



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS BIOLOGICAS PARA ANALISIS CLINICOS. ANTICOAGULANTES. TECNICAS DIVERSAS PARA DESPROTEINIZACION".

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :

Ma. Aurora Judith Acosta Barreda

2

1976



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.

TESIS 1976
ADG M.T. 3
FECHA
PROC
8



QUIMICA

PRESIDENTE. Ramón Guevara Estrada QFB.
VOCAL. QFB. Guadalupe L. Carrasco R.
SECRETARIO. QFB. Josefa Piedras Ross.
1er. Suplente. QFB. Luz Ma. Hernandez B .
2º Suplente. QFB. Esther Gutierrez H.

Sitio en donde se desarrolló el tema : Laboratorio 301 de la-
Facultad.

Ma. Aurora J. Acosta B.
Sustentante : Ma. Aurora Judith Acosta Barrera.

Asesor del tema: Ramón Guevara Estrada, QFB.



CON AGRADECIMIENTO AL
QFB . RAMON GUEVARA POR SU
GUIA Y ORIENTACION PARA LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO

A MI MADRE CON TODO
MI CARIÑO Y RESPETO,
POR SER LA PERSONA
A LA QUE LE DEBO TCDO.

A MIS HERMANOS.
SALVADOR
GABRIEL
CECY
MARTIN

A MI QUERIDO ESOSO.

I N D I C E .

INTRODUCCION	1
CAPITULO I. HISTORIA DE LOS ANALISIS DE SANGRE.....	3
CAPITULO II.- ANATOMIA DE LOS SITIOS DE OBTENCION DE SANGRE Y TECNICAS DE OBTENCION.	
Anatomía de las venas del antebrazo.....	11
Anatomía de los miembros inferiores.....	14
Sitios de obtención de sangre en niños.....	15
Anatomía de los sitios de obtención de san- gre capilar.....	18
CAPITULO III. MANEJO APROPIADO DE MUESTRAS PARA DIFERENTES PRODUCTOS POR ANALIZAR.	
Estado del paciente para la obtención de -- muestras fidedignas.....	25
Causas comunes de hemólisis.....	26
Obtención de suero.....	28
Obtención de plasma y sangre total.....	29
Manejo apropiado de la muestra para la deter- minación de enzimas.....	31
Pruebas funcionales hepáticas (no enzimáti- cas).....	33
Preservación de las muestras biológicas...	36
Conservadores químicos.....	38
CAPITULO IV. LOS ANTICOAGULANTES, SU ACCION Y CLASIFICACION, SU EMPLEO ADECUADO SEGUN EL TIPO DE MUESTRA.	
Producción y bioquímica de los factores de la coagulación.....	40
Plaquetas, su composición, bioquímica y fun- ción.....	47

Control de las reacciones de la coagulación.....	55
Mecanismo de la coagulación.....	56
Sistema Intrínseco.....	57
Sistema Extrínseco.....	58
Sistema Común.....	59
Agentes anticoagulantes que actúan in-vitro.....	63
Anticoagulantes que actúan in vivo.....	69.
Sistema enzimático fibrinolítico.....	77
Anticoagulantes adsorbentes.....	82
Desfibrinación.....	83

CAPITULO V. TECNICAS DIVERSAS PARA LA DESPROTEINIZACION, -
 SUS FUNDAMENTOS. CUANDO?, PORQUE?, Y PARA -
 QUE? SE USA CADA UNO DE LOS SISTEMAS.

Proteínas plasmáticas.....	85
Ultrafiltración.....	86
Precipitación por adición de solventes - miscibles.....	87
Separación por medio de sales.....	88
Precipitantes aniónicos.....	90
Precipitantes catiónicos.....	99

CAPITULO VI. RESUMEN DE LOS CONCEPTOS INDISPENSABLES 104

CAPITULO VII. CONCLUSIONES ACERCA DE LA INCLUSION DEL TEMA-
 EN EL PROGRAMA DE ANALISIS QUIMICO CLINICOS -
 CLAVE O36-Q-10. 106

BIBLIOGRAFIA.....	112
-------------------	-----

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

El desarrollo de este trabajo tiene por objeto ampliar un punto del programa del curso de ANALISIS QUIMICO CLINICOS, ya que es de gran importancia y responsabilidad para aquellos que se dedican a los análisis clínicos, desde la antigüedad eran los médicos los que se dedicaban a esta disciplina, pero debido al gran auge que tenía día a día y la importancia que representa, para que el enfermo logre un estado total de bienestar y salud, se fue separando y se formó como una disciplina aparte, pero siempre tendrá gran relación con la Medicina.

Los objetivos de este trabajo son: la descripción anatómica de los sitios más comunmente empleados para la obtención de muestras de sangre, tanto en sujetos adultos como en niños-pequeños, descripción del material adecuado para este propósito, el cual debe ser estéril para evitar alteración en los productos que se van a analizar, así como la transmisión de algún germen patógeno al sujeto (ejem: hepatitis), después de obtenida la muestra bajo condiciones asépticas se procede a su conservación, y ya que el tiempo y la temperatura son factores muy importantes, debido a que ocasionalmente es imposible llevar a cabo el análisis rápidamente, se emplean conservadores físicos tales como el almacenamiento de las muestras a temperaturas bajas, de ésta forma se retardan los procesos bioquímicos; o empleo de conservadores químicos, los cuales son sustancias que interfieren con ciertos fenómenos metabólicos como la glucólisis o la contaminación bacteriana, que implican serios problemas.

El empleo de anticoagulantes es un factor esencial ya que hay ciertos productos en las muestras que son alterados o eliminados por determinados anticoagulantes, algunos de éstos son empleados no sólo in vitro, sino también in vivo siendo de gran importancia en aquellos pacientes con trombosis, implicando ésto el conocimiento del mecanismo de la coagulación para-

delimitar en que fase va a actuar determinado anticoagulante-- así como su duración en el organismo, su forma de eliminación y las alteraciones posteriores que puede traer como consecuencia al enfermo.

De los anticoagulantes que se emplean in vitro, existe una gran variedad, algunos son más comunmente empleados en el laboratorio, debido a que no producen alteraciones en ciertos productos por analizar, pero otros presentan ciertos problemas tales como alteración morfológica de las células sanguíneas, y elevación o decrecimiento en la concentración de determinado producto, otros más son muy costosos por lo que son poco empleados.

La eliminación de las proteínas de la sangre usando técnicas especiales, fue estudiada y empleada desde hace mucho tiempo siendo Folín uno de los primeros que analizó las interferencias que surgían cuando las proteínas se encontraban presentes en las muestras que se analizaban, introdujo técnicas para evitar estos problemas y, aún a la fecha, siguen siendo empleadas en la mayoría de los laboratorios. Con respecto a esto se han introducido diversas técnicas y modificaciones realizadas por diferentes investigadores como Folín-Wu, Haden, Somogyi etc., pero la finalidad de todas es la eliminación de las proteínas de la sangre y otros fluidos del organismo.

CAPITULO I.

Historia de los análisis de sangre.

En alguna época la sangre fue considerada como un líquido de infinita complejidad, la esencia misma de la vida.

En 1666 Mr. Boyle, le escribió al Dr. Lower reflexionando los siguientes términos acerca de los efectos posibles de la transfusión cruzada: "si la sangre de un mastín transfundida frecuentemente a un sabueso no le perjudicaría el olfato".

Si la sangre de cada persona fuera o tuviera tal individualidad, ciertamente la transfusión sería compleja y merecería ser considerada como una de las ramas más refinadas de la Medicina (26)

Pero desde principios de este siglo los conceptos primitivos sobre la sutileza de la transfusión se vieron eclipsados por el descubrimiento de que la sangre de todos los seres humanos podía ser dividida en cuatro grupos (27)

En 1901, Landsteiner, observó que la sangre humana mostraba diferencias individuales caracterizadas por reacciones de aglutinación, pues los eritrocitos de una parte de sus colaboradores eran aglutinados por el suero sanguíneo de solo algunos de los demás, esto llevó al descubrimiento del sistema ABO y contribuyó al conocimiento actual de todos los demás sistemas de grupos sanguíneos (21). La clasificación de los grupos sanguíneos principales, está basada en el hecho de que los antígenos A y B pueden existir individualmente o juntos, o pueden faltar ambos (27)

El análisis clínico cuantitativo tiene menos de un siglo de antigüedad, uno de los primeros exponentes fue J.L.W. Thudichum, versátil científico y práctico en la obtención de vinos, estudió problemas de tipo sanitario e ideó métodos analíticos para la química clínica, su época coincidió con el florecimiento de la patología celular y la bacteriología, lo que ha hecho posible la moderna cirugía aséptica. En este período

la Medicina, la Química Orgánica y la Fisicoquímica desarrollaron particulares conceptos hasta sentar los fundamentos de -- ciencias bien organizadas(30)

Las contribuciones importantes efectuadas por Ehrlich - pueden considerarse como el inicio de la hematología moderna, los métodos de tinción que introdujo constituyen la base de - la hematología morfológica y la citoquímica, utilizando éstos, Ehrlich describió muchos detalles celulares y desarrolló una- clasificación de los glóbulos de la sangre. Señaló que la se- rie de las células granulocíticas nacen de un precursor no -- granuloso en la médula osea, y consideró que los leucocitos -- provenían de las "glándulas" linfáticas. Esto contribuyó a la base de su teoría sobre el origen dual de los glóbulos blancos, lo que también fue sostenido por Banti, Turk, Naegeli y otros, y fue combatida por los monofilistas Maximow, Jordan, Bloom y otros, quienes consideraban que el tejido mieloide podía ori- ginarse en la vida postembrionaria de los linfocitos. Otra teo- ría, la polifilética, fue propuesta por Cunningham, Sabin y - Doan, consideraban que cada tipo de célula adulta tenía su -- propio precursor plástico (26, 27)

En 1845, Buchanan, observó que durante la coagulación - se formaba una sustancia que luego, extraída del coágulo, cau- saba la coagulación de líquidos serosos, descubriendo que és- ta era la trombina. En 1859, Denis, demostró que en el plasma había un material que era el precursor soluble de la fibrina- del coágulo, el cual recibió el nombre de fibrinógeno. Schmidt siguiendo líneas similares, en 1872, llegó a la conclusión de que la formación de fibrina dependía de la interacción del fi- brinógeno y una globulina sérica en presencia de trombina (27, 30).

En 1879 Hammarsten, utilizando un método mejor para la- separación del fibrinógeno, demostró que podía convertirse -- en presencia de trombina sin la participación de albúmina ni globulina del suero (30)

En 1878, el gran hematólogo francés Hayem fue el primero

en demostrar que las plaquetas eran diferentes de los leucocitos, y señaló que probablemente desempeñaban algún papel en la coagulación, describió la estructura fibrilar como una tela de araña que se producía al aglutinarse las plaquetas, y creyó -- que ésta reaccionaba con el fibrinógeno (30)

En 1890, Arthus y Pages, demostraron que el calcio es -- esencial para la coagulación de la sangre, se demostró que las sustancias que lo fijan o lo separan de la sangre, impiden que se lleve a cabo la coagulación.

A principios del siglo, Morawitz formuló la teoría clásica de la coagulación, y a medida que se descubrieron factores adicionales, resultó necesario ampliar su esquema, pero esta teoría sigue siendo la base de la mayor parte de concepciones modernas sobre la coagulación (27)

Michael Somogyi, uno de los investigadores contemporáneos de amplio reconocimiento científico, en 1922 formó parte del profesorado del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Washington, en San Luis en donde practicó sus tareas de analista clínico en el Hospital de Jewish, hizo estudios sobre el metabolismo y fisiología de los hidratos de carbono, los cuerpos cetónicos y la insulina.

La desproteínización de la sangre con zinc, se conoció -- en 1923 por Hagedorn y Jensen. Somogyi encontró que si las sales de zinc se aumentaban el pH cambiaba a neutro o debilmente alcalino y la precipitación era completa a temperatura ambiente (3, 30)

En 1915, Greenwald, introdujo el uso de ácido tricloroacético para la precipitación de las proteínas, pero en ocasiones ésta es incompleta (3)

En 1919, Folin-Wu, introdujo el empleo del ácido túngstico para la obtención de filtrados libres de proteínas de la sangre y líquido cefaloraquídeo; Haden modificó este método, -- reversificando el orden de los reactivos, siendo la principal ventaja de éste que la reacción es prácticamente inmediata, y su uso es casi universal (3, 30)

En 1944 Neuberger y col., introdujeron el uso del ácido perclórico como sustituto del ácido tricloroacético (30)

En 1913, Ivan Bang, de la Universidad de Lund, Suecia escribió un tratado denominado *Der Blutzucker*, donde se proponían microtécnicas, comparables a los métodos microanalíticos de -- Pregl, para el rápido análisis de pequeñas cantidades de sangre, de tal forma que podían ser tomadas diariamente sin inconvenientes para los pacientes a investigar. No era mera coincidencia que Bang fuera doctor de medicina, como Ehrlich iniciador de la histoquímica e inmunoquímica, pero pronto el impacto de la medicina sobre la química se hizo tan marcado, que bioquímicos como Folin y Benedict, Van Slyke y Bloor se dedicaron por entero a los análisis de sangre y orina y crearon la estructura de la moderna química analítica clínica (13,30)

En 1911 Rona y Michaelis informaron acerca del empleo de la tributirina como sustrato para la determinación de la lipasa pancreática, midiendo el grado de hidrólisis por métodos es talagnométricos. Cherry y Grandall en 1932, describieron la aplicación del procedimiento del aceite de oliva al suero (30)

En 1925 Barkan, indicó que en el suero existe una pequeña cantidad de hierro, más tarde con la colaboración de Schales-- observaron que el hierro estaba unido a la fracción globulínica de las proteínas séricas, y es separado acidificando ligeramente, Barkan indicó que, probablemente el papel fisiológico del hierro unido a las proteínas era el transporte de éste por el organismo, teoría que ha sido confirmada en su esencia por trabajos posteriores (12,30)

Hanger describió en 1938, una prueba cualitativa de floculación en la que mezclaba suero diluido en solución salina y una emulsión de lípidos obtenidos de cerebros de carneros, cefalina y colesterol.

En 1944 Neefe y Reinhold, comprobaron la influencia de la luz y el calor en la reacción de floculación, para evitar fal-

sas reacciones positivas y unificar los resultados se necesitaba resguardar el suero diluido y la mezcla de éste con el antígeno, de las exposiciones demasiado prolongadas a la luz, natural o artificial (30)

Hace más de 30 años se introdujo el empleo de anticoagulantes en Medicina, el descubrimiento de la heparina no se debió a la investigación en busca de anticoagulantes, sino en realidad fue un subproducto de estudios cuyo objeto era descubrir nuevos procoagulantes, factores que fomentan la coagulación de la sangre. En 1916, Mc. Lean recibió el encargo de extraer sustancias tromboplásticas de diversos tejidos, descubrió que algunos de los extractos contenían no solo actividad tromboplastínica, sino también un poderoso anticoagulante, Howell y Holt (1918) describieron las características de éste, y lo denominaron heparina, para señalar que abundaba en el hígado, Best y col., demostraron su presencia en diversos tejidos del cuerpo, y que la fuente más rica era el pulmón, se mejoraron los métodos de extracción y purificación de la heparina, y en unos cuantos años, Charles y Scott, prepararon heparina suficientemente pura para poder administrarse al humano. Las primeras investigaciones clínicas de la profilaxia de la trombosis se hicieron en 1937 y en esa época se averiguó que la heparina era el ácido mucioitínpolisulfúrico (8, 29)

La administración de anticoagulantes por vía bucal se remonta a la época en que Schofield describió la "enfermedad del trebol dulce" que asolaba al ganado vacuno, caracterizándose por tendencia hemorrágica grave, se demostró que era causada porque las reses comían heno de trebol dulce mal curado, el cual contenía una sustancia tóxica que interrumpía los mecanismos normales de la coagulación, Roderick observó que esto se debía a una deficiencia de protrombina, el agente tóxico era probablemente un producto de descomposición de la cumarina, en 1934, Link y Campbell, lograron aislar, identificar y sintetizar el principio activo del trebol dulce podrido, la 3,3'-meti

leno-bis-(4-hidroxycumarina), primero se le llamó Dicumarina y después Dicumarol.

A partir de 1940, se publicaron los resultados de los estudios clínicos con Bishidroxycumarina, pronto abundaron las - publicaciones que hablaban de la aplicación clínica de este an ticoagulante en diversas situaciones médicas y quirúrgicas(8)

Tiselius fue el primero en introducir el uso de la elec troforesis para el estudio y separación de las diferentes pro teínas, junto con Kabat poco después de 1940, efectuaron diver sos trabajos en los que dan a conocer la estructura química de los anticuerpos, demostraron que la fracción de globulinas γ - de las proteínas del suero, cuya migración es lenta en la elec troforesis, contenían la mayor parte de anticuerpos séricos; - en 1950, Porter, trató a éstos con papaína, enzima proteolítica que hidroliza las moléculas de anticuerpos en tres fragmentos, dos de los cuales conservan la actividad de anticuerpo, mien-- tras que el tercero muestra las características antigénicas de la globulina γ . Edelman demostró que las inmunoglobulinas es-- taban formadas por varias cadenas, y Porter presentó un modelo de inmunoglobulina de 4 cadenas, que resultó coincidir satisfac toriamente con resultados de estudios posteriores (35)

Debido a la gran importancia de las reacciones immunoló gicas y, ya que para efectuarlas se emplea suero o plasma, éstas pueden llevarse a cabo y ser clasificadas de acuerdo a las interacciones antígeno-anticuerpo en:

a)Primarias, b)Secundarias y c)Terciarias.

La interacción primaria, o inicial, del antígeno con el anticuerpo es el fenómeno de base, puede ser estudiada por varias técnicas, incluyendo el método de precipitación con sulfa to de amonio (Técnica de Farr), la diálisis de equilibrio o la observación visual que se logra marcando el antígeno o el anti cuerpo con sustancias fluorescentes, opacas a los electrones, - radiactivas o enzimáticas. Estos métodos tienen gran valor clí nico para el estudio de anticuerpos fundamentales en fenómenos patológicos. La interacción primaria del antígeno con el anti-

cuerpo rara vez puede observarse directamente, debe estudiarse a través de los fenómenos secundarios o terciarios.

Las interacciones secundarias incluyen la precipitación, aglutinación, reacciones debidas al complemento, neutralización y efectos citotóxicos, estas reacciones se utilizan para identificar los antígenos en fenómenos patológicos, llevándose a cabo in vitro (35)

Las interacciones terciarias tienen lugar in vivo, a veces pueden ser útiles para el paciente; pero en otras ocasiones producen enfermedad inmunológica: comprenden dos tipos de hipersensibilidad, la inmediata y la tardía en función del tiempo para que aparezca la reacción después del contacto con el antígeno (35)

Los fundamentos del método complejométrico para la determinación del calcio se deben a Schwarzenbach y col. los cuales investigaban la captación de cationes di y trivalentes por medio del tetraacetato de etilenodiamina (EDTA). En 1951 y 1952, numerosos investigadores, independientemente, desarrollaron el método complejométrico para la determinación de cationes divalentes del suero, por modificaciones del procedimiento ideado por Schwarzenbach para la investigación de la dureza del agua.

Kay fue el primero que describió un método para determinar cuantitativamente la actividad de fosfatasa plasmática por medio de un sustrato adecuado. Bell y Doisy idearon un método para medir el fósforo en sangre, que no necesita el aislamiento previo de éste, se basa en el color azul que toma en presencia de un exceso de iones de molibdato cuando se utiliza la hidroquinasa como agente reductor. Bodansky modificó el procedimiento de Kay en sentido de que utilizaba como sustrato glicerofofostato con un amortiguador de Veronal ajustado a un pH de 8.6.

Para la determinación de yodo protéico en muestras de suero, Kolthoff y Sandell señalaron que se podía utilizar las sales de yodo para catalizar el proceso de reducción de las de cerio por el ión arsenioso, siendo esta técnica muy sensible.

En 1957 se describió, por primera vez, un método de análisis químico colorimétrico totalmente automático, en el mismo año se introdujo un instrumento, el Autoanalizador, que aplica los fundamentos de dicho método (30)

La inmensa mayoría de los hospitales de Estados Unidos y otras naciones de Europa y América Latina, han adoptado en sus laboratorios este método para una o varias determinaciones, como consecuencia, a la gran experiencia se ha podido comprobar que los resultados obtenidos son por lo menos tan exactos y -- desde luego mucho más reproducibles que los métodos manuales -- realizados con técnicas ordinarias, y lo que es más importante son fidedignos (9,30)

La historia de la Química Clínica fue realizada originalmente por médicos, pero debido a su especialización fue introduciendo técnicas cada vez más complejas en el laboratorio del patólogo, la manipulación de fotómetros de llama, aparatos electroforéticos, microanalíticos y otros equipos diversos se van haciendo cada vez más necesarios, lo que refleja la creciente necesidad de utilizar en hospitales y laboratorios privados -- personal químico competente y responsable.

El analista es un competente profesional, responsable de la cuidadosa realización de las determinaciones analíticas que se le encomiendan y de su posterior comunicación, con objeto -- de ayudar al diagnóstico de la enfermedad y de la terapia del padecimiento del paciente (30)

CAPITULO II

ANATOMIA DE LOS SITIOS DE OBTENCION DE SANGRE Y TECNICAS DE OBTENCION.

La principal diferencia química entre la sangre arterial - y la sangre venosa es el grado de saturación de oxígeno de la - hemoglobina. La sangre se oxigena a su paso por los pulmones -- y es bombeada entonces del ventriculo izquierdo del corazón -- a la circulación arterial. En el extremo arterial de los capila res existe todavía una ligera presión hidrostática, por ende -- la sangre recogida por punción capilar es practicamente sangre arterial. El oxígeno es, entonces, casi completamente separado de la sangre por los tejidos que circundan el lecho capilar, -- y regresa al corazón por la circulación venosa.

Cuando se desea llevar a cabo varios análisis cuantitati-- vos de sangre resulta preferible obtener sangre de una vena, ya que el metodo de obtención es más fácil y se obtiene un volumen de ésta suficiente.

En personas adultas y en niños mayores de seis años la ob- tención de sangre se hace utilizando las venas del antebrazo es pecialmente las del pliegue del codo, es decir, la mediana cefá lica, la mediana basílica, la cubital común y/o la radial. Tam- bién pueden utilizarse la vena mediana, la cubital y la cefáli- ca . Naturalmente sirve así mismo cualquier vena sobresaliente bien afirmada en los tejidos.

La vena cefálica nace en el lado radial de la red venosa - del dorso de la mano, con el nombre de vena radial superficial cruza sobre la "tabaquera anatómica" , recibe venas dorsales de el pulgar y rodea el lado anterior del supinador largo. Pasa ha cia arriba sobre el lado externo del pliegue del codo y, por - arriba del mismo, asciende por el borde externo del bíceps has- ta llegar al surco deltopectoral. En el extremo superior del - surco se introduce profundamente respecto a la porción clavícu- lar del pectoral mayor, cruza el pectoral menor y perfora la - aponeurosis claviopectoral a 1.25 cms. por debajo de la clavícu- la para desembocar en la vena axial. A veces cruza la clavícula

y llega a la vena yugular externa, recibe venas superficiales de la cara externa de la extremidad superior y, en el hueco subclaviar, recibe tributarias que siguen a las ramas de la arteria acromiotorácica (17,18)

La vena basílica, comienza con el nombre de vena cubital superior en el lado cubital de la red venosa del dorso de la mano, asciende por la cara interna del antebrazo, pero cerca del codo se dirige a la cara anterior y recibe venas superficiales del antebrazo, cruza sobre el pliegue del codo por dentro del tendón del bíceps y asciende por el lado interno del músculo, acompañando al accesorio del branquial cutáneo interno, perfora la aponeurosis profunda a nivel de la insertación del coracobraquial, camina por el lado interno de la arteria humeral y en el borde inferior del redondo mayor se continúa con la vena axilar.

La vena mediana nace en el plexo venoso palmar y asciende por la cara anterior del antebrazo hasta el codo donde puede unirse a la vena basílica, o bien se divide en venas mediana basílica y mediana cefálica, que van a las venas basílica y cefálica, respectivamente (18, 19) (Fig. 1)

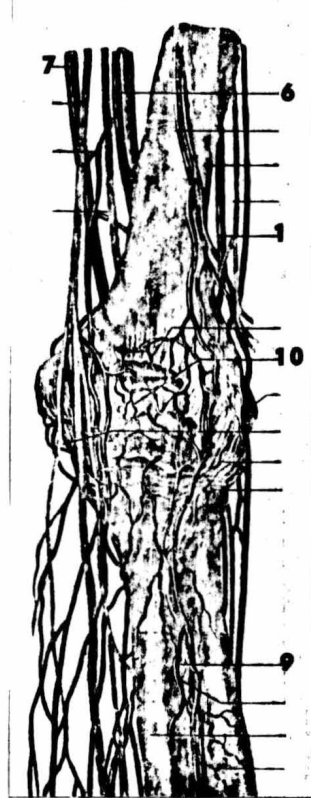
A veces la vena radial es la que se bifurca en lugar de que lo haga la vena mediana; en estas condiciones, la vena mediana basílica es voluminosa y parece continuar directamente a la radial.

La disposición de las venas superficiales en el plano anterior del codo es extremadamente variable, existen con mucha frecuencia pequeñas anastomosis y conductos longitudinales, de lo cual resulta un dispositivo plexiforme.

→ La obtención de la sangre se hace por punción venosa, debe ser muy delicada, debe disponerse de buenas agujas, que tengan punta suficientemente afilada, debido a que la pared de la vena es muy resistente y, además, más o menos móvil; tiene tendencia a escaparse que a dejarse penetrar, de aquí que para las punciones es preferible usar agujas especiales, las cuales no deben flamearse aun cuando sean de platino porque se embota la punta, se deben de esterilizar mediante calor seco o calor húmedo.



VISTA ANTERIOR.



VISTA POSTERIOR.

