

24/87



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Quimica

DETERMINACION DE PRODUCTOS DE DEGRADACION
DEL FIBRINOGENO EN PACIENTES TOXEMICAS E
INFECTADAS

T E S I S

Que para optar por el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

ALICIA MOYA RIZO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

CAPITULO I

GENERALIDADES.

A.- RESUMEN SOBRE COAGULACION.....	4
B.- COAGULACION INTRAVASCULAR.....	10
C.- FIBRINOLISIS.....	12
D.- IMPORTANCIA CLINICA DE LA DETERMINACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA - FIBRINA-FIBRINOGENO.....	20
E.- TECNICAS EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICA - CION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA FIBRINOGENO.....	23

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS.

METODO DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
DESCRIPCION DEL EQUIPO.....	31
MATERIAL DE LABORATORIO Y PREPARACION DE REACTIVOS.....	31
PREPARACION DE LAS PLACAS.....	32
METODO.....	33
INTERPRETACION.....	34

METODO DE OUCHTERLONY.

MATERIAL DE LABORATORIO.....	35
DESCRIPCION DEL EQUIPO.....	35
MATERIAL DE LABORATORIO Y PREPARACION DE REACTIVOS.....	35

PREPARACION DE LAS PLACAS.....	36
METODO.....	36
INTERPRETACION.....	37
CAPITULO III.	
RESULTADOS.	
TABLAS DE RESULTADOS.....	38
CAPITULO IV.	
DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	44
CAPITULO V.	
RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	46
CAPITULO VI.	
BIBLIOGRAFIA.....	47

INTRODUCCION

Desde hace algunos años ha surgido un interés notable por la presencia, la química y las propiedades de los productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina, ya que estos se encuentran en varias enfermedades (1).

Estos productos son un grupo heterogéneo de polipéptidos con características fisicoquímicas y actividades biológicas diferentes. Tales productos son el resultado de la acción de la plasmina sobre el fibrinógeno y la fibrina.

La existencia de estos productos fue demostrada primeramente por Garner en 1934 (2). Tales productos aparecen en la sangre en enfermedades asociadas con fibrinólisis sistemática, coagulación intravascular con fibrinólisis secundaria o depósitos locales de fibrina con fibrinólisis secundaria.

Recientemente se ha encontrado que estos productos aparecen en cantidades pequeñas durante el embarazo normal y en cantidades mayores en las complicaciones del embarazo como la toxemia y la eclampsia.

En 1964 McKay y Corey (3) sugirieron que la coagulación intravascular es responsable de muchas de las manifestaciones de la toxemia y la eclampsia.

La coagulación intravascular diseminada se caracteriza por el consumo de las plaquetas, del fibrinógeno y de los factores V y VIII de la coagulación, además se presenta un incremento de los niveles de los productos de degradación del fibrinógeno en el suero, que son el resulta

do de la fibrinólisis compensatoria (4).

Ya en 1947 Schneider (5) había encontrado una relación causal entre la coagulación intravascular y la pre-eclampsia, sin embargo el primer reporte convincente fue dado por Bonnar y Cols. en 1969 en un caso de eclampsia (6).

En 1971 tres grupos de investigadores hicieron estudios sobre esta relación, midiendo las plaquetas, los productos de degradación del fibrinógeno, la actividad fibrinolítica y el plasminógeno en sangre. Todos estuvieron de acuerdo en que había una reducción frecuente en la cuenta de las plaquetas y una elevación de los niveles de estos productos en el suero de las pacientes con toxemia o eclampsia (7).

Recientemente se ha incrementado el interés por medir los niveles de estos productos en suero y orina ya que pueden servir como ayuda en el diagnóstico de fibrinólisis primaria y secundaria.

El nivel de dichos productos en el suero se puede medir usando alguna de las siguientes técnicas: Por inmunodifusión, por pruebas de precipitación, o de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos frente al fibrinógeno, por inhibición de la hemaglutinación pasiva, por aglutinación con *Staphylococcus* o por un método inmunológico creado por Miléhn (8).

Todas estas técnicas tienen sus ventajas y desventajas ya que algunas son sensibles pero tediosas; otras son relativamente simples de realizar y consumen poco tiempo, pero tienen poca sensibilidad, algunas requieren de la --

preparación de reactivos especiales para lo cual se necesita una experiencia considerable.

El propósito de este trabajo fue medir los niveles sanguíneos de estos productos en mujeres con diagnóstico de toxemia moderada, toxemia sévera o eclampsia y relacionarlos con la severidad de la enfermedad, además ver la posibilidad de usar una de las técnicas empleadas en este trabajo como método de rutina en el laboratorio para detectar dichos productos, no solamente en complicaciones del embarazo sino también en otras enfermedades donde se presentan estos productos.

Las técnicas usadas en este trabajo fueron la doble difusión de Ouchterlony y la contraimmunoelectroforesis, empleando en esta técnica un sistema amortiguador discontinuo.

Ambas pruebas tienen la característica de que el anticuerpo y el antígeno se van a difundir en la agarosa, pero en la segunda técnica se acelera la inmunodifusión usando una corriente eléctrica y un sistema de amortiguadores con diferentes valores de pH.

CAPITULO I.

GENERALIDADES.

A.- COAGULACION SANGUINEA.

La coagulación sanguínea ha sido considerada por algunos autores como un proceso enzimático, en el cual los factores de ésta, que existen en el plasma como precursores inertes, son transformados a enzimas cuando se activan.

De este modo cada factor de la coagulación actúa -- primero como un sustrato y después como una enzima.

Este concepto fue dado por MacFarlane (9) y por Davis y Ratnoff (10) dándole el nombre de "CASCADA" y define a la coagulación como una serie de reacciones en cadena que divide en tres fases: La vía o sistema intrínseco, la vía o sistema extrínseco y la vía "común" que conducen a la formación de la fibrina.

La coagulación sanguínea forma parte del mecanismo de la hemostasis, el cual se inicia desde que hay una lesión en los vasos sanguíneos, ya que hay aquí una adhesión de las plaquetas a las estructuras subendoteliales de la colágena. El contacto con la colágena produce además una reacción de liberación del contenido de las plaquetas, entre el que se encuentra el adenosín difosfato (ADP).

El ADP inicia la agregación de las plaquetas en el sitio de la lesión y la liberación adicional de ADP que --

ayuda al desarrollo del agregado de plaquetas.

Estos agregados plaquetarios llamados tapones hemostáticos primarios, pueden desintegrarse y ser arrastrados por la corriente sanguínea si no son estabilizados. La estabilización la lleva a cabo la trombina, la que actúa directamente sobre las plaquetas produciendo disgregación, desgarre de la membrana y una agregación más firme. También la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina, con depósitos de ésta en el interior de los agregados de plaquetas.

Normalmente la trombina no se encuentra en la circulación, sino que es generada a partir de su precursor inerte en el plasma, la protrombina en condiciones que favorecen la coagulación (11). La trombina se puede generar a través de dos vías, la vía intrínseca y la vía extrínseca de la coagulación, ambas necesarias para una hemostasis normal.

La vía intrínseca se inicia con la activación del factor XII (reacción 1) la cual no requiere de iones calcio, la activación se inicia in vitro con una variedad de superficies electronegativas (12) como el vidrio, el caolín, etc. In vivo la activación se inicia probablemente por el contacto del factor XII con la colágena (13) o piel dañada, ácidos grasos, homocisteína y posiblemente fibrina y elastina (14). El factor XIIa (XII activado) funciona como una enzima en la activación del factor XI (15), (reacción 2), esta reacción no requiere de iones calcio, el producto de esta reacción que es el factor XIa activa el factor IX en presencia de calcio, aún este fac

tor actúa como sustrato, (reacción 3) (16).

El siguiente paso (reacción 4) es la interacción entre el factor IXa, el factor VIII y el factor plaquetario-3 (17) el cual puede ser acelerado por la acción de trazas de trombina sobre el factor VIII (reacción 13), el resultado de esta reacción es un complejo que es capaz de activar al factor X (18).

En la vía extrínseca solamente participan el factor tisular o tromboplastina y el factor VII, para la interacción de estos factores se requiere de iones calcio y se forma un complejo (reacción 5) que se comporta como una enzima (19), la cual va a activar al factor X.

Se puede observar que la diferencia entre estas dos vías es la forma por medio de la cual dan origen a un activador del factor X.

La vía común de la coagulación se inicia con la activación del factor X, la que requiere de iones calcio (reacción 6). El factor Xa en presencia del factor V, iones calcio y de un fosfolípido (reacción 7), conduce a la activación de la protrombina. En esta reacción se forma un complejo proteína-fosfolípido llamado protrombinasa (20) de la misma manera que se forma un complejo entre el factor IXa, el factor VIII y el factor plaquetario-3 en la vía intrínseca. La reacción en la que se forma la protrombinasa es acelerada cuando se le agregan trazas de trombina (reacción 13), ya que esta actúa sobre el factor V dando como resultado una forma más activa de este factor.

Este complejo actúa como una enzima que cataliza la

conversión de la protrombina a trombina (21) (reacción 8), la cual requiere de iones calcio. La trombina es una enzima proteolítica la cual ataca al fibrinógeno y lo transforma en monómeros de fibrina, esta es la última fase de la coagulación la cual se lleva a cabo en tres pasos distintos (22) que son: El paso enzimático, el paso de la polimerización y el paso de la estabilización.

En el paso enzimático la trombina actúa sobre el fibrinógeno y libera dos fibrinopéptidos A, dos fibrinopéptidos B y un monómero de fibrina por mol de fibrinógeno, este paso (reacción 9) sucede normalmente en ausencia de iones calcio (23).

