



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“CUAUTITLAN”

DISFIBRINOGENEMIA
TROMBOGENICA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MARIA ESTHER MORALES MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS:

RAMON CENDEJAS RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, MEXICO

1982



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.

I N D I C E

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.	2
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	
Características Generales	3
Transformación de Fibrinógeno a Fibrina	8
Fibrinógenos Anormales.	10
Características de Laboratorio.	14
Razones para el Estudio de una Disfibrinogenemia.	17
Historia Clínica.	17
OBJETIVOS.	22
MATERIAL Y METODOS	23
Diagrama de Plan de Trabajo	23
Pruebas de Coagulación.	24
Purificación de Fibrinógeno	27
Electroforesis del Fibrinógeno Purificado en Acetato de Celulosa.	28
Determinación de Fibrinógeno.	31
Determinación de la Coagulabilidad.	33
Determinación de la Velocidad de Desprendimiento de los Fibrinopéptidos	34
Determinación de la Polimerización de los Monómeros de Fibrina	35
RESULTADOS	37
DISCUSION.	67
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	74

A B R E V I A T U R A S

Acido	ac.
Acido Epsilon Amino Caproico	EACA
Acido Etilen Diamino Tetracético	EDTA
Bromuro de Cianógeno	CNBr
Centro Médico la Raza	CMR
Decilitros	dl
Densidad Optica	D.O.
Duodecil Sulfato de Sodio	SDS
Fibrinógeno	Fg.
Grados Centígrados	°C
Gramos	gr.
Instituto Nacional de Nutrición	I.N.N.
Kilogramos	Kg.
Micras	μ
Microlitros	ul
Miligramos	mg
Mililitros	ml
Milímetros Cúbicos	mm ³
Minutos	min
Molar	M
Nanómetros	nm
Peso Molecular	P.M.
Segundos	seg
Standard	std.
Tirosina	Tir
Unidades por mililitro	U/ml

R E S U M E N

El propósito de este trabajo fué dilucidar, mediante un estudio sistemático de coagulación, si en un paciente con trombosis de repetición se presentaba disfibrinogenemia.

Las primeras pruebas que se realizaron al paciente indicaron que sus tiempos de coagulación: trombina y reptilasa, fueron sumamente prolongados, por lo que se le efectuó un estudio funcional y su corrimiento electroforético de la molécula de fibrinógeno.

Al purificar el fibrinógeno del plasma del paciente, por el método de Silberstein, el rendimiento obtenido fué del 80.9%. La electroforesis en acetato de celulosa reveló que éste se encontraba relativamente purificado, con una concentración de fibrinógeno en plasma, en promedio, del 293.4 mg/dl de plasma; el análisis del fibrinógeno con respecto a su coagulabilidad fué, en promedio, del 79.26%. De acuerdo a las curvas standard de liberación de fibrinopéptidos y agregación de monómeros de fibrina, se puede decir que el fibrinógeno del paciente trombótico resultó ser normal, dado que presentó una trayectoria similar a estas curvas.

Los estudios realizados, orientados a demostrar una desfibrinogenemia, resultaron normales, sin embargo el hecho de que el paciente haya tenido alteraciones de coagulación similares a las observadas en las desfibrinogenemias, orientan a pensar que el paciente tuvo una desfibrinogenemia adquirida transitoria. Las causas más frecuentes a las que asocian éstas son las nefropatías del tipo del síndrome nefrótico. Con el tratamiento del problema renal al paciente, desapareció la desfibrinogenemia.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Características Generales

El fibrinógeno es una glucoproteína de P.M. de alrededor de - - - 340,000 daltons (1), tiene una estructura dimérica, cada unidad del dímero contiene tres cadenas peptídicas ligadas a un N-terminal por puentes de disulfuro e hidrógeno, que se denominan α (A), β (B) y γ . La α designa la cadena que produce todos los fibrinopéptidos A, cuando se trata con trombina (acción esterolítica), β se usa para indicar la cadena que produce fibrinopéptido B, y γ se usa para la cadena que no es hidrolizada por la trombina; por lo tanto, el fibrinógeno será: α (A)₂ β (B)₂ γ ₂ - - (2, 3, 4, 5) Fig. 1 y 2.

Usando electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, el P.M. de la cadena ha podido determinarse: α (A) 64,000, β (B) 57,000 y γ 48,000 daltons (2). La cadena polipeptídica γ es la más pequeña de las tres, no cambia durante el proceso de coagulación (6).

El fibrinógeno y la fibrina contienen carbohidratos en cantidades que alcanzan del 3-5% de la molécula. Los carbohidratos son 23 - residuos de hexosas, 20 residuos de hexosaminas y 6 ó 7 residuos de ac. siálico, unidos a la proteína por enlaces covalentes. Estos residuos parecen estar distribuidos en medio de las tres cadenas polipeptídicas. Los puntos de unión de los carbohidratos no están localizados en la cadena α (A) ó β (B), sin embargo en la cadena γ la unión se encuentra en la arginina en la posición 52. Algunos fibrinógenos anormales presentan incrementos o decremen-

ACCION DE LA TROMBINA

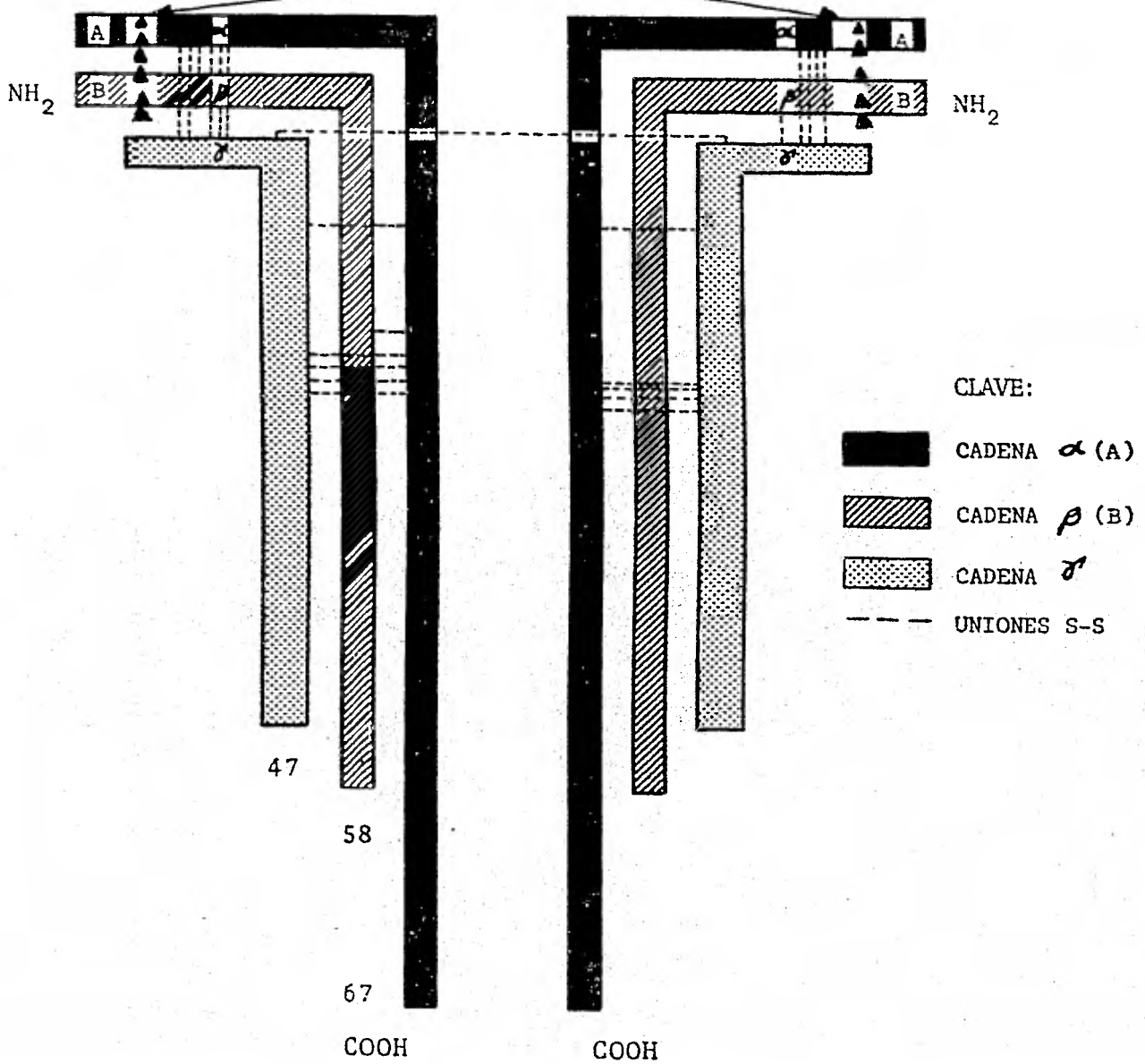


FIGURA 1.- Esquema que muestra la molécula dimérica del fibrinógeno con sus seis cadenas polipeptídicas, dispuestas en tres pares. Puede verse el sitio de ataque de la trombina.

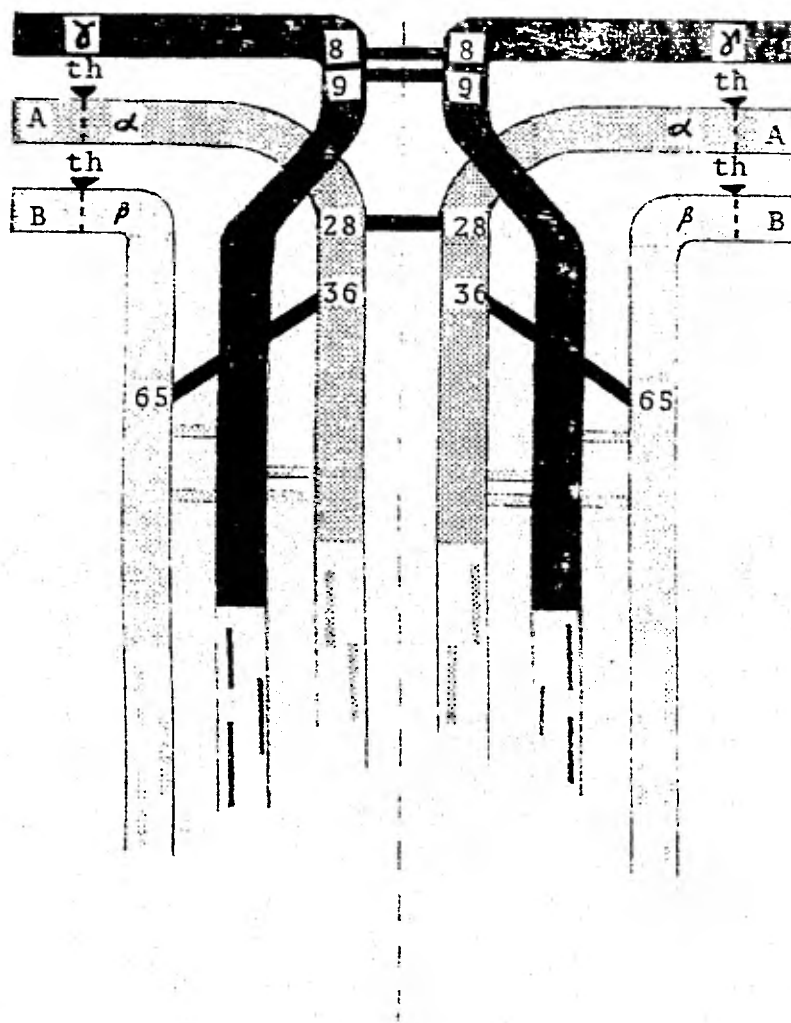


FIGURA 2.- Esquema que muestra los tipos de enlace disulfuro presentes en la molécula de fibrinógeno. Las líneas oscuras en la posición 8-8 y 9-9 de la cadena δ - δ , así como la línea 28-28 de la cadena α - α y 65-36 entre las cadenas α - β nos indican enlaces estables. Las líneas claras denotan enlaces inestables. Th representā el ataque de la Trombina.

tos en las cantidades de ac. siálico.

El fibrinógeno consta de 2,900 aminoácidos, el análisis de los aminoácidos N-terminales y C-terminales de las cadenas del fibrinógeno humano es el siguiente (5, 6):

	N-terminal	C-terminal
Cadena α (A)	Alanina	Valina
Cadena β (B)	Piroglutámico . . .	Valina
Cadena δ	Tirosina	Valina

Los diferentes fragmentos de proteínas de la molécula de fibrinógeno se han estudiado utilizando bromuro de cianógeno y plasmina. La fracción de la molécula de fibrinógeno que presentan los péptidos N-terminales, de los tres pares de cadenas polipeptídicas, tienen un gran contenido de enlaces disulfuro (40%). Estos péptidos N-terminales se combinan formando unos "nudos de disulfuro", por lo que se les llamó N-DSK. Estos nudos de disulfuro se separan cuando se adiciona bromuro de cianógeno, ya que éste actúa sobre los sitios metionilos (2, 5, 6). Cuando se adiciona plasmina al fibrinógeno, ésta reacciona como enzima proteolítica provocando la fibrinólisis, es decir, se obtienen varios fragmentos llamados X e Y, los cuales a su vez pueden fragmentarse en E y D.

X e Y poseen actividad anticoagulante, motivo por el cual hay muchos sangrados en los pacientes con acentuada fibrinólisis; en ciertos fibrinógenos anormales la acción de la plasmina no se realiza normalmente, ya que se piensa que la estructura anormal del fibrinógeno impide el sitio de acción de ésta (1, 5, 6 7) Fig. 3.

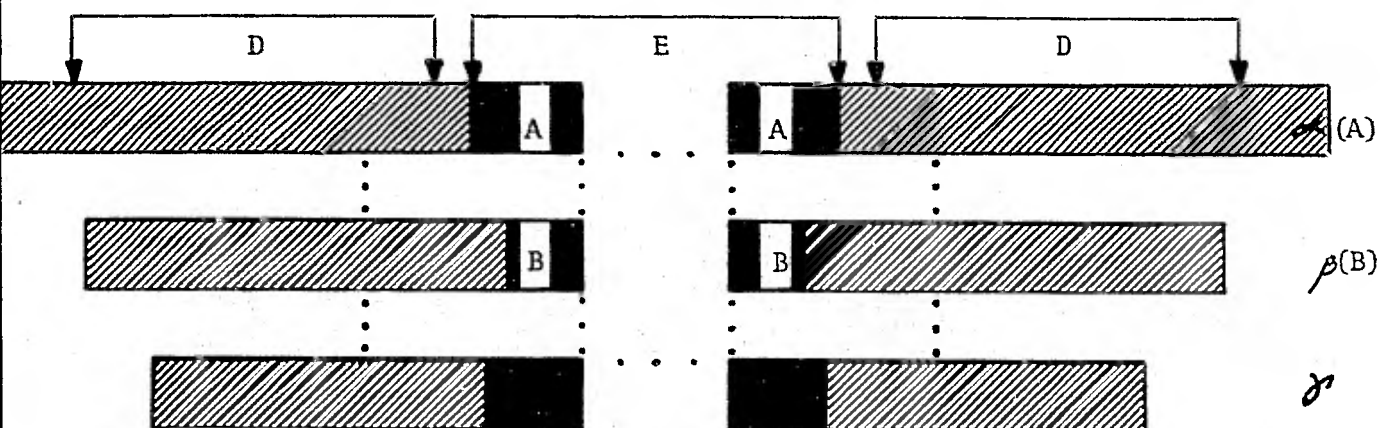


FIGURA 3.- Esquema que muestra el ataque de la plasmina, en donde se observa que dos fragmentos D y uno E se forman por la fibrinólisis (7).

Transformación de Fibrinógeno a Fibrina

Puede considerarse que la coagulación de la sangre se efectúa en tres fases (8): En la primera fase se desarrolla actividad de tromboplastina por la acción de jugos y plasma tisulares. Los sistemas sanguíneos (intrínseco) y tisular (extrínseco) son los responsables de la actividad tromboplástica. En la segunda fase es la conversión de protrombina a trombina, lo cual ocurrirá en presencia de la actividad de tromboplastina y de iones calcio, como puede observarse en la Fig. 4. En la tercera fase es la conversión de fibrinógeno a fibrina, por la acción de la trombina y, a su vez, esta conversión procede en tres etapas (3, 9):

- a) Liberación enzimática de fibrinopéptidos.- Esto ocurre cuando la trombina hidroliza cuatro enlaces arginil-glicina, en la posición 16-17 de la cadena α (A) y la posición 14-15 de la cadena β (B), liberando los fibrinopéptidos A y B de bajo P.M. El fibrinopéptido A es liberado primero y más rápidamente que el fibrinopéptido B; este retraso en la liberación del fibrinopéptido B refleja un aparente cambio conformacional después de la liberación del fibrinopéptido, lo cual permite la accesibilidad de la trombina en la posición 14-15 de la cadena β (B). La sola liberación del fibrinopéptido A del fibrinógeno normal, permite la polimerización de los monómeros de fibrina, ésto se ha comprobado con las enzimas Reptilasa y Arvin, que solo liberan fibrinopéptido A, la liberación única del fibrinopéptido B no da la polimerización (2, 5, 8, 9) Fig. 4.

b) Agregación de Monómeros de Fibrina.- Después de que los fibrinopéptidos A y B son removidos del fibrinógeno, a la porción residual de la molécula se le llamó monómeros de fibrina. La agregación se realiza por la formación de uniones de hidrógeno, lo cual enlaza a monómeros de lado a lado y de punta a punta para formar un coágulo visible, este hecho se afecta mucho por las condiciones del medio en el cual los monómeros de fibrina son suspendidos. El pH del medio afecta la clase de coágulo que se forma. El pH óptimo para que se presente la agregación de lado a lado es de 6.3 y el coágulo que se forma es grueso, de alta D.O. con consistencia plástica y no friable. A pH menor a 5.2 no se presenta la polimerización. La fuerza iónica también es un parámetro que nos determina la realización de la polimerización; incrementando la fuerza iónica del medio se retrasa la polimerización. Al adicionar iones calcio se acelera la agregación.

