



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO SOBRE TROMBOPLASTINA

126

FEDERICO JORGE DINGLER AULENBACHER

QUIMICO

1976



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.

CLAS Tesis
AGE 1946
FECHA 11-1
PROG 11-1
8

124



QUIMICA

JURADO ASIGNADO

ORIGINALMENTE

SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Q.F.B. GUADALUPE VELEZ PRATT

VOCAL: PROF. GUILLERMO JAMES MOLINA

SECRETARIO: Q. ROSA LUZ CORNEJO ROJAS

1^o-SUPLENTE:Q.F.B. PAULINA CASTRO ANDON

2^o-SUPLENTE:Q. MAURO CRUZ MORALES

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

FEDERICO JORGE DINGLER AULENBACHER

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR:

Q. ROSA LUZ CORNEJO ROJAS

AL MEJOR AMIGO TU :

I N D I C E

INTRODUCCION.

PARTE TEORICA.-

- A.- Generalidades. ¿Que es la coágulación?
Inhibidores. La Tromboplastina.
- B.- Mecanismo de Coagulación.
- C.- Método de Aislamiento y Purificación
del producto.
- D.- Pruebas de Actividad del Producto y
Aplicaciones.

PARTE EXPERIMENTAL.-

- E.- Condiciones Previas al Experimento:
 - a) La cámara estéril. Características
y pruebas de esterilidad.
 - b) Limpieza del material utilizado.
- F.- Experimentación.
- G.- Prueba de Identificación y Resultados.
- H.- Conclusión.

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA.

ESTUDIO SOBRE
TROMBOPLASTINA

I N T R O D U C C I O N

La intención al realizar esta Tesis es buscar, con ella, el que se inicien estudios experimentales en el campo de la Bioquímica en el Laboratorio de Quimica Experimental aplicada, U.N.A.M. la cual no posee una área experimental de Bioquímica. Por otro lado quiero hacer notar que al proponer iniciar una nueva área resulta imprescindible demostrar que es posible, obteniendo resultados experimentales óptimos, de tal forma que justifiquen la iniciación de la nueva área y la presentación de este trabajo.

En la Facultad de Química, U.N.A.M. existe un Laboratorio en el que se imparte Bioquímica experimental, este Laboratorio pertenece como complemento, a las Materia Teóricas de Bioquímica I y Bioquímica II, que se imparten a nivel Licenciatura, por otro lado también -- existe un Laboratorio en el que el alumno que cursa los dos últimos semestres de la Carrera de Químico, se le permite aplicar experimentalmente lo aprendido en forma teórica, proporcionándole, con esto, la oportunidad de unir sus conocimientos hacia un solo fin, la QUIMICA.

Dentro de la Química existen muchas divisiones, como ejemplo de ellas tenemos al Análisis, a la Química Orgánica, a la Bioquímica, a la Química Inorgánica, a la Fisicoquímica, etc. y si dentro de todas estas divisiones se encuentra la Bioquímica, es claro que ella debe participar en la formación química de un Qui

mico, de tal forma que amplíe su cultura Académica.

¿ Por qué pensar en la Bioquímica y no en la Fisicoquímica u otra Materia ?. Una razón la más poderosa, es la necesidad de conocimientos amplios sobre la materia a nivel experimental; conocer de la Bioquímica todo eso que la hace interesante e importante partiendo de sus fundamentos, hasta sus resultados o aportaciones al conocimiento de la Química, que es una; además de la posibilidad de experimentar con ella.

El Laboratorio de Química Experimental permite la aplicación, dentro de su idiosincracia, de muchos conceptos, principalmente los referentes a la Química Orgánica y los análisis involucrados por ellos; más aún siendo todo esto un campo amplio dentro de la Química adolece del gran defecto de no ser eso, un Laboratorio Químico; su campo es restringido y he aquí el por que de la importancia de iniciar una nueva área en este Laboratorio, la Bioquímica aplicada.

No solo es importante por el hecho de que los alumnos comprendan la Química, sino por la necesidad del país por la Ciencia Aplicada.

El equipo necesario para realizar experiencias de Bioquímica es especializado, hasta un cierto límite ya que el equipo utilizado para otras áreas puede ser aplicado a Bioquímica con un poco de imaginación ob

teniendo lo que uno desea, por lo que considero que el equipo no es problema grave y que en todo esto, el verdadero factor limitante es la perspicacia química e imaginación constructiva del alumno.

El Laboratorio de Bioquímica que actualmente existe contiene en sí lo fundamental para que el alumno -adquiera lo básico. Este laboratorio con un poco más de dinamismo y decisión procurará en sus alumnos el interés suficiente para ampliar, aún más, su experiencia y que continúe, por sí solo, la búsqueda de un cúmulo mayor de conocimientos. Mi concepto de un Profesor y de él integrado o un grupo de Laboratorio, es motivar el interés -de sus alumnos por ser útiles así mismos, al Laboratorio y a México.

Actualmente el conocimiento científico no -camina, corre y al profesionista le es necesario, el conocer nuevos campos dentro de la Química, entendiendo --por Química todo lo relacionado con ella. Mi ideal es poner la espina que moleste a diario.

P A R T E T E O R I C A

A.- GENERALIDADES

¿QUE ES LA COAGULACION?

INHIBIDORES -LA TROMBOPLASTINA

Una de las creencias populares, es que la sangre debe estar expuesta al aire para coagular (1); en este trabajo expondré explícitamente el por qué este concepto, no es en toda su amplitud, cierto.

La sangre por su composición compleja posee diversas funciones (2), de entre todas ellas una que es importante, es la coagulación. Aquí desarrollaré los temas más íntimamente relacionados con ella, y en particular lo referente a la tromboplastina, como factor que participa en este fenómeno.

La Tromboplastina recibe diferentes nombres (3):

- M) Tromboquinasa
- D) Citozima
- E) Tromboplastina Tisular
- L) Tejido Tromboplastina
- C) Sustancia Zimoplástica
- P) Trombal
- M) Trombostop
- A) Factor III

En el texto la referiré como Tromboplastina (TB), o Tromboquinasa (TQ).

¿ Que importancia tiene para los mamíferos la coagulación normal de la sangre ?, simplemente tiene la función de conservar la vida, previniendo la pérdida de este fluido que ocupa aproximadamente del 5 al 7% del pe-

so del cuerpo (1), o dicho de otra forma, 2 a 3 litros por metro cuadrado (2).

Para el fenómeno de coagulación se han propuesto diversos mecanismos, uno sencillo, es el de la Fig. No.1

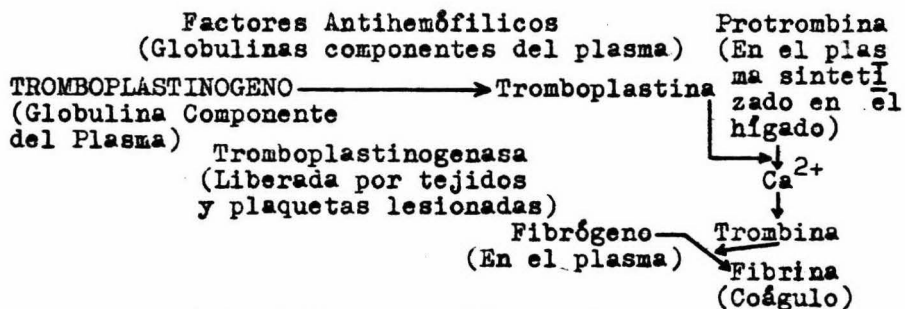


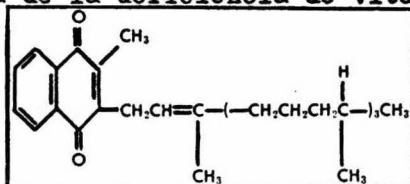
Fig. 1 Pasos seguidos en la coagulación sanguínea

¿ Cual es la causa del paso final, es decir, la transformación del fibrinógeno al estado de Gel o fibrina para formar un coágulo?, la respuesta está en la intervención de una enzima específica, la trombina o Trombasa que actúa sobre el fibrinógeno catalizando su conversión al estado Gel. La Trombina se encuentra en la sangre en forma inactiva como Protrombina o Protrombasa. Esta a su vez se forma en el hígado requiriendo la presencia de vitamina K. ¿Como se convierte a Trombina?; son necesarios dos factores: primero, iones calcio, normalmente presentes en el torrente sanguíneo y segundo, una lipoproteína la TB. Esta última, está en la sangre en estado inactivo como uno de los componentes globulínicos normales del plasma llamado Tromboplastinógeno, el cual pasa al estado activo

o TB en presencia de ciertas globulinas componentes del plasma, (Factores Antihemofílicos) liberadas de tejidos lesionados y plaquetas desintegradas, la Tromboplastinogénica. Por consiguiente la liberación del Tromboplastinógeno inicia una serie de reacciones que al finalizar constituirán el coágulo sanguíneo. Este permanece en forma de costra hasta que el tejido ha sido reparado (1).

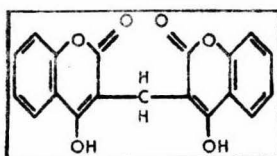
Obviamente éste camino rumbo a la fibrina, está muy simplificado; cabe preguntar ¿ Como y que sucede en cada paso de la coagulación sanguínea, como es inhibida y en que forma interviene la TQ.

El ejemplo más importante de inhibición es el que resulta de la deficiencia de vitamina K, (2) :



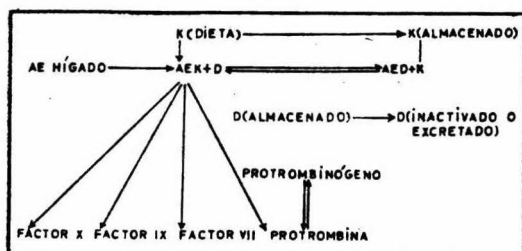
Esta vitamina suministra el grupo prostético K a una apoenzima (AE) para formar la holoenzima (AE K) involucrada en la producción de cuatro factores de la coagulación; Protrombina, Factor VII, Factor IX y Factor X. En ausencia de vitamina K, decrece primero el Factor VII y de manera muy drástica; seguido por una disminución en el nivel de protrombina. Existe una relación entre el decremento del Factor VII y la protrombina. La disminución de los Factores IX y X en relación a la caída del Factor VII no ha sido perfectamente estudiado.

