

3 Bis 6/2/56

UNIVERSIDAD MOTOLINIA
INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

DOSIFICACION DE HEPARINA SANGUINEA

TESIS

Que para su Examen Profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta

Martha Gallegos Contreras



MEXICO, D. F.

1956



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DOSIFICACION DE HEPARINA SANGUINEA

612.1(04)

UNIVERSIDAD MOTOLINIA
INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

DOSIFICACION DE HEPARINA SANGUINEA

TESIS

Que para su Examen Profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta

Martha Gallegos Contreras

MEXICO, D. F.
1956

*Con gratitud y agradecimiento
a mis padres*

Con cariño a mis hermanos

A mis Maestros

A la Universidad Motolintá

Al Instituto Nacional de Cardiología

*Con mi agradecimiento al
Sr. Dr. Rubén Olaya y Nava
quien dirigió el presente trabajo*

Al Honorable Jurado

A mis Maestros

A la Universidad Motolintá

Al Instituto Nacional de Cardiología

SUMARIO

	Pág.
I.—INTRODUCCIÓN	13
II.—HEPARINA	15
III.—HEPARINA Y COAGULACIÓN	20
IV.—MÉTODOS DE ESTUDIO	32
V.—RESULTADOS OBTENIDOS	36
VI.—DISCUSIÓN	38
VII.—CONCLUSIONES	40
VIII.—BIBLIOGRAFÍA	41

INTRODUCCION

Del papel tan importante que tiene la heparina sobre el mecanismo de la coagulación, y de los trabajos realizados por el Dr. Rubén Olaya y Nava sobre este tema, se sugirió la idea de hallar la relación que existe entre su contenido normal en la sangre y las modificaciones que sufre cuando se establece un tratamiento anticoagulante. Se escogió para este estudio uno de los métodos químicos, el método de L. B. Jukes utilizando para ello a pacientes seleccionados del Instituto Nacional de Cardiología bajo la dirección del Dr. Rubén Olaya y Nava con la gran ayuda prestada por el Químico Farmacéutico Biólogo Marcial Muñoz.

Someto a la consideración del H. Jurado este trabajo en el cual encontrarán errores, para los cuales pido su benevolencia al juzgarlo.

HEPARINA

Howell fue el primero que obtuvo del hígado una sustancia que impide la coagulación de la sangre y a la cual le dio el nombre de heparina (una antiprotrombina): no inhibe la acción de la propia trombina como lo hace la hirudina, sino que impide la conversión de la protrombina en trombina.

La heparina es un constituyente normal de los mamíferos y por ende del hombre. Es admitido de una manera general, aun cuando no universal, el que la heparina tenga como punto de origen las células cebadas de Ehrlich. Estas células forman parte de los diversos grupos celulares presentes en el tejido conjuntivo laxo, que reciben el nombre de mastocitos debido a su amontonamiento, Mastzellen de Ehrlich, células cebadas de Cajal o bien células plasmáticas de Waldeyer.

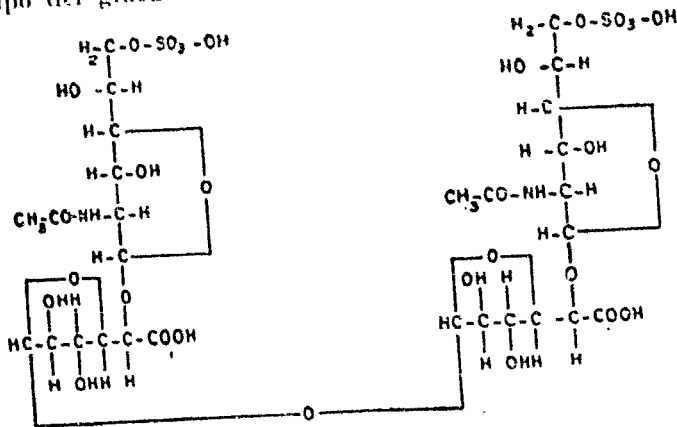
Holmgren y Wilander sospecharon el origen de la heparina, o por lo menos el rico contenido de ellas en estas células, debido a que se tiñen de rojo heliotropo con la fionina o con azul de toluidina, y en amarillo anaranjado con el rojo neutro.

Un pronunciado aumento de heparina en la sangre puede demostrarse en los animales en choque anafilático (Eagle, Wilander, Jaques y Waters), en el choque por peptona (Quick, Howell y Wilander) así como en la irradiación intensa de todo el cuerpo con sustancias radioactivas (Allen). En el hombre se encuentran valores elevados de heparina en la irradiación extensa (Frisschy, Allen), en la terapia intensa con Nitrógeno de Mostaza (Smith) y especialmente notable en la trombocitopenia pronunciada (Allen, Bozardus), aunque este último hallazgo no ha podido ser comprobado. En extensas investigaciones, las cuales fueron conducidas de 1943-1945 en la Medizineschen Klinik de Zürich (Koller y Frits-

chy) pudo comprobarse un aumento de la antitrombina del tipo de la antitrombina heparínica en las lesiones hepáticas difusas, en el asma bronquial, en el eritema solar y en el curso de la irradiación Roentgen. Además se demostró que el nivel de heparina es independiente de las células cebadas sanguíneas (Mastzellen y Tättlermann).

Las propiedades de la heparina fueron descritas por Howell; decía que era una sustancia termoestable, insensible a la acción de las bacterias, presentando cierta resistencia a la acción enzimática de la maltasa, emulsina, takadiastasa y fermentos proteolíticos; considerada como polisacárido, tenía las propiedades particulares de todos ellos, de no precipitar de sus soluciones acuosas por la acción de las sales metálicas, con excepción del acetato básico de plomo. Sin embargo estudios posteriores demostraron que podía precipitar por la acción del cloruro de bario en exceso y del hidróxido de bario.

Jorpes en 1935 fue el primero en estudiar la estructura química de la heparina; sabía que era un polisacárido de constitución química muy compleja y complicada, del que no concebían ni habían podido aislar preparaciones cristalizadas. Estimó que es un ácido condroitin-sulfúrico, compuesto de un ácido urónico (del tipo del glucurónico), hexosamina y un éster sulfúrico.

