

Tesis de Posgrado

Contribución al estudio de la proteína tromboplástica

Noir, Beatriz Alicia

1948

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Noir, Beatriz Alicia. (1948). Contribución al estudio de la proteína tromboplástica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0564_Noir.pdf

Cita tipo Chicago:

Noir, Beatriz Alicia. "Contribución al estudio de la proteína tromboplástica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1948.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0564_Noir.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUÍMICA

Contribución al Estudio

de la

Proteína Tromboplástica

Tesis para optar al título de Doctora en Física presentada por

BEATRIZ ALICIA NOIR

Físic: 304

A M I S P A D R E S

A mi padrino de tesis, el Dr. Jorge R. Mendive, que tan acertadamente me dirigió en la realización de este trabajo, brindándome en todas las oportunidades que se presentaron su palabra de asesoramiento, expreso mi más sincera gratitud.-

Esta tesis se llevó a cabo en su mayor parte en el Instituto Bacteriológico "Malbrán" y en la sección Hematología del Instituto de Investigaciones Físicas de la Academia Nacional de Medicina, a cuyos respectivos directores, los Dres. Enrique Savino y Alfredo Pavlovsky, manifiesto mi agradecimiento.-

Igual sentimiento expreso al Dr. Alfredo Sordelli que me guió en los comienzos de este trabajo, a los Dres. Venancio Deulofeu, Pedro Cattaneo, Blanca Beninzagui, Oscar Calmarini y a todas las personas que en distintas oportunidades facilitaron mi tarea.-

C A P I T U L O I

H E M O F I L I A

Schloesmann define a la hemofilia como una afección caracterizada esencialmente por un aumento en el tiempo de coagulación sanguíneo y que se traduce clínicamente por presentar hemorragias difícilmente coercibles, ya sean condicionadas por traumatismos o lesiones varias, o bien de aparición espontánea. Es una afección de carácter constitucional y congénito, generalmente hereditaria, padecida por el hombre y transmitida por intermedio de la mujer. A más de transmisión hereditaria es indudable la reaparición esporádica de hemofilia por mutación.-

Según Rosenthal el 90 % de los casos se observa en la raza caucasa. Es muy frecuente en Alemania (Selva Negra), especialmente en los judíos alemanes; hay menos casos en Inglaterra, Francia y Norte América. Afecta al 50 % de los niños con antecedentes hemofílicos, mientras las niñas están aparentemente sanas.-

Generalmente se admite que es una enfermedad transmitida por la mujer y sufrida por el hombre, aunque en 1931 Radovici presenta una familia de hemofílicos donde un hombre fué el trasmisor.-

Otto fué el primero que observó un caso directo.

En 1820 Nasse publicó una monografía sobre "Tendencia Hereditaria a Hemorragias Fatales": sus observaciones constituyen la ley de Nasse.

Las leyes de Mendel sobre el carácter hereditario de la hemofilia son las siguientes:

1°) Se transmite de generación en generación

2°) A veces puede saltar una generación

3°) Sólo la padece el sexo masculino.

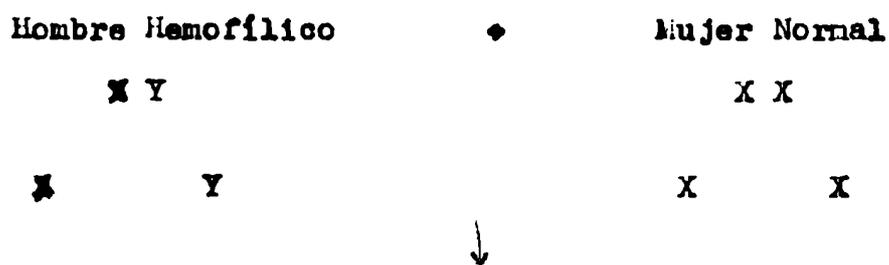
Las mujeres son atacadas excepcionalmente y de un modo muy atenuado.

4°) Se transmite según el modo matricial; las mujeres aparentemente sanas la transmiten a sus hijos.-

El hecho que la hemofilia esté ligada al sexo, significa que los factores o genes responsables de su desarrollo, están contenidos en el cromosoma X de las células reproductoras. Esto permitiría ampliar la ley de Nasse y predecir en qué condiciones aparecerá la hemofilia en la descendencia.-

La teoría Mendelina admite que en el óvulo hay un par de cromosomas X (XX) mientras que en el espermatozoide hay un cromosoma X y un Y.-

La combinación de estas células durante la fertilización, lleva al desarrollo posterior del hombre (XY) y de la Mujer (XX)



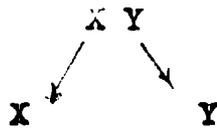
↓

- 1°) X X Hija conductora
- 2°) X X " "
- 3°) X Y Hijo normal
- 4°) X Y " "

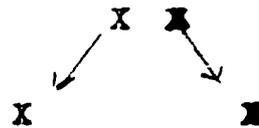
Hombre Normal

+

Mujer Conductora



↓

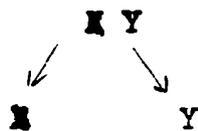


- 1°) X X Hija normal
- 2°) X X " conductora
- 3°) X Y Hijo normal
- 4°) X Y " hemofílico

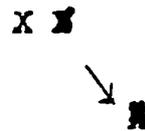
Hombre Hemofílico

+

Mujer Conductora



↓



- 1°) X X Hija conductora
- 2°) X X " hemofílica(1)
- 3°) X Y Hijo normal
- 4°) X Y " hemofílico

Bauer sugiere que los genes hemofílicos tienen una acción letal, luego una doble dosis de este factor que existiría en el óvulo destinado a producir una mujer hemofílica, harían imposible su posterior desarrollo.-

(1) No se han publicado casos anteriores de mujeres hemofílicas; los casos descriptos como tales parecen ser otras manifestaciones purpúricas. En general hay pocos casos de matrimonios en estas últimas condiciones.

Patogenia de la Hemofilia

Cuando la sangre sale del sistema arteriovenoso-capilar, es decir cuando se produce una hemorragia, el organismo reacciona convenientemente para detenerla. La sangre sale de su cauce normal por lesión de los vasos, por acción física o mecánica o por alteraciones de la permeabilidad o fragilidad de los capilares. Para que la sangre circule lentamente por el vaso lesionado, se contraen los capilares y la sangre va por otras vías, originándose una verdadera circulación colateral; el orificio es taponado por un coágulo que cierra los labios de la herida. Hay pues dos factores que influyen en la coagulación: el hemático y el vascular.-

La contracción de los capilares asume especial importancia en afecciones donde la coagulación es defectuosa (hemofilia) o no se realiza (fibrinopenia congénita), por lo que la hemostasia se efectúa exclusivamente mediante aquella contracción.-

En la hemofilia se encuentran perturbados los dos factores: la alteración del factor hemático produce un considerable aumento del tiempo de coagulación y la del factor vascular reviste especial importancia para muchos autores como Virchow, Opitz, Ronio, Chancier, Howell y Pavlovsky. Este último opina que aún descubriéndose el recurso capaz de acortar el tiempo de coagulación, sería necesario establecer clara y definitivamente la influencia del factor vascular, para resolver completamente el intrincado problema de la hemofilia.

Estas páginas han sido extractadas, del libro del doctor Alfredo Pavlovsky titulado: Consideraciones patogénicas de la hemofilia (Año 1947).

Sintomatología Clínica

Hemorragias: Son producidas por diferentes causas: heridas, extracciones dentarias, golpes, intervenciones quirúrgicas, etc. aunque a veces se presentan sin causa aparente. Muchos autores atribuyen gran influencia al factor psíquico en la aparición o cohibición de las hemorragias; P.E. Weil refiere algunos casos de aparición periódica. Las heridas aún las más insignificantes son incoercibles y ponen en peligro la vida del enfermo.-

Hematoma: Se presentan a raíz de traumatismos o sin ellos, y tienen las más variadas localizaciones.

Hemartrosis: En la hemofilia hereditaria especialmente, se observan derrames articulares provocados por el menor traumatismo, existiendo en general una tendencia recidivante local; en orden de frecuencia se comprueban en la rodilla, codo y tobillo.-

La iniciación de las hemorragias data desde el nacimiento en ocasión de la circuncisión y de la ligadura del cordón; lo más frecuente es su aparición cerca del año de edad, en los continuos traumatismos que sufre el niño al iniciar su deambulación.-

El factor hereditario (que falta parentemente en los casos esporádicos) tiene gran importancia para el diagnóstico.-

Síntomas Hematológicos

Tiempo de Coagulación: Es el principal síntoma de la hemofilia. El aumento del tiempo de coagulación varía de un enfermo a otro y en un mismo enfermo se observan a veces verdaderas curvas de oscilación.-

En general se presentan las formas graves de hemofilia con

tiempo de coagulación mayor de una hora, en las que los síntomas aparecen en los primeros meses de vida y los enfermos fallecen antes de la pubertad según estadísticas antiguas; 2) formas medianas con tiempo de coagulación de menos de una hora, de aparición más tardía y con cierta tendencia a atenuarse con la evolución del proceso; y 3) las formas frustras o sea las que se observan en familias de hemofílicos al lado de casos graves, o en toda la forma familiar donde la tara parece atenuarse.-

El coágulo que se obtiene es plasmático; los glóbulos rojos sedimentan antes de su formación dando origen a los llamados coágulos en botella.-

Tiempo de Sangría Se encuentra dentro de los límites normales, cuando la herida del lóbulo de la oreja no es muy profunda.-

Retracción del coágulo Normal desde el punto de vista de la coagulación, pero retardado debido a la lentitud de ésta.-

Plaquetas: El número de plaquetas es normal.

Fibrinógeno Todos los autores afirman que se encuentra entre los límites normales.

Serie Roja En los períodos de crisis hemorrágicas se observan anemias intensísimas (de $4\frac{1}{2}$ millones de eritrocitos a $1\frac{1}{2}$ en dos días por un derrame en la rodilla), sin que las hemorragias externas lo hagan sospechar a veces.

Serie Blanca Corrientemente es normal, pero durante las crisis aumenta sobre todo a expensas de los neutrófilos, con franca desviación a la izquierda, con cifras que oscilan entre 9000 y 20/000 aproximadamente.-

Eritrosedimentación: Normal o ligeramente acelerada salvo en las crisis, donde se comprueba que la aceleración es directamente proporcional a su grado de gravedad.-

Caloio: No se modifica.

Tiempo de protrombina: Normal

Electrolitos: En cantidades normales.

Signo del Bazo: Negativo

Evolución y Diagnóstico

La evolución depende de la intensidad de los síntomas. Algunos autores consideran que el período más peligroso se encuentra entre el 1°-2° año de vida, comprobándose hemorragias menos frecuentes con el paso de los años.

En las estadísticas de Schloesmann, sobre 46 casos el 30 % muere antes de los 10 años, el 28 % en la segunda década y el 17% en la tercera. El hemofílico que mayor edad ha alcanzado cumplió 80 años. En la estadística de Carrier se observa lo siguiente: 54 % muere antes de los 5 años y el 89 % muere antes de los 20 años, de ahí que exista sólo un 11 % que sobrepasa esta edad.-

En general es una afección grave, pues las hemorragias pueden ocasionar anquilosis al nivel de las articulaciones o pérdida de la vista por hemorragias retinianas.

Hoy en día todas las esperanzas de mejoría o curación están puestas en las transfusiones y en las globulinas de poder coagulante que se preparan.-

Así Rosenthal durante 15 años siguió alrededor de 20 hemofílicos y sólo tuvo un caso fatal de hemorragia cerebral.

Se consideran como básicos en el diagnóstico de la hemofilia los siguientes puntos:

1°) Tendencia desde la primera infancia a hemorragias excesivas, por causa de lesiones leves.-

- 2°) Hemorragias en las articulaciones desde los primeros años
- 3°) Alargamiento definido del tiempo de coagulación sin alteraciones cuantitativas de las plaquetas, protrombina, fibrinógeno y calcio
- 4°) Ausencia de causas de la predisposición a hemorragias aparte del aumento del tiempo de coagulación.

El tratamiento de la Hemofilia

En el tratamiento de la hemofilia el propósito culminante, la curación de la enfermedad y la eliminación de la persistencia vitalicia de la anomalía constitucional, difícilmente podrá ser alcanzado. La predisposición hemofílica dependiente del sexo está, según Schloëssmann anclada en la esencia hereditaria del hemofílico y no sufrirá ninguna influencia.-

Las indicaciones más importantes para el tratamiento hemofílico son:

- A) La lucha contra las hemorragias.
- B) La disminución de la predisposición a hemorragia, la profilaxia.
- C) El tratamiento de las consecuencias de las hemorragias (de los hematomas, de las articulaciones de los hemofílicos, etc)

En la lucha contra las hemorragias debe distinguirse:

- a) la hemostasia local y b) la hemostasia a distancia.

La hemostasia local se consigue:

- 1) con taponamientos adecuados
- 2) por tratamiento con hemostáticos de acción fisiológica local como sangre, sangre fibrinada, suero, plasma sanguíneo, globulina de plasma

jugos de tejidos, extractos orgánicos(de pulmón, placenta, bazo, saliva, etc) trozos de tejido(asociación de trombo quinasa), orina, leche de mujer ácido láctico, etc.-

- 3) Con preparados hemostáticos como: Clauden, Coaguleno, Hemoplastina, Fibrinógen, Marehl, Vivokoll, Stripphon Sangostopp, Histidina, veneno de serpientes. etc.

La hemostasia a distancia se realiza mediante:

- 1) Transfusión sanguínea
- 2) Inyección de plasma oxalatado o citratado
- 3) Seroterapia
- 4) Tratamiento con A. T. 10, es decir con un producto de la irradiación de la ergosterina, libre de vitamina D.
- 5) Tratamiento con Vitamina C
- 6) Tratamiento con nateína que es una mezcla de vitamina A-B-C-D Fosfato de Calcio y Lactosa
- 7) Tratamiento con citrato de Sodio
- 8) Tratamiento con rojo Congo
- 9) Aplicaciones de rayos Roentgen en el bazo
- 10) Tratamiento con preparados ováricos.

Estas páginas han sido extractadas del libro del doctor Alfredo Pavlovsky titulado: "Consideraciones Patogénicas de la Hemofilia" (año 1947)

C A P I T U L O I I

COAGULACION DE LA SANGRE

Teorías-Fisiología de la Coagulación Normal

El mecanismo fundamental de la coagulación es la transformación de una solución de fibrinógeno en un coágulo insoluble y rígido de fibrina.-

Esta propiedad característica de la sangre, constituye un fenómeno notable. Son muchas las teorías expuestas para explicar porque este humor completamente líquido mientras circula por los vasos sanguíneos, se transforma prontamente en un gel ni bien abandona su cauce normal.-

Teoría Enzimática de la Coagulación:

Alejandro Schmidt, el primer investigador que en 1861(78) publica un trabajo sobre este tema, expuso en el año 1872 la teoría enzimática de la coagulación sanguínea. Hammarsten(1880-1883) (35), Pikelharing(1892)(70), Fuld y Spiro (1904)(34), Morawitz(1904)(65) y Wöhlisch(1924-1929)(87 y 88) amplían, modifican y dan forma definitiva a esta clásica teoría de fermentos.