Ciertos compuestos como lo es la droga Bis
hidroxicumarina (Dicumarol)



actuan como antimetabolitos o Antagonistas de la vitamina K.

La relación existente entre el Dicumarol y la vitamina K son más claros en el siguiente esquema:



El compuesto de Cumarina (D) reemplaza a la vitamina K de acuerdo a la ley de acción de masas.

El reemplazamiento de la vitamina K (K) por su antagonista (D) en el sistema de la enzima reduce su actividad sintética obteniéndose un defecto en la producción del Factor VII y de la Protrombina.

Lo expuesto en la figura anterior es la reacción más probable.

Otro compuesto que actúa como inhibidor de la coagulación de la sangre, (31) (32) es la histona del timo; se ha encontrado que la globina poseé actividad an

ticuagulante IN VIVO, (33). Actuan como anticoagulantes
IN VITRO los siguientes agentes químicos (36) :

- C) Acido Nicotínico
- J) Piridina
- A') Nicotina
- O) Prontocil
- R) Rubiazol
- E) Diazil
- M) Sulfatiazol
- G) Cibazol
- E') Rivanol
- E) Acridina
- N') Acido Succínico
- D) Seconal
- P) Nembutal
- A) Pentotal
- M) Tripafloreño.

B.- MECANISMO DE COAGULACION

MECANISMOS DE COAGULACION.- Con el objeto de entender mejor el o los mecanismos de coagulación de la sangre, "EL COMITE INTERNACIONAL DE NOMENCLATURA PARA LA COAGULACION DE LA SANGRE", formado por el "CONGRESO INTERNACIONAL DE HEMATOLOGIA", ha propuesto una nomenclatura (4).

El sistema adoptado por el Comité Internacional, utiliza números romanos para designar los factores que luego describiré.

Con el objeto de proporcionar una mayor facilidad en la interpretación de estos factores a los primeros cuatro, se les dan los nombres que han sido utilizados por muchos años; el resto poseen tanto número como nombre para su identificación.

A continuación los factores con su sinónimo más empleado:

- FACTOR I - Fibrinógeno (4). (6).
- FACTOR II - Protrombina (4). (6).
- FACTOR III - Tromboplastina (4). (6).
- FACTOR IV - Calcio (4). (6).
- FACTOR V - Proacelerina, Fact. Lábil, Ac-Globulina (5).
- FACTOR VI - No utilizado-No asignado (5).
- FACTOR VII - Proconvertina (5). Acelerador de la conversión de la protrombina del suero (spca). Factor estable (4).
- FACTOR VIII - Factor antihemofílico (4). Globulina antihemofílica (5).

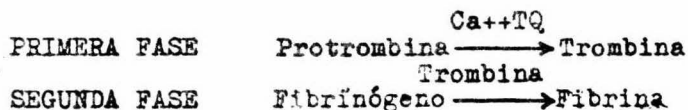
- FACTOR IX - Factor de Christmas, componente del plasma tromboplastina (ptc) (4).
- FACTOR X - Factor de Stuart, Factor de Stuart Power (4).
- FACTOR XI - Antecedente del plasma tromboplastina (pta) (4).
- FACTOR XII- Factor de Hageman (4). Factor vidrio (5).
- FACTOR XIII- Factor estabilizador de fibrina (4).
- Profibrinolisisina Plasminógeno
- Fibrinolisisina Plasmina

Los mecanismos los expondré del más sencillo al más complejo, aún el mecanismo más sofisticado puede sintetizarse en la Fig. No. 1, ya mencionada.

Los mecanismos que trataré son:

- a) Teoría clásica, (7) (22)
- b) Coagulación sanguínea de 4 pasos (2).
- c) Concepto básico de coagulación (4)
 - i) camino externo
 - ii) camino interno
- d) Esquema hipotético de coagulación, tres pasos (4).
- e) Sistema intrínseco y sistema extrínseco del proceso de coagulación (28)
- f) Sistema de cascada. (37).

a) La teoría clásica (22) de la coagulación de la sangre postula dos fases (7):



El factor que junto con el ión calcio, es responsable de la activación de la protrombina a trombina ha sido llamada: TB, TQ, Trombosima. . . . (3) (8).

La TB, se encuentra en muchos tejidos animales (8) de donde es extraída para producir coagulación extravascular. Su presencia en las frágiles plaquetas de la sangre, es probablemente la causa de coagulación intravascular, además de contener una fracción en extremo activa de la cefalina (15), la cual es considerada tam bien, como agente tromboplástico (34).

Una consideración del efecto tromboplástico, está puntualizado por un número de factores que desde hace tiempo se conocen parcialmente; extractos alcohólicos o etéreos de células contienen un factor termoestable, llamandosele a esta substancia zimoplástica (Descubierta por Schmidt (9)) y cuya función es ser activador de la coagulación. La substancia responsable de este efecto es un fosfátido (10,11,12, y 13), el cual pertenece al grupo de las cefalinas (14).

Es fácil corroborar que esta teoría no profundiza sobre el mecanismo de coagulación.

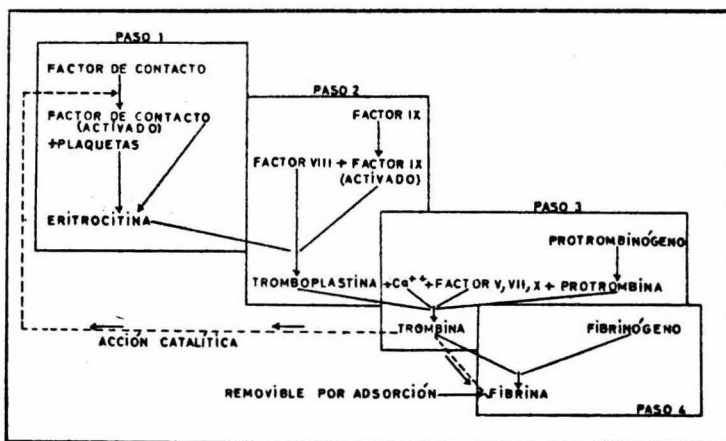
b) Coagulación sanguínea de cuatro pasos.

El siguiente mecanismo, es considerado uno de los que mejor detallan la coagulación de la sangre, así, cuando la sangre emana de una vena o arteria (2) y es colocada dentro de un recipiente, ésta coagula por completo en menos de 10 minutos. Este fenómeno aparentemente muy simple es el resultado de una serie de reacciones complejas

La reacción básica responsable de la coagulación de la sangre, es la conversión de la proteína soluble en el plasma, el fibrinógeno, en un polímero insoluble: la fibrina y es iniciada por la enzima trombina formada a partir de la proenzima, protrombina.

Las investigaciones realizadas muestran que el fenómeno de la coagulación de la sangre, envuelve un número indeterminado de reacciones y de factores "aparentemente" iniciados por algún factor liberado durante la lesión de un tejido y que esto provoque hemorragia.

Prácticamente el mecanismo de coagulación puede ser dividido en cuatro pasos (16) (Fig. No.2), La trombina es el factor clave ya que no solo "inicia" la conversión del fibrinógeno en fibrina, sino que también se vé envuelto en el inicio de la activación autocatalítica de la reacción.



Para discutir este tipo de mecanismo, par tiré del cuarto paso, al primero para mayor claridad.

PASO 4.- Conversión de fibrinógeno a fibrina por efecto de la trombina.

La trombina es una enzima proteolítica que rompe dos fibrinopéptidos. La molécula polimerizada para formar fibrina soluble en urea, la cual es convertida a la forma insoluble en urea, por la presencia de calcio y del factor suero (factor estabilizador de la fibrina, (FSF) (17).

El sustrato natural de acción de la trombina es el fibrinógeno.

PASO 3.- Activación de la Protrombina a Trombina.

Cuando una TB potente es adicionada a plasma humano normal recalcificado, el tiempo de coagulación es ta en

función del nivel de protrombina libre y activa presente en el plasma normal.

El protrombinógeno es el precursor de protrombina activa.

En adición a la TB, se requieren otros agentes para la conversión de la protrombina a trombina. Tres de los factores claramente definidos son el factor V, factor VII y factor X.

PASO 2.- Generación de Tromboplastina.-

La sangre que circula dentro de un organismo "NO" posee TB. Los agentes se encuentran presentes y en cuanto se combinan generan la TQ INTRINSECA; estos son fosfolípidos proporcionados por las plaquetas y los factores VII y IX.

La secuencia exacta de reacciones no es conocida, pero lo que si es claro es que proceden lentamente.

Existe la evidencia mediante trabajos experimentales (18), de que participan dos factores de coagulación (poco caracterizados), XI y XII, en la activación del Factor IX, el cual circula con la sangre en forma activa.

PASO 1.- Activación del Factor Plaquetar.

Las plaquetas no contienen una cantidad significativa

de TB, preformada. Adicionando un extracto de plaquetas a plasma, el cual no ha sido previamente puesto en contacto con una superficie, como lo sería el vidrio, no se observará un consumo medible de protrombina. Si se agrega una pequeña cantidad de trombina junto con las plaquetas, se obtienen buenos resultados en cuanto a consumo de protrombina. Por lo mismo, si el plasma es expuesto a una superficie de vidrio previo a la adición de plaquetas (19), buena parte de la generación de TB es afectada, mostrándose como consumo de protrombina. Esto indica que las plaquetas, en cuanto entran a las reacciones de coagulación, son activadas por un factor plasma, el cual requiere activación de trombina. Ya que este es activado por contacto con una superficie de vidrio, se le ha designado "FACTOR CONTACTO".

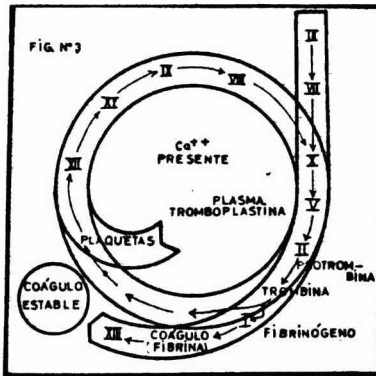
Una disminución de los principales factores de la coagulación redonda en una inadecuada producción de trombina.

La fibrina puede ser considerada como material estructural temporal, que funciona en ocasiones como mecanismo escalonado. Una enzima específica, la plasmina (Fibrinolisisina), disuelve rápidamente a la fibrina. Esta enzima circula en la sangre en forma de plasminógeno (pro fibrinolisisina). Factores (4).