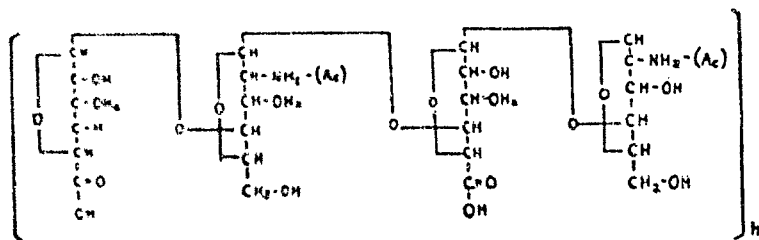


ACIDO CONDROITIN-SULFURICO

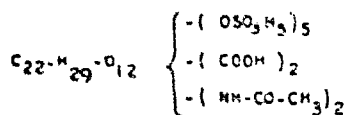
El mismo Jorpes y Bergström, años después (1936-1939) encontraron que la heparina purificada contenía glucosamina y no galactosamina; por lo que se consideraba como un éster mucóitín-

polisulfúrico, conteniendo derivados mono, di y trisulfúricos.

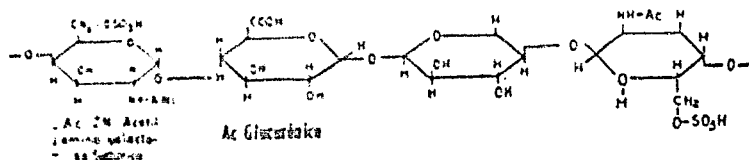
Charles y Todd en 1940 al mismo tiempo que Winstertein y Reirert, basados en los estudios de la sal bórica cristalizada de la heparina, concluyeron que es un ácido mucioitin-polisulfúrico, en donde la unidad fundamental es un tetrasacárido formado por dos moléculas de ácido glucurónico que contiene cinco grupos sulfúricos esterificantes y dos moléculas de N-acetil glucosamina:



La fórmula condensada quedaba así:



En la actualidad el polisacárido complejo que representa la constitución química de la heparina, se ha llevado al sistema cíclico y aun cuando se desconoce la estructura de estos excepcionales polisacáridos, Levene ha propuesto una estructura en cadena similar a la de la celulosa y quitina, a saber:



Por los estudios recientes que en la actualidad se han hecho sobre este polisacárido, mediante análisis e hidrólisis convenientes se ha logrado demostrar que la heparina está integrada por cuatro radicales perfectamente definidos: ácido sulfúrico, ácido acético, glucosamina (2 Amino glucosa) y un ácido urónico que no se ha podido identificar con seguridad, estando el grupo amino acetilado.

La heparina es el anticoagulante más enérgico que se cono-

ce; sus efectos se destruyen o neutralizan por la protamina llamada salina. El azul de toluidina y el azul A tienen un solo grupo amina; la heparina tiene ocho grupos ácidos; al unirse ocho moléculas del colorante con una de heparina, se produce un cambio de coloración con desplazamiento de la banda de absorción a 620 Å (Amstrong). Este cambio de coloración, reacción meta cromática, es casi específica de la heparina y sus derivados, es influida por el pH, otros iones, alcohol, calor; un gran exceso de heparina inhibe la reacción meta cromática. Su unión con proteínas y bases complejas fue señalada y estudiada por Fisher, Astrup, Jacques, J. Røder y Bruce Milford y Meyer.

Algunas proteínas al combinarse con la heparina la inactivan, según Fisher y Meyer, al lograrse la combinación desaparecen las reacciones ácidas de la heparina y básicas de las proteínas. La reacción sigue la Ley de las Masas y se establece un equilibrio entre heparina y proteínas libres y su compuesto.

La constante de disociación es menor que la del compuesto de la heparina con los procoagulantes; aumenta con el pH con la presencia de sales inorgánicas y otros compuestos que compiten con las proteínas por la unión con la heparina. Forma compuestos con bases orgánicas (benzidina), aldehídos (quinina, hecinact), colorantes básicos (fluoresceína, tiónina, azul de toluidina); histamina. Los colorantes neutralizan su actividad anticoagulante.

Anderson y Fawcett señalaron la formación de complejos heparina-fosfolípidos de significación química, fisiológica y patológica análoga.

Aunque la heparina descrita por Mc Lean y Howell, 1916 encuentra extensa aplicación en el tratamiento de las trombosis y las embolias, el modo de acción así como el metabolismo de este anticoagulante fisiológico no está del todo aclarado. Actualmente se acepta que en la sangre circulante existe normalmente un equilibrio entre los factores aceleradores e inhibidores de la coagulación. Las modificaciones de los mismos conducen por un lado a las diátesis hemorrágicas y por otro a la mayor coagulabilidad de la sangre, por lo que representaría un paso previo a la instalación de la trombosis.

La acción inhibitoria de la heparina sobre la coagulación descansa sobre dos mecanismos independientes entre sí; la heparina inhibe tanto la primera fase de la coagulación (antiprotrombina o antitromboplastina) como la segunda (antitrombina); para

ambas acciones se necesita la combinación con una proteína plasmática o "cofactor".

Hasta ahora sólo el cofactor antitrombina, el llamado complemento de la heparina ha sido el más investigado. Se trata en contradicción de los primeros conceptos, de una globulina (Uster, Loomis).

Además de estas propiedades inhibitorias, la heparina favorece también la fibrinólisis (Halses, Unger y Wist), dificulta la desintegración de los trombocitos (Quick) y juega un papel en los procesos mamuntarios (Astrup).

La heparina no parece tener una individualidad química definida, pues su poder anticoagulante difiere según la especie animal en donde existe. Este poder expresado en unidades por mg. es el siguiente: perro 240; hney 100; cerdo 40; carnero 23.

Gilberti y Nalefsky hicieron estudios sobre la acción vasodilatadora de la heparina y del dicumarol. Los experimentos realizados por estos autores llevan a la conclusión de que estos dos anticoagulantes son efectivamente vasodilatadores coronarios.