Estos autores suponen que el factor liberado por los tejidos es una quinasa capaz de convertir la protrombina en trombina en presencia de Ca; esta trombina formada reacciona con el fibrinógeno y lo transforma en fibrina. En la sangre circulante se en-

-encuentran presentes protrombina, Ca y fibrinógeno; la tromboquinasa necesaria para activar la protrombina se obtiene por desintegración de las plaquetas.

De acuerdo con esta teoría se puede dividir el proceso de la coagulación en tres fases según el siguiente esquema:

	De las Plaquetas	Del hígado y disueltas en el plasma
I Fase	Tromboquinasa (Morawitz)	Protrombina =
o de	= Trombozima=Tromboplasti-	=Serozima(Bordet)=
Reacción	na=Citozima(Bordet y Fuld)	= Trombógeno (Morawitz)
+		
en presencia de iones Ca		
	Trombina	= Fibrinógeno
II Fase		Fibrina
de gelificac-		en presencia de plaquetas
ión o		
Coagulación		
III Fase		Retracción del Coágulo
o de		
Retracción		

La sangre permanece líquida dentro del aparato circulatorio; porque el endotelio vascular intacto impide la liberación de la tromboquinasa. Si la sangre sale de los vasos y se coloca en contacto con superficies húmedas(con los tejidos que rodean la herida, con paredes de recipientes de vidrio, etc..) las plaquetas ponen en libertad la trombozima activa y el proceso se intensifica por la liberación de " sustancia tisural coagulante" de las células.-

Wöhlisch observa que la precipitación del fibrinógeno en medio ácido es un proceso reversible, mientras que la coagulación normal es un fenómeno irreversible.-

Woolridge(1886-1887)(89) y Mills (1921-1924) (62-63), creyeron posible la transformación de fibrinógeno en fibrina por acción de extractos de tejidos y Ca en ausencia de protrombina; pero experimentos de Fuld y Spiro (1904)(34) Morawitz (1904)(65) y otros más recientes de Smith, Warner y Brinkhous(1934) (83) permiten afirmar que mezclas de extracto de pulmón, Ca y fibrinógeno no coagulan pero, si se adiciona protrombina, la coagulación es inmediata.-

Según Wöhlisch (1929) (88) inmediatamente determinada la coagulación el contenido de trombina del suero alcanza un valor máximo y decae luego rápidamente, transformándose en metatrombina inactiva.-

Bordet y Howell consideran que las sustancias zimoplásticas son lípidos, probablemente fosfátidos y su presencia sirve para la neutralización de un anticuerpo y la activación del trombólgeno.-

Según Fucks el factor tisural está formado por dos constituyentes: uno de ellos cefalina, neutraliza la antiprotrombina liberando la protrombina; el otro es una protrombina, similar en sus propiedades a la que existe normalmente en la sangre, capaz de ejercer su misma acción sobre el fibrinógeno.-

Para Fischer (30) el activador es un complejo que contiene cefalina y un cerebrósido; define a la trombina como una lipoproteína que contiene Ca.

Wardet opina que la coagulación se verifica más rápidamente en contacto con superficies húmedas, porque éstas facilitan la liberación del trombólgeno de su grado previo al que llama pro-serozima y de la tromboxina de las plaquetas.

El fibrinógeno es la menos soluble de las proteínas de la sangre y uno de las que se desnaturaliza más fácilmente. Se cree que el fibrinógeno se forma en el hígado pues cuando se extirpa este órgano el nivel de fibrinógeno decae; en condiciones normales esta proteína es constantemente formada y utilizada por el organismo, pero no se sabe cuál es su misión ni cuáles son los órganos que la consumen. La formación de fibrina a partir de fibrinógeno tiene lugar en un medio levemente ácido hasta neutro (pH 6.4 a 7.)

Muchos autores consideran que la transformación de fibrina a partir de fibrinógeno es un proceso fermentativo, de acuerdo a las investigaciones nefelométricas de Klinke y Elfas sobre la cinética de esta reacción; afirman que se trata de una reacción monomolecular es decir fermentativa, acelerada por el mismo producto obtenido.-

La retracción de la fibrina y la expresión del suero; son acciones simultáneas y comienzan algún tiempo después de terminada la coagulación. El coágulo aparece de color rojizo rodeado de un líquido amarillo, el suero. Los eritrocitos, lastre de la coagulación, quedan aprisionados dentro de la red de fibrina y dan al coágulo el color rojo característico; la parte superior de éste tiene diámetro menor debido a que los glóbulos rojos que ya han sedimentado, permiten una mayor contracción.-

En las sangres con tiempo de coagulación o sedimentación aumentados, casi libres de eritrocitos, se observan coágulos con la parte superior blanca o amarilla y en forma de punta.

La mayoría de los autores admite que la retracción del coágulo está condicionada por los trombocitos; si éstos se separan de la sangre no se produce retracción. El agregado de extractos de plaquetas, es decir de factores puramente químicos, no produce efecto; Lampert admite que las plaquetas actúan como centro de coagulación.-

Otras teorías sobre la coagulación de la Sangre:

El primer investigador que expresó un punto de vista contrario a la teoría enzimática fué Woolridge(1883-1997) (89) Estableció que la coagulación de la sangre se produce por combinación de dos proteínas ricas en lecitina, presentes en este humor, llamadas fibrinógeno A y fibrinógeno B; la naturaleza de esta reacción no está especificada.-

Para Woolridge la trombina no parece ser muy importante, si bien se forma durante la reacción: el fibrinógeno B sólo se encuentra en la sangre, en cambio el fibrinógeno A está también en los tejidos.-

La teoría de Wolf (1906)(86) excluye por completo la intervención de enzimas o fermentos en la coagulación. Admite la existencia de tres coloides en el plasma: a) fibrinógeno, b) trombógeno(estos dos preexisten en el plasma y son formados en el hígado) y c) trombozima(originada a partir de las plaquetas, endotelios y leucocitos). Cuando se altera el equilibrio coloidal existente en el plasma se forma la fibrina a expensas del fibrinógeno, serozima y tromboquinasa floculados; en la sangre habría una antitrombina que se origina en el hígado y se opone a la coagulación.-

Bordet (1912) (85) difiere en cuanto al origen de la trombina; para él el factor activador(citozima) no es una enzima

sino un lípido(lecitina) que se une químicamente con la protrombina de la sangre(serozima) en presencia de Ca , para formar trombina. La proserozima de la sangre circulante constituiría el grado previo inmediato, inactivo, de la serozima o protrombina activa.

Howell (1916-1925)(44 y 45) presenta la hipótesis de que en la sangre circulante se encuentra presente una anti-protrombina (heparina) en forma de complejo antiprotrombina-protrombina; la protrombina necesaria se separa por acción del factor tisural liberado de las plaquetas. Las reacciones según Howell serían:
 Protrombina-heparina + factor tisural(cefalina) = protrombina libre
 protrombina + Ca = trombina

Trombina + Fibrinógeno = fibrina

Mellanby (1909) (59) y Pickering(1925-1928) (71) creen que la protrombina se encuentra físicoquímicamente combinada con el fibrinógeno en la sangre circulante.-

Según Fischer(1933,1954) (30) la protrombina es una globulina cuyo punto isoelectrico está a pH 5,3 y la trombina es una lipoproteína que contiene Ca ; la conversión de una en otra se realiza con Ca y el factor tisural. Este último es un complejo de cefalina soluble en alcohol y un cerebrósido.-

Mc Farlane establece la existencia de ciertos "Activadores Lipoides" que hasta ahora se habían considerado en conjunto con las tromboplastinas.-

Referente a la regulación del proceso de coagulación de la sangre algunos autores como Aoyama y Takahashi (67) señalan la notable influencia del sistema nervioso. El primero indica la existencia de un centro que acelera y otro que retarda la coagulación, ubicados en un punto del cerebro intermedio y capaces de ser inhibidos por la corteza cerebral.-

Por otra parte el porcentaje de protrombina en la sangre, puede ser regulado por el sistema nervioso pues, según Takats, la histamina cierra y la adrenalina abre los esfínteres que controlan el influjo venoso del hígado, lugar de origen de la protrombina; esto explica por qué se produce un descenso de protrombina que aumenta el tiempo de coagulación de la sangre, después de la liberación de histamina.-

Fibrinógeno y Fibrina

Algunos autores creen que el fibrinógeno se origina en el hígado; otros como Kish y Faludi opinan que el centro productor es el sistema retículo- endotelial. Para Hale, Ham y Curtis el régimen alimenticio influye en la cantidad de fibrinógeno.

Se trata de una globulina con peso molecular de 69.300, es la proteína menos soluble y una de las más lábiles del plasma.-

Su concentración normal en la sangre es de 3 a 6 gr. o/oo cantidad por demás suficiente para el proceso de coagulación, ya que las cifras mínimas con él compatibles oscilan entre 0.5 y 1 gr por mil. La fibrina es como hemos visto en todas las teorías de la coagulación expuestas, un producto derivado del fibrinógeno.-

Los análisis realizados por M. Bergmann y C. Niemann (1936) (2) encuentran en el hidrolizado de la fibrina los siguientes aminoácidos: l- prolina, d-arginina, d-lisina, l-histidina, d-ácido glutámico, l-ácido aspártico, triptofano, metionina y cistina.-

La naturaleza química de las reacciones que tienen lugar cuando el fibrinógeno da fibrina en presencia de trombina, es hasta ahora discutido.-

Nada se puede decir con seguridad sobre las diferencias que existen entre la fibrina obtenida por acción del calor y la formada en presencia de trombina a partir de fibrinógeno.-

Algunos autores señalan que la transformación de fibrinógeno en fibrina es el primer paso de un proceso de naturaleza proteolítica; la papaina por ejemplo, coagula el fibrinógeno directamente (26).

Muchas sustancias que también coagulan al fibrinógeno son capaces de oxidar a ciertos aminoácidos y péptidos y como ambas acciones parecen ser paralelas(16) se ha sugerido la naturaleza oxidativa de aquella transformación. Si esta teoría fuese exacta sería lógico entender por qué las diferencias químicas entre fibrinógeno y fibrina son aparentemente tan pequeñas. La acción de la trombina sobre el fibrinógeno no parece terminar con la formación de fibrina(36); el segundo paso consiste en una desintegración del coágulo, una licuación de fibrina, durante la cual se produce fibrinógeno no alterado y trombina inactiva.-

Este segundo paso ocurre bastante rápidamente revistiendo especial importancia, en las cavidades del cuerpo; hay quien relaciona este paso final de la acción de la trombina, con el origen de las proteínas del plasma.-

En los hemofílicos el fibrinógeno está en cantidades normales; como el tiempo de coagulación en estos enfermos está alargado por alteración de otros factores y la vibración de fibrinógeno se verifica mediante su transformación en fibrina, es conveniente agregar en estas circunstancias una solución de trombo-plastina para acelerar el proceso.-

Protrombina

En general la protrombina es una proteína presente en la sangre circulante, capaz de transformarse en trombina por acción del Ca y la tromboplastina; Mellanby la considera una meta-proteína ácida. Para Quirk(75) su estructura es proteica y contiene 4 % de hidratos de carbono. Este autor cree que la unión de dos factores constituyen la protrombina; el factor A disminuye en los plasmas conservados y el B en ciertas avitaminosis; la unión se realizaría mediante el ión Ca.-

El hígado parece ser una de sus principales fuentes de origen.-

La estabilidad de la protrombina en la sangre circulante puede ser debida a su presencia en forma inactiva(proserozima de Bordet) o bien a la circunstancia de encontrarse protegida ya sea combinada con un anticogulante(Howell) o formando complejos coloidales con fibrina sueroglobulina y albúmina(Mellanby, Pickering y Kiekma).

El nivel de protrombina en un animal dado es muy constante (86) aún después de hemorragias repetidas y de un brusco cambio de régimen ali enticio. Una marcada hipoprotrombinemia se produce en los envenenamientos agudos con fósforo o cloroformo; el nivel de protrombina desciende antes que el del fibrinógeno. Según experiencias de Pavlovsky(67) un franco déficit en protrombina, no impide la transformación de fibrinógeno en fibrina y sólo interviene en la velocidad de la misma.-

El porcentaje de protrombina en los enfermos hemofílicos es cuantitativamente normal; lo mismo sucede en todos los plasmas artificialmente incoagulables por administración intravenosa de heparina o por adición de heparina in vivo.-

Recientes experimentos (60) demuestran que soluciones purificadas de trombina contienen una sustancia capaz de inactivar la protrombina; el agente antiprotrombico no está presente en las soluciones de Ca, protrombina o tromboplastina empleadas, lo cual indica que la propia trombina es este factor. Esta conclusión es evidente e introduce una aparente contradicción; sin embargo es análoga a la de Kunitz cuando afirma que la tripsina puede convertir a su precursor, el tripsinógeno, en una proteína inerte.-

Purificación de protrombina:

Cuando preparaciones de protrombina impura se convierten en trombina, esta última puede ser inactivada por trazas de sustancia antitrombica presentes como impurezas; por purificación de las soluciones de protrombina puede evitarse esta dificultad.-

El plasma se diluye(80) y se precipita la protrombina a pH 5.3 con acético al 1%. El precipitado puesto en solución se adsorbe con $Mg(OH)_2$ y se lava con CO_2 ; se purifica dializando contra agua destilada. En un trabajo posterior (82) los autores recomiendan usar CO_2 a 4-6 atmósferas. También se obtiene una protrombina más pura mediante fraccionamiento isoeléctrico de del producto de la diálisis a pH 5.6 y 5.3; la protrombina más activa está en la última fracción.-

Trombina

No se sabe aún si la transformación de protrombina por acción de la tromboplastina es una reacción química o enzimática.-

Schmidt considera a la trombina como una enzima; Mellanby la llama trombina. Quick (75) dice que es una albúmina soluble

en agua y en solución fisiológica.