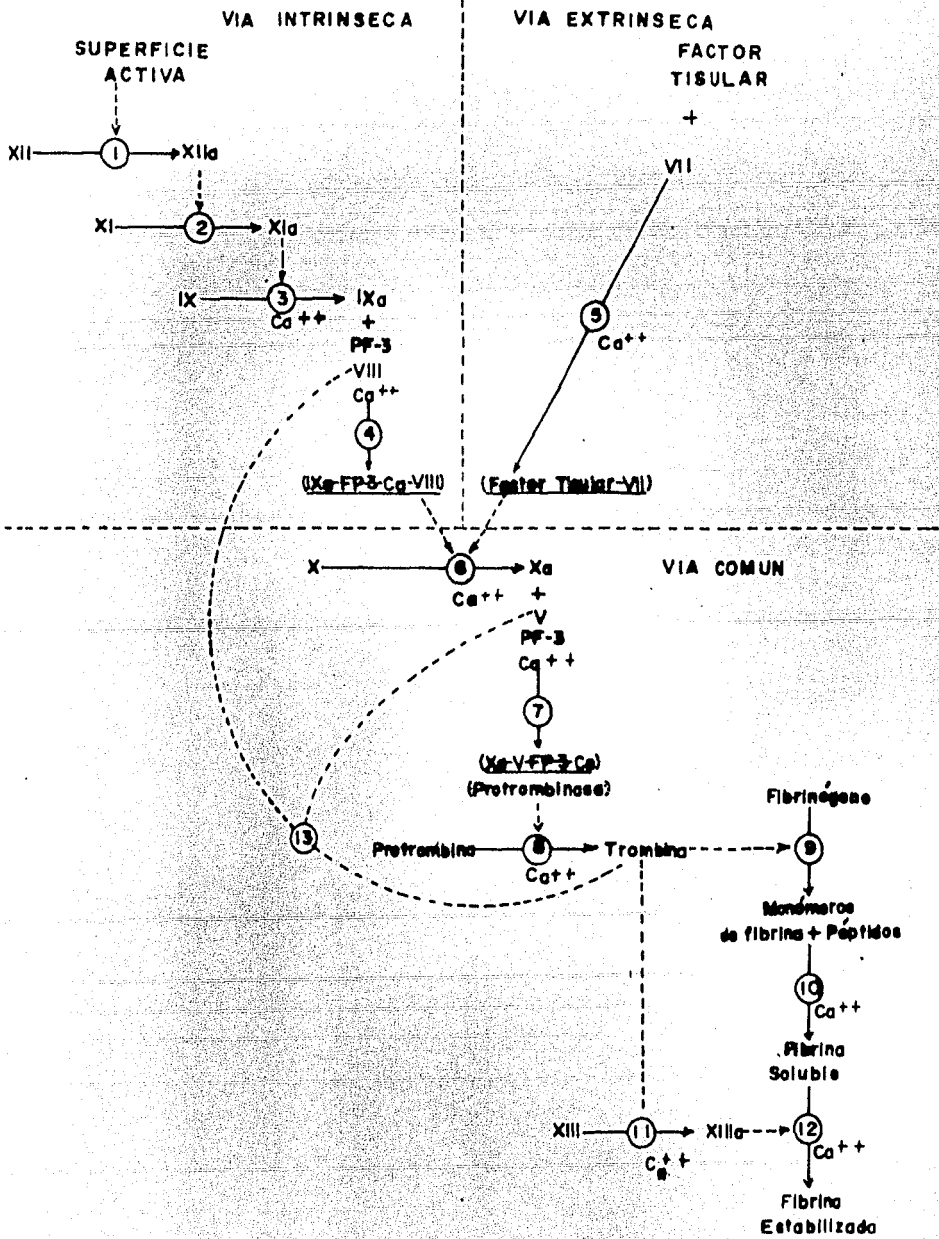
En el paso de la polimerización el monómero de fibrina que resulta, posee una carga negativa reducida debido a la pérdida de los péptidos, lo que permite que estas moléculas se polimericen mediante enlaces de hidrógeno para formar cordones de fibrina (24).

La polimerización conduce primero a la formación de fibrina soluble, un término que se refiere a la fibrina formada antes de la acción del factor XIII (reacción 10).- Esta fibrina soluble es frágil mecánicamente y fácilmente soluble en urea con una concentración de 5 moles/litro o en ácido monocloroacético al 1% (25).

En el paso de la estabilización, la fibrina soluble es convertida en fibrina insoluble (reacción 12) por el factor XIIIa. El factor XIII es activado por la acción de la trombina (reacción 11) dando como resultado el factor XIIIa que es una transamidasa que forma uniones covalentes entre los grupos épsilon amino de la lisina de una molécula

la de fibrina con los grupos gamma amida de la glutamina - de otra molécula de fibrina (26) dando origen a coágulos - más estables que ya no son solubles en urea o en ácido monocloroacético y que son mecánicamente fuertes y hemostáticamente efectivos.

ESQUEMA DE LA COAGULACION SANGUINEA



B.- COAGULACION INTRAVASCULAR.

La coagulación intravascular diseminada se ha definido como un mecanismo intermediario de enfermedad y abarca más que la simple formación de un trombo (27).

Este es un proceso biológico que comprende muchas sustancias químicas y respuestas fisiológicas y que se debe a la presencia de la trombina en la circulación general. Las acciones de esta enzima proteolítica conducen a la formación de fibrina, al consumo de algunas proteínas específicas del plasma y a la pérdida y agregación irreversible de plaquetas; también se ha asociado con la activación del sistema enzimático fibrinolítico donde hay disolución de fibrina y fibrinógeno y la liberación de productos de degradación de la fibrina dentro del plasma --- (28).

La detección de estos fragmentos provee de un método sensible para el diagnóstico de la coagulación intravascular.

La combinación de los efectos antes mencionados conducen a las siguientes manifestaciones clínicas como son la hemorragia difusa y la formación de trombos de fibrina (29).

La etiología de la coagulación intravascular diseminada se puede clasificar en tres procesos que son:

Lesión a la célula endotelial, la que por exposición a la colágena (30) activa al factor de Hageman y en consecuencia al sistema intrínseco de la coagulación.

Lesión tisular, la cual por liberación de trombo---

plastina tisular y en presencia del factor VII, activa el sistema extrínseco de la coagulación.

Lesión a las plaquetas o a los glóbulos rojos, queda como resultado la liberación de un fosfolípido, que es un componente necesario para la función de los sistemas - intrínseco y extrínseco de la coagulación. Todos estos -- procesos actúan impulsando los mecanismos que liberan --- eventualmente trombina libre dentro de la circulación y - por lo tanto también activan la coagulación de la sangre.

Los procesos antes mencionados se pueden presentar en las siguientes enfermedades (31).

I.- Complicaciones del embarazo como son: Aborto, - muerte fetal intrauterina, embarazo abdominal y eclampsia (32).

II.- En infecciones virales como en: Rubéola, her-- pes o sarampión. En infecciones rickettsiales como en la - fiebre de las montañas Rocallosas (33). Infecciones bacte_rianas como en: Septicemias, particularmente las que se - deben a organismos Gram-negativos. Infecciones por hongos como en histoplasmosis y aspergilosis. Infecciones por -- protozoarios como en la malaria (34) y tripanosomiasis.

III.- Neoplasias; carcinomas de próstata, ovarios y del páncreas.

IV.- Desordenes del sistema hematopoyético. En leu- cemia aguda promielocítica, mieloblástica o linfoblástica agudas. En hemólisis intravascular.

V.- Desordenes vasculares: Hipoxia e hipoperfusión.

VI.- Enfermedades como amiloidosis, anafilaxis, in- solación, púrpura fulminante, síndrome de Cushing o en -- pancreatitis aguda.

C.- FIBRINOLISIS.

La fibrinólisis es el resultado de la conversión de una proenzima inerte del plasma que es el plasminógeno a una enzima proteolítica, la plasmina cuyo papel fisiológico principal es la disolución proteolítica de la fibrina. El fibrinógeno y la plasmina junto con los activadores e inhibidores del proceso forman el sistema fibrinolítico de enzimas.

Se considera que la fibrinólisis es uno de los principales mecanismos con que cuenta el organismo para eliminar la fibrina después de que su función hemostática ha sido terminada (35).

COMPONENTES DE LA FIBRINOLISIS.

El plasminógeno es una beta globulina, de P.M. 89,000, la cual esta compuesta de una cadena simple de polipéptidos (36), se puede encontrar en los tejidos y fluidos del cuerpo, como también en el plasma circulante y tiene una gran afinidad por el fibrinógeno y la fibrina (37).

La plasmina tiene el mismo peso molecular que el plasminógeno y actúa como una endopéptidasa (38). Es capaz de digerir la fibrina, fibrinógeno, el factor V y el factor VIII (39) y algunas proteínas del plasma. La plasmina tiene un período corto de vida en el plasma, debido a que es inactivada por antiplasminas humorales.

ACTIVADORES DEL PLASMINOGENO.

Este término se refiere a un grupo heterógeno de sustancias que convierten el plasminógeno a plasmina. Ellos se encuentran concentrados en los lisosomas de la ma

yoría de las células (40) y en el endotelio vascular (41). La urocinasa es un activador del plasminógeno, tiene un -- P.M. de 54,000 (42) y rompe las uniones arginina-lisina -- del plasminógeno. Los activadores también se encuentran en otros fluidos del cuerpo, por ejemplo, en la leche (43), - lágrimas (44), saliva (45) y semen (46).

PROACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO.

La evidencia de la existencia de un precursor inerte de la sangre activador del plasminógeno (proactivador del plasma) se obtuvo primero de los estudios que se hicieron acerca de la activación del plasminógeno por estreptocinasa. Estos estudios sugirieron que esta enzima bacteriana activa el plasminógeno solamente después de una intera-----cción preliminar con una euglobulina del plasma no identificada (paso 1).

La evidencia que mantiene la hipótesis de la presencia de un proactivador del plasma se obtuvo de los estu----dios que demuestran la capacidad del factor XIIa para activar la fibrinólisis.

La fibrinólisis, al igual que la coagulación, pueden por lo tanto ser activadas por ambas vías, la extrínseca o la intrínseca.

INHIBIDORES DE LA FIBRINOLISIS.

Al menos dos proteínas del plasma neutralizan específicamente la plasmina libre (47). Estas son una alfa-2-macroglobulina, la cual neutraliza rápidamente la plasmina y una que actúa lentamente que es la alfa-1-antitripsina --- (48).

La alfa-2-macroglobulina es un inhibidor competitivo

de la plasmina y la trombina y la competición entre estas dos enzimas por los sitios de unión sobre la molécula del inhibidor, puede ser de importancia homeostática en la -- coagulación intravascular.

Las antiplasminas también han sido aisladas de las plaquetas (49), del endotelio y mesotelio.

FISIOLOGIA DE LA FIBRINOLISIS.