Fig. 1 (Anatomía del brazo y antebrazo). 1.- Vena braquial cefálica. 2.- Vena mediana cefálica. 3.- Rama colateral radial. 4.- Vena cefálica antibraquial; arteria radial. 5.- Vena basílica antibraquial. 6.- Arteria braquial. 7.- Vena basílica braquial. 8.- Vena mediana - basílica. 9.- Arteria interósea dorsal. 10.- Olécranon.

Las agujas pueden ser de platino, níquel o de acero. Estas últimas tienen el inconveniente de oxidarse. Para evitar esto después de emplearlas se pasa alcohol por su interior.

El calibre de las agujas varía mucho, las agujas muy finas tienen la ventaja de reducir al mínimo la abertura de la vena, pero para extracción de sangre se deben usar agujas de mayor -- calibre , es conveniente usar las de bisel largo, pues de lo -- contrario puede este penetrar parcialmente en la vena y la sangre derramarse fuera y a la vez en el tejido subcutáneo.

Técnica de obtención de sangre venosa.- La punción puede -- practicarse estando el paciente sentado o acostado, se limpia-- la piel de la flexura del codo, frotándola bien con alcohol de 70° y se aplica un torniquete a unos 5 cms. por encima del pliegue del codo, el torniquete debe estar sujeto de tal forma que de un pequeño tirón se suelte, si las venas no se ven fácilmente, se debe indicar al paciente que abra y cierre el puño va---rias veces o se le puede percutir ligeramente la región .

El torniquete no se mantendrá por más de dos minutos, pues existe el peligro de que se modifique la concentración de san--gre (31).

La jeringa y la aguja empleadas deben estar limpias y se--cas, para evitar hémolisis, se sostiene firmemente el antebra--zo del paciente con una mano; la piel que recubre la vena se -- estira con el pulgar mientras la aguja se introduce debajo de -- la piel con la otra mano, la jeringa se mantiene en tal forma -- que el bisel de la aguja este vuelto hacia arriba, debe empezar se por penetrar la piel algo por fuera de la vena, pues interesa que la punción de la piel y de la vena no coincidan.

No debe quitarse la aguja antes de soltar el torniquete -- para evitar la formación de un hematoma, la salida de sangre se suprime comprimiendo a un nivel de la punción mediante un algodón o gasa esteril , la sangre recogida se vacía en un tubo de vidrio, antes de vaciar la jeringa debe quitarse la aguja , ya que si se hace salir la sangre a presión a través de la aguja

puede producirse hemólisis. En lugar de usar jeringa se pueden emplear otros aparatos para efectuar la punción, tales como -- los tubos de vacío de Keidel, consistentes en una ampollita cerrada a la lámpara, una aguja con conexión de goma y un pequeño tubo de ensayo que sirve como cubierta protectora, después de que la aguja ha penetrado en la vena, se rompe la punta de la ampolla dentro del tubo de goma, y la sangre penetra gracias al vacío interior, también se puede usar una aguja unida directamente al tubo de cristal, que está esmerilado para que se ajuste bien (Cummer), con lo que no hace falta el tubo de goma. Se puede insertar la aguja en el tapón de goma, en vez de hacerlo al tubo de vidrio (Woolley) (1,11)

Existe una variedad de tubos de diferentes tamaños y con tapones de diferentes colores lo cual sirve para clasificarlos, estos tubos son llamados Vacutainer B-D, ejemplo: los tubos -- que no están estériles, el color del tapón es rojo, verde y naranja, los que contienen solución salina isotónica son de color amarillo, los no estériles que contienen anticoagulantes -- como oxalato de amonio y potasio son de color azul, los que -- contienen EDTA son de color lavanda, los que tienen heparina -- sódica son verdes y así sucesivamente, estos tubos tienen la -- ventaja de que evitan la pérdida de sangre cuando se quiere tomar más de una muestra con una sola punción venosa, la aguja -- para muestras múltiples, tiene una delgada cubierta en forma -- de acordeón, la cual envuelve al adaptador de la aguja con un -- guante cuando se cambia de tubo; se abre de nuevo automáticamente tan pronto como el nuevo tubo se coloca en su lugar, la -- aguja debe usarse una sola vez (1,13)

Otros sitios de muestreo de sangre venosa: la vena femoral es empleada cuando el paciente por alguna circunstancia, -- tal como quemadura u otra lesión en los miembros superiores -- impide la obtención de sangre de dichos miembros.

Anatomía de la vena femoral.- Es la continuación de las -- venas poplíteas por el paso del aductor mayor, su posición in-

ferior suele ser doble. Ascende por el conducto de los aductores, y se sitúa primero posteroexterna y después posterior a la arteria femoral, luego pasa por el triángulo femoral, posterior primero, e interna después respecto a la arteria femoral, entra en la vaina femoral externamente al conducto crural, y termina por detrás del ligamento inguinal convirtiéndose en vena iliaca externa, generalmente tiene dos o tres válvulas: una situada en la parte superior de la vena y otra inmediatamente por encima de la desembocadura de la vena femoral profunda, -- sus colaterales principales son: la femoral profunda, las circunflejas interna y externa y las venas safenas magmas, una anastomosis plexiforme entre la vena femoral y la femoral profunda suele establecerse en el conducto de los aductores (17,18)

Técnicas de obtención de la sangre de la vena femoral.- Se inmoviliza y se extiende perfectamente bien el miembro que se va a puncionar, se coloca una mano en la rodilla y la otra un poco por encima del arco crural, se localiza la espina iliaca anterosuperior y la sínfisis púbica, en el punto equidistante a dichas referencias, y un poco por debajo del pliegue inguinal se localiza por palpación el latido de la arteria femoral. Se limpia la región con alcohol, y se introduce la aguja por dentro de la zona del latido arterial y perpendicularmente a la piel, el acceso a la vena se identifica por la entrada brusca y espontánea de la sangre en la jeringa, se retira la aguja después de obtener la cantidad necesaria de sangre y se pone en el sitio de la punción una torunda de algodón con alcohol para que se produzca hemostasia (2) (Fig. 3)

Extracción de sangre venosa en niños.- Por lo general en niños menores de seis años o en personas que no tengan venas superficiales adecuadas en otros sitios, para la obtención de sangre venosa se recurre a la vena yugular externa, vena yugular interna o a una temporal.

En niños menores de un año, puede extraerse sangre del seno longitudinal superior.

Anatomía de la vena yugular externa.- Nace en la superfi

cie del esternocleidomastoideo, por la unión del tronco temporomaxilar y la vena auricular posterior, ésta última es de pequeño calibre, desciende por detrás de la oreja desde la porción posteroexterna del cuero cabelludo, la vena yugular externa desciende cubierta por el cutáneo del cuello en la fascia superficial, adosada al esternocleidomastoideo, siguiendo una línea trazada del ángulo del maxilar inferior a la porción media de la clavícula, atraviesa la aponeurosis profunda del triángulo supraclavicular, aproximadamente a 1.25 cm por arriba de la clavícula y desemboca en la vena subclavia; recibe las venas cervical transversa y supraescapular, que siguen a las arterias homónimas, y también la vena yugular anterior(18)

Técnica de obtención de sangre de la vena yugular externa.- Se coloca al paciente en una mesa de exploración, si se trata de un niño, es preferible envolverlo en una sábana y que una persona le sujete la cabeza para evitar lo más posible que se mueva, se coloca en posición decúbito dorsal, de modo que la cabeza y el cuello cuelguen completamente y que la persona no tenga ningún movimiento, se localiza la vena, se limpia la región con alcohol, y con el dedo pulgar de la mano izquierda se fija perfectamente para evitar que se mueva y se hace la punción, una vez que se ha tomado la cantidad suficiente de sangre, se retira la aguja y se pone una torunda con alcohol en donde se hizo la punción y se sienta al paciente (1,13) (Fig 2)

Anatomía de la vena yugular interna.- Esta vena recibe sangre de los senos venosos del cráneo y también de la cara, por la vena facial, comienza en la porción posterior de agujero rasgado continuando a la porción vertical del seno lateral; desciende en el cuello, envuelta en la vaina carótida junto con las carótidas interna y primitiva y el nervio vago, cubierta por el esternocleidomastoideo y por las demás estructuras superficiales al sistema carótido, se aprecian ganglios linfáticos cervicales profundos a lo largo del trayecto de la vena, principalmente por su cara superficial, en la base del cráneo, por delante del recto lateral de la cabeza y de la apófisis --

transversa del atlas, la yugular interna presenta una dilatación, el golfo de la yugular, por debajo de la caja del tímpano; la vena está situada posteriormente a la carótida interna y los cuatro últimos pares craneales, de los cuales el espinal la cruza dirigiéndose hacia atrás y afuera, en la mayor parte de su trayecto, la vena desciende por fuera de las arterias y por delante del angular del omóplato, el escaleno medio, el plexo cervical y el escaleno anterior, en la base del cuello se inclina algo por delante de la vena vertebral, el tronco tirocervical y sus ramas; cruza la primera porción de la vena subclavia, presenta una segunda dilatación, llamada seno de la yugular y se une a la vena subclavia por detrás del extremo interno de la clavícula, en el lado izquierdo del conducto torácico describe una curva hacia adelante y afuera para desembocar en la unión de las venas yugular interna y subclavia; del lado derecho, la gran vena linfática termina de manera análoga (18,32)(fig. 2)

Obtención de sangre de la vena yugular interna.- Se coloca al paciente en una mesa de exploración en decúbito dorsal de modo que la cabeza y el cuello cuelguen completamente, es necesario exagerar la hiperextensión y torsión del cuello, por que el borde posterior del esternocleidomastoideo es el punto de referencia, ya localizado, se señala con tinta el hueco supraesternal y el vértice de la apófisis mastoidea se traza una línea imaginaria sobre el borde posterior del músculo mencionado, se introduce con cuidado la aguja por detrás del músculo, dirigiéndola hacia el hueco supraesternal, cuando se trata de niños muy pequeños, existe el peligro de que se pueda lesionar la cúpula del pulmón, por lo que se recomienda introducir la aguja en dirección del mentón, la dirección del vaso, por su calibre, hace posible el llenado espontáneo de la jeringa. Se retira la aguja después de obtener la cantidad necesaria de sangre, se pone en el sitio de la punción una torunda con alcohol y se sienta al paciente (17,18)

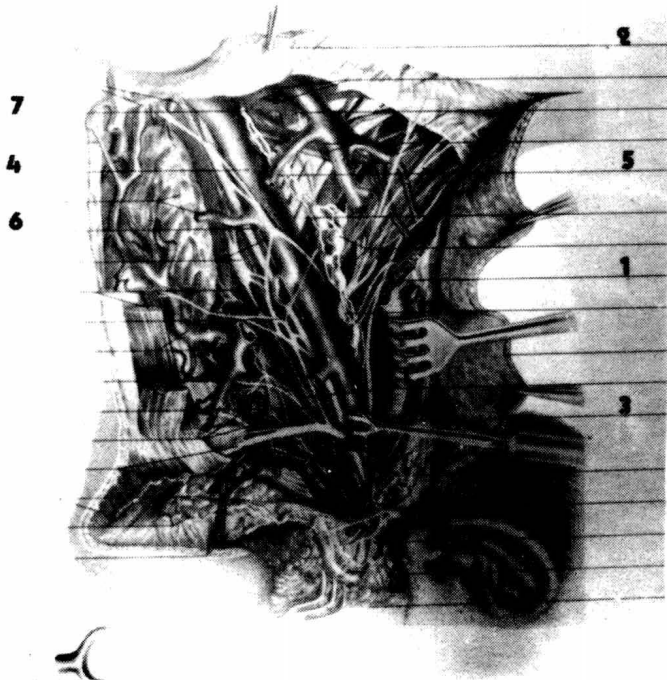


Fig. 2 .- (Posición adecuada para efectuar la punción) 1.- Porción superior del músculo esternocleidomastoideo. 2.- Porción inferior del-músculo esternocleidomastoideo. 3.- Vena yugular externa. 4.- Vena yugular interna. 5.- Vena yugular anterior y nervio posterior supraclavicular. 6.- Nervio vago. 7.- Tronco linfático yugular.

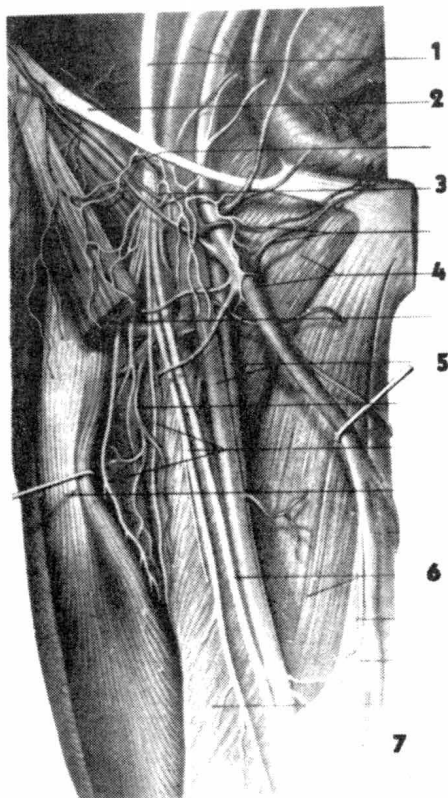
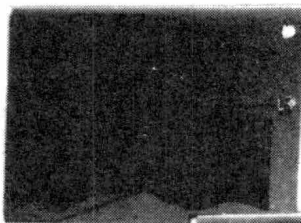


Fig. 3.- 1 Nervio femoral, arteria y vena iliaca externa. 2.-Ligamento inguinal. 3.-Arteria y vena-circumfleja ilíaca superficial. - 4.- Gran vena safena; músculo pectíneo. 5.-Arteria y vena femoral - 6.-Nervio safeno ; gran músculo aductor. 7.-Canal aductor.

Fig 4.- 1 Arteria peronea perforante. 2.-Arteria peronea. -- 3.-Tendón calcáneo. 4.-Arteria tibial anterior. 5.-Arteria tarsiana lateral. 6.-Arteria dorsal pedia. 7.-Arteria tibial posterior. 8.-Gran ligamento plantar y arteria plantar lateral.



Anatomía del seno longitudinal superior.—Esta dispuesto en la línea media desde la apófisis crista galli hasta la protuberancia occipital interna, cursa por un canal poco profundo en la cara endocraneal de los huesos y se dispone en el borde superior de la hoz del cerebro. Su porción anterior recibe las venas cerebrales superiores, y en ambos lados hay orificios semejantes a hendidura que comunican el seno con las lagunas venosas de la duramadre, en las cuales sobresalen muchas granulaciones aracnoideas, hacia la porción anterior, el seno longitudinal superior puede comunicarse por el agujero ciego del etmoides con las venas del seno frontal, y a veces con la cavidad nasal, en la protuberancia occipital interna, se une en un lado o en ambos con la porción transversal del seno lateral.

En el seno longitudinal superior desembocan venas superficiales que son de mayor calibre que las arterias cerebrales, recibiendo éstas últimas la sangre de las porciones superiores de las caras interna y externa de los hemisferios (18,32)

La obtención de sangre se hace: Se envuelve al niño en una sábana y se hace que un ayudante sujete la cabeza, la punción se efectúa sobre la línea media del ángulo posterior de la fontanela anterior, la piel se limpia con alcohol, se utiliza una aguja del número 18 de bicel corto, esterilizada y aplicada a una jeringa de Record o Luer, de 5 c.c. de capacidad, la aguja debe penetrar perpendicularmente a la superficie hasta una profundidad de 4 mm, se aspira, si la sangre no sale se penetra la aguja unos 2 mm más, lo que generalmente basta en la mayoría de los niños menores de 1.5 meses, puede extraer se sin peligro de 3 a 5 c.c. de sangre, después se limpia y se tapa la región con un colodión (13)

La obtención de sangre capilar se emplea para realizar análisis cualitativo y micrométodos clínicos de sangre, se practica en lactantes, pacientes obesos, pacientes en choque o con graves quemaduras, debido a que solo se requiere de pequeños volúmenes de sangre para efectuar el análisis.

La sangre arterial es obtenida mediante punción del lóbulo de la oreja o de la cara palmar del pulpejo de un dedo, en casos de niños pequeños, puede efectuarse en la superficie plantar del dedo gordo o del talón.

Anatomía de la oreja.- Es una lámina de fibrocartilago elástico amarillento, cubierta de piel, modelada de manera que las concavidades de su cara externa corresponden a convexidades homónimas de la cara craneal, el lóbulo de la oreja está desprovisto de cartilago, puede ser libre o adherido. La irrigación sanguínea del oído externo procede de las arterias auricular posterior y temporal superficial, la arteria estilomastoidea, rama de la auricular posterior, emite algunas ramas a la cara profunda del tímpano y se distribuye en la porción posterior de la cavidad del oído medio, las ramas auriculares de la misma arteria se distribuyen en el conducto auricular externo, la porción mastoidea y parte de la cara externa de la oreja. - Las ramas auriculares anteriores de la arteria temporal superficial también se distribuyen en el conducto auditivo y en la cara externa del pabellón del oído, las venas superficiales del tímpano pasan a la vena yugular externa y las del conducto auditivo externo (17,18)

Técnica de obtención de sangre del lóbulo de la oreja.- Este sitio presenta menor dolor para efectuar la punción, debe evitarse que se encuentre edematoso o congestionado, el tejido debe estar tibio para asegurar que los vasos están dilatados y la sangre fluya libremente, para acelerar la circulación se frota el lóbulo con una torunda con alcohol o xilol, lo cual también sirve para limpiar la suciedad o detritos epiteliales, se deja transcurrir el tiempo para que la circulación se normalice, se punciona la piel con una lanceta o con una aguja de Hagedorn colocada en un corcho y conservada en un frasco con alcohol de 95%, esta aguja hace una punción triangular que sangra en abundancia, son también útiles las lancetas sencillas y las de resorte, también se pueden emplear hojas de bisturí del

núm. 22. Cualquier instrumento que se emplee debe estar completamente estéril, la punción se realiza de un golpe firme y rápido, la primera gota se deshecha y la segunda es la que se emplea para el exámen, no conviene exprimir el lóbulo para que la sangre emane, porque con ello diluye la sangre con suero de los tejidos, pero puede hacerse presión moderada a cierta distancia por encima del punto puncionado, ya obtenida la sangre se limpia la región con algodón con alcohol para provocar la coagulación (2,13).

Anatomía de la cara palmar de la mano.- Los capilares forman un red anastomótica en la cual se vacían las arteriolas, las venulas recogen la sangre del plexo capilar y uniéndose con otros vasos similares forman las venas, en ciertas zonas las arterias se anastomosan entre sí, la sangre no siempre pasa a través de una red capilar para ir de una arteriola a una vénula, existen unos dispositivos llamados anastomosis arteriovenosas, que forman un cortocircuito respecto de los capilares, se hallan ampliamente distribuidas en la piel de la nariz, palma de la mano etc. (17,18).

Las arterias de la mano son: la arteria radial, abandona el antebrazo curvándose hacia atrás, alrededor del ligamento radial colateral, hasta alcanzar el escafoides y trapecio, en el suelo de la tabaquera anatómica, llega a la palma de la mano pasando entre las porciones del I interóseo dorsal, lo rodea por dentro y se sitúa entre las porciones del aductor del pulgar; se anastomosa con la rama profunda de la arteria cubital y forma el arco palmar profundo (18).

La arteria radial proporciona las siguientes ramas:

- 1.- Rama palmar superficial. Originada en la parte inferior del antebrazo y desciende hasta los músculos de la eminencia tenar algunas veces se anastomosa con la arteria cubital completando el arco palmar superficial.
- 2.- Rama dorsal del carpo. Se dirige hacia adentro, dorsal a los tendones extensores, y forma la red dorsal del carpo con una r

ma procedente de la arteria cubital, esta red emite principalmente tres o más arterias dorsales metacarpianas, que después se dividen en arterias digitales dorsales para los bordes adyacentes de los cuatro dedos internos, las metacarpianas dorsales y las digitales arteriales se anastomosan con los arcos -- palmares por medio de pequeñas ramas perforantes.

3.- Arterias dorsales digitales. Son dos para el pulgar y una para el borde radial de índice, pueden originarse juntas, como I arterial dorsal metacarpiana.

4.- Arteria principal del pulgar o dorsal del pulgar. Se origina al llegar a la mano la arteria radial, se dirige hacia abajo sobre el primer metacarpiano y se divide en dos arterias palmares digitales para el pulgar, puede originarse en común con la colateral externa del índice como primera arteria palmar metacarpiana; con mayor frecuencia la colateral externa es una rama de la arteria principal del pulgar (18,32)

5.- Arteria colateral externa. Se dirige hacia el borde radial del dedo medio, es a menudo rama de la arteria dorsal del pulgar o puede originarse en los arcos arteriales superficial o -- profundo, cuando se origina en el primero, se distribuye por -- el borde radial del dedo índice.

6.- Arco palmar profundo. Se apoya en los interóseos, profundo con respecto a los tendones flexores, proporciona tres arterias metacarpianas palmares, que descienden aplicadas a los interóseos, y se unen a las arterias palmares digitales del arco superficial destinadas a los bordes adyacentes de los cuatro dedos internos.

La arteria cubital, llega a la mano ventralmente al retículo flexor, por fuera del pisiforme, entre este hueso y la apófisis del ganchoso, después se divide en dos ramas terminales, arco palmar superficial y arco palmar profundo.

1.- Arco palmar superficial. Su continuación por el lado radial es extremadamente variable, suele ser complementado por la arteria colateral del índice, por la rama palmar superficial o -- por la arteria propia del pulgar, emite tres arterias digitales

palmares comunes que se dividen para irrigar los bordes adya--- centes de los dedos (18,32).

Técnica de obtención de sangre de la cara palmar del pul-- pejo de un dedo.- El dedo que se elije para la punción no debe presentar edema, congestión o inflamación, debe estar caliente y en buen estado circulatorio , cuando la mano está fría y sudo rosa se introduce en agua caliente durante algunos minutos o - se fricciona vigorosamente, la punción se practica en la última falange, de preferencia en la cara palmar o dorsal, o bien en - la cara lateral de la yema del dedo medio, efectuándose en sen-- tido perpendicular a las líneas de la piel mejor que paralela - a ellas (2, 13).

La piel se limpia frotando con una torunda con alcohol y - se deja secar, ya que si la punción se practica cuando esta hú-- medo el dedo, la sangre se extiende formando una capa delgada - en lugar de formar una gota grande, por otra parte el alcohol - coagula las proteínas de la sangre, haciendo imposible aspirar-- la con la pipeta. (13).

Se comprime la yema del dedo y se hace la punción firme , completa y profunda, de manera que la sangre brote con ligera - presión, para hacer la punción se emplea cualquiera de los ins-- trumentos mencionados anteriormente, se deshecha la primera go-- ta, cuando es necesario se exprime ligeramente para que broten nuevas gotas, después de obtenida la muestra se limpia el dedo - con alcohol para producir hemostasia.

Anatomía de la superficie plantar y del talón.- En la plan-- ta del pie hay ciertas zonas de arterias que se anastomosan en-- tre sí , la arteria plantar interna es la de menor calibre de - las ramas terminales de la arteria tibial posterior, y se origi-- na bajo el retináculo flexor, es profunda primeramente al abduc-- tor del pulgar y luego se dirige hacia adelante en la planta -- del pie , para situarse entre el abductor del pulgar y el fle-- xor corto de los dedos, una rama superficial continúa ventral-- mente e irriga el borde interno del dedo gordo, durante su tra-- yecto, emite ramas cutáneas, (17, 18), su rama profunda origi

na tres ramas digitales superficiales, que se anastomosan con las tres arterias metatarsianas plantares internas.

La arteria plantar externa se origina también bajo el retináculo flexor, es generalmente la de mayor calibre de las ramas terminales de la arteria tibial posterior, se dirige hacia delante y afuera por la planta del pie, entre el flexor corto de los dedos o flexor corto plantar, por debajo, y el cuadrado plantar de Silvio, por arriba, después se sitúa entre el flexor corto de los dedos y el abductor corto del dedo pequeño, desde la base del V metatarso, cambia de dirección, se dirige hacia adentro y alcanza el arco plantar.

La arteria pedia es un vaso extremadamente variable, es la continuación de la arteria tibial anterior a partir del punto medio entre los maléolos, cruza por el retináculo extensor inferior y por el extensor corto del pulgar, se aplica sucesivamente a la cápsula de la articulación del tobillo, cabeza del astrágalo, escafoides y cuneiforme intermedio, la arteria pedia termina en una rama plantar profunda en el extremo proximal del primer espacio intermetatarsiano y alcanza la planta del pie entre las porciones del primer interóseo dorsal. Forma el arco plantar, descrito con la arteria plantar externa.

La arteria externa del tarso se origina a nivel de la cabeza del astrágalo y se dirige hacia afuera, profunda a los extensores largo y corto, se anastomosa con la arteria arqueada y con la rama perforante de la peronea, las ramas tarsianas de menor calibre proceden del borde externo de la pedia, la arteria arqueada se origina al nivel de los cuneiformes y también se dirige hacia afuera profunda a los extensores largo y corto, proporciona tres arterias dorsales metatarsianas (II, III y IV) se dirigen hacia adelante aplicadas a los interóseos, cada una de ellas se divide en dos arterias dorsales digitales para los bordes adyacentes de dos dedos, la primera arteria metatarsiana dorsal es la continuación ventral de la arteria pedia y se aplica al I interóseo dorsal, proporciona arterias-

dorsales digitales al borde interno del dedo gordo y a los bordes adyacentes del I y II dedos(17,32) (Fig. 4)

Técnica de obtención de sangre de la superficie plantar del dedo gordo y del talón.-- La parte que se va a pinchar no debe estar cianótica ni edematosa. Si se halla cianótica o fría debe sumergirse en agua a 38° ó 40° durante 3 a 5 minutos.

