial quitando el precinto metálico y retirando lentamente el tapon de goma para evitar pérdidas del material.
- Agregar el volumen de agua bidestilada o desionizado indicado en el envase. Verificar que la temperatura del agua empleada no sea mayor a 37°C.

-Tapar y agitar suavemente hasta obtener una suspensión homogénea. Volver a homogeneizar cada vez que se emplee.

### **PRECAUCIONES**

El reactivo es para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

### **ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO**

Reactivo A: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Reactivo A reconstituido: en refrigerador (2-10°C), es estable 5 días a partir del momento de su reconstitución.

### **MUESTRA**

Plasma

a) **Recolección:** Obtener sangre cuidadosamente (evitando estasis o trauma) y colocar en un tubo con anticoagulante en proporción 9+1 exacta (ejemplo: 4,5 ml de sangre + 0,5 ml de anticoagulante). Si se emplea Anticoagulante TP de Wiener lab., se requerirán 7 gotas para 4.5 ml de sangre). Mezclar suavemente. Centrifugar y separar el plasma antes de los 30 minutos.

b) **Aditivos:** para obtener el plasma se debe emplear Anticoagulante TP de Wiener lab. O citrato de sodio 130 mmol/l (3.8%) o 109mmol/l (3.2%).

c) **Sustancias interferentes conocidas:**

- Las contaminaciones, visibles o no, son causa de tiempos falsamente prolongados;
- La presencia de heparina o EDTA invalida los resultados;
- Hemolisis visibles dificultan la medición foto-óptica de los resultados.

d) **Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** el plasma debe mantenerse en el refrigerador (2-10°C) hasta el momento de efectuar el ensayo. En caso de no procesarse dentro de las 4 horas contadas desde la obtención, la muestra se debe congelar (a -20°C); de tal forma, puede conservarse durante un me. Este último procedimiento debe ser realizado con rapidez, al igual que el descongelamiento (sumergiendo en baño a 37°C) previo a la determinación.

### **MATERIAL REQUERIDO (no provisto)**

- tubos de hemolisis.
- pipetas y micropipetas para medir los volúmenes indicados.
- baño de agua a 37°C.
- Cronómetro.
- Fuente luminosa para la observación del coagulo.

**PROCEDIMIENTO**

1. Colocar el plasma (desconocido o control) en baño de agua a 37°C durante 2-3 minutos (no más de 10 minutos).
2. En tubo de hemolisis, colocar 0,2ml de Reactivo A reconstituido y preincubar a 37°C durante 2-3 minutos (no más de 10 minutos).
3. Pipetear 100ul de plasma preincubado y agregar rápidamente al tubo conteniendo 0,2 ml de Reactivo A, disparando simultáneamente el cronometro.
4. Mantener el tubo dentro del baño y cerca de una fuente de luz. Previo al tiempo estimado de coagulación, sacar el tubo de baño, inclinar suavemente una o dos veces por segundo y detener el cronometro en el momento de la aparición del coagulo.
5. Calcular el tiempo promedio de coagulación de la determinación por duplicado para cada plasma (desconocido o control). Si la diferencia entre los replicados de una misma muestra es mayor del 5% se aconseja repetir el procedimiento desechando los valores anteriores.

En caso de emplear un instrumento de medición, deben seguirse las instrucciones del fabricante del mismo.

**VALORES DE REFERENCIA**

El rango de valores obtenidos en pacientes normales oscila entre:

- Tiempo de protrombina o tiempo de Quick: 10-14 segundos.
- Porcentaje de actividad protrombínica: 70 – 100%



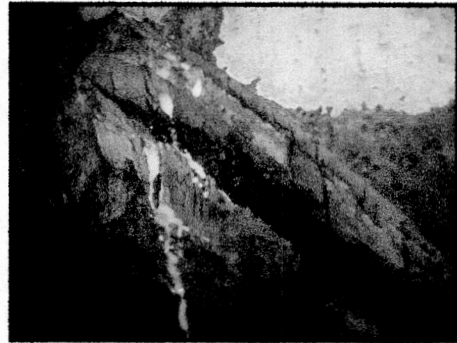
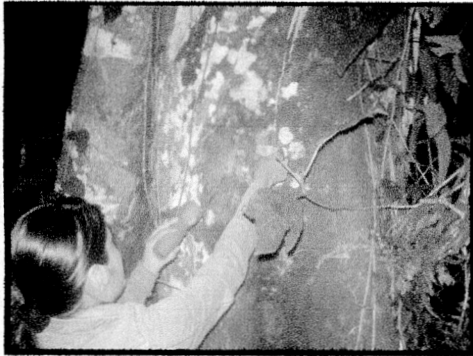
ANEXO N° 08:



**Arbol de *Ficus insípida* W. Ojé**

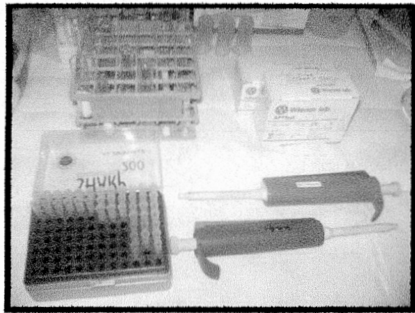
ANEXO N°09:

Extracción y recolección del látex de *Ficus insípida* W.