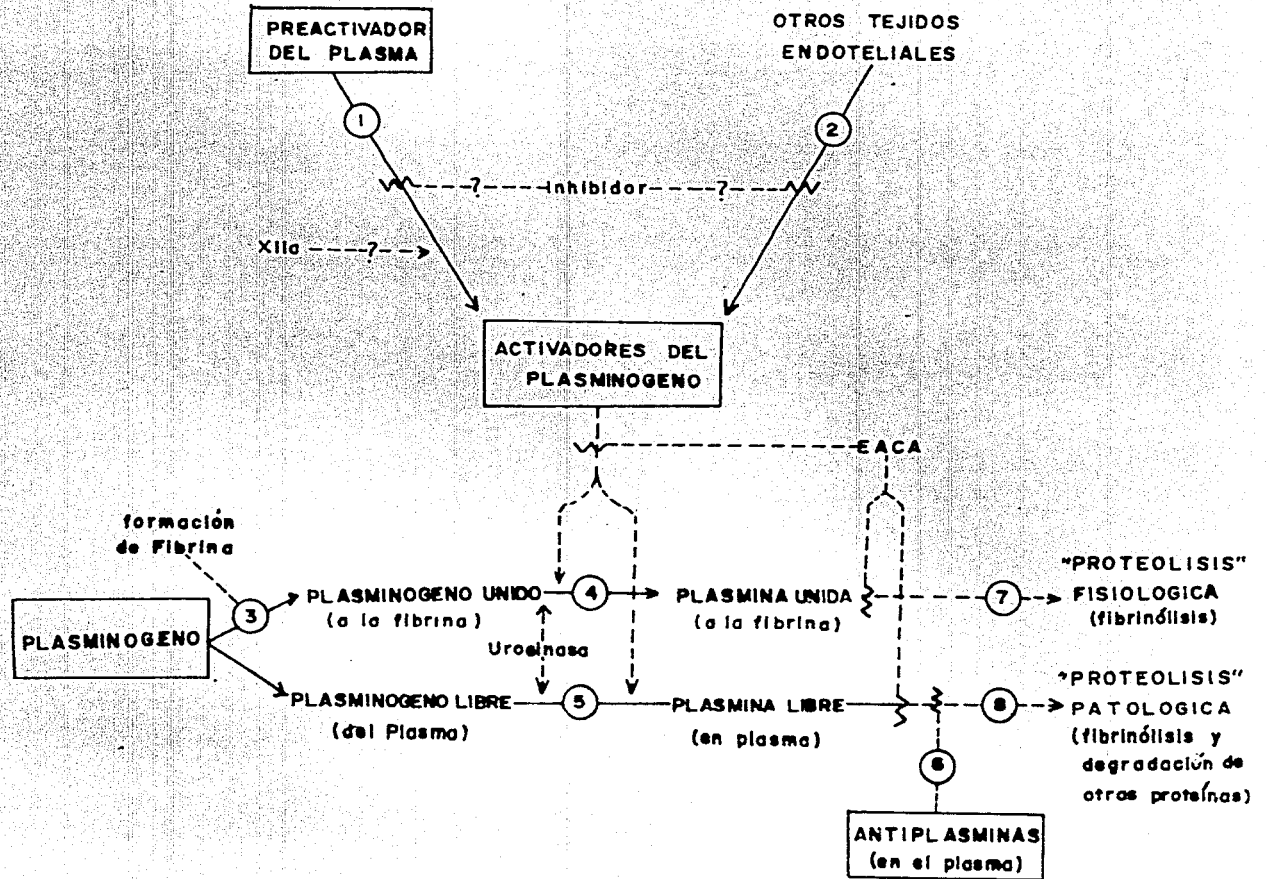
La mayoría de los estímulos fisiológicos y patológicos que conducen a la liberación de los activadores del plasminógeno son vaso-activos (50) y probablemente conducen a la liberación de activadores del endotelio (paso 2) por ejemplo, en el shock eléctrico y otras formas de ---- stress (51), durante el ejercicio (52), con epinefrina e histamina (53), pirógenos bacterianos (54), hipoxia e isquemia (55). Los activadores lisosomales pueden ser liberados bajo circunstancias fisiológicas (56) y en procesos patológicos que involucran shock o daño tisular.

ACTIVACION DEL PLASMINÓGENO.

Las consecuencias de la activación del plasminógeno son modificadas en forma drástica por la tendencia de la fibrina a adsorber esta proenzima (57), de esta manera -- cuando se forma la fibrina (paso 3) y el plasminógeno es activado (pasos 4 y 5), la plasmina que existe en forma libre es destruída tan rápidamente como es formada, esta destrucción la realizan las antiplasminas presentes en el plasma (paso 6) y por esto es incapaz de degradar proteolíticamente cualesquiera de los sustratos susceptibles.

La fibrina unida a la plasmina, por lo contrario es poco afectada por las antiplasminas en el plasma y de es-

ESQUEMA DE LA FIBRINOLISIS



te modo lleva a cabo su función fisiológica que es la lisis de la fibrina (paso 7). La degradación proteolítica del fibrinógeno y otros factores de la coagulación y de las proteínas del plasma (paso 8), solamente ocurren, si la plasmina libre excede la capacidad de los inhibidores del plasma (58).

LA DEGRADACION PROTEOLITICA DE LA FIBRINA Y EL FIBRINOGENO.

La acción proteolítica de la plasmina sobre la fibrina o el fibrinógeno conduce a la formación de una familia de fragmentos de proteínas solubles (59) llamados productos de degradación de la fibrina-fibrinógeno.

Las principales determinantes antigénicas del fibrinógeno nativo son retenidas por la fibrina y los productos de degradación más grandes (60). Estos productos son importantes en la diátesis hemorrágica de la coagulación intravascular.

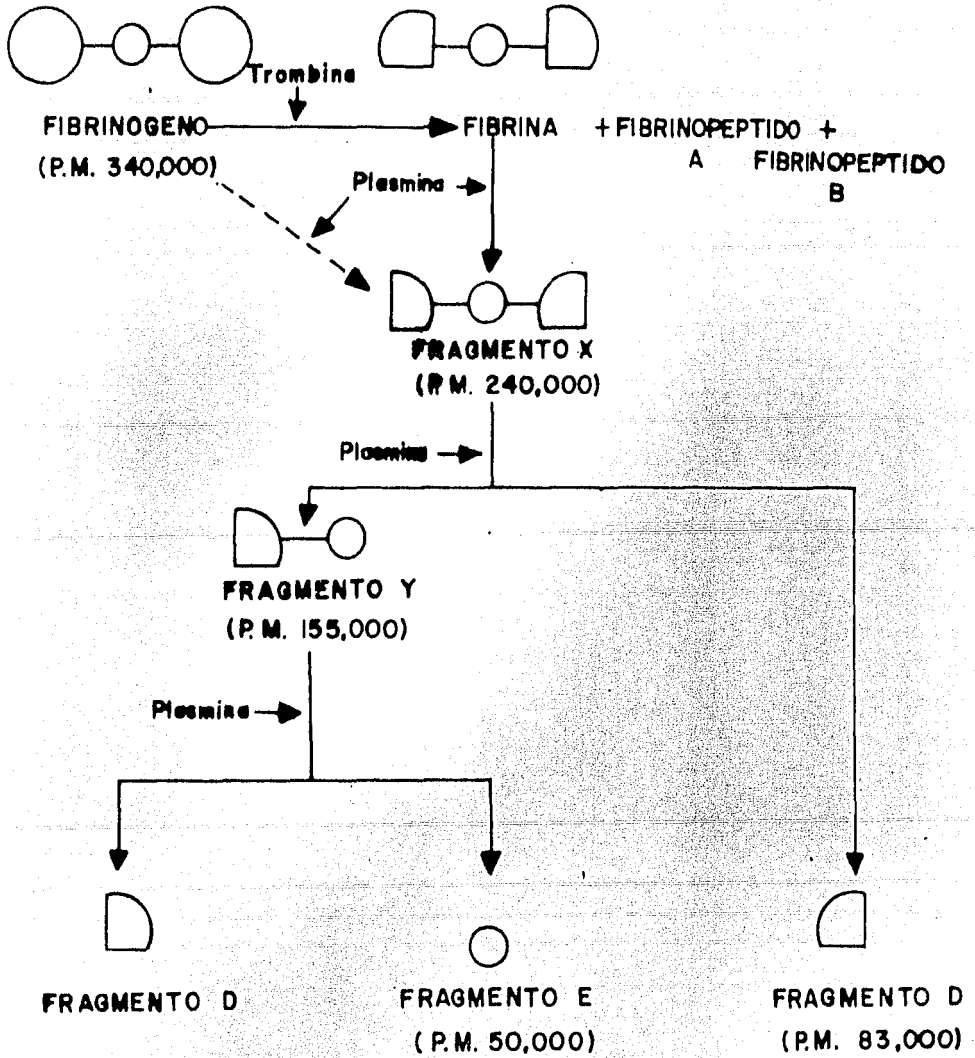
El tamaño y las características de estos productos varían con la duración de la acción de la plasmina.

En el paso inicial, aproximadamente el 20% de la molécula del fibrinógeno de P.M. 320,000 es removida en forma de pequeños péptidos, formándose el fragmento X de P.M. 240,000 que es completamente coagulable por trombina.

Cuando el fibrinógeno es atacado por la trombina se forma un monómero de fibrina, más dos fibrinopéptidos A y dos fibrinopéptidos B.

La fibrina al ser atacada por la plasmina también da lugar a un fragmento X junto con otros fragmentos menores. Posteriormente la acción de la plasmina sobre el fragmento X puede dar una variedad de productos grandes cuyo P.M. va-

ESQUEMA DE LA FORMACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL FIBRINOGENO Y LA FIBRINA



ría de 100,000 a 200,000 (fragmentos intermediarios) (61). Alternativamente estos fragmentos se pueden romper dando una molécula de fragmento Y, de P.M. 155,000 y una de fragmento D, de P.M. 83,000 (62) y ninguna es coagulable.

Finalmente el fragmento Y es degradado formando un fragmento D adicional junto con un fragmento E, cuyo P.M. es de 50,000.

Los fragmentos D y E son relativamente resistentes a una proteólisis posterior de la plasmina.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA-FIBRINOGENO.