El sitio se limpia bien con alcohol para eliminar la suciedad y los detritos epiteliales, y para aumentar la cantidad de sangre en la parte . Después se deja secar y se punciona con -- cualquiera de los instrumentos mencionados anteriormente . La punción se realiza con un golpe firme y rápido, la primera gota de sangre se limpia con un algodón , usando para el análisis -- las siguientes gotas, posteriormente se limpia la región con alcohol y se colocará sobre la herida una torunda empapada en alcohol, que se deja hasta que la sangre no fluya (13).

CAPITULO III

MANEJO APROPIADO DE LAS MUESTRAS PARA DIFERENTES PRODUCTOS POR ANALIZAR.

La preservación de la integridad química de las muestras desde el momento que se recogen hasta el momento en que se analizan es de máxima importancia para que los resultados tengan un sentido real y no ficticio.

En general, la sangre para análisis químico ha de extraerse mientras el paciente está en estado de posabsorción, el ayuno durante la noche es el procedimiento usual, aunque es suficiente un ayuno de seis horas, durante este tiempo no es necesario restringir la ingestión de agua. Los componentes comunes que son afectados de modo significativo por la ingestión de alimentos son: glucosa (se eleva), fosforo inorgánico (disminuye), turbidez con timol (aumenta), y triglicéridos (aumenta) entre otros, además, la lipemia, causada por un ascenso transitorio en quilomicrones después de una comida que contiene grasa, causa gran interferencia en varios análisis químicos debido a la turbidez que produce.

Se ha observado que tanto como la fatiga y el ejercicio moderado pueden elevar la excreción de catecolaminas y 17-hidroxi corticosteroides, disminuir las cifras de aclaramiento urefco, de hierro sérico y ocasionalmente incrementar las tasas de colestesterina sérica. Para ciertas pruebas funcionales gástricas, renales y hepáticas está contraindicado el tabaco, el té y el café.

El paso de posición decúbite a la erecta se produce una contracción temporal del volumen plasmático, y en consecuencia aumenta tanto el nivel de hemoglobina como la concentración de proteínas plasmáticas.

En relación a la administración de medicamentos al paciente antes de efectuar el análisis puede dar valores falsos, por lo cual ha de suspenderse y repetirse el análisis unos días después (2,16).

El transporte de muestras al laboratorio de un hospital - es, algunas veces, un problema, las muestras deben ser manejadas por un equipo de técnicos o enfermeras perfectamente adiestradas y con conocimiento del problema, quienes tienen que transportarlas directamente de los pabellones al laboratorio, - la muestra se pone en un tubo de ensaye o en un frasco pequeño, que debe rotularse claramente para evitar confusión o bien que la muestra se pierda. Los problemas más frecuentes son la hemólisis en los tubos con sangre, esto puede interferir en varios métodos químicos y por ello ha de evitarse, / varios componentes como transaminasa glutámica oxalacética en suero, deshidrogenasa láctica, fosfatasa ácida y potasio están presentes en grandes cantidades en los eritrocitos, de modo que la hemólisis - elevará significativamente los valores hallados para estas sustancias en suero, la hemoglobina puede afectar directamente en una determinación química por inhibir una enzima (la lipasa); por interferir en la reacción de la diazoación de bilirrubina - o por presentar cantidad importante de color y por ello alterar en alguna determinación colorimétrica, en particular cuando la lectura se hace en la parte azul del espectro (2,9)

En suero fuertemente hemolisado ocurre efecto de dilución en los componentes de éste si la concentración de los metabolitos en los eritrocitos es menor que en el plasma; así, las concentraciones de sodio y cloruro serían bajas falsamente en un suero en tales condiciones (30)

Algunas de las causas comunes de hemólisis son: humedad - en la jeringa (que se evitará empleando este tipo de instrumental perfectamente seco); destrucción mecánica de células - al forzar el paso de la sangre de la jeringa al tubo sin quitar la aguja (se dejará resbalar lentamente la sangre por la pared del tubo después de quitar la aguja de la jeringa), el uso de tubos de vacío ha resuelto muchos de estos problemas; la

mezcla demasiado energética en el tubo después de extraída la -- sangre (la mezcla con el anticoagulante se consigue por inversión lenta, y no sacudiendo) (1,31).

Los análisis se deben realizar antes de las 5 horas a partir del momento de la obtención, en caso de que ésto no sea -- posible no debe dejarse la muestra destapada a temperatura amiente, se tapa y se guarda en refrigeración entre 4 y 10°C, - salvo si existen aglutininas al frío, en cuyo caso es necesario conservar la muestra en baño tibio a 37°C (1,2).

Se debe tener cuidado, ya que los procesos de congelación y licuefacción producen la desnaturalización de ciertas protefnas y disminuyen la concentración de otros componentes, la descongelación se debe realizar rápidamente en un baño de agua de 37-45°C.

Hay que estar seguros de que todas las soluciones con las cuales se mezcla o diluye la sangre esten correctamente preparadas y resulten isotónicas, ya que las soluciones hipotónicas producen hemólisis.

Es preferible emplear reactivos de calidad analítica, aunque los criterios de precisión de éstos no son tan estrictos - como en el caso cuando se emplean para la preparación de patrones primarios, la principal fuente de error de los reactivos, es la debida al deterioro o alteración de sus propiedades que pueden sobrevenir con el transcurso del tiempo.

Entre los factores que afectan a la estabilidad y caracteristicas de los reactivos se encuentran: pH, luz, temperatura, oxidación, crecimiento de hongos, conservadores, evaporación, absorción de dióxido de carbono o vapor de agua, contaminación con polvo, contaminación por los tapones o corchos de las botellas, impurezas en el agua destilada, deprendimiento - de silicatos a partir de las botellas de vidrio o con el polietileno del frasco que lo contiene.

La estabilidad de los reactivos se puede mejorar en ocasione

nes modificando el disolvente, preparando soluciones más concentradas, o bien, añadiéndole alguna sustancia conservadora. La refrigeración siempre aumenta la estabilidad, pero ha de evitarse la cristalización de los componentes de la solución, sobre todo aquellos que se emplean para el análisis de enzimas, pH, o velocidad de formación de color.

Se ha observado que los frascos de polietileno no son totalmente inertes, lo cual se comprueba por la captación de tintes, colorantes, yodo y ácido pícrico, también puede ocurrir que capte reactivos incoloros de forma inapreciada, pero se hace patente al comprobar resultados absurdos con las subsiguientes soluciones. Se ha comprobado que en soluciones conservadas en frascos de polietileno se produce lenta reducción de las iones cérico y cúprico, mientras que otras soluciones desarrollan evidente fluorescencia, por otra parte, las soluciones alcalinas conservadas en frascos de vidrio producen de forma gradual silicatos solubles que pueden interferir en ciertos métodos de determinación de calcio (1,2).

Obtención de suero: La sangre del paciente se pasa a un tubo colector ordinario, se mantiene en éste hasta que la sangre se coagule espontáneamente. Este proceso requiere normalmente de 5 a 15 min. a temperatura ambiente y, un tiempo mayor a temperatura de refrigeración, el coágulo que se forma se adhiere a las paredes del tubo, se remueve con cuidado con un aplicador de madera ó con un agitador de vidrio, se efectúa un simple movimiento alrededor de la periferia del tubo, ya que es necesario desprender el coágulo antes de centrifugar de esta forma se puede evitar la hemólisis. Si el coágulo se quita después de centrifugar, éste se retrae y se obtiene un mayor volumen de suero, y esto ocurre más rápidamente y con mayor extensión a temperatura ambiente que a la de refrigeración.

La decisión de obtener la máxima cantidad de suero es permitiendo la retracción del coágulo, lo cual debe ser manejado con destreza para evitar cambios en los metabolitos del suero

a las células y viceversa, para evitar esto debe separarse el suero antes de una hora, sin embargo hay muchas excepciones, - el coágulo no debe ser removido una vez centrifugada la muestra, el suero se saca por medio de una pipeta de succión.

La mayor parte de los análisis clínicos son hechos en sueros más bien que con plasma o sangre total, teóricamente se -- consideraba que la única diferencia entre suero y plasma era - la presencia de fibrinógeno en el último, actualmente se ha de mostrado que existen otras sustancias por ejemplo: factor aclarante, lipemia; que aparecen como coprecipitados que se libe-- ran o consumen en el proceso de la coagulación, la LDH y aldolasa son liberadas de los trombocitos durante este proceso, -- también es liberado el CO₂ del suero, a menos que éste sea obtenido en condiciones anaerobias, el efecto resultante es un - cambio en la concentración de agua y electrolitos en el suero.

Obtención de plasma y sangre total: La sangre es un fluido del organismo de color rojo brillante en las arterias y rojo oscuro en las venas, es un líquido relativamente viscoso, - siendo de 4.5 á 5.5 veces la del agua, su densidad esta entre 1.041 y 1.067, siendo un poco más densa en el hombre que en la mujer, tiene olor peculiar, sabor salado, temperatura alrededor de 38°C, estos valores incluyen tanto la sangre arterial - como la venosa (2,12)

La sangre a simple vista se ve opaca u homogénea, al observarla al microscopio se encuentra formada por elementos figurados o glóbulos en un líquido intercelular, el plasma, el - volumen de las células y del plasma es aproximadamente el mismo, siendo este último un líquido de color amarillo muy tenue, en el cual se encuentran las proteínas, distinguiéndose tres - fracciones diferentes:

Fibrinógeno: Es el precursor de la fibrina, es la sustancia que forma el coágulo sanguíneo. Su peso molecular, osci-

la entre 350 000 y 450 000, normalmente constituye del 4 al 6% de las proteínas totales del plasma, esta cifra puede aumentar en muchas enfermedades infecciosas, aunque no haya fiebre ni leucocitosis, también aumenta cuando hay hiperpirexia producida por la inyección intravenosa de la vacuna tífica (1,3)

Albúmina: Su distribución en el plasma humano obtenida por técnicas electroforéticas por Armstrong y cols. es de 55.2%, su peso molecular es de 69 000, es la molécula de menor peso, posee la mayor difusibilidad (34)

Globulinas: Es una mezcla compleja, siendo los componentes de particular interés: mucoproteínas y glucoproteínas, se encuentran en combinaciones de carbohidrato con globulinas principalmente en las fracciones alfa₁ y alfa₂ de las globulinas. Lipoproteínas, son combinaciones de lípidos y proteínas que migran con las α y β globulinas. Gammaglobulinas, esta fracción contiene la mayor cantidad de anticuerpos circulantes, son llamadas inmunoglobulinas, se han dividido de acuerdo a estudios electroforéticos, inmunológicos y de ultracentrifugación en cinco grupos: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, constituyen el 44.9% de las proteínas totales del plasma (1)

Muchos de los componentes de la sangre total están presentes en concentraciones desiguales en los eritrocitos y en la fase extracelular, en el plasma.

Para la obtención tanto de plasma como de sangre total se emplean anticoagulantes, existen diversos tipos y dependiendo, tanto del tipo de análisis que se va a efectuar como para los fines que se va a emplear la sangre, se seleccionan.

Una vez obtenida la sangre del paciente se mezcla en un tubo con el anticoagulante, lentamente para no producir alteraciones en los componentes de ésta, ni hemólisis.

Para la obtención de plasma, una vez que se ha mezclado la sangre con el anticoagulante se centrifuga, quedando los elementos figurados en el fondo y en el sobrenadante se encuentra el plasma (10, 13)

Manejo apropiado para la determinación de enzimas.

Se ha discutido el problema de la estabilidad in vitro de estas proteínas, ya que la actividad enzimática puede desaparecer a cualquier temperatura, esto se puede evitar analizando rápidamente la muestra, o bien manteniéndola bajo congelación.

Las siguientes enzimas séricas permanecen estables a temperatura ambiente durante 8 horas al menos, por una semana a 4°C y un mes o más bajo congelación: transaminasas glutámico-oxalacética y glutámico-pirúvica, leucín-aminopeptidasa, deshidrogenasa láctica, fosfohexoisomerasa, glutatión reductasa, aldolasa, deshidrogenasa isocítrica, amilasa y lipasa. Algunas presentan períodos de estabilidad más largos a temperatura ambiente; no obstante, deben mantenerse las muestras refrigeradas de un día para otro, puesto que la disminución de la actividad enzimática en los sueros anormales muestran fluctuaciones que no obedecen a norma alguna.

Otras enzimas son menos estables, la ceruloplasminoxidasasa se inactiva rápidamente a temperatura ambiente, sin embargo puede permanecer estable durante dos días a 4°C, y durante una semana si se congela, la fosfoglucomutasa es estable a temperatura ambiente durante más de 8 horas, su actividad disminuye después de dos días bajo refrigeración.

Las fosfatasa alcalina y ácida difieren en estabilidad, la primera permanece estable a temperatura ambiente durante 8 horas, y por más de una semana si se mantiene congelada, la fosfatasa ácida por el contrario, es muy inestable a temperatura ambiente, a 25°C se pierde casi el 50% de su actividad en un plazo de 5 horas, si se separa el suero o el plasma rápidamente y se congela hasta el momento de someterlo a análisis, no ocurre cambio alguno perceptible en su actividad enzimática.

Para la mayoría de las determinaciones enzimáticas se puede emplear indistintamente plasma o suero, la posibilidad de --

utilizar plasma depende del tipo de anticoagulante que se disponga, debe evitarse el uso de fluoruro sódico o quelatos metálicos del tipo EDTA, ya que contienen inhibidores enzimáticos, la actividad amilásica queda inhibida por oxalatos y citratos- pero nó por heparina, también la deshidrogenasa láctica y la fosfatasa ácida pierden potencia en el plasma oxalatado (30)

Se debe evitar la hemólisis en la mayoría de las determinaciones enzimáticas, debido a que casi todas las enzimas séricas se encuentran en mayor concentración en el interior de los eritrocitos que en el plasma, y su presencia produce generalmente elevación de los niveles enzimáticos.

Aún no se ha aclarado la necesidad de emplear muestras obtenidas en ayunas para la determinación de ciertas enzimas, pero se ha observado que algunas son afectadas por la dieta y el ejercicio físico, los ejercicios violentos pueden causar incrementos en la tasa de transaminasas, la determinación de fosfatasa alcalina debe efectuarse en muestras obtenidas en ayunasya que se presentan variaciones muy marcadas en caso contrario (30, 31)

Elementos químicos y electrolitos.- Las concentraciones de sodio, potasio, yodo y cloro no se modifican si se mantiene el suero a temperatura ambiente durante 8 o más horas, bajo refrigeración durante la noche, o bajo congelación durante un año al menos, una vez obtenida la muestra se debe separar el suero del coágulo, para impedir el intercambio de electrolitos entre las células y el suero. Goodman, Vicent y Rosen observaron que las cifras de potasio aumentaban más rápidamente en sangres conservadas a 4°C que a 25°C, opinan que dicho fenómeno es el resultado del retardo que experimentan los procesos enzimáticos a 4°C, que hace que se suspenda el transporte de potasio al interior de las células, con lo que ya no se compensa el efecto superior de su difusión en sentido contrario.

Es evidente que para la determinación de calcio no podrán emplearse plasmas que contengan sustancias eliminadoras de este ión (oxalatos, citratos, EDTA), de igual manera para la determinación de sodio y potasio no deberá realizarse en plasmas que contengan anticoagulantes en forma de sales sódicas y potásicas respectivamente, la heparina a una pequeña concentración de 0.5 mg/ 10 ml, contiene cierta cantidad de sodio o calcio que pueden alterar los resultados, por el contrario, este anticoagulante es muy empleado en la determinación de dióxido de carbono plasmático, pH plasmático y sanguíneo.

Para las determinaciones de yodo no es preciso que las muestras se hayan obtenido en ayunas, la dieta no parece modificar los niveles de sideremia, pero se sabe que existe una notable variación diurna que oscila entre 15 y 100 $\mu\text{g}/100 \text{ ml.}$, las cifras más bajas se obtienen por lo general, a últimas horas de la tarde o en las primeras de la noche.

Para la determinación de magnesio, hierro y potasio, debe evitarse totalmente la hemólisis, debido a que estos componentes se encuentran en niveles muy elevados dentro de los eritrocitos, en comparación con los correspondientes niveles plasmáticos.

Pruebas funcionales hepáticas (no enzimáticas).- De entre las innumerables pruebas de floculación, la mayoría de los laboratorios practican normalmente la de cefalina-colesterina, la de sulfato de zinc y la de turbidez del timol, debido a que éstas no hacen más que determinar anomalías en las proteínas plasmáticas, cualquier técnica para la obtención de muestras que afecte a las proteínas séricas puede alterar igualmente los resultados, las muestras se deben de obtener cuando el paciente se encuentre en ayunas, por cuanto la lipemia puede falsear los resultados. Las pruebas de cefalina-colesterina y las de turbidez del timol, es preferible realizarlas con sueros recientes, si se quiere conservar el suero bajo refrigeración para la prueba del timol, habra de estar en contacto con el

coágulo, para evitar obtener resultados erróneamente bajos, debido a que disminuye la concentración de dióxido de carbono en el suero separado.

Para la determinación de bilirrubina conjugada y libre, el suero debe mantenerse resguardado de la luz directa, la bilirrubina no conjugada (soluble en alcohol) permanece estable durante 8 horas a temperatura ambiente, y su exposición a la luz eléctrica, solar o ultravioleta produce una pérdida del 50% de ésta, la hemólisis interfiere en su determinación por el método de Malloy-Evelyn obteniéndose resultados inferiores a los reales, para la determinación de bilirrubina puede emplearse tanto suero como plasma.

En las determinaciones del tiempo de protrombina pueden efectuarse sobre plasma oxalatado o citratado, en el primer caso se demostró que la actividad protrombínica permanece estable durante 18 horas, a una temperatura de 22 á 25°C, manteniendo los tubos bien tapados, la hemólisis tiene influencia despreciable cuando la determinación se hace en un solo tiempo.

Los análisis de retención de bromosulfoftaleína (BSP) se realizan con el paciente en ayunas, ya que la capacidad del hígado para eliminar el colorante se altera durante el período posprandial, las muestras deben ser claras, no ictericas y exentas de hemólisis y, puede emplearse tanto plasma oxalatado o heparinizado como suero.

Determinación de nitrógeno no proteico.- Es más apropiado el empleo de suero, pero también puede emplearse plasma o sangre total, cuando se recurre a técnicas que empleen ureasa, la muestra se recoge en tubos exentos de inhibidores enzimáticos y anticoagulantes cuya composición formen sales amónicas. Los componentes de la fracción de nitrógeno no proteico permanecen estables durante dos días cuando la muestra se recoge en tubos con fluoruro y durante una semana cuando la sangre es refrigerada.

Metabolitos hidrocarbonados.- La ingestión de alimentos-

modifica las cifras de glucemia, se debe someter al paciente a dietas equilibradas durante varios días antes de efectuar la -determinación de tolerancia a la glucosa, en individuos en ayunas, las cifras de glucemia son casi idénticas en sangre capilar, venosa o arterial, después de la ingestión de glucosa, la sangre capilar presenta cifras más elevadas que la venosa. Esto es muy importante a la hora de interpretar una curva de glucemia o el nivel de ésta posprandial en muestras de sangre obtenidas por punción capilar.

Cuando se emplee para la determinación sangre total, se debe de añadir un inhibidor enzimático -por ejemplo: fluoruro-sódico- a la mezcla anticoagulante para impedir la pérdida de una cantidad sensible de glucosa por glucólisis enzimática, para controlar estos efectos se puede preparar un filtrado libre de proteínas de dicha muestra, o bien diluirla con agua (12,30) ←

Las cifras de ácido láctico y pirúvico pueden aparecer - falsamente elevadas como consecuencia de la hemólisis, dichos ácidos resultan inestables, debido a los procesos metabólicos que ocurren después de extraída la sangre, para evitarlo se -- obtiene la muestra sin ayuda de torniquete, separando rápidamente el suero o plasma de las células y congelándolo hasta el momento de la determinación. ←

Lípidos.- Debido a la relación que existe entre los lípidos y las cardiopatías arteroscleróticas, se ha aumentado y variado las técnicas para la determinación de lípidos sanguíneos, entre éstas se incluyen las de colesteroína libre y total, triglicéridos, ácidos libres totales (esterificados y no esterificados), β -lipoproteínas y fosfolípidos, se puede emplear -- tanto suero como plasma, ya que los anticoagulantes corrientes no afectan la tasa de lípidos, se debe prescindir de las muestras hemolizadas e ictericas, ya que pueden dar valores falsos.

A excepción de la colesteroína, el resto de los lípidos - se altera rápidamente a pesar de guardar las muestras en refri

geración, por consiguiente a menos que se vaya a realizar el análisis inmediatamente, se separará el suero o plasma para congelarlo, los ácidos grasos libres por ejemplo, aumentan a temperatura ambiente, ya que la lipasa proteíca existe en el plasma normal, produciendo incremento de estos ácidos por hidrólisis de sus ésteres, la hemólisis altera la cifra de fosfolípidos, debido a que los fosfatos orgánicos se hidrolizan rápidamente para adoptar la forma inorgánica (3,30)

Preservación de las muestras biológicas.

Desde los principios de la historia de la química clínica, se hicieron considerables investigaciones con respecto al problema de la preservación de la glucosa y varios constituyentes nitrogenados de la sangre, orina y líquido cefaloraquídeo.

La preservación de las muestras, no ha significado un problema serio cuando son obtenidas directamente del paciente en el laboratorio clínico o en el hospital, ya que el tiempo para efectuar los análisis correspondientes es de 4 á 8 horas, y en algunos casos es de 24 horas. La viabilidad de las muestras se conserva reduciendo la temperatura, comunmente se emplean temperaturas bajas inclusive; 4°C (refrigeración); -5 á -20°C (congelación); -70°C (hielo seco) (1,2,16)

Hay exámenes adicionales que se hacen por duplicado:

a) Si la muestra es conservada por un período de tiempo después de efectuado el análisis, permita que se repita éste si se considera prudente, y b) Si se hacen análisis de las muestras a diferentes tiempos debido a que estan conservados, pueden ser ensayados sin dificultad.

La alteración en la concentración de un constituyente en la muestra copia, puede resultar por la absorción en las paredes de vidrio o de plástico de los tubos colectores de sangre, desnaturalización parcial de las proteínas durante la formación de una película monomolecular, evaporación de constituyentes -

volátiles o de la fase acuosa del suero, cambios de permeabilidad eritrocítica, actividades de los constituyentes metabólicos de los eritrocitos y/o leucocitos, incluyendo consumo de O_2 y producción de CO_2 , alteración de pH y potencial red-ox, hidrólisis proteólisis, actividades fosforolíticas, glucólisis y autodegradación (pérdida de actividad enzimática). Se han efectuado estudios de estabilidad usando como parámetros muestras normales y anormales (1,2)

Los cambios en la concentración de sustancias volátiles como O_2 y CO_2 son impedidas o al menos prevenidas, por la colección de la muestra en condiciones anaerobias, que son difíciles de obtener y son más bien molestas.

El problema de la acción microbiana es muy importante, y puede prevenirse siguiendo 4 caminos: A) Colección y manejo de la muestra bajo condiciones estériles (no siempre posibles y son frecuentemente imprácticos en el procedimiento rutinario para todas las determinaciones); B) Adición de agentes antibacterianos; C) Alteración del pH de la muestra; D) Refrigeración o congelación de la muestra.

El empleo de la liofilización de muestras es estable con respecto a muchos constituyentes, algunos autores afirman que componentes como la glucosa pueden decrecer considerablemente en un período de un año si la liofilización no fue total.

El problema de la estabilidad tiene un significado particular sobre todo cuando las muestras son mandadas por medio del correo o vía aérea a laboratorios de referencia mejor equipados, muchas sustancias son estables a temperatura ambiente, otras pueden ser estabilizadas por la adición de conservadores y otras más no pueden ser estabilizadas excepto por congelación (2,31)

El uso de pH de mayor a menor previene la acción microbiana en orina ya que este sistema es incompatible con el sistema de vida, la estabilidad de la fosfatasa ácida puede ser prolongada ajustando el pH a 6.2 con amortiguador de citrato.

Conservadores Químicos.

Pueden ser clasificados dentro de dos grupos, de acuerdo a su función:

1.- Incluye inhibidores enzimáticos que producen cambios químicos como en la glucólisis, ejemplo: fluoruros.

2.- Incluye agentes bacteriostáticos que interfieren en el desarrollo microbiano.

Major, en 1923, introdujo el empleo de fluoruro de potasio como conservador de la sangre, tiene actividad anticoagulante (formación de CaF_2 insoluble), y esto hace innecesario el uso de otros anticoagulantes.

Se encontró que la glucosa, urea, nitrógeno no proteico, creatinina, colesterol y ácido úrico son estables hasta 10 días a temperatura ambiente si la sangre fue esterilizada, pero el fluoruro no es suficiente antibacteriano, que prevenga el desarrollo microbiano si la muestra está contaminada. Sander, en 1923, introdujo el empleo de una combinación 10 mg de fluoruro de sodio más 1 mg de timol por ml de sangre, la presencia de éste último controla eficientemente el desarrollo microbiano aunque las muestras no esten estériles, son estables para todas las determinaciones excepto para nitrógeno no proteico, por cerca de dos semanas.

Otros investigadores observaron que no obstante con los éxitos encontrados con respecto al período de conservación, la adición de grandes cantidades de fluoruro de sodio causan un cambio significativo en la concentración de agua y hay tendencia de producirse hemólisis, lo cual no sucede a bajas concentraciones y por lo tanto puede ser usado, el empleo de tubos colectores conteniendo timol y fluoruro son provechosos.

Una interesante posibilidad es el uso de antibióticos que prevengan el desarrollo microbiano, por ejemplo: 1mg de estreptomomicina base por 10 ml de sangre, que es empleado en la conservación de muestras para la determinaciones de Hb y urea.

Recientemente agentes bactericidas, tales como derivados de mercurio-tiosalicilato son empleados ya que previenen el

desarrollo microbiano en el suero guardado en refrigeración.

