

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

*Estudio Químico de la Coagulación
Sanguínea*

La Prueba de Quick

T E S I S

*que para su examen profesional
de Químico Farmacéutico Biólogo
presenta la alumna*

MARIA TERESA PARRA LOPEZ

México, D. F.

1945



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres,

Sr. Ing.

Alfonso A. Parra

y Sra.

María Luisa L. de Parra,

con veneración.

A mis hermanos,

Antonio,

Concepción

y

María Luisa.

*A la sagrada memoria
de mi mamá grande,*

Sra.

Refugio M. Vda. de Parra.

*Al Sr. Dr. en Química
Don Fernando Orozco D.,*

*Químico Farmacéutico
Carlos Herrera Rey*

y

*Químico Farmacéutico
Francisco Noriega.*

Respetuosamente.

A mis tíos,

A mis maestros,

A mis amigos y compañeros.

*Al Sr. Dr. Don
Gustavo Argil*

y

al personal del Laboratorio de Química Sanguínea del Pabellón No. 5 del Hospital General, agradeciendo las facilidades que me otorgaron para llevar a cabo los trabajos requeridos para el presente estudio.

SUMARIO

- I.—Factores químicos de la coagulación sanguínea.
- II.—Mecanismo de la coagulación sanguínea. Teorías clásica y modernas de la misma.
- III.—La prueba de Quick en casos normales.
- IV.—La prueba de Quick en casos patológicos.
- V.—Conclusiones.
- VI.—Bibliografía.

CAPITULO I

FACTORES QUIMICOS DE LA COAGULACION SANGUINEA

Nos hemos alejado ya un poco de la época en que la presencia de los factores de la coagulación eran motivo de duda, diversos estudios y procedimientos se han llevado a cabo para conocer las deficiencias en pacientes con factores hemorrágicos.

Desde que Alexander Schmidt presentó su teoría en 1861, sosteniendo que la trombina no toma parte en la coagulación fisiológica de la sangre, muchos otros autores, entre los que se encuentran Wooldrigge, Nolf, Mills, Stuber y Lange, la han corroborado.

La coagulación de la sangre es un mecanismo complicado, que consiste esencialmente en la transformación del fibrinógeno en fibrina, por medio de un fermento llamado trombina que actúa en presencia de las sales de calcio.

El coágulo que se forma como consecuencia de esta transformación, está constituido por filamentos de fibrina que aprisionan los elementos figurados de la sangre.

Por ser de gran interés, en su conexión con la patogénesis y diagnóstico diferencial de las enfermedades hemorrágicas primarias y secundarias, el mecanismo de la coagulación debe ser estudiado con más detalle.

El proceso es muy complicado y no del todo entendido, y las teorías expuestas para explicarlo son muy confusas; sin embargo, la de Howell es una de las más sencillas y sirve bien de base para los trabajos clínicos. Según esta teoría cinco factores de coagulación se supone que tomen parte.

1.—**Fibrinógeno.**—Es una proteína lábil, que se encuentra en el plasma de la sangre circulante; probablemente se forma en el hígado y es vertido en el torrente sanguíneo en cantidad

suficiente para mantener el porcentaje normal. No ha sido aislado y se le considera como el precursor de los filamentos de fibrina que forman el coágulo visible.

2.—**Protrombina.**—Precursor inactivo de la trombina, existe en la sangre como una globulina. Es una substancia termolábil, que se encuentra normalmente en la concentración requerida.

La cantidad de protrombina en el plasma es constante. En los recién nacidos e infantes la proporción es pequeña, como se afirma en las discusiones acerca de los factores hemorrágicos de los recién nacidos.

En otro tiempo se pensó que la protrombina derivaba de las plaquetas, pero en la actualidad se ha demostrado que éstas no contienen protrombina. Las experiencias de Nolf indican que ésta se forma en el hígado. Su concentración en la sangre disminuye a consecuencia de la deficiencia de vitamina K, que es absorbida en parte por el intestino.

Cerca de cuarenta miligramos de protrombina se obtienen de 100 c.c. de plasma. Un miligramo de ésta, aun cuando se convierte en trombina (por la tromboquinasa), coagula en 20 segundos 100 c.c. de plasma oxalatado.

La protrombina preparada por Mellanby, es un polvo blanco, amorfo y produce las reacciones características de ácido metaproteínico. Es prácticamente insoluble en el agua, pero cuando ésta tiene carbonato de sodio, se disuelve rápidamente.