La liberación de solo el fibrinopéptido A favorece la formación de un coágulo fino (agregación de punta a punta). El fibrinopéptido B es necesario para que se efectúe la agregación de lado a lado. Los sitios exactos responsables de la agregación en la molécula de fibrinógeno aún no se conocen (2, 5, 8, 9) Fig. 4.

c) Estabilización de la Estructura de Fibrina.- El paso final de la conversión de fibrinógeno a fibrina es la estabilización de los agregados de monómeros de fibrina -

por la formación de uniones ϵ -(γ -glutamil)lisina entre las cadenas γ y entre las cadenas α bajo la influencia del factor XIII e iones calcio. El enlace de la cadena γ - γ se realiza rápidamente, mientras el enlace de la cadena α - α se efectúa lentamente. Una mala estabilización se puede ver no sólo por deficiencia del factor XIII sino también en "desfibrinogenemia" con cambios estructurales modifica la accesibilidad de los sitios de actividad del factor XIII (2, 5, 8, 9) Fig. 4.

Fibrinógenos Anormales

Los primeros casos de fibrinógenos anormales fueron descritos desde 1938 (10). Más tarde Ingram, 1955 (11), indicó que ciertas alteraciones funcionales del fibrinógeno eran de naturaleza familiar. Imperato y Dettori (12), en los inicios de 1958, reportaron un defecto funcional congénito del fibrinógeno como "hipofibrinogenemia con fibrastenia". Menaché, 1963 (1, 12), introdujo el término "disfibrinogenemia" definiéndola como toda alteración cualitativa del fibrinógeno, la cual se debe a un defecto molecular que puede dar lugar a manifestaciones clínicas y resultados anormales. Cada nuevo fibrinógeno variante sería nombrado de acuerdo a la ciudad donde fueron encontrados (Tabla 1).

Actualmente se conoce una anormalidad cualitativa de la molécula de fibrinógeno en dos diferentes situaciones (1):

- 1) Cuando aparece una molécula anormal del fibrinógeno por alteración espontánea en algunas condiciones patológicas, llamándose así "disfibrinogenemia adquirida".

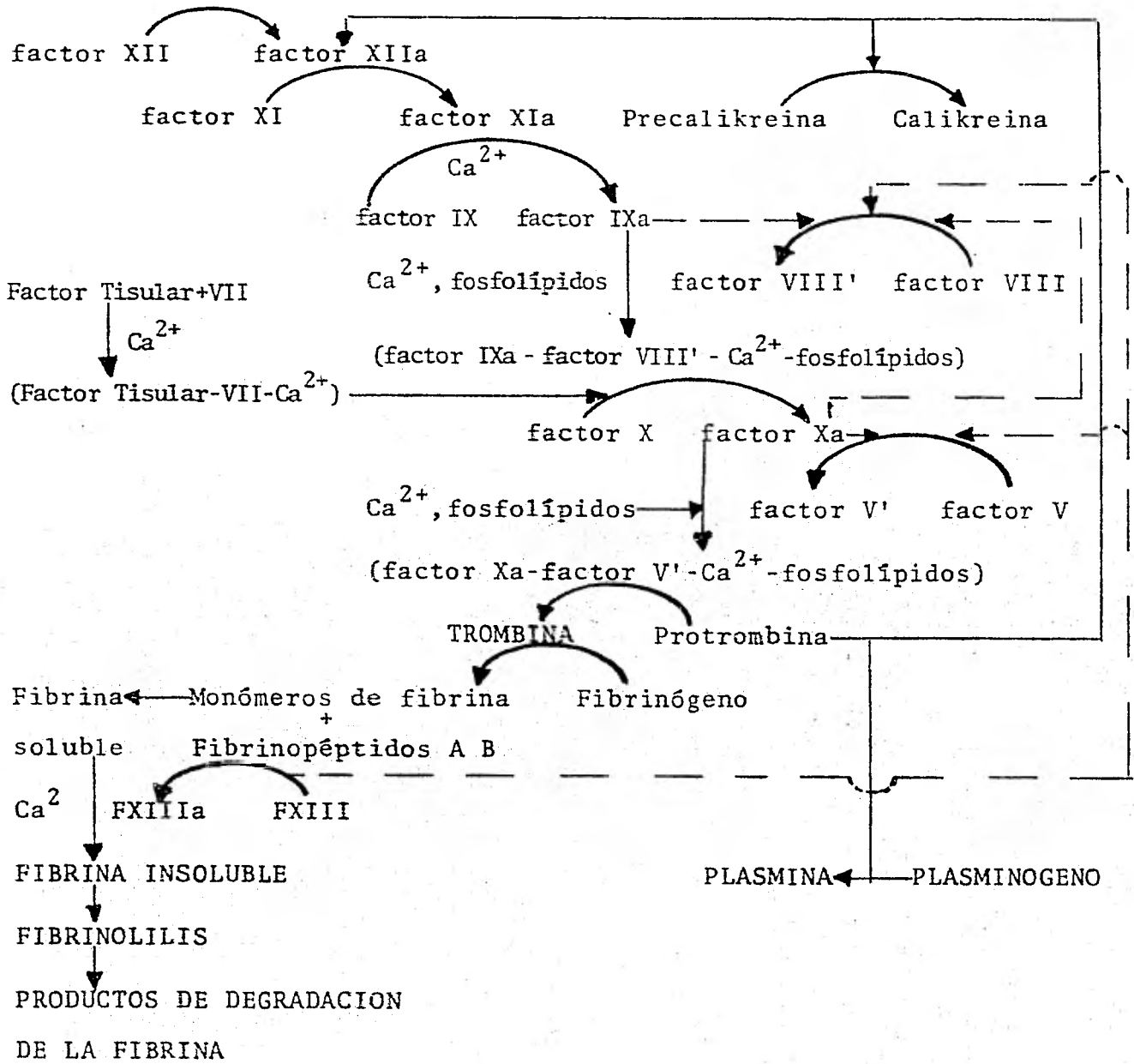


FIGURA 4.- Aquí se muestra la iniciación del mecanismo de coagulación, observándose la acción de los trece factores de la coagulación.

TIPO FIBRINOGENO ANORMAL	AÑO REPORTADO	SINTOMAS ASOCIADOS CON FIBRINOGENOS ANOR MALES:
PARMA	1958	Sangrados
PARIS I	1963	Defecto en la cicatrización de la herida (DCH)
VANCOUVER	1963	Sangrados, trombosis
BALTIMORE	1964	Sangrados, trombosis
ZURICH I	1965	-
CLEAVELAND	1967	Defecto en la cicatrización de la herida
DETROIT	1968	Sangrados
PARIS II	1968	Trombosis
LEUVEN	1968	-
OKLAHOMA	1968	Sangrados
ST. LOUIS	1968	-
ZURICH II	1970	-
LOS ANGELES	1970	-
BETHESDA I	1970	Sangrados
AMSTERDAM	1971	-
NANCY	1971	-
WEISBADEN	1971	Sangrados, trombosis, DCH
TROYES	1971	-
METZ	1971	Sangrados
GEISSEN	1971	Sangrados
BETHESDA II	1972	-
MONTREAL	1972	-
PHILADELPHIA	1972	Sangrados
IOWA CITY	1973	-
CLEAVELAND II	1973	Sangrados
SAN FRANCISCO	1974	-
PARIS III	1974	Trombosis

TABLA Nº 1 - FIBRINOGENOS ANORMALES

2) Cuando la molécula de fibrinógeno es anormal debido a una alteración transmitida genéticamente "disfibrinogenemia hereditaria".

La disfibrinogenemia adquirida fué observada en 1968, en un paciente con hepatitis severa; después 11 casos más fueron estudiados: 4 de ellos presentaron hepatitis viral severa, 5 presentaron cirrosis hepática y 2 hepatoma primario (2).

Se conocen 37 casos de disfibrinogenemia hereditaria (2) y el aumento en el número de casos ha permitido indicar su principal característica. En el caso de Fg. Detroit, Fg. París I, se ha comprobado la anormalidad molecular, sin embargo el sitio exacto de la mutación del aminoácido ha sido solo identificado en el Fg. - Detroit.

La enfermedad puede ocurrir aislada o asociada con la deficiencia de un factor de coagulación, como se observó en el caso de Fg. - Saint Louis (14), en el que hay una deficiencia en factor VIII. - En el caso de Fg. Parma (Imperato y Dettori) (2), se asocia con bajos niveles de fibrinógeno, lo cual también induce a un sangrado anormal. En Fg. Baltimore (2,5) se presentaron sangrados anormales asociados con "trombosis".

Transmisión en Disfibrinogenemia Hereditaria.- Generalmente el modo de transmisión parece ser una característica autosómica dominante con la misma frecuencia (2, 5, 8, 9).

Manifestaciones Clínicas.- En disfibrinogenemia hereditaria se observó que los individuos que poseían los fibrinógenos anormales

fueron en su mayor parte asintomáticos, y sólo se descubrieron por las pruebas de coagulación de rutina. Los individuos con síntomas han expresado variaciones en el grado de tendencia hemorrágica. Aunque algunos individuos con fibrinógeno anormal pueden manifestar síntomas, otros con la misma variante de fibrinógeno no los presentan, aún no se conoce la razón de este hecho.

Características de Laboratorio

Las siguientes pruebas nos ayudan a clasificar un fibrinógeno anormal:

- 1.- Características funcionales: Tiempo de trombina, tiempo de protrombina, tiempo de reptilasa, tiempo de tromboplastina parcial y niveles de fibrinógeno (1, 5).
- 2.- Características fisicoquímicas: Características del coágulo de fibrina, características electroforéticas (electroforesis en acetato de celulosa, inmunoelectroforesis, electroforesis en gel de poliacrilamida), anomalías estructurales y contenido de carbohidratos (1, 5).
- 3.- Localización del defecto funcional en la conversión de fibrinógeno a fibrina: liberación enzimática de fibrinopéptidos, fase de polimerización y estabilización de la fibrina (1, 5).

Tiempo de Trombina: La mayoría de los fibrinógenos anormales han presentado tiempos de trombina prolongados, lo cual se puede demostrar con trombina de varias fuentes (humana, bovina, equina);

los reportes han indicado que esta anormalidad se encuentra asociada a tiempos de reptilasa prolongados.

Tiempo de Protrombina: Los fibrinógenos anormales dan tiempos de protrombina también prolongados, pero con menor severidad que en el tiempo de trombina.

Tiempo de Reptilasa: Se ha visto que este tiempo se presenta sumamente prolongado en presencia de fibrinógenos anormales.

Tiempo de Tromboplastina Parcial: En fibrinógenos anormales el tiempo de tromboplastina parcial se puede encontrar normal o mínimamente prolongado.

Niveles de Fibrinógeno: Muchos de los fibrinógenos anormales mostraron discrepancia entre los valores de concentración de fibrinógeno en plasma cuando se determinó por varios métodos, si la concentración se mide solo por un método puede dejarse de identificar un fibrinógeno anormal. Los métodos para determinar la concentración de fibrinógeno son, entre otros: Método del fibrinocrito (19), Método de Von Clauss (20), Método de Ratnoff (23).

Electroforesis en Acetato de Celulosa: Esta técnica ayuda a determinar la pureza del fibrinógeno, en base al corrimiento que éste tiene, con una muestra de plasma normal.

Inmunoelectroforesis: Esta técnica indica si existe identidad parcial, total o no identidad entre un fibrinógeno normal y uno anormal.

Electroforesis en gel de poliacrilamida: Esta técnica detecta la

movilidad electroforética de las cadenas del fibrinógeno.

Anormalidades Estructurales: Se estudia la secuencia de aminoácidos, una vez que se tiene la seguridad de que es un fibrinógeno anormal, aún cuando no se conozca la estructura primaria de toda la molécula del fibrinógeno normal. Para lo cual se emplea el bromuro de cianógeno y la plasmina.

Contenido de Carbohidratos: Algunos fibrinógenos anormales purificados se han estudiado por su contenido de carbohidratos, y solo se ha detectado incremento o decremento de ácido siálico.

Liberación Enzimática de Fibrinopéptidos: Los fibrinopéptidos liberados por la trombina y la reptilasa se pueden medir como proteínas, por el Método de Lowry. Los fibrinopéptidos precipitados por el ac. tricloroacético se pueden medir por colorimetría, fluorometría o separarlos electroforéticamente.

Fase de Polimerización: En la mayoría de los fibrinógenos anormales se ha demostrado un defecto en la fase de polimerización de los monómeros de fibrina y varias técnicas han sido empleadas para conocer esta fase. Cuando el fibrinógeno se incuba con trombina a pH 5.2, los fibrinopéptidos se liberan pero la polimerización no se efectúa; cuando el pH se incrementa, el cambio en la D.O. de la solución refleja la polimerización de monómeros de fibrina. El fibrinógeno puede ser coagulado en presencia de EDTA para evitar una unión fuerte, en estas condiciones el coágulo de fibrina se puede disolver en solución de urea y mantener en solución amortiguadora salina, con esto la agregación de monómeros de fibrina puede ser estudiada bajo una variedad de condiciones, siguiendo la -

D.O. de la solución e incrementando el pH del medio.

Estabilización de la Fibrina: El resultado de la estabilización del coágulo se observa al ver la insolubilidad en urea 5M. Casi todos los fibrinógenos anormales han mostrado una estabilización normal por pruebas de solubilidad, sin embargo el coágulo de fibrina producido a partir del Fg. Oklahoma fué soluble, aunque -- después se observó una deficiencia en factor XIII.

Razones para el Estudio de una "Disfibrinogenemia"

Los casos de disfibrinogenemia son poco frecuentes por dos razones:

- 1) Generalmente el paciente llega al hospital porque tiene algún problema circulatorio, se estudia y existe una posibilidad en un millón de que presente disfibrinogenemia (10). Ahora bien, esto no quiere decir que la disfibrinogenemia debe ser sintomática, puede tenerse sin presentar patología, razón por la cual no se estudia.
- 2) Al descubrirse la disfibrinogenemia se incrementaron las investigaciones, y ahora se puede diagnosticar si presenta disfibrinogenemia u otra alteración.

En base a estas razones en el presente trabajo fué estudiado solo un paciente, del cual se sospechaba, por la sintomatología que presentaba, que tenía un problema de disfibrinogenemia.

A continuación se describe la historia clínica del paciente:

Historia Clínica del Paciente

Fué realizada en el Departamento de Hematología del I.N.N., por el

Dr. Roger Anaya.

Ingresa el paciente, masculino, de 40 años de edad, originario del Estado de Sinaloa, cuyos antecedentes familiares son los siguientes:

Abuelo materno, falleció por cardiopatía no especificada.

Padre, vivo, de 75 años de edad, padeció probable embolia pulmonar.

Madre, fallecida por nefropatía no especificada.

Acude por primera vez al I.N.N. con cuadro clínico de aproximadamente un año de evolución, del que destacan principalmente dos problemas: Insuficiencia arterial que ha condicionado fenómenos isquémicos en miembro inferior izquierdo, que lo llevaron a amputación del 5º orfejo izquierdo por gangrena, y posteriormente a probable tromboendarterectomía femoral izquierda, teniendo que administrar warfarina sódica, que el paciente suspendió, presentando entonces trombosis mesentérica que lo llevó a resección intersticial amplia, y finalmente dicho problema vascular está condicionado a hallazgos clínicos que pudieran corresponder a una neuropatía isquémica, especialmente patente en el territorio del nervio ciático derecho. El segundo problema, que se inició a dos meses después del anterior, consiste en edema, inicialmente solo en miembros inferiores y que después se generalizó asociado a hipoproteïnemia, proteinuria que no se ha cuantificado en forma exacta e -- hiperlipidemia, se le ha practicado biopsia renal.

Padecimiento Actual: El paciente presentaba un aparente buen estado de salud hasta el mes de mayo de 1979, en el que notó la presencia de dolores en los miembros inferiores, referidos como de "tipo muscular", como sensación de cansancio, así como calambres.

Dichas molestias se presentaban sin relación clara con el ejercicio muscular, y le mejoraban al cambiar de posición y al deambular.

El día 20 de mayo sufrió un golpe en el dedo pequeño del pie izquierdo, el cual tomó inicialmente una coloración violácea a negra, ocurriendo una marcada exacerbación de sus dolores musculares en miembro inferior izquierdo, fué al médico quien le practicó amputación del 5º orfejo izquierdo, además le recomendó ir a Guadalajara por sospecha de la presencia de trombosis de la arteria femoral izquierda. El paciente viajó a Guadalajara donde encontraron que su miembro inferior izquierdo se encontraba hipotérmico y sin pulsos, practicándosele intervención quirúrgica con insición inguinal izquierda (probable tromboendarterectomía femoral), al mes fue dado de alta (recibiendo únicamente warfarina sódica al día) viajando a Culiacán.