El interés en bioquímica por la conservación de los metabolitos ha tenido gran incremento a tal grado que los investigadores han desarrollado varias técnicas observando los cambios sensibles en las moléculas, tales como los cambios en la absorción en el espectro visible y en el de luz ultravioleta, en la movilidad electroforética, alteración o desnaturalización de lipoproteínas en el suero humano (1,24)

CAPITULO IV.

LOS ANTICOAGULANTES, SU ACCION Y CLASIFICACION, SU EMPLEO ADECUADO SEGUN EL TIPO DE MUESTRA.

Para casi todo el trabajo hematológico y para muchos análisis bioquímicos se requiere sangre sin coagular, por lo -- cual se emplean los anticoagulantes y de este modo se obtiene-- sangre completa o plasma, se agrega a la muestra inmediatamente después de extraída, o bien se coloca en el tubo en que se recoge la sangre, se debe de asegurar que su empleo no afecte-- el análisis que se va a efectuar, esto puede ocurrir de muchas maneras, tales como el empleo de sal sódica o potásica que produce un error significativo cuando se van a analizar electrolitos, también puede ocurrir que el anticoagulante separe el componente que se va a analizar (23)

Como antecedente a la acción y clasificación de los anti-- coagulantes se dará una breve descripción de los factores que-- intervienen en la coagulación, de la bioquímica y función de -- las plaquetas y de la teoría más comunmente aceptada para la-- coagulación.

Una vez derramada la sangre en los vasos pierde su flui-- dez y se gelifica, denominándose coagulación a este proceso, -- desde el primer momento, numerosos factores reaccionan entre -- sí, en forma muy compleja para producir finalmente el coágulo-- de fibrina, o sea se forma una red filamentososa que retiene los elementos sanguíneos; el coágulo formado se retrae y trasuda -- un líquido llamado suero sanguíneo (20)

Producción y bioquímica de los factores de la coagulación

El hígado ha mostrado ser el mayor sitio de síntesis de -- los diferentes factores de la coagulación, aunque en algunos -- casos no esta claro el sitio de síntesis, la evidencia de que-- este sea su origen deriva del estudio en sujetos humanos con -- enfermedad hepática o experimentando con animales hepatectomi-- zados o por medio de estudios "in vitro" de la síntesis en pre

parados de tejidos (20,33)

A excepción del calcio, todos los factores de la coagulación son proteínas, y la mayoría tienen dificultad para ser purificadas, pero a través de grandes progresos efectuados en -- los últimos años y utilizando técnicas bioquímicas se han logrado grandes adelantos en este aspecto.

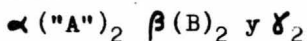
Fibrinógeno (Factor I). -- Se ha demostrado por medio de -- estudios en cortes de tejido o por medio de perfusiones que es sintetizado en el hígado, esto se ha completado por la incorporación de aminoácidos radiactivos o por técnicas inmunológicas que demuestran la síntesis de la nueva proteína.

Las técnicas de inmunofluorescencia han indicado que la -- célula parenquimal del hígado es el sitio de síntesis del fi--brinógeno, en las células de Kupffer se encontraron huellas de éste, pero bajo ciertas condiciones se ha incrementado la síntesis en las células retículo endoteliales que generalmente es tan desprovistas de dicho factor.

Las plaquetas contienen fibrinógeno intracelular diferente al plasmático, que puede ser sintetizado en el megacariocito.

El fibrinógeno es una glucoproteína con peso molecular de cerca de 340 000, puede ser purificado por procedimientos que involucren la precipitación con sales, solventes orgánicos, --crioprecipitación y cromatografía, el grado de purificación obtenido es de 98%, es coagulada por la trombina, aproximadamente el 3% esta en forma libre como fibrinopéptidos y, representa el máximo de coagulabilidad. Recientemente se ha observado fracciones diferentes de este factor, por medio de electroforesis.

Nomenclatura. -- La molécula de fibrinógeno esta compuesta de tres pares de cadenas unidas por puentes disulfuro, siendo la designación mas usual:



α ("A") designa las cadenas más sensibles de todos los tipos de fibrinopéptido A, cuando es atacada por la trombina; β (B) es usado para indicar la cadena sensible de fibrinopéptido B, y γ se emplea para indicar la cadena que no es atacada por la trombina.

Subunidades y grupos terminales amino-libres.- Por medio de estudios se ha llegado a la conclusión de que el fibrinógeno está constituido por tres pares de cadenas, la separación de éstas se hizo por electroforesis y con sulfito de sodio, obteniéndose fracciones con pesos moleculares de 50 000 á 65 000.

El análisis de los grupos terminales demostró que había seis aminoácidos residuales por molécula: alanina (cadena α - ("A")), ácido piroglutámico (cadena β (B)) y tirosina (cadena γ). El ácido aspártico está presente en pequeña cantidad en el N-terminal y aparentemente deriva de la cadena α ("A").

Contenido de carbohidrato.- Contiene cerca del 3 al 5% de éste por molécula, consiste de hexosas y ácido siálico y está unido a la proteína por medio de enlace covalente, su función en la coagulación sanguínea no está bien determinada (7, 33)

Fibrinopéptidos.- Cuando el fibrinógeno es convertido a fibrina por la trombina, los péptidos son liberados, se ha observado que la trombina hidroliza la ligadura de arginilglicina, liberando dos moles de fibrinopéptidos A y B de las cadenas α ("A") y β (B), respectivamente.

La coagulación visible ocurre solamente después de la aparición de una cantidad apreciable de fibrinopéptido A, en adición de éste y del B, son liberados en pequeñas cantidades, durante la coagulación, otros péptidos derivados del fibrinopéptido A, difiriendo solamente en uno de los aminoácidos.

El fibrinopéptido AP es idéntico al A, excepto que el residuo de serina está fosforilado; el fibrinopéptido AY difiere en el N-terminal, ya que contiene ácido aspártico en lugar de alanina. Recientemente se ha encontrado que las tres cadenas están constituidas por una secuencia de 78 aminoácidos(33)

Protrombina (Factor II).- Se ha comprobado que es sintetizada en el hígado, por medio de experimentos con suspensiones de células hepáticas, su peso molecular encontrado por medio de análisis de aminoácidos y datos fisicoquímicos es de 52 000 y 70 000, los preparados purificados contienen cerca de 10% de carbohidrato constituido por: hexosamina y ácido siálico, debido a su migración electroforética es una α -globulina, su grupo terminal amino libre es alanina.

Una de las cuestiones más difíciles en la química de la protrombina es su relación con los factores VII, IX y X, debido a que éstos últimos tienen propiedades muy similares, particularmente las relacionadas a su purificación ya que todos son adsorbidos en compuestos inorgánicos insolubles como sulfato de bario o hidróxido de amonio.

Existe una relación fisiológica, en que los cuatro factores decrecen en su concentración tanto en el hombre como en los animales con deficiencia de vitamina K o tratados con antagonistas de ésta, lo que indica que posiblemente estos factores son derivados de la protrombina más bien que entidades distintas, se le considera el precursor de la trombina, es una molécula pequeña, es una enzima proteolítica que ataca al fibrinógeno, fibrina, aminoácidos, amidas, ésteres, péptidos y otras proteínas; contiene 2% de carbohidrato y es inhibida por la diisopropil fluorofosfato (DFP) (8, 33)

Tromboplastina, Factor Tisular (Factor III).- Se encuentra en muchos tejidos, especialmente en pulmón, cerebro y placenta, los complejos lipoproteicos y el factor de activación tisular están compuestos por fosfolípidos, proteínas y colesterol, cuando es calentado disminuye su actividad, debido a la desnaturalización de las proteínas, sin embargo las preparaciones calentadas retienen su actividad en función de fosfolípidos en reacciones que requieren de este factor.

Los extractos de fosfolípidos del factor tisular son una mezcla de esfingomielina, fosfatidil colina, fosfatidil etanola

mina demostrando ser éste último muy eficiente en el sistema - de la coagulación, fosfatidil inositol y fosfatidil serina.

Los extractos de tejidos frescos o deshidratados con acetona aceleran la coagulación del plasma recalcificado por dos mecanismos:

1.- Aceleración relativamente menor, causada por la presencia de fosfolípidos o fosfoproteínas en los extractos ejemplo: en los eritrocitos y plaquetas, estos compuestos están involucrados en la reacción entre los factores IXa, VIII y calcio, y entre los factores Xa, V y calcio.

2.- Aceleración mayor cuando reacciona con el factor IV y el calcio (33)

Ión calcio (Factor IV).- Interviene en forma preponderante en varias etapas del proceso de la coagulación, la sangre - de los vasos no coagula si se le añaden sustancias descalcificantes que se combinan eliminando el ión calcio de la solución.

Factor V.- Existen evidencias que indican que es sintetizado en el hígado, debido a que pacientes con daño hepático presentan niveles disminuidos del factor, es destruido por la fibrinólisis y se ha observado su presencia en preparados de plaquetas persistiendo después de varias lavadas, lo que indica - que es adsorbido en la plaquetas más bien que sintetizado en ellas. Es un componente muy inestable, su peso molecular se ha estimado de más o menos 200 000 por medio de filtración en gel, el análisis de aminoácidos justifica solamente el 73% de su peso seco cuando es purificado y la naturaleza del resto de la molécula es desconocida, requiere la presencia de metales para su estabilidad, es atacado por la trombina resultando un incremento en la reactividad y disminución en su peso molecular, - un exceso de trombina destruye su actividad, la papaína en bajas concentraciones la incrementa y en elevadas concentraciones la destruye (6,7,33)

Factor VII.- Es un procoagulante y se purificó de suero,

plasma humano y bovino por técnicas de cromatografía y adsorción, es una glucoproteína contiene poco más del 50% de carbohidrato, su peso molecular en suero es de 48 000 y en plasmas es de 63 000 migra electroforéticamente hacia β -globulina o en la región alfa, su concentración en suero es de 8 á 10 μ g/ml es activa durante la coagulación espontánea o en la inducida por el factor tisular o la trombina y por la exposición al vidrio u otras superficies (8,33)

Factor VIII.- El hígado, bazo, sistema retículo endotelial y riñón sugieren un sitio posible de síntesis del factor pero no ha sido firmemente establecido, se ha extraído con amortiguador de citrato, sus valores se incrementan variablemente en personas normales después de la aplicación de una inyección de epinefrina lo cual no ocurre después de la esplenectomía, manifestando que el bazo no es el sitio primario de síntesis ya que no conduce a la hemofilia. Experimentos recientes de trasplantes sostienen la evidencia en favor de que el hígado es el sitio de mayor síntesis también se demostró por medio de estudios preliminares que el factor aparece en pequeñas cantidades en cultivos de leucocitos y linfocitos, la administración de células hepáticas a pacientes con hemofilia A causa incremento significativo en los niveles del factor después de dos a tres meses, en experimentos de perfusión con extractos de riñón se observó que contiene material con actividad de factor VIII pero difiere del plasmático en su estabilidad por medio de la adición de cloruro de manganeso y requiere condiciones especiales para su ensayo.

Es un factor muy inestable se obtiene por técnicas de precipitación, electroforesis y cromatografía su contenido de proteína es muy pequeño, su peso molecular es de 200 000 a mayor de 2 millones parece ser una glucoproteína o lipoproteína pero la diferencia no se ha establecido, en electroforesis en gel de almidón migra hacia α_2 -globulina y en papel hacia β -glo--

bulina, es convertido a la forma más reactiva por la adición — de una pequeña cantidad de trombina (6,22,33)

Factor IX.— Se ha obtenido parcialmente puro de material humano y bovino por adsorción y cromatografía en columna, es una glucoproteína y su migración electroforética es hacia α 6- β -globulina, su peso molecular es de 56 000 á 110 000, es más activo en suero que en plasma(33)

Factor X.— Se ha purificado del suero humano, es una glucoproteína de peso molecular de 50 000 á 100 000, migra electroforéticamente hacia α -globulina o en el área de albúmina prealbúmina, es estable y se ha activado por exposición prolongada a soluciones concentradas de citrato de sodio y sulfato de amonio. El factor Xa es una enzima con actividad esterolítica, activa al zimotripsinógeno, siendo ésto muy importante en la coagulación (7,33)

Factor XI.— Se ha reportado que los niveles de éste disminuyen en pacientes con daño hepático, lo que manifiesta que puede ser producido por el hígado, no hay supresión por el tratamiento con antagonistas de la vitamina K, también se ha encontrado aparentemente unido a las plaquetas, pero no hay evidencia de que sea sintetizado en ellas ni en los megacariocitos, requiere del factor IX para su estabilidad, por lo que no se ha podido purificar, es parcialmente adsorbido por sustancias como el vidrio, celita etc. El factor XIa probablemente tiene actividad esterasa, pero no ha sido comprobado(33)

Factor XII.— Su origen no se ha confirmado pero decrecen sus niveles en enfermos con daño hepático, su peso molecular — estimado por ultrafiltración es de 20 000, mientras que por filtración en gel es de 100 000, lo que sugiere la existencia de subunidades en la molécula, es una sialoglucoproteína, su movilidad electroforética es hacia β 6 γ -globulina, es activado — por exposición al vidrio, tierra de diatomeas etc. o sustancias como la homocisteína, colágena o ácidos grasos. El factor — XIIa tiene actividad enzimática en la coagulación sanguínea y

los inhibidores DFP la favorecen, este factor manifiesta estar involucrado en la liberación de sustancias del plasma, incrementa la permeabilidad capilar y calma la contracción muscular, por lo que puede tener función enzimática en la activación del mecanismo fibrinolítico (8,33)

Factor XIII.- Es purificado de pulmón humano y plasma bovino por procesos como precipitación diferencial y cromatografía en columna, se ha encontrado en cantidades significativas en plaquetas por lo que puede ser sintetizado por los megacariocitos, sus niveles decrecen en pacientes con daño hepático, lo que indica que puede tener su origen en el hígado, su peso molecular es de 350 000 y puede estar dissociado en subunidades de peso alrededor de 110 000, los grupos sulfhidrilos son esenciales para su actividad, la cisteína estabiliza la enzima purificada. El factor XIIIa es una transaminasa que cataliza la formación de uniones entre $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{-lisina}$ y las ramificadas adyacentes del monómero de fibrina (33)

Plaquetas, su composición, bioquímica y función.

Las plaquetas humanas están constituidas por componentes celulares comunes, excepto DNA, son fragmentos heterogéneos de citoplasma de megacariocito, tienen un rango mayor de 5 y menor de $12\ \mu^3$ por volumen, contienen glucógeno, aminoácidos, proteínas, adenina y otros nucleótidos, ortofosfato y lípidos. La heterogeneidad de volumen y composición es probablemente debido a la edad plaquetaria (33)

Carbohidratos.- Representan el 1.9% del peso húmedo de la plaqueta y 8.4% del peso seco. No se ha encontrado glucosa libre en el lavado de plaquetas, contienen compuestos de poli y heterosacáridos, la hexosamina está distribuida en el 75% de glucoproteína y el 25% de mucopolisacárido, la glucosamina es el componente más abundante de la hexosamina y glucoproteína, mientras la galactosamina proporciona el 96% de aminoazúcar de mucopolisacárido, probablemente también estén presentes el ácido

hialurónico, el condroitín-4-sulfato y algo de polisacárido sulfatado.

La enzima nitrocatecol sulfatasa (aril sulfatasa) tiene gran significado en el metabolismo de los mucopolisacáridos, se ha encontrado en las plaquetas. Su ácido siálico contiene predominantemente ácido N-acetil murámico, el tratamiento de plaquetas intactas libera el 60% del total de ácido siálico y se ha sugerido que no todo es atacado por la acción enzimática o bien no todo está presente en la superficie de la plaqueta.

Proteínas.- Representan el 12% del peso húmedo y el 52% del peso seco, un 15% del total está compuesto por contráctil - ATP-asa, trombostenina que es similar (en muchos aspectos) a la actomiocina del músculo, el 13% es fibrinógeno, el 25% del cual se ha aislado de la fracción granular mientras que el residuo es extracelular.

La albúmina plaquetaria constituye el 2% de toda la proteína parece ser intracelular, el factor XIII de la coagulación está también presente intracelularmente conteniendo del 30 al 50% del total de este factor (33,34)

Otras proteínas asociadas con frecuencia a la membrana plaquetaria, pero no están presentes intracelularmente y no son eliminadas por el lavado son: IgG, IgM, plasminógeno y los factores V, VIII y XI.

Se conoce como factor 1 plaquetario al factor V del que ya se mencionaron sus características anteriormente.

El factor 2 o factor activador del fibrinógeno es una proteína que acelera el catalizador de trombina en la reacción de fibrinógeno-fibrina, también actúa como enzima proteolítica específica, transformando al fibrinógeno a un sustrato más sensible para el ataque de la trombina, tiene efectos inhibitorios sobre la antitrombina III del plasma en la reacción trombina - inducida en la conversión de fibrinógeno-fibrina.

El factor 3 plaquetario parece ser un componente lipoproteico de la membrana que hace disponible a las enzimas coagu-

lantes y cofactores del plasma para favorecer la adhesión, la agregación y el trombo plaquetario, el componente activo está en una parte del fosfolípido, acelera la coagulación del plasma en la vía intrínseca, probablemente porque actúa como catalizador de superficie, este componente es liberado durante la agregación plaquetaria está constituido de una fracción sedimentable y otra no (33)

El factor 4 plaquetario, o factor antiheparínico es una glucoproteína que es liberada de las plaquetas después de la agregación por ADP (?), trombina o epinefrina, puede ser un potente agente específico en la agregación y en la coagulación sanguínea in vitro.

El contenido de aminoácidos se ha analizado y comparado con el de los aminoácidos del plasma, encontrándose en concentraciones apreciables: ácido glutámico, ácido aspártico, serina y glicina, la taurina es la que se encuentra en mayor proporción y en cantidades pequeñas se encontraron: cistina, histidina y metionina (33,34)

Los lípidos representan el 2.98% del peso húmedo y el 14% del peso seco, el fosfolípido proporciona el 76% del total de lípidos, el 20% corresponde a lípidos neutrales y el 4% a lipoproteínas, el total de fosfolípido está constituido principalmente de fosfatidil colina (lecitina), fosfatidil etanolamina y esfingomielina, y pequeñas cantidades de fosfatidil serina, fosfatidil inositol, lisilecitina, ácido fosfatídico y cardiolipina también están presentes el lípido neutro está constituido de 85% de colesterol libre y pequeñas cantidades de tri, di y monoglicérido, ácidos libres y ésteres de colesterol(33)

Contienen nucleótidos con bases púricas de adenina, -- guanina e hipoxantina y bases pirimídicas de uracilo y citosina, encontrándose los primeros en concentraciones similares a las encontradas en el músculo esquelético y otros tejidos reportándose ATP, ADP, AMP-cíclico y adenil ciclasa, las plaquetas no son capaces de sintetizar nucleótidos de purinas de --

precursores tales como glicina, pero utilizan bases de purina y nucleósidos para sintetizarlos también pueden sintetizar - NAD a partir de ácido nicotínico.

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es una sustancia vasoconstrictora, que está presente en las plaquetas pero ausente en el plasma y como resultado de la coagulación o de la agregación se libera del 20 al 25% de esta sustancia, las plaquetas la adquieren de células que la secretan y es concentrada por un mecanismo activo que requiere energía, su contenido normal es de 59.3 $\mu\text{g/g}$ del peso húmedo las plaquetas contienen enzimas capaces de metabolizarla.

Las membranas plaquetarias son derivadas de vesículas endoplásmicas, posiblemente del retículo endoplásmico o de megacariocitos esta constituida de dos capas externas; una gruesa y otra delgada formadas de proteínas, y una bicapa interior de lípidos hay evidencia histoquímica de la presencia de proteínas y mucopolisacáridos (posiblemente condroitín sulfato) en la superficie de la membrana, su carga es negativa con un punto isoelectrónico de 3.88 cuando están intactas y normales.

Las preparaciones de membranas plaquetarias contienen proteína, lípido neutro, fosfolípido y colesterol, el fosfolípido representa el 78% del total de la membrana lipídica, el resto corresponde al lípido neutro representando el 90% del colesterol, las membranas aisladas tienen actividad acetil-colina-esterasa. Los glúcidos identificados son: glucosa, galactosa, manosa, hexosaminas, ácido siálico y fucosa (33,34)

Las plaquetas realizan una importante función hemostática, ya que forman tapones en la pared venosa y proveen de constituyentes esenciales como fosfolípidos para la coagulación, la formación de tapones puede observarse a través del microscopio de luz colocando una pequeña vena de un tejido translúcido que puede ser del mesenterio, durante los primeros segundos una cuantas plaquetas se adhieren al borde de la lesión,-

se deja transcurrir el tiempo y las plaquetas siguen adhiriéndose alrededor como si estuvieran ancladas (33)

La degranulación es específicamente abundante alrededor - del tapón y la presencia de eritrocitos y leucocitos es escasa dentro de éste, si hay una región dañada hay formación de coágulo y los filamentos de fibrina forman mallas dentro de él en las cuales quedan atrapados muchos eritrocitos, después de algún tiempo la cantidad de fibrina se hace más evidente las plaquetas sufren cambios degenerativos y se unen más libremente, se forma una masa plaquetaria cuando los vasos sanguíneos sufren un daño en el cual la pared no esta rota, esto no es - propiamente llamado tapón plaquetario hemostático y se ha denominado como cuerpo blanco, cuando el flujo sanguíneo es lento y el daño vascular es suficientemente severo, puede ser desarrollado una mezcla de trombos con el cuerpo blanco y esto - es llamado "cabeza".

La función plaquetaria interviene en los siguientes procesos: Interacción con las paredes venosas, con cualquier otra - plaqueta y su relación en la coagulación sanguínea.

1.- Interacción con las paredes venosas.- Cuando éstas se encuentran afectadas hay contacto con las plaquetas y reaccionan con la colágena alrededor de la pared venosa, las primeras plaquetas se adhieren a la colágena expuesta cuando las venas son cortadas, los grupos amino de esta molécula inician su reacción con las plaquetas aun en ausencia del ión calcio; la adhesión puede realizarse in vitro en presencia de EDTA.

Bajo circunstancias fisiológicas, las plaquetas de la hemorragia inicial entran en contacto con la colágena (adhesión) - las plaquetas posteriores sólo entran en contacto con las plaquetas adheridas (agregación) en ambos casos por la liberación de ADP, durante la primera fase hay una degranulación con pérdida de otros constituyentes plaquetarios siendo este tiempo muy corto y no hay desarrollo de trombina, en los traumas vasculares sin ruptura de la pared pueden dañarse las células endo

teliales con daño en la membrana basal; se adhieren pocas plaquetas que permanecen morfológicamente normales en las células endoteliales lesionadas adheriéndose muchas más en la membrana basal, que llegan a la degranulación y pueden ser el centro de acumulación de otras plaquetas y de fibrina, esta membrana puede estimular la formación de "cuerpos blancos" por contener una proteína similar a la colágena, sin embargo se ha demostrado que las microfibrillas no colágenas son las responsables de la adhesión y agregación plaquetaria cuando se han eliminado - células endoteliales de grandes vasos sanguíneos (33)

La vasodilatación marcada hace que las células endoteliales se separen de las membranas, exponiendo su unión y provocando exhibición de fragmentos de éstas en forma de casquete - que son cubiertos en todo o en parte por plaquetas, probablemente cuando esto ocurre la cuenta plaquetaria es baja, los eritrocitos en circulación quedan en los casquetes que si están en la piel o membranas mucosas forman pequeñas hemorragias llamadas petequias.

2.- Interacción con otras plaquetas.- El ADP es efectivo en bajas concentraciones (1.0 μM) derivado in vivo de fuentes endógenas o de eritrocitos, el estudio de éstos conceptos se ha efectuado por medio de análisis in vitro usando plaquetas - obtenidas de plasma citratado, el calcio ionizado es necesario para la agregación, existiendo suficiente cantidad en el plasma citratado permite que proceda la agregación, para esto se requiere plasma rico en plaquetas que obviamente es un material no fisiológico, la agregación difiere entre las especies de varios mamíferos pero la más estudiada es la conducta de las -- plaquetas humanas solamente in vitro.

Para este estudio se emplea el agregómetro a temperatura de 37°C, determina los cambios en la transmisión de luz en plasma rico en plaquetas después de la adición de un agente agregante, la agregación de las plaquetas en plasma es efectivamen

te reducido y la transmisión de la luz se incrementa o la densidad óptica decrece, si se dispersa el agregado la transmisión de la luz decrece y por lo tanto la densidad óptica aumenta.

Con ADP la agregación puede ser reversible, ocurrir en dos fases o ser irreversible, esto depende de la concentración usada.

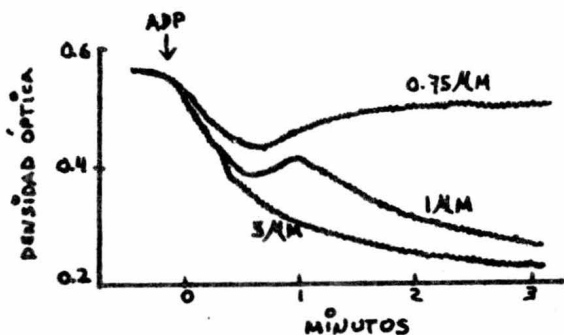


Fig. 5.- Agregación plaquetaria usando diferentes concentraciones en el Agregómetro.

Con bajas concentraciones de ADP ($0.75 \mu\text{M}$) hay agregación reversible con una deflexión inicial descendiente en el registro seguido después se observa un regreso en la densidad óptica, en esta fase sufren cambios las plaquetas adoptan formas de pequeñas espirales y hay formación de pequeños agregados, cuando la concentración de ADP es mayor ($1.0 \mu\text{M}$) se observa una curva bifásica, hay una caída inicial en la densidad óptica después hay un regreso hacia la línea de base, luego se produce un segundo descenso en la densidad óptica lo que indica una completa extensión de la agregación, esto es acompañado por la liberación de ADP endógeno, serotonina radiactiva y factor 4 plaquetario, con una elevada concentración de ADP ($5.0 \mu\text{M}$) la agregación ocurre en un solo paso siendo marcada y prolongada. De las numerosas teorías acerca de la explicación de la agregación plaquetaria por ADP ninguna es ampliamente aceptada y el mecanismo molecular de la liberación de los constituyentes

plaquetarios es desconocido, la agregación ADP-inducida es prevenida por el bloqueo de la glucólisis y la fosforilación oxidativa, pero no por uno solo, también puede ser inhibida por adenosina y compuestos vasodilatadores siendo la prostaglandina E_1 el más potente de éstos.