No es dializable por la membrana de colodión, ni destruída en solución acuosa cuando se calienta a 100 grados C por cinco minutos; sin embargo, este tratamiento reduce su valor, por convertirse en trombina.

La acción de la tromboquinasa, que convierte la protrombina en trombina, es acelerada por la acción de los iones de calcio. El estroncio, el bario y el magnesio, tienen sólo una ligera acción aceleradora.

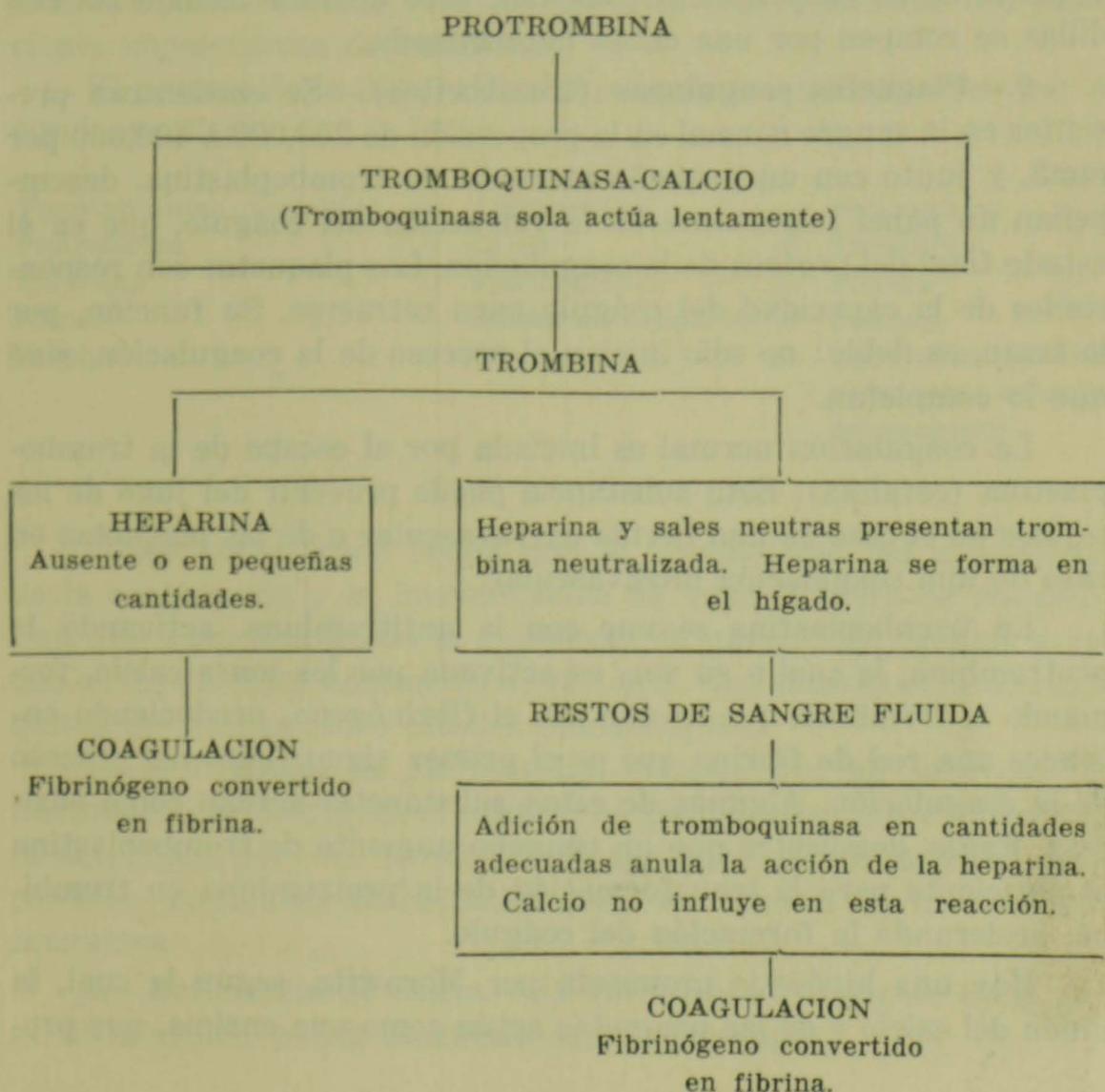
3.—**Antitrombina** (heparina).—Se forma en el hígado, donde existe en grandes cantidades y es vertida en el torrente circulatorio en cantidad suficiente para prevenir la activación de la protrombina.