A fines de julio 1979 presentó edema de ambos miembros inferiores, por lo cual regresó a Guadalajara, donde se le prescribió furosemide, una semana después lo vió un nefrólogo practicándole una biopsia renal, diciendo al paciente que solo presentaba afectada la cubierta del riñón. Inició tratamiento con Meticarten 75 mg. diariamente.

Estuvo en buenas condiciones durante varias semanas, sin embargo en noviembre de 1979 notó aumento importante del volumen corporal, así como giba dorsal, acné en cara posterior del tórax y fascias de luna llena; acudió a Guadalajara donde se le redujo la dosis de Prednisona a 50 mg. cada tercer día, llegó a pesar 117 Kg. y presentó hiperglucemia, con la reducción de dosis de esteroides redujo su peso hasta 89 Kg. y desapareció la mayor parte de las mani-

festaciones antes mencionadas.

En marzo del año en curso (1980), en Culiacán se le siguió disminuyendo la dosis de esteroides, hasta dejar de tomarla por completo el 10 de marzo. A fines de ese mes dejó de tomar el Coumadín porque se le iba a practicar extracción dentaria, que no llegó a efectuarse. El día 22 de abril un cuadro agudo de dolor abdominal difuso, náusea, vómito, siendo intervenido con el diagnóstico de probable trombosis mesentérica, practicándosele resección de 2 cm. de intestino delgado; una semana después se le dió tratamiento de Coumadín, presentando diarrea hasta hace diez días.

En mayo de 1980 acudió con un médico de Culiacán, Sinaloa, quien en base de estudios de laboratorio diagnosticó insuficiencia renal, recomendando acudiera a este instituto.

Acude al I.N.N. quejándose de edema en miembros superiores e inferiores, aunque con predominio en estos últimos.

El la Tabla N° 2 se muestran los estudios realizados en junio de 1980 al paciente, por el I.N.N.

Diagnóstico de salida:

- 1) Síndrome de hipercoagulabilidad.
 - a) Probable disfibrinogenemia por tiempo de trombina y -- reptilasa prolongados.
 - b) Trombosis recurrentes (femoral izquierda mesentérica).
- 2) Síndrome nefrótico de etiología no precisada.
- 3) Nefropatía del tubulo intersticial.
- 4) Hiperlipoproteinemia tipo IV.
- 5) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Determinación de Tiempos de Coagulación
Así como Concentración de Fibrinógeno.

		VALORES PACIENTE	VALORES NORMALES
(a) TIEMPOS DE COAGULACION:			
Tiempo de Trombina		0 min. 25.8	17 a 21.5
	ANORMAL	30 min. 80.0	20 a 22.0
		60 min. mayor a 120	28 a 40.0
Tiempo de Reptilasa	ANORMAL	56.4	17.4 a 23.6
Tiempo de Protrombina		11.3	11.0 a 14.2
Tiempo de Tromboplastina parcial		29.4	34.0 a 45.0
(b) CONCENTRACION DE FIBRINOGENO POR:			
Clauss	ANORMAL	620	175 a 475
Ratnoff	ANORMAL	760	175 a 475

(a) Tiempos de coagulación calculados en segundos.

(b) Concentración de fibrinógeno calculada en mg%.

TABLA N° 2 - Estudios de coagulación dados en segundos, mientras - que los métodos de Clauss y Ratnoff se dan en miligramos por ciento. Estos análisis se realizaron en junio de 1980 en el - I.N.N., como se puede observar el tiempo de trombina y reptilasa se encuentran sumamente prolongados.

O B J E T I V O S

El interés en la naturaleza funcional y estructural del fibrinógeno se incrementó con los resultados obtenidos al estudiarlo en el importante papel que realiza dentro de la coagulación, asumiendo que su conocimiento detallado nos ayudará a estudiar las causas de varios estados de enfermedad.

Este trabajo ha tenido como finalidad saber la causa por la cual se presenta, en un paciente, trombosis de repetición, y si ésta es debida a una disfibrinogenemia, ya que según lo informado en la literatura ocurrieron, entre otros síntomas, problemas trombóticos por los menos en cinco diferentes fibrinógenos anormales estudiados (2, 5), además, según las pruebas de coagulación realizadas en 1980 del paciente en estudio, éste presentó tiempos de trombina y reptilasa prolongados (Tabla 2).

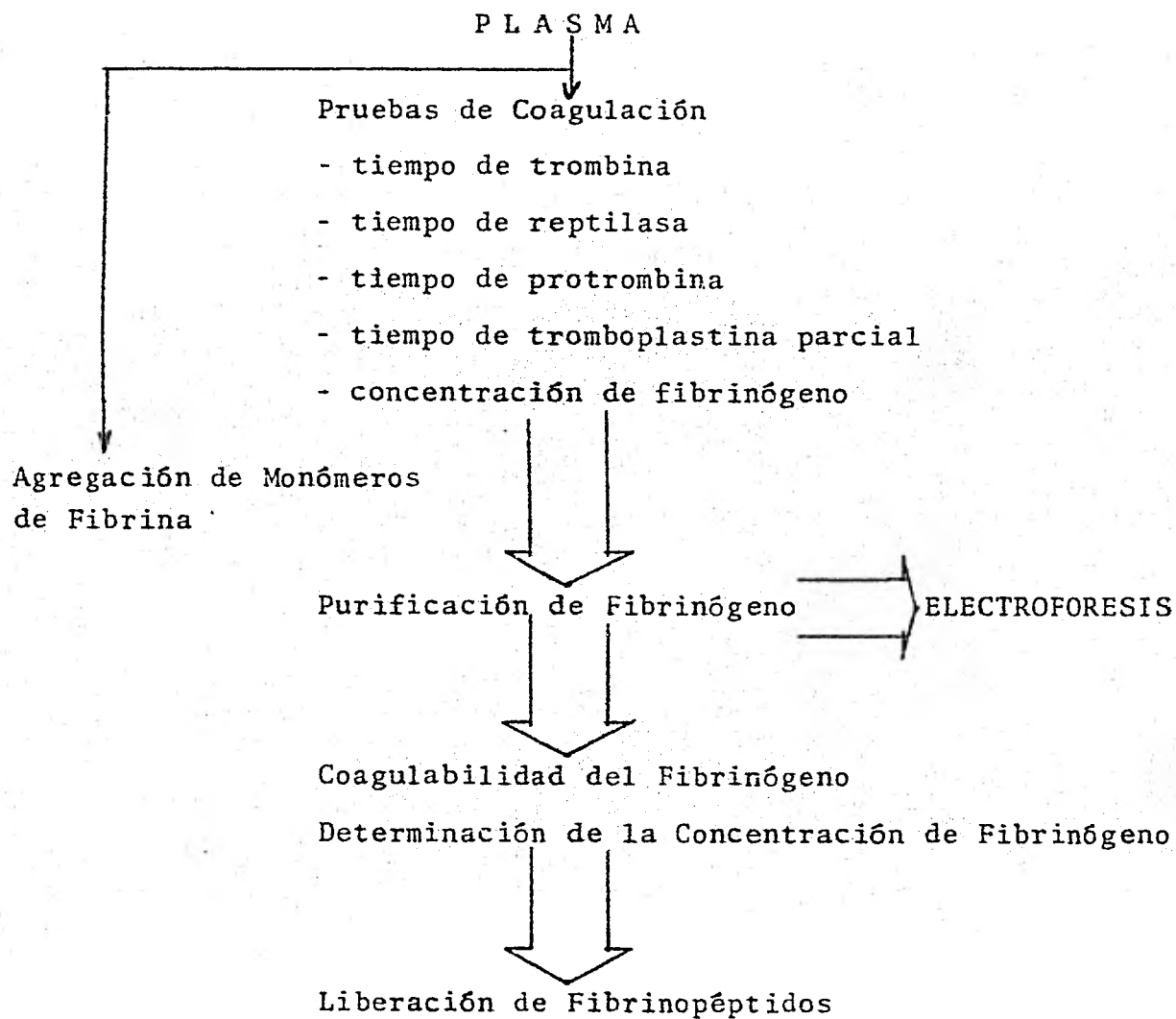
Con estas bases planteamos los siguientes objetivos:

Estudiar las características funcionales y corrimiento electroforético de la molécula del fibrinógeno en un individuo con probable disfibrinogenemia, utilizando el equipo y reactivos de un laboratorio de Hematología Especial.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se basó en el siguiente plan de trabajo:

Diagrama de Plan de Trabajo



En este diagrama se muestra la secuencia de trabajo que se siguió para estudiar tanto el plasma del paciente como el plasma control.

Muestras de Plasma:

Se analizaron 10 muestras de plasma obtenidas del Banco de Sangre del Hospital de Especialidades del C.M.R., mediante las pruebas de coagulación, con el fin de observar el desarrollo de dichas técnicas, que son de suma importancia para descartar algunos problemas de coagulación.

Tiempo de Trombina.- Este tiempo de coagulación se realizó siguiendo la técnica de Hardisty (15), para lo cual se empleó el reactivo comercial Trombofax (Laboratorios Ortho Diagnóstico). Se reconstituyó la ampollita con 1 ml. de NaCl 0.85%, esta solución se diluyó 1:20, aparte se tomó 0.1 ml. de plasma y se incubó a 37°C. por 1 min., después se añadió 0.2 ml. de la solución de trombina y se cronometró el tiempo de coagulación. Se reportó el problema con referencia a un testigo . (el valor normal se muestra en tabla 4).

Tiempo de Reptilasa. - El tiempo de reptilasa se realizó siguiendo la técnica de Soria y Samana (16), para lo cual se emplea el reactivo Reptilase-R (Laboratorios Pentapharm, S. A., Suiza). Este reactivo se reconstituyó con 1 ml. de agua destilada. Esta solución contiene 0.9% de NaCl y su actividad se ajustó de tal modo que 0.3 ml. de plasma humano normal, citratado con 0.1 ml. de reactivo a 37°C, produjera un tiempo de reptilasa de 25 seg.. Se reporta con referencia a un testigo. (El valor normal se muestra en la tabla 4).

Tiempo de Protrombina.- El tiempo de protrombina se efectuó en base a la técnica de Quick (17), el reactivo comercial empleado fué

El Thromborel Hoech (Laboratorios HOechst), el cual se reconstituyó con 2 ml. de agua destilada. Se incubó por 5 min. en baño maría a 37°C. Aparte se colocó 0.1 ml. de plasma en baño maría a 37°C durante 1 min., después del cual se añadió 0.2 ml. de reactivo precalentado y se registró el tiempo en que se formó el coágulo. (Valor normal en la tabla 4).

Tiempo de Tromboplastina Parcial.- Para este tiempo de coagulación la técnica empleada fué la de Rapaport (18), el reactivo comercial empleado fué el Pathromtin (Laboratorios Behring) que consta de dos frascos, uno que es el reactivo TTP y el otro que es la suspensión caolín. Lo primero que se hizo fué verter la suspensión de caolín en el frasco del reactivo TTP, se mezcló bien. Se tomó 0.1 ml. de plasma con 0.1 ml. de la suspensión anterior en un tubo de ensayo y se mezcló, incubándola a 37°C durante 2 min., después de la incubación se añadió 0.1 ml. de CaCl_2 0.025 M precalentado a 37°C, se cronometró hasta la formación del coágulo. (El valor normal se muestra en Tabla 4).

Concentración de Fibrinógeno por el Método de Fibrinocrito.- Aquí se empleó la técnica descrita por Ruiz Reyes (19), para este método se emplearon capilares de vidrio de 67 mm., los cuales se marcaron a 45 mm. y se llenaron con plasma hasta ese nivel, cerrando los extremos con calor, se centrifugó en centrífuga microcapilar por unos momentos, para que el plasma quedara empacado perfectamente en un extremo. El tubo capilar se introdujo en baño maría a 58°C durante 15 min., cuidando que el nivel del agua sobrepasara el del plasma que estaba en el capilar, para asegurar un calen

tamiento uniforme. Transcurrido este tiempo se sacaron los tubos capilares y se centrifugaron durante 15 min. en la centrífuga microcapilar. De esta manera el fibrinógeno precipitado se empacó en el fondo del capilar; se leyó el tubo capilar en una microescala (19) introduciendo en la canaladura del aparato de plástico y con observación de un ocular de microscopio 10x invertido, se hizo coincidir el fondo del tubo capilar con el cero de la escala. Se midió la altura del precipitado del fibrinógeno (H.F.) y, sin mover el tubo capilar para que su fondo siguiera coincidiendo con el cero de la escala, se midió la altura del plasma (H.P.).

Cálculo: Conocidas las alturas del plasma y el fibrinógeno precipitado, se obtuvo la expresión porcentual del fibrinógeno precipitado y empacado:

$$\frac{H.F. \times 100}{H.P.} = \text{fibrinocrito}$$

Para convertir el fibrinocrito a mg. de fibrinógeno por 100 ml., se multiplicó por un factor que se obtiene de dividir el valor de fibrinógeno por el método de Clauss en 20 plasmas normales, entre el valor del fibrinocrito. (Ver Tabla 4).

Niveles de Fibrinógeno por el Método de Von Clauss.- Para determinar la concentración de fibrinógeno en plasma, se empleó la técnica de Von Clauss (20), mismo que utiliza Trombina humana (Laboratorios Behring), este reactivo se reconstituyó con 1 ml. de NaCl 0.85%. Se incubó 0.2 ml. de plasma a 37°C (previamente diluido 1:10 con amortiguador de veronal de Owren (Laboratorios Behring) pH 7.35) durante 2 min., después de los cuales se añadió 0.2 ml. de trombina previamente hidratada, y se cronometró hasta la for-

mación de un coágulo visible. El tiempo obtenido se interpoló - en una curva standard para obtener la concentración de fibrinógeno.

La curva standard es una curva standarizada y empleada diariamente para esta determinación, por el Laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades del CMR. (Valor normal según Von Clauss, en la Tabla 4).

Muestra de Plasma del Paciente:

Fué obtenido por plasmaféresis, y más tarde fué fraccionado en diferentes alicuotas de 100 ml., 3 ml. y 1 ml., y almacenados a 4° C para posteriormente realizar las pruebas correspondientes.

Purificación de Fibrinógeno:

La purificación de fibrinógeno fué realizada por la técnica de Silberstein (9, 21, 22). Se emplearon 80 ml. de plasma, los cuales se colocaron en un vaso de precipitado a temperatura ambiente, con agitador magnético (Thermolyne tipo 1000), se adicionaron 5 mg. de $MgSO_4$ por ml. de plasma (cristalino $MgSO_4 \cdot 7H_2O$), para formar un complejo no ionizado con el citrato libre; al mismo tiempo se adicionaron 90 mg. de $BaSO_4$ por ml. de plasma para absorber la protrombina. Se agitó lentamente por 30 min., al cabo de los cuales se centrifugó por 15 min. a 1800 x g (Centrífuga Damon/IEC División), para remover el $BaSO_4$.

En tubos de plástico grandes se separó el sobrenadante claro, el cual se pasó a través de un filtro millipore (swinnex de 0.45 μ), con el objeto de esterilizar la solución, midiéndose el volumen -

obtenido, el cual fué de 78 ml. El filtrado fué entonces colocado en un vaso de precipitado y se adicionó EACA (14 mg. por ml. del filtrado) para inhibir el plasminógeno. Se precipitó el fibrinógeno agregando glicina al 65% de saturación, de acuerdo a la Tabla 3 (22). Se agitó por 50 min. y se centrifugó a 1800 x g durante 15 min., el sobrenadante se desechó por decantación; el fibrinógeno ya obtenido fué disuelto por citrato de sodio 0.055 M pH 7.4 más EACA (14 mg. por ml. del sobrenadante que se obtuvo con BaSO_4 (78 ml.)). Este fibrinógeno se precipitó dos veces más con glicina. La pastilla resultante de la tercera precipitación se disolvió en un volumen de citrato de sodio 0.055 M pH 7.4 igual a 5/6 de 78 ml. (65 ml.). Finalmente la solución se filtró por millipore para clarificarla.

Inmediatamente después se dializó en solución amortiguadora de citrato de sodio 0.055M pH 7.4 a 4°C durante 72 horas para quitar el exceso de glicina.

Como control se emplearon 80 ml. de plasma, obtenido del Banco de Sangre del Hospital de Especialidades del CMR, libre de plaquetas, globulina y paquete globular; éste fué inmediatamente centrifugado para obtener plasma totalmente libre de plaquetas, entonces fué tratado de la misma forma que el plasma del paciente y bajo las mismas condiciones experimentales.

Electroforesis del Fibrinógeno Purificado en Acetato de Celulosa:

Se basó en el método de microzona para proteínas del suero (el método ha sido standarizado y aplicado diariamente en el labora-

Glicina Optima al 65% de Saturación

TEMPERATURA en °C	mg. de GLICINA por ml. de Plasma
30	175
29	171
28	168
27	164
26	160
25	157
24	153
23	149
22	145
21	142
20	138

TABLA N° 3.- Aquí se muestran los mg. de glicina (al 65% de saturación), que se deben adicionar de acuerdo a la temperatura ambiental del laboratorio, desde 30°C a -- 20°C. (Datos tomados de un trabajo experimental realizado por Silberstein (22)).

torio del Hospital de Especialidades del CMR) y es como sigue: Se impregnó la membrana de acetato de celulosa con una solución amortiguadora de Barbitol B-2 pH 8.6, el cual es un producto comercial (obtenido de los Laboratorios Beckman, California USA), se dejó remojar por 10 min., después de ese tiempo se dejó secar en unas membranas absorbentes llamadas blotters, una vez seca se puso entre los puentes de la cámara de corrimiento y se tapó. Aparte, en un papel parafilm, se colocaron unas gotas de la solución a estudiar y, con un aplicador de muestra, se tomaron 0.025 ul. y se aplicaron en los canales para las muestras indicadas en la cámara, se esperó entre 5 y 7 seg., después se corrió la muestra a 250 -- volts durante 20 min. (4-6 miliamperios).