Las drogas pueden tener efectos tanto in vivo como in vitro, la ingestión de 650 mg de aspirina en una dosis única puede afectar la función plaquetaria durante cinco días, ya que - altera la segunda fase de agregación y la liberación de serotonina inducida por ADP o epinefrina, pero sin embargo si hay una elevada concentración de ADP causa agregación marcada.

Otros agentes de agregación.

En estudios in vitro, un gran número de componentes además del ADP pueden causar agregación y estos agentes se dividen en tres grupos:

I.- Materiales particulares como la colágena, agregados de γ -globulina y complejos Ag-Ac la fibrina no induce la agregación, pero complejos solubles de ésta y mediante digestión - con productos fibrinolíticos o con fibrinógeno, pueden inducirla.

II.- Algunas enzimas proteolíticas como trombina, tripsina y algunos venenos de serpientes.

III.- Algunas aminas biogénicas tales como la serotonina y epinefrina.

Se ha observado que la adición de una suspensión de colágena provoca que la agregación sea irreversible después de un período latente, la trombina puede causar una agregación bifásica la epinefrina en un rango amplio de concentración también la causa, la serotonina provoca agregación reversible.

La trombina mostró tener efectos profundos ya que no solo libera pocas moléculas como ADP, serotonina y potasio, sino también moléculas grandes como β -glucuronidasa y otras proteínas.

Las enzimas mitocondriales y más significativamente las citoplásmicas solubles no se liberan, lo que indica que hay un proceso más específico y complejo que el aumento de permeabilil

dad de la membrana plasmática. La epinefrina en gran concentración libera ADP y serotonina, la segunda fase de agregación y la liberación cuando es inducida por epinefrina o ADP requiere de uno o más factores en adición al fibrinógeno; γ -globulina y el factor Hageman (factor XII) que parece estar también involucrado.

3.- Relación con la coagulación sanguínea.- Varias actividades de las plaquetas contribuyen a la coagulación, ya se han descrito los factores plaquetarios, su función en los coágulos tanto in vivo como in vitro no es enteramente igual.

El factor 3 es necesario pero no suficiente para iniciar la coagulación en el sistema intrínseco, se sugiere también — que la evolución de trombina in vivo puede ser el gatillo en parte, para la liberación de ADP de las plaquetas, la retracción del coágulo es en cierto modo un artefacto, sin embargo — resulta probablemente de la contracción de pseudópodos de las plaquetas, que se unen con la fibrina estando en relación con las proteínas contráctiles presentes en las plaquetas, la trombosostenina es una de ellas requiere ATP y magnesio para funcionar como ATP-asa, la retracción del coágulo ocurre sólo si las fuentes de energía están disponibles y es inhibido por componentes que interfieren con el metabolismo energético (33,34)

Control de las reacciones de la coagulación.

Control del mecanismo fisiológico.

Flujo sanguíneo.- El movimiento de la sangre en las venas puede servir para la fragmentación y distribución de pequeños-coágulos de fibrina formados y para diluir algunas concentraciones locales de procoagulantes, esto puede involucrar todos los factores de la coagulación, pero posiblemente tenga mínima influencia sobre el complejo factor tisular-factor VII, de marca da actividad coagulante y si el factor tisular es expuesto "in situ" ejemplo en el endotelio, puede permanecer aún después de reaccionar con el factor VII y proporcionar una actividad coa-

gulante continua, El factor Xa puede estar unido a este complejo y aumentar su efecto local.

El efecto de estasis en la coagulación intravascular se ha estudiado mediante la formación de trombos después de inyectar suero, para la formación de trombos es necesario que se induzca un estado temporal de hipercoagulabilidad por medio de la inyección intravenosa de suero, y que el flujo de sangre esté detenido en un segmento de vena durante este período.

El daño de la pared vascular no es esencial para que ocurra la coagulación, pero esto puede ser un factor determinante en otras circunstancias.

Mecanismo de la coagulación.

La coagulación sanguínea ha sido considerada por algunos investigadores como un proceso enzimático y ha sido denominada como cascada o catarata, cada uno de los factores circulantes de la coagulación son considerados como proenzimas los cuales son convertidos a enzimas durante el proceso, excepto para el fibrinógeno que es convertido finalmente a fibrina insoluble. La función de cada enzima formada es activar la proenzima siguiente en la secuencia de la coagulación, de este modo la proenzima A es convertida a enzima A, la cual cataliza la conversión de proenzima B a enzima B, así subsecuentemente hasta la formación del coágulo de fibrina. La cascada fue desarrollada para el llamado Sistema Intrínseco, que es el acontecimiento de la coagulación como resultado de la interacción de sustancias presentes en la circulación (6,7,33)

La validación de este concepto requiere de la demostración de que los factores activados convierten a otros factores a la forma enzimática activa, pero sus experimentaciones pueden ser difíciles, dado que en una determinación las dos proteínas se encuentran en la mezcla de reacción, actuando una como enzima y la otra como sustrato, esto puede ser realizado estudiando la

cinética de la reacción bajo condiciones controladas cuidadosamente, involucrando el estudio de la proporción inicial de la reacción, debido a que ésta es directamente proporcional a la concentración de la enzima por lo tanto al hacer el diagrama se obtiene una línea recta. La conversión de la razón de la proporción inicial varía con la concentración del sustrato, de tal manera que el diagrama obtenido tiene la configuración de hipérbola.

La diferenciación de las funciones de los componentes puede ser realizada por medio de la variación de la concentración de los reactivos mediante un rango apropiado. Otro mecanismo empleado para la diferenciación de la enzima y el sustrato es la relación en el rendimiento del producto la cual está determinada por la concentración del sustrato, en un determinado tiempo en que el rendimiento del producto es independiente a la concentración de la enzima, lo cual ha sido demostrado que después de una reacción se ha perdido la adición complementaria de más sustrato, ya que puede incrementar el producto, sin embargo la adición de la enzima no tiene efecto.

El sistema intrínseco.

La coagulación en este sistema empieza con la activación del factor XII por la exposición a una superficie de contacto, aunque éste factor es esencial para la coagulación normal in vitro, su función in vivo es incierta, ya que se ha observado que en individuos con deficiencia congénita de este factor no presentan desórdenes hemorrágicos, in vivo puede ser activado por sustancias como la colágena o ácidos grasos; in vitro puede ser activado por sustancias como el caolín, celita, vidrio, etc (1, 3, 33)

La actividad del factor XII es causada por la adsorción de un inhibidor por el vidrio, pero trabajos recientes han indicado que esto es causado por una alteración del factor, o tal vez por la adsorción de la protefna en la superficie, exponien

do sus grupos hidrófobos, siendo el centro activo de la enzima, el calcio no es indispensable para su activación (7,33)

El factor XIIa funciona como enzima en la activación del factor XI, no necesita calcio y la reacción se efectúa en la superficie, el consumo de este último factor durante la coagulación es mínimo y la reacción es completa si el plasma se expone a una superficie grande, es consumido en proporción a la cantidad del factor XIa formado, y puede ser activado por cadenas de ácidos grasos grandes.

La naturaleza del producto de la reacción de los factores XIIa y XI es desconocida, sin embargo tiene actividad enzimática capaz de activar al factor IX; otra alternativa del factor XI es que, considerándolo como cofactor o acelerador en la reacción involucra a los factores XIIa como enzima y al IX como sustrato para formar el IXa, se requiere la presencia de calcio y la reacción es inhibida por altas concentraciones de heparina.

En el esquema de cascada se observa, actuando los factores XIIa como enzima y el IX como sustrato, el producto se considera como factor IXa y tiene potente actividad coagulante, la cual no es inhibida por el DFP o por el inhibidor de tripsina, el suero contiene mayor actividad del factor IX que el plasma, probablemente por algo del factor IXa presente; éste último participa en la reacción que involucra al factor VIII, fosfolípido y calcio, reacción que es acelerada por restos de trombina. Los resultados de Earlier, indican que ésta reacción da como producto el factor VIIIa, el fosfolípido es cedido por las plaquetas en sangre completa, en donde la membrana lipídica es la que tiene más participación en la coagulación (Fig. 6)

El Sistema Extrínseco.

Este término se refiere a la secuencia de las reacciones de la coagulación debidas a la adición de extractos tisulares y calcio al plasma, el único paso en éste sistema es la reac--

ción del factor tisular (factor III) con el factor VII, y la incubación de éstos con calcio revela una marcada actividad coagulante del complejo así formado, que actúa enzimáticamente con el calcio como cofactor y convierte el factor X a factor Xa. (Fig. 6)

El DFP inhibe la actividad coagulante del complejo, un punto que aparece diferente entre el sistema extrínseco e intrínseco, es que el último requiere de la adición de fosfolípido, esta diferencia puede ser relativa, ya que se ha observado que el factor tisular está constituido de fosfolípidos, proteínas y colesterol, siendo el fosfolípido un complejo lipoproteico capaz de inducir la formación de protrombinasa, de esta manera la función de los dos sistemas es idéntico después de la activación del factor X, excepto por el origen del fosfolípido. La función del sistema extrínseco en la coagulación in vivo es incierta, pero es importante porque provee un mecanismo para la rápida producción de pequeñas cantidades de trombina, la cual puede convertir a los factores V y VIII más rápidamente a la forma activa y acrecentar la agregación plaquetaria (7,33)

El factor tisular parece estar relacionado al sitio de la lesión, posiblemente se localiza en la íntima de las venas, y puede reactivarse rápidamente junto con el factor VII al plasma, siendo aumentada por el factor XIIa, que aparece en la conversión del factor VII a la forma más reactiva (33)

Sistema común.

El producto de la reacción que involucra los factores IXa y VIII, actúa como enzima que cataliza la activación del factor X con calcio como cofactor, durante la coagulación normal se consume muy poco de factor X, pero si se adiciona factor VIII al plasma hay mayor formación de factor XIa y, el factor X es consumido, lo que sugiere que éste es suprimido en el suero debido a su insuficiente activación, que puede ser a causa de

la marcada inestabilidad del factor VII o a la activación del factor X.

El factor Xa es formado tanto en la coagulación extrínseca como en la intrínseca, es el empiezo del paso final de la coagulación y es también producto de la acción del veneno de víbora de Russell en el factor X, su función es que puede catalizar la conversión de protrombina a trombina sin ningún componente adicional en la mezcla de reacción.

Se ha observado que la combinación de fosfolípido, factor V y calcio, incrementa la actividad del factor Xa, y es capaz de efectuar la conversión de protrombina en una razón más rápida.

La incubación del factor V con pequeñas cantidades de -- trombina, convierte al factor en una pequeña molécula con mayor actividad es consumido durante la coagulación normal y, -- está ausente en el suero.

La conversión de protrombina a trombina involucra una serie de cambios en el peso molecular, aparición de nuevos grupos terminales amino libres, y la ruptura proteolítica de la molécula de protrombina.

La trombina es una enzima proteolítica que ataca al fibrinógeno y lo convierte en monómero de fibrina por la hidrólisis de cuatro uniones peptídicas por mol, desprendiendo dos moles de cada fibrinopéptido A y B todo el fibrinógeno es convertido a fibrina en el plasma, éste puede ser atacado en ausencia de calcio, pero su presencia acelera la reacción.

La heparina inhibe la actividad proteolítica de la trombina, y es incrementada por el cofactor heparina del plasma (anti trombina III). La trombina tiene otras funciones importantes - tales como, la activación del factor XIII, la agregación plaquetaria y liberación de constituyentes plaquetarios.

Después de que se ha formado el monómero de fibrina sigue una polimerización del tipo unión-hidrógeno para la formación del coágulo de fibrina, cuando éste es formado después de la purificación de fibrinógeno y trombina es mecánicamente inesta

ble y soluble en soluciones concentradas de urea, mientras que el formado en el plasma normal es mecánicamente estable e insoluble en soluciones concentradas de urea, esta diferencia se debe a la acción del factor XIIIa, que es una enzima formada por la acción de la trombina sobre el factor XIII con calcio como cofactor, es una transaminasa cataliza la formación de uniones peptídicas entre grupos glutamina y lisina, en moléculas adyacentes del monómero de fibrina en el coágulo, esto no sucede en el suero, esta reacción es el paso final de la coagulación, produciéndose un coágulo efectivo hemostáticamente por la estabilización de fibrina (1,3,33)

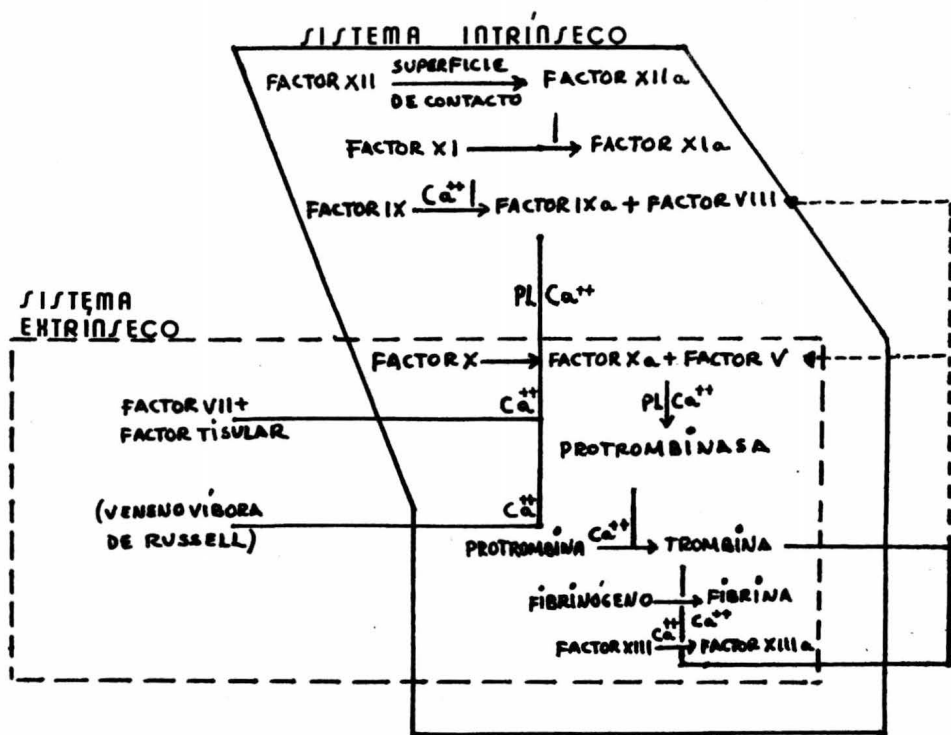


Fig.6.-Esquema del mecanismo de la coagulación sanguínea.

Las reacciones encerradas por la línea sólida, son las que ocurren cuando la sangre es expuesta a una superficie extraña: es el Sistema Intrínseco. Las reacciones encerradas por la línea punteada, son aquellas que suceden en el plasma, cuando es adicionado el factor tisular y el calcio: es el Sistema Extrínseco. El veneno de víbora de Russell se incluye en el área del Sistema Extrínseco, pero está entre paréntesis, debido a que no se ha definido como parte de este Sistema.

PL indica la presencia de fosfolípido y, Ca⁺⁺ indica la presencia de calcio (33)

Agentes Anticoagulantes.— Son aquellos que impiden o retardan la coagulación sanguínea, hay dos o más sistemas de clasificación atendiendo a su interacción fuera o dentro del organismo, y de acuerdo a la etapa de coagulación en que actúan o sobre que sustancia de esa etapa.

1) Anticoagulantes que actúan in vitro, es decir una vez obtenida la sangre: son esencialmente sustancias descalcificantes que eliminan el ión calcio de la sangre (7)

2) Anticoagulantes que actúan in vivo, cuando se administran al organismo: drogas hipoprotrombinémicas que provocan un descenso del nivel de protrombina en el plasma, lo cual se ha obtenido por la determinación del "tiempo de protrombina".

3) Anticoagulantes físicos que actúan in vitro.

4) Anticoagulantes que actúan tanto in vivo como in vitro.

Dentro del primer grupo, se encuentran los siguientes anticoagulantes que son también llamados agentes descalcificantes.

Descalcificantes precipitantes.— Se encuentran los oxalatos siendo los más empleados los de litio, sodio y potasio, — remueven los iones calcio de la sangre y precipitan como sales insolubles de calcio.

El oxalato de potasio ($K_2 C_2 O_4 \cdot H_2O$) es el más comúnmente empleado se usa de 1 a 2 mg/ ml de sangre, en los procedimientos rutinarios se emplea 0.01 ml de una solución acuosa al 20% por ml de sangre.

El oxalato cuando es empleado como sal, debe estar perfectamente seco, lo cual puede hacerse directamente en los tubos colectores de sangre reduciendo así la producción de hemólisis, la temperatura de secado no debe exceder de $100^{\circ}C$ para evitar que el oxalato se descomponga y se forme carbonato, acción que recibe el nombre de crepitación, el secado es actualmente innecesario puesto que el error de dilución es de 1%, y hay menor tendencia de hemólisis con la solución que con la sal seca, este peligro se aumenta con el incremento de la con-

centración de oxalato y es casi inevitable a concentraciones mayores de 3mg/ml, dan resultados eficaces el empleo de tubos-colectores conteniendo una mezcla de oxalatos como sigue: Oxalato de litio (12 mg), de sodio (14 mg), de amonio (4 mg), de potasio (6 mg) y fluoruro de sodio (17.5 mg) (1,2,9)

El problema más frecuente del empleo de este tipo de anticoagulantes es que alteran las concentraciones de los componentes del plasma.

El hematocrito usando oxalato de potasio es de 8%-13% menor que el obtenido con heparina, esta disminución es debida a un cambio en la concentración de agua en los eritrocitos. Obviamente los cambios son incrementados cuando se aumenta la concentración del anticoagulante, siendo este efecto inversamente proporcional al peso molecular, a parte de los cambios de agua es posible que haya otras alteraciones en la permeabilidad eritrocítica, la cual puede explicarse debido a los efectos variables del oxalato y otras sales anticoagulantes.

Oxalato de sodio.- Se usa en una solución de 0.1 M, la --cual es preparada disolviendo 1.34 mg de oxalato de sodio grado reactivo analítico en 100 ml de agua. Se emplea para pruebas de coagulación en una proporción de 1 parte de oxalato por 9 partes de sangre total, esta solución no es isotónica, el --oxalato se combina con el calcio y se forma oxalato de calcio-insoluble, este anticoagulante tiende a incrementar la labilidad de los procoagulantes.

Oxalato de litio.- Es muy empleado y, su acción es superior a la de otros oxalatos, se emplea para la determinación de iones potasio debido a que hace aparente su presencia rápidamente ya que también tiene la propiedad de ser aclarante, el inconveniente que presenta, es que produce turbidez en la determinación de ácido úrico por cualquiera de los métodos de fosfotungstato (1,3,9)

Heller y Paul introdujeron, en 1934, el uso de una mezcla balanceada de oxalatos, usando oxalato de amonio seco 1.2gr --

y oxalato de potasio seco 0.8 gr en 100 ml de agua destilada-- neutra, se pipetea 0.5 ml de la solución a tubos de ensayo--- previamente limpios y secos, se tapan con algodón y se dejan evaporar en un esterilizador de aire caliente hasta sequedad,-- la cantidad de oxalato sirve para 5 ml de sangre.

La mezcla no afecta significativamente el volumen corpuscular y se puede emplear para la determinación de hemoglobina, hematocrito, tiempo de sedimentación y recuento de células también se puede utilizar para frotos de sangre pero es limitado-- a los 5 primeros minutos debido a que produce crenación de las células rojas, vacuolización en el citoplasma de los granulo--citos, fagocitosis de los cristales de oxalato, formación de -- artefactos en el núcleo de los linfocitos, monocitos y otras -- deformaciones que aparecen rápidamente. La sangre que contiene esta mezcla de anticoagulantes no se emplea para el análisis -- de determinación de nitrógeno no proteico, nitrógeno de urea -- por el método de ureasa y determinación de potasio (1,11,12)

El empleo de sangre oxalatada se utiliza para la determi-- nación de:

Cantidad de hemoglobina; recuento de hematíes; índice de-- color (valor globular); recuento de plaquetas; índices de volu-- men, saturación e icterico; reacción de Van den Bergh; recuen-- to de leucocitos; frotos para recuento diferencial (fórmula -- leucocitaria); reacción de peroxidasas; prueba de resistencia-- osmótica; velocidad de sedimentación; determinación de glucosa etc. (9,13)

Anticoagulantes descalcificantes desionizantes.-- En esta-- clasificación se encuentran los fluoruros y los citratos que-- forman con el calcio sales insolubles impidiendo así que actúe en el proceso de la coagulación.

Fluoruro de sodio.-- Generalmente se usa como conservativo para determinaciones de glucosa en sangre, pero actúa también-- como anticoagulante débil; cuando se emplea como conservador --

junto con un anticoagulante como oxalato de potasio es eficaz en una concentración de 2 mg/ ml de sangre, ejerce su acción por inhibir el sistema de enzimas que intervienen en la glucólisis, cuando se usa como anticoagulante la concentración debe ser mucho mayor por ejemplo: de 6 á 10 mg/ ml de sangre, pero puede producir un cambio significativo en la concentración de agua y por lo tanto hay presencia de hemólisis.

El fluoruro de sodio no es empleado cuando se determinan enzimas ni cuando se utilizan éstas en el análisis ejemplo: -- determinación de urea por el método de ureasa (2,12)

Citrato de sodio.- Se utiliza para la determinación del tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina y otras pruebas de la hemostasia, mantiene relativamente estable el -- factor V en la sangre, se utiliza en solución al 3.8% agregando a cada tubo 0.5 ml del anticoagulante que se mezclan suavemente con 4.5 ml de sangre. Cuando el plasma citratado es recalcificado los componentes de la mezcla se aclaran, el punto final es la formación de una película uniforme de fibrina en la solución aclarada.

El citrato de sodio puede ser metabolizado por el organismo y es empíricamente mejor protector de los procoagulantes lábiles que el oxalato, los que no son facilmente adsorbidos del plasma citratado.

El uso de este anticoagulante es el más difundido en Medicina Clínica, para efectuar transfusiones de plasma que son -- importantes en tres circunstancias principales:

1) Cuando el volumen sanguíneo disminuye bruscamente como ocurre en las hemorragias, la movilización de las proteínas por el cuerpo requiere tiempo y en tal situación, las transfusiones de plasma (o de sangre) son de gran valor por suministrar la proteína en forma inmediata.

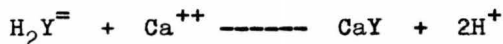
2) La transfusión es útil en la deficiencia proteica crónica generalizada por ejemplo: en la producida por incapaci--

dientes a los hidrógenos de los grupos carboxilos se pueden -- sumar dos electrones de cada nitrógeno, por lo que la molécula posee seis ligandos covalentes para unirse al ión metálico, es por lo tanto un agente quelatígeno exadentado.

En la práctica no se emplea directamente el ácido en la - preparación de soluciones debido a su baja solubilidad, la sal tetrasódica tampoco es apropiada en virtud de tener una gran - tendencia a hidrolizarse, de lo que resultan soluciones de al- calinidad elevada que pueden interferir en algunas determina- ciones, comunmente se emplea la sal disódica con dos moléculas de agua de cristalización.

Su fórmula empírica es: $H_{14}C_{10}O_8N_2Na_2 \cdot 2H_2O$

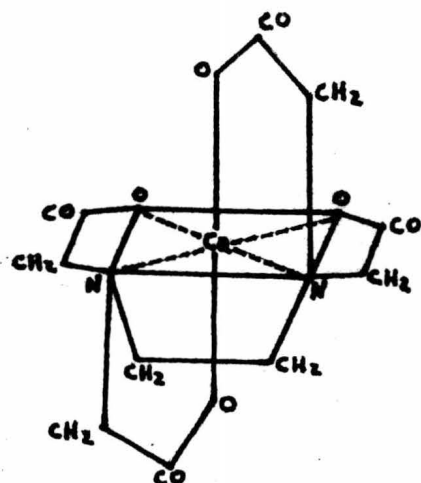
$Na_2H_2Y \cdot 2H_2O$ este anión es denominado por la forma $H_2Y^{=}$ en solución a un pH cerca de 10 y cuando reacciona con el ión- calcio se tiene:



La sal de EDTA potásica es conocida comercialmente con el nombre de solución Sequestreno (28)

El EDTA se usa en una concentración de 1 á 2 mg/ ml de -- sangre, es empleada para el estudio de análisis morfológicos - porque previene la formación de artificios; además, su estabi- lidad es constante y prolongada, su empleo para la preparación de frotos es muy aceptada ya que se puede preparar después de- 2 ó 3 horas y las células continúan sin alteración después de- 12 horas.

El EDTA puede emplearse para realizar los mismos análisis que se llevan a cabo con el uso de oxalato, también se emplea- para análisis de conteo de plaquetas y función plaquetaria ya- que previene su aglutinación (2,16)



Fórmula del EDTA cálcico.

Dentro del segundo grupo se encuentran los anticoagulantes que generalmente actúan in vivo; su acción es contra algún o algunos de los factores de la coagulación, se clasifican en:

Antitrombínicos (actúan contra la trombina).

Antiprotrombínicos (actúan contra la protrombina).

Estas dos clasificaciones son específicas; la que se hace como inhibidores es más general, ya que actúan contra uno o varios factores, no determinándose específicamente contra cual.

Anticoagulantes antitrombínicos.-Dentro de este grupo se encuentran: la heparina, las cumarinas, las indandionas etc.