III

HEPARINA Y COAGULACION

En los últimos doce años, el interés por el problema de la coagulación sanguínea ha crecido de manera sorprendente. Quick habla de un renacimiento de la fisiología de la coagulación. Este nuevo despertar de la investigación clínica y experimentación de la coagulación debe atribuirse primordialmente al trabajo de Dam sobre lo que él llama "Koagulationsvitamin". Su descubrimiento, por primera vez, dio la posibilidad de influenciar de manera específica un trastorno perfectamente definido de la coagulación. La diferenciación de los trastornos de la coagulación respecto a los trastornos de los factores individuales de la misma, fue por tanto, una necesidad para la clínica. Se señaló que la falta de cada uno de los factores de la coagulación corresponde a un cuadro clínico bien descrito (deficiencia de protrombina; diatésis hemorrágica de los enfermos hepáticos o sea avitaminosis K; falta de tromboquinasa; hemofilia hereditaria; deficiencia de fibrinógeno; a "fibrinopenia" congénita o adquirida). Solamente el calcio constituye una excepción; hasta ahora no se ha probado con seguridad una diatésis hemorrágica en donde el trastorno de la coagulación sea consecuencia de la falta del calcio, probablemente porque para influir en el proceso de la coagulación se requiere una disminución tan grande de los iones de calcio, que ésta resultaría incompatible con la vida. Los descubrimientos fundamentales de los precursores como Schmidt, Haammarsten y Morawitz, condujeron a la teoría clásica de la coagulación sanguínea, enunciada en 1904 por Morawitz. Afirma esta teoría que la protrombina, una proteína plasmática, es activada a trombina en presencia de iones calcio y de tromboplastina o trombocinasa, factor éste liberado por los trombocitos afectados. Por su parte, la trombina actúa

sobre una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno, formándose la fibrina, que es insoluble. Esta hipótesis ha sido aceptada por la mayoría de los autores durante más de 40 años; en el curso de los 10 últimos años y como consecuencia de las múltiples investigaciones sobre la coagulación sanguínea han sido propuestas numerosas modificaciones a la teoría original; se descubrieron diversos nuevos factores coagulantes y se estudió sucesivamente el papel de cada uno en el mecanismo de la coagulación.

Los factores que se conocen en la actualidad son los siguientes:

- 1.—Fibrinógeno
- 2.—Protrombina
- 3.—Tromboplastina
- 4.—Calcio
- 5.—Procclerina de Owren
- 6.—Acelerina
- 7.—Proconvertina
- 8.—Convertina
- 9.—Complemento Tromboplastínico de Stefanino
- 10.—Factor de Rosenthal. (A.C.T.)

Los primeros cuatro factores son los universalmente conocidos, los demás están en estudio.

Fibrinógeno. Se admite que la coagulación comprende dos reacciones distintas y consecutivas: a) formación de un coagulante activo, la trombina; b) la interacción entre trombina y fibrinógeno para formar fibrina. El fibrinógeno es una proteína lábil que se halla en el plasma de la sangre circulante (al rededor de 400 mgts. por 100 cc.), que puede observarse en la sangre derramada formando una estructura gelatinosa o coágulo de fibrina y en cuyos intersticios queda aprisionado el resto de la sangre para formar una estructura elástica, el coágulo sanguíneo. El fibrinógeno se forma en el hígado.

Trombina. En el suero eliminado por el coágulo existe una substancia coagulante activa, la trombina, que puede causar la coagulación tanto del fibrinógeno purificado como del plasma al cual se haya añadido un anticoagulante. La trombina puede transformar varios centenares de veces su propio peso de fibrinógeno en fibrina. Se observa analogía en el caso de la papaína, enzima triptien y en numerosos venenos proteolíticos de serpientes que coagulan el fibrinógeno.

La formación de trombina depende de la interacción de tres factores, por lo menos: 1) una sustancia derivada de las plaquetas, que también existe en los extractos de tejidos y de la que pueden hallarse indicios en el plasma sin plaquetas (tromboplastina); 2) iones calcio y 3) un factor plasmático, este último se denomina protrombina.

Protrombina. Se ha comprobado que es un glucopérido hidrolizable que probablemente contiene triptófano y un 14.49% de nitrógeno. Se calcula la concentración plasmática en 20 mg. por 100 cc. La cantidad de protrombina del plasma se mantiene notablemente constante en estado de salud. En un tiempo se creyó que la protrombina derivaba de las plaquetas, pero actualmente está demostrado que las plaquetas no la contiene, sino que se forma en el hígado.

Tromboplastina. Está ampliamente distribuida por el organismo como sustancia intracelular. Ciertos tejidos y en particular el cerebro, los pulmones, el timo y los testículos, son especialmente ricos en tromboplastina. En la sangre existe en las plaquetas y quizás en mínima cantidad en el plasma. Los estudios de Chargaff y colaboradores indican que la tromboplastina es una lipoproteína de peso molecular elevado.

Aparte de los problemas por defecto de los factores activos de la coagulación, se presenta el de considerar un exceso de sustancia inhibidora de la coagulación como origen a una tendencia a sangrar espontáneamente. La divergencia de opiniones en ningún campo de la coagulación es tan grande como en el de los anticoagulantes.

Se han descrito sustancias inhibitoras para cada uno de los factores de la coagulación mencionados anteriormente (antiprotrombina, antitromboquinasa, antitrombina, sustancias precipitantes del calcio e inactivantes del fibrinógeno). El número de estas sustancias se reduce rápidamente, cuando sólo se consideran aquellas genuinas del organismo.

No existe en la actualidad una teoría sobre la coagulación sanguínea que satisfaga a todo el mundo. Es cierto que la mayoría de los especialistas están de acuerdo sobre las reacciones fundamentales y las principales sustancias que intervienen en la formación del coágulo sanguíneo; sin embargo discrepan mucho en lo que se refiere a las etapas sucesivas del proceso y a la aparición de sustancias específicas de la cadena de reacciones que con-

duce, en definitiva, a la fibrina. Por otra parte la multiplicidad de sinónimos propuestos por los autores para los factores coagulantes, aumenta la complejidad de las publicaciones sobre coagulación sanguínea, esto no contribuye a que el médico no especializado se mantenga al corriente de los rápidos procesos realizados en estos dominios. Hasta hoy sólo se han demostrado y caracterizado 2 sustancias inhibidoras de la coagulación: la heparina descubierta por Mc Lean y Howell en 1916 y en el cuerpo inhibidor lipóico (Lipoid-Hemmungskörper) demostrado por Chargaff en 1937, el cual fue obtenido del sistema nervioso central. Mientras que el modo de acción del último anticoagulante no se conoce de cerca, sabemos que la heparina interviene en el proceso de la coagulación como antiprotrombina y antitrombina. Aquí nos concretaremos a su efecto de antitrombina. Es importante hacer notar que la heparina pura compuesta de una mezcla de diversos ácidos polisulfúricos-polisacáridos es un anticoagulante fisiológicamente inactivo y sólo por la combinación con una proteína plasmática se convierte en antitrombina.

Heparina + proteína plasmática = antitrombina heparínica.

La proteína llamada complemento por Chargaff, aunque se aísla con la fracción albúmina no se encuentra en la albúmina cristalina.