La membrana, con las muestras ya corridas, se procesó de la siguiente manera: Se dejó en una solución de rojo oleoso por 8 min., eliminando el exceso de colorante con una solución de ácido acético al 5%, se colocó entonces la membrana en una solución fijadora (95 ml. de alcohol absoluto más 5 ml. de alcohol isopropílico) por 2 min. Después se colocó en una solución aclaradora (95 ml. de alcohol absoluto con 5 ml. de alcohol isopropílico, se eliminan 25 ml. de la solución total y se substituyen con 25 ml. de ciclohexanona) durante 8 min. Finalmente se dejó secar. (Todo el equipo empleado es de los Laboratorios Beckman. California, USA).

Se corrió una placa con fibrinógeno purificado del paciente y un fibrinógeno control a diferentes concentraciones (Fig. 5).

Como std. internos se corrieron las siguientes muestras: albúmina humana y solución comercial de fibrinógeno humano (de los Labora-

torios Sigma) a tres concentraciones diferentes; plasma normal y suero normal (Fig. 6).

Determinación de la Concentración de Fibrinógeno:

La técnica realizada para la determinación de la concentración - fué la de Ratnoff y Manzie (23). Para esto se tomaron 0.5 ml. - de plasma del paciente sujeto de este estudio. En un mortero se machacaron pedazos de vidrio para obtener partículas de vidrio, de modo que las más grandes tuvieran un diámetro menor de 0.5 mm.

En tubos grandes de vidrio 19 x 105 mm. se adicionaron 0.5 ml. - de vidrio aproximadamente, medidos en relación de volumen a 0.5 ml. de agua, 10 ml. de solución de NaCl al 0.85% y 0.05 ml. de - solución de trombina conteniendo 1000 U/ml., finalmente 0.5 ml. de plasma a ser analizado; se agitaron los tubos con movimiento oscilatorio durante 10 min. Una vez realizada la coagulación, - las bandas de fibrina se adhirieron a las partículas de vidrio, diez min. después los tubos se centrifugaron por 5 min. a 1800 - x g . El sobrenadante obtenido se eliminó por decantación. ense guida se adicionaron 10 ml. de solución de NaCl al 0.85% al coá- gulo de fibrina, el cual fué cuidadosamente presionado contra - las paredes del tubo de centrífuga con una varilla de vidrio, - con el fin de evitar que cayera. Esta operación se repitió dos veces más. Finalmente se adicionó 1 ml. de NaOH al 10% a los tu bos conteniendo vidrio molido y la fibrina, y se calentaron en - baño maría durante 10 min., minimizando la evaporación tapando - el baño maría. Se enfriaron los tubos y se les adicionó 7 ml. - de H₂O, seguidos de 3 ml. de solución de Na₂CO₃ al 20% y 1 ml. -

de reactivo Folin-fenol (23). Se dejó reposar por 10 min. para que se desarrollara completamente el color azul. Se tomó 1 ml. de la solución coloreada y se añadieron 3 ml. de agua; finalmente se determinó su absorbancia a 650 mm. (en cubetas de 1 cm. de paso de luz y un espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL).

La cantidad de fibrina en el plasma se estimó al comparar la intensidad de color desarrollado con aquella de un ml. de solución std. de tirosina, preparada como sigue: Se pipeteó 1 ml. de solución de tirosina (200 mg. de tirosina por litro de solución al 0.1 N de HCl) en tubo de 15 x 125 mm., enseguida se adicionó 1 ml. de NaOH al 10%, 6 ml. de agua, 3 ml. de Na₂CO₃ al 20% y 1 ml. de reactivo Folin-fenol (23). Un ml. de solución coloreada fué diluido con 3 ml. de agua destilada y después de 10 min. fué leída la intensidad de color contra el blanco de reactivos.

La concentración de fibrinógeno se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CONCENTRACION DE FIBRINOGENO (mg/dl)} = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. patrón}} \times 936.12$$

En donde el factor 936.12 fué obtenido de la siguiente forma:

$$\frac{[\text{Fibrinógeno}]}{\text{por 100 ml. plasma}} = \frac{\text{D.O. prob.}}{\text{D.O. pat.}} \times \text{vol. pat. Tir.} \times \text{pat. Tir.} \times \frac{100}{\text{vol. plasma}} \times \text{Factor 11.7}$$

En donde: prob.=problema; pat.=patrón; vol.=volumen; []=concentración.

El factor 11.7 fué en 4 experimentos (22), el peso de la fibrina promedio de 11.7 veces el peso de una cantidad equivalente de tirosina, en donde el error std. de la media fué ± 0.3

$$\begin{array}{l}
 \text{[Fibrinógeno]} \\
 \text{por 100 ml. plasma}
 \end{array}
 = \frac{\text{D.O. prob.}}{\text{D.O. pat.}} \times \underbrace{1.55 \times 0.2581 \times \frac{100}{0.5} \times 11.7}_{\text{constante}}$$

Por lo tanto la fórmula es:

$$\begin{array}{l}
 \text{[Fibrinógeno]} \\
 \text{por 100 ml. plasma}
 \end{array}
 = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. patrón}} \times 936.12$$

Se determinaron dos curvas standard, una empleando solución de fibrinógeno a diferentes concentraciones y otra empleando solución de tirosina, también a diferentes concentraciones, empleando para ello el método de Ratnoff.

Con este método, además, se determinaron 10 muestras de plasma, obtenidas del Banco de Sangre del Hospital de Especialidades del CMR.

Determinación de la Coagulabilidad de la Solución de Fibrinógeno:

La determinación de la coagulabilidad se efectuó por el Método de Gralnick (25). Se diluyeron 0.5 ml. de solución de fibrinógeno - pH 7.4 con 4.5 ml. de solución amortiguadora de fosfatos 0.025M - pH 7.4 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$), de aquí se tomaron 2.25 ml. y se añadieron 0.25 ml. de solución de trombina conteniendo 100 U/ml., se incubó en baño maría a 37°C por 45 min. Después de este tiempo fué separado el coágulo con una asa de platino. Se centrifugó y se separó el sobrenadante. Se determinó la absorbancia a 280 nm. del sobrenadante y de la solución inicial del fibrinógeno.

Se leyó la absorbancia de la solución de trombina a 280 nm., la cual sirvió para corregir el valor de la absorbancia del sobrena

dante, bajo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ COAGULABILIDAD} = \frac{A_{F \text{ original } 280} - \left[A_{F \text{ sobrenadante } 280} - A_T \right]}{A_{F \text{ original}}} \times 100$$

A= absorbancia; F=fibrinógeno; T=trombina.

Determinación de la Velocidad de Desprendimiento de los Fibrinopéptidos:

Esta determinación se basó en el Método de Sherman (14). Se obtuvieron 10 muestras diferentes de plasmas normales del Banco de sangre del Hospital de Especialidades del CMR, a las cuales se les purificó su fibrinógeno por el método anteriormente explicado y se procedió a realizar la liberación de fibrinopéptidos, para obtener una curva standard (Fib. 10). El método consiste en lo siguiente: Se rotularon 10 tubos de ensayo con 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 120 min., a cada tubo rotulado se le adicionaron 0.5 ml. de fibrinógeno con una concentración de 2.9 mg/ml. de solución amortiguadora de citrato de sodio 0.055M pH 7.4, al tiempo cero se adicionaron a todos los tubos 0.05 ml. de solución de trombina conteniendo 25 U/ml.; a los diferentes intervalos de tiempo ya indicados se paró la reacción, con 0.5 ml. de ácido tricloroacético al 10%, con agitación para disolver el coágulo.

Se preparó un blanco de reactivos bajo las mismas condiciones, pero sin plasma. Una vez parada la reacción se pasaron los tubos a 4°C, después se centrifugaron a 2200 x g durante 10 min.; más tarde a los sobrenadantes se les determinó la liberación de proteínas por el Método de Lowry.

Determinación de Proteínas por el Método de Lowry. - Se prepararon las siguientes soluciones: Reactivo A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.2N; Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%, tartrato de sodio y potasio al 1%; se mezclaron 0.5 ml. de CuSO_4 con 0.5 ml. de tartrato de sodio y potasio al 1%; Reactivo C: Solución alcalina de cobre; se mezclaron 50 ml. de reactivo A, con 1 ml. de reactivo B. Reactivo D: - Reactivo de Folin-fenol (23) diluido 1:2 en el momento de usarse.

A 0.2 ml. del sobrenadante obtenido por precipitación con ac. tricloroacético se añadieron 1 ml. del reactivo C y 0.1 ml. del reactivo D, se agitó y dejó reposar por 20 min. a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 650 nm (en cubetas de 1 cm. de paso de luz en un espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL).

Para comprobar que la técnica de Lowry estaba funcionando y que servía para los fines de determinación de proteína, se realizó una curva std. de concentración de proteína.

El plasma problema se trabajó en las mismas condiciones que para la curva std.

Determinación de la Polimerización de los Monómeros de Fibrina:

Esta determinación se basó en el Método de Von Felten (25). Se obtuvieron 10 muestras diferentes de plasmas normales del Banco de sangre del Hospital del CMR, las cuales se procesaron por este Método para obtener una curva standard (Fig. 13). El método consiste en lo siguiente: Se emplearon 100 ml. de plasma, a los cuales se les adicionó 0.1 gr. de EDTA, con el propósito de fijar los iones calcio e inhibir la actividad del factor XIII y -

evitar la estabilización de la fibrina. Se adicionaron 5.6 ml. de EACA para inhibir la actividad del plasminógeno. El plasma fué diluído 1:3 con NaCl al 0.85%, se incubó con trombina conteniendo 5 U/ml. de plasma a 37°C durante 30 min., después de este tiempo se incubó por 24 horas. Los pasos subsecuentes se realizaron a 24°C. El coágulo se separó por centrifugación y se lavó tres veces con NaCl 0.85% y 2% de EDTA. El sedimento lavado se disolvió en urea 5M y se dializó con agua destilada durante 24 horas. El nuevo coágulo se lavó tres veces con NaCl al 0.85% y 2% de EDTA, después de esto se disolvió en urea 5M. Esta solución de dímeros purificados se dializó con una solución amortiguadora de fosfatos 0.016M pH 4.5 durante 5 días (a este pH se inhibe la agregación de los monómeros).

Agregación de monómeros.- En tubo de ensayo se colocaron 0.2 ml. de solución de monómeros purificados, 1.75 ml. de agua, 0.23 ml. de solución amortiguadora de fosfatos 0.016M pH 9.6 y 0.2 ml. de CaCl_2 332 meq/l, inmediatamente se midió el aumento de turbidez a 350 nm. de longitud de onda (en un espectrofotómetro Zeiss PM - 2 DL, utilizando celdillas de cuarzo de 1 cm. de paso de luz). El plasma problema se trabajó bajo las mismas condiciones que para la curva standard y a dos diferentes concentraciones,

R E S U L T A D O S

Muestras de Plasma.- Con el objeto de standarizar las pruebas de coagulación de rutina en el laboratorio de Hematología Especial, se analizaron 10 muestras de plasma por los métodos anteriormente descritos en material y métodos: Tiempo de trombina, tiempo de reptilasa, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial, así como los niveles de fibrinógeno. Los resultados se muestran en la Tabla N° 4.

Con estos resultados se estudiaron las condiciones en que se hallaba el paciente en estudio, realizándole las mismas pruebas de coagulación y los resultados se muestran en la Tabla 5.

Purificación de Fibrinógeno.- El fibrinógeno del paciente se purificó a partir de una muestra de plasma, por el método de Silberstein (22) descrito en material y métodos. Se determinó el rendimiento de la siguiente forma: El volumen inicial de plasma del paciente fué de 80 ml., la concentración de fibrinógeno en el plasma, por el método de Von Clauss, fué de 300 mg%, el volumen final de fibrinógeno purificado del paciente fué de 67 ml. y la concentración de este último, calculada por el método de Clauss, fué de 290 mg%, con estos datos se encontró que:

300 mg.	-	100 ml. plasma
X	-	80 ml. plasma
X	=	240 mg.

290 mg.	-	100 ml. de solución de fibrinógeno purificado
X	-	67 ml. de solución de fibrinógeno purificado
X	=	194.3 mg.

Si:	240	mg.	-	100%
	194.3	mg.	-	X
	X	=		80.9% de rendimiento

Por el método de Silberstein permite obtener un rendimiento entre 75-85%.

La muestra del control se efectuó bajo las mismas condiciones y con los mismos cálculos, el rendimiento fué de 76.7%.

Electroforesis del Fibrinógeno Purificado en Acetato de Celulosa:

Con el objeto de comprobar que las soluciones del fibrinógeno purificado del paciente y del control se encontraban puras, se procedió a efectuar la electroforesis en acetato de celulosa, una vez finalizada la diálisis por 4 días; el resultado de este corrimiento se puede observar en la Fig. 5, en donde se puede afirmar que las muestras se encontraban relativamente puras.

Los std. internos mencionados en material y métodos se muestran en la Fig. 6.

Concentración de Fibrinógeno.- Aplicando el método de Ratnoff descrito en material y métodos, para obtener las curvas standard de fibrinógeno y tirosina, necesarias para comprobar la funcionabilidad del método, se trabajó con las soluciones de fibrinógeno y tirosina a diferentes concentraciones, obteniéndose los resultados indicados en las Tablas 6 y 7. Con estas lecturas se hicieron -- las curvas std. de concentración contra D.O. a 650 nm., se muestran en las Fig. 7 y 8. Los resultados de las muestras de plasma analizadas por este método se muestran en la Tabla N° 8. Los resultados de las muestras del paciente, efectuadas 8 veces, se en-

Resultados de Pruebas de Coagulación

Realizados en Plasmas Normales

	^{c)} PLASMAS NORMALES	VALORES NORMALES
a) TIEMPOS DE COAGULACION:		
Tiempo de Trombina	18/20	20 6 2 arriba del T.
Tiempo de Reptilasa	23/21	hasta 25
Tiempo de Tromboplastina Parcial	28/30	35-45 6 10 arriba del T.
b) CONCENTRACION DE FIBRINOGENO POR:		
Von Clauss	350	150-450
Fibrinocrito	390	150-450

a) Tiempos de coagulación calculados en segundos

b) Concentración de fibrinógeno calculada en mg%

c) Los números abajo de la diagonal indican testigos, así como la T.

TABLA N° 4.- Promedio de 10 determinaciones efectuadas en 10 muestras de plasma normal bajo las condiciones explicadas en material y métodos, se observan los rangos normales para cada prueba.

Resultados de Pruebas de Coagulación

Realizadas al Paciente

con Probable Disfibrinogenemia

	^{c)} PLASMA DEL PACIENTE	VALORES NORMALES
a) TIEMPOS DE COAGULACION:		
Tiempo de Trombina	17.1/18	20 6 2 arriba del T.
Tiempo de Reptilasa	21.8/20	Hasta 25
Tiempo de Tromboplastina Parcial	39.1/42	35-45 6 10 arriba del T.
b) CONCENTRACION DE FIBRINOGENO por:		
Von Clauss	221	150-450
Fibrinocrito	292	150-450

a) Tiempos de Coagulación calculados en segundos

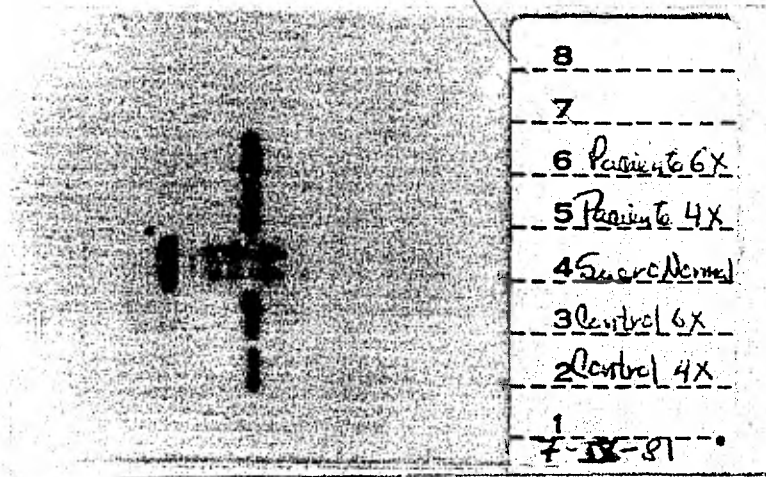
b) Concentración de fibrinógeno calculada en mg%

c) Los números abajo de la diagonal indican testigos, así como T.

TABLA N° 5.- Resultados de las pruebas de coagulación realizadas al paciente, efectuadas al mismo tiempo que un plasma testigo, bajo las condiciones descritas en material y métodos; también se dan los rangos normales para cada prueba.

Electroforesis del Fibrin6geno

Purificado en Acetato de Celulosa.