La heparina no proviene de la conversión de la protrombina,

sino que inactiva esta última después que se ha formado. Cuando la trombina y la heparina, que ordinariamente no causan coagulación, se añaden al plasma dializado, la inactivación depende de la presencia de sales neutras de calcio.

La sangre no debe coagularse intravascularmente, sencillamente porque la tromboquinasa es aprovechada para convertir la protrombina en trombina; cuando ésta y la heparina están presentes en proporciones adecuadas para mantener la fluidez de la sangre, la adición de tromboquinasa causa coagulación, no siendo los resultados influenciados por las sales de calcio.

Mellanby sugiere que el papel de la heparina en los tejidos, es de anticoagulante local, previniendo la coagulación de la sangre en los pequeños vasos.



4.—**Sales de calcio.**—Están presentes en la sangre en una proporción de 10 mg. % . Su función parece ser debida a la liberación de los iones calcio que se unen con la protrombina para formar la trombina.

5.—**Tromboplastina** (cefalina o tromboquinasa).—No se encuentra presente en el plasma sanguíneo, se deriva en cierto grado de las plaquetas después que la coagulación ha comenzado.

Se considera ampliamente repartida en el cuerpo como sustancia intracelular. Los solventes de los lipoides pueden extraer de las plaquetas una sustancia termoestable similar a la cefalina, pero estos extractos no son tan activos como la suspensión de plaquetas.

Algunos tejidos, principalmente cerebro, pulmones y timo, son particularmente ricos en tromboplastina. Esta sustancia aparentemente no se encuentra en libertad, pero aparece cuando las células se rompen por una causa determinada.

6.—**Plaquetas sanguíneas** (trombocitos).—Se encuentran presentes en la sangre normal en la proporción de 300,000 a 400,000 por mm³, y junto con un pequeño aumento de tromboplastina, desempeñan un papel importante en la retracción del coágulo, que es el estado final del proceso de la coagulación. Las plaquetas son responsables de la capacidad del coágulo para retraerse. Su función, por lo tanto, es doble: no sólo inician el proceso de la coagulación, sino que lo completan.

La coagulación normal es iniciada por el escape de la tromboplastina (cefalina). Esta sustancia puede provenir del jugo de los tejidos en el caso de una herida extravascular o de las plaquetas en caso de una coagulación intravascular.

La tromboplastina se une con la antitrombina, activando la protrombina, la cual a su vez, es activada por los iones calcio, formando la trombina, que se une con el fibrinógeno, produciendo entonces una red de fibrina que es el primer signo físico del proceso de la coagulación. Algunas de estas sustancias actúan como enzimas. Eagle demuestra que un pequeño aumento de tromboplastina es suficiente para la transformación de la protrombina en trombina, acelerando la formación del coágulo.

Hay una hipótesis propuesta por Morawitz, según la cual, la unión del calcio y de las plaquetas actúa como una enzima, que pro-

voca la formación de la trombina; en apoyo de tal opinión, está la observación de que la tripsina cristalizada convierte la protrombina en trombina, aunque no coagule el fibrinógeno.

Algunas ponzoñas de serpientes tienen el mismo efecto, ya que éstas y la tripsina cristalizada actúan en ausencia del calcio. Se ha pensado que las plaquetas o su tejido, más el calcio, constituyen una enzima proteolítica.

Por otra parte, Ferguson afirma que la tripsina destruye la proteína del plasma y libera tromboplastina y iones calcio, siendo estos últimos utilizados en la interreacción de la tripsina y la protrombina.

Una combinación de las teorías de la coagulación, de Morawitz y Schmidt, propuesta por Eagle, hace de la coagulación una reacción comparativamente sencilla, que a la vez comprende dos reacciones consecutivas de enzimas.

El proceso de la formación del coágulo se puede ilustrar por el siguiente diagrama:

Tromboplastina (cefalina)	· ·	Antitrombina	=	Protrombina
Protrombina	· ·	Calcio	=	Trombina
Trombina	· ·	Fibrinógeno	=	Fibrina
Fibrina	· ·	Elementos celulares	=	Coágulo
Coágulo	· ·	Plaquetas	=	Retracción del coágulo con cesación del sangrado.

Puede verse desde luego, que la complejidad del mecanismo de la coagulación y la incriminación de gran número de sustancias, son responsables de la existencia de numerosos agentes a los que se les da valor hemostático; aún más, una disminución de cualquiera de ellos produce estados hemorrágicos.