Heparina.- Su descubrimiento no se debió a la investigación en busca de anticoagulantes, sino que fue un subproducto de estudios cuyo objeto era descubrir nuevos procoagulantes (8)

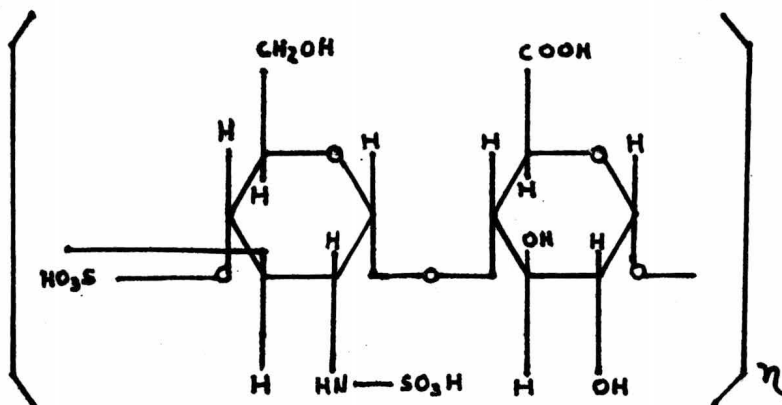
La heparina es un mucopolisacárido compuesto de D-glucosamina y ácido D-glucurónico con grupos de ésteres de ácido sulfúrico, una característica de esta molécula es su potente car--

ga electronegativa, se ha aislado de hígado y pulmón de algunos animales, y se ha observado que no coagula la sangre tanto in vivo como in vitro, debido a que interfiere en la transformación de la protrombina en trombina (antitrombínico) para -- ello es necesario la presencia de un cofactor (albúmina X₁) -- del plasma.

Se ha establecido que el sitio de formación de la hepari na en el organismo animal, es principalmente en las células -- cebadas (mastocitos) del tejido conectivo, especialmente en hí gado y pulmón; las granulaciones que presentan estas células -- son de heparina como lo demuestra la reacción metacromática -- purpúrea que se efectúa con azul de toluidina.

Se considera que normalmente existe cierta concentración de heparina en la sangre, algunos investigadores la consideran como el anticoagulante que es el responsable de mantener la -- fluidez de la sangre en el sistema vascular intacto (6,7,22).

Estructura química de la heparina.



Las dos hexosas están en cantidades equimoleculares y se

alternan en la cadena del polisacárido, el peso molecular en - varios preparados y fracciones varía de 6 000 á 20 000, tiene- analogías estructurales con la amilasa y después de la desulfa- tación y reducción puede hidrolizarse con la beta-amilasa, se- distingue de otros mucopolisacáridos en que posee grupos sulfu- ro en enlaces amínicos, un tipo de ligadura rara en la natura- leza, su contenido de ácido sulfúrico es muy alto lo que hace que esta molécula sea el ácido orgánico más fuerte del organis- mo. Los polisacáridos sulfatados con propiedades anticoagulan- tes (heparinoides) se sintetizaron con objeto de producir un - sustituto barato de la heparina, su actividad depende del gra- do de esterificación con ácido sulfúrico.

Los extractos de heparina obtenidos de diferentes anima- les y de diferentes órganos varían en potencia, de manera que- las preparaciones finales deben ser estandarizadas biológica- mente, estas pruebas se basan en la comparación entre la acti- vidad de los preparados con el patrón de referencia U.S.P., en relación con la capacidad para prevenir la coagulación de una- mezcla de plasmas citratados de ovejas, a la que se le ha agre- gado calcio. La farmacopea de los Estados Unidos, especifica - que las preparaciones de heparina sódica deben contener no me- nos de 110 unidades U.S.P. por miligramo, pero al mismo tiempo permite a los fabricantes un 10% de error. Una unidad represen- ta la actividad presente en aproximadamente 0.01 mg de heparina.

Los grupos fuertemente ácidos de la heparina reaccionan - con ciertos compuestos básicos, por ejemplo: la protrombina, - azul de toluidina, bencidina, hexadimetrina y la quinina que - destruyen así la actividad anticoagulante (6,7,12)

Los trabajos publicados indican que la heparina inhibe en orden de eficiencia creciente; la trombina, la tromboplastina, el factor V, la generación de tromboplastina, los factores IX- y XII, también la propiedad de reducir el grado de adhesividad de las plaquetas, lo que tiene particular interés en relación a su uso, debido a que ésta propiedad se ve aumentada en perío-

dos puerperales y en enfermedad de Buerger (5, 6 , 22)

Heparina e hiperlipemia: Hahn, en 1943, fue el primero en señalar que la turbiedad del plasma lipémico posprandial podía "aclarse" inyectando heparina, pero no añadiéndolo al plasma-lipémico in vitro. Anderson y Fawcett, en 1950, demostraron - que el plasma lipémico no heparinizado se depuraba in vitro - añadiéndole plasma de un individuo heparinizado, lo que probaba la presencia en la sangre de un factor depurador producido por la heparina, se ha demostrado que es una lipasa que hidroliza los triglicéridos de los quilomicrones y libera los ácidos grasos, pasando éstos últimos con rapidez a los tejidos, este factor se ha denominado lipasa proteica, se encuentra en casi todos los órganos salvo hígado y cerebro, se la supone situada en la pared vascular o cerca de ella, porque, después de la inyección intraarterial de heparina, puede demostrarse su actividad en sangre venosa a los pocos segundos que tarda en pasar por el lecho capilar, aparece también en linfa y es inactivada en el hígado del hombre y de los animales (6,7,23)

No se conoce el papel fisiológico que tiene la lipasa lipoproteica cuando falta la heparina exógena, su localización - en la pared de los capilares o junto a ella, sugiere que tiene un papel en el transporte de los ácidos grasos libres por las paredes vasculares, aunque se carecen de pruebas concluyentes.

Propiedades Farmacológicas.- Sus principales acciones se limitan casi por completo a la sangre, incluso grandes dosis - intravenosas de heparina, no tienen otros efectos más que en la coagulación y en el metabolismo de los lípidos sanguíneos.

El primer efecto de la heparina y el de mayor importancia clínica, es su habilidad para interferir la conversión de protrombina en trombina por la acción de la tromboplastina, a esto se le ha denominado acción antiprotrombínica o acción antitromboplastínica de la heparina la cual fue descrita por Howell y confirmado después por Brinkhaus, quien ha sugerido que actúa antagonizando la tromboplastina manifestándose cuando -

hay plasma presente (5,6,8)

El efecto inhibitor de la heparina sobre la trombina requiere la acción de una alfa-globulina plasmática, conocida como cofactor de la heparina, posiblemente idéntico a la antitrombina plasmática normal, aunque se ha señalado cierta separación entre las dos actividades, basadas en diferencias de estabilidad.

Acciones diversas.- Su administración no altera la velocidad de sedimentación de los eritrocitos, pero su empleo in vitro, produce cifras distintas de las obtenidas con oxalato o citrato los estudios químicos de la sangre no son alterados por la heparina, aunque deben efectuarse cuentas leucocitarias dentro de las dos primeras horas ya que hay tendencia de los leucocitos a desaparecer de la sangre, no es utilizado para efectuar pruebas en las que intervienen el complemento o isoaglutininas, tampoco se emplea para pruebas de fragilidad debido a que inhibe la hemólisis, sin embargo se usa para la determinación de hematocrito, pH, pCO_2 y pO_2 debido a que no causa alteración. De ordinario se usa aproximadamente 20 unidades de heparina por ml de sangre es empleado a menudo en solución, algunos inconvenientes de su empleo es su alto costo, su acción transitoria y el hecho que dá fondo azul a un frote de sangre teñido con Wright (5,6,20)

Anticoagulantes Cumarínicos.- Prolongan el tiempo de protrombina, mediante la supresión de su formación y de los factores VII, IX y X por el hígado, requiriendo la presencia de la vitamina K, debido a la similitud de su estructura con la de los compuestos cumarínicos han sugerido que estos últimos actúan como antimetabolitos bloqueando la utilización de la vitamina K por el hígado, y son denominados "hipoprotrombinémicos" o "antitrombínicos".

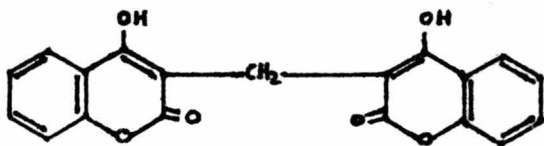
Vía de administración y excreción.- Los compuestos son bien absorbidos después de su administración oral, difiriendo en el tiempo necesario para producir hipoprotrombinemia y en el que los factores de la coagulación retornen a su actividad normal, en base a la determinación del tiempo de protrombina una vez -

suspendida la droga, aunque con dosis suficientemente altas - la síntesis hepática de los factores vitamina K-dependientes, - resultaría probablemente disminuida casi inmediatamente después de absorbida la droga, se requiere determinado tiempo antes de que caigan los niveles de los factores como resultado del consumo normal para que haya rápida acción, las dosis iniciales de estas drogas deben ser más altas que las dosis subsecuentes, estos anticoagulantes no aparecen como tales en cantidades importantes en la orina, pero sí se excretan productos metabólicos no identificados de ellos (5,8,20)

Los derivados principales de la cumarina son:

Bishidroxicumarina (Dicumarol). - Fue la primera droga estudiada, posee ciertos inconvenientes (absorción irregular, -- larga duración de acción que impide su control adecuado)

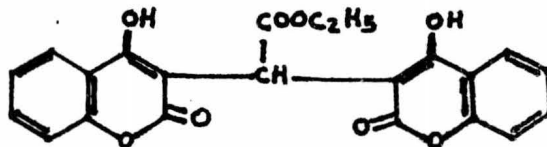
Su fórmula es:



Bishidroxicumarina-(Dicumarol) 3,3-metilen-bis-(4-hidroxicumarina).

Biscumacetato de etilo (tromexán). - Se diferencia del anterior porque este compuesto tiene acetato de etilo a nivel del puente metileno del anterior; ambas drogas poseen dos grupos - derivados de la 4-hidroxicumarina.

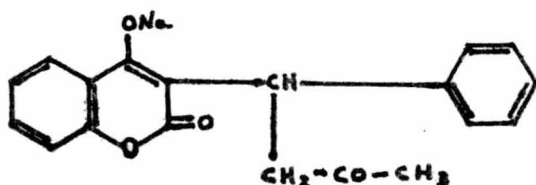
Su fórmula es:



Tromexán 3,3-carboximetileno-bis-(4-hidroxicumarina)etil eter.

Warfarín sódico (Cumarín sódico).- Tiene un solo grupo - de hidroxycumarina, puede ser administrado parenteralmente.

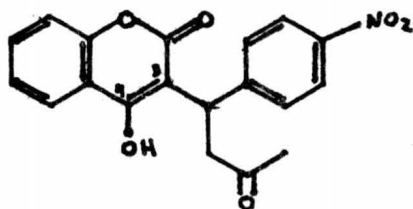
Su fórmula es:



Warfarín sódico 3(acetonil-bencil)-4-hidroxycumarina.

Acenocumarol (Sintrom).- Tiene un solo grupo de hidro-- xicumarina, su sal sódica es muy soluble y estable, puede admi nistrarse por vía intravenosa, se diferencia del anterior por poseer un grupo nitro.

Su fórmula es:



Acenocumarol 3-(acetonil-p-nitro-bencil)-4-hidroxycumarina

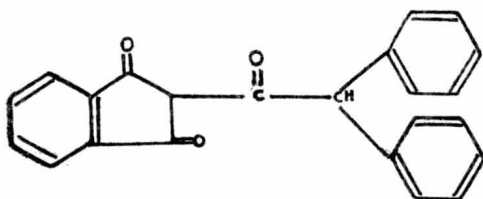
Ciertos compuestos de la indandiona tienen efectos simi- lares a los compuestos cumarínicos, actúan mediante la disminu ción de la formación de proteínas de la coagulación vitamina - K-dependientes, su estructura química está muy relacionada con la de los derivados cumarínicos.

Fenindrona (Daniloné, Hedulín)



2-fenil-1,3-Indandiona.

Difenandiona (Dipaxin).



2-difenilacetil-1,3-Indandiona.

Usos terapéuticos de las drogas anticoagulantes (cumarinas e Indandionas):

1.- En el tratamiento de enfermedades tromboembólicas, - para prevenir el crecimiento de los coágulos y los embolismos-subsecuentes, este tipo de tratamientos también deben ser administrados en las tromboflebitis, las cuales pueden desarrollar se espontáneamente a consecuencia de cirugía, trauma o procesos patológicos como la oclusión coronaria y la insuficiencia-cardíaca congestiva.

2.- Profilácticamente para prevenir las complicaciones - tromboembólicas después de la cirugía, en ciertos casos de traumatismos tales como fracturas, en pacientes con trombosis coronaria aguda.

El uso de estos anticoagulantes depende de muchos factores tales como la edad del paciente, el grado de reposo en cama, la historia de enfermedades tromboembólicas previas y la - ausencia de contraindicaciones específicas (5, 8, 29)

Este tipo de anticoagulantes sólo tienen acción in vivo.

Dentro de la segunda clasificación tenemos los anticoa--gulantes antiprotrombínicos, encontrándose a la heparina como-

representante de éstos, pero este anticoagulante ya se trató - ampliamente .

Dentro del grupo de los anticoagulantes que tienen acción contra algún o algunos de los factores de la coagulación se encuentran los inhibidores, y pertenecen a este grupo: productos-líticos de la fibrina y los adsorbentes.

Productos líticos de la fibrina.- El depósito de fibrina-ya sea intravascular o extravascular frecuentemente ocurre tanto en personas sanas como en enfermas, el mecanismo por medio del cual estos depósitos son disueltos in vivo e involucran la disolución enzimática de polímeros insolubles de fibrina se conoce como fibrinolisis. Esto fue explicado por medio de la observación en la circulación normal del plasma de la actividad de un sistema proteolítico denominado Sistema plasminógeno- plasma, una proenzima denominada plasminógeno (β -globulina) es convertida en plasmina por medio de la acción de activadores -- (o cinasas) liberadas de fuentes de tejidos.

La plasmina es una enzima que es activa a un pH neutral, y es capaz de digerir la fibrina en un número de fragmentos solubles.

Componentes del Sistema enzimático fibrinolítico.

Plasminógeno. -Abunda en el plasma en una concentración - de 10 á 20 mg/ ml, cuando es convertido en plasmina posee una - actividad de 2.5 ± 1.0 unidades de caseína / ml de plasma.

Se encuentra también presente en pequeñas cantidades, en fluidos y secreciones más o menos de todo el cuerpo. La relación

de éste con el fibrinógeno es de gran consideración, ya que el plasminógeno tiene tendencia a coprecipitar, siempre que la fibrina disminuye, cantidades significativas de éste son incorporadas en tales depósitos.

En estudios básicos de inmunofluorescencia se ha sugerido que el plasminógeno es sintetizado en los eosinófilos del hueso y es transportado a la circulación y tejidos cuando es necesario, muchos investigadores han sugerido que el hígado es el lugar de mayor producción y mantenimiento de este componente.

Se ha efectuado el aislamiento, purificación y caracterización del plasminógeno humano mediante técnicas de extracción, cromatografía y fraccionamiento, se ha observado que es una proteína monomérica con peso molecular de 89 000.

Plasmina.- Tiene mucha semejanza con la tripsina, es una endopeptidasa susceptible de hidrolizar las cadenas de arginina y lisina de las proteínas a un pH neutro, también actúa con algunas proteínas y sustratos sintéticos los cuales son susceptibles a la acción de la tripsina, la plasmina digiere al fibrinógeno en una cantidad similar a la acción de la fibrina, también hidroliza varias proteínas que se encuentran en estado natural particularmente los factores V y VIII de la coagulación, pero incluye componentes del suero, ACTH, gran hormona y glucagon entre otras.

La activación del plasminógeno a plasmina ocurre enzimáticamente y cuando es catalizada por urocinasa, implica la simple apertura de la cadena arginina-valina en la molécula de plasminógeno, manteniéndose unidas estas dos cadenas por un puente de disulfuro. Algunos estudios sugieren que la plasmina tiene el mismo peso molecular que el plasminógeno, pero como resultado de la apertura de la cadena, la molécula se vuelve más compacta.

Activadores del plasminógeno.- Ya que éste es un constituyente normal en el plasma, se ha dado mucha atención a los ac-



QUIMIO

Activadores biológicos que ocurren naturalmente del plasminógeno los cuales son enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar arginina y/o uniones de lisina, son específicas para la activación de plasminógeno, tienen pocos efectos demostrables en otras proteínas, pueden encontrarse en pequeñas cantidades en todos los fluidos del cuerpo (el nivel de activador en plasma asciende bruscamente con la actividad fibrinolítica aumentada en la sangre), en la orina el activador es llamado urocinasa, en los tejidos es probable que los activadores se encuentren en los gránulos lisosomales y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, encontrándose en éstas últimas en forma soluble y difusible, estando listo para ser liberado a la circulación en respuesta al estímulo vasoactivo, mientras que en los gránulos lisosomales es difícil de extraerse.

La urocinasa, por su potencial como agente trombolítico, ha sido estudiada y se ha podido cristalizar, es una cadena polipeptídica de peso molecular de 53 000, tienen un centro enzimático activo capaz de hidrolizar uniones de lisina y arginina.

Proactivador.- Hay poca evidencia de la existencia de éste en el plasma como una entidad distinta y separada, su presencia tiene gran relación en el sistema "intrínseco", para la aparición de un activador además del liberado por los tejidos. Se ha usado para explicar la activación del plasminógeno la estreptoquinasa bacteriana (S-K), siendo el proactivador del plasminógeno y/o la plasmina, la cual reacciona con la enzima antes mencionada en una relación 1:1 molar para formar el complejo SK-plasmina, siendo un potente activador del plasminógeno humano y animal.

Se ha observado que el factor Hageman genera actividad fibrinolítica incrementada, lo que indica una fuente endógena del activador del plasma, esto se ha observado durante la incubación de un precipitado de euglobulina bajo condiciones no fisiológicas, pero no ha sido aclarado (6,33)

Inhibidores.- El plasma contiene grandes cantidades de actividad antiplasminica, suficiente para inactivar 10 veces -

toda la plasmina existente en el plasma, su actividad es de dos tipos -acción inmediata y lenta- y probablemente reside al menos en dos componentes de α -globulina o separados en α_1 -globulina (inhibidor de rápida acción), muy parecida al α_1 -antitripsina y una α_2 -macroglobulina (inhibidor de acción lenta).

Las plaquetas también contienen actividad antiplasminica, su acción parece ser solo inmediata, similar al inhibidor de rápida acción del plasma.

Mecanismo fisiológico de la fibrinólisis.

Puesto que la acción de la plasmina sobre fibrina produce fibrinólisis, inicialmente se aceptó que la regulación de los niveles de plasmina era un mecanismo utilizado por el organismo para el control y regulación de la fibrinólisis, la actividad fibrinolítica era medida en los fluidos circulantes (lisis del coágulo de sangre completa y de euglobulina) y era equivalente a la actividad de plasmina. Las condiciones bioquímicas efectuadas para esta explicación no son muy claras, sin embargo se encontraban en el plasma grandes cantidades de inhibidor, pero la actividad de la enzima in vitro, no tienen selectividad para la fibrina, e hidroliza fibrinógeno y otras proteínas susceptibles del plasma, esto significa que el organismo utiliza un mecanismo muy complejo para la lisis de los depósitos de fibrina, durante estudio fisiológico (ejemplo: ejercicio intenso) y estados farmacológicos (ejemplo: administración intravenosa de ácido nicotínico) hay incremento notable de la actividad fibrinolítica aparentemente, durante estados hiperplasminémicos ocurre una extensiva proteólisis en el plasma y se presentan defectos graves en la coagulación, frecuentemente asociado con una diátesis hemorrágica catastrófica, esto fue aclarado cuando el factor responsable de la actividad fibrinolítica fue identificado como activador del plasminógeno.

Mecanismo de disolución de trombos in vivo.

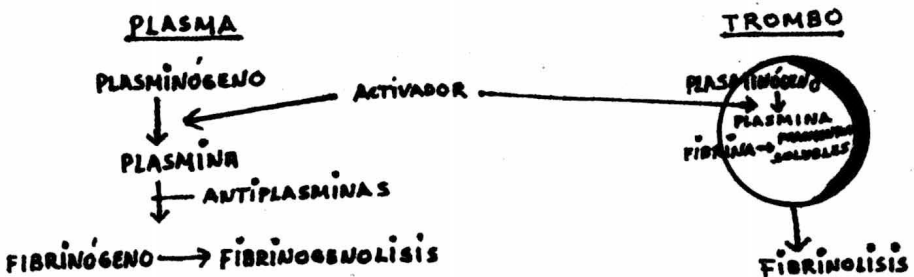
La observación de que la actividad fibrinolítica es medida en el plasma, reflejó que éste contenía activador de plasmi-

nógeno, y es depositado en pequeñas cantidades en trombos, o bien en el coágulo de fibrina cuando es formado, la activación del plasminógeno en los intersticios del coágulo es el mecanismo más sensible para su disolución.

Se han efectuado trabajos in vivo de este sistema, donde se emplean cantidades adecuadas de los factores con actividad moderada, que es rápidamente reprimida por los inhibidores de plasmina y los activadores de plasminógeno en el plasma, sin embargo en trombos, se aumenta su actividad y se prolonga consecutivamente bajo condiciones diferentes: la plasmina es activada en relación con la fibrina siendo un sustrato viable, la reacción aparece siendo inicialmente pequeña lo cual es independiente de los inhibidores circulantes en los fluidos del cuerpo.

Se ha observado que existe un sistema de dos fases, siendo la primera en gel donde hay depósitos de fibrina y trombina y la segunda es una fase soluble (plasminógeno-plasmina) que es útil como reserva móvil para el depósitosin fibrina con plasminógeno (5,8,29)

El efecto de los activadores en las dos fases y en consecuencia de la activación de plasminógeno en los dos sitios es desigual.



Activación del plasminógeno en el plasma y en un trombo.

El mecanismo por el cual el activador entra al trombo -- preformado o al depósito de fibrina más rápidamente que la antiplasmina u otros inhibidores, ha sido aclarada por Wolf, que provee evidencias que sugieren las diferencias en relación de que la difusión puede ser la responsable.

La presencia en el plasma de grandes cantidades de activador, particularmente cuando la concentración es sostenida la activación rápida del plasminógeno sobreviene con la producción de hiperplasminemia, con actividad proteolítica excesiva y degradación extensa de fibrinógeno.

El activador de plasminógeno juega un papel clave en la medición de fibrinolisis y su concentración regula el fenómeno fibrinolítico en el organismo, bajo circunstancias fisiológicas y por medio de un estímulo activador apropiado es rápidamente liberado en la circulación, y actúa en la disolución del coágulo pero involucra una incrementada proteólisis en el -- plasma.

Otros factores que influyen en la fibrinolisis in vivo -- son: la edad de la fibrina, ya que se ha demostrado que después de 5 á 7 días, in situ, la coagulación experimental en animales le quita la resistencia a la lisis por medio de agentes -- trombolíticos, una consideración a este concepto es la reacción de estabilización de fibrina, en la cual la trombina-activada y el factor XIII (factor fibrinoestabilizador) catalizan una -- transaminación entre los polímeros de fibrina, uniéndose juntamente producen una fuerte estructura integral para el coágulo, pero es más resistente a la lisis, también los factores hormonales, nutricionales etc. pueden ser una fuente de influencia en el fenómeno fibrinolítico.

Anticoagulantes Adsorbentes. -- Este tipo de anticoagulantes se emplea relativamente, ya que ayuda a detectar la deficiencia de algún o algunos factores de la coagulación.

El sulfato de bario es comunmente usado, pero no es muy efectivo como adsorbente cuando se emplea citrato como anticoa

gulante, la adsorción elimina esencialmente toda la protrombina, los factores VII, IX y X así como apreciables cantidades del factor XI, de este modo el plasma adsorbido es una fuente de los factores I, V, VIII, XI y XII.

En el suero adsorbido con sulfato de bario, se encuentran todos los factores excepto la protrombina, el factor XI que es parcialmente adsorbido, de tal modo que una mezcla de suero y plasma adsorbido provee todos los factores de la coagulación excepto la protrombina (25,33)

Entre los factores esenciales para el sistema "intrínseco" se halla el factor antihemofílico (AHF), es consumido durante la coagulación por lo tanto solo se encuentra en el plasma, no es adsorbido por compuestos inorgánicos precipitantes.

El principio de la mezcla de reactivos tiene aplicación en las pruebas de generación de tromboplastina, debido a que el plasma contiene los factores antes mencionados el cual es mezclado con suero normal, plaquetas o un sustituto plaquetario y calcio, de este modo la mezcla contiene todos los factores del sistema "intrínseco" excepto protrombina, el factor VII esta presente pero no participa en el sistema mencionado, similarmente el fibrinógeno no participa en el primer paso de esta prueba siendo el producto final la protrombinasa (tromboplastina plasmática) la cual puede ser ensayada por su habilidad en la coagulación normal del plasma. Si una anomalía es detectada en esta prueba, los reactivos normales pueden ser sustituidos por aquellos derivados del paciente en un orden determinado en el cual se observe la deficiencia de determinado factor (12)

Procesos físicos o mecánicos. (desfibrinación).- Se lleva a cabo en un Erlenmeyer, utilizando perlas de vidrio o un tubo cerrado con un agitador central de vidrio que lleve pegado varillitas o tubos capilares, el extremo superior del agitador se sujeta a nivel del cuello del matrás con un tapón perforado o con algodón, la sangre se pone en éste inmediatamente después de extraída, el matrás se sujeta por el cuello y se hace girar

describiendo ochos durante 5 á 10 minutos, al cabo de los cuales toda la fibrina se habrá pegado a las perlas o al extremo "erizado" del agitador, se obtiene una buena cantidad de suero, se conserva la morfología de los glóbulos rojos y blancos, la sangre así obtenida es muy empleada para varios análisis en -- el laboratorio (12)

CAPITULO V.