Walter Seegers afirma (82) que la protrombina y la trombina son proteínas que contienen carbohidratos. La trombina, como hemos dicho, parece ser capaz no sólo de precipitar fibrina a partir de fibrinógeno, sino también de disolver el coágulo.-

La proporción de trombina presente influye en el tiempo de coagulación, sin embargo según Quick, es muy pequeña la diferencia de concentración de trombina necesaria para transformar, por ejemplo un tiempo de coagulación de una hora en otro normal (4 a 8 minutos.-

Purificación de Trombina;

La conversión de protrombina en trombina se hace (82) en una solución al 0.9 % de ClNa que contiene 0.15 % de $(NO_3)_2Ca$; se utiliza tromboplastina especialmente purificada(80) pues los extractos crudos de órganos contienen también sustancias antitrombicas. La trombina preparada se precipita con acetona, se seca con acetona-eter y se redisuelve en agua; se precipita a pH 5- 5.3 con ácido acético, obteniéndose un residuo de sustancias inertes y un sobrenadante de trombina muy pura, soluble en aquel pH y relativamente estable.-

Tromboplastina

Se tratará detenidamente este tema en los capítulos III y IV.-

Calcio

El ión Ca toma parte en la activación de la protrombina. Muchos autores observan que si a una solución de fibrinógeno o a plasma oxalatado se le agrega plasma con protrombina pero sin Ca, la coagulación no se produce; al agregar Ca se forma rápidamente el coágulo correspondiente.-

Respecto a la naturaleza de la reacción que tiene lugar entre Ca y protrombina Pekelharig(1892) (70) opinaba que la trombina es un compuesto de Ca y que al reaccionar sobre el fibrinógeno le transfiere este ión, dando así origen a un compuesto insoluble, la fibrina. Hammarsten(1896-1899) (35) no está de acuerdo con este criterio y encuentra que la fibrina contiene sólo 0.005 % de Ca en su molécula.-

Loucks y Scott(1929) (51) afirman que la fibrina no es un compuesto de Ca, en cambio este ión es un componente esencial de la molécula de trombina, por lo que las soluciones de trombina se inactivan cuando se les agrega oxalato. Eagle(1935) (25) por el contrario, precipita cuantitativamente el Ca de las soluciones de trombina, sin afectar en nada su actividad; la conversión de protrombina en trombina en ausencia de Ca, puede realizarse con otros reactivos como cloroformo y alcohol o también producirse espontáneamente.-

Ya sea como catalizador que acelera una reacción que puede ocurrir espontánea pero más lentamente en su ausencia, o como constituyente, junto con la protrombina y el factor lipóide, de la trombina(Bordet, Fuchs y Fischer), el Ca sólo, en condiciones normales no es suficiente para convertir protrombina en trombina en la sangre circulante; necesita indudablemente del factor tromboplástico liberado por los tejidos.-

Anticoagulantes;

Existen sustancias llamadas anticoagulantes que in vitro o inyectadas en el organismo son capaces de actuar sobre algunos de los factores de la coagulación, pudiendo alargarla o inhibirla. La heparina está normalmente presente en la sangre circulante, aumentando en los estados de shock y después de la inyección de peptona.-

La clasificación de anticoagulantes de Quick(citada por Pavlovsky(67) es la siguiente:

- 1°) Agentes decalcificantes: citratos, oxalatos, fluoruros.
- 2°) Anti-protrombinas:
 - a) Heparina(en unión con un co-factor)
 - b) Absorbentes(fosfato tricálcico(Bordet), Hidróxido de Mg. (Suchs), hidróxido de Al(Quick), sulfato de Ba(Dale y Walpole).
 - c) Suero antiprotrombina específico, preparado por Tocantins
 - d) Dicumarina
- 3°) Antitrombinas, aparentemente presentes en el plasma sanguíneo y capaces de neutralizar los trozos de trombina formados. Quick no ha comprobado su presencia en la sangre.-
- 4°) Actúan sobre el fibrinógeno
 - A) Estabilizadores: a) sales neutras b) Germanina
 - B) Fibrinolisinias; sust. colorantes.

Fisiopatología de la Coagulación hemofílica

La mayoría de los autores admite en los hemofílicos:

- 1) Protrombina: normal
- 2) Calcio: normal(Nolf, Hess, Sahl, Klinger, Naegeli, Morawitz)
- 3) Fibrinógeno: normal(Sahl, 0.35 a 0.66 %, Wöhlisch 0.43 %).

Opitz 0.26 a 0.32 % Howell, Castex y Pavlovsky)

- 4) Anticoagulantes: normales (Nolf, Addis, Minot Lee) ligeramente disminuidos(Howell, Evans) aumentados (Weil, Feissly, Tocantins) (quick Pavlovsky).
- 5) Plaquetas: normales o ligeramente aumentadas (Sahli, Fonio)
- 6) Trombina: casi normal(Fonio)

El tiempo de coagulación de los hemofílicos se acorta con el agregado de extractos de tejidos(tromboquinasa), de plaquetas normales(trombozima) o de plasma normal(trombógeno y trombozima). El agregado de elementos figurados de sangre hemofílica no acorta el tiempo de coagulación.

La coagulación hemofílica presenta las siguientes características; los copos de fibrina aparecen lentamente y la consolidación del coágulo se realiza horas después de empezado el proceso, el que concluye normalmente. El coágulo no es muy consistente.-

En general, para explicar las deficiencias de la coagulación hemofílica aparentemente causadas por una disminución del factor tromboplástico, se aceptan tres teorías(68)

1) Déficit de tromboplastina

Schmidt en 1893(citado por quick(75) encuentra que el agregado de sustancias simoplásticas acorta el tiempo de coagulación de los hemofílicos. Sahli(1905) (76) dice que en los tejidos de los hemofílicos faltan las sustancias estimulantes de la coagulación; esta suposición ha sido rechazada de acuerdo a la investigación en cadáveres (Gressot, Plant). Señala también Sahli que la sangre hemofílica" presenta un déficit en la composición química de sus elementos figurados" pero sin precisar

cuáles son. En efecto, la adición de elementos figurados normales acelera el tiempo de coagulación en los hemofílicos, lo que no se consigue cuando estos elementos provienen de sangre hemofílica.-

Muchos trabajos publicados a este respecto concluyen que en la sangre normal entera existe una sustancia (fracción globulina) que acorta el tiempo de coagulación de sangre hemofílica; la misma fracción extraída de plasma hemofílico tiene poco poder coagulante(68).

2) Excesiva estabilidad de las plaquetas que determina una lenta liberación de tromboplastina.

Minot y Lee en 1916(64) confirman los hallazgos de Fonio en 1914(33) y suponen que las plaquetas hemofílicas, son anormalmente resistentes y que liberan más lentamente la tromboplastina; si se destruyen las plaquetas hemofílicas por medios mecánicos la sangre coagula normalmente (Lafleur). Estudios posteriores de Howell (1939) (48) y Quick en 1942(55) refutan aquella hipótesis.-

3) Aumento de las sustancias anticoagulantes que impiden la normal acción de la tromboplastina producida. Se cree que la anti-trombina y antiprotrombina están aumentadas. Tocantins en 1942 (84) y Pavlovsky en 1947 (68) entre otros autores, creen en la presencia de antitromboplastinas en la sangre hemofílica.-

C A P I T U L O I I I

SUSTANCIAS TROMBOPLASTICAS

Según lo expuesto anteriormente, el factor que junto con el Ca es responsable de la transformación de protrombina en trombina activa, necesaria para obtener fibrina a partir de fibrinógeno, ha recibido varios nombres desde su descubrimiento. Se lo ha llamado tromboplastina o sustancia tromboplástica (Nolf, Howell) citozima (Bordet y Fuld), tromboquinasa (Morawitz), sustancia zimoplástica (Schmidt), proteína tromboplástica (Chargaff, Cohen) y citozímfosfátido (Howell, Pickering, Fuchs).

Está contenida en muchos tejidos animales ejerciendo su acción coagulante en la sangre, extravascular en caso de heridas; su presencia en las plaquetas es probablemente la causa principal de las coagulaciones intravasculares.-

Alejando Schmidt en 1913(79) encontró que los extractos alcohólicos de tejido hepático, secos y luego emulsionados con agua tienen la propiedad de acelerar el proceso de coagulación de la sangre. Este factor activo, termoestable y muy soluble en alcohol y eter es llamado sustancia tromboplástica (Nol?) o zimoplástica (Schmidt).

El autor juzga que se trata de un fosfátido probablemente una cefalina, presente en las plaquetas y en muchas otras células del organismo. La sustancia zimoplástica es muy soluble en alcohol, éter y toluol y casi insoluble en acetona anhidra, pero bastante soluble en ésta en presencia de agua(6).

Las plaquetas tienen especial importancia en la coagulación intravascular y extravascular; en general se las considera como los únicos proveedores de la tromboplastina del organismo o tal vez con ayuda de los leucocitos pero estos en menor escala.-

Los lípidos de las plaquetas han sido extraídos y analizados en 1936(8) observándose un alto contenido en colesterol y fosfátidos y poco porcentaje de glicéridos. Los fosfátidos extraídos poseen alto poder coagulante, en cambio las fracciones solubles en acetona y cloroformo son enteramente inactivas; la fracción cefalina notablemente más activa que la lecitina, es la responsable de la propiedad tromboplástica de aquella sustancia. Se observa además que la actividad de la cefalina, es paralela a su contenido en ácidos no saturados.-

Hay un hecho curioso y es que los extractos acuosos de plaquetas agotadas por disolventes orgánicos, alargan considerablemente el tiempo de coagulación de la sangre.-

Un comportamiento anormal de las plaquetas sanguíneas podría ser, según aquellos hechos experimentales, la causa de muchos trastornos fisiológicos; en efecto, la diferente permeabilidad de aquellas para el activador o el inhibidor de la coagulación,

tanto como la ausencia de uno u otro en determinados casos patológicos determinaría el tiempo de coagulación de un individuo.

En 1912 Howell(43) estableció: que el principio activo presente en los extractos etéreos de cerebro desecado o timo, es un fosfátido con las propiedades generales de la cefalina; para Howell el efecto tromboplástico de aquel fosfólípido extraído de los tejidos animales, se debe a la neutralización de la fracción antitrombina.-

El hecho que cefalinas de origen vegetal tengan actividad tromboplástica(8) es muy significativo e indica que se trata de una propiedad característica de la cefalina y no debida a un factor coagulante contenido en los tejidos animales y presente en estos fosfátidos como impureza.-

La yema de huevo contiene lecitina sin ningún efecto coagulante y una pequeña fracción de cefalina activa.-

Jay Mc Lean en 1916(56) prepara cefalina pura y confirma aquellos resultados, estableciendo que la actividad tromboplástica es una propiedad intrínseca y marcada de la cefalina y no atribuible a ninguna impureza.-

Este principio obtenido de cerebro, hígado o corazón, aumenta la acción trómbica del suero fresco, mientras que otros fosfátidos como lecitina, esfingomielina y cuorina son completamente inactivos.-

El mismo investigador en 1917(58) advierte que la cefalina posee mayor efectividad para acelerar el proceso de coagulación de la sangre, inmediatamente después de aislada de tejidos, cerebro yema de huevo, hígado o músculo de corazón.-

Tanto la cefalina impura como la purificada pierden su capacidad tromboplástica cuando se las deja mucho tiempo a temperatura ambiente y aún conservándolas en desecador. Cefalina con dos años de antigüedad es completamente inactiva, aún cuando recién preparada tuviera marcado efecto coagulante.-

La cefalina se considera un fosfátido no saturado y se verifica que su actividad tromboplástica guarda relación directa con el grado de no saturación; cuando por oxidación o reducción se la satura más allá de un cierto límite, pierde completamente aquel poder, llegando hasta retardar la coagulación.-

La conversión de protrombina en trombina con cefalina, es sin embargo incompleta y requiere mucho tiempo durante el cual parte de la trombina formada se desintegra(31); los extractos salinos crudos de tejidos y los despojados de sustancias anti-trómbicas presentan mayor actividad

La concepción primaria de la estructura de las cefalinas como glicéridos amino-etil fosforilados, distintos sólo en cuanto al tipo de los ácidos grasos presentes, parece no concordar con los actuales descubrimientos. En efecto se encuentra(31) que la cefalina preparada de cerebro de buey, contiene 40-70 % de su nitrógeno en forma de un alfa aminoácido. Es una variante grande ya que se creía que todo el nitrógeno estaba en forma de etanolamina.-

Se ha identificado como serina por lo siguiente:

- a) da la reacción característica de los alfa aminoácidos liberando simultáneamente, al ser tratada con ninhidrina, cantidades equimoleculares de anhídrido carbónico y amoníaco.
- b) reacciona como los ácidos hidroximinados con periodato alcalino desprendiendo NH_3

c) tratado con ninhidrina libera aldehído glicólico, con el mismo rendimiento dado por serina en experiencias de control.

El hidroxiamino ácido de la cefalina está aparentemente unido al resto de la molécula del fosfátido por una unión de éster a través del grupo hidroxilo; efectivamente, haciendo reaccionar cefalina intacta con ácido nitroso, se deduce que los grupos COOH y NH₂ se encuentran libres.-

Los autores afirman también de acuerdo a su experiencia, que no se trata de una impureza de la cefalina, sino de un constituyente esencial. En cuanto a la presencia simultánea de las dos sustancias en la cefalina, puede ser que se encuentren preformados en el cerebro de buey o que la etanolamina haya sido originada post mortem, por descarboxilación del constituyente serina.-

Las bases de los fosfolípidos han sido determinadas también por el método de la dilución del isótopo (12); estos experimentos indican la existencia de por lo menos otra base primaria distinta de los conocidos o de un hidroxiaminoácido.-

En 1942(32) Folch encontró que la fracción cefalina de los fosfátidos de cerebro, siempre considerada como un compuesto definido, es una mezcla de fosfátidos.-

Las tres fracciones presentes en la cefalina de cerebro son: a) fosfatidil serina, b) un compuesto con la composición primariamente atribuida a la cefalina y que se llama fosfatiletanolamina c) una mezcla de fosfátidos, uno o más de los cuales contiene inositol como constituyente.-

En 1943(90) Woolley aisló del perote de soja el lipositol, un fosfolípido conteniendo inositol 18 %, galactosa 15.5%, ácido d-tartárico 8.3 %, ácido oleico 23.6 %, ácido fosfórico, etanolamino y una mezcla de ácidos cerebrónico, palmítico y estearico de peso equivalente al del ácido oleico.

Con motivo de estos recientes descubrimientos sería interesante investigar la estructura de la cefalina de proteínas tromboplásticas de distinto origen.-

Como hemos dicho, la cefalina libre acelera el proceso de coagulación de la sangre; idéntica propiedad tiene cuando se encuentra combinada con una proteína. El grupo funcional responsable de este efecto no ha sido identificado, pero para poder actuar parece que necesita en su molécula la presencia de ácidos grasos no saturados.-

Los venenos de serpiente poseen ciertas enzimas capaces de separar los ácidos grasos no saturados de los fosfátidos, dando origen a los llamados lisofosfátidos con propiedades hemolíticas características(9). El veneno de culebra de cascabel (3) destruye el poder tromboplástico de emulsiones de cefalina; el veneno de cobra inactiva la citozima (37). El Chergaff.S.Cohen (9) realizan interesantes experimentos para obtener lisofosfátidos a partir de distintos sustratos y observar la influencia de los compuestos formados, en el proceso de la coagulación sanguínea. Encuentran una anormal resistencia de la cefalina para ser convertida en lisocefalina, en contraste con la natural predisposición de la lecitina; este distinto comportamiento ante el ataque de los complejos enzimáticos de los venenos de serpiente, es otro ejemplo de las diferencias existentes entre estos fosfátidos.-

Ni la lisolecitina ni la lisocéfalina tienen acción sobre el tiempo de coagulación, en contraste con la actividad tromboplástica de la cefalina.-

Hace mucho tiempo que se conoce que el proceso de coagulación de la sangre se activa en presencia de tejidos.-

En 1902 (1) Arthus demuestra este hecho en la sangre de mamíferos. Encuentra que la adición de extractos salinoso acuosos de tejidos como timo, músculo, cerebro, testículo, etc. provoca la rápida coagulación de sangres que de ordinario lo hacen muy lentamente; tal es el caso de la sangre peptonizada de los perros y la de pájaros extraída con cuidado de los vasos sanguíneos para que en ningún momento se ponga en contacto con los tejidos.-

El principio activo presente en estos tejidos llamado sustancia tromboplástica es soluble en agua, termolábil y de naturaleza aparentemente proteica, pero su forma de actuar es semejante a la de la cefalina aunque más efectiva.-

El modo de acción del factor tromboplástico no está aún bien dilucidado.-

Bordet considera(4) que la trombina es un compuesto entre protrombina, calcio y un lípido tromboplástico(citozima).