Una circunstancia que ha provocado confusión es la existencia de una segunda antitrombina, a la que designamos "antitrombina sérica" y se diferencia fundamentalmente de la heparínica en que no es capaz de impedir el proceso de la coagulación. Su acción aparece principalmente en el suero, en el curso de la coagulación, en donde inactiva a la trombina en exceso (formación de metatrombina) hemos tratado de ilustrar esta relación con tres igualdades, en donde se expresa, según el lugar de la serie que la afinidad de la trombina por la antitrombina heparínica, es máxima; y mínima en caso contrario, para la antitrombina sérica:

1. Trombina + antitrombina heparínica = trombina inactiva
2. Trombina + fibrinógeno = fibrina
3. Trombina + antitrombina sérica = metatrombina.

Cuando se inicia la coagulación en la sangre misma y se forma trombina, ésta queda en presencia de la heparina uniéndose a ella e inactivándose consiguientemente, el proceso de la coagulación no finaliza, pues no se forma fibrina. Debe concluirse por

tanto, que normalmente, la antitrombina heparínica no existe en el plasma o sólo en muy pequeñas cantidades. En efecto, sólo han sido aisladas cantidades mínimas de heparina en la sangre normal. En cambio, la antitrombina sérica se encuentra normalmente en cantidades considerables y por esto es capaz de inactivar completamente un gran exceso de trombina, que resulta inútil y peligroso después de la coagulación. Poco se sabe de la constitución química de esta antitrombina sérica. Precipitada por salazón (salting out) siempre en la fracción albúmina, pero no parece ser idéntica con el complemento de la heparina. Posiblemente se trate de una lipoproteína.

La importancia fisiológica y clínica de estas dos antitrombinas como ya se ha dicho es completamente diversa. La tarea de la antitrombina sérica puede compararse a la reparación de los daños hechos por los bomberos; un mecanismo necesario y útil (coagulación sanguínea) conduce a la sobreproducción de sustancias de defensa (trombina) que debe hacerse inofensiva. Mucho menos claro es el papel que desempeña la antitrombina heparínica en el organismo, puesto que normalmente no es demostrable en el plasma o sólo en mínimas cantidades, inmediatamente surge la necesidad de investigar las condiciones en que aparece la heparina en concentraciones tales en la sangre, que efectivamente inhibe la coagulación. Las investigaciones de Howell y de Quick indicaron que la coagulabilidad de la sangre en el choque por peptona, está condicionada por una antitrombina del tipo de la heparínica. Eagle y colaboradores pudieron comprobar también en el choque anafiláctico, en el cual Arthus había probado la incoagulabilidad de la sangre desde 1909, un fuerte aumento de la antitrombina. La prueba definitiva de que efectivamente se trata de una antitrombina heparínica la dieron Wilander (1948) y Jaques y Waters (1941) por el aislamiento e identificación de la heparina de la sangre de perros en choque anafiláctico y peptónico. La cantidad de heparina obtenida fue suficiente para explicar la incoagulabilidad de la sangre.

Wilander pudo demostrar, además en muy hermosas investigaciones histológicas, que las Mastzellen pericapilares del tejido vaciaban casi completamente a la sangre sus gránulos heparínicos durante el choque. Es evidente que nos encontramos frente a un mecanismo de protección adecuado para impedir la trombosis de los vasos coronarios abdominales por el éxtasis sanguíneo durante

el choque anafiláctico. Quick conecta este hecho del efecto de la heparina con las plaquitas, los principales portadores de histamina. En el choque anafiláctico las plaquitas se aglutinan y liberan al plasma no solamente tromboquinasa sino también histamina, por lo que los síntomas del choque se intensifican grandemente.

Según Owren el mecanismo de la coagulación y de la terminología más adecuada para distinguir los diversos factores coagulantes se encuentran reunidos en la figura N^o 1; de hecho, este concepto es el resultado del desarrollo en tres direcciones principales de la teoría clásica:

1.—El contacto con una superficie extraña provoca la coagulación, no sólo por destrucción de los trombocitos, sino también por activación de factores coagulantes del plasma.

2.—La tromboplastina de la sangre no es liberada por los trombocitos bajo su forma final, sino que se produce una reacción entre un factor trombocitario y dos factores plasmáticos.

3.—Otros dos factores coagulantes, la proacelerina y la proconvertina, son también necesarios, además de la tromboplastina, para obtener una transformación rápida de la protrombina en trombina.

Hemos representado gráficamente en la figura N^o 1 los mecanismos de la coagulación, que serán comentados en los párrafos siguientes. Aclaremos que la numeración de los párrafos corresponde a la de las reacciones que están de acuerdo con la del esquema de la figura N^o 1.

1.—**Efecto de contacto.**—Es sabido desde hace tiempo que el contacto con un cuerpo extraño provoca no solamente la desintegración de las plaquetas y la liberación de los factores coagulantes trombocitarios, sino también que este fenómeno aumenta la coagulabilidad del plasma.

1^a.—Destrucción de los trombocitos.—Recientes investigaciones han confirmado totalmente la antigua hipótesis de que las plaquetas desempeñan un importante papel en la coagulación y en el control de las hemorragias producidas por una lesión, esta notable y compleja función de los trombocitos se explica por el gran número de sustancias biológicas activas que contienen:

- a) una sustancia vasoconstrictora: la serotonina;
- b) una retractoquina que produce la retracción del coágulo;

c) un factor lipéidico, indispensable para la formación de tromboplastina;

d) un factor que acelera la conversión de protrombina en trombina, y;

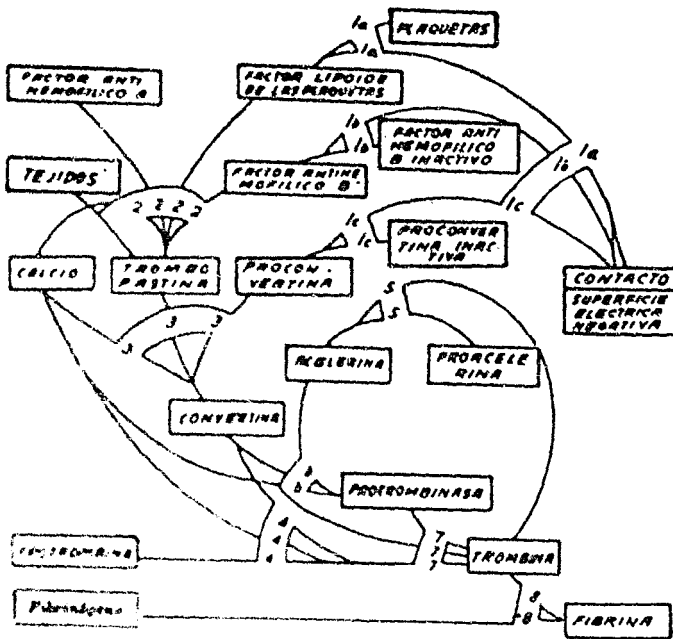
e) un factor que estimula la reacción de la trombina con el fibrinógeno.