El mecanismo anterior propone la secuencia

de las reacciones, más no menciona los detalles y el qué sucede de un precursor a su producto; y de este producto, ahora como precursor, a su respectivo producto y así subsecuentemente hasta el coágulo.

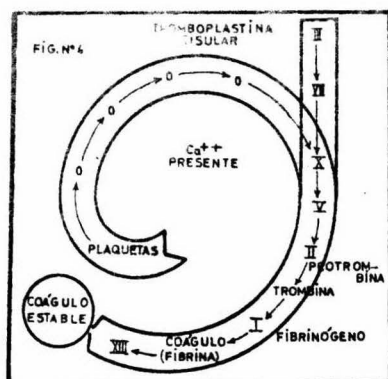
c) Concepto Básico de Coagulación.- El siguiente mecanismo (4), nos menciona dos conceptos aún poco discutidos; el camino externo y el camino interno de coagulación. Este último camino justifica la idea establecida al inicio de esta Tesis.



El concepto básico de coagulación de la Fig. No. 3, muestra la "actividad tromboplástica" necesaria para la conversión de protrombina a trombina que puede ser iniciada, tanto en el camino interno, como en el camino externo. Bajo la acción proteolítica de la trombina el fibrinógeno es convertido a fibrina.

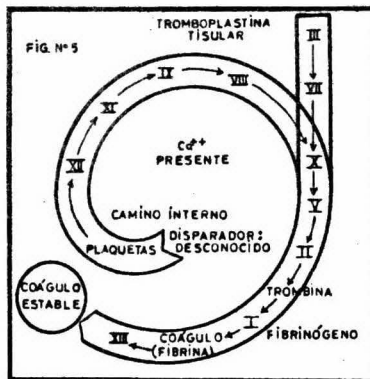
Independientemente cada camino sigue una secuencia propia de reacciones:

i) camino externo.- cuando hay un daño



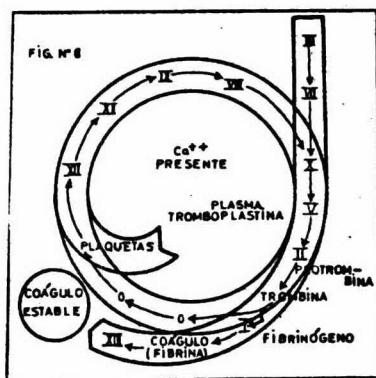
celular dá por resultado la aparición del tejido TB. (Factor III), y en la presencia de los Factores VII, X y V y calcio ionizado, "La actividad trombo plástica" es producida cuando es convertida la protrombina en trombina. El Factor VII (Ver figura No.4) es esencial para la activación del tejido trombo plástica. Los Factores X y V son aceleradores de la conversión de protrombina.

ii) Camino Interno.- En el camino interno (Fig. No.5), cuando un cambio en el medio ambiente de la sangre causa alteración en las plaquetas, y una agregación (conglomerado) resulta de la liberación de un fosfolípido o factor plaquetal 3, el cual interactúa con los Factores XII, XI, VIII, X y V, para producir una "Actividad Trombo plástica" conocida también como "Plasma Trombo plástica". El plasma TB, convierte protrombina en trombina y la secuencia continúa hasta la fibrina.



En este punto surge una pregunta interesante: ¿ Como interactúan ambos caminos ? veamos la Fig.No. 6.

Una lesión a nivel celular y la liberación del tejido tromboplastina, inician la coagulación en el camino externo. El tejido TB interacciona con los Factores VII, X y V para producir actividad tromboplástica, convirtiendo protrombina en trombina y la subsecuente formación del coágulo sanguíneo, el cual tiene la propiedad de frenar el sangrado, aunque sea en forma temporal.



La acción autocatalítica de la trombina al
tera a las plaquetas del camino interno para producir
plasma tromboplastina y obtener al final, un coágulo de
sangre.

Una función adicional que posee la trombina,
es la polimerización de la fibrina a través de su acción
proteolítica sobre el factor XIII, produciendo al final,
un coágulo estable de fibrina.

Utilizando un esquema "Hipotético" de la coa-
gulación de la sangre, podemos dividirla en tres etapas
o secciones de actividad de sus factores (9), por tanto:

Etapa I : (Generación de la actividad trombo-
plástica).

Plaquetas o sustituto de plaquetas.

Factores del plasma.

Factor XII

Factor XI Plasma tromboplastina

Factor IX Tejido TB o TB tisular

Factor VIII Factor tisular

Factor IV

La actividad tromboplástica necesaria para
convertir a la protrombina en trombina, es producida en
esta etapa, a través de camino externo o de camino inter
no.

Etapa II

TB (En plasma o en tejido).

Factor II
Factor V
Factor VII Trombina
Factor X
Factor IV

El plasma TB (o TB tisular más el factor VII) producido en la primera etapa en presencia de los factores del plasma V y X, convierte a la protrombina a una enzima activa, trombina.

Etapa III

Trombina
Factor I Coágulo de fibrina
Coágulo de fibrina
Factor XIII Coágulo estable de fibrina
Factor IV

La trombina convierte al fibrinógeno en fibrina y un coágulo de fibrina es formado cuando este es estabilizado en presencia del Factor XIII.

El mecanismo anterior, posee información que nos permite conocer como sucede la coagulación, con más detalle; más a pesar de esto, el mecanismo no es completo, ya que no proporciona detalles de como se llega a formar un coágulo.

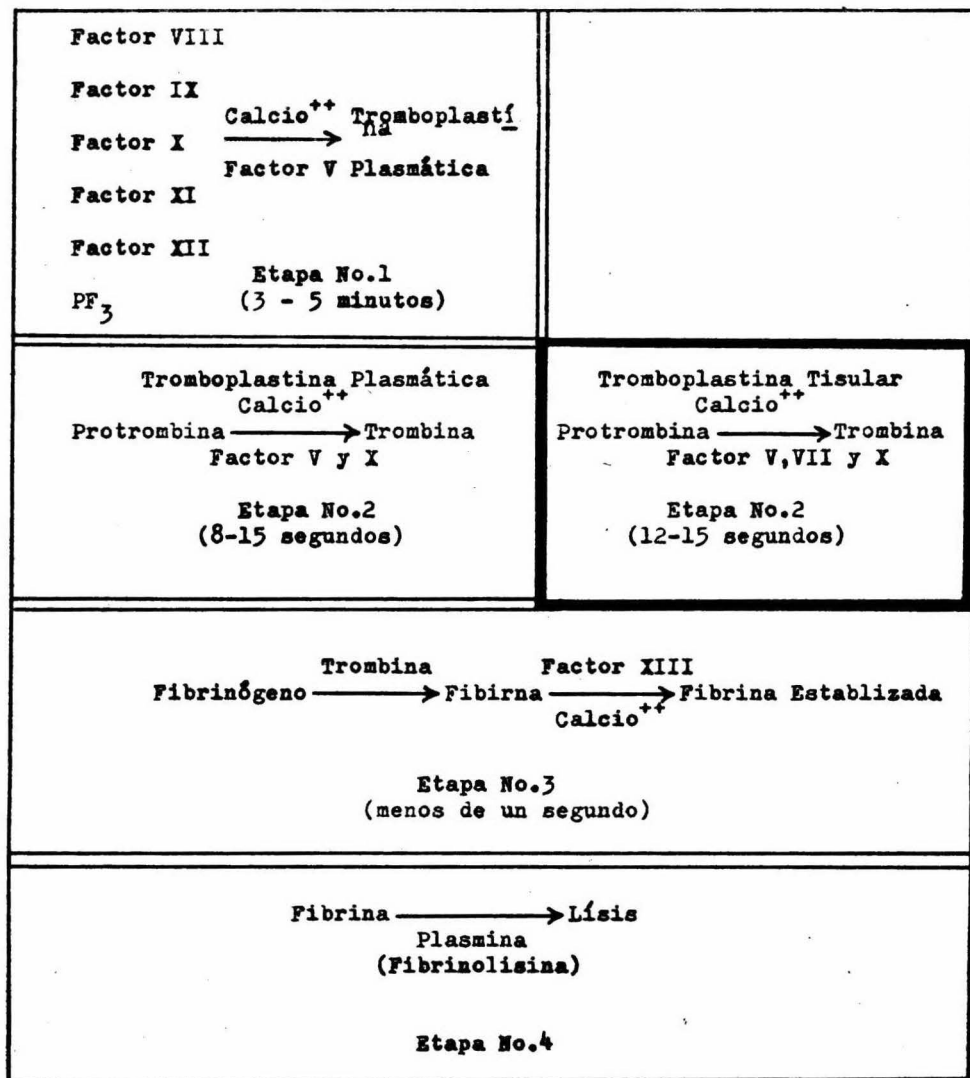
e) Sistema intrínseco y sistema extrínseco del proceso de coagulación (28).- El siguiente mecanis-

mo divide al proceso de coagulación en tres etapas básicas y una cuarta, llamada de Lisis. Conjuntamente las cuatro etapas se están efectuando continuamente, en cantidades mínimas, en el torrente sanguíneo de una persona normal.

La presencia de plasmina libre en cantidad mayor que "Trazas", es anormal.

Este mecanismo muestra claramente, "Donde" actúan los diversos extractos de TB que producirán coagulación extravascular. (Fig, No. 7).