Para comprobar si así sucede o si estas sustancias actúan de manera distinta, se hicieron interesantes experiencias con el isótopo radioactivo P^{32} (10); para ello se realiza la conversión de protrombina a trombina bajo la influencia de la proteína tromboplástica, como aparentemente ocurre in vivo.-

Se usa tromboplastina radioactiva que se aísla de ratas alimentadas con PO_4HNa_2 radioactivo, por un método de Chargaff y Cohen cuya publicación se anuncia; en presencia de este preparado activo se realiza la transformación de protrombina en trombina. La radioactividad de la trombina obtenida, se compara con la de otra solución especialmente preparada y usada como contralor. Estas experiencias parecen no confirmar la hipótesis de Bordet,

pues es tan pequeña la cantidad de sustancias con P, transferidas a la trombina formada, que sólo puede ser determinada por este método.-

Según Howell(47), para que el factor tromboplástico actúe es necesario que se combine con un anticoagulante, por ejemplo heparina, presente en la sangre circulante como complejo heparina-protrombina, y deje protrombina en libertad.-

La heparina parece no ser un compuesto químicamente definido, sino un ester mucitínpolisulfúrico(49). No está bien aclarado si su poder coagulante proviene de cierta afinidad química definida, o de su gran carga iónica.-

El pulmón es el órgano más rico en heparina. Holmgren y Wilander(38) señalan a los mastzellen(basófilos) como la fuente originaria de la heparina; posiblemente sea el constituyente de las granulaciones basófilas.-

La hipótesis de Howell aparece como no probable, pues cuando se trata heparina con proteína de pulmón, se forma un complejo heparina-proteína dotado de una efectiva acción anticoagulante; esta capacidad de combinación de la heparina parece provenir de su alta carga eléctronegativa(14). Durante la reacción se libera cefalina de poder levemente coagulante.-

Para que la heparina actúe necesita de un factor, el complemento de la heparina, presente en la fracción albúmina del suero(74), no idéntica a la albúmina cristalina(14), ni reemplazable por el constituyente proteico de la tromboplastina(11).

Con excepción de la albúmina cristalina todas las fracciones albúminas probadas son activas. El natural inhibidor de la coagulación sería pues un complejo de albúmina cuyo grupo prosté-

tico es la heparina. Preparaciones de albúmina de plasma, en presencia de heparina, pueden ser electroforéticamente separadas en tres fracciones de las cuales sólo la rápida y media contienen al complemento de la heparina.-

La heparina necesita de este complemento: a) para impedir la acción coagulante de la trombina sobre el fibrinógeno y b) para inhibir la conversión de protrombina en trombina por destrucción de la tromboplastina. Es probable que la primera acción citada tenga lugar en sangre aislada o circulante y que el segundo efecto ocurra en el sitio de una herida, donde grandes cantidades de tromboplastina son liberadas.-

El poder anticoagulante de la heparina está relacionado con la concentración relativa de trombina y del complemento de la heparina(91), de modo tal que el proceso de coagulación en un sistema que contiene fibrinógeno, heparina y trombina, puede depender exclusivamente de la concentración del complemento de la heparina.-

El comportamiento "anti-protrómbico" de la heparina no está del todo aceptado(7). Mellanby y Quick indican que la transformación de protrombina purificada en trombina, puede realizarse aún en presencia de heparina. Para entorpecer aquel proceso parece necesaria la presencia de cierto factor presente en el plasma, no dializable, pero de identidad desconocida. Ni la heparina ni el factor por separado impiden la formación de trombina. En 1936 Quick(73) encontró que en el shock que se produce al inyectar peptona, aumenta enormemente el tiempo de coagulación, debido a la presencia de una antitrombina parecida o idéntica a la heparina y completamente distinta de la antitrombina normal de la sangre.-

Un año después Eagle, Johnston y Ravdin atribuyen el marcado aumento del tiempo de coagulación en el shock, anafiláctico(74) a una antitrombina similar a la obtenida añadiendo heparina al plasma.-

Quick cree que la antitrombina normal de la sangre es una albúmina que neutraliza lentamente a la trombina, sin molestar la coagulación normal, ya que el fibrinógeno tiene mayor afinidad por la trombina que por la albúmina. La afinidad de la albúmina por trombina se acrecienta notablemente en presencia de heparina, resultando que en pocos minutos toda la trombina se habrá combinado con el complejo heparina-albúmina en vez de coagular al fibrinógeno.-

La albúmina calentada a 67° C no es capaz de neutralizar la trombina; no se observa entonces al añadir heparina a la sangre ninguna acción antitrombica, lo que confirma la hipótesis de que la heparina sólo no es una antitrombina, sino un simple activador de la albúmina.-

Hay también evidencia de una reacción entre la heparina y las globulinas del plasma(14). Continuando las consideraciones sobre la manera de actuar del factor tromboplastico, diremos que otros autores lo consideran una enzima capaz de catalizar la transformación de protrombina en trombina; esta opinión es sostenida por el hecho experimental de que la tripsina(26), ciertos venenos de culebra (*Bothrops atrox*, *Vipera Russell*, *Notechis acutatus*)(27) y (53) y otras enzimas proteolíticas pueden también actuar sobre la protrombina.-

Algunos venenos de serpientes tienen acción efectiva sobre la citozima(41) por lo que impiden la formación de trombi-

na; el veneno de cobra es un ejemplo. Este veneno actúa también aunque con menor intensidad, sobre la protrombina(40); pero por otra parte activa considerablemente la combinación trombina-fibrinógeno. Los venenos coagulantes tienen al parecer propiedades de trombina, inyectados in vivo en dosis muy grandes provocan la coagulación de la sangre en todo o parte del aparato circulatorio. Cuando la dosis inyectada es pequeña a la fase positiva en la que la coagulación aumenta por acción del veneno, sigue una fase negativa de incoagulabilidad debido a la momentánea desaparición del fibrinógeno(42)

Eagle en 1937(27) estudió 17 venenos de serpientes y encontró que 9 de ellos podían coagular la sangre citratada; 7 de esos 9 podían convertir el fibrinógeno en una sustancia insoluble semejante a la fibrina(*Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops nummifera*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus horridus*, *Crotalus terrificus basiliscus*, *Crotalus terrificus terrificus*). El medio óptimo para la coagulación se encontró para tres de ellos en pH 6.5, el mismo necesario para que la trombina actúe sobre el fibrinógeno. Sin embargo la capacidad de estos venenos de coagular el fibrinógeno, no es afectada por la antitrombina que se produce durante el shock anafiláctico, lo que no ocurre con la trombina.

Además de coagular el fibrinógeno directamente, tres venenos(*Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca* y en menor extensión *Crotalus terrificus basiliscus*) actuaban también sobre la protrombina convirtiéndola en trombina, sin intervención de calcio o plaquetas. Otros venenos que no tenían acción sobre el fibrinógeno purificado también convertían protrombina en trombina.-

La cantidad de veneno necesaria para transformar la protrombina era en algunos casos extraordinariamente pequeña; así

el *Bothrops atrox* era activo aún en diluciones de 1:25 millones, mientras que el de *Motechis scutatus* actuaban en diluciones de 1 en 4 millones. El autor cree que la propiedad de coagulación y destrucción del fibrinógeno y la de activar y destruir la protrombina que poseen estos venenos, depende de las enzimas proteolíticas que contienen.-

De acuerdo con este carácter enzimático atribuido a esta reacción, algunos autores hablan de tromboquinasa más que de sustancias tromboplásticas al referirse a los extractos alcohólicos, e téreos, acuosos y salinos de tejidos, plaquetas y algunas fracciones de plasma, que poseen la propiedad común de transformar rápidamente la protrombina en trombina en presencia de Ca y lentamente en su ausencia.-

Otros autores observan en cambio que la tromboplastina se consume cuando reacciona con protrombina en presencia de iones Ca(61), luego hay que suponer que no se trata ya de una enzima capaz de transformar ilimitadas cantidades de protrombina en trombina.-

Si se parte de un exceso de protrombina se encuentra que la trombina obtenida es directamente proporcional a la cantidad de tromboplastina empleada; si la tromboplastina es la que está en exceso, la cantidad de trombina formada es proporcional al peso de protrombina utilizado.-

En 1937 Patek y Taylor aislaron de plasma humano normal (28) mediante dilución y precipitación a pH 5.5 o 6, una globulina termolábil, soluble en solución salina isotónica y que acorta el tiempo de coagulación de sangre hemofílica in vivo e in vi-

tro. Dializando plasma humano normal, se obtiene una euglobulina activa. Similares fracciones preparadas con sangre hemofílica son inactivas o de efecto muy débil.-

El factor activo parece ser distinto de la protrombina o trombina y también de la tromboplastina de los tejidos pues pasa fácilmente a través de filtros Berkefeld y no tiene acción aceleradora sobre el tiempo de coagulación de sangre normal.-

Muchas sustancias preparadas sintéticamente son capaces de coagular el fibrinógeno y formar coágulos más o menos parecidos a los de fibrina(16). La ninhidrina(13) da coágulos firmes, la aloxana y el aldehído salicílico son también capaces de coagular el fibrinógeno pero son menos activos; la cloramina T da coágulos flojos.-

La sal sódica del ácido sulfónico 4 de 1-2 naftoquinona y la sal de potasio del ácido sulfónico 2 de la 1-4 naftoquinona, producen a partir de soluciones de fibrinógeno purificado, firmes coágulos a 30° y pH neutro.

El tiempo de coagulación cuando se usan estos preparados sintéticos depende de la concentración de éstos y de fibrinógeno y la retención del coágulo se produce más rápido que cuando el fibrinógeno es coagulado por trombina. No se necesitan iones Ca ni factor tromboplástico. Se cree que la acción coagulante de los agentes sintéticos sobre el fibrinógeno, se debe a una oxidación de los grupos aminoacilados o sulfhidrílos de la proteína o bien a una combinación de ésta con el coagulante artificial(16).

Pocas sustancias como el glutatión y el bisulfito de sodio, impiden la acción de los agentes sintéticos estudiados.-

C A P I T U L O I V

PROTEINA TROMBOPLASTICA DE PULMON VACUNO

La proteína tromboplástica está contenida en muchos tejidos animales y acorta el tiempo de coagulación extravascular, en caso de heridas.-

Mediante soluciones salinas se la extrae de diferentes fuentes orgánicas: placenta y pulmón vacunos y humanos, saliva, leche de mujer, cerebro de conejo, bazo, timo, testículo, músculo etc.-

En general los estudios de este factor activador de la coagulación sanguínea, han sido realizados sobre proteína tromboplástica extraída de pulmón vacuno.-

El factor termolábil contenido en los extractos acuosos de tejidos, de naturaleza aparentemente proteica, acelera la coagulación de la sangre en forma similar a los fosfátidos, siendo sin embargo mucho más potente que la cefalina.-

Woolridge(89) considera a esta sustancia como una proteína compleja, una fosfoproteína.-

Howell en 1912 demostró que la sustancia activa de los tejidos tiene las propiedades generales de una cefalina y en 1916 Mc Lean (56) lo confirma, puntualizando que esta propiedad es característica de la cefalina y no debida a impurezas.-

Seymour S. Cohen y Erwin Chargaff(20) extrajeron la proteína tromboplástica de pulmón vacuno con solución fisiológica, purificándola mediante sucesivas precipitaciones con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ seguidas de diálisis y liofilización.

Obtuvieron así preparaciones termolábiles, de alto valor tromboplástico; esta propiedad se pierde por tratamiento con alcohol.-

Contienen 0.8 a 1 % de P, 11.5 a 12.5 % de N y alrededor de 1 % de S.-

La labilidad al calor de este factor soluble en agua, disminuye en las preparaciones purificadas, lo cual permitiría atribuir aquella propiedad a las impurezas presentes.-

Esta preparación fué observada en un aparato de electroforesis de Tiselius(22); es 90 a 95 % homogénea según se desprende de su comportamiento electroforético y puede ser purificada.-

Los experimentos confirmaron de que se trata de una fosfolipoproteína que contiene 16 a 20 % de fosfátidos y 2 a 3 % de ácido nucleico.-

El ácido nucleico es al parecer el componente rápido, pero como se obtienen muy pequeñas cantidades de él, la comprobación de su identidad es indirecta. Las relaciones N:P encontradas permitirían suponer la presencia de algunas impurezas proteínicas en el componente veloz; dada su gran movilidad en el campo e-

léctrico el ácido nucleico parece constituir una mezcla física.-

El resto del P se encuentra en el componente lento como P lipídico, lo cual indica que los fosfátidos están firmemente ligados a la proteína, que tiene aparentemente un alto peso molecular.-

Una solución de este componente lento, electroforéticamente homogénea, examinada en una ultracentrífuga es heterogénea y todos los límites observados presentan altas constantes de sedimentación, que corresponderían a fracciones proteicas de peso molecular del orden de varios cientos de miles; la heterogeneidad observada se atribuye a las manipulaciones químicas realizadas para preparar esta tromboplastina.-

Chargaff, Moore y Bendich(1942)(15) preparan proteína tromboplastica de gran potencia, por sedimentación en la ultracentrífuga, de extractos salinos de pulmón vacuno.

Por este método, obtienen preparaciones homogéneas en la célula electroforética y como se evitan las manipulaciones necesarias en el método primitivo, se impide una posible alteración de la proteína.-

Las preparaciones de proteína tromboplástica así obtenidas poseen la más alta actividad registrada por Chargaff; contienen menos N y mas P que las aisladas por precipitación con sal. Tienen actividad enzimática y una marcada acción de fosfatasa, en cambio los resultados referentes a una acción semejante a la de la tripsina, no son muy convincentes; la tripsina cristalina en cambio posee propiedades tromboplásticas.-

Considerando el poder activador de la cefalina en el proceso de la coagulación, es interesante estudiar el contenido en fosfátidos de la proteína tromboplástica.-

Cohen y Chargaff (1941) (21) realizan su extracción con alcohol-eter; a) de una solución a Ph alcalino b) de una preparación liofilizada y lavada con acetona, para extraer los esteroides glicéridos neutros y esteres de esteroides presentes. Separan una fracción insoluble en eter en la que aíslan esfingomielina y una porción soluble en eter que se puede dividir en: una parte soluble en alcohol(lecitina) y otra insoluble en alcohol (cefalina).