Estos productos y sus complejos dañan profundamente el proceso hemostático y son una de las mayores causas de hemorragia en la coagulación intravascular y fibrinogé^lsis.

La mayoría de estos productos son inhibidores de la coagulación, el fragmento Y es el más potente en este respecto (63). Ellos son antitrombinas potentes (antitrombina VI) y también forman complejos incoagulables o lentamente coagulables con monómeros de fibrina o fibrinógeno.

Los fragmentos Y y D inhiben la polimerización de la fibrina, produciendo un polímero defectuoso estructuralmente. El fragmento E es un potente inhibidor de la trombina (64).

El fragmento E es el único producto de degradación excretado en la orina.

Varios de estos productos dañan la función de las plaquetas. Dichos productos son removidos por la circulación para ser desechados por el hígado y el sistema reticu

loendotelial (65). La vida media de estos fragmentos, como un grupo, es aproximadamente de 9 horas (66).

D.- IMPORTANCIA CLINICA DE LA DETERMINACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA-FIBRINOGENO.

La determinación de estos productos es importante -- porque se ha demostrado que interfieren con la hemostasis.

Estos productos se presentan en la sangre de pacientes en una gran variedad de estados patológicos por lo que se ha sugerido que su determinación juega un papel importante en el diagnóstico de algunas enfermedades y también que puede ser de valor para seguir el curso del tratamiento de la enfermedad.

Estos productos se pueden detectar también en el suero y la orina de individuos sanos. Los niveles normales en el suero son de 1 a 5 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo ocasionalmente se elevan hasta 20 $\mu\text{g/ml}$ y se consideran como normales. Los niveles normales en orina son menores de 1.25 $\mu\text{g/ml}$.

Se ha encontrado que estos productos se elevan principalmente en las siguientes condiciones patológicas: En algunas complicaciones del embarazo como en la toxemia y la eclampsia, en otras enfermedades como el cáncer, enfermedades renales, principalmente en glomerulonefritis y en el rechazo a trasplantes renales, en infecciones, artritis reumatoide, en embolismo pulmonar, o en enfermedades donde se presenta la coagulación intravascular. Todavía no se ha establecido una relación definitiva entre los niveles de estos productos y la severidad o el progreso de la enfermedad.

En las complicaciones del embarazo se ha detectado un incremento marcado en el nivel de estos productos en el

suero de un 78% de las pacientes que se han estudiado (67) y hay un incremento progresivo de estos productos en el suero de la paciente después de un ataque de eclampsia (68). Esto sugiere que la detección de estos productos puede ser un indicador muy útil de las complicaciones del embarazo antes mencionadas.

En el cáncer, en un gran número de enfermedades malignas se ha detectado una elevación de estos productos (69). Se han hecho estudios específicos en pacientes con carcinoma en el ovario y se ha sugerido que la medición de estos productos se puede usar como un medio de diferenciación entre tumores malignos y no malignos del ovario.

En enfermedades tromboembólicas también se ha detectado elevación de estos productos (70), pero en general parece que no hay ninguna relación con la magnitud y el incremento de la mortalidad de la enfermedad (71). La frecuencia de las complicaciones también se ha podido relacionar con los niveles de estos productos durante las primeras 24 horas después del período del infarto.

En los trasplantes renales la detección temprana del rechazo se logra mediante la determinación de estos productos, sin embargo a pesar de haber sido ampliamente investigado, hay una evidencia conflictiva, ya que parecer ser que la elevación en el suero y la orina aparece en todos los pacientes durante las dos primeras semanas que siguen al trasplante (72). Los niveles en la orina parece que son más seguros y quizá su elevación indique un rechazo antes de que este sea detectable clínicamente (73). Los niveles de los productos bajan al implantarse el tratamien

to adecuado.

En enfermedades renales agudas y en glomerulonefritis, particularmente en las formas proliferativas se ha detectado una elevación en los niveles de estos productos en el plasma y en la orina. Los niveles en la orina parecen ser el mejor indicador de la actividad de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento, lo que sugiere que los niveles en la orina están correlacionados con el grado de proteinuria (74).

E.- TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA-FIBRINOGENO.

Debido al gran valor que tiene la medición de los niveles de estos productos para el diagnóstico de la coagulación intravascular y fibrinólisis en una gran variedad de condiciones patológicas, se han desarrollado numerosas técnicas tanto cualitativas como cuantitativas para detectar estos productos ya sea en el suero o en la orina.

Dentro de estas técnicas la que se considera como de referencia es el método inmunológico de la inhibición de la hemaglutinación pasiva (75). Esta técnica es sensible a los fragmentos X, Y, D y E.

El método se basa en la neutralización del suero antifibrinógeno por los productos de degradación, por lo que este ya no aglutina con los glóbulos rojos cubiertos con fibrinógeno, el título de la reacción es la dilución más alta en la cual se note claramente la inhibición de la hemaglutinación por el suero inmune.

Para realizarla, primero se mezcla cada dilución del suero con el suero anti fibrinógeno diluido y se deja incubar durante 30 minutos a 4°C, después se le añade los glóbulos rojos tñados cubiertos con fibrinógeno y se vuelve a incubar 30 minutos a 25°C, se leen los resultados contra los controles positivos y negativos adecuados.

Si los productos de degradación estan presentes en el suero, como tienen las mismas determinantes antigénicas que el fibrinógeno, reaccionan con éste formando un complejo que inhibe la aglutinación de los glóbulos rojos tñados cubiertos con fibrinógeno, que sucedería normalmente -

entre éstos y el suero anti fibrinógeno.

La prueba es sensible, pero tiene el inconveniente - de que la preparación de los glóbulos rojos tanados es laboriosa y no se pueden almacenar por mucho tiempo, ya que éstos se disocian del fibrinógeno.

El procedimiento original de Merskey lleva de 3 a 4 horas, sin embargo la modificación hecha por Marten requiere únicamente de 45 a 60 minutos.

Otra técnica empleada es la aglutinación con estafilococo en la que se emplea una cepa de *Staphylococcus aureus* Newman D₂J coagulasa negativa. La prueba se basa en la presencia de un factor aglutinante dentro de las bacterias, el cual puede aglutinar en presencia de fibrinógeno, monómeros de fibrina o de los fragmentos X y Y.

Para esta prueba no se requiere de suero inmune y se puede realizar en tubo o en placa.

La suspensión de bacterias se prepara de la siguiente forma: 10 mg de polvo se suspenden en 1 ml de amortiguador Tris 0.05M pH de 7.4 que contiene 0.01% de albúmina bovina.

Para efectuar la prueba, se mezcla cada dilución de suero con la suspensión de bacterias y se incuba durante 2 minutos a 25°C, enseguida se le añade el amortiguador, se mezcla y se vuelve a incubar durante 30 minutos a 25°C y se leen los resultados. Se considera que el título de la reacción es la dilución más alta en la que se presenta una aglutinación clara, comparada con un control de amortiguador y la suspensión de bacterias.

La prueba se realiza en 45 minutos y aunque es adecuada para la identificación de los fragmentos X y Y, la-

agregación no se presenta con los fragmentos D y E (76), - además para que la cepa de bacterias no pierda su poder de aglutinación es necesario conservarla liofilizada, ya que cuando están en suspensión van perdiendo esta propiedad.

Hay una buena correlación entre esta prueba y la de la inhibición de la hemaglutinación pasiva, excepto en --- ciertos desordenés donde se presentan principalmente los - productos de peso molecular bajo (77).

Otra prueba es la de aglutinación con partículas de látex. El fundamento de ésta es la aglutinación del fibrinógeno o sus productos de degradación con partículas de lá tex cubiertas con anticuerpos al fibrinógeno (78).

En una placa de fondo negro, se mezcla una gota del reactivo de partículas de látex cubiertas, con una gota de cada dilución de suero, se agita cuidadosamente y a los 2- minutos se observan los resultados, el título de la rea--- cción es la dilución más alta de suero donde se presenta - aglutinación comparada con un control.

La prueba es rápida y simple, pero es poco sensible- comparada con otras técnicas ya que casi no reacciona con los fragmentos X y Y y con los fragmentos de bajo peso molecular, cuando se encuentran en concentraciones altas no sucede la aglutinación, sin embargo si las partículas de - látex se cubren con los anticuerpos específicos a los pro- ductos D y E la aglutinación si se presenta.

Otra técnica es la que usa sulfato de protamina. Esta prueba de la dilución seriada de sulfato de protamina - se ha reportado que reacciona solamente con monómeros de - fibrina y sus productos de degradación (79).

Se mezcla cada dilución de sulfato de protamina con la muestra de plasma, se agita y se examina a los 30 minutos y a las 24 horas usando una luz no reflectiva sobre un fondo negro. La prueba se considera positiva si se presenta la formación de cordones de fibrina o la de un gel en cualquier dilución.

Probablemente el valor principal de esta prueba es la de medir la actividad fibrinolítica en pacientes que es tan bajo terapia fibrinolítica.

Otra prueba es la de la medición del tiempo de coagulación de la trombina. Para este método se mezcla la trombina diluida con plasma sin diluir, el tiempo de coagulación se puede prolongar por la presencia del fibrinógeno, de anti trombinas como la heparina o los productos de degradación del fibrinógeno (80). Para distinguir si la heparina o los productos de degradación son los causantes de la prolongación del tiempo de trombina, se puede usar el tiempo de la reptilasa, esta enzima es un veneno de víbora que actúa sobre el fibrinógeno en forma similar a la trombina, excepto en que la reptilasa produce solamente el fibrinonéptido A. El tiempo de reptilasa se puede prolongar en presencia de los productos de degradación, pero no es afectado por la heparina.

Esta prueba del tiempo de trombina tiene el inconveniente de que este solo se prolonga cuando hay bajas concentraciones de fibrinógeno o de sus productos de degradación.

La prueba de floculación es otro método empleado para la determinación de estos productos y se basa en la precipitación del fibrinógeno o sus productos de degradación.

por los anticuerpos respectivos (81).

En una placa de fondo negro se mezcla una gota de suero y diluciones de éste con una gota de suero anti fibrinógeno, la placa se hace rotar a 140 r.p.m. durante 8 minutos y con la ayuda de una lupa se observan los resultados, el grado de floculación se toma en base a una escala que va de 0 a 4+ comparada con un control de suero inmune y amortiguador. Esta prueba es apropiada para determinaciones de emergencia pero requiere de títulos altos del suero inmune.