ANEXO N°10: Preparación de la mesa y los materiales de trabajo.





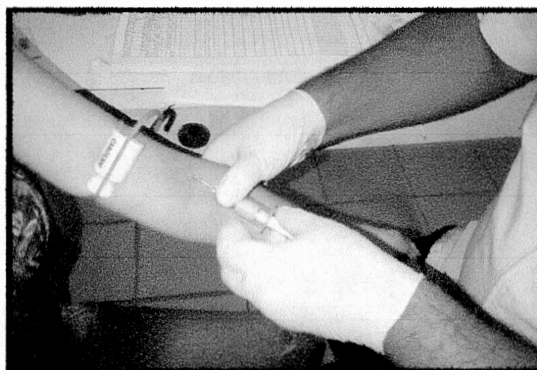
**ANEXO N°11:** Filtración y procesamiento de la muestra vegetal.

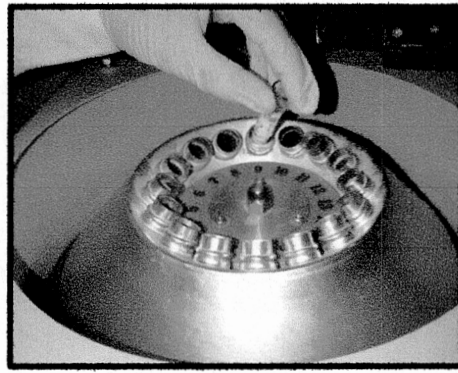


**ANEXO N°12:** Preparación de los reactivos de TP y TTPa

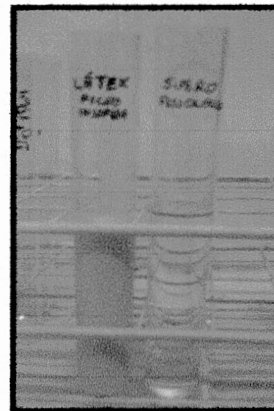
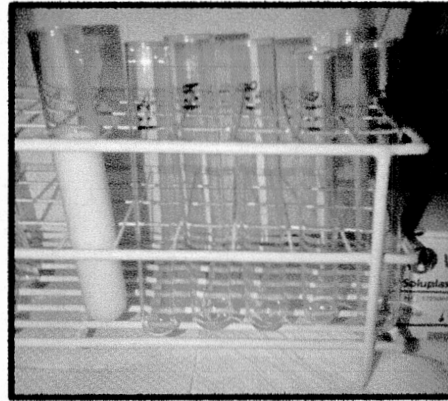
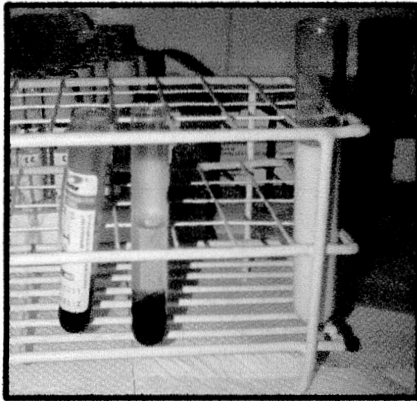


**ANEXO N°13:** Extracción y procesamiento de muestras sanguíneas de los donantes voluntarios.

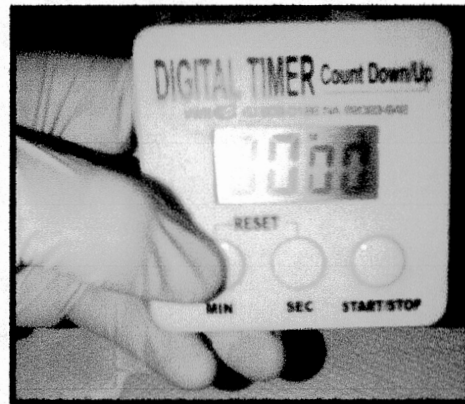




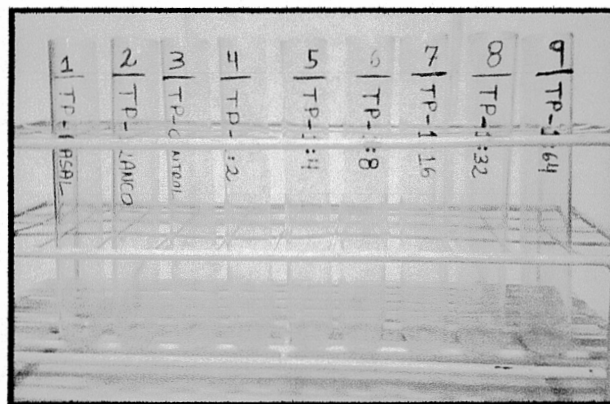
**ANEXO N°14:** Obtención del plasma y preparación de las diluciones del látex.