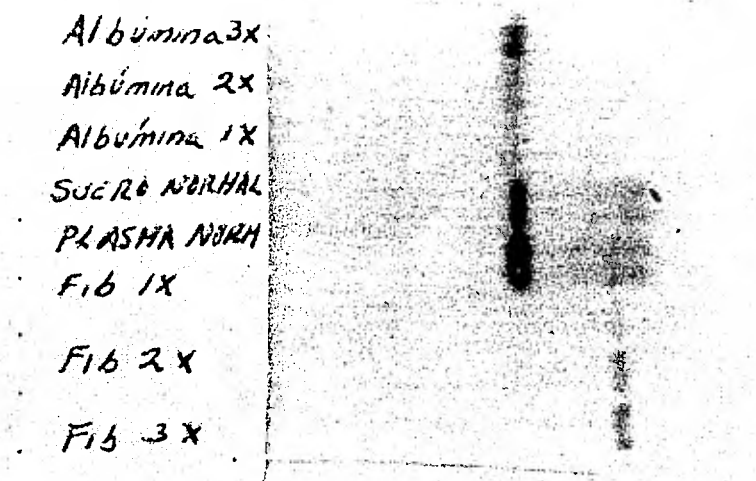


- 6.- Paciente 6 x - Indica Fibrin6geno del Paciente 6 x 0.025 ul.
- 5.- Paciente 4 x - Indica Fibrin6geno del Paciente 4 x 0.025 ul.
- 4.- SUERO NORMAL
- 3.- Control 6 x - Indica Fibrin6geno Control 6 x 0.025 ul.
- 2.- Control 4 x - Indica Fibrin6geno Control 4 x 0.025 ul.

FIGURA 5.- Se puede observar que la soluci6n de fibrin6geno del paciente y la del control se encuentran relativamente puras, al ser comparadas con un suero normal, debido a que las franjas que se observan corren entre las cadenas β y δ .

Electroforesis de los Standard Internos

Empleados en Acetato de Celulosa



Albumina	3 x	- Indica Albumina Humana	3 x 0.025 ul.
Albumina	2 x	- Indica Albumina Humana	2 x 0.025 ul.
Albumina	1 x	- Indica Albumina Humana	1 x 0.025 ul.
SUERO NORMAL			
PLASMA NORMAL			
Fibrinógeno	1 x	- Indica Fibrinógeno Humano	1 x 0.025 ul.
Fibrinógeno	2 x	- Indica Fibrinógeno Humano	2 x 0.025 ul.
Fibrinógeno	3 x	- Indica Fibrinógeno Humano	3 x 0.025 ul.

FIGURA 6.- Se puede observar el corrimiento de tres concentraciones diferentes de albúmina, una de suero normal, una de plasma normal y tres de fibrinógeno comercial.

Determinación de la Curva Standard
de Concentración de Fibrinógeno

TUBOS	FIBRINOGENO		H ₂ O	NaOH	Na ₂ CO ₃	(a) R.F.	D.O.
	0.2 mg/ml	ml					
1	0	0	7	1	3	1	0
2	0.1	0.02	6.9	1	3	1	0.01
3	0.2	0.04	6.8	1	3	1	0.013
4	0.3	0.06	6.7	1	3	1	0.021
5	0.4	0.08	6.6	1	3	1	0.024
6	0.5	0.1	6.5	1	3	1	0.024
7	0.6	0.12	6.4	1	3	1	0.034
8	0.7	0.14	6.3	1	3	1	0.034
9	0.8	0.16	6.2	1	3	1	0.040
10	0.9	0.18	6.1	1	3	1	0.046
11	1.0	0.20	6.0	1	3	1	0.048
12	1.2	0.24	5.8	1	3	1	0.056
13	1.5	0.3	5.5	1	3	1	0.074
14	1.7	0.34	5.3	1	3	1	0.074
15	2.0	0.4	5.0	1	3	1	0.086
16	2.5	0.5	4.5	1	3	1	0.113
17	3.0	0.6	4.0	1	3	1	0.069
18	4.0	0.8	3.0	1	3	1	0.167

(a) R.F. Reactivo de fenol-folín

TABLA N° 6.- Curva std. para la determinación de fibrinógeno en plasma.

Determinación de la Curva Standard

de Concentración de Tirosina

TUBOS	TIROSINA		H ₂ O ml	NaOH ml	Na ₂ CO ₃ ml	^(a) R.F. ml	D.O. nm
	ml	mg					
1	0.1	0.002	6.9	1	3	1	0.009
2	0.2	0.004	6.8	1	3	1	0.021
3	0.3	0.006	6.7	1	3	1	0.036
4	0.4	0.008	6.6	1	3	1	0.048
5	0.5	0.01	6.5	1	3	1	0.057
6	0.6	0.12	6.4	1	3	1	0.062
7	0.7	0.014	6.3	1	3	1	0.068
8	0.8	0.016	6.2	1	3	1	0.068
9	0.9	0.018	6.1	1	3	1	0.089
10	1.0	0.02	6.0	1	3	1	0.096
11	2.0	0.04	5.0	1	3	1	0.018
12	3.0	0.06	4.0	1	3	1	0.246

(a) R.F. Reactivo de fenol-folín

TABLA N° 7.- Curva std. para la determinación de la concentración de tirosina.

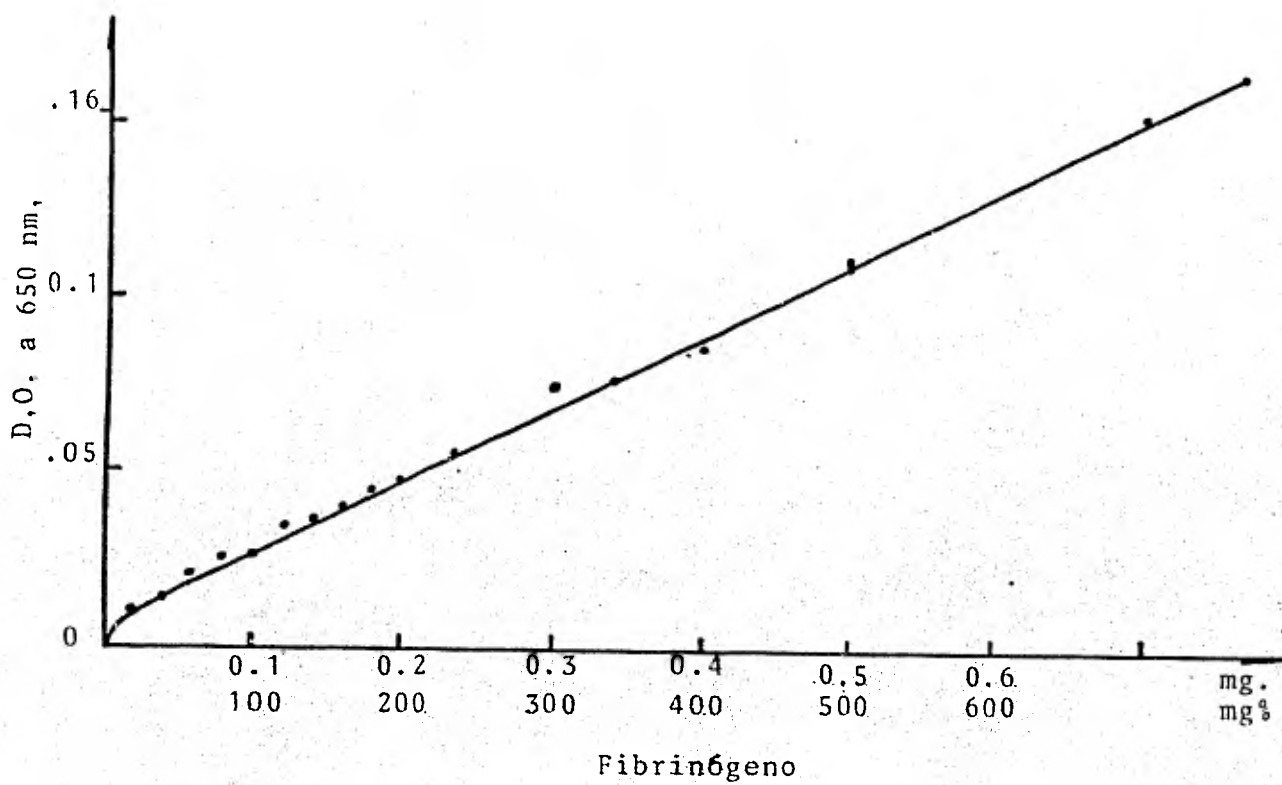


FIGURA 7.- Curva std. para la determinación de la concentración de fibrinógeno.

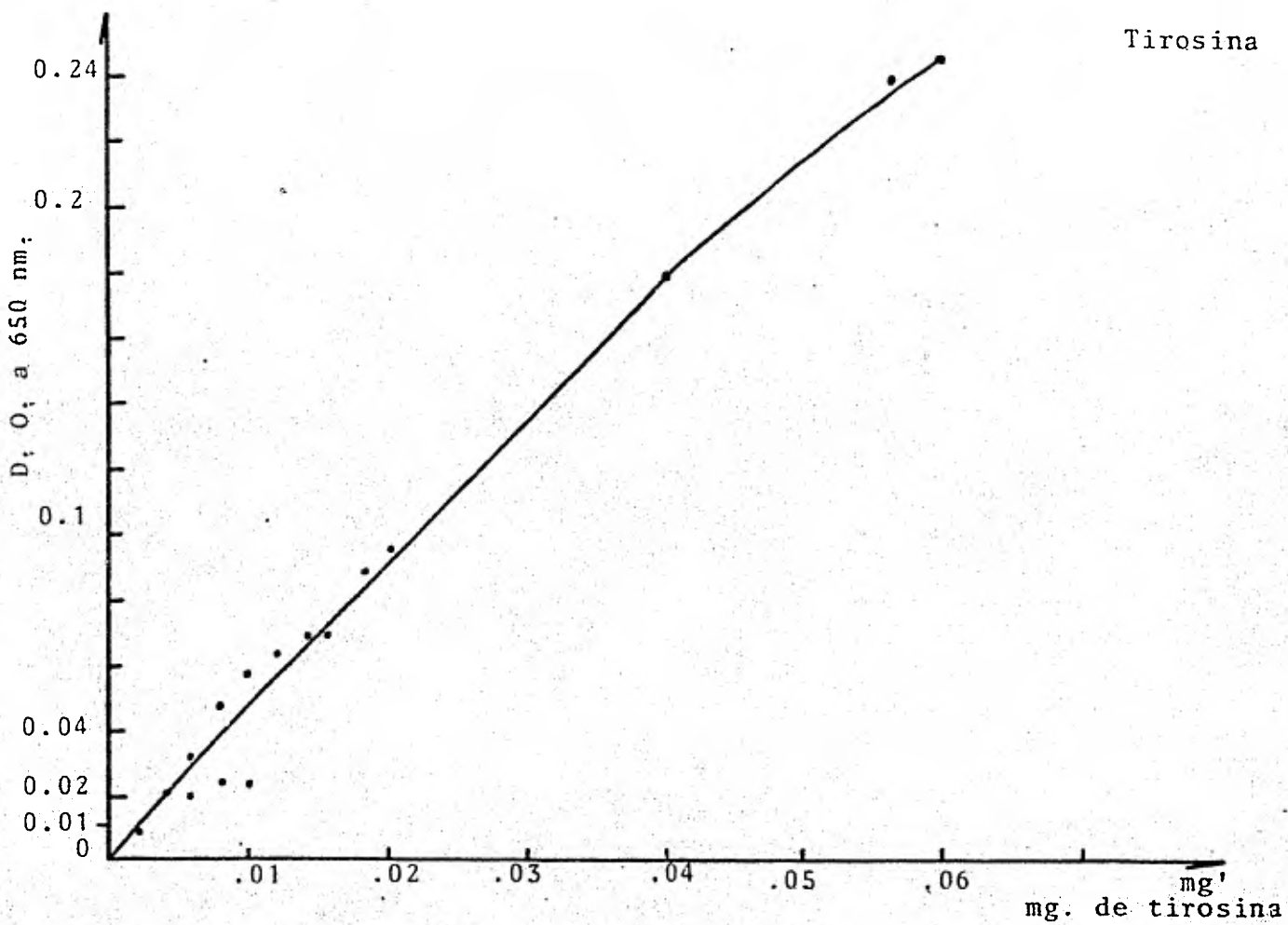


FIGURA 8.- Curva std. de tirosina para la determinación de la -
concentración de fibrinógeno.

Determinación de la Concentración de Fibrinógeno
de Muestras de Plasmas Normales

MUESTRAS de ^(a) P.N.	^(b) A. del P. N. P.	^(c) A. del Std. de TIROSINA	CONCENTRACION DE FIBRINOGENO en mg%
1	0.267	0.950	263
2	0.310	1.006	288
3	0.192	0.982	183
4	0.432	1,010	400
5	0.324	0.892	340
6	0.270	0.940	268
7	0.314	0.950	309
8	0.350	0.964	340
9	0.220	0.954	216
10	0.470	0.950	463

(a) Plasma Normal

(b) Absorbancia del Plasma Normal Procesado

(c) Absorbancia del standard de Tirosina

TABLA N° 8.- Concentración de fibrinógeno de 10 muestras de plasma normal, por el método de Ratnoff, en el cual se emplea una fórmula que para su uso necesita de la absorbancia del problema y la absorbancia del standard de Tirosina.
Los resultados se encuentran entre los rangos normales (150-450 mg%).

cuentran representadas en la Tabla N° 9; el Grupo "A" se efectuó en los primeros días de haber tomado la muestra y su promedio, - como se puede ver, fué de 293.4 mg%, que está dentro de los rangos de valores normales. El grupo "B" a los 30 días de haber si do tomada la muestra y mantenida durante ese tiempo a -30°C., el valor promedio encontrado fué de 219.78 mg%.

Determinación de la Coagulabilidad de la Solución de Fibrinógeno

La determinación de la coagulabilidad se efectuó por el método - de Gralnick, bajo la técnica descrita en material y métodos, em- pleando para el cálculo matemático la fórmula descrita anterior- mente (pág. 34). Se sabe que la técnica de Silberstein da un - porcentaje de coagulabilidad entre 85-90% que corresponde a los rangos normales. En la Tabla N° 10 se muestran 8 determinaciones de porcentaje de coagulabilidad, realizadas a la muestra de solu- ción de fibrinógeno del paciente, divididas en dos grupos, A y B, debido a que el grupo A fué realizado a los pocos días de tomada la muestra, y el grupo B al mes de tomada la muestra; el grupo A no presenta determinaciones en el plasma control, debido a que - éste resultó contaminado, el grupo B si presenta determinación - de plasma control.

Determinación de la Velocidad de Desprendimiento de los Fibrino-

péptidos.- Aplicando el método de Lowry, descrito en material y métodos, se obtuvo una curva std. de proteína para comprobar que el método se verifica, los resultados obtenidos se muestran en - la tabla 11. Con estas lecturas se hizo una curva std. de con- centración, contra D.O. a 650 nm. (Fig. 9)

Determinación de la Concentración de Fibrinógeno
en 8 Muestras del Plasma del Paciente

MUESTRAS del (a) P.P.	(b) A. del P.P.P.	(c) A. del Std. de TIROSINA	(d) CONCENTRACION de FIB. en mg%	PROMEDIO en mg%
<u>GRUPO "A"</u>				
1	0.315	0.980	300.8	
2	0.309	0.950	304.48	
3	0.310	1.066	272.23	293.4
4	0.305	0.964	296.27	
<u>GRUPO "B"</u>				
5	0.236	0.980	225.4	
6	0.230	0.950	226.4	
7	0.232	1.066	203.73	219.78
8	0.230	0.964	223.35	

- (a) Plasma del Paciente
 (b) Absorbancia del Plasma Procesado del Paciente
 (c) Absorbancia del standard de Tirosina
 (d) Concentración de Fibrinógeno en mg%

TABLA N° 9.- Concentración de fibrinógeno de 8 muestras del plasma del paciente, por el método de Ratnoff, en el --- cual se emplea una fórmula que para su uso requiere de la absorbancia del problema y la absorbancia del std. de tirosina.
 Estas determinaciones están divididas en dos grupos:
 "A" - Se realizó inmediatamente después de tomada la muestra.
 "B" - Se realizó a los 30 días de tomada la muestra.

Determinación de la Coagulabilidad

a partir de la Solución de Fibrinógeno Purificado

a) SOLUCION F.P. del P. (ml)	b) SOL. AMORT. DE FOSFATOS 0.025M (ml)	TROMBINA 100 U/ml 2.25 ml.	c) FIB.IN. A.280nm	d) SOBR. A.280nm	% de COAGULABILIDAD	
GRUPO "A"	- -	2.25	0.25	0.222	- -	
	0.5	4.5	0.25	0.48	0.31	81.6 %
	0.5	4.5	0.25	0.50	0.34	76.4 %
	0.5	4.5	0.25	0.47	0.33	77.0 %
	0.5	4.5	0.25	0.48	0.31	81.6 %
				PROMEDIO	79.1 %	
GRUPO "B"	- -	2.25	0.25	0.208		
	0.5	4.5	0.25	0.382	0.292	78.01 %
	0.5	4.5	0.25	0.391	0.293	78.26 %
	0.5	4.5	0.25	0.420	0.276	83.80 %
	0.5	4.5	0.25	0.378	0.295	76.98 %
					PROMEDIO	79.26 %
	CONTROL:					
	0.5	4.5	0.25	0.384	0.24	91.6 %
	0.5	4.5	0.25	0.385	0.243	90.9 %
	0.5	4.5	0.25	0.392	0.237	92.6 %
0.5	4.5	0.25	0.384	0.250	89.06 %	
				PROMEDIO	91.04 %	

a) Solución de Fibrinógeno Purificado, del Paciente

b) Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.025M

c) Fibrinógeno Inicial. Absorbancia a 280 nm.

d) Sobrenadante. Absorbancia a 280 nm.