Otras técnicas que se usan son las de inmunodifusión de Mancini y la doble difusión de Ouchterlony. Estas pruebas se basan en la precipitación del antígeno por el anticuerpo en el seno de un gel de agar purificado. Al colocar el antígeno y el anticuerpo en el seno del gel, los dos empiezan a difundirse y avanzan con una velocidad que es directamente proporcional a su concentración e inversamente proporcional a su peso molecular (82).

En estas técnicas, aunque se usa comunmente suero anti fibrinógeno, la detección de los productos D y E se puede mejorar usando el suero inmune específico. Aún cuando con estas técnicas se pueden detectar 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estos productos, se consideran poco satisfactorias para medir niveles menores de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ya que tienen poca sensibilidad (83).

Otro método empleado es la inmunoelectroforesis. En esta técnica se identifica a las proteínas tanto por sus propiedades electroforéticas como antigénicas y consta básicamente de dos pasos; primero las proteínas son separadas por electroforesis y subsecuentemente se les hace reaccionar con sus correspondientes anticuerpos, con lo que resul-

ta la formación de líneas de precipitación individuales -- (84).

El método de Niléhn (85) basado en la técnica de Laurell (86), es capaz de distinguir entre las sustancias de alto peso molecular y los fragmentos D y E. Todos ellos, cuando reaccionan con el suero inmune forman picos, pero la altura de éstos es diferente para cada producto, la sensibilidad de este método es de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se hizo una modificación de esta técnica, en la cual la misma muestra se aplica en placas separadas que contienen los sueros específicos al fibrinógeno y a los fragmentos D y E respectivamente, esto permite la identificación y cuantificación de todos los productos que pueden estar presentes en el suero.

El método de la inmunolectroforesis tiene buena sensibilidad para la identificación de los productos de degradación, la única desventaja es que requiere de mucho tiempo para realizarla.

Otra técnica es la de contraelectroforesis en gel de agar que permite la identificación del fibrinógeno y sus productos de degradación. Este método se basa en una reacción de precipitación entre el antígeno y el anticuerpo en el seno de un gel de agar, pero aquí el desplazamiento es acelerado mediante el uso de una corriente eléctrica y un amortiguador apropiado.

Los anticuerpos son gamma globulinas que se mueven electroforéticamente hacia el cátodo y el fibrinógeno es una beta globulina parte de la cual migra hacia el ánodo a un pH de 8.2, los productos de degradación son α_1 y α_2 globulinas que también se mueven hacia el cátodo (87).

El suero anti fibrinógeno se prepara en conejos que se inmunizan con fibrinógeno humano o con el producto de degradación correspondiente purificado. El suero obtenido contiene anticuerpos precipitantes que son estabilizados por un método especial, como conservador se usa azida de sodio (1 mg/ml).

En las plaças de gel se perforan pares de pozos, los que se llenan con el suero problema y las diluciones de éste y el suero inmune correspondiente, después se le aplica una corriente eléctrica durante un tiempo de 80 minutos y se leen los resultados.

Este método no requiere de mucho tiempo para realizarlo y además tiene una buena sensibilidad ya que es capaz de detectar hasta 1 μ r/ml del producto E.

Otra técnica empleada para la determinación de estos productos es el radioinmunoanálisis. Con este método ha sido posible la investigación de proteínas y hormonas en el plasma en concentraciones menores de 0.1 μ g/100 ml (88).

Este método se basa en la competencia entre el antígeno y una cantidad limitada de anticuerpo específico. El antígeno lo forman la proteína marcada con yodo radiactivo y la proteína no marcada.

Cuando se presenta un incremento en la cantidad del antígeno no marcado también hay un descenso progresivo en la cantidad del antígeno radiactivo unido al anticuerpo específico. El grado de este descenso se puede usar para cuantificar cantidades pequeñas del antígeno no marcado usando como referencia una curva estándar hecha con cantidades conocidas de antígeno.

En estas pruebas, al finalizar la reacción inmune, -

se deben separar el trazador libre y el unido al antígeno, lo que permite la cuantificación de uno o de ambos componentes. Generalmente esta separación se ha hecho por migración diferencial del trazador unido y el libre o por aislamientos de éstos mediante adsorción o por precipitación.

El método de radioinmunoanálisis en fase sólida fue desarrollado para facilitar esta separación usando en anticuerpo específico acoplado al acarreador. Tales anticuerpos se pueden lavar y cuantificar al finalizar la reacción inmune y esto permite la cuantificación del antígeno unido.

Además de la simplicidad, este método tiene las ventajas de poder separar fácilmente las dos formas de anticuerpo, el libre y el unido por ejemplo al fibrinógeno o sus productos de degradación. Ahora este método se ha aplicado para el análisis del fibrinógeno y para investigar la inmunoreactividad de los productos de degradación del fibrinógeno. (89).

Esta técnica tiene una buena sensibilidad, pero el equipo que se usa no lo tienen todos los laboratorios y además se requiere de personal entrenado para realizarla.

CAPITULO II.MATERIAL Y METODOS.MATERIAL BIOLÓGICO.

El material de trabajo usado en el método de contrainmunoelectroforesis consistió en 100 muestras de suero de mujeres embarazadas con los siguientes diagnósticos: 71 de toxemia severa; 16 de eclampsia; 7 de toxemia moderada y 6 de pelviperitonitis; además se usaron 20 muestras de suero de mujeres con embarazo normal que no presentaron ninguno de los diagnósticos antes mencionados. Estas pacientes fueron atendidas en el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 2 del Centro Médico Nacional, del I.M.S.S.

Las muestras se obtienen en ayunas, por punción venosa, usando jeringas estériles, la sangre se coloca en tubos de ensaye y se deja coagular a la temperatura ambiente durante 60 minutos, después se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y se separa el suero. Cuando éste no se usa de inmediato, se almacena en congelación y se emplea dentro de las 24 horas siguientes.

DESCRIPCION DEL EQUIPO.

Cámara electroforética CHEMETRON, modelo 2 PAC/5 con regulador de voltaje LKB tipo 3290 B.

Placas de plástico de 14 cm de largo, 8.5 cm de ancho y 5 mm de alto.

Esponjas como soporte de 7 cm de largo, 2.8 cm de ancho y 2.3 cm de espesor.

MATERIAL DE LABORATORIO Y REACTIVOS.

Suero Anti fibrinógeno.+

Suero Anti D.+

Suero Anti E.+

Trombina Bovina.++

Agarosa al 1.5% en agua destilada: Pesar 1.5 g de agarosa, disolver en agua destilada y aforar a 100 ml.

Agarosa al 1% con conservador: Pesar 1 g de agarosa, disolver con amortiguador Tris pH de 9.6 y aforar a 100 ml, añadir 10 mg de timerosal por cada 100 ml como conservador.

Amortiguador Tris pH de 9.6: Conteniendo Tris 0.01M, NaCl 0.1M y EDTA 0.001M. Pesar Tris 1.2114 g, NaCl 5.8 g, EDTA 0.3722 g, disolver los reactivos en agua destilada y ajustar el pH en el potenciómetro con una solución concentrada de NaOH hasta pH de 9.6 y aforar a 1 litro.

Amortiguador de barbital pH de 8.6: Pesar 1.84 g de ácido barbitúrico y 10.30 g de barbiturato de sodio, disolver en agua destilada, ajustar el pH a 8.6 en el potenciómetro usando una solución concentrada de NaOH o de HCl según se necesite y aforar a 1 litro.

Solución salina al 0.9%.

PREPARACION DE LAS PLACAS.

Colocar las placas de plástico en una superficie perfectamente nivelada, arregar la solución de agarosa al 1.5% y distribuirla con un pincel sobre la placa hasta dejar una capa delgada que servirá de sello. Llevar las placas a secar durante 30 minutos en estufa a 37°C.

Arregar a cada placa 15 ml de la solución de agarosa al 1% para dejar una capa de 2 mm de espesor y dejar solidi

+ Laboratorios Behringwerke.

++ Laboratorios Hyland.

ficar la agarosa. Estas placas no deberán usarse antes de 12 horas.

Practicar cortes en las placas de la siguiente forma: Sobre cada lado de la placa se hacen dos hileras de siete pozos cada una, entre cada par de pozos dejar una separación de 3 mm y hacia abajo una separación de 5 mm con el siguiente par, el diámetro de los pozos debe ser exactamente de 5 mm. Para extraer la agarosa de los cortes se hace un ligero vacío con una pipeta capilar. Guardar las placas en cajas de plástico en el refrigerador, dentro de las cajas colocar una gasa húmeda para evitar que se reseque la agarosa.

METODO.

A.- CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Para este trabajo se empleó el método de Brody (90), esta técnica utiliza el flujo endosmótico que, durante la electroforesis en un gel cargado negativamente, hace que las proteínas de movimiento lento, como son las inmunoglobulinas, se desplacen hacia el cátodo, o sea en dirección opuesta a la del antígeno de movimiento rápido. Mediante la disposición adecuada de las cavidades, se puede hacer que el anticuerpo y el antígeno converjan. Las líneas de precipitación se desarrollan rápidamente, lo que depende también de la intensidad de la reacción.

Esta técnica se realiza de la siguiente forma:

1.- A las muestras de suero añadir 100 unidades de trombina bovina (0.1 ml) por cada ml y llevar a incubar durante 15 minutos a 37°C, esto se hace con el objeto de destruir cualquier resto de fibrinógeno en la muestra.

2.- Hacer diluciones de suero usando solución salina-

estas diluciones deben ser 1:2, 1:4 y 1:8.

3.- Colocar en la cámara electroforética las esponjas agregar el amortiguador de barbitol hasta la mitad del volúmen de la cámara. Para saturar las esponjas se comorimen varias veces con los dedos en el amortiguador hasta que se expandan. Tapar la cámara y dejar que se sature.

4.- Por otra parte retirar las placas del refrigerador y eliminar el exceso de humedad de ellas con un papel filtro.

5.- De cada doble fila de pozos, llenar los más próximos al cátodo con las muestras de suero sin diluir y con las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8, usar tubos capilares diferentes para cada dilución, llenar los pozos cuidadosamente procurando no derramar las muestras.