Las fracciones "lecitina" y cefalina" muestran considerable acción aceleradora de tiempo de coagulación; igual en ambas fracciones.-

Demuestran tambien que la propiedad de activar la coagulación sanguínea, reside sólo en la parte de proteína tromboplástica soluble en eter e insoluble en acetona, pues la fracción proteica libre de P lipídico no posee ninguna actividad tromboplástica (20) (21).

Las sustancias activas se hidrolizan encontrándose ácidos grasos, ácido glicerofosforico(en alfa y beta formas) y bases. Contienen ácidos palmítico, esteárico, oleico y otros ácidos no saturados con una doble ligadura.-

Las fracciones lecitina y cefalina tienen pequeñas cantidades de etanolamina y probablemente un ácido hidroxilaminado o una amina primaria distinta de la etanolamina; sugieren los autores la posibilidad de que la actividad tromboplástica de la cefalina aislada de los tejidos, esté relacionada con la presencia de estas sustancias desconocidas.

Con el objeto de investigar las propiedades biológicas de la tromboplastina y la naturaleza del efecto anticoagulante de la heparina, E. Chargaff, M. Ziff y S. Cohen (11) realizan experimentos con ambas.-

Cuando se trata heparina con proteína tromboplástica de pulmón, se produce el desplazamiento de los fosfátidos contenidos en ésta y la formación de un compuesto heparina-proteína.

La alta carga electronegativa de la heparina favorece su combinación con aquella proteína y con otras como histona y salmina, siendo sin embargo distintas las propiedades de los compuestos obtenidos. En efecto, al unirse a la heparina la proteína tromboplástica pierde su alto poder coagulante y el complejo heparina-proteína obtenida ejerce una activa acción anticoagulante, mientras que los sistemas igualmente formados, con histona o salmina, son biológicamente inactivos.-

Esto demuestra que cuando la heparina reacciona con histona o salmina pierde sus propiedades anticoagulantes, en cambio la proteína de la tromboplastina al unirse con ella, no destruye su poder biológico característico.-

Algunos autores (46) sugieren que el efecto anticoagulante de la heparina proviene de su reacción con la cefalina o tromboplastina, pero la experiencia no ha confirmado este criterio.

Como hemos dicho anteriormente se ha encontrado que la heparina no actúa sola, sino mediante un factor presente en la fracción sueroalbúmina pero no idéntico a la albúmina cristalina; este factor albúmina además, no es sustituible por la proteína de la tromboplastina(11)

La formación de complejos heparina- tromboplastina parece ser el modo de acción de la heparina, sobre todo en el sitio de una herida, pero como las propiedades anticoagulantes de ésta impiden, como se ha dicho, no sólo la formación sino la acción de la trombina, los autores piensan que existen otros mecanismos de reacción.-

La unión de la heparina con la proteína tromboplástica, deja cefalina en libertad, y ésta tiene por su parte una débil acción coagulante.-

E. Chargaff, A. Bendich y S.S. Cohen(1944) (17) preparan proteína tromboplástica por centrifugación de extractos de pulmón vacuno, en una centrifuga International con refrigeración y equipada con el dispositivo Multispeed; cuando usan grandes volúmenes de material, combinan este procedimiento con una sedimentación preliminar en una supercentrifuga Sharples.-

Se ha visto ya (15) que en la ultracentrifuga se obtienen preparaciones homogéneas en cuanto a su conducta electroforética y a su velocidad de sedimentación; en esta trabajo(17) se habla de fracciones electroforéticamente homogéneas y provistas de gran actividad coagulante, pero heterogéneas en cuanto al tamaño de las partículas. En algunos casos 0.0003 gammas de proteína tromboplástica tienen notable actividad coagulante.- Estas preparaciones contienen alrededor de 7.5 % de N y 1.6 % de P la fracción lipídica tiene alrededor de 1,3 % de N y 2.5 % de P, índice de iodo 50.6 y 19.1 % de colesterol total, no habiendo prácticamente ésteres del colesterol.-

El residuo de la extracción de los lípidos consiste en proteínas, hidratos de carbono y ácido nucleico del tipo ribonucleico, el cual parece estar unido al resto proteico por

lazos muy lábiles, como ocurre en el virus del mosaico del tabaco(23) Esto haría pensar que el acidonucleico se encuentra más bien como impureza que como auténtico componente.-

Es interesante estudiar la naturaleza de las uniones entre los distintos componentes de esta sustancia y aclarar si se trata de una lipoproteína es decir de una sal verdadera, o de una simple asociación física. En general este aspecto aún no está bien aclarado. La relativa estabilidad al calor de estas preparaciones permite suponer que los lípidos ejercen una actividad protectora, con lo que la antigua distinción entre el factor lipóidico, termestable y el factor proteico, termolábil, pierde algo de su fuerza.-

Se observó también que una porción de esta proteína puede ser digerida por enzimas proteolíticas; se señala la posibilidad de que el alto contenido en lípidos proteja el resto proteico del ataque enzimático.-

Mc Farlane(52) observó que los lípidos del suero, que habitualmente no son solubles en éter, se solubilizan cuando una mezcla de suero y éter se congela a -25°C y luego se deja deshechar. Basados en esta observación, los autores (18) realizaron la desintegración de la proteína tromboplástica congelando en presencia de éter y obtuvieron cuatro fracciones distintas. Cuando los experimentos de desintegración se llevaron a cabo con éter conteniendo 10 % de alcohol, se comprobó una pérdida casi completa del poder coagulante.-

Estudios con rayos alfa de sustancia similares acusan la presencia de pequeños depósitos de proteínas entre láminas bimoleculares de lípidos; esto permitiría suponer una ordenación

regular en el complejo, de moléculas cuyo tamaño es condicionado por los espacios intercelulares donde se originan. De acuerdo a los experimentos de desintegración a los que acabo de referirme se ha podido apreciar la importancia de los lípidos para mantener la uniformidad de tamaño y de movilidad en un campo eléctrico de aquellas partículas.-

Una vez que la barrera protectora de agua es rota, la uniformidad del complejo homogéneo desaparece debido a la extracción de los lípidos por el éter y se separan en componentes apreciables.-

Las propiedades inmunológicas de la proteína tromboplástica podrían aclarar su estructura y sus propiedades. Los experimentos realizados en conejos presentan múltiples dificultades, por el hecho de que este compuesto es completamente tóxico cuando se inyecta en forma intravenosa.-

En general 4 miligramos de proteína en 2 c.c. de solución salina son toleradas, pero a veces esta cantidad produce efectos letales.-

Para preparar sueros inmunes contra la proteína tromboplástica(20) se inyecta una suspensión muy fina de ésta en solución salina, que contiene 0.01 % de etil-mercuritiosalicilato.-

El preparado de tromboplastina ha sido previamente liofilizado y lavado con acetona.-

Extrayendo sangre del corazón de los animales de experiencia después de una serie de inyecciones, durante las cuales

cada animal ha recibido un total de 148 miligramos de proteína tromboplástica, se observan los siguientes resultados.

- a) La proteína tromboplástica es capaz de producir anticuerpos en el conejo.
 - b) El resto proteico que queda despues de extraer los fosfolípidos con alcohol-eter(1:1) hirviente, no precipita el antisuero preparado; lo mismo sucede con la sustancia obtenida haciendo gotear una solución de tromboplastina a pH 8.8 en eter; alcohol (1:1-) a 30° C.
 - c) La proteína tromboplástica cuyos fosfátidos han sido desplazados por la heparina, se combina con el antisuero preparado, lo cual muestra que los fosfátidos no son esenciales para que aquella sustancia aglutine los anticuerpos contra la proteína intacta.
-

C A P I T U L O V

PROTEINA TROMBOPLASTICA DE PLACENTA HUMANA

Sakurai (1929-1930) (77 y 39) observó que las toxinas placentarias activan considerablemente al proceso de coagulación de la sangre; extrajo el principio activo de placentas humanas frescas con solución fisiológica, centrifugó el extracto y lo usó en diversas experiencias. El factor coagulante parecido a la tromboplastina resultó ser una globulina con 1,226 % de P, termolábil y fácilmente inutilizable por oxidación, enzimas proteolíticas o larga exposición al aire.-

Este extracto placentario, muy activo para acortar el tiempo de coagulación de plasma de perros y conejos, oxalata-do y recalificado, tenía una toxicidad para los animales, paralela a su poder coagulante. Cuando se lo administraba oral o subcutáneamente a animales de experimentación el tiempo de coagulación de la sangre era acortado, in vivo e in vitro; inyectado en forma intravenosa en mucha cantidad, desfibrinaba la sangre y era excretado por la orina, pero con su poder coagulante retenido.-

Eley, Green y Mc Khann en 1936(29) prepararon fracciones activas extrayendo sucesivamente placentas frescas con solución salina isotónica fría y con agua destilada levemente alcalina; después de filtrar y centrifugar el extracto llevaron a pH 5 con ClH 0.1 N y el precipitado así obtenido disuelto en agua destilada, lo ajustaron a pH 7.5.-

Existe una gran diferencia entre esta fracción coagulante de la placenta humana y la solución de anticuerpos ("Placental extract immunizin" o immune globulin) preparado por Mc Kahn y sus asociados (54 y 55) usada para prevención del sarampión y rica en anticuerpos para poliomielitis, escarlatina y difteria. La fracción coagulante está presente sólo en los extractos salinos de placenta, mientras que los anticuerpos inmunizantes se encuentran en los tejidos y en el suero placentario (29).

El principio que activa la coagulación de la sangre es una globulina muy insoluble, que precipita fácilmente a pH 5 y pierde rápidamente su potencia en soluciones ácidas o alcalinas. Esta preparación, activa aún en concentración de 1: 10000, pierde su propiedad por pasaje a través de filtros Berkefeld o Seitz.

Se comprueba además un cierto grado de especificidad para las especies de las cuales derivan las preparaciones, pues trabajando con plasma humano son más efectivas las fracciones coagulantes de placenta, mientras que los extractos de pulmón vacuno reducen más rápidamente el tiempo de coagulación del plasma bovino.-

Mientras los extractos de tejidos animales acortan el tiempo de coagulación de los hemófilicos durante breves perio-

dos, los extractos humanos placentarios conservan su efecto sobre sangre capilar y venosa desde 48 horas hasta 9 días. Inyectados intravenosamente a conejos, cobayos y monos provocan la muerte inmediata del animal, pero cuando la inyección es subcutánea, intramuscular o intraperitoneal o se administran por vía oral en pequeñas dosis, se observa un acortamiento notable del tiempo de coagulación. En terapéutica el uso de estos preparados placentarios tiene la ventaja de que contienen material humano solamente, por lo tanto no se introducen proteínas heterólogas cuando se los añade a las fracciones proteicas del plasma humano.

La sección coagulante local del extracto de placenta humana es muy importante en el tratamiento de los hemofílicos y de ciertos traumatismos y hemorragias post operatorias de individuos normales.-

Mc Gavaok (1940) (53) cree que el factor coagulante placentario no está relacionado química o farmacológicamente con ninguna hormona femenina. Respecto a la administración del principio activo por vía oral si bien es ventajosa porque pueden utilizarse rápidamente grandes dosis de material, señala las siguientes desventajas: 1°) grandes variaciones en el dosaje efectivo
2°) peligro de acumulación que provocaría una acción inversa en el organismo
3°) tendencia a la coagulación intravas-
cular cuando pasa material al aparato circulatorio, lo que excluye su uso parenteral en casos de emergencia.

Edsall, Ferry y Armstrong(1944) (28) proponen utilizar la tromboplastina extraída de placenta humana para la determinación del tiempo de protrombina

Zondek y Filkestein(1945) (92) investigan nuevamente la actividad coagulante de extractos de placenta y opinan que la sustancia activa tiene las propiedades de una verdadera tromboplastina. La actividad de preparados recientemente obtenidos sobre plasma fresco, no se modifica cuando se los calienta 5 minutos a 98° C; en cambio si se usa plasma almacenado varios días en una refrigeradora, se observa que la tromboplastina calentada es menos activa que la no calentada. La actividad del preparado calentado no se altera si se lo conserva en heladera.-

De acuerdo a éstas y otras experiencias, los autores creen que la tromboplastina está formada por dos componentes; uno termoestable(I) y otro termolábil (II) El componente I que subsiste despues de calentamiento a 98° C durante cinco minutos, es capaz de actuar sobre el plasma en el cual los componentes de la protrombina(partes A y B de Quick) estan intactos (ej. plasma fresco citratado), pero no actúa sobre el plasma cuyo componente A se ha destruido)(Plasma almacenado).Los componentes I y II juntos presentes en la tromboplastina no calentada, actúan sobre plasma oxalatado almacenado, y activan el componente B de protrombina. Luego la parte termoestable de la tromboplastina(I) activa el componente A de protrombina, mientras que el componente B puede ser activado por las partes I y II juntas o por la parte termolábil solamente.-

Los autores usan y recomiendan la tromboplastina placentaria para los siguientes fines:

- 1) para determinación del tiempo de protrombina.

- 2) como hemostático local
- 3) para fijar transplantes en injertos de tejidos
- 4) para inyección en el hombre, puesto que estas preparaciones sólo contienen proteínas homólogas.