SITEMA INTRINSECO Y SISTEMA EXTRINSECO DE LA COAGULACION

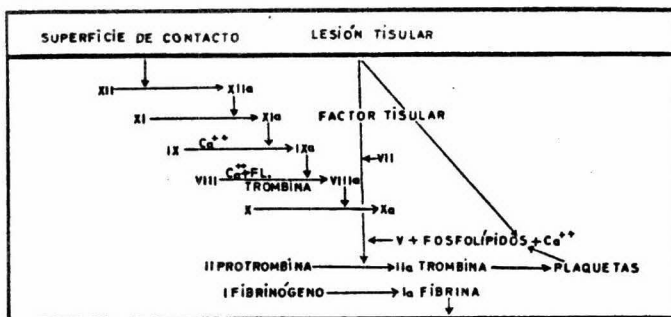


Tiempo Total:

Minimo 24 segundos
Maximo 36 segundos

Fig. No.7

f) Sistema de Cascada.- Uno de los hechos más notorios descubiertos recientemente, es el de que la coagulación se realiza por una cadena de activaciones de proenzimas a enzimas, propagada con efecto amplificante. Este fenómeno que sucede en forma de cascada recibe el nombre de "Cascada Enzimática"; esta especial denominación queda clara en la Fig. No.8:



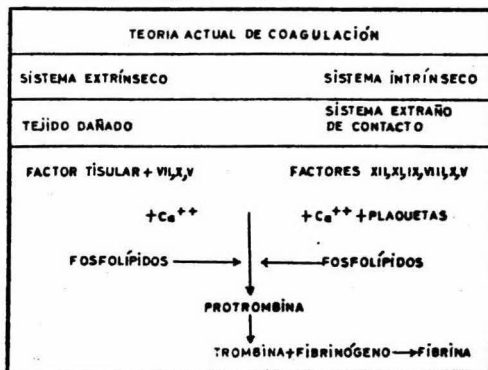
Quando el evento principia dentro de los vasos por la activación de la proenzima XII, y termina en la formación del coágulo recibe el nombre ya mencionado con anterioridad, de Sistema Intrínseco y cuando se inicia en los tejidos a partir de los Factores VII y Tisular se denomina Sistema Extrínseco.

El Sistema Intrínseco se inicia con la activación del Factor XII por una superficie extraña, (parece que también se puede iniciar por la presencia de ciertos ácidos grasos) llamada "Superficie de Contacto".

El Factor XIIa activa al XI originando el XIa. Es posible acelerar este proceso por efectos de ácidos grasos de cadena larga. Enseguida el Factor XIa

activa al IX produciendo el IXa, fenómeno que puede ser inhibido por la Heparina. El Factor IXa activa al VIII y también puede ser inhibido por la Heparina así como a la reacción trombina-fibrinógeno. Para la activación del Factor IX se requiere Calcio⁺⁺ y este mismo, fosfolípidos y trombina a baja dilución para el VIII, y el VIIIa activa al X en presencia de Calcio. El Factor Xa con el V, en presencia de calcio y fosfolípidos convierte la protrombina en trombina y ésta al fibrinógeno en fibrina por la división del primero en monómeros de fibrina y fibrinopéptidos con plimerización posterior y estabilización final. Todos los factores de coagulación se localizan en el plasma y los fosfolípidos en las plaquetas.

En el sistema extrínseco, al destruirse las células liberan los Factores Tisular y VII, los que junto con el Factor V y fosfolípidos activan el Factor Xa para transformar la protrombina en trombina y esta al fibrinógeno para dar la fibrina como final de las reacciones del Sistema Extrínseco (Fig. No.9).



En los últimos años se ha ampliado el conocimiento de los procesos de coagulación, sobre todo en lo que se refiere al papel desempeñado por las plaquetas. Estas se adhieren al vaso lesionado debido al contacto con las fibras colágenas; casi simultáneamente se agregan otras para finalmente consolidarse en un tapón dentro del cual se encuentran algunos eritrocitos, leucocitos y escasos filamentos de fibrina, el proceso se llama función hemostática de las plaquetas y necesita en sus etapas de agregación y consolidación de una fuente potente de energía suministrada por el ATP; utilizado como ADP.

Las plaquetas suministran fosfolípidos ; éstos junto con una proteína, forman el complejo denominado Factor Plaquetario, de función tromboplástica,(37).

**C.- METODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACION
DEL PRODUCTO**

Métodos de Aislamiento y Purificación.-

En la discusión de los métodos de extracción, la dificultad del proceso no se afectará por la fuente de materia prima, (cerebro o pulmón de conejo, buey, caballo o humano) sino por el tipo de reactivos (costo y dificultad de conseguirlos), equipo y tiempo efectivo de trabajo - laboratorio; además de la efectividad en cuanto a la actividad del producto.

Llegaré en cada método, hasta el punto óptimo en que el producto está listo para su aplicación.

Los métodos que trataré son:

- 1.1.- Preparación del reactivo tromboplastina obtenido de cerebro de conejo.
- 1.2.- Método de Bell-Alton
- 1.3.- Hemostático extraído de cerebro de buey según el método de Hess, A.F.
- 1.4.- Obtención de tromboplastina según Cronin, J.J.
- 1.5.- Extracto salino de cerebro humano
- 1.6.- Preparación de tromboplastina de Ortho Pharmaceutical Corp.
- 1.7.- Tromboplastina a partir de pulmón de conejo.
- 1.8.- Aislamiento de proteína tromboplastina de pulmón de becerro.

1.1.- Preparación del reactivo tromboplastina, obtenido de cerebro de conejo.-

Para este método se utiliza un Cerebro de

Conejo recién sacrificado; se limpia de las porciones visibles de sangre, se tritura en un mortero con 20 ml de acetona y 0.1 ml. de citrato de sodio 0.2M., para remover trazas de calcio. Se muele vigorosamente hasta que el material se suavice, una vez logrado esto se tira la acetona sobrenadante y se reemplaza por una nueva porción de 20 ml. de acetona y se vuelve a triturar. Este proceso se repite hasta que el material es de forma granular y no adhesiva. Filtrar por succión y secar a 37 grados C. por 30 minutos.

Mezclar 200 mg del producto en una solución 0.85% de cloruro de sodio, incubar a 50 grados C. por 20 minutos. Mezclar ocasionalmente. Colocar la emulsión en un recipiente con agua a 37 grados C. y permitir que sedimente de tal forma, que la solución pase libremente a través de una pipeta, (2).

1.2.- Método de Bell- Alton.-

Extraer con 20 ml de cloroformo 1 gramo del cerebro de conejo que ha sido tratado con acetona. Filtrar. Separar el cloroformo del producto por evaporación al vacío y suspender el extracto en 10 ml de una solución salina al 0.85%, (2).

Bell y Alton recomiendan :

- a) Lavar dos ocasiones con acetona un gramo de extracto del cerebro de conejo (obtención con acetona).
- b) Secar

- c) Suspender el secado en aproximadamente 50 ml de cloroformo a temperatura ambiente. Agitar.
- d) Evaporar a 37 grados centigrados.
- e) Homogenizar con 50 ml de una solución salina al 0.85%.
- f) Congelar (el producto no pierde su actividad si es descongelado y vuelto a congelar repetidas ocasiones).

1.3.- Hemostático Extraído de cerebro de buey, según método de Hess, A.F. .-

La preparación de TB, comunmente utilizada es la obtenida de "tejido uterino" humano, y aún más, recientemente del "hígado" de mamíferos o del cerebro del buey. El tejido que se utilizará se obtiene lo más fresco del rastro, se lava bien, se coloca en una licuadora, se extrae con solución salina y se filtra. En este tipo de preparaciones se debe observar todo tipo de normas higienicas- asepsia total.

El extracto que posee una fina suspensión de tejido en adición al jugo de este mismo, se le agrega 0.3% de tricresol. El tejido es desecado y molido en un mortero.

La dificultad que presenta esta preparación es que rapidamente se autolisa, con la formación de sustancias anti-trómbicas, lo que no hace inerte a la preparación, però si reduce su actividad (23), (32).

1.4.- Obtención de Tromboplastina según Cronin, J.J..-

En el siguiente método de obtención Cronin, J.J., (24), (3) hace referencia al método de Hess, A.F. (23) con la ventaja de que el primero aporta datos más claros al método del segundo.

CRONIN refiere: El Dr. Hess describe así la obtención de TB. Los cerebros de buey son obtenidos del rastro poco después de sacrificado el animal; se le quitan las membranas que lo cubren, se lava con agua corriente y se pesa; se coloca en una licuadora la cual posee giro en ambos sentidos, se acciona y se hace el cambio de dirección en tres ocasiones con una cantidad igual de una solución salina normal. La solución se guarda 42 horas en refrigerador y se pasa cuando menos dos veces a través de una prensa de queso. Este extracto que posee una fina suspensión de tejido en adición al jugo de éste tejido, es diluido con la mitad de su cantidad con solución salina. El tricresol (mezcla de los isómeros orto, meta y para, en la cual el isómero meta predomina (3)) es entonces añadido en la proporción adecuada tal que la preparación final tenga 0.32% del tricresol.

Se ha encontrado que el producto final está completamente estéril, libre de microbios, aerobios y anaerobios.

El producto mantiene su poder hemostático por muchos meses.

1.5.- Extracto salino de Cerebro Humano.-

Una vez obtenido el cerebro humano, se le quita la sangre que lo cubre (26) y se separan las meninges. El tejido se lava suavemente con agua y es emulsificado con un homogenizador por 60 segundos con un litro y medio de solución salina al 0.85%, previamente calentada a 45 grados. La emulsión es centrifugada durante 15 minutos a 500Xg; el sedimento es descartado. Una pequeña cantidad del sobrenadante es diluido 1:2, 1:4 y 1:8 con solución salina al 0.85%. La actividad del material no diluido y cada una de la diluciones, son usadas como fuentes de TB para la prueba del tiempo de protrombina de un paso con plasma normal. El sobrenadante restante se diluye con solución salina al 0.85% (ajustando el pH al 7.0 adicionando gotas de NaOH 0.5N, si es necesario de tal forma que esto es equivalente y que proporcionará el menor tiempo (12 a 15 segundos) para la prueba arriba mencionada.

Finalmente se agrega un volumen de la solución reguladora de Owren igual a un décimo del volumen total del extracto. Esta solución se prepara de la siguiente manera: Mezclar 11.75 gr. de barbiturato de dietil sodio, 14.67 gr. de cloruro de sodio y 400 ml de

una solución de ácido clorhídrico 0.1N. El pH se rectifica agregando aproximadamente 430 ml más hasta obtener un pH igual a 7.3. Se agrega agua hasta un volumen de dos litros. La solución resultante debe tener un pH igual a 7.35. El extracto se guarda en varios recipientes y es almacenado a -20 grados.

Este extracto proporciona (27) valores consistentes día a día; no variando el valor medio en un lapso mayor de un segundo.