TABLA N° 10.- Resultados de 8 determinaciones del porcentaje de coagulabilidad, efectuadas a la solución de fibrinógeno purificado del paciente.

El grupo "A" se efectuó inmediatamente después de la toma de la muestra.

El grupo "B" se efectuó a los 30 días de tomada la muestra.

Método de Lowry

Albúmina Mg.	D.O. 650 nm.
10	0.025
20	0.042
30	0.075
40	0.084
50	0.103
60	0.122
70	0.142
80	0.156
90	0.175
100	0.190
125	0.240
150	0.272
175	0.337
200	0.347

Desviación std. = 0.996, Media = 0.00349
Varianza = 0.015, $1/n = 285.96$

TABLA N° 11,- Curva std. de albúmina para la liberación de fibrin
nopéptidos, por el método de Lowry.

Método de Lowry

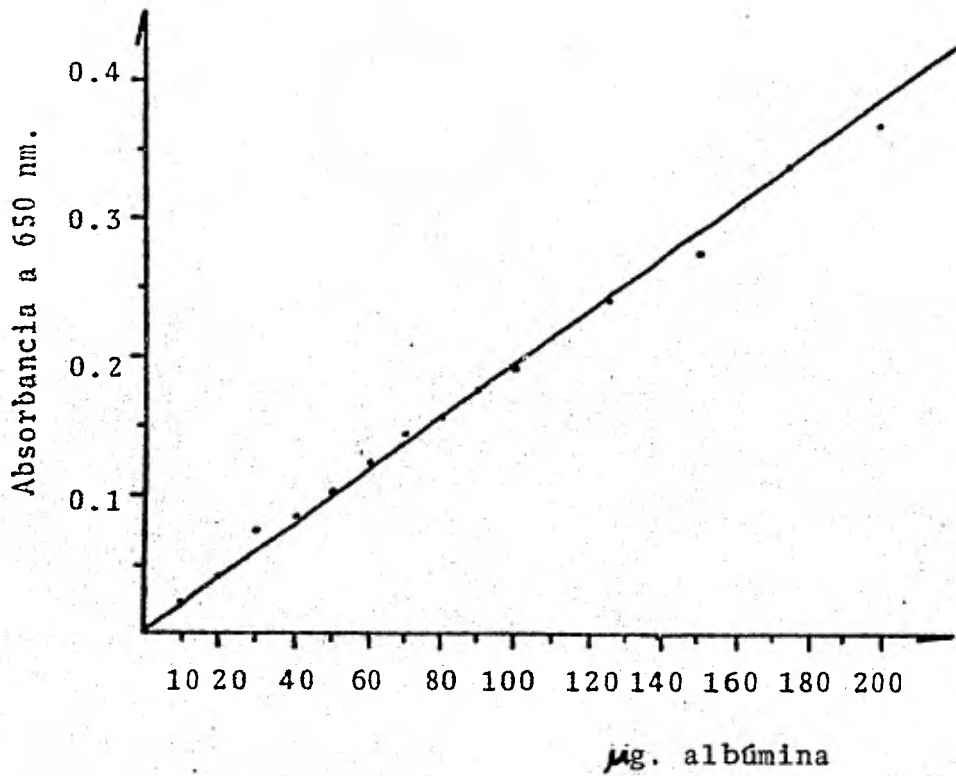


FIGURA 9.- Método de Lowry, empleando albúmina como proteína.

$S = 0.996$, $M = 0.00349$, $V = 0.015$, $1/n = 285.96$

S = desviación std.

M = media

V = varianza

Diferentes alicuotas de la solución de fibrinógeno se trataron de acuerdo a la técnica descrita por Sherman (14) en material y métodos, los resultados se muestran en la Tabla 12. Con estas lecturas se hizo una curva std. de tiempo contra D.O. a 650 nm. que se muestra en la Fig. 10. Con dicha curva se pudo determinar que toda curva que diera la misma trayectoria, con la misma concentración de fibrinógeno, sería considerada normal en su liberación de fibrinopéptidos. Después, bajo condiciones experimentales, se realizaron determinaciones de la liberación de fibrinopéptidos de la solución de fibrinógeno del paciente, así como de un control, cuyos resultados promedio se encuentran establecidos en la Tabla 13 y graficados en la Fig. 11. Estas determinaciones se efectuaron poco tiempo después de la toma de la muestra. Y, 30 días después de transcurrida la toma de la muestra, se efectuó otra determinación de la liberación de fibrinopéptidos, bajo la misma concentración de proteína, con el objeto de reafirmar los resultados inicialmente obtenidos. Los resultados se muestran en la Tabla 14 y se grafican en la Fig. N° 12.

Determinación de la Polimerización de los Monómeros de Fibrina.

Esta determinación se basó en el método de Von Felten (26), el cual se describe en material y métodos. Lo primero que se hizo fué purificar la solución de monómeros de fibrina por el método anteriormente mencionado, de 10 muestras de plasma normal, para después efectuar la agregación de monómeros de fibrina y así obtener una curva std. de tiempo contra D.O. a 350 nm, que se muestran en los datos de la Tabla 15 y se grafican en la Fig. 13. Con dicha curva se pudo determinar que toda curva que diera la

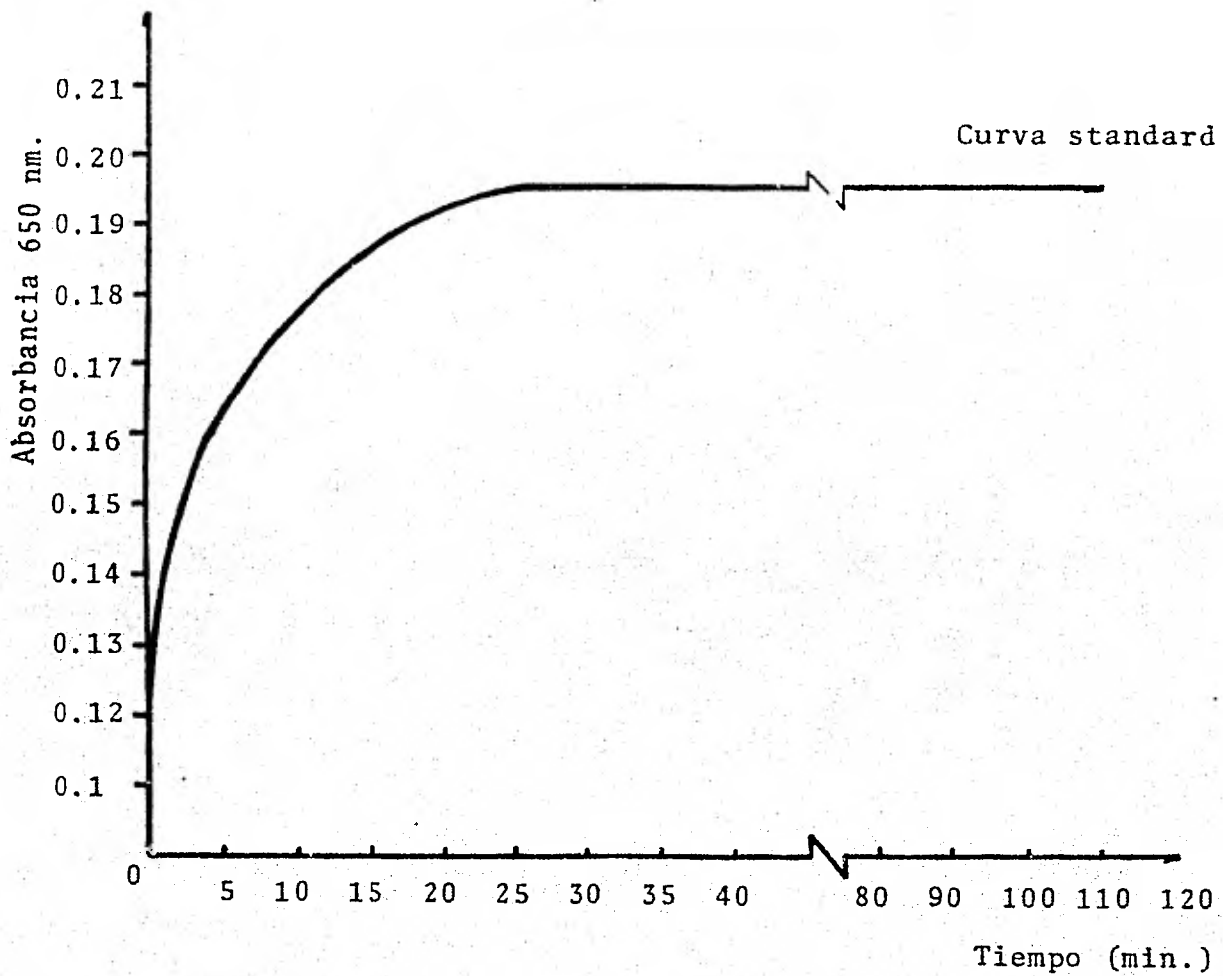
Determinación de la Curva standard
para la Liberación de Fibrinopéptidos

TIEMPO min.	a) ABSORBANCIA a 650 nm.
0	0.107
1	0.135
5	0.164
10	0.178
15	0.187
20	0.192
25	0.195
30	0.195
60	0.195
120	0.195

a) Se muestra la absorbancia obtenida, después -
de la realización de la técnica de Sherman.

TABLA N° 12.- Curva standard para la determinación de la liberación de fibrinopéptidos, por el método de Sherman, descrito en material y métodos, la concentración de fibrinógeno fué de 2.9 mg/ml.

Liberación de Fibrinopéptidos



Concentración = 2.9 mg/ml. de proteína.

FIGURA 10.- Curva std. para la liberación de fibrinopéptidos realizada de 10 muestras diferentes de plasma. La concentración de fibrinógeno fue de 2.9 mg/ml.

Determinación de la Curva que se Produce
por la Liberación de Fibrinopéptidos del Paciente
Inmediatamente Después de Tomada la Muestra

TIEMPO min.	a) ABSORBANCIA a 650 nm	
	CONTROL	PACIENTE
0	0.106	0.107
1	0.123	0.123
5	0.160	0.139
10	0.176	0.149
15	0.186	0.158
20	0.192	0.163
25	0.195	0.169
30	0.195	0.176
60	0.195	0.191
120	0.195	0.191

a) Se muestra la absorbancia obtenida, tanto del paciente como del control, después de realizar la técnica de Sherman.

TABLA N° 13.- Curva para la liberación de fibrinopéptidos del paciente y el control, determinados por el método de Sherman, ambos con la misma concentración de proteína de 2.9 mg/ml. Los estudios se realizaron al poco tiempo de tomada la muestra del paciente.

LIBERACION DE FIBRINOPEPTIDOS

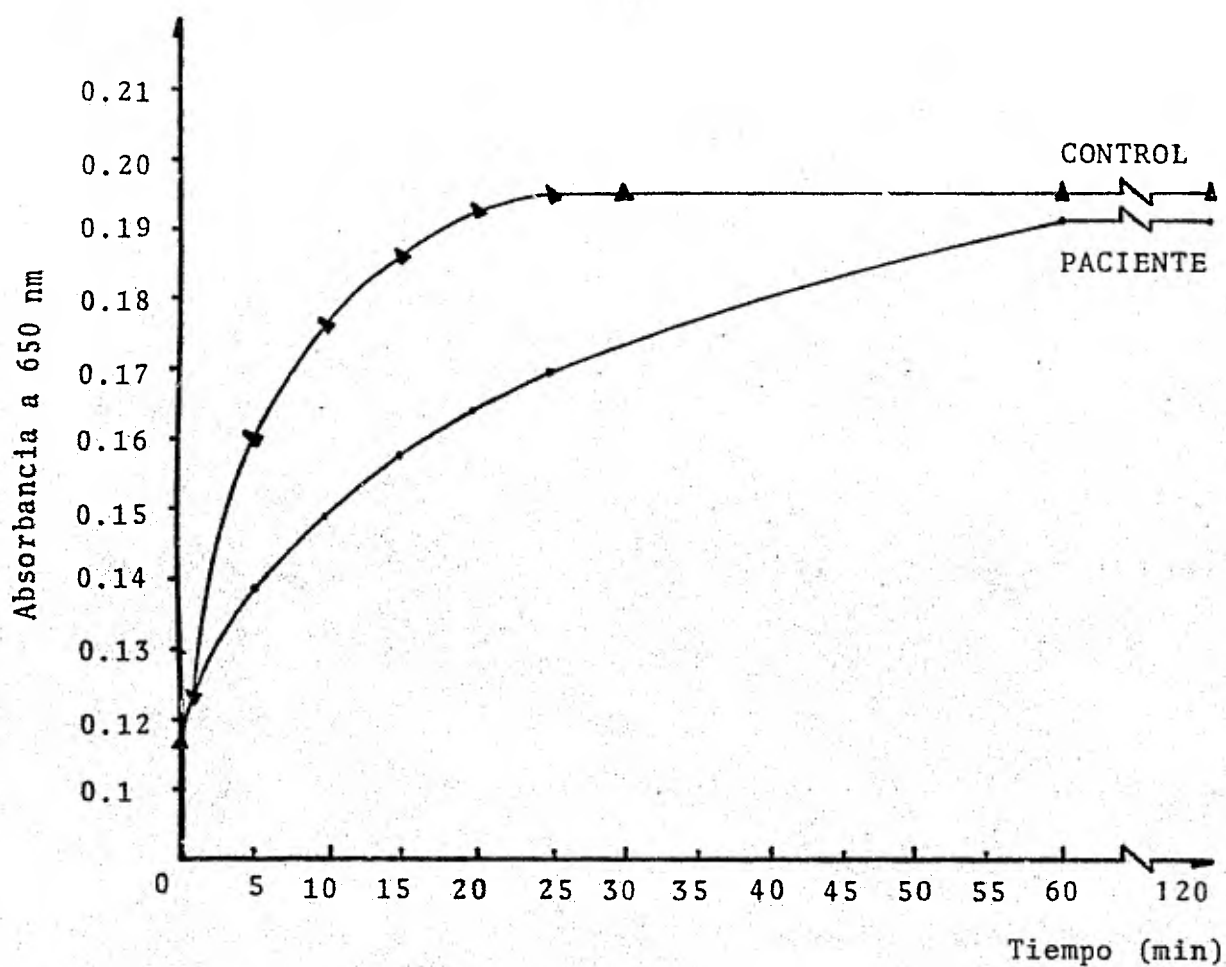


FIGURA 11.- Curvas obtenidas de la liberación de fibrinopéptidos del fibrinógeno del paciente y de un control. Estas curvas se determinaron con una concentración de fibrinógeno de 2.9 mg/ml. Estos estudios se realizaron al poco tiempo de tomada la muestra del paciente.

Determinación de la curva que se Produce
por la Liberación de Fibrinopéptidos del Paciente
A los 30 días de Tomada la Muestra

TIEMPO min.	a) ABSORBANCIA a 650 nm	
	CONTROL	PACIENTE
0	0.131	0.11
1	0.147	0.12
5	0.165	0.13
10	0.172	0.142
15	0.179	0.152
20	0.184	0.157
25	0.188	0.169
30	0.188	0.175
60	0.195	0.190
120	0.195	0.190

a) Se muestra la absorbancia obtenida, tanto del paciente - como del control, después de realizar la técnica de ----- Sherman.

TABLA N° 14.- Curva para la liberación de fibrinopéptidos del paciente y el control, determinados por el método de Sherman, ambos con la misma concentración de proteína de 2.79 mg/ml. Los estudios se realizaron a los 30 días de tomada la muestra.