1.—**Deficiencia de fibrinógeno.**—Puesto que se sabe que el fibrinógeno se forma en el hígado, es posible que una enfermedad caracterizada por una marcada destrucción del tejido hepático, proporcione cantidades inadecuadas para su función en la corriente sanguínea.

2.—**Deficiencia de calcio.**—Es raramente vista y se duda que su disminución pueda ocasionar una hemorragia.

3.—Deficiencia de protrombina o vitamina K (Melena Neonatorum).

4.—Deficiencia de tromboplastina.—Es muy rara.

5.—Deficiencia de plaquetas sanguíneas.—Este es el factor más común en las hemorragias, debido a que sin ellas el coágulo no se retrae.

6.—Un retardo marcado en el proceso completo de la coagulación, se presenta a veces a pesar de las relaciones cuantitativas de los componentes normales de la sangre. Eagle cree que la hemofilia se debe a lenta formación de la trombina.

7.—Excesivas cantidades de antitrombina (heparina).

Del estudio de los factores que toman parte en la coagulación normal, es obvio que los estados hemorrágicos ocurran debido a la deficiencia en el proceso, de uno o varios factores:

Primero, puede ser una deficiencia de los elementos ya enumerados y secundariamente a deficiencia de plaquetas, lo que redundaría en perjuicio de la coagulación. Existen causas hemorrágicas debido a una debilidad inherente en el capilar, que puede ser fragilidad por resistencia o permeabilidad, y en semejante circunstancia no hay diferencias en otros de los mecanismos citados.

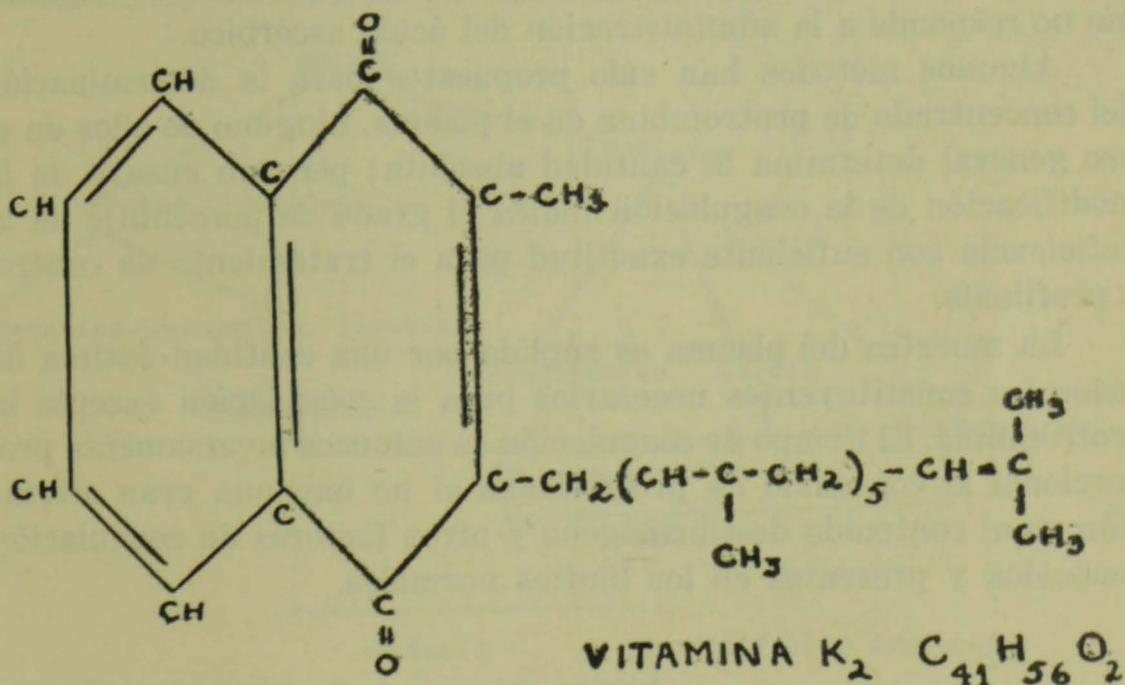
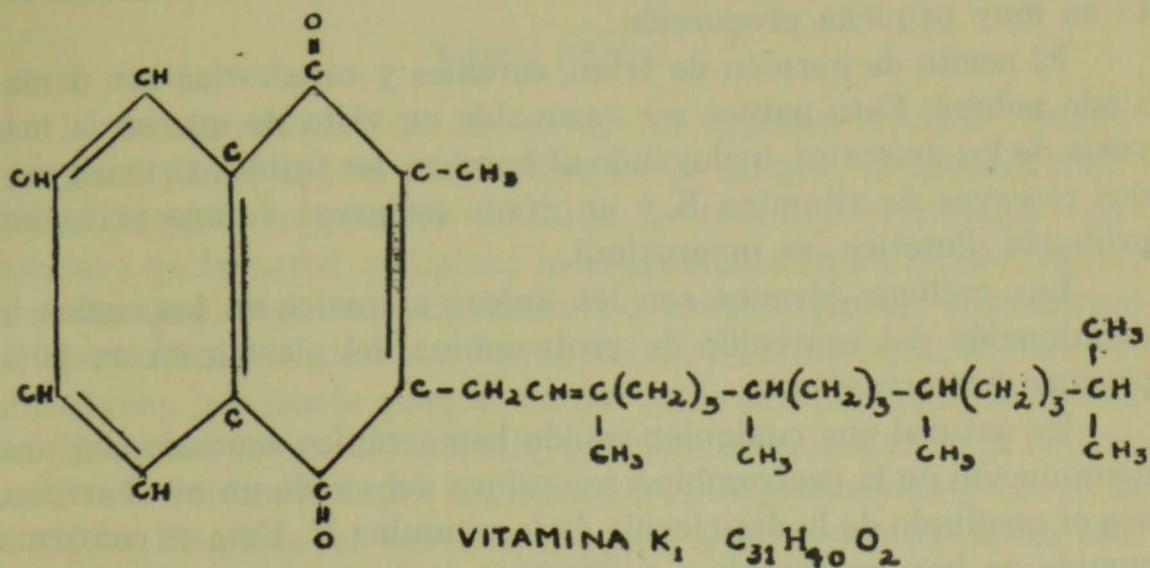
VITAMINA K.—VITAMINA DE LA COAGULACION