1.6.- Preparación de Tromboplastina de Ortho Pharmaceutical Corporation.-

Sesenta y seis gramos de cerebro de conejo congelado, (20), son homogenizados a 5 grados centígrados por un minuto en presencia de 7600 ml de una solución acuosa conteniendo por litro, 150 ml de una solución alcohólica preparada por adición de 7.5 ml de metanol, 15 gr de glicina, 4.8 ml de una solución acuosa de ácido acético 1M. adicionada a 142.5 ml de etanol al 95%. El homogenado se agita 2 horas a 5 grados centígrados y se centrifuga a -5 grados centígrados por 30 minutos. El líquido sobrenadante es filtrado, se dializa con agua destilada a 5 grados centígrados, el material que pase a través de la membrana es liofilizado. Se obtienen 740-760 gramos de TB sólida. La actividad Tromboplástica se mide según modificación hecha al método de Shapiro y Weiner, (20).

Una suspensión TB- calcio, se prepara en un tubo de ensayo adicionando 25 mg del sólido liofilizado a 5 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 0.85% mezclando por inversión del tubo de ensayo hasta obtener una mezcla uniforme; se coloca la mezcla en un recipiente con agua a 46-50 grados centígrados por 20 minutos, centrifugar, enfriar el sobrenadante hasta temperatura ambiente, agregar 0.1 ml de una solución de cloruro de sodio 0.25M a 4 ml de la suspensión, mezclar, centrifugar. El sobrenadante (pocoturbio) se encuentra listo para realizar pruebas de actividad.

1.7.- Tromboplastina a partir de Pulmón de Conejo.-

Diez gramos de pulmón de conejo (20) congelado son colocados en 20 ml de una solución acuosa que contenga 160 ml por litro de una mezcla de alcoholes (5 ml de metanol en 95 ml de etanol al 95%). Se prepara una solución la cual posea 56 gramos de glicina, 3.12 ml de una solución de glicinato de sodio (4.5 gramos de glicina y 2 gramos de hidroxido de sodio en 100 ml de agua), 4 ml de fosfato bisódico 0.5M y 2.76 ml de fosfato monosódico 0.5M.; La preparación anterior es homogenizada 30 segundos a 5 grados centígrados, una vez logrado esto se le adicionan los 20 ml de solución acuosa ya preparada . Se agita 90 minutos a 5 grados centígrados y se centrifuga a -5 grados centígrados durante 30 minutos. El sobre-

nadante se filtra a través de un filtro de vidrio y se dializa con agua destilada a 5 grados centigrados, el dializado (la materia que pasa a través de la membrana) es capaz de coagular plasma oxalado de conejo por nuestra modificación a la prueba de Shapiro-Weiner. (tiempo de protrombina) (21).

El dializado se liofiliza obteniéndose TB activa sólida.

Se prepara una suspensión de TB-calcio en un tubo de ensayo, adicionando 30 mg del sólido liofilizado a 5 ml de cloruro de sodio acuoso al.85% se hace la mezcla invirtiendo el tubo 3 ó 4 ocasiones, hasta obtener una mezcla uniforme, se coloca la suspensión en un recipiente con agua a 46-50 grados centigrados por 20 minutos, se centrifuga, se enfria el sobrenadante a temperatura ambiente. Se agrega 0.1 ml de cloruro de calcio acuoso 0.25M a 4 ml de la suspensión. Se mezcla como ya se describió y se centrifuga de nuevo. 0.2 ml del sobrenadante (poco turbio) esta listo para la prueba de coagulación.

La solución acuosa utilizada es una solución reguladora con un rango de pH 5 a 8, (materia que pasa a través de la membrana). Es necesario que como parte activa de la solución reguladora, en una cantidad de 0.01 a 6.0% en peso de la solución extractora, este presente una

sal de un metal alcalino de bajo peso molecular de un aminoácido, y de preferencia que este(os) aminoácido(s) no contengan, en su estructura, más de nueve átomos de carbono tal como alanina, prolina, glicina o serina. La cantidad preferida es de 1 a 2% en peso.

1.8.- Aislamiento de Proteína Tromboplástica de Pulmón de Becerro.

En un experimento típico se maceran 1860 gramos de pulmones de un becerro (o buey) recién muerto y extraídos en un refrigerador o en un cuarto frío con 3 litros de solución salina fisiológica durante 12 horas. El material se filtra a través de una bolsa de lienzo o manta, se obtiene 1950 c.c. de una solución turbia la a d a d i c i o n de una solución saturada de sulfato de amonio, (10% de la saturación) resulta en la formación de un precipitado, el cual después de enfriado se centrifuga y posteriormente es descartado. El sobrenadante se lleva a una saturación del 30% con sulfato de amonio y la mezcla se mantiene fría toda la noche. El precipitado resul t a n t e, se separa del sobrenadante inactivo por centrifugación- en una centrifuga angular refrigerada- a 4000 r. p.m., se toman en 200 ml de solución salina fisiológica y se dializa con agua corriente durante 12 horas. La com pl e t a se par ac i o n de las sales por diálisis es suficiente para precipitar la proteína (en algunos experimentos la ad i c i o n de unas gotas de ácido acético diluido a la mez

cla dializada produce una precipitación completa de la proteína tromboplástica). Después de ser separado del sobrenadante inactivo, el precipitado se congela con una mezcla sólida de alcohol - CO₂ y secado en éste estado al alto vacío. La sustancia completamente deshidratada y después de lavados exhaustivos con hielo seco - acetona y secada al vacío pesa 8.5 gramos.

Las preparaciones obtenidas bajo éste método pueden ser almacenadas por mucho tiempo sin pérdida de actividad.

Como es claro, en el proceso de secados, la TQ es poco soluble en agua y diluible en soluciones salinas; el trato con acetona no afecta su actividad; tratamientos con alcohol producen pérdidas en la actividad tromboplástica y las emulsiones acuosas preservan por completo, la potencia de la sustancia.

**D.-PRUEBAS DE ACTIVIDAD
DEL PRODUCTO Y APLICACIONES**

Pruebas de Actividad del Producto.- Las pruebas de actividad son con el objeto de verificar la actividad del producto obtenido. En función de estos resultados se denotará la efectividad de la extracción, por lo que es necesario utilizar un estandard de pruebas que cumpla ciertos requerimientos, un método que cumpla las condiciones necesarias es en la que hay que obtener 4.5 ml de sangre humana por medio de una puntura venosa según la técnica común. Después de obtenida la muestra, es preciso que las pruebas se realicen lo más pronto posible. Mezcle la sangre con 0.5 ml de oxalato de sodio 0.1M. centrifugue para separar el plasma.

La velocidad de centrifugación debe de ser exacta, 2500 r.p.m. durante 5 minutos. Si se utilizan pipetas provistas de un bulbo de hule, se obtiene una cantidad apreciable de plasma, sin dañar las paredes de las células.

Otro estandard de pruebas de actividad aceptable, es el plasma humano citratado (35).

Las pruebas de actividad de la TB son realizadas básicamente con la sangre a analizar, en las condiciones mencionadas, otro tipo de pruebas (poco usuales) es inyectar el producto IN VIVO y producir traumas o la muerte del animal.

El valor normal de coagulación de la san-

gre colocada en un baño maría a 37 grados, es de 4 a 8 minutos. Si el tiempo de coagulación se prolonga, indicará deficiencia marcada en los factores de coagulación o presencia de anticoagulantes circulantes, incluyendo a la heparina (26), (anti-trombina (2)).

Las pruebas son con el objeto de conocer de defectos en la coagulación sanguínea; los que se detectan por medio de las siguientes pruebas (2), (Ver Fig. No 2):

- ETAPA 1 y 2 - Tiempo de consumo de Protrombina o Generación de TB
- ETAPA 3 - Tiempo de Protrombina de un paso y tiempo de Protrombina
- ETAPA 4 - Tiempo de Trombina

De éstos, interesan exclusivamente, las correspondientes a los pasos dos y tres, ya que en ellas interviene la TQ.

ETAPA 2.- Tiempo de Consumo de Protrombina.

Cuando la sangre coagula en un tubo de ensayo a 37 grados centígrados, la cantidad de protrombina remanente en el suero es determinada por la prueba del tiempo de protrombina de un paso, siendo una medida cuantitativa de la protrombina consumida y una estimación cuantitativa indirecta de la cantidad de TB intrínseca generada. Son reconocidos tres factores para la formación de TB en el plasma, el factor plaquetal y los factores VIII y IX.

El rango normal de coagulación es de 16 a 35 segundos. En caso de trombocitopenia y de hemofilia es de 8 segundos, debidoa que la protrombina inactiva es convertida al estado libre y no es consumida.

Procedimiento: Transfiera un ml de sangre fresca a un tubo de ensayo, (13 x 100 mm) y colóque en baño maría a 37 grados centígrados cincuenta minutos despues de formado el coágulo sólido, centrifugar durante 1 a 2 minutos a 1000 r.p.m. para separar el suero del coágulo. Incube a 37 grados centígrados por 45 minutos. Para determinar la protrombina residual, pipetear 0.1 ml de suero y soplar dentro del tubo una mezcla compuesta - por un mililitro de plasma de conejo sin protrombina, 0.1 ml de TB y 0.1 ml de cloruro de calcio 0.02M determine el tiempo de formación del coágulo con un cronómetro (2).

ETAPA 3.- Tiempo de Protrombina en un Paso

Cuando se agrega calcio (26) y un extracto de tejido, como es el obtenido de cerebro, el Factor VII presente en el plasma reacciona con el Factor Tisular formando un producto, el cual convierte al Factor X a su forma activa Xa; éste reacciona con Factor V, con el calcio y con el fosfolípido del tejido TQ para formar protrombina extrínseca la cual convierte protrombina en trombina. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina. La concentración de los factores V, VII, X, protrombina y fibrógeno

El tiempo normal de protrombina, se prolonga por falta de protrombina (2) de los Factores V, VII y X; además una causa importante de esto es una concentración baja de vitamina K o la presencia de un antagonista de ella, la bishidroxycumarina.

Procedimiento: Un volúmen de extracto de cerebro (TB) se mezcla con un volúmen igual de cloruro de calcio 0.025M, la mezcla se coloca en baño maría a 37 grados centígrados 0.1 ml del plasma-prueba, se pipetea en un tubo de ensayo (12 x 7.5 mm) inmediatamente antes de la prueba. La mezcla es colocada en un baño maría a 37 grados centígrados durante un minuto. 0.2 ml de la suspensión extracto-cloruro de calcio se agrega al plasma y se acciona el cronómetro el tiempo de coagulación se determina cuando aparece la primera fibra de fibrina; logrado esto se hace recorrer la mezcla por las paredes del tubo, aproximadamente hasta la mitad de éste.