TECNICAS DIVERSAS PARA LA DESPROTEINIZACION. SUS FUNDAMENTOS. CUANDO?, PORQUE?, Y PARA QUE?, SE USA CADA UNO DE LOS SISTEMAS.

La preparación de filtrados libres de proteínas es de importancia particular para los análisis químicos clínicos.

Numerosos métodos analíticos para la determinación de varios de los componentes de la sangre, orina y el líquido cefalorraquídeo, necesitan un tratamiento preliminar de la muestra para obtenerlo libre de proteínas, esto es para prevenir el enturbiamiento y la formación de precipitados o la interferencia directa en algunas de las reacciones de color.

Cualquiera de estas consecuencias puede provocar errores en la determinación clínica. El término "filtrado libre de proteínas" es relativo, ya que todas las proteínas frecuentemente no se eliminan dejando residuos de éstas en concentración de 1 a 5 mg/dl. (1, 4, 31)

Las proteínas plasmáticas.

La sangre es un sistema bifásico formado por una suspensión de eritrocitos en una solución acuosa coloidal, al pH sanguíneo, los eritrocitos están cargados negativamente (su pI es de 6.6 a 6.78) pudiendo ser descargados, aglutinándose por los iones H^+ y OH^- , las sales neutras no eliminan a los eritrocitos de sus cargas, en éstos se encuentra la hemoglobina en solución coloidal como partículas esferoidales de unas 50 Å.

En la fase plasmática el 90% es agua, en la que se encuentran proteínas en forma coloidal.

Para aislar las proteínas del plasma se precipitan de él, no pudiendo considerarse las precipitadas como si tuvieran las mismas propiedades que las disueltas en el plasma. (4, 31)

Las proteínas pueden ser precipitadas por medio de procedimientos físicos, químicos y fisicoquímicos.

A continuación se dan en aspectos generales los fundamentos

que se tienen para cada sistema.

Las proteínas contienen cargas positivas y negativas y la eficiencia del proceso de precipitación depende del pH final de la solución, en soluciones de ácidos fuertes son cargadas positivamente, en la misma forma son cargadas negativamente en soluciones alcalinas fuertes.

Existe una atracción de moléculas del solvente para las proteínas, la cual es máxima en el punto isoelectrico encontrándose en forma de ión anfotérico con carga electrostática cero, a este pH la mayoría de las proteínas están libres y fácilmente precipitables.

Fuera del punto isoelectrico, las moléculas adquieren una carga neta positiva o negativa, que aumenta la solubilidad, el pH sin embargo debe ser controlado con mucho cuidado en cada procedimiento en el cual participe la precipitación de proteínas (1,4,34)

Procedimientos físicos.— Son varios procesos como: la ultrafiltración, la adsorción en compuestos tales como el caolín; ultracentrifugación; microdifusión; la desnaturalización por medio del calor; la diálisis de muestras bajo condiciones controladas de temperatura, tipo de membrana, agitación y renovación de los componentes difundidos; y la cromatografía que tienen gran aplicación debido a su potencialidad ya que en pequeñas columnas con o sin presión, permiten una buena separación de las proteínas.

Procedimientos químicos.— La precipitación química de proteínas seguida de filtración o centrifugación, generalmente resulta de la deshidratación de las proteínas y/o la formación de sales insolubles.

Procedimientos fisicoquímicos.— Algunos de los métodos fisicoquímicos para la separación de las proteínas del suero, considerando entre las propiedades físicas: el índice de refracción, los sólidos totales; la densidad específica; la absorción de las proteínas por luz ultravioleta.

Ultrafiltración.

pág. 105 y ver
que técnica y 86
continúa por sección
Lizant.

Este método consiste en la filtración a través de una -- membrana semipermeable es el principio de la diálisis, la pre sión diferencial positiva o negativa debe aplicarse en forma - de permeabilidad baja de la membrana y separa a los componentes de alto o bajo peso molecular en el fluido fisiológico, el sol vente y los componentes de bajo peso molecular pasan a través- de la membrana, los de alto peso molecular se quedan en ella - dependiendo también de la medida de la porosidad de la membra- na, recientemente el tamaño de la membrana selectiva se ha for mulado en configuración de cono, para su fabricación se utili- zan materiales poliméricos insertados siendo capaces de rete- ner moléculas con un peso de 20 000 o mayores.

Farese y Mager han analizado los filtrados obtenidos por técnicas convencionales para glucosa, N de urea, creatinina y ácido úrico sus datos muestran pocas diferencias entre los - dos métodos, la técnica de ultrafiltración también se ha em--- pleado para la determinación de calcio difusible y unido a pro teínas, y para la separación de carbohidratos por medio de un- agente filtrante delgado.

La simplicidad del principio de ultrafiltración ha sido- de gran aplicación para la ciencia química clínica, también -- presenta varias desventajas sobre la desproteinización por pre cipitación de proteínas:

- (a) No hay técnicas precipitantes específicas para los procedi- mientos individuales necesarios.
- (b) No hay cambio significativo en la concentración de los so- lutos del suero.
- (c) Las membranas están inertes, así que no se le debe adicio- nar iones a la muestra.
- (d) No hay coprecipitación de los componentes ultrafiltrables.
- (e) Se emplea un pequeño volumen de muestra, es útil en análi- sis pediátricos (3,31,34)

Precipitación por adición de solventes miscibles.

Las proteínas pueden precipitarse de una solución acuosa por medio de un aumento de solventes orgánicos miscibles en a-

gua como metanol, etanol, acetona y éter etílico debido a sus solubilidades las precipitan de una solución polar mucho más alta, parece que existen dos factores que toman parte en este fenómeno:

1.- Las moléculas de solventes no acuosos forman hidratos, que compiten con las proteínas por moléculas de agua, si ésta es satisfactoria las proteínas se deshidratan y por lo tanto precipitan.

2.- La constante dieléctrica de las soluciones acuosas disminuye por aumento de solventes miscibles y no acuosos, debido a que las fuerzas de atracción y repulsión electrostática entre las moléculas solubles es inversamente proporcional a la constante dieléctrica, la fuerza de repulsión entre las moléculas de proteínas cargadas decae, mientras menos polaridad haya en el solvente hay mayor precipitación pero hay riesgo de que se desnaturalicen las proteínas, pero en este caso esto no es importante ya que el objeto es la obtención de una solución libre de proteínas.

Técnica de separación por medio de sales.

Al adicionar sales neutras disminuye la atracción de las moléculas proteicas entre sí, lo que aumenta su solubilidad se le llama "salting in" y a la adición de sales que compiten con moléculas proteicas por las de agua que están dentro de la proteína (poder oncótico) y las extren dejándolas deshidratadas para provocar su precipitación, se llama "salting out" (3)

Las sales que contienen aniones polivalentes son muy eficaces como agentes precipitantes, las más usadas son: sulfato de sodio, en concentración variable o en mezcla de sulfatos y sulfitos; sulfato de amonio; sales de magnesio; fosfatos, y citratos. En esencia la hidratación de la sal se suma progresivamente a los movimientos de las moléculas de agua para que la proteína se deshidrate dando como resultado la disminución de la solubilidad, por este procedimiento tienden a redisolverse cuando la concentración de sal ha disminuido por la adición de un disolvente acuoso apropiado; la concentración de sal que se

requiere para la precipitación, depende de la proteína particular y su pH, en pocas excepciones la solubilidad mínima ocurre en el punto isoeléctrico (1,31)

Precipitación dependiente de la formación de sales insolubles.

Es el más comunmente usado puede llevarse a cabo por la adición (a) Precipitantes aniónicos tales como ácido tungstico, ácido tricloroacético, ácido perclórico ó (b) Precipitantes catiónicos tales como: Zn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} y Pb^{2+} . Estos métodos se llevan a cabo de la siguiente manera: los precipitantes ácidos forman sales insolubles de proteínas con la forma catiónica de dichas moléculas, se necesita que el pH esté por debajo del punto isoeléctrico de la proteína; la combinación de los metales pesados con la forma aniónica forman proteínatos insolubles, el pH de la solución debe estar por arriba del punto isoeléctrico de la proteína, implicando que la sal se une a ésta a través de grupos aminos cargados positivamente, en el caso de precipitantes aniónicos y a través de grupos carboxílicos cargados negativamente en el caso de metales pesados.

Los metales pesados son precipitantes, pero nó como resultado de una combinación con grupos carboxilos cargados negativamente, se demostró que los iones de cobre, zinc, cadmio y plomo mezclados con albúmina bovina se unen a través de grupos imidazol de los residuos de histidina de las moléculas proteicas y solo debilmente con los grupos carboxilos.

Sin considerar a los precipitantes y al mecanismo que siguen hay dos variables críticas para llevar a cabo la máxima precipitación:

- 1.- El pH de la mezcla de reacción.
- 2.- Concentración del precipitante.

Debe haber suficiente reactivo para combinarse con las proteínas presentes, generalmente se usa un exceso de éste, si se desea obtener los precipitantes de las proteínas de la solución se hace por medio de acidificación en el caso de metales-proteínatos y por medio de una mezcla alcalina en el caso de sales de proteínas (3,31)

Precipitantes aniónicos.

Entre los ácidos precipitantes que se están empleando en química clínica están: pícrico-molibdico, fosfotúngstico, sulfosalicílico, túngstico, tricloroacético, metafosfórico y perclórico.

Acido túngstico.- Este precipitante fue introducido por Folin-Wu en 1919, un volumen de sangre se mezcla con 7 volúmenes de agua, un volumen de tungstato de sodio al 10% ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y uno de H_2SO_4 2/3N dando una dilución de 1:10 de la muestra, la mezcla se mueve y se deja reposar hasta que cambie a un color chocolate (aproximadamente de 15 á 30 min.) posteriormente se filtra o se centrifuga, además del cambio de color hay una conversión significativa de la hemoglobina a metahemoglobina, la completa precipitación se indica por medio de la ausencia de espuma y la presencia de un sonido como pequeños estallidos cuando la mezcla se mueve, cualquier error al conseguir el color chocolate puede ser remediado aumentando el 10 % de ácido sulfúrico, de gota en gota y moviendo vigorosamente después de cada adición hasta completar el cambio, esta técnica es probablemente la más vieja de desproteinización de la sangre, que actualmente se usa, fue originalmente usada para determinar glucosa y nitrógeno no proteico en la sangre.

Procedimiento para suero o plasma.- Estos contienen menos material proteico que interfiera a diferencia de la sangre completa, por lo tanto se necesita más o menos la mitad de los reactivos.

se usa un volumen de suero o plasma más 8 volúmenes de agua, 0.5 volúmenes de tungstato de sodio y 0.5 de ácido sulfúrico se mezcla bien y se deja reposar unos 10 min. después se procede a filtrar o centrifugar (12,13,31)

El procedimiento para líquido cefaloraquídeo o para otros fluidos del cuerpo como orina que contengan solamente pequeñas cantidades de proteínas se usarán las proporciones siguientes:

No

1 volumen de muestra más 8.5 volúmenes de agua, 0.25 volúmenes de tungstato de sodio y 0.25 vol de solución de H_2SO_4 en algunos de los procedimientos para los filtros de Folin-Wu pueden ser usadas diferentes cantidades de agua para obtener una dilución de 1:10.

➔ Haden modificó el método de Folin-Wu invirtiendo el orden de adición de los reactivos, él adicionó primero el ácido y después el tungstato de sodio, la principal ventaja de esta modificación es que (se usa casi universalmente hoy en día) la reacción es prácticamente inmediata y no hay necesidad de una filtración tardada, también se obtiene un volumen mayor de filtrado.

Haden modificó también la concentración del H_2SO_4 , emplea 8 volúmenes al 1/12 N de éste más un volumen de tungstato de sodio al 10% eliminando con esto una adición, la combinación de agua, tungstato de sodio y ácido da un agente de ácido túngstico el cual es estable durante dos semanas solamente, y requiere un período de espera para que el precipitado llegue a un color chocdate.

Se han propuesto modificaciones en las cuales la solución de ácido túngstico se amortigue y de esta manera no precipite el ácido y se estabilice el reactivo. (2, 3, 11)

Abrahamson propone las siguientes adiciones:

Preparación del reactivo adicionando 11.11 g de tungstato de sodio y 5g de citrato de sodio en cerca de 700 ml de agua, -- disolver 13.6g de $NaHSO_4$ ó 15.6 g de $NaHSO_4 \cdot H_2O$ en cerca de -- 200 ml de agua, se hace una mezcla con las dos soluciones y se afora a 1 litro con agua, se deja reposar por una semana y se filtra si se torna de consistencia arenosa se puede añadir 2g de ácido benzoico por litro de reactivo, pero los filtrados obtenidos de esta manera contienen ácido benzoico, no pueden ser utilizados para la determinación de urea por el método de la -- ureasa, debido a que el ácido inhibe la enzima. (3, 9)

H_3PO_4

Caraway recomienda el uso de ácido ortofosfórico en lugar de citrato de sodio como amortiguador, aumentando la estabilidad del reactivo por cerca de cuatro meses.

Goldenberg desarrolló un reactivo de ácido tungstico que es estable por cerca de dos años a temperatura ambiente, dió las siguientes instrucciones:

Disolver 1.0g de alcohol polivinílico (Elvanol 70 05 Dupont) en 100 ml de agua manteniendo una temperatura suave, ya frío se pasa a un matraz volumétrico de 1 litro que contenga 11.1g de tungstato de sodio, teniéndolo previamente disuelto en 100 ml de agua, por separado se mezcla en un vaso 2.1 ml de ácido sulfúrico concentrado con 300 ml de agua; se mezcla con la solución anterior y se diluye a 1 litro con agua.

El H_2SO_4 $2/3$ N se prepara pesando 35g de ácido A.R.+0.1g y se diluye a 1 litro con agua destilada en un matraz volumétrico, posteriormente se titula la solución.

Las instrucciones primarias dadas por Folin-Wu incluyen varias pruebas y la neutralización de álcalis extraños (Na_2CO_3) que se encuentran en productos comercialmente disponibles, en la actualidad las especificaciones para el grado Reactivo Analítico para el tungstato de sodio permiten un máximo de 0.4 ml de ácido 0.1N para neutralizar los alcalinizantes extraños que se presentan en 2g de sal esto es a un pH de 8, dichas sales dan a las soluciones un pH de 9 á 9.5 no es necesario en la práctica neutralizar la pequeña cantidad de Na_2CO_3 que se presenta, la solución de tungstato de sodio es estable indefinidamente, pero específicamente si se guarda en un frasco de paredes de vidrio delgadas se acumula el reactivo en el fondo (1,3)

Si se mezclan cantidades iguales de H_2SO_4 $2/3$ N y tungstato de sodio al 10% se encuentra un exceso de H_2SO_4 , que es debido al ácido tungstico que no se combina con las proteínas causando la obtención de un filtrado ácido, habiendo un error en los trabajos originales de Foli-Wu que hablan de que el --

"filtrado se acerca mucho a la neutralidad", esto no se refería al pH de las determinaciones, sino al hecho de que la acidez titulable debía ser pequeña (10 ml del filtrado requieren 0.2 ml de NaOH para neutralizarse usando fenolftaleína como indicador), el estudio de la precipitación de las proteínas por medio de la adición de ácido túngstico ha llegado a las siguientes conclusiones:

a) El pH promedio de los filtrados de sangre completa y suero es cerca de 4.1 con un rango de 3.2 á 4.7.

b) El mismo pH del filtrado se obtiene si el ácido o el tungstato se adiciona primero.

c) La precipitación máxima de proteínas ocurre solo si el pH del filtrado es de 5.1 o menos, cuando es mucho menor el filtrado es turbio y es demostrado por el efecto Tyndall.

c) El pH de los filtrados aumenta de la misma forma que el contenido de proteínas de la sangre se aumenta, pero la precipitación de éstas es máxima (su concentración en el filtrado es menor de 2 mg/ 100 ml) y los filtrados claros sobre este rango, pueden hacerse clínicamente (por arriba de 27g/ 100 ml).

e) Si el ácido se adiciona primero a la sangre completa y el pH está por debajo de 3, el filtrado puede ser turbio y amarillento y da positiva la prueba de bencidina, probablemente sea debido a la formación de hematina ácida en esos valores bajos de pH, como lo sugiere Haden.

f) Al contrario de lo que ha legado Folin, la presencia de 10 veces la cantidad recomendada usualmente de anticoagulante no tiene efectos significativos en el pH del filtrado.

La principal ventaja de esta precipitación es la obtención de un filtrado claro y cristalino, ciertas modificaciones a estas técnicas se han empleado para la determinación de creatina, creatinina, ácido úrico, cloruros y glucosa (3,31)

→ Acido tricloroacético $\text{CCl}_3\text{-COOH}$ (TCA).

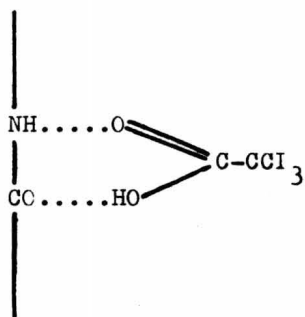
Este reactivo se usó por vez primera en 1915 por Green-wald, en el método original se usó 1 volumen de muestra más 9 volu-
menes de solución al 2.5% de ácido, pero debido a que ocasional-
mente era incompleta la precipitación de proteínas, se sugirió-
más tarde que la concentración del ácido se debería aumentar--
al 5%, dejando reposar la mezcla por 20 min. antes de la filtra-
ción o centrifugación, el pH de los filtrados es cerca de 1.0,-
siendo más voluminoso que el obtenido con el ácido túngstico.

A menudo, el filtrado obtenido de la precipitación con áci-
do tricloroacético no es claro, si el componente que se va a -
determinar puede resistir una temperatura dada, el aclaramiento
se puede obtener por medio de una elevación de ésta, la cual --
debe ser de 90 á 95°C más o menos durante 15 min. antes de la -
filtración, cuando el filtrado hierve en un pH ácido no tiene -
efectos negativos para lograr la conservación de los constitu-
yentes deseados.

El ácido tricloroacético puede descomponerse por tratamien-
to con cloroformo y CO_2 , sin embargo el 70% de éste es elimina-
do por este tratamiento, una alternativa es la extracción del -
ácido con eter, pero se dificulta debido a que el coeficiente -
de reparto es desfavorable.

Al adicionar el ácido tricloroacético a las proteínas, la-
unión ocurre en los grupos terminales de cationes y en los en--
laces peptídicos, la eliminación de agua y su remplazo es por -
medio de un radical de fuerza no polar CH_3-C-C- , destruye la so-
lubilidad de las proteínas en agua y tiende hacerse soluble en-
solventes no polares tales como el cloroformo y el benceno, al-
gunas proteínas no precipitan por medio de la adición de este -
ácido ejem: los albuminoides, peptonas algunos aminoácidos y el
ácido seromucoide (3, 31)

El 4% de las proteínas de la orina que se presenta en pro-
teinuria no se precipitan.



Unión del ácido tricloroacético y la proteína.

Este filtrado se usa para la determinación de fósforo inorgánico y procedimientos que requieren un filtrado ácido.

La solución de ácido tricloroacético es muy estable aún cuando no se mantenga en refrigeración, es preferible diluirlo según se vaya necesitando, es muy corrosivo e higroscópico por lo cual dificulta que se pese exactamente.

Una forma conveniente para preparar la solución concentrada es disolver el contenido de una botella que no haya sido abierta de 1/4 de libra de grado R.A. en 315 ml de agua, esto dará una concentración de la solución al 30% (p/v) (1,3)

Acido perclórico HClO₄.

La desproteínización con el empleo de este ácido se introdujo en 1944 por Neuberg y col., como sustituto del ácido tricloroacético ya que interfiere menos en la reacción.

Se adiciona a un volumen de sangre, suero o plasma; 9 vol. de HClO₄ 1.11M para dar una concentración de 1M, la mezcla se agita y se deja reposar durante 10 min., la filtración debe hacerse a través de un papel de poro muy cerrado, debido a que la parte final de la precipitación que se obtiene esta formado por partículas muy pequeñas.

Para conseguir que la precipitación sea más rápida y completa el reactivo debe enfriarse a temperatura de congelación, el pH del filtrado es cerca de 0.

El exceso de ácido puede removerse del filtrado mediante

la neutralización con KOH, K_2CO_3 , CH_3COOK ó adicionando alcohol, el $KClO_4$ puede removerse de la mezcla mediante filtración.

El seromucoide (mucoproteína), α_2 -glicoproteína 3.5 S, -- haptoglobina, β -globulina (MP_3 de Winzler), las peptonas y - albuminosas no precipitan con el ácido perclórico, pueden aparecer algunas veces, en el filtrado residuos de sero-albúmina (1,3)

Acido metafosfórico.

El empleo de este ácido para la desproteinización sanguínea fue introducida por Horvath en 1816 en Europa y se introdujo en la literatura química clínica en Estados Unidos a través de Folin y Denis en 1916.

El ácido metafosfórico en solución acuosa forma varios --- polímeros de $(HPO_3)_x$.

Los ácidos ortofosfóricos no precipitan proteínas, las soluciones de ácido metafosfórico retienen su actividad, más o menos durante una semana a temperatura de refrigeración.

Casi todos los estudios sobre precipitación de proteínas - han sido incrementadas con el uso de ácido metafosfórico glacial de composición variable, este es comprado en pequeñas píldoras - las cuales estan formadas de una mezcla de HPO_3 y $NaPO_3$, se le adiciona un preservativo, el ácido glacial es actualmente ---- Na_2O -- H_2O -- P_2O_5 y tiene consistencia de vidrio debido a la gran variedad de ramificaciones que enlazan a los fosfatos, aun que en forma glacial la superficie de las bolitas tienen una cobertura blanca (forma orto) y entonces el producto pierde su poder de precipitar las proteínas, la Asociación Química Americana ha establecido para el grado R.A. del ácido metafosfórico - que es de 34.0 á 36.0 % de HPO_3 más 58.0 á 62.0 % de $NaPO_3$, de acuerdo como sigue: se pesan 5g, se disuelven en 100 ml de agua - y se agregan tres gotas de bromocresol (indicador verde), se titula con NaOH 1N hasta que vire de color verde a azul, 1 ml - de NaOH 1N es equivalente a 0.07998 g de HPO_3 , para llegar a la

mayor precisión en el proceso de la titulación depende casi de la completa ausencia de otros fosfatos, para estimar la presencia de orto, piro, meta y polifosfatos en presencia de orto, - se ha hecho titulando y usando fenolftaleína como indicador ya que mediante ésta no dará la concentración del ácido meta, el pK_1 y el pK_2 del H_3PO_4 son de 2.2 y 7.2 respectivamente.

La titulación con bromo cresol como indicador titula los primeros H^+ , y ya que 1 mol de HPO_3 se convierte en 1 mol de H_3PO_4 , si se tuviera suficiente HPO_3 precipitaría las proteínas por sí solo esto sería entonces, que el ácido libre que - esta presente en los productos comerciales es la forma orto - así mismo la sal de sodio es la forma meta, si este es el caso la solución de la mezcla glacial sería todavía PO_3^- por combinación con proteínas.

Un estudio de este método de precipitación ha revelado - que como el pH desciende, la precipitación empieza en un pH de 5.2.

El cálculo para la determinación de precipitación de las proteínas de la sangre y del suero revelan que la cantidad de ácido metafosfórico glacial recomendada es aproximadamente - 0.6g de éste por gramo de proteína presente, para un exceso se usan tres volúmenes de ácido metafosfórico glacial al 5% para un vol. de sangre completa y un vol. de ácido por vol. de suero y plasma, también se le adiciona agua y la mezcla se mueve durante 30 seg. más o menos y se deja reposar durante 15 min. antes de centrifugarla o filtrarla, el pH de los filtrados así obtenidos varía de 2.1 á 2.6 (2,3)

Se ha mostrado que una solución de metafosfato sódico ajustado a un pH de 8 á 9 por adición de Na_2CO_3 ó $NaOH$ es prácticamente estable a temperatura ambiente, el Na_2PO_3 se prepara - mediante calentamiento del $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ en una placa de pla---

tino, a 700°C durante 1 hora, la mezcla se enfría hasta un punto en el cual el reactivo flote y pueda separarse mediante un alambre de platino, para la precipitación de las proteínas se usa una solución equivalente a 0.2g de Na_2PO_3 por gramo de proteína, y se adiciona suficiente ácido ya sea clorhídrico o acético para obtener un pH de 2.5 á 3.0 (3,9)

El ácido metafosfórico no precipita a los aminoácidos y peptonas, solo precipita una pequeña porción de albuminoides, aún con reactivos preparados en ese momento es frecuentemente imposible obtener filtrados o sobrenadantes que presenten el efecto Tyndall, este reactivo debe evitarse lo más posible en los análisis fotométricos (3)

Reactivo de Krautman.

Para la preparación de este reactivo se ponen 23.8g de fosfato de sodio y 50 ml de solución de ácido fosfórico glacial (0.56g/ 100 ml de agua) en un matríz volumétrico de 1 litro, se mezcla y se le adiciona lentamente con agitación 29 ml de ácido sulfúrico concentrado, se enfría a 40°C y entonces se le añade 370 ml de tungstato de sodio al 30% se calienta hasta que se vuelva claro, posteriormente se enfría a temperatura ambiente y se afora a 1 litro con agua, esta solución de acuerdo con Krautman es estable por lo menos durante 5 años si se almacena en una botella color ambar y se tapa con un tapón de hule, el corcho puede reaccionar con el reactivo mientras que el hule nó, la acidez de la solución puede comprobarse o ajustarse mediante la titulación usando como indicador alizarina: 1 ml de reactivo requiere 0.39 á 0.5 ml de NaOH 1.0 N (1,3)

Para usar este reactivo es necesario diluirlo para obtener una solución de 1:10.

La desproteinización se efectúa mezclando un vol. de sangre u otro fluido con 9 vol. de este reactivo, la mezcla se deja reposar durante 5 min. o en el caso de sangre hasta que se convierta en color café, los pH de los filtrados de suero y san

gre completa son de 2.3 y 3.0 más o menos, respectivamente.