En los pozos que estan cerca del ánodo colocar el suero anti fibrinógeno frente a cada muestra de suero y sus respectivas diluciones, después colocar el suero anti D y el suero anti E de la misma forma, esperar que se difundan los reactivos en el gel.

6.- Colocar la placa invertida dentro de la cámara y conectarla a la fuente de poder, aplicandole una corriente constante de 40 mA por un tiempo de 80 minutos.

7.- Una vez transcurrido este tiempo, desconectar la cámara de la fuente de poder, sacar la placa y observar los resultados usando una fuente de luz oblicua y con la ayuda de una lupa.

Para observar mejor las líneas de precipitación, se pueden intensificar con tanino o teñir con negro de amido.

INTERPRETACION.

La aparición de una línea de precipitación paralela -

entre la cavidad de la muestra y la del anticuerno indica un resultado positivo, es decir que en el suero estan los productos de degradación del fibrinógeno.

Si la muestra esta lipémica, un precipitado no específico puede emigrar desde la cavidad de la muestra hacia la cavidad del anticuerno. Esta zona nublada no se debe interpretar como positiva. De vez en cuando se observará una banda débilmente arqueada alrededor de una de las cavidades, lo cual tampoco se deberá interpretar como resultado positivo.

METODO DE OUCHTERLONY.

MATERIAL BIOLOGICO.

El material de trabajo empleado en esta técnica consistió en 46 muestras de suero de mujeres embarazadas con los siguientes diagnósticos: 30 de toxemia severa, 10 de eclampsia, 2 de toxemia moderada y 4 de pelviperitonitis.- Estos sueros son los que dieron resultado positivo con el método de contrainmunolectroforesis, además se emplearon como controles negativos, los 20 sueros de pacientes embarazadas sanas que no presentaron ninguno de los diagnósticos mencionados.

Las muestras se obtienen en ayunas por punción venosa, usando jeringas estériles, se coloca la sangre en tubos de ensaye y se deja coagular a la temperatura ambiente durante 60 minutos y se separa el suero.

Quando el suero no se usa de inmediato, se almacena en congelación y se usa dentro de las 24 horas siguientes.

DESCRIPCION DEL EQUIPO.

Placas de plástico de 14 cm de largo, 8.5 cm de ancho y 5 mm de alto.

Cajas de plástico para guardar las placas.

MATERIALES DE LABORATORIO Y PREPARACION DE REACTIVOS.

Suero Anti fibrinógeno.+

Suero Anti D.+

Suero Anti E.+

Trombina Bovina.++

Agarosa al 1.5% en agua destilada: Pesar 1.5 g de agarosa, disolver con agua destilada y aforar a 100 ml.

Solución salina al 0.9%.

Timerosal al 10%.

PREPARACION DE LAS PLACAS.

Colocar las placas en una superficie nivelada, añadir a cada placa 30 ml de la solución de agarosa al 1.5% para que quede una capa de 3 mm de espesor, dejar solidificar la agarosa, guardar las placas en las cajas de plástico y llevarlas al refrigerador para que la capa de agarosa este firme.

Con un perforador de 5 mm de diámetro practicar 5 cortes dispuestos en forma de roseta, uno central y cuatro periféricos. La separación entre el bozo central y cada pozo periférico es de 3 mm. En el resto de la placa hacer otras perforaciones en la misma forma, colocar las placas en las cajas de plástico con una gasa húmeda para evitar que se sequen y guardarlas en el refrigerador.

METODO.

1.- Añadir a cada ml de suero 100 unidades de trombina bovina (0.1 ml) y llevar a incubar las muestras a 37°C durante 15 minutos, esto se hace con el fin de destruir cualquier resto de fibrinógeno en las muestras.

+ Laboratorios Behringwerke.

++ Laboratorios Hyland.

2.- Hacer las diluciones de los sueros usando solución salina, las diluciones son 1:2, 1:4 y 1:8.

3.- En la placa con agarosa, colocar en el pozo central de la primera roseta el suero anti fibrinógeno usando un tubo capilar, con otro tubo capilar colocar en otro pozo central el suero anti D y en el siguiente pozo central, usando otro tubo capilar el suero anti E.

4.- Con tubos capilares diferentes colocar en los pozos de la periferia de cada roseta la muestra de suero sin diluir y las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 siguiendo el sentido de las manecillas del reloj.

5.- Guardar las placas en las cajas de plástico y dejarlas a la temperatura ambiente por un período de 24 a 48 horas, después de las cuales se observan los resultados.

Para evitar que se desarrollen contaminantes en la agarosa se le puede añadir unos cristales de fenol o colocar un papel filtro impregnado en una solución de timersal al 10% adherido a la tapa de la caja, esto sirve para mantener la humedad en las placas y también como germicida.

INTERPRETACION.

Debido a que el antígeno y el anticuerpo se difunden en la capa de agar, cuando se encuentran, si se corresponden, forman una banda de precipitación, esto indica que la reacción es positiva y por lo tanto que en el suero se encuentran los productos de degradación.

CAPITULO III.

RESULTADOS.

Los resultados que se muestran en las siguientes tablas -- son los que se obtuvieron usando el método de contrainmuno electroforesis.

RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES
CON TOXEMIA SEVERA. (TOTAL 71).

No. de Casos.	Título. F	Título. D	Título. E	%
41	neg	neg	neg	57.79
12	1:1	1:1	-	16.90
6	1:2	1:2	-	8.45
3	1:4	1:4	-	4.22
3	1:1	1:1	1:1	4.22
2	1:4	1:4	1:1	2.81
2	1:2	1:2	1:2	2.81
2	1:4	1:4	1:2	2.81

En esta tabla de resultados se puede observar que de los 71 casos con diagnóstico de toxemia severa que se estudiaron el 42.26% dio resultado positivo para la presencia -- de los productos de degradación y de este porcentaje, solamente el 14.06% dio resultado positivo para el fragmento E.

RESULTADOS ENCONTRADOS EN PACIENTES
CON ECLAMPSIA. (TOTAL 16).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
6	neg	neg	neg	37.50
2	1:1	1:1	-	12.50
1	1:2	1:2	-	6.25
2	1:4	1:4	-	12.50
1	1:1	1:1	1:1	6.25
1	1:2	1:2	1:1	6.25
2	1:4	1:4	1:1	12.50
1	1:4	1:4	1:2	6.25

En esta tabla se puede apreciar que de los 16 casos estudiados, el 62.5% dió resultado positivo, y de este porcentaje el 31.25% fue positivo para el fragmento E.

RESULTADOS ENCONTRADOS EN PACIENTES
CON TOXEMIA MODERADA. (TOTAL 7).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
5	neg	neg	neg	71.42
1	1:1	1:1	-	14.28
1	1:2	1:2	-	14.28

En esta tabla se puede ver que de los 7 casos de toxemia - moderada que se estudiaron, el 28.58% resultaron positivos pero ninguno dió resultado positivo para el fragmento E.

RESULTADOS ENCONTRADOS EN PACIENTES
CON PELVIPERITONITIS: (TOTAL 6).

No. de Casos	Título F	Título D	Título E	%
2	neg	neg	neg	33.33
1	1:1	1:1	-	16.66
1	1:2	1:2	-	16.66
1	1:1	1:1	1:1	16.66
1	1:4	1:4	1:4	16.66

En la tabla se puede apreciar que de los 6 casos estudiados con diagnóstico de pelviperitonitis el 66.66% dió resultado positivo a los productos de degradación y de este porcentaje, el 33.33% fue positivo para el fragmento E.

Los resultados que se muestran en las siguientes tablas son los que se encontraron usando el método de Ouchterlony.

RESULTADOS ENCONTRADOS EN PACIENTES
CON TOXEMIA SEVERA. (TOTAL 30).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
20	neg	neg	neg	66.66
3	1:1	1:1	-	10.00
7	1:2	1:2	-	23.33

En esta tabla se puede ver que de los 30 casos estudiados con el diagnóstico de toxemia severa, el 33.33% dieron resultado positivo al fragmento D, pero ninguno se encontró positivo al fragmento E.

RESULTADOS ENCONTRADOS EN PACIENTES
CON ECLAMPSIA. (TOTAL 10).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
5	neg	neg	neg	50
2	1:1	1:1	-	20
3	1:2	1:2	-	30

En la tabla se puede apreciar que de los 10 casos estudiados el 50% dio reacción positiva al fragmento D, pero ninguno al fragmento E.

RESULTADOS ENCONTRADOS EN PACIENTES
CON PELVIPERITONITIS. (TOTAL 4).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
2	neg	neg	neg	50
1	1:1	1:1	-	25
1	1:2	1:2	-	25

En esta tabla se puede ver que de los 4 casos estudiados con diagnóstico de pelviperitonitis, el 50% dio resultado positivo al fragmento D y ninguno resultado positivo al --- fragmento E.

RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES
CON TOXEMIA MODERADA. (TOTAL 2).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
2	neg	neg	neg	100

En los casos que se estudiaron con diagnóstico de toxemia moderada no se obtuvo ningún resultado positivo para la - presencia de los productos de degradación.

Los resultados que se muestran en las siguientes - tablas son los que se obtuvieron en los sueros de pacien- tes sanas que no tuvieron ninguno de los diagnósticos an- tes mencionados, por lo que estos sueros se usarón como- control negativo para las dos pruebas empleadas aquí.

En la primera tabla se muestran los resultados en- contrados con el método de la contraimmunoelectroforesis y en la segunda tabla, los que se obtuvieron con la téc- nica de Ouchterlony.

RESULTADOS OBTENIDOS EN PACIENTES
SANAS. (TOTAL 20).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
20	neg	neg	neg	100

RESULTADOS ENCONTRADOS EN PACIENTES
SANAS. (TOTAL 20).

No. de Casos.	Título F	Título D	Título E	%
20	neg	neg	neg	100

En las dos tablas de resultados se puede ver que de los - 20 sueros de pacientes sanas que se probaron por los dos- métodos, ninguno dio resultado positivo para la presencia de los productos de degradación.

CAPITULO IV.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos indican que los niveles de los productos de degradación del fibrinógeno, se elevan -- significativamente en la toxemia severa, pero esta elevación es mayor en los casos de eclampsia, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Bonnar en 1969 (6), al estudiar un número limitado de casos, usando el método-inmunológico de la inhibición de la hemaglutinación pasiva.