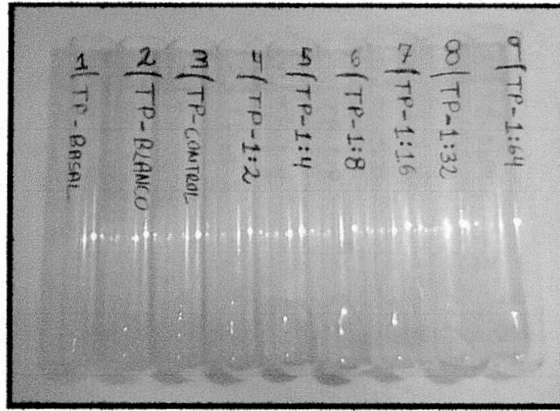


**ANEXO N°15: Determinaciones y registro de los tiempos de coagulación de TP y TTPa.**

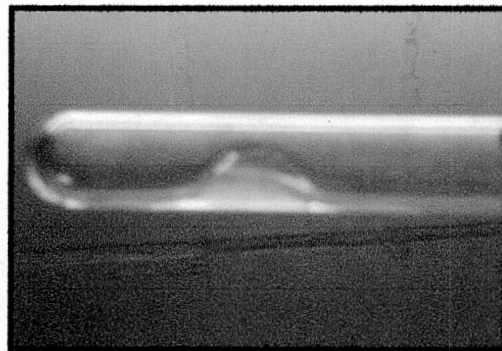
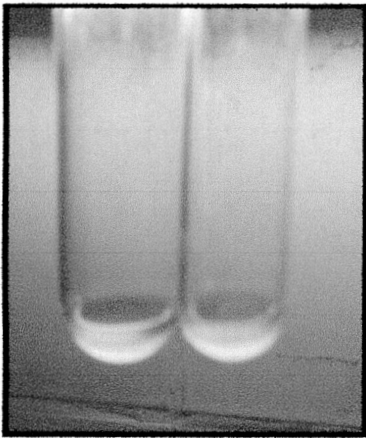


**ANEXO N°16: Formación de los coágulos en las pruebas de TP y TTPa en las diluciones y sub-diluciones del látex de *Ficus insípida*.**

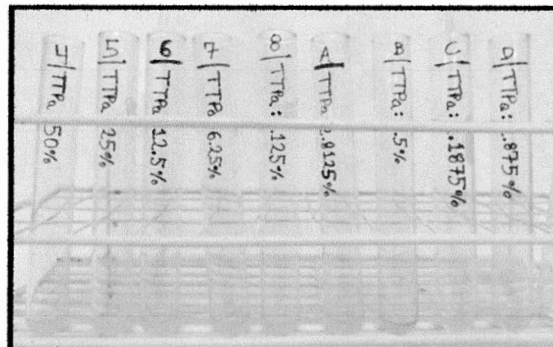


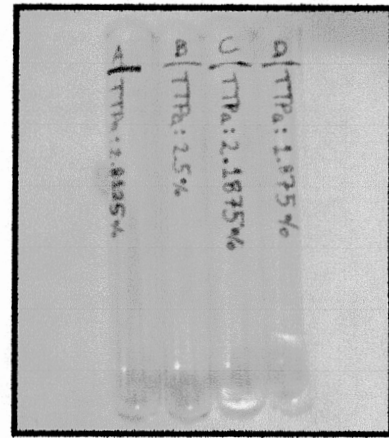
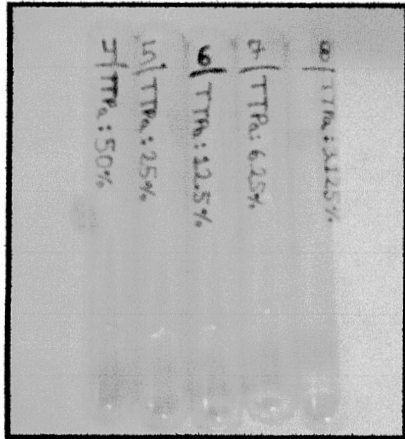


**FORMACIÓN DE COÁGULOS EN EL TP A DIFERENTES DILUCIONES**



**FORMACIÓN DE COÁGULOS EN EL TP A DIFERENTES DILUCIONES**





**DILUCIONES DEL LÁTEX EN EL TTPa SUB-DILUCIONES DEL LÁTEX EN EL TTPa**