El propósito del empleo del pirofosfato de sodio y del ácido metafosfórico es amortiguar el reactivo para que el ácido tungstico no precipite, ciertas dificultades pueden ser encontradas con respecto a dicho reactivo, debe haber suficientes sustancias reductoras en los productos químicos o se puede usar agua para producir en éste un color amarillo que se vaya decolorando con el tiempo.

El reactivo de Krautman es en efecto una modificación del reactivo para ácido úrico de Folin-Denis, el cual es una solución de ácido fosfotungstico que da color azul en presencia de ácido úrico (1, 3)

Precipitantes catiónicos.

Los más frecuentemente usados son: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , $-Cu^{2+}$ y Zn^{2+} , también las combinaciones tales como: $Hg^{2+} - Ba^{2+} - Zn^{2+}$ y $Ba^{2+} - Zn^{2+}$.

Zinc (Zn).

El uso de este metal para la desproteinización de la sangre, se conoció en 1923 por Hagedorn y Jensen, se adiciona una mezcla de $ZnSO_4$ y NaOH a la muestra, para obtener la completa precipitación es necesario calentar la mezcla y este procedimiento puede debilitar algunas sustancias que se van a determinar, Somogyi encontró que si las sales de zinc se aumentaban y se adicionaba a la sangre laqueada, se cambiaba el pH a neutro o ligeramente alcalino y la precipitación es completa aún a temperatura ambiente (1, 3, 9)

→ Filtrado de Somogyi.

a) Un volumen de sangre más 7 volúmenes de agua más un volumen de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ al 10% más un volumen de NaOH al 0.5%, la sangre puede ser laqueada antes de la adición de sulfato de zinc, y se completa la mezcla antes de la adición del álcali, si los reactivos son muy fuertes, entonces se usan 10 ml de la solución de zinc diluida con 50-70 ml de agua y 10.8-11.2 ml -

de álcali, entonces se titula usando como indicador fenolftaleína y agitando constantemente hasta obtener como punto final un color rosa (1,3,11)

➔ Para plasma o suero Somogyi, recomendó una mezcla de 1 vol. de muestra más 8 volúmenes de agua más 0.5 volúmenes de sulfato de zinc más 0.5 volúmenes de NaOH.

b) 1 vol. de sangre más 8 vol. de sulfato de zinc (se disuelve 12.5g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua, se adiciona 125 ml de H_2SO_4 0.25N y se afora a un litro) más 1 vol. de NaOH 0.75N, los reactivos deben titularse en presencia de fenolftaleína y deben medirse 50 ml de sulfato de zinc, que necesitan de 6.70-á 6.80 ml de álcali para obtener color rosa con el indicador.

El método b), da una filtración más rápida y mayor producto del filtrado que el método a).

Somogyi presentó dos métodos para la precipitación de muestras pequeñas de sangre.

c) A 5.8 ml de agua se le adiciona 0.2 ml de sangre y 1.0 ml de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ al 1.8%, se mezcla y se adiciona 1 ml de NaOH 0.1N.

10 ml del reactivo se diluyen con 60 ml de agua, y se necesitan 12.0 á 12.2 ml de álcali para titularlo y obtener como punto final un color rosa usando como indicador fenolftaleína.

d) A 6.8 ml de reactivo de zinc (2.95g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 29.5 ml de H_2SO_4 0.25N por litro) se adiciona 0.2 ml de sangre y 1.0 ml de NaOH 0.15N los cálculos de la titulación formulados con anterioridad son confrontados y revelan que las cantidades de álcali en forma teórica son las que se piden para obtener los puntos de equivalencia en las titulaciones.

Aparentemente los complejos de zinc son formados y las cantidades de álcali empleadas son empíricas.

El pH del filtrado de sangre completa del método a) encontrado en el laboratorio es de 7.4 y su contenido de proteínas por turbidez con ácido sulfosalicílico es menor de 2mg/dl. el pH de los filtrados de suero obtenidos usando la mitad de -

la cantidad que se sugiere de agentes precipitantes es cerca de 7.4 pero los filtrados estan algo turbios y el contenido de proteínas es cerca de 150 mg/ dl.

Si la cantidad completa del reactivo es usado, el filtrado generalmente es claro con un rango de concentración de proteínas de 1 á 25 mg/ dl y el pH continúa de 7.4 (1,11)

En la precipitación de las proteínas por el zinc, hay una completa coprecipitación de glutati6n, ergotionina, ácidou0rico hay p6rdida de creatinina pero n6 de urea, se ha mostrado que el zinc se combina especifica y reversiblemente con las proteínas del plasma.

El conocimiento de que el complejo proteico de zinc es parcialmente insoluble con una fuerza i6nica de 0.15 y un pH de 7, ha sido aplicado para la formaci6n del sistema de fraccionamiento proteico (2,3)

Zinc m6s Bario.

Somogyi not6 que el zinc por s6 solo falla para dar una precipitaci6n completa de proteínas del suero o plasma y observ6 que al remplazar el NaOH por Ba(OH)₂, el resultado era una precipitaci6n completa que se le atribuye a la capacidad de adsorci6n del BaSO₄ formado, los agentes precipitantes son: soluci6n de ZnSO₄ · 7H₂O al 5% y soluci6n de Ba(OH)₂, que actualmente se prefiere preparar al 0.34N, por ejemplo: 5.36g de Ba(OH)₂ · 8H₂O por 100 ml. (para evitar las impurezas se adiciona BaCO₃ insoluble), el grado de esta concentraci6n no es demasiado importante, pero el álcali debe neutralizar la soluci6n de sulfato de zinc de manera muy precisa de volumen a volumen, cuando a la titulaci6n se le adiciona fenolftaleína como indicador. Se colocan 10 ml de la soluci6n de sulfato de zinc en un matr6z y se le adiciona m6s o menos 10 ml de agua y unas cuantas gotas de fenolftaleína, el álcali se gotea con continua agitaci6n hasta que vire a rosa y el color persista por lo menos un minuto, una titulaci6n r6pida dá un punto falso.

Las soluciones de sulfato de zinc y de hidróxido de bario se diluyen 1:5 y 1:2.5 con agua hervida respectivamente, su contacto debe ser mínimo debido a la absorción de CO_2 con formación de BaCO_3 , y se debe almacenar en una botella bien tapada si hay formas precipitantes muy visibles, el reactivo debe ser retitulado y de acuerdo con esto ya no hay formación de sales.

Henry sin embargo ha analizado los filtrados de suero preparados con Zn^{2+} y $\text{Zn}^{2+}-\text{Ba}^{2+}$ y encontró de 176 y 60 Mg/ml de Zn respectivamente (1,3,9)

Los filtrados obtenidos por esta técnica se utilizan para la determinación de glucosa, así como para las pruebas de glucosa oxidasa y para la de N de urea (11)

Cobre.

La desproteinización con cobre, es superior a la precipitación obtenida con zinc de dos maneras:

Da mayor y más completa precipitación de proteínas del plasma y suero, el exceso de reactivo se elimina con las proteínas, al adicionar CuSO_4 seguido de NaOH , pero en este caso el exceso de cobre aparece en el filtrado, y para eliminar este problema puede usarse tungstato de sodio para reemplazar al NaOH .

Somogyi presenta el siguiente método para esta precipitación: se pone un volumen de sangre en 7 vol. de agua y se le adiciona 1 vol de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 7%, se mezcla continuamente y se le agrega 1 vol. de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 10% se agita bien y se filtra o centrifuga después de unos cuantos minutos, para suero o plasma se usan soluciones de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5% y $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 6% (1,14)

Precipitación por medio de agitación con cloroformo.

Las proteínas pueden eliminarse de una muestra, adicionando 0.25 volúmenes de CHCl_3 más 0.1 vol. de cualquier sustancia preservativa como alcohol amílico, se agita de 15 á 60 min. --

posteriormente se centrifuga, la mezcla se separa en dos capas la superior acuosa y la inferior constituida de un gel de --- CHCl_3 -proteína y si hay un exceso del reactivo se forma una -- tercera capa de CHCl_3 en el fondo.

Actualmente ésto constituye una prueba muy sensible para las proteínas, pero cuando la capa de CHCl_3 esta en agua clara no muestra la precipitación en forma tersa en la interface.

Se ha observado que la concentración de proteínas en la - solución original acuosa es menor de 3mg/dl (3)

RESUMEN DE LOS CONCEPTOS INDISPENSABLES.

Este trabajo estableció la topografía de los sitios de obtención de sangre tanto venosa como capilar, los diferentes tipos de material empleados para efectuar la punción, ventajas y desventajas de cada uno de ellos la importancia de su asepsia- para evitar la contaminación de las muestras y la inoculación- de gérmenes patógenos al individuo, las técnicas seguidas para la obtención de sangre, la forma en que debe estar la región - que se va a puncionar, ya que zonas edematosas pueden alterar- los resultados en las muestras.

El manejo de las muestras para el análisis de diferentes- productos, las condiciones en que debe presentarse la persona- para hacer la punción, los cuidados que se tienen para evitar- alteraciones en las muestras ya obtenidas, las técnicas de ob- tención de suero o plasma así como la variación de su empleo - dependiendo del tipo de análisis que se va a realizar, las propiedades de los reactivos que se emplean.

Se estableció el uso de conservadores tanto físicos como- químicos para la obtención de muestras reales, las causas más- comunes que las alteran tales como la adsorción de los produc- tos en las paredes de los tubos colectores, hemólisis, des- naturalización de las proteínas y otros compuestos etc.

La obtención de sangre sin coagular es empleada en diferen- tes análisis por lo que se estableció cuales son los anticoagu- lantes más empleados, su forma de actuar y de acuerdo a ésto - se clasificaron en varios grupos, se describió en forma general el Mecanismo de la Coagulación más ampliamente aceptado, citando el lugar de origen, bioquímica y función tanto de los facto- res como de las plaquetas ya que intervienen en dicho mecanis- mo, (este punto se ve ampliamente en el curso de Hematología - que se estudia en el semestre posterior).

La meta en la preparación de filtrados libres de proteínas es precipitar solo éstas sin embargo hay ciertos componentes- que se adsorben o precipitan con las proteínas, esto depende de la naturaleza de los componentes, del reactivo precipitante específico, del pH y de la temperatura los procedimientos más empleados se dividieron en tres clases:

Procedimientos físicos: entre estos se encuentran la ultrafiltración cuyo principio es la separación de los componentes- en relación a su peso molecular, desnaturalización por medio de calor, adsorción de compuestos usando adsorbentes determinados etc.

Procedimientos químicos: la precipitación por adición de solventes miscibles en cuyo caso hay una competencia de las molecúlas proteícas por las de agua por lo tanto se deshidratan - y precipitan, o bien en función a la constante dieléctrica, disminuye en soluciones acuosas por el aumento de solventes miscibles y no acuosos.

Separación por medio de sales, precipitantes aniónicos (su empleo fue introducido por Folín-Wu y hasta la fecha se siguen usando en el laboratorio), precipitantes catiónicos (fue introducido por Somogyi).

Las precipitaciones se consideran completas cuando el filtrado es claro, si hay duda se pueden examinar por análisis fotométrico o por el efecto Tyndall, la presencia de espuma in-dica que la precipitación fue incompleta.

ANÁLISIS QUÍMICO CLÍNICOS

CLAVE: 036 - Q - 10

TEMA: Toma de muestras sanguíneas min.60

ANTECEDENTES: No hay.

CONCEPTOS	HABILIDADES	MATERIA	CONCEPTOS	HABILIDADES
Punción venosa	Conocimiento de los sitios apropiados (venas del antebrazo especialmente las del pliegue del codo; venas de los miembros inferiores; venas yugular externa e interna; del seno longitudinal superior, sitio empleado solo en niños muy pequeños)	Anatomía y Fisiología	Estudio topográfico de los sitios de punción y técnicas de punción.	Conocimiento de la red venosa que se punciona en cada lugar, instrumentos empleados para efectuar la punción.
Punción capilar	Conocimiento de los sitios apropiados (pulpejo del dedo; lóbulo de la oreja, superficie plantar del dedo gordo o del talón del pie en niños pequeños)	Anatomía y Fisiología	Estudio topográfico de los sitios de punción y técnicas de punción.	Conocimiento de la red vascular, nerviosa etc. de cada lugar, instrumentos empleados para efectuar la punción.
Componentes sanguíneos	Conocimiento de la composición y propiedades de la sangre, los elementos figurados, proteínas plasmáticas, componentes nitrogenados no proteícos, lípidos, glúcidos, electrolitos, pH, olor, color etc.	Biología Celular Química Inorgánica Química Orgánica	Conocimiento de los organelos celulares. Estudio de los electrolitos: Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe etc. Estudio de macromoléculas derivadas de carbohidratos; lípidos; proteínas; ácidos nucleicos.	Conocimiento de los organelos su función y composición. Conocimiento de la estructura, comportamiento electrolítico, funciones químicas y fisicoquímicas de estos elementos. Conocimiento de la estructura y función de dichos compuestos.

ANÁLISIS QUÍMICO CLÍNICOS

CLAVE: 036 - Q - 10

TEMA: Toma de muestras sanguíneas min. 60 ANTECEDENTES: No hay.

CONCEPTOS	HABILIDADES	MATERIA	CONCEPTOS	HABILIDADES
Componentes sanguíneos.		Bioquímica General.	Estudio de macromoléculas derivadas de carbohidratos; lípidos; proteínas; ácidos nucleicos.	Conocimiento de la estructura, vías metabólicas y sus funciones como molécula viva.
Enzimas	Conocimiento de las propiedades de las enzimas séricas que interviene en el fenómeno de la coagulación o nó, ya que se incluye el manejo de muestras para estudios enzimáticos.	Bioquímica I y II Fisicoquímica.	Estudio in vitro de las propiedades de las enzimas séricas.	Conocimiento de los factores para lograr su cinética enzimática (pH, temperatura, luz, tiempo de vida media, concentración de enzima y/o sustrato)
Elementos químicos o electrolitos	Conocimiento de las concentraciones de los compuestos químicos y electrolitos en sangre, su equilibrio electrostático; difusión, anticoagulantes específicos empleados en la determinación.	Fisicoquímica Anatomía y Fisiología Análisis I Química Orgánica	Estudio in vitro de los compuestos químicos y electrolitos, en sus aspectos químicos y fisicoquímicos, su cuantificación por instrumentos analíticos.	Conocimiento de los elementos químicos y electrolitos presentes intra y extracelularmente, conocimiento del manejo adecuado del instrumental de cuantificación, sus técnicas.
Pruebas funcionales hepáticas (no enzimáticas)	Conocimiento de los cuidados que se deben tener para la conservación de la muestra y determinación de los compuestos (luz, temperatura, separación rápida del suero, empleo de anticoagulantes etc.)		Concepto nuevo.	

ANÁLISIS QUÍMICO CLÍNICOS

CLAVE: 036 - Q - 10

TEMA: Manejo de las muestras. 60min.

ANTECEDENTES: No hay.

CONCEPTOS	HABILIDADES	MATERIA	CONCEPTOS	HABILIDADES
Metabolitos Hidrocarbonados	Conocimiento de los compuestos hidrocarbonados que más comúnmente se determinan, sus propiedades y cuidados, empleo de anticoagulantes, separación de plasma y/o suero en su caso.	Biología Celular Anatomía y Fisiología	Estudio de los organelos en que se degradan o sintetizan dichos compuestos. Estudio de los órganos y aparatos en que se realizan las diferentes etapas de su metabolismo.	Conocimiento adecuado de la función de mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi etc. Degradación, absorción, transporte, síntesis, almacenamiento, consumo del producto o sus derivados.
Lípidos.	Conocimiento de los compuestos lipídicos que generalmente se determinan, sus propiedades y su manejo apropiado (pH, temperatura, anticoagulantes)	Bioquímica. Biología Celular. Anatomía y Fisiología	Vías metabólicas de los carbohidratos. Estudio de los organelos en que se degradan o sintetizan dichos compuestos. Estudio de los órganos y aparatos en que se realizan las diferentes etapas de su metabolismo.	Manejo apropiado de las diferentes vías, sus esquemas, las enzimas que intervienen, los productos que sirven de sustratos y los que se producen en cada etapa o sección. Conocimiento de la función de las mitocondrias, aparato de Golgi etc. Degradación, absorción, transporte, síntesis, almacenamiento, consumo, excreción de productos o derivados.

ANÁLISIS QUÍMICO CLÍNICOS

CLAVE: 036 - Q - 10

TEMA: Manejo de las muestras. 60 min.

ANTECEDENTES: No hay.

CONCEPTOS	HABILIDADES	MATERIA	CONCEPTOS	HABILIDADES
Lípidos		Bioquímica.	Vías metabólicas de los lípidos.	Manejo apropiado de las diferentes vías, sus esquemas, las enzimas que intervienen, los productos que sirven de sustratos y los que se producen en cada etapa o sección.
Proteínas	Conocimiento de las diferentes proteínas - que generalmente se determinan, sus propiedades y su manejo apropiado (temperatura, pH - etc)	Biología Celular	Estudio de los organelos en los que se lleva a cabo la síntesis o degradación proteica.	Conocimiento adecuado de la función del núcleo, ribosomas, mitocondrias, lisosomas - etc.
		Anatomía y Fisiología	Estudio de los órganos y aparatos en que se realizan las diferentes etapas de su metabolismo.	Degradación, absorción, transporte, síntesis, almacenamiento, consumo, excreción de productos o sus derivados.
		Bioquímica.	Vías metabólicas de las proteínas.	Conocimiento de la síntesis proteica, sus esquemas, las enzimas que intervienen, los productos que sirven como sustratos y los que se producen en cada etapa.
Conservadores.	Conocimiento de los conservadores que se emplean en el laboratorio.	Concepto nuevo.		

ANÁLISIS QUÍMICO CLÍNICOS

CLAVE: 036 - Q - 10

TEMA: Manejo de las muestras. 60 min.

ANTECEDENTES: No hay

CONCEPTOS	HABILIDADES	MATERIA	CONCEPTOS	HABILIDADES
Conservadores	rio cuando las muestras no pueden ser analizadas inmediatamente (antibióticos, antibacterianos, reducción de temperatura, alteración del pH, liofilización, adición de compuestos inorgánicos, bactericidas)		Concepto nuevo.	
Coagulación. (Factores de la coagulación)	Conocimiento de los factores de la coagulación y de las plaquetas; su origen, función, composición y bioquímica (contenido de carbohidratos, lípidos y aminoácidos)		Concepto nuevo.	
Mecanismo de la Coagulación.	Conocimiento del mecanismo seguido en el Sistema Intrínseco, Extrínseco y la vía Común para ambos (secuencia de las reacciones en la coagulación)		Concepto nuevo.	
Anticoagulantes.	Conocimiento de los anticoagulantes más comúnmente empleados, su clasificación dependiendo si actúan in vitro (sustancias desca-		Concepto nuevo.	

ANÁLISIS QUÍMICO CLÍNICOS

CLAVE: 036 - Q - 10

TEMA: Anticoagulantes.

60 min.

ANTECEDENTES: No hay.

CONCEPTOS	HABILIDADES	MATERIA	CONCEPTOS	HABILIDADES
Anticoagulantes	cificantes); in vivo- (drogas hipoprotrombi- némicas); los que ac- túan tanto in vivo co- mo in vitro.	Concepto nuevo.		
Desproteíniza- ción sanguínea.	Conocimiento de las - técnicas más empleadas para la preparación de -- filtrados libres de -- proteínas de la sangre, orina y líquido cefalo- raquídeo.	Concepto nuevo.		
Procedimientos Físicos.	Conocimiento de las - técnicas de desproteíni- zación por medio de pro- cedimientos físicos.	Concepto nuevo.		
Procedimientos Químicos.	Conocimiento de los -- procedimientos químicos en la desproteínización (reactivos, concentracio- nes empleadas, pH, tem- peratura etc.)	Concepto nuevo.		

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Davidson Henry, Todd Stanford. 1972. *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. (14 a. ed.). Philadelphia: W.B. Sanders Co. 120-126, 526-545.
- 2.- Baurer D. John, Ackerman G. Philip, Toro Gelson. 1974. *Clinical Laboratory Methods*. (8a. ed.) Saint Louis: The C. - Mosby Company. 85-88, 349-383.
- 3.- Canon Henry. 1974. *Clinical Chemistry Principles and Technics*. (2a. ed.) New York: Harper and Row. 198-199, - 390-403.
- 4.- Bladergraen W. 1946. *La Fisicoquímica en la Medicina y en la Biología*. Madrid: Espasa Calpe S.A. 136-147, 302-306.
- 5.- Dr. Goth Andrés. 1971. *Farmacología Médica Principios y Conceptos* (5a. ed.) México D.F. : Interamericana S.A. 398- - 407.
- 6.- Litter Manuel. 1961. *Farmacología*. (2a. ed.) México D.F.: - El "Ateneo". 1027-1057.
- 7.- Drill A. Victor. 1969. *Farmacología Médica*. (1a. ed.) México D.F.: La Prensa Médica Mexicana. 913-927.
- 8.- Goodman Louis S., Gilman Alfred. 1974. *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. (4a. ed.) México D.F. : Nueva Interamericana S.A. 1205-1219.
- 9.- Dr. Tietz Norbert W. 1972. *Química Clínica Moderna* (1a. ed.)- México D.F. : Nueva Interamericana S.A. 39-45, 125-134.
- 10.- Wintrobe Maxwell M. 1960. *Fundamentos de Hematología*. I Tomo (4a. ed.) Buenos Aires Argentina: Interamericana S.A.
- 11.- Lamela M.D. Alberto. 1971. *Introduction to Medical Laboratory Methods*. (1a.ed.) New York: Harper and Row. 40-49, 140-144, 270-273.
- 12.- Lynch, Raphael, Mellor, Spare. 1972. *Métodos de Laboratorio*. (2a. ed.) México D.F. : Interamericana S.A. 703-708, 840-854.

- 13.- Kolmer John A. Boerner Fred. 1948. Métodos de Laboratorio - Clínico. (2a. ed.) México D.F. : Interamericana S.A. 42-51, 126-137, 277-296.
- 14.- Dr. Campbell Tood James, Harvley Sanford Arthur. 1943. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. (2a. ed.) Madrid : — Manuel Marín y G. Campo. 202-206, 354-357.
- 15.- Dr. Agasse E. Lanfont. 1933. El Laboratorio Moderno del Médico Práctico. (2a. ed.) Madrid : Bailly-Bailliere S.A. - 17-29.
- 16.- I.M.S.S. 1970. Manual de Procedimientos de Laboratorio Clínico. México D.F. : Subdirección General Media. 67-70
- 17.- Lockhart R.D., Hamilton G.F., Fyfe F.W. 1965. Anatomía Humana (1a. ed.) México D.F. : Interamericana S.A. 629-639, - 644-646.
- 18.- Prives M., Lisenkov N., Buskovich V. 1971. Anatomía Humana - (Tomo II) Moscú: Mir Moscú. 104-116.
- 19.- Gardner Ernest, Gray Donald J., O'Rahilly Ronan. 1971. Anatomía (2a. ed.) México D.F. : Salvat S.A. 59-51, 133, -- 195-197.
- 20.- Dr. Wright Samson. 1949. Fisiología Aplicada. (4a. ed.) México D.F. : Nacional S.A. 346-365.
- 21.- Manual Hyland. 1965. Pruebas de Coagulación. (1a. ed.) Los Angeles E.U.A. : Hyland Laboratories Div. Travenol International. 1-9.
- 22.- Guerra Francisco. 1951. Manual de Farmacología. México D.F.: Impresora Insurgentes S.A. 282-287.
- 23.- Mollison P.L. 1955. Transfusión Sanguínea Aspectos Clínicos. México D.F. : La Prensa Médica Mexicana. 20-23, 67-69, -- 325-329.
- 24.- Abreu Luis Martín. 1975. Fundamentos del Diagnóstico. (1a.ed) México D.F. : Impresiones Modernas S.A. 21-22, 655-658.

- 25.- Meites Samuel, Faulkner Willard R. 1962. Manual of Practical Micro and General Procedures in Clinical Chemistry. - U.S.A.: Charles C. Thomas. 5-9, 22-29, 43-50, 61-67.
- 26.- Dr. Meyers H. Frederik, Jawetz Ernest, Goldfien Alan. 1974. Manual de Farmacología Clínica. México D.F. : El Manual - Moderno S.A. 179-191.
- 27.- Dr. Báez Villaseñor José. 1966. Hematología Clínica. (2a. ed.) México D.F. : Talleres Gráficos de la Nación. 246-248, -- 264-269.
- 28.- Orozco Díaz Fernando. 1970. Análisis Químico Cuantitativo. (6a. ed.) México D.F. : Porrúa S.A. 113, 284-286.
- 29.- Dr. Guyton Arthur C. 1969. Fisiología Humana. (3a. ed.) México D.F. : Interamericana S.A. 111-115, 185.
- 30.- Villar Polasi Vicente, Villar Polasi Carlos. 1968. Métodos- Seleccionados de Análisis Clínicos. (3a. ed.) España: Aguilar S.A. Vols. I, II, III y IV.
- 31.- Bray Bach W.E. 1941. Sinopsis de los Métodos Bioquímicos de Laboratorio. México D.F. : Hispano Americana. 64-65, 149-154.
- 32.- Testud L., Jacob O. 1949. Compendio de Anatomía Topográfica. México D.F. : Nacional S.A. 4-14, 161-168, 422-425.
- 33.- William J., Williams M.P. 1972. Hematology. New York : McGraw Hill. 57, 58, 771-789, 999-1004, 1014-1020, 1050-1064, 1070-1075.
- 34.- Dr. Harper Harold A. 1971. Manual de Química Fisiológica -- (3a. ed.) México D.F. : El Manual Moderno S.A. 208-230, - 322.
- 35.- Dr. Bellanti Joseph A. 1972. Inmunología (1a. ed.) México - D.F. : Interamericana S.A. 94, 95, 123, 171.