Estos resultados también concuerdan con la hipótesis de que la toxemia y la eclampsia están asociadas a la coagulación intravascular y parece ser que esta causa oclusión generalizada de los vasos sanguíneos pequeños, tanto en los riñones, como hígado, cerebro y placenta, esto, posiblemente puede ser la causa de las manifestaciones clínicas de las enfermedades antes mencionadas. En la toxemia, aparentemente se presenta un proceso similar, pero en forma moderada, ya que la acumulación de fibrina solo se limita a la microcoagulación renal.

También se presentó una elevación de estos productos en los casos de pelviperitonitis, esta elevación se puede explicar porque en esta enfermedad también se puede presentar la coagulación intravascular y una fibrinólisis posterior y como consecuencia de ésta aparecen los productos de degradación del fibrinógeno en el suero.

Sin embargo, como únicamente se estudiaron 7 casos - con diagnóstico de pelviperitonitis, éstos no son suficien

tes para evaluar los resultados con exactitud en este diagnóstico, lo mismo sucede con los 6 casos estudiados con diagnóstico de toxemia moderada.

De los 20 sueros de pacientes con embarazo normal, usados como controles negativos, ninguno dio reacción positiva para la presencia de los productos de degradación con ninguna de las dos técnicas empleadas en este trabajo, sin embargo Henderson (4), usando el método de aglutinación con *Staphylococcus* encontró que las concentraciones normales en el adulto no exceden de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y en el embarazo normal se elevan hasta 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Los resultados negativos obtenidos en todos los controles negativos se pueden explicar en base a que la sensibilidad calculada para la técnica de contraelectroforesis fue de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y como la elevación que se presenta durante el embarazo normal es de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, este método no la puede detectar.

La determinación de estos productos en el suero puede ser de gran ayuda para la detección temprana de las complicaciones del embarazo, así como para seguir el curso de algunas enfermedades y la respuesta al tratamiento.

En este estudio se eligió la técnica de contraelectroforesis por ser específica y rápida para la determinación de los productos de degradación. Sin embargo, aunque con este método no se puede medir con exactitud la cantidad de productos de degradación en el suero, desde un punto de vista práctico resulta suficiente en el laboratorio.

Esta técnica se comparó con la de inmunodifusión propuesta por Ouchterlony y se observó por los resultados obtenidos en las dos técnicas, una sensibilidad cuatro veces mayor para el método de contraelectroforesis.

CAPITULO V.RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Se determinaron los productos de degradación de la fibrina y el fibrinógeno en 100 muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico de toxemia severa, eclampsia, toxemia moderada y pelviperitonitis.

Se empleó el método de contrainmunolectroforesis efectuando la reacción en un tiempo de 80 minutos y aplicándole una corriente de 40 mA.

Esta técnica se comparó con la de inmunodifusión de Ouchterlony, se probaron únicamente los 46 sueros que dieron resultado positivo con el otro método. La prueba de Ouchterlony requiere cuando menos de 24 horas para observar los resultados.

Se encontro positividad en un porcentaje mayor de sueros con el primer método, que con el de Ouchterlony.

Se discuten las ventajas de los métodos y su aplicación al estudio de algunas complicaciones del embarazo.

De los resultados obtenidos se concluye que la técnica de contrainmunolectroforesis es una prueba que se puede incorporar fácilmente a los procedimientos de rutina en los laboratorios donde se hacen análisis para determinar los productos de degradación, ya que esta prueba es rápida tiene buena sensibilidad a los productos de degradación, sobre todo al fragmento E, ventajas que no se pudieron observar en el otro método empleado, ya que este requiere de más tiempo y su sensibilidad es menor sobre todo al fragmento E.

CAPITULO VI.BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Hedner, U. and Nilsson, I.M. 1971. Clinical experience with determination of fibrinogen degradation products. Acta. Med. Scand. 189: 471.
- 2.- Garner, R.I. and Tillett, W.S. 1934. Biochemical studies on the fibrinolytic activity of hemolytic Streptococci. II. Nature of the reaction. J. Exp. Med. 60: 255.
- 3.- McKay, D.G. and Corey, A.E. 1964. Cryofibrinogenemia - in toxemia of pregnancy. Obstet. Gynec. -- 23: 508.
- 4.- Henderson, A.H., Pugsley, D.J. and Thomas, D.P. 1970.- Fibrin degradation products in pre-eclamptic toxemia and eclampsia. Brit. Med. J. 3: 545.
- 5.- Schneider, C.L. 1947. The active principle of placental toxin: Thromboplastin; its inactivator in blood: Antithromboplastin. Am. J. Phys.- 149: 123.
- 6.- Bonnar, J., Davidson, J.F., Pidgeon, C.F., McNicol, G. P. and Douglas, A.S. 1969. Fibrin degradation products in normal and abnormal pregnancy and parturition. Brit. Med. J. 3: 137.
- 7.- Wood, S.M., Burnett, D., Picken, A.M., Farrell, G.W. - and Wolf, P. 1974. Assessment of coagulation and fibrinolysis in pre-eclampsia. Brit. Med. J. 2: 145.
- 8.- Niléhn, J.E. 1967. Separation and estimation of split-

- products of fibrinogen and fibrin in human serum. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 18: -- 487.
- 9.- MacFarlane, R.G. 1964. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature.* 202: 498.
- 10.- Davie, E.W. and Ratnoff, O.D. 1964. Waterfall sequence of the blood clotting. *Science.* 145: -- 310.
- 11.- Hemker, H.C. and Kahn, M.J.P. 1967. Reaction sequence of blood coagulation. *Nature.* (London). -- 215: 1201.
- 12.- Hubbard, D. and Lucas, G.L. 1960. Ionic charges of -- glass surfaces and other materials, and -- their possible role in the coagulation of blood. *J. Appl. Physiol.* 15: 265.
- 13.- Wilner, G.D., Nossel, H.L. and LeRoy, E.C. 1968. Activation of Hageman factor by collagen. *J. Clin. Invest.* 47: 2608.
- 14.- Niewiarowski, S., Bánkowski, E. and Rogowicka, I. --- 1965. Studies on the adsorption and activation of Hageman factor (factor XII) by collagen and elastin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 14: 387.
- 15.- Ratnoff, O.D., Davie, E.W. and Mallet, D.L. 1961. Studies on the activation of the Hageman factor. Evidence that activated Hageman factor in turn activates plasma thromboplastin antecedent. *J. Clin. Invest.* 40: 803.
- 16.- Cattan, A.D. and Denson, K.W.E. 1964. The interaction of contact factor and factor IX. *Thromb. - Diath. Haemorrh.* 2: 155.

- 17.- Schiffman, S., Rapaport, S.I. and Chong, W.M.Y. 1966. The mandatory role of lipid in the interaction of factors VIII and IX. Proc. Soc. -- Exp. Biol. Med. 123: 736.
- 18.- Lundblad, R.L. and Davie, E.W. 1965. The activation - of Stuart factor (factor X) by activated - antihemophilic factor. (activated factor - VIII). Biochem. (Wash). 4: 113.
- 19.- Nemerson, Y. 1966. The reaction between bovine brain-tissue factor and factors VII and X. Biochemistry. 5: 601.
- 20.- Papahadjopoulos, D. and Hanahn, D.J. 1964. Observa---tion on the interaction of fosfolipids and certain clotting factors in prothrombin ac---tivation formation. Biochim. Biophys. Acta. 90: 436.
- 21.- Barton, P.G., Jackson, C.K. and Hanahan, D.J. 1967. - Relationship between factor V activated -- factor X in the generation of prothrombin_a se. Nature. 214: 923.
- 22.- Jobin, F. and Esnouf, M.P. 1967. Studies on the forma---tion of the prothrombin converting complex. Biochem. J. 102: 666.
- 23.- Laki, K. and Glander, J.A. 1964. Chemistry and phisio---logy of the fibrinogen-fibrin transition.- Physiol. Rev. 44: 127.
- 24.- Endries, G.F. and Scheraga, H.A. 1968. Equilibria in - the fibrinogen-fibrin conversion. Bioche---mistry. 7: 4219.
- 25.- Tyler, H.M. 1966. A comparative study of the solvents commonly used to detect fibrin stabiliza---tion. Thromb. Diath. Haemorrh. 41: 61.

- 26.- Pisano, J.J., Finlayson, J.S. and Peyton, M.J. 1968.- Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII; epsilon-(alfa-glutamyl) lysine. --- Science. 160: 892.
- 27.- Donald, G. and McKay, M.D. 1969. Progress in disseminated intravascular coagulation. Calif. -- Med. 111: 86.
- 28.- Kwaan, H.C. 1972. Disseminated intravascular coagulation. Med. Clin. North. Am. 56: 177.
- 29.- Colman, R.W., Robboy, S.J. and Minna, J.D. 1972. Disseminated intravascular coagulation. An approach. Am. J. Med. 52: 679.
- 30.- Ratnoff, O.D., Davie, E.W. and Mallet, D.L. 1961. Studies on the action of Hageman factor; evidence that activated Hageman factor in --- turn activates plasma thromboplastin antecedent. J. Clin. Invest. 40: 803.
- 31.- Wintrobe, M.M. 1974. Clinical Hematology. Lea and Febiger. Philadelphia. 7^a ed. p. 1212.
- 32.- Verstraete, M. and Vermylen. J. 1968. Acute and chronic "defibrination" in obstetrical practice. Thromb. Diath. Haemorrh. 20: 444.
- 33.- Trigg, J.W. 1964. Hypofibrinogenemia in Rocky mountain spotted fever. N. Engl. J. Med. 270: 1042.
- 34.- Dennis, I.H., Eichelberger, J.W., Inman, M.M. and Conrad, M.E. 1967. Depletion of coagulation factors in drug-resistant Plasmodium falciparum malaria. Blood. 29: 713.
- 35.- Kwaan, H.C. and Astrup, T. 1964. Fibrinolytic activi-