Como resultado de las investigaciones hechas en las hemorragias de gallinas jóvenes, Dum, de Copenhague, en 1935, descubre que en las hojas verdes se encuentra un factor alimenticio, resistente al calor, soluble en grasa (vitamina de la coagulación) sin el cual el poder coagulante de la sangre disminuye seriamente. El conocimiento de esta vitamina esencial se extendió rápidamente desde hace tiempo.

El estado hemorrágico causado por una carencia de vitamina K no varía con la administración de la vitamina C y siempre es acompañado por la disminución del contenido de protrombina en la sangre de tal manera que, la alteración en el poder coagulante que resulta, es atribuida a esta deficiencia. La administración de la vitamina K vuelve normales el poder coagulante de la sangre y el contenido de protrombina; una disminución del contenido de pro-

trombina acompaña algunas veces a ciertas enfermedades en las que hay una tendencia hemorrágica. La vitamina K es un hidrocarburo no saturado y su composición química ha sido definida como la 2-metil3 fitil 1.4-naftoquinona.

Existen buenas razones clínicas y experimentales para suponer que el componente 1.4-naftoquinona de la molécula, da la actividad biológica de la vitamina.



La vitamina K no es un componente de la molécula de protrombina; las preparaciones de protrombina tienen pequeña actividad de vitamina K y la inyección de grandes dosis de ésta, no vuelve supernormal la coagulación de la sangre.

Las hojas verdes, tales como la col y la espinaca, son una fuente rica de esta vitamina; el polvo seco de alfalfa y la grasa de hígado (Hog's) se encuentran en las mismas condiciones.

En los tomates, jugo de limón, aceite de hígado de bacalao está en muy pequeña proporción.

El aceite de germen de trigo, cereales y zanahorias son demasiado pobres. Esto parece ser razonable en vista de que en la mayoría de los animales, incluyendo al hombre, los tejidos tienen grandes reservas de vitamina K y un grado peligroso de una privación primaria dietética, es inverosímil.

Las gallinas jóvenes son los únicos animales en los cuales la disminución del contenido de protrombina del plasma en un 80% produce hemorragias.

Es natural que cualquier estado hemorrágico asociado con una disminución de la protrombina sanguínea debajo de un nivel crítico, sea el resultado de la deficiencia de la vitamina K. Esto se confirma cuando no hay un cambio significativo en los otros constituyentes sanguíneos concernientes a la coagulación, y cuando el organismo no responde a la administración del ácido ascórbico.