Alternativamente, 0.1 ml del extracto de cerebro es adicionado a 0.1 ml del plasma-prueba, y EXACTAMENTE un minuto despues, agregar 0.1 ml de cloruro de calcio 0.025M.

Cada prueba se realiza por triplicado promediando los valores obtenidos, esencial para un control de pruebas.

ETAPA 3.- Tiempo de Protrombina para la Coagulación.

El tiempo básico de protrombina, es el tiempo de coagulación obtenido cuando un exceso de TB y una cantidad óptima de calcio se añaden.

El tiempo de protrombina del plasma de un humano adulto es prácticamente constante: 12 ± 0.5 segundos.

Procedimiento: Transfiera 0.1 ml de plasma oxalatado a un tubo de ensayo (13 x 100 mm). Adicione 0.1 ml de TB (de preferencia utilice el método de obtención 1.1). Coloque la preparación en baño maría a 37 grados centígrados y sople dentro 0.1 ml de cloruro de calcio 0.1M por medio de una pipeta de protrombina.

Determine con un cronómetro el intervalo de tiempo entre la adición de cloruro de calcio y la formación del coágulo.

La formación de la fibrina es el punto final de la prueba. El coágulo se detecta en forma más clara, agitando un poco el tubo de ensayo (2).

P A R T E E X P E R I M E N T A L

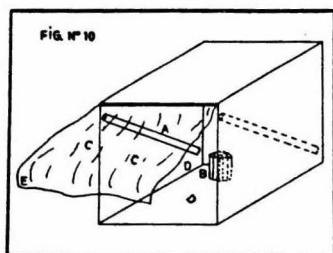
E.- Condiciones previas al Experimento.-

Antes de iniciar un experimento, en este caso la extra
cción del TB, es necesario tomar en cuenta lo siguiente:

- a) La cámara esteril. Características y pruebas de esterilidad.
- b) Limpieza del material utilizado.

a).- La Cámara Esteril. Características y Pruebas de Esterilidad.- Con el propósito de extraer tromboquinasa de cerebros de conejo, fabriqué una cámara o sección bajo las siguientes condiciones:

- A').- Aislada del medio ambiente
- B').- Esteril



- a) Lámparas
- b) Formol (frasco)
- c) Guantes Polietileno
- d) Forro anterior de polietileno negro
- e) Tapa de polietileno transparente.

El aislamiento del medio lo logré forrando un cajón armado en el sitio adecuado, es decir, cerca de una toma de vacío, gas, agua, con "lienzos" de Polietileno, sellando todas las uniones con cinta adhesiva y pegamento. La Esterilidad dentro de la cámara la obtuve

con dos elementos:

- 1.- Formol. (Solución de Formaldehído, formalina solución al 37% de formaldehído (gas) en agua; con 10-15% de metanol para evitar polimerización q. incoloro. P.E. 96 grados pH 2.8-4.0 miscible en agua, alcohol, acetona. Uso: germicida y fungicida destruye varios tipos de insectos.
- 2.- Luz Ultravioleta.- pero, ¿que longitud de onda posee la luz U.V.? ¿cual es la más útil? ¿cómo actúa y como actúa en el resto de ellas?, ¿en donde son útiles?

Es importante hacer notar que los rayos ultravioleta no son detectados por los sentidos humanos de inmediato, aunque los efectos pueden ser aparentes posteriormente.

Es posible hacer una separación de los rayos ultravioleta, de acuerdo con la longitud de onda de los mismos, así pues, tenemos cuatro divisiones:

La primera división está comprendida entre los 330 y 400 nanómetros y es la que se encuentra más cerca de la parte visible del ojo humano. Esta longitud de onda es especialmente útil en ciertas clases de fotografía y fluorescencia, tanto médico y de laboratorio como en la industria.

La segunda división comprende de 280 a 330 nanómetros y es en esta sección en donde se encuentran beneficios biológicos útiles en fisioterapia o para activar la vitamina D, y que comúnmente se utilizan para

broncear la piel.

La tercera división comprende de 200 a 295 nanómetros y es esta la longitud de onda útil para provocar la absoluta destrucción de los microorganismos, actuando de esta manera como bactericida potente.

La cuarta división comprende de 100 a 200-nanómetros, esta longitud de onda además de ser germicida forma ozono lo cual aumenta su efecto, llegando a producir por tanto, esterilidad total.

Los tubos de cátodo frío y de alta intensidad, están divididos en tubos de bajo ozono, alto ozono y muy alto ozono. El factor de ozono es muy útil, no solo para oxidar (matar) gérmenes en el ambiente (Ver Fig. 11) sino que también tiene la

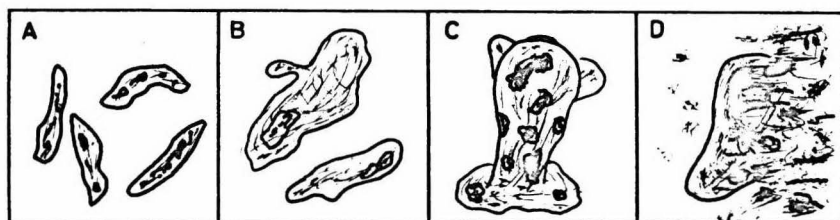


Fig. No. 11.- Demostración esquemática cómo las radiaciones ultravioleta matan las bacterias. A).- Vista microscópica normal de microorganismos. B).- El organismo comienza a dilatarse cuando recibe las radiaciones C).- Al continuar la irradiación, la dilatación continúa y la membrana celular comienza a debilitarse. D).- Finalmente, el microorganismo queda destruido por explosión.

facultad de poderse filtrar en lugares y ranuras en donde no penetra la radiación ultravioleta.

Con los tubos de cátodo caliente el costo es inicialmente bajo; pero son de corta vida, con un costo de operación que representa un mayor gasto; este tipo de tubos se ven afectados por temperaturas bajas (corrientes de aire frío), cambios de voltaje, calentamiento excesivo que implican precauciones tediosas.

Las lámparas de luz ultravioleta se encuentran en diferentes tamaños, voltajes y potencias de irradiación ultravioleta. Además de diferentes tipos de costo y vida, cada una diseñada para aplicaciones específicas.

Se han promovido grandes discusiones acerca de los efectos que sobre los animales y especialmente sobre la gente pudieran causar largas exposiciones a los rayos ultravioleta, se ha dicho, que pueden ser responsables de muchos padecimientos, desde cáncer hasta esterilidad; pero esto es tan poco cierto, que más bien las especulaciones al respecto se deben a la mala información de las personas y al poco conocimiento que se tiene de los rayos ultravioleta. Es necesario hacer incapié, en que todos nosotros alguna vez hemos estado o estaremos expuestos a la acción prolongada de los rayos solares que contienen gran cantidad de irradiaciones U.V.. Sin embargo no se ha visto que alguien resulte afectado de forma seria.

Existe la creencia mal fundada, de que los

rayos ultravioleta son responsables de cierto tipo de cáncer en la piel, o bien, de la caída del cabello, o de la esterilidad de las personas. Hasta ahora no se ha comprobado que así sea.

Las personas que trabajan con los rayos UV, estando debidamente protegidas con ropa adecuada, no sufren quemaduras ni alteraciones de ninguna especie. Hasta cierto punto los rayos UV son inócuos para la vista. Es decir no la afectan seriamente, salvo que con prolongadas exposiciones, sin utilizar goggles adecuados, pueden producir una conjuntivitis bastante molesta y dolorosa, pero que cede fácilmente en unos cuantos días. Resulta de suma importancia recalcar, que la conjuntivitis que producen son completamente inofensivas aunque si resultan dolorosas, cediendo en unos tres días.

Con respecto al poder de penetración de los rayos UV, los de longitud de onda muy corta, es decir, de 253.7 nanómetros tienen muy poca penetración, no pueden pasar por un cristal común o son absorbidos por el aire produciendo ozono; penetran los tejidos aproximadamente un milimetro; atraviezan con facilidad el polietileno y ciertos tipos de plásticos transparentes.

En cuanto a una sección estéril, ésta debe ser planeada lo más sencillo posible, de paredes lisas; guardar en ellas exclusivamente el material con que se vá a trabajar. El sellado de la sección estéril

puede llevarse a cabo con diversos plásticos adhesivos.

Para conservar la esterilidad de las secciones, las lámparas germicidas deben mantenerse encendidas 24 horas (39) ¿ es cierto que la lámpara, donde se extraerá la tromboplastina, es una sección estéril? para corroborar ésto último, utilicé dos tipos diferentes de medios de cultivo que permitieran, por sus características, representar la esterilidad o la no esterilidad de la zona que pretende serlo. La composición química de los dos medios de cultivo son:

MEDIO DE MUHSHIGE (40)

NH_4NO_3	-----	1650 mg/ml
KNO_3	-----	1900 mg/ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-----	440 mg/ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	370 mg/ml
KH_2PO_4	-----	170 mg/ml
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	-----	37.3 mg/ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	27.8 mg/ml
H_3BO_4	-----	6.2 mg/ml
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-----	22.3 mg/ml
KI	-----	0.83 mg/ml
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-----	0.25 mg/ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-----	0.025 mg/ml
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-----	0.025 mg/ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-----	8.6 mg/ml
SACAROSA	-----	30 g/l

MYO-INOSITOL -----	100 mg/ml
EDOMINA -----	1 g/l
GLICINA -----	2 mg/l
2,4 - D -----	1-36 mg/l
KINETINA -----	0.04-10 mg/l
AGAR -----	10 g/l
AC. NICOTINICO -----	0.5 mg/l
PIREDOXINA - HCl -----	0.5 mg/l
TIAMINA - HCl -----	0.1 mg/l

GELATINA NUTRITIVA

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA (41)

PEPTONA GELYSATE -----	5.
EXTRACTO CARNE RES -----	3.
GELATINA -----	120.
pH FINAL	6.8 [±]

Coloque cuatro muestras de cada uno de los cultivos mencionados, dentro y fuera de la cámara, bajo el siguiente esquema (Ver Fig. No.12):

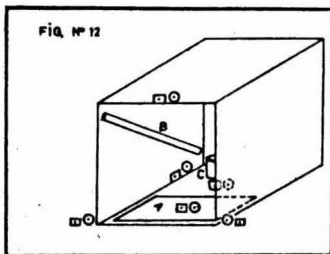


Fig. No. 12

- A).-Zona de Trabajo
- B).-Lámparas U.V.
- C).-Formol
- .-Gelatina Nutritiva
- ⊙.-Medio de Murshige

Las muestras colocadas en el exterior de la cámara funcionan como control o testigos de contaminación.