Pavlovsky, Arbona, y Dumas (69) realizaron recientemente interesantes pruebas para verificar los resultados señalados anteriormente.-

La acción hemostática local y la actividad coagulante in vitro de placenta total fresca y desecada y de las distintas fracciones separadas (pulpa cordon, membranas) , es realmente significativa.-

La utilización del polvo de placenta total por vía oral no dió los resultados esperados. Estos autores aconsejan el empleo de polvo de placenta desecada directamente en las hemorragias de pacientes hemofílicos y no hemofílicos.-

C A P I T U L O VI

PARTE EXPERIMENTAL

Introducción

La proteína tromboplástica extraída de pulmón vacuno y humano ha sido estudiada en estos últimos años en todos sus aspectos y propiedades, buscando una luz para aclarar el intrincado problema de la hemofilia. Extractos humanos placentarios también han sido objeto de pacientes investigaciones.-

No se sabe hasta el presente con seguridad si este factor extraído de las células animales mediante soluciones salinas y dotado de propiedades termolábiles, es el mismo en los diferentes órganos y en las distintas especies animales.-

En el presente trabajo se estudiaron las similitudes y diferencias en la constitución química de tromboplastinas obtenidas apartir de distintos órganos(pulmón y placenta vacunos) y del mismo órgano de diferente origen(placenta humana y vacuna); no se abarcaron momentáneamente las propiedades inmunológicas. Se ensayaron también las propiedades tromboplásticas de extracto de hígado vacuno.-

Después de estudiar detalladamente todos los métodos hasta hoy utilizados para obtener proteínas tromboplásticas puras, homogéneas y muy activas, hubiéramos preferido utilizar en nuestras experiencias preparados obtenidos mediante ultracentrifugación de extractos salinos; también nos parecía muy acertado el método de separación electroforética.-

Empero la falta del material de laboratorio necesario; ultracentrífuga y aparato electroforético de Tiselius, nos ha impedido realizar nuestros propósitos primitivos. Posteriormente pudimos disponer de una centrífuga International equipada con dispositivo Multispeed, pero la ausencia en ella de un sistema refrigerador provocaba un excesivo calentamiento, con lo que se perdía parte de la actividad coagulante de los extractos centrifugados.-

Debido a las dificultades mencionadas nos vimos obligados a adoptar el método de Erwin Chargaff(18) de obtención de proteína tromboplástica, mediante sucesivas precipitaciones de extractos salinos, con sulfato de amonio. Usando este método, el citado investigador ha obtenido preparados muy activos a partir de pulmón humano y vacuno y de placenta humana. Nosotros ensayamos el método de Chargaff para preparar tromboplastina de placenta e hígado vacunos y repetimos sus experiencias con pulmón vacuno y placenta humana.-

Una vez obtenida la proteína liofilizada y seca y después de comprobar su actividad coagulante sobre sangre hemofílica, se nos presentó como problema de interés el estudio y fraccionamiento de sus fosfolípidos, y a que los fosfátidos de tejidos animales tienen importantes propiedades tromboplásticas.-

Cohen y Chargaff en 1941 aislaron los fosfátidos de tromboplastina de pulmón vacuno y realizaron su fraccionamiento; en 1945 Chargaff(18) separó los fosfolípidos de proteína tromboplástica de pulmón humano y vacuno y de placenta humana.-

En este trabajo repetimos la separación de los fosfolípidos de tromboplastina de pulmón vacuno y de placenta humana. Separamos también los fosfátidos de proteína tromboplástica de placenta vacuno y los estudiamos especialmente.-

Con objeto de realizar un estudio comparativo repetimos las experiencias de Chargaff y siguiendo el mismo método, realizamos el fraccionamiento de los fosfátidos de proteína tromboplástica obtenida de placenta humana y vacuna.-

Estudiamos también la influencia del factor tiempo en la conservación de las propiedades coagulantes de proteína tromboplástica de pulmón vacuno y las modificaciones químicas que experimentan estas preparaciones, cuando se dejan a temperatura ambiente durante un tiempo determinado.

La preparación de proteína tromboplástica de placenta vacuna, la separación y estudio de sus fosfolípidos, el fraccionamiento de los fosfátidos de proteína tromboplástica de placenta humana y vacuna, así como el estudio de la influencia del factor tiempo en la constitución química y actividad coagulante de la tromboplastina de pulmón, vacuno, son una novedad en la materia y constituyen nuestra contribución al conocimiento de la proteína tromboplástica.

Experiencia I: EXTRACCION, PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE PREPARACIONES DE PROTEINA TROMBOPLASTICA OBTENIDAS DE PULMON VACUNO. SEPARACION Y FRACCIONAMIENTO DE LOS FOSFATIDOS.-

Extracción

Se realiza según el método de Chargaff, para lo cual se limpia y demenuza pulmón fresco y se extrae con solución fisiológica durante 24 horas en la cámara frigorífica. Se filtra a través de gasa y el filtrado se satura con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 10 %; se deja descansar 10 minutos y se centrifuga a 2000 revoluciones por minuto, durante 15 minutos. El sobrenadante se satura con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 30 % y se deja en la cámara frigorífica durante 15 horas. Al día siguiente se centrifuga a 5000 revoluciones por minuto durante 1 hora. El precipitado obtenido que contiene la tromboplastina, se diluye en solución fisiológica y se dializa durante un día o más contra agua destilada. Se centrifuga, lava, liofiliza y seca. Para tener idea del rendimiento de la operación consultar Tabla I.

T A B L A I

Obtención de Tromboplastina de Pulmón Vacuno

Pulmón	Vacuno	Proteína Tromboplástica (liofilizada y seca)
de 2.735	Kg.	se obtienen 8.6 gr
" 2.5	"	" " 8 "
6	"	" " 22 "
" 10	"	" " 56 "
" 3.5	"	" " 12 "
" 10	"	" " 48 "
" 3.7	"	" " 15 "

Propiedades

Los porcentajes de N y P y la actividad coagulante de varias preparaciones de proteína tromboplástica están consignados en la Tabla II. La curva que expresa la relación entre el valor tromboplástico y la concentración de Proteína Tromboplástica de Pulmón Vacuno, está representada en el Gráfico I.

T A B L A II

Proteína Tromboplástica de Pulmón Vacuno

Preparación N°	N %	P %	N:P	Acorta el tiempo de coagulación de sangre hemorrágica
1	11.3	0.91	27.7	de 50' a 1' 36"
2	11.27	0.9	27.7	de 45' a 3' 45"
3	11.5	0.95	26.9	de 1 h.15' a 2' 55"
4	11.22	0.9	27.5	de 75' a 2'
5	11.1	0.86	28.8	de 30' a 80"
6	11.7	0.98	26.7	de 30' a 1' 47"

Los lípidos se extraen de la tromboplastina entera con alcohol eter según el método de Bloor. La determinación de colesterol se hace por el método de Grigaut; se disuelve el colesterol anteriormente extraído en cloroforno y se dosa por colorimetría. por medio de la reacción de Liebermann.- Burchard. La comparación en el colorímetro de Duboscq es bastante dificultosa, pues el color que desarrollan las muestras es apreciablemente distinto

del de la solución testigo.- Se hizo la determinación cualitativa de pentosa con la reacción de Lejbaum y de desoxipentosa por la reacción de Dische. Se encontró reacción negativa de desoxipentosa y reacción netamente positiva de pentosa. Con el objeto de valorar cuantitativamente esta última para expresar los resultados en ácido nucleico, suponiendo que toda la pentosa está en forma de este ácido, se efectúa la reacción comparando las respectivas coloraciones desarrolladas, con las obtenidas de una serie de diluciones de ácido nucleico de levadura.-

T A B L A III

Proteína Tromboplástica de Pulmón Vacuno

<p>Colesterol</p> <p style="text-align: center;">3.9 %</p>	<p>Acido Nucleico</p> <p style="text-align: center;">2.9 %</p> <p>(Acido Ribonucleico)</p>
--	---

Determinación de Nitrógeno

La determinación de N se hace por el método de Kjeldahl en semimicro escala.-

Reactivos: Agua destilada libre de CO₂

Solución de ácido bórico; (10 gr. en 500 c.c. de agua)

Solución de ClH o SO₄H₂ N/100

Indicadores

a) Solución de Rojo de Metilo; 0.1 gr. de rojo de metilo en 100 c.c. de alcohol 95 %.

b) Indicador mixto: 0.1 g. de Azul de Metileno en 200 c.c. de sol. anterior.

Técnica

Carbonización. 0.5 c.c. de material (depende del % de N) se carboniza con 2 c.c. de SO_4H_2 + 1 gr. de SO_4K_2 + 10 g. de SO_4Cu al 25 %. Se calienta muy lentamente y despues que toma color verde se hace hervir una hora y media. Se deja enfriar lentamente y se toma con 10 c.c. de agua destilada libre de CO_2 .

Destilación 5 c.c. de sol. de ácido bórico purísimo se pone en un erlenmeyer de 500 c.c. con tres gotas de indicador mixto; se conecta al dispositivo de destilación. La llegada del NH_3 se reconoce por el cambio de color del indicador(rojo vinoso o verde níquel). Desde ese momento se destila 5' luego se baja el erlenmeyer y se destila un minuto más. Se lava el tubo con agua privada de CO_2 y titula con ácido hasta color del test de dilución.-

Test de Dilución 5 c.c. de sol. de ácido bórico se diluyen en 25 c.c. de agua privada de CO_2 y se agrega la misma oantidad de indicador que la empleada en la determinación.-

Determinación de P

Se emplea la técnica seguida per Pregl (14 de IV)

Reactivos sulfo- molibdicco

Cincuenta gramos de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en 500 ml. de NH_3H ($d=1.36$); 150 gramos de molibdato de amonio se disuelven en 400 c.c. de agua hirviente y se enfría. Esta solución se agrega lentamente a la anterior; la mezola se diluye a 1 litro, se deja en reposo tres dias y se filtra a través de un filtro ordinario a una botella de vidrio oscuro que se guarda en la oscuridad y en sitio fresco.-

Acido Nítrico con sulfúrico- 30 ml. de SO_4H_2 (d = 1,84) se vierten en 1 litro de NO_3H (d = 1,19- 1,21)

Solución de $NO_3(NH_4)$ -Nitrato de Amonio.puro al 2 %-(Débilmente nítrica).

Alcohol: 95;96 %.

Acetona: libre de aldehido.

SO_4H_2 ; d = 1,84.

NO_3H ; d = 1.4

Peróxido de hidrógeno libre de ácido.

Agua destilada.

Destrucción de Materia Orgánica

La sustancia orgánica se destruye por ebullición con una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico, que oxida el P a ácido fosfórico.-

La sustancia se pesa en un pesafiltro, se pasa a un baloncito micro Kjeldahl y se añaden: 0.5 ml. de SO_4H_2 (d = 1.84) y 4 - 5 gotas de NO_3H (d \approx 1.4); se calienta con llama pequeña hasta vapores sulfúricos y se repite el proceso dos veces; si después de enfriar, la solución no es clara, se añade 4-5 gotas de perhidrol y se vuelve a calentar hasta humos. Esto se repite hasta que la solución sea clara.-

Precipitación

Después de la destrucción se deja enfriar, se agregan 3 ml. de agua destilada, se hierve tres minutos para producir la hidrólisis y se deja enfriar. Se agrega luego 2 ml. de mezola ní-

-trico-sulfúrica, se lleva a 15 ml. con agua destilada y se coloca en un baño hirviente. Se retira el tubo y se agregan 15 ml. de reactivo, se agita y se deja 24 hs. Luego se filtra, se lava alternadamente con la sol. de NO_3NH_4 y alcohol y finalmente con acetona y alcohol. Se pesa.-

Determinación de la Actividad Tromboplástica

Diez miligramos de Proteína Tromboplástica se suspenden en un mililitro de solución fisiológica; un tubo de ensayo con 0.1 ml. de esta suspensión se coloca en un baño a 37°C y se le agrega rápidamente un mililitro de sangre extraída en el momento. Los ensayos se hacen por duplicado. Se toma simultáneamente el tiempo de coagulación de sangre del paciente sin sustancia coagulante, para control.-

Determinación del ácido Desoxi-Ribonucleico en órganos de animales

(Según Dische. Mikrochem. 8, 4-1930)

Un gramo o mejor aún dos gramos de órgano se pesan y se cortan fino con una tijera. La papilla se suspende en cinco veces la cantidad de pepsina ácida al 1 % (1,10 N ClH) y se deja una hora a 40° en estufa, terminada la digestión se centrifugan las partículas suspendidas y se las vuelve a suspender en 5 c.c. de hidrato de sodio N.-

La suspensión se pasa cuantitativamente a una probeta y se completa todo a 10 c.c. Se calienta todo dos horas a B.M. hirviendo, completando de cuando en cuando el agua que hace falta para mantener en 10 c.c. la suspensión. Terminado el calentamiento se saca del baño maria hirviendo y se añaden 0.3 c.c. de ácido acético glacial. Se deja reposar unas horas y se filtra.-

Una parte alícuota se coloca en un tubo de centrifuga y se trata con 3-4 veces su volumen de alcohol absoluto. Se deja por la noche y el centrifugado se disuelve en agua destilada y en la solución se determina el ácido desoxiribonucleico como se verá después. Las soluciones del precipitado del alcohol son a veces amarillas y deben compensarse.-

Reactivo Na 400 c.c. de una solución de difenilamina al 1 % en ácido acético, se añaden 11 c.c. de ácido sulfúrico d.1.84

Procedimiento A una parte de la solución conteniendo el ácido nucleico se le añaden dos partes del reactivo, se calienta tres minutos a baño maría hirviendo y se enfría con agua.-

Se puede determinar el color después de varias horas. La concentración más útil en nucleico es de 0.05 % a 0.1 %.

Determinación de acidoribonucleico según Meibaum, Z.Physiol. Chem. 258,117(1939)

Reactivo Añadir una solución de tricloruro de hierro a ácido clorhídrico concentrado, de tal manera que la concentración llegue a 0.1 % de la sal de hierro. Guardado en frascos esmerilados se conserva indefinidamente.-

La orcina se añade en el momento de emplear el reactivo, en la proporción de 10 mg. por c.c. de la solución ácida.-

Procedimiento Se emplean tubos de ensayo graduados de 2,4 y 6 c.c. En uno de estos tubos se colocan 0.5 c.c. de la solución a dosar, exactamente medidos- y 0.5 c.c. del reactivo y se calienta 20 minutos a baño maría hirviendo. Se lleva todo con agua a 2 c.c. y se mide. Las otras graduaciones sirven para trabajar con otras cantidades.

Para la comparación usamos el colorímetro de Klett-Sumner-son con filtro rojo.-

T A B L A I V

Fracciones	Sangre + Tromboplastina	Plasma + Proteína Trom- boplástica + Ca
1	50 "	50 "
2	56 "	<u>60</u> "
3	80 "	80 "
4	90 "	100 "
5	125 "	120 "
	Tiempo Coagulación = 40'	Recalcificado; 4'30" Tiempo Protrom- bina = 19 "

Fraccionamiento de Fosfátidos

En el lapso de un mes se obtienen 30 gr. de proteína tromboplástica liofilizada y seca. Esta cantidad, formada por varias porciones cuyos valores tromboplásticos parciales se consignan en la Tabla IV, se conserva en la congeladora y en desecadores para evitar su inutilización. Se lava con acetona para extraer los esteroides, ésteres de esteroides, glicéridos y demás impurezas, comprobándose una disminución del 21 % de su peso inicial. El residuo seco después del tratamiento con acetona, se extrae con mezclas de alcohol y éter para aislar los fosfolípidos de la lipoproteína. Con ese objeto, se hierve a reflujo con dos porciones de 800 c.c. de alcohol-éter(1:1) durante 6^u hs. no continuas, según indican Cohen y Chargaff.-

El extracto se evapora a vacío; pesa 5 gramos lo que corresponde a un 16.6 % de proteína tromboplástica total. El residuo se disuelve en éter tibio y por enfriamiento prolongado de esta solución se obtienen un precipitado blanco que se centrifuga, lava con éter helado y seca en vacío. Se disuelve luego en cloroformo, se filtra la solución y se precipita con 3 volúmenes de acetona. Se deja una noche en la refrigeradora y luego se centrifuga obteniéndose 1,523 gr de un precipitado blanco que es la Fracción 1; se deja muestra para análisis y el resto se disuelve en 15 c.c. de ligroína-alcohol absoluto (5:1) y se precipita con 4^u c.c. de alcohol absoluto; se enfría, centrifuga y lava con alcohol frío. Se seca y obtiene la Fracción 1 a

El sobrenadante y los líquidos de lavado se evaporan y el

residuo se disuelve en acetato de etilo caliente; un enfriamiento-prolongado de esta solución da un polvo blanco que es la Fracción 1 b

El sobrenadante de la Fracción 1 se concentra a pequeño volumen y se precipita con tres volúmenes de acetona; al enfriar precipita un polvo blanquecino que seco pesa 1,352 gramos y que es la Fracción 2. El sobrenadante de la Fracción 2 se evapora a seco y se precipita con acetona de una pequeña cantidad de éter. Es la Fracción 3 que pesa a 0.85 gr. y tiene color blanco grisáceo.--

El sobrenadante de la Fracción 3 se evapora a sequedad, obteniéndose a 0.523 gr. de una pasta marrón que es la Fracción 4. El esquema que sigue aclara esta marcha.--

E S Q U E M A

(*) 8 gr) Tromboplastina liofilizada(P,N)

lavar con acetona

extraer con dos porciones de 200 c.c.
de alcohol- eter (1:1) 60 horas

Residuo

Extracto

Evaporar en Vacio

Residuo

Disolver en eter tibio

Enfriar

Centrifugar el precipi-
tado

Lavar con éter helado

Polvo blanco

Disolver en cloroformo

Filtrar la solución

Precipitar con tres vo-
lúmenes de acetona

Sobrenadante 1

concentrar

♦ 3 vol. de acetona

enfriar

Fracción 2

Sobrenadante 2

Evaporar a
seco

Disolver en
eter

Precipitar
con acetona

Sobrenadante
3

Evaporar a
seco

Fracción 4

Fracción 1

a todas las
fracciones
P,N, I.I
T.C.