LIBERACION DE FIBRINOPEPTIDOS

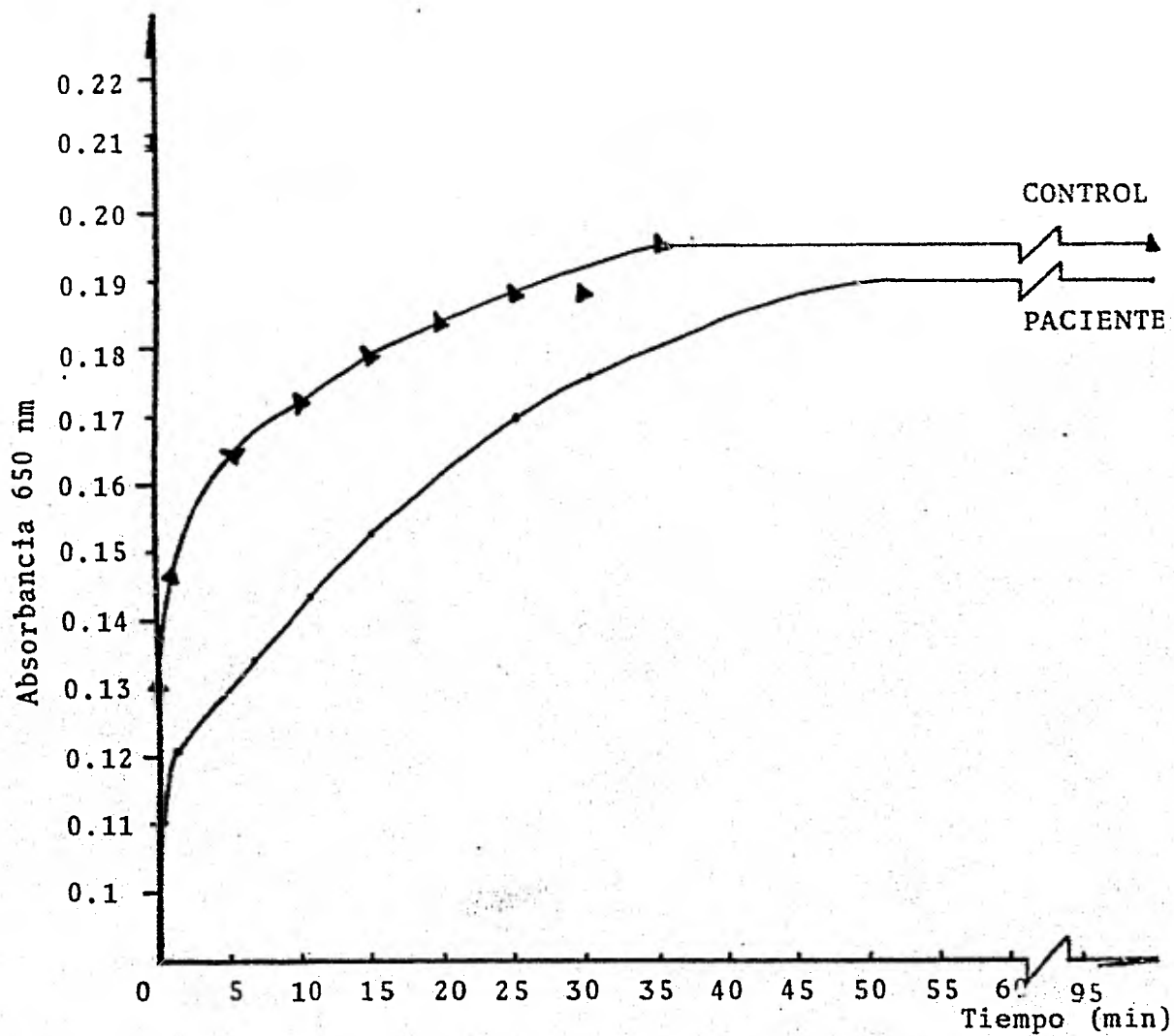


FIGURA 12.- Curvas para la liberación de fibrinopéptidos del paciente y del control, con una concentración de proteína de 2.79 mg/ml. Los estudios se realizaron a los 30 días de tomada la muestra.

Determinación de la Curva Standard

Para la Agregación de Monómeros de Fibrina

A Dos Diferentes Concentraciones de Monómeros

TIEMPO min.	a) SOLUCION DE MONOMEROS		b) ABSORBANCIAS	
	ml.		a 350 nm	
	I	II	I	II
1	0.2	0.4	0.6	0.94
2	0.2	0.4	0.7	1.03
5	0.2	0.4	0.77	1.2
10	0.2	0.4	0.81	1.26
15	0.2	0.4	0.83	1.3
20	0.2	0.4	0.85	1.31
25	0.2	0.4	0.86	1.31
30	0.2	0.4	0.86	1.31
35	0.2	0.4	0.86	1.31
40	0.2	0.4	0.86	1.31

a) Solución de monómeros a dos diferentes concentraciones: I y II.

b) Dos absorbancias obtenidas, después de realizar la técnica de Von Felten.

TABLA N° 15.- Curva std. para la determinación de la agregación de monómeros de fibrina, por el método de Von Felten, la concentración de fibrinógeno fue de ----- 57.2 mg/ml.

AGREGACION DE MONOMEROS

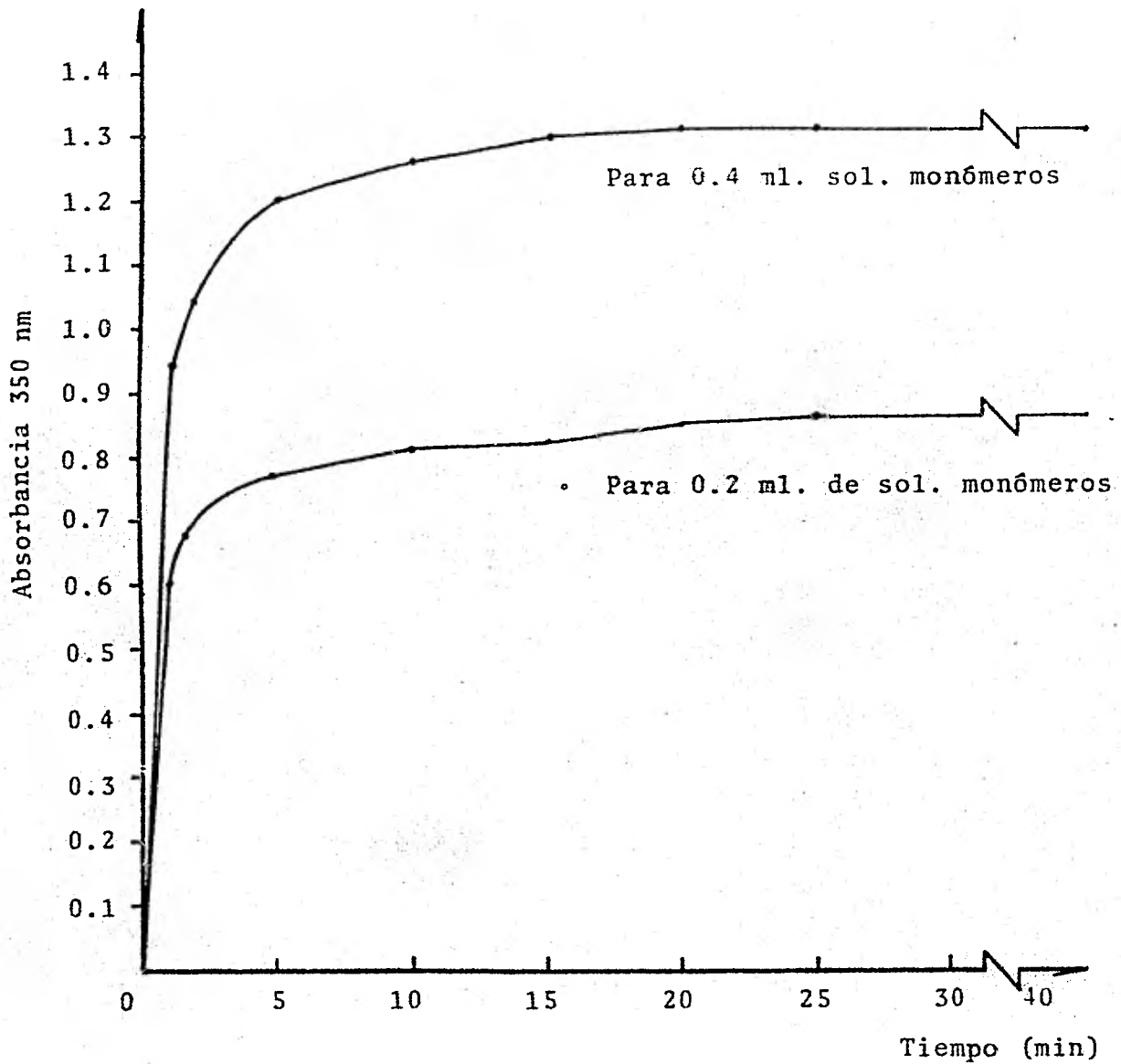


FIGURA 13.- Curva std. para la determinación de la agregación de monómeros de fibrina, realizada a 2 diferentes concentraciones de solución de monómeros. La concentración de fibrinógeno fué de 57.2 mg/ml.

misma trayectoria, con la misma concentración de fibrinógeno, se ría considerada como normal en su agregación. Bajo estas condiciones se realizaron determinaciones de la agregación de monómeros de fibrina, del plasma del paciente y del control, cuyos resultados promedio se muestran en la Tabla 16 y graficados en la Fig. 14, estas determinaciones se efectuaron al poco tiempo de la toma de la muestra. A los 30 días de esta toma se hizo otra determinación de la agregación de monómeros, con el plasma del mismo paciente y otro control, en la Tabla 17 se muestran los resultados y la graficación en la Fig. 15. En los resultados se dan dos valores de absorbancias, debido a que cada uno corresponde a diferente concentración de monómeros de fibrina.

Determinación de la curva que se produce por la agregación de monómeros de fibrina, inmediatamente después de tomada la muestra.

TIEMPO. min.	a) SOLUCION DE MONOMEROS Ml.		b) ABSORBANCIAS a 350 nm.			
	I	II	Control		Paciente	
	I	II	I	II	I	II
1	0.2	0.4	0.6	0.94	0.55	0.94
2	0.2	0.4	0.71	1.0	0.58	1.0
5	0.2	0.4	0.76	1.17	0.65	1.14
10	0.2	0.4	0.79	1.23	0.71	1.20
15	0.2	0.4	0.79	1.26	0.75	1.24
20	0.2	0.4	0.82	1.3	0.78	1.28
25	0.2	0.4	0.86	1.31	0.80	1.31
30	0.2	0.4	0.86	1.31	0.83	1.31
35	0.2	0.4	0.86	1.31	0.83	1.31
40	0.2	0.4	0.86	1.31	0.83	1.31

a) Solución de monómeros de fibrina a diferentes concentraciones I y II.

b) Absorbancias obtenidas del control como del paciente, - después de realizar la técnica de Von Felten.

TABLA N° 16.- Curva para la agregación de monómeros de fibrina del paciente y el control, determinados por el método de Von Felten, a dos diferentes concentraciones de monómeros, con una concentración de proteína de 57.2 mg/ml. - Estudios realizados al poco tiempo de tomada la muestra.

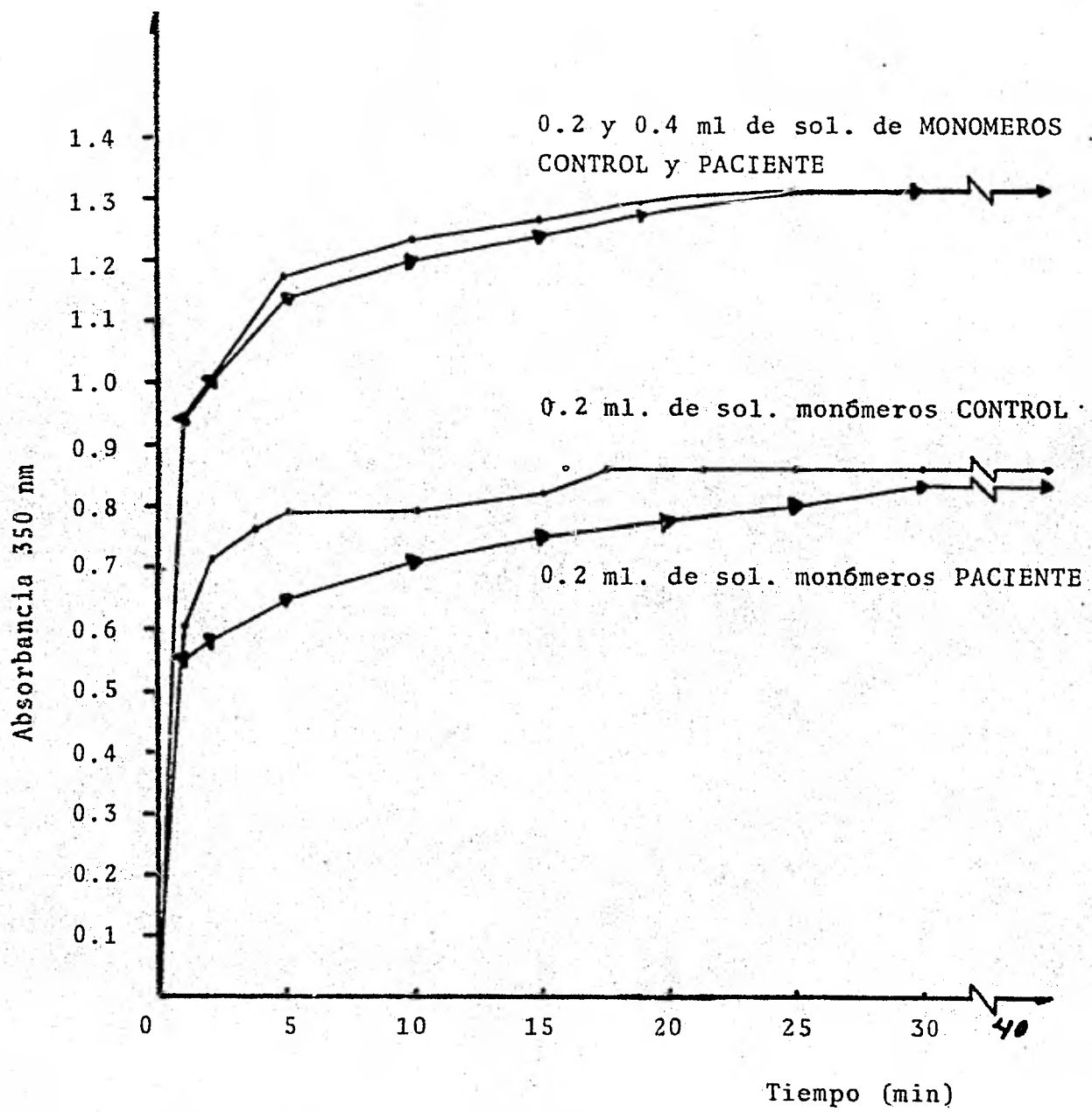


FIGURA 14.- Curva para la agregación de monómeros de fibrina del paciente y el control a 2 diferentes concentraciones de solución de monómeros. La concentración de fibrinógeno fué de 57.2 mg/ml. Estas determinaciones se realizaron al poco tiempo de tomada la muestra.

Determinación de la curva que se produce
por la agregación de monómeros de fibrina, a los
30 días de tomada la muestra.

TIEMPO min.	a) SOLUCION DE MONOMEROS ml.		b) ABSORBANCIAS a 350 nm.			
	I	II	Control		Paciente	
1	0.2	0.4	0.36	0.79	0.27	0.88
2	0.2	0.4	0.39	0.89	0.29	0.94
5	0.2	0.4	0.41	0.99	0.30	0.98
10	0.2	0.4	0.42	1.04	0.31	1.04
15	0.2	0.4	0.45	1.07	0.32	1.07
20	0.2	0.4	0.46	1.09	0.34	1.07
25	0.2	0.4	0.47	1.11	0.35	1.07
30	0.2	0.4	0.48	1.11	0.35	1.07
35	0.2	0.4	0.48	1.11	0.35	1.07
40	0.2	0.4	0.48	1.11	0.35	1.07

a) Solución de monómeros de fibrina a diferentes concentraciones I y II.

b) Absorbancias obtenidas del control y del paciente después de realizar la técnica de Von Felten.

TABLA N° 17.- Curva para la agregación de monómeros de fibrina del paciente y el control, determinadas por el método de Von Felten, a dos diferentes concentraciones de monómeros, con una concentración de proteína de 57.2 mg/ml. Estudiados a los 30 días de tomada la muestra.

Agregación de Monómeros

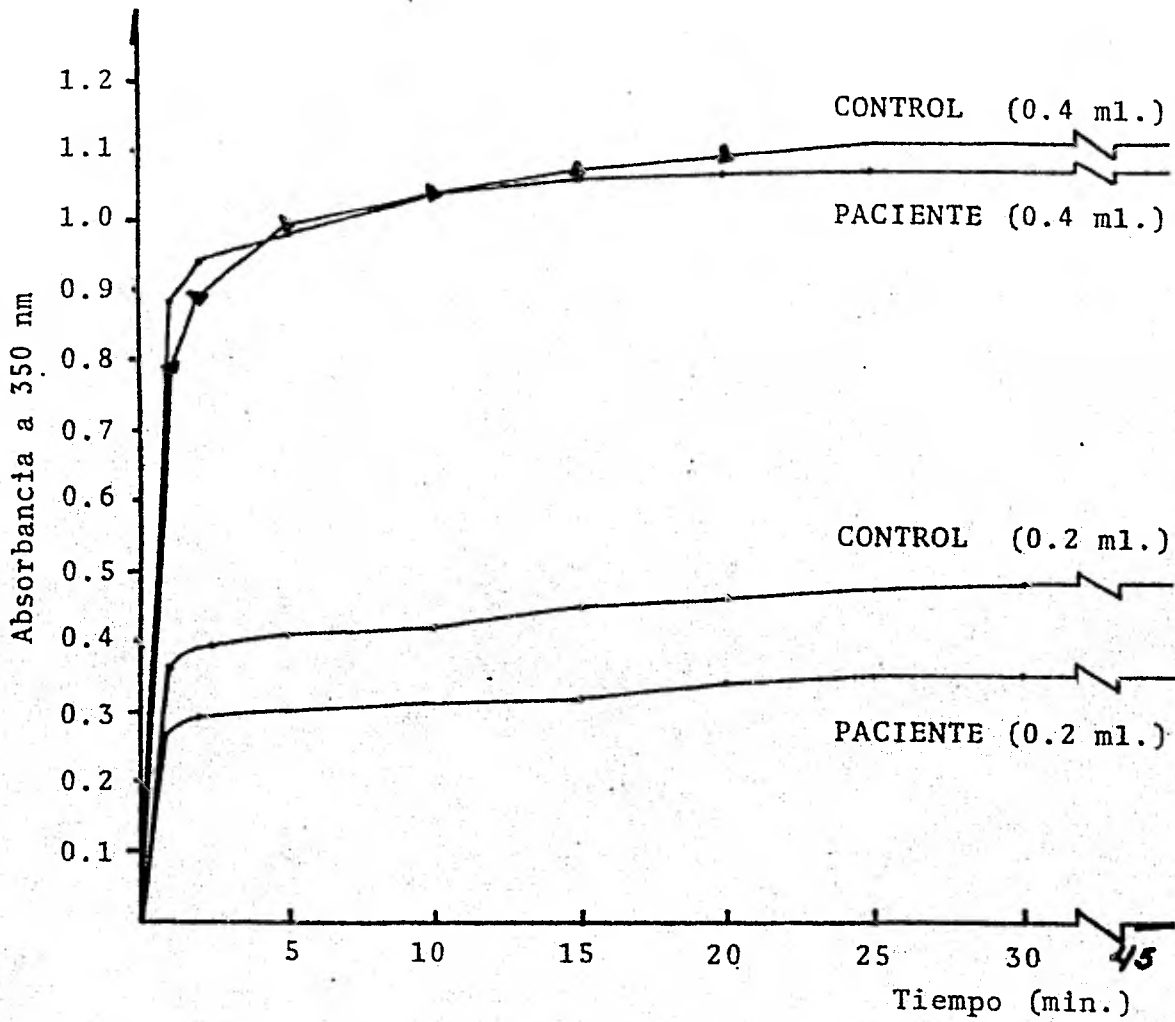


FIGURA 15.- Curvas para la agregación de monómeros de fibrina del paciente y el control, a diferentes concentraciones de solución de monómeros, con una concentración de fibrinógeno de 57.2 mg/ml. Estudio realizado a los 30 días de tomada la muestra.