2.—Formación de la tromboplastina.—La mayoría de los autores utilizan los vocablos "tromboplastina", "trombocinasa" para designar la actividad coagulante de los extractos tisulares acuosos o para expresar una acción equivalente a la que se manifiesta en el curso de la coagulación normal.

3.—Formación de convertina. La reacción entre tromboplastina y proconvertina, para formar la convertina ha sido deducida de los resultados de experiencias relativamente antiguas (Owren, 1947; Mann, 1947-1949; Alexander y colaboradores, 1948-1951). Nuestra investigación sobre el plasma parahemofílico lo han confirmado (Owren 1951). Posteriormente investigaciones realizadas con la formación de convertina en la sangre y el plasma y con el empleo experimental de factores aceleradores, demuestran así mismo que la proconvertina se combina cuantitativamente con las partículas de tromboplastina tisular, con la intervención de los iones calcio. La convertina es una substancia que se presenta bajo la forma de partículas susceptibles de ser separadas por ultracentrifugación, lo mismo que la tromboplastina tisular.

Es posible obtener la convertina mediante adición de tromboplastina tisular (extracto de cerebro) ya sea a un suero conservado que contenga alta concentración de proconvertina, pero exento de protrombina, o bien a una solución de convertina preparada a partir de suero conservado. Contrariamente a la tromboplastina, la convertina obtenida por ultracentrifugación permite corregir la coagulación de un plasma deficiente en proconvertina (véase cuadro N^o 1).

La especificidad de la convertina viene también demostrada por el hecho de que el líquido inhibitor del cerebro, descrito por Tocantins (1945) impide la reacción entre la tromboplastina y la proconvertina, aunque no tiene efecto alguno sobre la convertina preformada (Rapaport y colaboradores). En presencia del factor trombocitario lipéidico, la reacción coagulante del veneno de viperá ruselli es equivalente a la de la convertina.



La Coagulación según la teoría de P. A. Owren.

FIG. No. 1

- 1.-El contacto provoca la coagulación:
 - a) por destrucción de los trombocitos y liberación del factor tromboplastina lipídica trombocitaria;
 - b) por activación del factor antihemofílico B (principio de la tromboplastina plasmática o PCF, "christmas factor");
 - c) por activación de la proconvertina (co-tromboplastina, SPCA, factor VII "stable factor").
 - 2.-La lesión de los tejidos provoca la liberación espontánea de tromboplastina. Reacción entre el factor lipídico trombocitario, el factor antihemofílico A y el factor antihemofílico B activado para formar tromboplastina en la sangre, en presencia de iones calcio.
 - 3.-Formación de convertina con la participación de iones calcio por reacción de la tromboplastina con convertina.
 - 4.-La convertina provoca, en presencia de iones calcio, una débil transformación de protrombina en trombina.
 - 5.-La trombina así formada actúa sobre el sistema de factores aceleradores y origina la transformación de procelerina en acelerina.
 - 6.-Reacción entre convertina y acelerina en presencia de iones calcio para formar protrombina.
 - 7.-La protrombina acelera, con intervención de los iones calcio, la transformación de protrombina en trombina.
 - 8.-La concentración de trombina es ahora suficiente para transformar el fibrinógeno en fibrina.
- El sistema de los factores inhibidores no figuran en el esquema. El factor antihemofílico B y la proconvertina son inactivos en el estado inicial, muy probablemente por estar combinados con un principio inhibidor. El plasma contiene también sustancias capaces de inactivar la tromboplastina, la convertina, la acelerina, la protrombina y la trombina.

4.—Fase inicial de la transformación lenta de la protrombina en presencia de la convertina y los iones calcio.—La convertina y los iones calcio pueden transformar lentamente la protrombina en trombina, incluso en ausencia de la proacelerina o de la acelerina; la prueba puede hacerse añadiendo convertina, bien sea a un plasma parahemofílico que no contenga nada de proacelerina, o bien a una solución de protrombina exenta de proacelerina y de acelerina. La figura Nº 2 nos representa esta experiencia. No hemos confirmado la existencia de una reacción específica que exija un cierto lapso de tiempo entre la tromboplastina y la proacelerina; sin embargo, la tromboplastina celular obtenida por ultracentrifugación puede contener indicios de proacelerina o acelerina, procedentes ya sea de soluciones purificadas, de plasma o incluso de plasma desfibrinado; se trata verosímilmente de un fenómeno de adsorción no específico. No nos ha sido posible demostrar una reacción específica cualquiera entre la convertina y la proacelerina, por lo que pensamos que la reacción Nº 4 (véase Fig. 1) se produce durante la coagulación. La denominación de "convertina" está justificada por el hecho de que esta substancia es el primer factor transformador de la protrombina que aparece durante la coagulación normal; en ausencia de convertina es posible la formación de trombina.

5. —Transformación de la proacelerina por la trombina.—Para desencadenar la transformación de la proacelerina en acelerina bastan indicios de trombina; sin embargo, si la trombina se forma muy lentamente como ocurre en la hemofilia, la cantidad de trombina activa puede resultar insuficiente para activar por completo la proacelerina.

6.—Reacción entre convertina y la acelerina para formar la protrombina.—Bodet y Gugou (1904) han sido los primeros en comunicar la presencia en el suero de un factor muy activo de conversión de la protrombina. El autor del presente artículo (Owen 1947a) estudió más a fondo este factor que denominó factor VI o protrombina.