Disolver en 3 c.c. de
ligroína alcohol abso-
luto (5:1)

precipitar con 8 c.c. Sobrenadan-
de alcohol absoluto → te

enfriar

y

Lavar con alcohol frío → Líquidos
y centrifugar de lava-
do

Secar

Evaporar

Fracción 1 a

Fracción 1 b

En la tabla V figuran los porcentajes de N y P los índices de iodo (método de Rosenmund-Kuhnenn) y la actividad coagulante de cada una de las fracciones obtenidas.

T A B L A V

Fraccionamiento de Fosfátidos de Proteína Tromboplástica de Pulmón Vacuno

Preparación	N %	P %	N:P	I.I	Acorta el Tiempo de Coagulación de Sangre Hemofílica.-
Proteína Tromboplástica entera	11.3	0.91	27.7		de 30' a 1' 44"
Proteína Tromboplástica tratada con acetona	12.78	0.93	31.3		de 65' a 4' 20"
Proteína Tromboplástica tratada con alcohol-eter	14.5	0.32	10.3		de 65' a 20"
Fosfolípidos en bruto	2.12	2.55	1.8	71.6	A los 45' de una prueba realizada con sangre hemofílica de 2 hs. de tiempo de coagulación, ésta no había coagulado
Fracción 1	2.2	3.53	1.3	14.3	
Fracción 1 a	2.07	3.15	1.5	12.5	
Fracción 1 b	2.3	3.88	1.3	13.5	
Fracción 2	2.22	3.42	1.4	38.6	
Fracción 3	2.03	2.63	1.7	39.8	
Fracción 4	1.71	1.52	2.5	46.7	

Experiencia II: PROPIEDADES DE PREPARACIONES DE PROTEINA TROMBO -
PLASTICA DE PULMON VACUNO DEJADAS CUATRO MESES A TEMPERATURA
AMBIENTE EXTRACCION Y ESTUDIO DE SUS FOSFATIDOS

Veintiocho gramos de proteína trombo-plástica de pulmón vacuno liofilizada y seca; dejada cuatro meses a temperatura ambiente se lavan con acetona con lo que se pierde, un 22 % del peso original. Hirviendo 60 hs. con alcohol-éster(1:1) se extraen 5,79 gr. de fosfolípidos, cuyo análisis consta en la Tabla VI

T A B L A V I

Extracción de Fosfátidos de Proteína Trombo-plástica
de Pulmón Vacuno dejada cuatro meses a temperatura
ambiente

Preparación	N %	P %	N:P	I.I	Acorta el tiempo de Coagulación de Sangre Hemofílica.
Proteína Trombo-plástica	11.37	0.91	27.6		de 90" a 2' 8"
Proteína Trombo-plástica tratada con acetona	13.1	0.94	31		de 90' a 2' 6"
Proteína Trombo-plástica tratada con alcohol-éster	15.63	0.35	111		de 65' a 20"40"
Fosfolípidos en bruto	2.11	2.98	1.5	30.8	de 65' a 18'

Experiencia III EXTRACCION, PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE PREPARACIONES DE PROTEINA TROMBOPLASTICA OBTENIDAS DE PLACENTA VACUNA-SEPARACION, ANALISIS Y FRACCIONAMIENTO DE LOS FOSFATIDOS

Extracción

Se emplea como en las experiencias anteriores el método de F.Chargaff.

El extracto salino tiene pH casi neutro; la mezcla de proteínas que contiene el principio activo precipita bastante rápido y muy fácilmente, después de saturar al 30 % con $SO_4(NH_4)_2$. Los rendimientos de la operación pueden verse en la Tabla VII

T A B L A VII

Obtención de Tromboplastina de Placenta Vacuna

Placenta Vacuna	Tromboplastina (liofilizada y seca)
de 7 Kg.	se obtienen 32 gr.
" 8.5 "	" " 38 "
"20 "	" " 78 "
"12 "	" " 49 "
"24 "	" " 83 "
"22 "	" " 80 "

Propiedades

Los porcentajes de P y N, los I.I y las propiedades coagulantes de preparaciones de Proteína Tromboplástica de placenta vacuna obtenidas según el método de Chargaff, constan en la Tabla III.

T A B L A VIII

Proteína Tromboplástica de Placenta Vacuna

Preparación N°	N %	P %	N:P	Acorta el tiempo de coagulación de sangre hemofílica.
1	11	0.66	37.1	de 50' a 1'
2	11.34	0.7	36.3	de 1 h.30' a 7' 52"
3	11.8	0.73	36.5	de 50' a 5' 30"
4	12.14	0.74	37.3	de 80' a 2' 39"
5	11.38	0.70	36.8	de 80' a 2' 16"

En el gráfico 1 está representada la curva que indica la relación entre la actividad tromboplástica y la concentración de este tromboplastina.

La determinación de colesterol se efectúa como indicamos anteriormente.

Se determina cualitativamente pentosa con la reacción de Mejbaum; para expresar los resultados como ácido nucleico, se comparan las coloraciones obtenidas con las desarrolladas por una serie de diluciones de ácido nucleico de levadura.

T A B L A IX

Proteína Tromboplástica de Placenta Vacuna

Colesterol

3.39 %

Acido Nucleico

3 % (Ribonucleico)

GRAFICO N°1

Proteína Tromboplástica de Placenta Vacuna

Proteína Tromboplástica de Pulmón Vacuno

Proteína Tromboplástica de Placenta Humana

Escala de Tiempo $\frac{1cm}{2min}$

Escala de Concentración $\frac{1cm}{0.03mg}$



Separación de Fosfátidos de Proteína Tromboplástica
de Placenta Vacuna

Setenta y siete gramos de proteína tromboplástica liofilizada y seca se lavan con acetona, obteniéndose un residuo de 61.5 gr. lo que indica una solubilización del 15.7 % de producto inicial. Los fosfolípidos se extraen con 3 litros de alcohol-eter (1:1) durante 60 horas no consecutivas; se obtienen 8.7 gramos de extracto seco que corresponden a un 11.3 % de proteína tromboplástica total. Los datos de N,P I.I y actividad coagulante de estas fracciones pueden verse en la Tabla X

T A B L A X

Preparación	N %	P %	N:P	Tiempo de Coagulación
Proteína Tromboplástica de placenta vacuna	11.71	0.72	36	de 65' a 2' 30"
Proteína Tromboplástica de placenta vacuna más acetona	13.17	0.9	32.4	de 65' a 2' 10"
Proteína Tromboplástica de placenta vacuna más alcohol-eter	15.22	0.3	120	de 65' a 13' 25"
Fosfolípidos	3.12	2.35	3	de 65' a 6' 40"

Análisis de Fosfátidos

Tres gramos trecientos cincuenta y seis miligramos de fosfátido, se saponifican a reflujo con 50 ml. de hidróxido de potasio en etanol (concentración 4 %). Se diluye con 200 ml. de agua y extrae el material insaponificable con éter etílico hasta agotamiento; se obtienen 0.3546 g de insaponificable cuyo índice de iodo se determina por el método de Rosenmund - Kuhunhenn.-

El líquido hidro-alcohólico libre de insaponificable se acidifica con HCl (heliantina) y los ácidos liberados se extraen con éter etílico; el extracto étereo se lava con agua, recupera el solvente y seca a 100° C en estufa de vacío. Se obtiene 1.37 g. de ácidos; se determina el índice de saponificación de estos ácidos y se calcula el peso molecular medio que parece corresponder al de los ácidos en C₂₀.

Los datos de este análisis están consignados en la Tabla XI

T A B L A X I

Fosfátidos de Proteína Tromboplástica de Placenta Vacuna

	% de fosfátidos totales extraí- dos	I.I	I. Japoni- ficación	Peso Molécu- lar medio (calculado)
Insaponifi- cable	10.56	41.1		
Acidos Grasos	40.82	44.7	180.3	311.1 ácidos C ₂₀

Fraccionamiento de Fosfátidos

Se sigue la misma marcha que en la Experiencia I

Se parte de 125 gr. de proteína tromboplástica liofilizada y conservada en congeladora y en desecadores al vacío.

Después de lavar con acetona se obtienen 107 gr. de producto seco, es decir que se ha extraído 14.5 % de peso original. Se hierve a reflujo 65 horas discontinuas con 5 litros de alcohol-éter (1:1) en dos porciones.-

El extracto evaporado a vacío pesa 15.5 gramos que corresponden a 12.4 % en peso de proteína tromboplástica entera. Los porcentajes de N,P. los I.I y la actividad coagulante de las fracciones obtenidas en esta clásica marcha figuran en la Tabla XII

T A B L A XII

Fraccionamiento de Fosfátidos de Proteína Tromboplástica

Preparación	N %	de Placenta Vacuna			Acorta el tiempo de coagulación de sangre hemofílica
		P %	N:P	I.I	
Proteína Tromboplástica entera	11.38	0.71	36.4		de 80' a 2' 15"
Proteína tromboplástica tratada con acetona	13.6	0.96	32.3		de 90' a 2' 20"
Proteína tromboplástica con alcohol - eter	14.95	0.50	117.7		de 65' a 19'
Fosfolípidos en bruto	4	2.12	4.08	43.2	de 2 hs. a 22'
Fracción 1	4.43	2.67	3.6	35.8	A los 50 minutos de una prueba realizada con sangre hemofílica de 2 hs. de tiempo de coagulación aún no había coagulado
Fracción 1 a	3.07	1.72	3.8	21.8	
Fracción 1 b	2.96	2.64	2.5	21.6	
Fracción 2	1.68	0.68	5.2	13.1	
Fracción 3	1.38	0.65	4.6	17.6	
Fracción 4	1.29	0.61	4.8	20.3	
Proteína tromboplástica dejada durante exp.a T. ambiente	11.51	0.69	37.2		de 65' a 14' 25"
Placenta vacuna Fresca					1 hs. 20' 50"

Experiencia IV

Mediante el método de precipitación de Chargaff se preparó a partir de extracto salino de hígado, una sustancia cuyo aspecto físico recuerda a la proteína tromboplástica de pulmón vacuno, pero que carece en absoluto de actividad coagulante; tampoco tiene poder anticoagulante

	<u>Tiempo de Coagulación</u>
Sangre Hemofílica	62 '
Sangre hemofílica más preparado de hígado	62 '

Experiencia V: EXTRACCION PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE PREPARACIONES DE PROTEINA TROMBOPLASTICA, OBTENIDAS DE PLACENTA HUMANA

Extracción: La tromboplastina se obtiene a partir de placentas humanas frescas del día o congeladas.

El pH de extracto salino de placenta humana es 6.6. Después de saturar al 10 % con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ el pH baja a 6.4.-

La proteína tromboplástica precipita impura, saturando al 30 % con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$; el medio tiene pH 6. Se centrifuga 1 hora 20 a 5000 revoluciones por minuto. Se dializa el precipitado 24 horas contra agua destilada; se liofiliza y seca.-

T A B L A XIII

Proteína Tromboplástica de Placenta Humana

<u>Preparación N°</u>	<u>N %</u>	<u>P %</u>	<u>N:P</u>	<u>Acorta el tiempo de coagulación de sangre hemofílica</u>
1	11.05	0.51	48.7	de 2 hs a 2' 55"
2	11.24	0.55	47.04	de 2 hs a 2' 25"
3	11.3	0.55	47.05	de 35' a 2' 30"
4	11.29	0.54	47.05	de 30' a 1' 20"
5	11.57	0.54	47.4	de 30' a 1' 20"

Propiedades

Los porcentajes de N y P y la actividad coagulante de preparaciones de proteína obtenidas de placentas humanas figuran en la Tabla XIII. Ver en gráfico 1 la representación mediante una curva de la relación entre poder coagulante y concentración de proteína tromboplástica de placenta humana.-

Se determina colesterol por el método ya citado. Se determina cualitativamente ribosa y se dosa cuantitativamente ácido ribonucleico, por comparación con diluciones tipo de ácido nucleico de levadura.-

T A B L A XIV

Colesterol	Acido Nucleico
2.76 gr. %	3.2 % (ribonucleico)

Fraccionamiento de Fosfátidos

Ciento quince gramos de proteína tromboplástica de placenta humana, liofilizada y seca se lavan con acetona; se obtienen 95 gr de producto seco, es decir que se ha solubilizado 17.3 % El residuo seco se hierve a reflujo con 5 litros de alcoholéter de (1:1) en dos porciones durante 60 horas discontinuas, para extraer los fosfolípidos. Se obtienen 13.75 gr. de residuo después de evaporar el extracto en vacío, lo que corresponde a 11.9 % de proteína tromboplástica inicial.-

Siguiendo la marcha de E. Chargaff como en las experiencias anteriores, se obtienen las fracciones cuyos porcentajes de N y P, I.I y actividad coagulante están consignadas en la Tabla XV.

T A B L A X V

Fraccionamiento de Fosfátidos de Proteína Tromboplástica
de Placenta Humana

Preparación	N %	P %	N:P	I.I	Acorta el tiempo de coagulación de sangre hemofí- lica.
Proteína Trombo- plástica entera	11.15	0.53	47.05		de 30' a 1' 20"
Proteína trombo- plástica tratada con acetona	12.35	0.70	40		de 70' a 2' 30"
Proteína trombo- plástica tratada con alcohol-eter	14.75	0.2	164		de 98' a 16' 45"
Fosfolípidos en bruto	2.4	2.41	2.2	53.8	de 98' a 15' 10"
Fracción 1	2.21	3.16	1.5	30.9	de 98' a 11'
Fracción <u>1 a</u>	2.74	2.78	2.1	23.6	de 65' a 17' 5"
Fracción <u>1 b</u>	2.64	3.12	1.8	32.5	de 65' a 24'
Fracción 2	2.15	2.21	1.6	44.4	de 98' a 15'
Fracción 3	2.17	2.15	2.08	49.2	de 65' a 18'
Fracción 4	1.36	0.98	3.1	51.3	de 65' a 18' 50"
Placenta humana desezada					de 65' a 1'
Placenta humana fresca					de 65' a 45"

C O N C L U S I O N E S

1°) Se preparó una proteína tromboplástica muy activa de placenta vacuna, capaz de coagular en 2', in vitro, sangre hemofílica con tiempo de coagulación de 80 minutos.