- ty of reparative connective tissue. *J. Pathol. Bacteriol.* 87: 409.
- 36.- Alkjaersig, N. 1964. The purification and properties of human plasminogen. *Biochem. J.* 93: 171.
- 37.- Sherry, S., Lindermyer, R.I., Fletcher, A.P. and -- Alkjaersig, N. 1959. Studies on enhanced-fibrinolytic activity in man. *J. Clin. Invest.* 38: 810.
- 38.- Williams, J.W., Beutler, E. and Erslev, J.A. 1972. - Hematology. McGraw Hill Book Company. New York. p. 1105.
- 39.- Donaldson, V.H. 1960. Effect of plasmin in vitro on-clotting factors in plasma. *J. Lab. Clin. Med.* 56: 644.
- 40.- Nakahara, M. and Gelandner, C.R. 1968. Properties of-microsomal activator of profibrinolysin - found in bovine and porcine heart muscle. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19: 483.
- 41.- Ali, S.Y. 1967. Purification and properties of tissue activator of plasminogen. *Biochem. J.* 101: 1.
- 42.- Lesuk, A., Terminiello, L. and Traver, J.H. 1965. -- Crystalline human urokinase. Some properties. *Science.* 147: 880.
- 43.- Astrup, T. and Sterndorff, I. 1953. A fibrinolytic - system in human milk. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84: 605.
- 44.- Storm, O. 1955. Fibrinolytic activity in human tears. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1: 55,

- 45.- Albrechtsen, O.K. and Thaysen, J.H. 1955. Fibrinolytic activity in human saliva. Acta Physiol. Scand. 35: 138.
- 46.- Tympanidis, K. and Astrup, T. 1969. Fibrinolytic activity of rat, rabbit and human sperm cells. Proc. Soc. Biol. Med. 129: 170.
- 47.- Norman, P.S. and Hill, B.M. 1958. Studies on the plasmin system III. Physical properties of the two plasmin inhibitors in plasma. J. Exp. Med. 108: 639.
- 48.- Rimon, A., Shamash, Y. and Shapiro, B. 1966. The plasmin inhibitor of human plasma IV. Its action on plasmin, trypsin, chymotrypsin and thrombin. J. Biol. Chem. 241: 5102.
- 49.- Johns, S.A. and Schneider, C.I. 1953. The existence of antifibrinolysis activity in platelets. Science. 117: 229.
- 50.- Holemans, R. 1965. Enhancement of fibrinolysis in the dog by injection of vasoactive drugs. Am. J. Physiol. 208: 511.
- 51.- Sawyer, W.D., Fletcher, A.P., Alkjaersig, N. and Sherry, S. 1960. Studies on the thrombolytic activity of human plasma. J. Clin. Invest. 39: 426.
- 52.- Cash, J.D. 1969. Effects of moderate exercise on the fibrinolytic system in normal young men -- and women. Brit. Med. J. 2: 502.
- 53.- Holemans, R. and Langdell, R.D. 1964. Histamine induced increase in fibrinolytic activity. Proc. Soc. Exp. Med. 115: 584.

- 54.- Deutsch, E. and Elsner, P. 1959. The mechanism of fibrinolysis induced by bacterial pyrogens.- *Thromb. Diath. Haemorrh.* 3: 286.
- 55.- Kwaan, H.C., Ior, M.C. and Fadzean, A.J. 1958. On the inhibition of plasma fibrinolytic activity by exercised ischaemic muscles. *Clin. Sci.* 17: 361.
- 56.- Beard, E.L., Busuttil, R.W. and Gottshalk, S.K. 1969. Stress induced release of plasminogen activator from lysosomes. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 21:20.
- 57.- Sherry, S., Alkjaersig, N. and Fletcher, A.P. 1959. - Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man. *Physiol. Rev.* 39: 343.
- 58.- Smith, G.F. and Bang, N.U. 1972. Formation of soluble fibrin polymers. Fibrinogen degradation -- fragments D and E fail to form soluble complexes with fibrin monomer. *Biochemistry.* 11: 2958.
- 59.- Kwaan, H.C. and Barlow, G.H. 1973. Nature and biological activities of degradation of fibrinogen and fibrin. *Ann. Rev. Med.* 24: 335.
- 60.- Marder, V.J. 1971. Identification and purification of fibrinogen degradation products produced by plasmin. Consideration on the structure of fibrinogen. *Scand. J. Haematol.* ---- *Suppl.* 13: 21.
- 61.- Fletcher, A.P., Alkjaersig, N., Fisher, S. and Sherry, S. 1966. The proteolysis of fibrinogen by plasmin: The identification of thrombin-clotable fibrinogen derivatives which polymerize abnormally. *J. Lab. Clin. Med.* 68: -- 780.

- 62.- Marder, V.J., Budzynski, A.Z. and James, H.I. 1972.- High molecular weight derivatives of human-fibrinogen produced by plasmin. *J. Biol.-Chem.* 247: 4775.
- 63.- Kowalski, E. 1968. Fibrinogen derivatives and their -- biologic activities. *Sem. Haematol.* 5: -- 45.
- 64.- Larrieu, M.J., Rigollot, C. and Marder, V.J. 1972. - Comparative effects of fibrinogen degradation fragments D and E on coagulation. -- *Br. J. Haematol.* 22: 719.
- 65.- Gaus, H. and Lowman, J.T. 1967. The uptake of fibrin degradation products by the isolated perfused rat liver. *Blood.* 29: 526.
- 66.- Fletcher, A.P., Alkjaersig, N. and Sherry, S. 1962.- Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. I The -- significance of fibrinogen proteolysis -- and circulating fibrinogen breakdown products. *J. Clin. Invest.* 41: 896.
- 67.- Astedt, B., Svanberg, L. and Nilsson, I.M. 1972. Fibrinogen degradation products. *Lancet.* 2: 1312.
- 68.- Bonnar, J., McNicol, G.P. and Douglas, A.S. 1971. -- Coagulation and fibrinolytic systems in -- pre-eclampsia and eclampsia. *Brit. Med. - J.* 2: 212.
- 69.- Carlsson, S. and Linelli, F. 1973. Fibrin degradation products in serum and urine in patients with renal carcinoma. *Scand. J. -- Urol. Nephrol.* 7: 43.

- 70.- Sonnabend, D., Cooper, D. and Fiddes, P. 1972. Fibrin degradation products in thromboembolic disease. *Pathology*. 4: 47.
- 71.- Baele, G., Mussche, M. and Vermeire, P. 1972. Serum - fibrin- fibrinogen degradation products in myocardial infarction. *Lancet*. 1: 689.
- 72.- Bennet, N.M., Bennett, D., Holland, N.H. and Luke, R.- C. 1972. Serum fibrin degradation products in the diagnosis of transplantation rejection. *Transplantation*. 14: 311.
- 73.- Briggs, J.D., Prentice, C.M., Hutton, M.M., Kennedy, - A.C. and McNicol, G.P. 1972. Serum and urine fibrinogen-fibrin-related antigens (F.- R. Antigen) levels in renal disease. *Brit. Med. J.* 4:82.
- 74.- Carlsson, S., Hedner, U., Nilsson, I.M., Bergentz, S. E. and Ljungqvist, U. 1970. Kidney transplantation and fibrinolytic split products in serum and urine. *Transplantation*. 10: - 366.
- 75.- Merskey, C., Jalezari, P. and Johnson, A.J. 1969. A - rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human-serum. *Proc. Soc. Exp. Med. Biol. Med.* --- 131: 871.
- 76.- Hawiger, J., Niewiarowski, S., Gurewich, V. and Thomas, D.P. 1970. Measurement of fibrinogen- and fibrin degradation products in serum - by staphylococcal clumping test. *J. Lab. - Clin. Med.* 75: 93.
- 77.- Thomas, D.P., Niewiarowski, S., Myers, A.R., Bloch, - K.J. and Colman, R.W. 1970. A comparative- study of four methods for detecting fibri-

nogen degradation products in patients --- with various diseases. *New. Eng. J. Med.* - 283: 663.

- 78.- Garvey, M.B. and Black, J.M. 1972. The detection of - fibrinogen-fibrin degradation products by means of a new antibody-coated latex parti- cle. *J. Clin. Path.* 25: 680.
- 79.- Niewiarowski, S. and Gurewich, V. 1971. Laboratory -- identification of intravascular coagula- --- tion. The serial dilution protamine sulfa- te test for the detection of fibrin mono- --- mers and fibrin degradation products. *J. - Lab. Clin. Med.* 77: 665.
- 80.- Jim, R.T.S. 1957. A study of the plasma thrombin ti- --- me. *J. Lab. Clin. Med.* 50: 45.
- 81.- Ferreira, H.C. and Murat, L.G. 1963. An immunological method for demonstrating fibrin degradation products in serum and its use in the diag- nosis of fibrinolytic states. *Brit. J. Hae- mat.* 9: 299.
- 82.- Schmid, P. 1969. Dependence of radial immunodiffusion of fibrinogen on time and antigen concen- --- tration. *Clin. Chim. Acta.* 26: 183.
- 83.- Marder, V.J., Matchett, M.D. and Sherry, S. 1971. De- tection of serum fibrinogen and fibrin de- gradation products. Comparison of six tech- nics using purified products and applica- --- tion in clinical studies. *Am. J. Med.* 51: - 71.
- 84.- Clarke, H.G.M. and Freeman, T. 1968. Quantitative -- immunoelectrophoresis of human serum pro- teins. *Clin. Sci.* 35: 403.

- 85.- Niléhn, J.E. and Nilsson, I.M. 1964. Demonstration of fibrinolytic split products in human serum by an immunological method in spontaneous- and induced fibrinolytic states. Scand. J. Haemat. 1: 313.
- 86.- Laurell, C. 1966. Quantitative estimation of protein by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal. Biochem. 15: 45.
- 87.- Lewis, J.H., Wilson, J.H. and Brandon, J.F. 1972. --- Counterelectrophoresis test for molecules immunologically similar to fibrinogen. Am. J. Clin. Pathol. 58: 400.
- 88.- Gatt, K.J., Niall, H.D. and Tregear, G.W. 1967. Solid phase radioimmunoassay. Nature (Lond) --- 213: 825.
- 89.- Gatt, K.J., Hirsh, J., Castelan, D.J., Niall, H.D. -- and Tregear, G.W. 1968. Radioimmunoassay of fibrinogen and its proteolysis products. Thromb. Diath. Haemorrh. 20: 1.
- 90.- Brody, J.I. 1972. Detection of fibrinogen-fibrin degradation products by counterelectrophoresis. J. Clin. Path. 25: 754.