Los resultados que obtuve fueron los que esperaba : Las muestras colocadas dentro de la cámara y después de incubarse durante 50 horas en el interior de una incubadora saturada con formol a \pm 40 grados centígrados, no mostraron crecimiento alguno, en cambio, las muestras colocadas en el interior de la cámara, después de incubarse bajo las mismas condiciones, mostraron todas, crecimientos en diferentes zonas de la parte expuesta del medio de cultivo; tomando en cuenta estos resultados, y considerando que por el momento no me interesa que microorganismos formaron colonias, aseguro que la zona donde realizaré la extracción de TQ le puedo llamar "Sección o Cámara Esteril".

b) Limpieza del Material Utilizado.-

El material de cristal, así como el mortero con su pistilo lo limpié químicamente; primero con agua y detergente tipo comercial, posteriormente con mezcla crómica. El proceso lo repetí tres ocasiones enjuagando finalmente con agua destilada dos ocasiones, y secando el equipo perfectamente (4); junto con las dos soluciones que utilizaré, lo introduje por una abertura hecha ex-profeso a la cámara estéril, dejando todo en su interior y lo más cercano posible a las lámparas ultravioleta aproximadamente 25-30 horas para considerar nuevamente estéril la sección junto con el equipo de trabajo.

F. - Experimentación:

El método que seguiré para extraer la tromboplastina, está basado en el siguiente proceso:

Preparación del reactivo tromboplastina -
(Ver métodos de aislamiento y purificación, 1.1.) .- Los cerebros de conejo los obtuve de dos conejos sanos (sin certificado); sacrificados con un golpe en la nuca con el propósito de evitar, con una posible anestesia, el que los cerebros fueran dañados. Una vez obtenidos, los coloqué en un recipiente perfectamente cerrado y colocado sobre hielo. Obtuve 10.63 gramos de cerebro de conejo.

Siguiendo la técnica utilicé 0.1 ml de citrato de sodio (citrato de sodio ácido, citrato disódico alkacitrón, solido blanco, $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$, P.M-263.13 solubilidad: 1g/ 2 ml H_2O uso: anticoagulante (43)), - 100 ml de acetona (Dimetil-cetona; - cetopropano; 2- propanona; éter piroacético CH_3COCH_3 -P.M-58.08 liquido altamente flamable miscible con agua, alcohol dimetil formamida, cloroformo éter P.eb.56.5 grados P.F-94 grados uso: solvente), que corresponden a cinco lavados. Filtro y seco el producto a 36-37 grados centígrados obteniendo 1.756 █ gramos de cerebro de conejo deshidratado, los cuales suspendo en 43 ml de cloruro de sodio al 0.85% (p/v) - - (cristales cubicos blancos P.M.58.45 P.F. 809° solubilidad 1 g/2.8 ml H_2O (25°C.); 1 g/2.6 ml H_2O (100°C.)insoluble en ácido clorhídrico concentrado.Su solución acue-

sa es neutra pH 6.7-7.3). La suspensión blanquecina resul_u
tante la almaceno en un refrigerador a 0°- 5°C.

G.- Prueba de Identificación.- La TB no posee hasta el momento, una estructura determinada, debido a la complejidad de sus componentes, por tal motivo se le identifica por medio de su actividad en la coagulación.

El método que utilizaré con el objeto de identificar la actividad del producto obtenido es utilizado la prueba del tiempo de protrombina, utilizaré plasma humano oxalatado liofilizado obsequiado por una firma comercial.

El procedimiento que utilizaré, es el mencionado en "Pruebas de Actividad del Producto y Aplicaciones"; como Paso 3: Tiempo de Protrombina para la Coagulación.

Los resultados que obtuve son en función del tiempo en que se produce el coágulo. El tiempo óptimo de coagulación de plasma humano oxalatado es de 12 ± 0.4 seg.

Realicé seis pruebas con los siguientes resultados:

- 1.- 13.6 segundos
- 2.- 11.4 segundos
- 3.- 12.3 segundos
- 4.- 12.6 segundos
- 5.- 11.8 segundos
- 6.- 11.7 segundos
- \bar{X} = 12.23 segundos

4.- CONCLUSIONES.- La tromboplastina que obtuve en el laboratorio fué utilizado el proceso más representativo, en cuanto que de un modo sencillo en su desarrollo, permite obtener un producto de excelente ca lidad, a la vez que dá oportunidad de aplicar conocimien tos relativos a la Bioquímica. Esto último me permite ha cer varias sugerencias referentes al inicio de una nueva área en el Laboratorio de Química Experimental Aplicada. Es imprescindible para inciar esta área, el creer en la capacidad e interes de cada alumno y en el criterio aca démico de cada uno de los profesores que componen dicho laboratorio. El profesor será guía-alumno en cada uno de los experimentos.

Es indudable la necesidad de una prepara ción previa por parte de los profesores, en cuanto a co nocimientos básicos sobre la Bioquímica, su desarrollo - experimental y sus aplicaciones útiles; es aquí donde ra dica un serio problema, que es conocido por todos nosq tros: la apatía por ampliar REALMENTE nuestra cultura.

"Si la Ambición no te daña, careces de ella"

K. Norris.

Una vez obtenido este conocimiento, resul- tará de lo más sencillo destinar una sección aislada que reúna las condiciones de pulcritud para un laboratorio - dentro del cual se realizarán, por ejemplo, fermentacion es tanto aerobias como anaerobias, así, los controles (pH, temperatura, agitación _ _ _) estarán en concordana

cia con la técnica utilizada y los fines específicos que se persiguen (obtención de un alcohol, de una antibiótico, de ácido láctico, etc.), de aquí es viable proseguir con la extracción del producto final del medio de fermentación. La muestra puede requerir de una precipitación por modificación del pH, cambio de solvente, de una cristalización o hasta de una liofilización, de tal forma, que simultáneamente otro alumno puede realizar la síntesis química de ese mismo producto (siempre que sea posible) y comparar resultados. Se pueden preparar derivados de ambos productos, tal que nuevamente, bajo minucioso análisis (electroforésis, IR, UV, cromatografías, análisis químicos- - -) se corrobore la pureza de la materia obtenida y que finalmente se llegue a concluir algo que aumente el conocimiento teórico-experimental del "Alumno". Esto último es, en mucho, idéntico a lo que actualmente es el Laboratorio de Química Experimental, solo que la sutil diferencia es trabajar con la Bioquímica y en mi concepto, esto es iniciar una nueva área; aprender un poco, aplicar lo conocido y obtener un gran resultado.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- NASON - "Biologia", Limusa-Wiley, S.A. México-1969
- 2.- OSER - "Hawk's Physiological Chemistry", 40th ed. McGraw-Hill, Inc. N.Y.-1965
- 3.- THE MERK INDEX-AND ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL AND DRUGS, 8th Edition, N.J.-1968
- 4.- ORTHO DIAGNOSTICS - "Coagulation Procedures" USA. 1968
- 5.- BLACOW - "The Extra Pharmacopea", 26th Edition , London 1972
- 6.- J.A.M. MED. ASSOC. 180 - 753 - 1962
- 7.- WOHLISCH, E. ERGEBN- "Physiology 28 - 443 - 1929.
- 8.- COHEN, S.S. and CHARGAFF, E. - Studies in the Chemistry of blood coagulation - J.Biol. chem., 136 - 243 - 1940.
- 9.- SCHMIDT, A. - Zur Blutlehre, Leipzig-99 - 105-1892
WEITERE, B. - Zur Blutlehre, Wiesbaden-231-1895
- 10.- WOOLDRIGE, L.C. - Arch. Anat. U. Physiol., Physiol. Abt. 389-1883
- 11.-ZAK, E. - "Arch. Exp. Path. U. Pharmakol.", 70-27 1912
- 12.-HOWELL, W.H. - "AM.J. Physiol., 31 - 1, 1912-13
- 13.-BORDET, J. AND DELANGE, L. "Ann. Inst. Pasteur 27 341 - 1913
- 14.- McLEAN, J. - "AM. J. Physiol., 41 - 250, 1916 ; 43 - 586, 1917
- 15.- CHARGAFF, E. - "ET-AL., J.Biol. Chem., 116 -237 1936
- 16.- QUICK, A. - " Ann. Int. Med., 55 - 201, 1961
- 17.- LORAND - "Progress in Coagulation" Transactions of conference of international committee on blood clotting factors. Ger., 1961
- 18.- BIGS AND DOUGLAS - "J. Clin. Pathol., 6 -23, 1953.
- 19.- QUICK, A. - "AM.J. Physiol., 174 - 123, 1953

- 20.- SING, H.O., PLAINFIELD AND SWART, E.A. - "Preparation of thromboplastin Pat.2,842, 480, USA, 1958
- 21.- SHAPIRO AND WEINER - "Coagulation, thrombosis and Dicumarol", Brooklyn Med. Press., N.Y. 1949
- 22.- No_aparece
- 23.- HESS, A.F. - "Tissue Extract as a Hemostatic" J. A.M.A. - April 24, p.p. 1395, 1915.
- 24.- CRONIN, J.J. - "Thromboplastin (Tissue Extract) as a hemostatic., J.A.M.A., 66 (8) - 557-8, 1916.
- 25.- No_aparece
- 26.- WILLIAMS - "Hematology", MC GRAW-HILL, N.Y., 1972
- 27.- QUICK - "Hemorrhagic diseases and thrombosis", 2nd edition, Lea and Feibiger, Philadelphia 1966.
- 28.- WARNER CHILCOTT LABS. DIV. - "Reactivos para diagnóstico de laboratorio clínico", 1971
- 29.- BELL, W.N. AND ALTON, H.G.- "A Brain Extract as a substitute for platelet suspension in the thromboplastic generation test nature, p.p. 174-880, London, 1954
- 30.-HOUGIE - "Fundamentals of blood coagulation in clinical medicine", N.Y., 1963
- 31.- LILIENFELD, L. - "Z. Physiol. Chem., 125 -671, 1895
- 32.- THOMPSON, W.H. - "Z. Physiol. Chem., 29 - 1, 1900
- 33.- SCHULZ, F.N. - "Z. Physiol. Chem., 24 - 449, 1898
- 34.- ZUNZ, E. AND LA BARRE, J. - "The actions of the Fosfatides on the coagulation of blood" J. Arch. Inter. Physiol., 18 -116-27, 1921
- 35.- GOOSSENS, N. - "Stability of Thrombokinase So Ls" Med. Monatsscher, 6 - 229-32, 1952.
- 36.- TUDORANV, G. - "ET-AL. Chemical Anticoagulating Agents. Le Sang., 21 - 511-14, 1950