D I S C U S I O N

El criterio para el diagnóstico de disfibrinogenemia se hace en base a sus manifestaciones clínicas, forma de transmisión genética, pruebas de coagulación, movilidad electroforética, características bioquímicas de la molécula y finalmente el estudio funcional del fibrinógeno, a través de las tres etapas en que se hace la transformación de fibrinógeno a fibrina. Desde su inicio se creyó conveniente realizar un estudio más profundo del aspecto funcional y fisicoquímico de la molécula del fibrinógeno del paciente con trombosis de repetición, porque como se observó en los estudios realizados en junio de 1980 (Tabla 1), indicaron que los tiempos de trombina y reptilasa se encontraron sumamente prolongados, con lo cual nos dió el primer indicio de probable disfibrinogenemia que, como reporta Ogston-Bennet, Gralnick, Menaché, Lane (1, 5, 24, 26), la disfibrinogenemia se asocia a esta prolongación en los tiempos de trombina y reptilasa; además, al presentar trombosis de repetición hacía suponer que podría ser debido a una disfibrinogenemia, ya que como sabemos tanto Soria como Bennet (2, 5) reportaron 5 casos de fibrinógenos anormales por diversos problemas, entre los cuales se encontraba la trombosis.

Con estos antecedentes se citó al paciente para realizarle las pruebas de coagulación y estas resultaron ser normales (Tabla 5) pero, aún así, no se descartó la posibilidad de que tuviera disfibrinogenemia. Se volvió a citar a dicha persona y se creyó conveniente someterlo a una plasmaferesis, para así poder obtener un volumen adecuado de plasma para ser trabajado en el laboratorio.

La muestra de plasma se fraccionó en diferentes alicuotas, para ser trabajada como se mencionó en material y métodos.

Para explorar cualquier etapa de formación de fibrina a partir de fibrinógeno, se requirió purificar el fibrinógeno, para lo cual se empleó el método de Silberstein (22), el cual nos dió una buena recuperación de proteína (80.9% de rendimiento) como se puede ver en los resultados, además con un buen porcentaje de coagulabilidad (Tabla 10), este método se ajustó a nuestras posibilidades y, a diferencia de otros (Blomback-Blomback), se realizó a temperatura ambiente y con equipo disponible. El método de Jakobsen & Kierulf (27), para purificar el fibrinógeno, emplea β -alanina para precipitar fibrinógeno, en este trabajo se empleó glicina en un 65% de saturación, ya que existen reportes con buenos resultados en estas condiciones (22).

No se puede decir que el fibrinógeno purificado tuviera un cien por ciento de pureza, ya que no se empleó ningún procedimiento que nos determinara el índice de pureza en el fibrinógeno control y problema; la única medida que se tomó fue la electroforesis en acetato de celulosa, la cual nos indicó que el fibrinógeno del paciente y el del control se encontraban relativamente puros (Fig. 5) en donde se muestra que el fibrinógeno control y problema corren en el rango de las cadenas β y δ' que es el rango en el que corre el fibrinógeno normal, además los estándares internos corridos del fibrinógeno comercial lo confirman en la Fig. 6.

Las siguientes determinaciones como son: Determinación de la Concentración de fibrinógeno, porcentaje de coagulabilidad, libera--

ción de fibrinopéptidos, agregación de monómeros de fibrina, se realizaron en dos intervalos de tiempo diferentes, es decir, una determinación se realizó al inicio de la toma de la muestra del paciente y la otra a los 30 días de tomada la muestra del sujeto de estudio, mientras transcurrió este tiempo el plasma estuvo a -30°C . El objeto de realizar estas dos determinaciones fué para reafirmar el primer resultado, ya que éste fué normal y se quiso tener un cien por ciento de seguridad de este reporte.

El siguiente paso fué determinar la concentración de fibrinógeno por un método más sensible que los convencionales, por ésto se eligió el método de Ratnoff (23), que como lo indica Bennet (5) se debe de realizar más de una técnica diferente para efectuar la medición y así poder reportar un fibrinógeno anormal, ya que se ha visto que las diferencias en concentración de un método a otro en estos fibrinógenos son muy grandes; al revisar la tabla 9, vemos que los resultados de la determinación de fibrinógeno del paciente por este método se encuentran entre los rangos normales y que si los comparamos con la concentración de fibrinógeno por el método de Clauss y el fibrinocrito no existe mucha diferencia.

Para comprobar que la técnica se verificaba, se requirió efectuar dicha prueba con diferentes concentraciones de tirosina y solución de fibrinógeno (tablas 6 y 7 y figuras 7 y 8) en donde podemos ver que la técnica se cumple, ya que sigue la ley de Lambert y Beer.

Para ver la funcionabilidad del fibrinógeno se calculó la congulabilidad del fibrinógeno por el método de Galnick (25) que a diferencia de otros (22) es fácil de aplicar. Analizando los resultados de la tabla 10, vemos que el porcentaje promedio de coagulabilidad encontrado en el paciente a los pocos días de tomada la muestra fué de 79.1 % (en este momento no se realizó ninguna - determinación de la coagulabilidad en un fibrinógeno control, debido a que éste salió contaminado) el porcentaje promedio de la - coagulabilidad a los 30 días de tomada la muestra al paciente, - fué de 79.26 % (tabla 10) (en este paso si se determinó la coagulabilidad en un fibrinógeno control y esta fué de 91.04 %). Estos resultados se encuentran entre los rangos de valores normales de coagulabilidad ya que informa Silberstein que su método para purificar fibrinógeno da rangos del 75 - 90 % de coagulabilidad.

La velocidad del desprendimiento de los fibrinopéptidos es de - suma importancia para catalogar a un fibrinógeno anormal, la técnica que se aplicó fué la de Sherman con una modificación, como fué el ocupar la solución de fibrinógeno disuelta en solución - amortiguadora de citrato de sodio y no de fosfatos con lo cual - se evito un día más de tardanza en la técnica. Para evaluar la sensibilidad de la técnica al emplear el método de Lowry, se realizó una curva std. de albúmina humana (tabla 11 y fig. 9), en - donde vemos que la ley de Lamber y Beer se verifica lo que nos - determina la funcionabilidad de la técnica.

Al analizar plasmas normales por este método obtuvimos una gráfica de D.O. contra tiempo dandonos una trayectoria teorica que se ajusta a los reportes (fig.10) bajo una determinada concentración de fibrinógeno. Al analizar el plasma del paciente y el control -

Por este método se obtuvo una curva (fig. 11) con la misma pendiente que la curva std., lo cual nos indica que el paciente presenta normalidad en su liberación de fibrinopéptidos, lo mismo sucedió en la curva que se determinó a los 30 días de analizada la muestra (fig. 12), se debe hacer incapie de que no se tuvo la precaución de comprobar que la solución de fibrinopéptidos analizada estuviera totalmente pura, es decir, que la otra proteína contaminante se presentara, como pudo ser el caso del fibrinógeno no reaccionante con la trombina, por lo que se recomienda que en futuros estudios, se realice antes de leer los fibrinopéptidos por espectrofotometría, el método de isoelectroenfoque, con el cual purificaríamos los fibrinopéptidos.

Para medir la agregación de monómeros de fibrina, se aplicó la técnica de Von Felten (26) con algunas modificaciones que fueron: en el método de Felten se indica que se adicionen 2 g% de EDTA a la sangre colectada para quitar los iones y formar un coagulo inestable, sin embargo, en la práctica fué necesario adicionar mayor cantidad de EDTA. Ahora bien, este método diluye el plasma 1:5, ocupando 10U/ml de solución de trombina, nosotros ocupamos una dilución 1:3 del plasma con 5U/ml de trombina como lo hizo Lane (27).

Para la agregación de monómeros de fibrina, se realizaron las determinaciones de dos diferentes cantidades de solución de monómeros de fibrina, por la razón de que se quería ver si la curva se reproducía y fuera fácil de leerla.

Al igual que en la liberación de fibrinopéptidos para evaluar la agregación de monómeros de fibrina se hace en base a una curva -

std (fig. 13), la cual nos determinó la trayectoria normal que sigue la agregación de monómeros de fibrina con una concentración fija de proteína, se procesó el plasma del paciente junto con el control y las curvas obtenidas se pueden observar en la fig. 14 y fig. 15 que nos demuestra que el paciente presenta normalidad en la agregación de monómeros de fibrina.

Los estudios realizados orientados a demostrar una disfibrinogenemia resultaron normales, sin embargo, el hecho de que el paciente haya tenido alteraciones de la coagulación similares a las observadas en las disfibrinogenemias orientan a pensar que el paciente tuvo una disfibrinogenemia adquirida transitoria. Las causas más frecuentes a las que se asocian éstas, son las nefropatías del tipo del síndrome nefrótico. El paciente durante la fase inicial de su enfermedad, cuando tuvo alteraciones en la tercera fase de la coagulación, tuvo también proteinuria de más de 5g/l., hiperlipoproteinemia e hiperalbuminuria que son alteraciones que se observan en el síndrome nefrótico; la biopsia renal se informó con cambios tubulo intersticiales, alteración que puede asociarse a un síndrome nefrótico. Con el tratamiento las alteraciones renales generalmente desaparecen y con ellas la disfibrinogenemia. La persistencia de las alteraciones funcionales plaquetarias seguramente fueron la causa de la trombosis de repetición.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos sacar de este trabajo son las siguientes:

- 1.- La coagulabilidad, despegamiento de los fibrinopéptidos por trombina, la agregación de monómeros de fibrina y el estudio electroforético del fibrinógeno problema, no demostró ninguna anormalidad y, por lo tanto, es posible afirmar que el paciente no tenía en el momento del estudio una disfibrinogenemia.
- 2.- El estudio estructural del coágulo de fibrina del paciente, la electroforesis de las cadenas del fibrinógeno problema y su fragmentación por la plasmina no fué posible estudiarla, por lo tanto no es posible asegurar que el fibrinógeno del paciente no tiene alguna alteración fisicoquímica; pero, dado que los pacientes que tuvieron alteraciones en estas técnicas, han tenido también alteraciones en el estudio funcional, podemos pensar, con buenas bases, que no hay una disfibrinogenemia.
- 3.- Existen suficientes datos para apoyar que el paciente tuvo una disfibrinogenemia transitoria relacionada con síndrome nefrótico, que desapareció al tratarse éste.
- 4.- Las alteraciones funcionales plaquetarias seguramente han tenido relación con la trombosis de repetición que presentó.

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

- 1.- MENACHE D. - Abnormal Fibrinogens, A review. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 1973, 29:525-531.
- 2.- SORIA J., SORIA C. y SAMAMA M. - Recent Advances in Blood - Coagulation. N° 2, 2a. edición. Ed. Livingstone, London and New York, 1977, 313-336.
- 3.- WILLIAM J.W., ERNEST BEUTLER, ERSLEU A.J. - Haematology. 1a. edición. Ed. Mc. Graw Hill Book Company a Blakistan Publication, U.S.A., 1972, 1057-1060.
- 4.- HILMAN R. y FINCH C.A. - Manual de Hematología. 1a. edición, Ed. El Manual Moderno, S. A., 1977, 53-54.
- 5.- OGSTON D. y BENNET B. - Haemostasis, Biochemistry, Physiology and Patology. 3a. edición, Ed. John Willey & Sons, 1977, 105-116, 424-445.
- 6.- KAWAI TADASHI - Proteínas Plasmáticas. 2a. edición, Ed. Médica Panamericana, 1977, 75-82.
- 7.- BUDZYNSKI A.Z. y MARDER V.J. - Degradation Pathway of Fibrinogen by Plasmin. *Thrombos. Haemostasis*, (Stuttg), 1977, 38:793-798.
- 8.- LEAVELL B.S., TROUP O.A. - Hematología Clínica. 4a. edición, Ed. Interamericana, México, 1978, 527-536.
- 9.- GONZALEZ LLAVEN J., VARGAS LINARES M.E., WATANABE SAYTO C., - DIAZ MAQUEO J. Cl., AZAOLA ESPINOZA P. y GONZALEZ ANGULO A. - Características Funcionales, Electroforéticas y Ultraestructura de un Fibrinógeno Anormal Identificado en una Familia Mexicana. Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C., XVIII Jornada Anual, 1977, (sin numeración).
- 10.- MENACHE D. - Dysfibrinogenemia. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1973, 29:523-524.
- 11.- INGRAM G.I. - Variations in the Reactions Between Thrombin - and Fibrinogen and their Effect on the Prothrombin Time. *J. Clin. Pathol*, 1955, 8:318-323.

- 12.- KRAUSE W.H., HEENE D.L. y LASCH H.G. - Congenital Dysfibrinogenemia (Fibrinogen Giessen) Thrombos. Diathes. Haemorrh, - 1973, 29:547-561.
- 13.- PUTNAM FRANK W. - The Plasma Proteins, 2a. Edición, Ed. Academic Press, 1977, 489.
- 14.- SHERMAN L.A., GASTON L.W., KAPLAN M.E. y SPIVACK A.R. - Fibrinogen, St. Louis, A New Inherited Fibrinogen Variant, Coincidentally Associated with Haemophilia. A. Journal Clin Invest, 1972, 51:590-596.
- 15.- HARDISTY R.M. e INGRAM. G.I. - Bleeding Disorders Investigations and Management. Black well Scientific Publications, -- Oxford, 1965, 285.
- 16.- SORIA J., SORIA C. y SAMAMA M. - Time of Reptilase Study the Polimerization of the Fibrin in Presence of Reptilase. Coagulation, 1969, 2:175-179.
- 17.- QUICK A.J. - The Prothrombin in Haemophilia and in Obstructive Jaundice. J.Biol. Chem. (abstract), 1935, 109:73-79.
- 18.- PROCTOR R.R. y RAPAPORT S.I. - The Partial Thromboplastin time with Kaolin. Am. J. Clin. Path., 1961, 36:212-219.
- 19.- RUIZ REYES G. y JIMENEZ VAZQUEZ - Rev. Mex. Lab. Clin. 1965, - 19(6):3-6.
- 20.- Método para la Determinación de Fibrinógeno, basado en la Técnica de Von Clauss. Manual de Técnicas de Laboratorio de Hematología Especial del C.M.R.
- 21.- GONZALEZ LI., J. VARGAS L.M.E., CAMACHO HDZ., DIAZ MAQUEO J.Cl., GUILLEN A.M., GONZALEZ A.A. y RUIZ REYES - Disfibrinogenemia Adquirida. Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C.,XIX Jornada Anual, 1978, 57-72.
- 22.- SILBERSTEIN E.B., INGRAHAM III S.C. y KEREIAKES J.G. - The Determination of Optimum Glycine Concentration for the Preparation of Human Fibrinogen at Ambient Temperature. Thrombos.-Diathes. Haemorrh, 1973, 29:572-578.
- 23.- RATNOFF O.D. y MANZIE A.B. - A New Method for the Determina-

- tion of Fibrinogen in Small Samples of Plasma. J.Lab. Clin. Medicine, 1951, 37:316-320
- 24.- FOLIN O. y CIOCATEU V. - On Tyrosine and Tryptophane. Determination in Proteins. J.Biol. Chem., 1927, 73:627-634.
- 25.- GRALNICK H. R., GIVELBER H.M. SHAINOFF J.R. y FINLAYSON J.S.
- Fibrinogen Bethesda: A Congenital Dysfibrinogenemia with Delayed Fibrinopeptide Release. J. Clin. Invest, 1971, - - 50:1819-1830
- 26.- VON FELTEN A., DUCKERT F. y FRICK P.G. - Familial Disturbance of Fibrin Monomer Aggregation. Brit. J.Haematology, 1966, - 12:667-676
- 27.- LANE D.A., SCULLY M.F., THOMAS D.P., KAKKAR V.V., WOOLF I.L. y WILLIAMS R. - Acquired Dysfibrinogenemia in Acute and Chronic Liver Disease. Brit., J. Haematology, 1977, 35:301-307