La protrombina puede ser obtenida añadiendo convertina a una solución de acelerina que contenga iones calcio, y separada después por ultracentrifugación. La acelerina puede ser preparada mediante activación de la proacelerina en el plasma de buey absorbido, por adición de trombina; elimínese en seguida la fi-

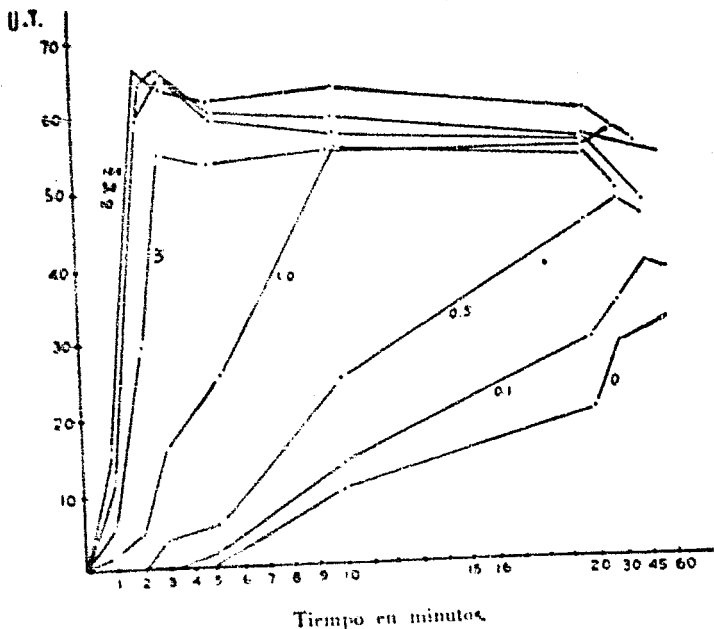


FIG. No. 2

Proporción de trombina formada a concentraciones constantes de protrombina y de convertina, a concentraciones óptimas de iones calcio y a concentraciones variables de acelerina. En ausencia de acelerina es lenta la formación de trombina; la adición de acelerina incluso en muy pequeñas cantidades favorece enormemente la transformación de protrombina en trombina. (Las cifras de la curva representan las unidades acelerina por cm³; U. T. = unidades trombina).

CUADRO 1

Comparación entre los poderes coagulantes de la tromboplastina del cerebro, de la convertina, del veneno de *Vipera russelli* y de la protrombinasa, frente a diversos plasmas patológicos.

		Plasmas recalcificados sin tromboplastina				
	NORMAL	HEMOFILIA A	HEMOFILIA B	DEFICIENTE PROCONVER- TINA.	DEFICIENTE PROCELE- RINA.	FIBRINOGENO
SOLUCION TAMPON	Approx. 14 min.	Approx. 10 min.	Approx. 10 min.	14.2 min.	Approx. 8 min.	> 8 min.
TROMBOPLASTINA	15.0 seg.	15.1 seg.	14.9 seg.	65.0 seg.	70.0 seg.	> 8 min.
CONVERTINA (sedimentada, lavada y puesta en suspensión)	11.5 seg.	11.4 seg.	11.7 seg.	11.9 seg.	40.5 seg.	> 8 min.
VENENO DE VIPERA RUSSELLI + CEFALINA BRUTA.	5.0 seg.	5.1 seg.	5.3 seg.	5.2 seg.	40.0 seg.	> 8 min.
PROTROMBINASA (sedimentada, lavada y puesta en suspensión)	7.2 seg.	7.6 seg.	7.2 seg.	7.9 seg.	8.0 seg.	> 8 min.

brina, dilúyase la solución y acidifíquese después para precipitar la acelerina.

En el cuadro N^o 1 se resume una experiencia sobre la acción de la protrombinasa; su actividad es independiente del contenido plasmático en tromboplastina, proconvertina y proacelerina. A título comparativo, han sido representados en el cuadro N^o 1 las respectivas actividades coagulantes de la tromboplastina, de la convertina y del veneno de *Vipera russelli* adicionado de cefalina bruta. Se eligió el nombre de acelerina a causa de la influencia de este factor sobre la velocidad de formación de la protrombina.

7.—Fase de formación acelerada de trombina por la protrombinasa y los iones calcio.—En presencia de iones calcio, la protrombinasa provoca una transformación muy rápida de la protrombina en trombina; la protrombinasa es responsable de la evolución rápida de esta fase.

8.—Reacción de la trombina y del fibrinógeno.—El concepto habitual de la transformación del fibrinógeno en fibrina está basado particularmente sobre el estudio de la formación de un gel por polimerización mediante ciertos métodos fisicoquímicos; las últimas adquisiciones sobre el mecanismo de la coagulación son debidas en gran parte a la puesta en punta de métodos cuantitativos más específicos, que pueden ser utilizados tanto para la valoración cuantitativa de los diferentes factores como para el estudio de la formación y de la activación de las diversas sustancias intermedias que aparecen en el curso de la coagulación.

IV

MÉTODOS DE ESTUDIO

Existen numerosos y muy variados métodos de investigación y dosificación de heparina sanguínea los cuales se han estudiado y puesto en práctica para su determinación. Estos procedimientos han resultado bastante complicados y muy difíciles de llevar a cabo como procedimientos clínicos debido a la concentración tan pequeña que de ella existe en la sangre, cantidad que sin embargo es suficiente para producir estados hemorrágicos graves.

En el presente trabajo se seleccionaron dos grupos de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología: a) Con tendencia hemorrágica normal; y b) Con tratamiento a base de anticoagulantes. Se siguió el método de L. B. Jaques para dosificar heparina por ser el método químico que mejor llena las condiciones para este trabajo y al cual se le hicieron algunas modificaciones que se describirán más adelante.

REACTIVOS:

Solución de citrato de sodio al 3.8%.

Solución de cloruro de sodio al 0.85%.

Eter.

Solución de fenol al 80%.—El fenol se licúa a baño maría, 800 cc. se diluyen a 100 cc. con agua destilada.

Procedimiento.—El método original utiliza 9 cc. de sangre y 1 cc. de citrato de sodio como anticoagulante la cual se centrifuga a 2000 revoluciones por minuto durante 10 min. Separar cuidadosamente el plasma con una pipeta Pasteur. Al residuo globular que contiene todavía plasma, se lava añadiendo 4 cc. de solución de cloruro de sodio, solución salina fisiológica; agitando y

centrifugando por 3 minutos. El líquido sobrenadante del lavado se agrega al plasma. Se agrega además 5.5 cc. de solución de fenol, tapando y agitando vigorosamente y dejando reposar a la temperatura del laboratorio por espacio de 10 ó 20 hs. para separar la heparina de las proteínas plasmáticas. El contenido del tubo se centrifuga a 2500 revoluciones durante 20 minutos y se separa cuidadosamente la capa superior que será guardada en el refrigerador hasta el momento de su titulación. El residuo del tubo se lava con 4 cc. de S.S.F. agitando y centrifugando por 3 minutos. El líquido del lavado se agregará a la porción que se tiene guardada en el refrigerador. A esta mezcla se le hará un nuevo lavado con 5 cc. de éter agitando y centrifugando.