2°) Se obtuvo proteína tromboplástica de pulmón vacuno y de placenta humana, cuyas propiedades químicas y actividad coagulante, coinciden con las halladas por otros autores en trabajos anteriormente mencionados.-

3°) La proteína tromboplástica de pulmón vacuno es bastante estable, pues conserva sus propiedades características después de permanecer cuatro meses en condiciones ambientales. Los porcentajes de N y P no varían apreciablemente con el tiempo; el índice de I experimenta una pronunciada disminución, que no corresponde a ninguna pérdida notable de actividad coagulante.

4°) La proteína tromboplástica de placenta humana es sumamente inestable, pierde actividad durante las manipulaciones químicas, efectuadas y aún conservada en congeladora. La de placenta vacuna es más estable.-

5°) La proteína aislada de hígado vacuno, en condiciones idénticas a las anteriores, no tiene ninguna acción tromboplástica sobre sangre hemofílica, pero tampoco posee actividad anticoagulante.-

6°) A mayor concentración de las tres tromboplastinas preparadas, corresponde mayor poder coagulante sobre sangre hemofílica.

7°) Cuando se extrae parte de los lípidos de las tres proteínas activa con acetona, éstas conservan casi totalmente su poder coagulante, pero cuando se separan de ellas los fosfolípidos con alcohol-éter, pierden prácticamente todo su valor

8°) Se separan los fosfátidos de las tres proteínas activas preparadas; en cada caso, tanto los fosfolípidos aislados como el resto proteico, tienen menos actividad que la tromboplastina entera correspondiente.-

9°) Se estudian particularmente los fosfátidos extraídos de proteína tromboplástica de placenta vacuna. Tienen 10.56 % de insaponificable y 40.82 % de ácidos grasos, cuyo Peso Molecular calculado en 311,11 corresponde a ácidos en C₂₀

10°) Se realiza el fraccionamiento de los fosfátidos extraídos de proteína tromboplástica de pulmón vacuno y placenta humana y vacuna; ninguna de las fracciones obtenidas, tiene mayor actividad que la tromboplastina entera correspondiente.-

11°) La relación N:P es: Proteína Tromboplástica de placenta humana > Proteína Tromboplástica de placenta vacuna
> Proteína Tromboplástica de Pulmón Vacuno

12°) La actividad coagulante es: Proteína Tromboplástica de placenta humana > Proteína Tromboplástica de Pulmón vacuno
> Proteína Tromboplástica de placenta vacuna.-

Las conclusiones 11° y 12° indican que no existiría una

correspondencia entre la actividad tromboplástica y el total de fosfolípidos presentes en la lipoproteína.-

13°) La cantidad de colesterol contenida en tromboplastina de pulmón vacuno es mayor que en la de placenta vacuna; la proteína tromboplástica de placenta humana es la menos rica en este lípido.-

14°) La proporción de ácido nucleico, prácticamente igual en las tres lipoproteínas, oscila alrededor del 3 %; este valor coincide con el hallado por Chargaff en la fracción activa extraída de pulmón vacuno.

15°) El 0.3 % de P que queda en la tromboplastina después de la extracción con alcohol-éter, correspondería a un 3 % de ácido ribonucleico, ya que comunmente se acepta que en este ácido hay un 10 % de P. Parece evidente entonces de acuerdo a 14° y 15°, que el ácido ribonucleico no es separado en absoluto durante aquella extracción.-

Las cifras halladas para proteína tromboplástica de placenta humana no coinciden con este resultado; esta diferencia se explica si se tiene en cuenta que el material es muy higroscópico y que el método de determinación de P no da la aproximación necesaria.-

16°) No se observa una relación significativa entre la no saturación de los ácidos grasos y la actividad coagulante de las Proteínas Tromboplásticas correspondientes.-

Geatrig Alicia Ruiz

BIBLIOGRAFIA

- 1) Arthus. J.Phis. Path. pag. 281 (1902) citado por W.H.Howell. Am.J.Physiol. 31,1(1902)
- 2) Bergmann M. y C.Niemann J.Biol.Chem. 115 77(1936)
- 3) Billing W. Pharmacol. Exp. Therap. 38 173 (1930) citado por C.Chargaff y S.Cohen. J.Biol. Chem. 129 619(1939)
- 4) Bordet J. Ann. Inst. Pasteur. 34-561(1920)
- 5) Bordet J. y Delange L. Ann. Inst. Pasteur 26,657(1912)
- 6) Bordet J. y Delange L. Ann. Inst. Pasteur 27, 341 (1913)
- 7) Brinkhous K.H. Smith, E.Warner y W.Seegers Ann. J.Physiol. 125 9683 (1939)
- 8) Chargaff E. Bancroft F. y Stanley Brown J.Biol. Chem. 116,237 (1936)
- 9) Chargaff E. y S.Cohen J.Biol.Chem. 129 619 (1939)
- 10) Chargaff E. H.Ziff y S.Cohen. J.Biol. Chem. 135 351 (1940)

- 11) Chargaff E. Ziff M. y Cohen S. J.Biol. Chem.136, 257 (1940)
- 12) Chargaff E. M.Ziff y D.Rittenberg J.Biol.Chem.138,439(1941)
- 13) Chargaff E. y M.Ziff.- J.Biol.Chem. 158,787(1941)
- 14) Chargaff E. M.Ziff y D.Moore J.Biol.Chem.139 383(1941)
- 15) Chargaff E.D.Moore y A. Bendich J.Biol. Chem. 145,593 (1942)
- 16) Chargaff E. y A. Bendich J.Biol.Che. 149,93 (1943)
- 17) Chargaff E. Bendich A y S.Cohen.- J.Biol.Chem.156,161 (1944)
- 18) Chargaff E. J.Biol.Chem.161,389 (1945)
- 19) Chargaff E. The coagulation of blood. Advances in Enzymology.Vol.5
- 20) Cohen S. y Chargaff E. J.Biol.Chem.136 243(1940)
- 21) Cohen S y Chargaff E.- J.Biol.Chem.139,741 (1941)
- 22) Cohen S y Chargaff E.- J.Biol.Chem 140, 689(1941)
- 23) Cohen S y W.M.Stanley. J.Biol.Chem.144, 589(1942)
- 24) Dische Mikrochem.8,4 (1930)
- 25) Eagle H. J.Gen.Physiol.18,547 (1935) citado por Howell W. Physiol. Rev.15 -16 (435 (1935-36)
- 26) Eagle H y Harris T. J.Gen.Physiol.20,543 (1937) citado por Howell W. Physiol.Rev. 15 o 16 435(1935-36)

- 27) Eagle H.- J.Exp.Med. 65,618 (1937)
- 28) Edsall J., Ferry R. y Armstrong H.Jr. J.Clin.Inv. 23,557(1944)
- 29) Eley C. Green A. y Mc Kahn Ch. J.Ped. 8, 135(1936)
- 30) Fischer A. Biochem.Ztschr. 264,169-178-184
(1933) 269,115(1934)
- 31) Folch J. y Schneider H. J.Biol.Chem.137,51 (1941)
- 32) Folch J. J.Biol.Chem.146,35 (1942)
- 33) Fonio A. Mitt a d.Grenzgeb.d.Med. un Chir.
28,313(1914) citado por Pavlovsky
A. en Consideraciones patogenéticas
de la hemofilia.
- 34) Fuld E. y Spiro K. Hofmeister's Beiträge 5,174(1904)
citado por Howell W. Physiol.Rev.
15-16, 435(1935-36)
- 35) Hammarsteu O. Pflüger's Arch. 19,563(1880) y 30.
437 1883.Ztschr f. Physiol.Chem.
22,333(1896) citado por Howell W.
Physiol.Rev. 15-16, 435 (1935)1936
- 36) Hirose R. Am.J.Physiol.107,693 (1934)
- 37) Hirschfeld L y Klinger R. Biochem.Z. 70, 398 (1915) citado
por E.Chargaff y S.Cohen.J.Biol.
Chem.129,619 (1939)
- 38) Holingren H. y Wilander O. Ztschr. 42,242 (1937) citado por A.
Pavlovsky Consideraciones patogéné-
ticas de la hemofilia.

- 39) Hori E y Sakurai K. Sei-i Kwaf. M.H. 49,21(1930 citado por Eby, Green y Mc Kahnn. J.Ped. 8,135 (1936)
- 40) Houssay B. y Sordelli A. An.Soc. Quim.Arg. 5 141,(1917)
- 41) Houssay B. y A.Sordelli Rev. Inst. Bact. 1,486 (1917-18)
- 42) Houssay B. y Sordelli A. Rev. Asoc. Med. Arg. 31,70(1919)
- 43) Howell W.H. Am.J.Physiol.31 1 (1912)
- 44) Howell W.H. Am.J.Physiol.40, 526 (1916)
- 45) Howell W.H. Proc. Inst. Med. Chicago (1925)
- 46) Howell W.H. Am.J.Physiol.71, 553(1924-25)
- 47) Howell W.H. Physiol.Rev. 15-16, 435 (1935-36)
- 48) Howell W.H. Hemophilia Bull.N.J.Acad.Med. 15, 3(1939)
- 49) Jorpes E. y Bergstrom S.- J.Biol.Chem.118,447 (1937)
- 50) Link T. Z.Immunitäts forsch u. exp. Therap-35,504(1935) citado por E.Chargaff y S.Cohyen J.Biol.Chem.129,619 (1939)
- 51) Louck M. y Scott F. Am. J.Physiol.91,27(1929)
- 52) Mc Farlane S.A. S.Nature 149,439(1942) citado por E. Chargaff, Bandich A y Cohen S. J.Biol. Chem.156,161(1944)
- 53) Mc Cavaok Med. Clin.of North.Am.24,791(1940)

- 54) Mc Kahn C y Chu Fu Tang J.Infect. Dis. 52,268 (1933)
citado por Eby Green y Mc Kahn
J. Ped. 8, 135(1936)
- 55) Mc Kahn C. Green A y Coady H. J.Ped. 6,603 (1935)
- 56) Mc Lean J. Am.J.Physiol.41-250 (1916)
- 57) Mc Lean J. Am.J.Physiol. 43,686 (1917)
- 58) Meysbaum Z.Physiol.Chem.258,117(1939)
- 59) Mellanby J. J.Physiol.38,28 (1909)
- 60) Mertz E. Seegers W.H. Smith P. Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 41,
657(1939)
- 61) Mertz E. Seegers W.H. Smith P. Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 42
604 (1940)
- 62) Mills C.A y Guest G. Am.J. Physiol.57,395(1921)
- 63) Mills C.A y Mathews A.P. Arch. Internat. Physiol. 24, 73(1924)
citado por Howell W. Physiol.Rev.
15-16,435(1935-36)
- 64) Minot G. y Lee R. Arch.Int. Med.18,474(1916) citado
por A.Mavlovsky-Consideraciones pa-
tonéticas de la hemofilia.-
- 65) Morawitz P. Hofmeister's Beitr.5,174 (1904)
Arch. f.Klin.Med. 79,215 (1904)
citado por Howell W. Physiol.Rev.
15-16 435 (1935-36)
- 66) Noff P. Arch.Internat. Physiol.4 165(1906)
citado por Howell W. Physiol.Rev.
15-16,435 (1935-36)

- 67) Pavlovsky A. Consideraciones patogénicas de la hemofilia .Año 1947
- 68) Pavlovsky A. Contribución to the pathogenesis of hemophilia(copy from blood) Vol.2 N° 2, 185,191(1947)
- 69) Pavlovsky A. Arbone C.S. de y Dumas L. El día Médico Año 19 N° 9,(1947)
- 70) Pekelharing C.A. Untersuchungen ü d. Filtriervermögen Amsterdam (1892) citado por Howell W.H.Physiol.Rev. 15-16 435(1935-36)
- 71) Pickering J.W. Brit. J.Exp.Biol.,2397 (1925); Blood plasma in health and disease London (1928) citado por Howell W. Physiol. Rev. 15-16,435(1935-36)
- 72) Pregl. Quantitative organic microanalysis.
- 73) Quick A. Am.J.Physiol. 116, 535(1936)
- 74) Quick A. Am.J.Physiol.125,712(1938)
- 75) Quick A. The hemorrhagic diseases and the physiology of Hemostasis Springfield (1942) citado por A. Pavlovsky Consideraciones patogénicas de la hemofilia.
- 76) Sahli Ztschr. f.Klin.Med. 56 264 (1905) citado por A. Pavlovsky Consideraciones patogénicas de la hemofilia.

- 77) Sakurai K. Sei-i Kwai M.J. 48,52(1929) citado por Eby Green y Mc Kahn J. Ped. 8,135 (1936)
- 78) Schmidt A. Arch. f. Physiol.(1861) Pflüger's Arch. 6: 445(1872) citado por W. Howell Physiol.Rev. 15-16 435 (1935-36)
- 79) Schmidt A. Ann.Inst. Pasteur 27, 341(1913)
- 80) Seegers W. Smith H., Warner E y Brinkhous K. J.Biol.Chem. 123 751(1938)
- 81) Seegers W. Brinkhous K. Smith H y Warner E. J.Biol.Chem.126 91 (1938)
- 82) Seegers W. J.Biol.Chem.136-105(1940)
- 83) Smith H., Warner E y Brinkhous K. Am.H.Physiol.107,63(1934)
- 84) Tocantins L. Federation Proc. I 85(1942) citado por Pavlovsky Consideraciones patogénicas de la hemofilia
- 85) Tocantins L. Am. J.Physiol. 139, 265(1943)
- 86) Warner E. Brinkhous K y Smith H. Am.J.Physiol.114,667 (1936)
- 87) Wöhlisch E. y Paschkis K. Ztschr. Ges. Exp. Med. 40,121 (1924) citado por Howell W. Physic Rev. 15-16,435(1935-36)
- 88) Wöhlisch E. Ergebn d.Physiol.28,46 (1929) citado por Howell W. Physiol. Rev. 15-16, 435(1935-36)

- 89) Wooldrige L.C. Arch. Anat. u Physiol. Abt. 397
(1886) ;Beitz z. Physiol. (1887)
citado por Howell W. Physiol.
Rev. 15-16; 435(1935-36)
- 90) Woolley D.W. J. Biol. Chem. 143, 581 (1943)
- 91) Ziff E. y Chargaff E. J. Biol. Chem. 136, 689 (1940)
- 92) Zondek B y Finkelstein M Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 60-
374(1945)
-
-