- 37.- SOTO - " Cirugía y Cirujanos", Hemorragia y Hemostasis.
- 38.- NOTA DEL AUTOR - SUTHERLAND, H.L. BULL. Mississippi State Board of Helath.
- 39.- GENTRY - "La Luz Ultravioleta en áreas Estériles" , Publicación de Ultravioleta, S.A.
- 40.- MURHSHIGE, T.F. - " A revised Medium for rapid growth an Bio assays with tobacco tissue cultures". Phy Plathrum, 5 - 473-497, 1962.
- 41.- RODHE, P.A. (ED) - "Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos ", BBL.,USA 1968.
- 42.- THE MERCK INDEX - AND ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL AND DRUGS, 7th Edition, N.J., 1960
- 43.- BRITISH PHARMACOPEIA - Pub. By Ph. Press London , 1968.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

Estas citas Bibliográficas no las utilicé en la presente Tesis, debido a la dificultad que presenta - el localizarlas; las incluyo con el objeto de dejar constancia de que los temas tratados no son exhaustivos, y que aún hay que aprender mucho de ellos.

- 1'.- HANZLIK, P.J. AND WEIDENTHAL, C.M. - "The Hemostatic properties of thromboplastic agents under different conditions". J. Pharmacol 14 - 189-210, 1919.
- 2'.- KAZAL, L.A. AND ARNOW, L.E. - "The use of horse brain thromboplastin for the Det. of Prothrombin". AM. J. Med. Sci., 207 -268 , 1944.
- 3'.- KAZAL, L.A. - "Horse-Brain thromboplastin IV. Stabilization of activity of Bryied Brain" prep. arch. biochem., 10- 183-93, 1943
- 4'.- KAZAL, L.A. - "Horse-Brain Thromboplastin III, stabilization of activity of solutions" ,. Arch. Biochem., 10 - 173-82, 1946.
- 5'.- MAROTTA, C. - "Preparation of stable thromboplastin Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.,19-107-8, 1944.
- 6'.- DE GAETANI, G.F. - "Determination of Prothrombin (preparation of thromboquinase). Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.,21 - 327 - 8 , 1946.
- 7'.- DEVI, A. - "Blood Coagulation I preparation of thromboplastin from dif. tissues" Bull. Calcuta School. Trop. Med. 3 - 106- 6, 1955.
- 8'.- BERTRAND, I.TH., GILLET-HALLIAN AND QUIVY,D. - " Comparative activities of certain thromboplastic subs. in diff. animal species" Compt. Rend. Soc. Biol.,137-283 - 7 , 1943.

- 9'.- MARCUSSEN, E. AND WOLFFBRANDT, G.G. - "The prep. of thromboquinase by fractionation of brain extracts". the prep. of thromboquinase tablets. Dansk tids. Farm., 18-90-103 , 1944.
- 10'.-HURN, M., BORKER, W. AND MARGHAT, T.B. - "The determination of protrombin time following the administration of dicoumarol". 3,3'-Methylen -Bis(4-Hidroxy Coumarin) with especial reference to thromboplastin. J. Lab. Clin. Med., 30 - 432-47, 1945
- 11'.-STUDER, A. - "Thromboquinase". Jubilee Vol Emil . Bareil, 1246- 229-37.
- 12'.-MENON, IG.K. - "Studies in the coagulation of blood Indian J. Med. Research, 34 - 193-203, 1946.
- 13'.-KAGANI, M. - "Blood coagulation- I thromboplastin Generation test". Nippon Nai Kagakkai Zasshi, 46 - 1562-76, 1958.
- 14'.-VOLLE, N.H. - "Extraction of thromboquinase from rabbit brain" USA. pat. 2,349,316, 1946
- 15'.-SMITH, H.P. - "Thromboplastin from beef lung". USA. Pat. 2,516,216, 1950.
- 16'.-KAZAL, L.A. - "Thromboplastin a testing agent" USA. Pat. 2,516,216. 1950.
- 17'.-MORELLI, G.H. - "Preservation of thromboplastic reagent". Frensa Médica Argentina 31 (42) -2108-11, 1944.
- 18'.-FERGUSON, J.H. - "Thromboplastic action of plasma proteinase (tryptase). Proc.Soc. Exptl. Biol.Med, 64 - 302-5, 1947
- 19'.-TOCANTINS, L.M. - "A lipid anticoagulant from brain tissue." Physio-chem. Charact. and action in vivo and in vitro. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 68 - 110-17, 1948.
- 20'.-WAALER, B.A. - "Simultaneous contribution to the formation of thrombin by the intrinsic and extrinsic blood clotting system". Scand. J.Clin. and Lab. Investigation. 9 -322-30, 1957.
- 21'.-HORANYI, M. - "Origin of thromboplastin". Acta Med.

Scand. 134 - 448-53, 1949

- 22'.--ASTRUP, T. - "Biochem. of blood coagulation". Acta Physiol. Scand suppl. 21, 1944.
- 23'.--FULLER, J. - "Frozen thromboplastin extracts in prothrombin" Det. AM. J. Clin. Pathol. 17 - 891-6, 1947
- 24'.--DAWSON, D.W. - "The detection of a circulating anti coagulant active against blood thrombo-
plastin formation". J. Clin. Pathol. 10-
346-7, 1957.
- 25'.--QUICK, A. - "Properties of thromboplastin (aqueous tissue extract)." AM. J. Physiol. 114 - 282-96, 1936.
- 26'.--QUICK, A.J. - "The action of heparin and its relation to thromboplastin". AM. J. Physiol. 115- 317-33, 1936.
- 27'.--HONORATO, R.C. - "The plasmatic co-factor of thromboplastin its absorption with prothrombin and fibrinogen, by albumina and tri calcium Phosphate Gels". AM. J. Physiol. 150 - 381-8, 1947.
- 28'.--KAPLAN, F.E. ETAL - "Qualitative differences between brain and lung thromboplastin suspensions". AM. J. Physiol. 162 - 293-300 1950.
- 29'.--BORDET, J. - "Theories on coagulation of blood" Ann. Inst. Pasteur. 34 - 561-95, 1920.
- 30'.--SMITH, H.P. AND FLYN, J.E. - "The coagulation of blood". Ann. Rev. Physiol. 10 - 417-44, 1948.
- 31'.--ZUNZ, E. AND LA BARRE, .J. - "The action of Phosphatides on the coagulation". Arch. Intern. Physiol. 118 - 116-27, 1921.
- 32'.--BLAUSTEIN, A. ET-AL - "Studies on the clotting activity of extracts of normal and diseased tissues. Arch. Surg. 63 - 592-8 , 1951.
- 33'.--FISCHER, A. - "Coagulation Time and Conc. of the coagul. subs.", Biochem. Z. 278 - 278-5 1935.

- 34'.-QUICK, A.J. - "The determination of prothrombin".
Conf. blood clotting and allied problems trans. 1 - 170-2, 1948
- 35'.-OVERMAN, R.S. - "Method for the determination of
prothrombin time (clotting)" Conf.
blood clotting and allied problems.
Trans. 1 - 177-9, 1948.
- 36'.-HOWELL, WM.H.- "The isolation of thromboplastin from
lung tissue". John Hopkins Hosp. 76
295-301, 1945.
- 37'.-MILLS, C.A. - "Is cephalin necessary for the activa-
tion of prothrombin". Chinese J. Physiol. 1 - 435-8, 1927.
- 38'.-CHARGAFF, E. - "Studies in the mechanism of the throm-
boplastin effect". J. Biol. Chem. 173
253-262, 1948.
- 39'.-CHARGAFF, E. AND WEST, R. "The Biological significance
of thromboplastin protein of blood"
J. Biol. Chem. 166 - 189-97, 1946.
- 40'.-OVERMAN, R.S. AND WRIGHT, I.S. "A new blood clotting
inhibitor". J. Biol. Chem. 174 - 759-
60, 1948.
- 41'.-MILSTONE, J.H. - "Three-Stage analysis of blood coa-
gulation". J. Gen. Physiol. 31 - 301-
24, 1948.
- 42'.-HECHT, E. - "Chem nature of coagulation" Activa-
tors. Le Sang. 21 - 486-93, 1950.
- 43'.-FISCHER, A. - "Coagulation of the blood as a chain
reaction". Nature. 135 - 1075, 1935.
- 44'.-BORDET, J. - "Researches on the coagulation of --
blood" Mode of union of zero zyme and
cytozyme. Reunión Soc. Belge., Biol.
921-2, 1919.
- 45'.-MELLANBY, J.- "Supposed coagulation of oxalated --
plasma" by try. J. Proc. roy. Soc. B-
117 - 352-7, 1935.
- 46'.-CHARGAFF, E. AND BENDICH, A. - "Thromboplastic Subs.
the desintegration of macromolec. tiss.
lipoprotein.". Science 99 - 147-8, 1944.
- 47'.-STUCKERT, G.V. - " Chem Comp. of brain (ox-brain).

Cordoba Médica. 2 - 13-9, 1927.

48'.-HUNTER

- "Fibrinogen and fibrin turnover of clotting factors", p.p. 429-454, Stuttgart 1963.

FE DE ERRATA.

- Pag. 21 Renglon 13 - Dice "Internos" ; Debe decir "Externos".
- Pag. 54 Renglón 4 - Dice "Lámpara" ; Debe decir "Cámara".
- Pag. 56 Renglón 8 - Dice "Interior"; Debe decir "Exterior".
- Pag. 59 Renglón 2 - Dice "Utilizado"; Debe decir "Utilizando".