Para eliminar el éter se extraerá la sol. de heparina introduciendo una pipeta Pasteur tapada hasta el fondo absorbiendo por aspiración el líquido y pasándolo a un tubo. Este líquido contiene residuos de éter que serán eliminados calentando el tubo a baño maría durante 2 ó 3 minutos a 65° ó 70°C.; eliminado el éter se procede a la determinación de heparina. Las modificaciones hechas al método de L. B. Jacques se llevaron a cabo efectuando diferentes ensayos para determinar el tiempo suficiente de agitación; así como la dilución del plasma y fenol, encontrándose que es suficiente una agitación de 3 minutos y una mezcla de fenol y plasma en cantidades iguales. Se comprobó también que los lavados con S.S.F. no son enteramente necesarios por lo que pueden ser eliminados y el lavado con éter debe efectuarse con las mismas cantidades de líquido problema.

El método ya modificado con el que se efectuó este trabajo es el siguiente: mezclar 9 cc. de sangre tomada por punción venosa con 1 cc. de citrato de sodio, separar el plasma por centrifugación y agregar el mismo volumen de solución de fenol, agitar durante 3 minutos. Dejar reposar a la temperatura del laboratorio por 10 a 15 hs. Centrifugar por 15 minutos y separar el líquido sobrenadante con pipeta Pasteur. Mezclar partes iguales de líquido sobrenadante y éter, agitando vigorosamente y centrifugar por 10 minutos. Separar la solución de heparina que se encuentra en la parte inferior del tubo con una pipeta introduciéndola tapada hasta el fondo y absorber por aspiración. Para eliminar el residuo de éter que arrastra consigo el líquido problema se lleva el tubo a baño maría por dos o tres minutos a 70°C y al líquido así obtenido se le determina la cantidad de heparina

por determinación de Máxima Actividad Trombínica (M.A.T.) cuya técnica es la siguiente:

MATERIAL NECESARIO:

Tubos de Kahn
Asa de alambre nicromel
Baño maría
Pipetas de 1 cc. graduadas en centésimos
Pipetas de Kahn
Reloj eléctrico con control de pie que marque décimos de sgdo.

REACTIVOS:

Solución 0.20 M. de cloruro de calcio
Solución salina fisiológica (sol. de NaCl al 0.85%)
Tromboplastina (preparada con pulmón de gato)

TECNICA. --

En una serie de tubos se colocan en cada uno 0.1 cc. de plasma, 0.05 cc. de líquido problema y se añaden cantidades variables de tromboplastina desde 0.06 cc. hasta 0.10 cc. respectivamente; se introducen los tubos al baño maría a 38°C al igual que un tubo que contenga unos centímetros de sol. de CaCl_2 0.20 M. y una pipeta de Kahn. Se espera hasta que los tubos adquieran la temperatura del baño (1 minuto); se tiene listo el reloj y con la pipeta de Kahn se coloca en un tubo 0.1 cc. de sol. de CaCl_2 poniendo a funcionar el reloj en el momento de colocar la última porción de la sol. de CaCl_2 , se retira rápidamente la pipeta y se agita el contenido del tubo con la asa de alambre hasta la formación de fibrina, momento en que se interrumpe el funcionamiento del reloj. Se anota el tiempo y se repite la misma operación en los demás tubos tomando nota de los tiempos obtenidos en cada uno.

La cantidad de tromboplastina que contiene el tubo que da el menor tiempo nos da la dosis óptima; con esta cantidad de tromboplastina se procede a efectuar otra determinación semejante a la anterior, pero ahora variando la cantidad de CaCl_2 colocando desde 0.08 cc. hasta 0.14 cc. y buscando el tiempo mínimo. Al hacer estas determinaciones es necesario hacer un testigo, el cual se manipula al igual que las anteriores determinaciones, co-

locando en lugar de 0.05 cc. de líquido problema 0.05 cc. de S.S.F. tomando nota del tiempo obtenido.

CALCULOS:

Sabemos que 0.1 cc. de una sol. de sal sódica de heparina hecha con 0.010 gr. en 220 cc. de S.S.F. neutralizan al 50% de la M.A.T. de 0.1 cc. de plasma; por consiguiente 0.2 cc. de la sol. neutralizarán al 100% de la M.A.T. y así tenemos:

$$220 = 0.010 \text{ gr.}$$

$$0.2 = X$$

$$X = \frac{0.2 \times 0.010}{220} = 0.00009 \text{ gr.}$$

$$0.00009 \text{ gr.} = 9\lambda$$

Como se trabajó con 0.05 cc. de líquido problema, con un volumen constante de sangre y un volumen variable de líquido problema obtenido tenemos lo siguiente:

$$\begin{aligned} 9\lambda &= 100 = 0.05 = V_1 \\ X &= M = V_2 = 100 \end{aligned}$$

en donde:

V_1 = volumen total de sangre

V_2 = volumen de líquido problema obtenido

M = % de actividad trombínica de cada problema;

Despejando tenemos:

$$X = \frac{9\lambda \times M \times V_2 \times 100}{100 \times 0.05 \times V_1} = \frac{9\lambda \times M \times V_2}{V_1 \times 0.05}$$

V

RESULTADOS OBTENIDOS

Se hizo el estudio de ochenta casos en los cuales se obtuvieron cantidades variables de líquido problema con un pH que osciló entre 7 y 8 con las siguientes cantidades de heparina expresada en gomas.

Para mayor facilidad anotamos únicamente las iniciales de los pacientes, el registro de los mismos, los resultados de heparina y el % de M.A.T. Los resultados en pacientes que se encontraban con tratamiento a base de anticoagulantes son los siguientes:

1.—R. T.	39519	CI	A 11	600	16%
2.—A. O.	46700	CI	A 7	120	92%
3.—J. de la F.	47110	CE		1848	47%
4.—R. L.	46973	CI	A 12	1320	17%
5.—S. E.	13368	CI	B 34	200	95%
6.—Ma. L. V.	47398	CI	B 19	560	47%
7.—D. L.	47303	CI	B 18	326	30%
8.—V. A. B.	47248	CI	A 10	1040	19%
9.—Ma. C. M.	37395	CE		80	67%
10.—A. V.	47651	CE		86	25%
11.—E. de los R.	47658	CI	B 22	3570	10%
12.—D. R.	47296	CI	A 20	616	16%
13.—V. L.	47617	CI	A 2	3166.66	47%
14.—Ma. L. G.	18968	CI	B 31	3040	57%
15.—L. O.	47307	CI	A 5	1400	68%
16.—M. O.	46069	CE		3240	71%
17.—G. P.	21568	CI	A 33	1925	82%
18.—E. H.	48054	CI	B 29	2800	10%
19.—M. F.	17290	CE		640	55%

20.—L. G.	18968	CI	B 31	2160	70%
21.—R. C.	46862	CE		480	95%
22.—H. A.	47859	CI	A 13	924	41%
23.—R. M.	48772	CI	D. 4	1350	31%
24.—A. V.	47651	CE		3240	83%
25.—H. A.	47859	CI	A 13	780	40%
26.—J. M.	47876	CI	A 24	2170	14%
27.—R. C.	46862	CE		1932	68%
28.—M. M.	47332	CI	B 9	1926	9%
29.—J. M.	47876	CI	A 24	1332	22%
30.—S. A.	20968	CE		3416	31%
31.—H. A.	47859	CI	A 13	1740	90%
32.—R. C.	46862	CI	A 28	2480	57%
33.—R. V.	38751	CI	A 33	2240	45%
34.—J. T.	37734	CI	C 33	842.44	50%
35.—E. L.	5797	CI	A 30	880	67%
36.—I. S.	48840	CE		1380	31%
37.—A. P.	36617	CE		2121.11	12%
38.—R. C.	46862	CE		3480	20%
39.—J. O.	44918	CI	A 19	3034	57%
40.—I. S. E.	48830	CE		1470	15%

Los resultados obtenidos en pacientes normales fueron:

1.—M. M.	43807	CE		1848	100%
2.—C. A.	47092	CE		3440	100%
3.—E. M.	34811	CE		3720	94%
4.—B. Ch.	47164	CE		2933	100%
5.—J. R.	43041	CE		2400	100%
6.—G. Z.	47662	CE		800	90%
7.—G. P.	46674	CE		1848	100%
8.—L. V.	40327	CI	A 12	1230	95%
9.—A. M.	45136	CE		1520	100%
10.—Ma. L. G.	47550	CE		2080	100%
11.—R. D.	46781	CE		540	92%
12.—E. L. P.	46261	CI	B 25	640	100%
13.—J. Z.	46502	CE		650	100%
14.—J. M. G.	46978	CE		1190	100%
15.—V. M. S.	47957	CE		1260	100%
16.—Ma. C.	48010	CE		1280	100%
17.—C. H.	45400	CI		546	61%

18.—L. F.	33447	CE		140	100%
19.—L. L.	47834	CE		400	90%
20.—R. L.	45933	CE		1820	92%
21.—C. V.	2932	CE		1020	92%
22.—L. B.	S/R	CE		162	87%
23.—R. Ma. R.	19965	CE		640	95%
24.—E. M.	34811	CE		3920	100%
25.—R. B.	45877	CE		2162	100%
26.—C. H.	45400	CE		1050	88%
27.—E. Ch.	29671	CE		1152	100%
28.—F. B.	S/R	CE		1536	95%
29.—O. C.	41130	CE		2030	95%
30. Ma. E. S.	48684	CE		2640	100%
31.—J. L.	46909	CI	E 8	2720	71%
32.—G. V.	48174	CE		630	100%
33.—P. A.	48601	CI	A 18	2550	70%
34.—S. S.	47020	CE		1190	85%
35.—A. G.	38199	CE		1470	85%
36.—E. P.	47007	CE		640	95%
37.—L. R.	16152	CI	B 27	3200	100%
38.—A. Ch.	48939	CE		1050	98%
39.—J. O.	44918	CI	A 19	960	50%

VI

DISCUSION

De los trabajos previos para determinar las modificaciones de la técnica de L. B. Jaques se observó que no son necesarios los lavados con NaCl (S.S.F.) que recomienda el autor y que es suficiente agregar volúmenes iguales de fenol y posteriormente éter al del plasma obtenido de la muestra y asimismo se observó que es suficiente una agitación durante 3 minutos para efectuar la extracción completa de heparina o sustancias de acción heparinizante.

Como consecuencia de no necesitarse aparatos y material especial (fuera del común y corriente en un laboratorio de análisis clínicos) esta prueba puede efectuarse en forma rutinaria.

VII

CONCLUSIONES

- 1.—Se presenta una técnica para determinar heparina sanguínea (o sustancias heparinizantes) que no es otra cosa que la técnica de L. B. Jaques modificada.
- 2.—Por esta técnica los datos normales de heparina (o sustancias heparinizantes) varían de 80λ hasta 3220 gammas λ en 100 cc. de sangre.
- 3.—En los casos examinados se encontró concentraciones de:

En el 10 % de los casos entre	30λ y	400λ
.. .. 22.5%	500λ y	1000λ
.. .. 37.5%	1001λ y	2000λ
.. .. 20.0%	2001λ y	3000λ y
.. .. 10.0%	3001λ y	4000λ

- 4.—Por esta técnica los datos obtenidos de concentración de heparina determinados en personas con tratamiento anticoagulante se encuentran dentro de los límites normales.
- 5.—Esta técnica puede seguirse en forma rutinaria.
- 6.—Los datos obtenidos por esta técnica son semejantes a los encontrados en la Técnica para la determinación en sangre de la concentración de sustancias heparinizantes.

VIII

BIBLIOGRAFIA

- 1.—*Tratado de Bioquímica*.—Harrow, 1950.
- 2.—*Manual de Histología Normal Humana*.—Tomás Ferrín G.—Espasa Calpe, S. A. Pág. 247/914.
- 3.—*L'hepatine en Médecine*.—Rev. d'Hématol. 1952. 174. Jaques, L. B.
- 4.—*J. Lab. and Clin. Med.* 34: 797, 1949.
- 5.—Schwartz von E. Esterl C. y Koller E.—Hematol. 1950-4. 148.
- 6.—Koller, E. y Eritschy W.—Über die Bedeutung des Antithrombins. *Helv. Med. Acta* 1947. 14. 263.
- 7.—*Clinical Hematology*.—Wintrobe, 1951.
- 8.—*Extraction of heparin from blood*.—L. B. Jaques, 1949.
- 9.—Triángulo. Vol. 1. N° 10. Dic. 1951.—Revista Sandoz de Ciencias Médicas. Prof. P. A. Owren, Oslo.
- 10.—*Técnica para la determinación en sangre de sustancias heparinizantes*.—Ignacio Cordera H.
Tesis recepcional de Q.F.B. de la U.N.A.M.
- 11.—*Técnica para determinar la Máxima Actividad Trombínica del plasma sanguíneo*.—Marcial Muñoz O.
Tesis recepcional de Q.F.B. de la U.N.A.M.