Algunos métodos han sido propuestos para la determinación del concentrado de protrombina en el plasma, ninguno de ellos en el uso general determina la cantidad absoluta; pero un ensayo de la modificación de la coagulación indica el grado de porcentaje de la deficiencia con suficiente exactitud para el tratamiento de control y profilaxis.

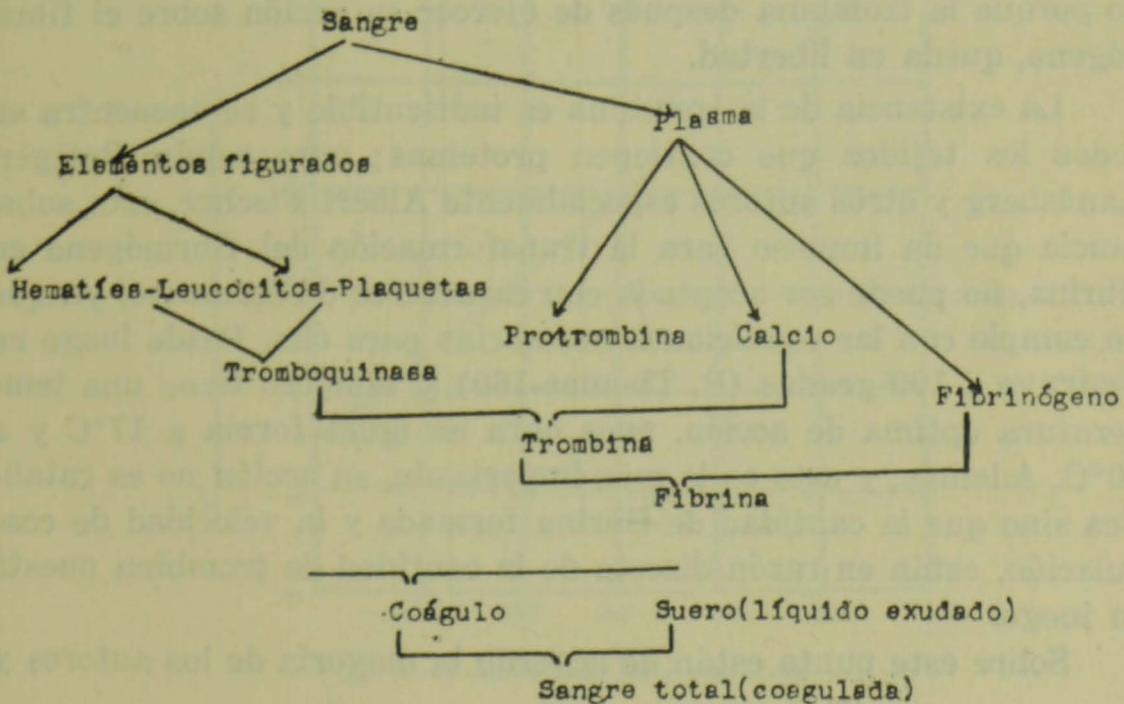
La muestra del plasma es suplida por una cantidad óptima de todos los constituyentes necesarios para la coagulación excepto la protrombina. El tiempo de coagulación es entonces inversamente proporcional al contenido de protrombina si no hay una gran alteración en el contenido de fibrinógeno y otros factores de coagulación conocidos y presentes en los límites normales.

CAPITULO II

MECANISMO DE LA COAGULACION DE LA SANGRE

Teoría clásica

La teoría clásica tiene la ventaja de explicar muchos fenómenos relacionados con la coagulación de la sangre; la incoagulabilidad in vivo y la coagulación local por lesiones experimentales o patológicas de la pared vascular; la coagulación fuera de los vasos; la acción de ciertos anticoagulantes; la coagulación del fibrinógeno por recalcificación del plasma oxalatado; la incoagulabilidad del fibrinógeno purificado cuando actúan estas mismas sales de calcio, etc. Hablando esquemáticamente, podríamos decir que en la sangre circulante existen siempre el fibrinógeno, la protrombina y las sales de calcio. Fuera de los vasos se libera la tromboquinasa de las plaquetas y en presencia de las sales de calcio actúa sobre la protrombina y la transforma en trombina activa.



La trombina obra sobre el fibrinógeno transformándolo en fibrina, desencadenando el fenómeno visible de la coagulación sanguínea. La representación esquemática de la coagulación aparece en la página anterior.

Un hecho importante sobre el cual se insiste, se refiere a que las sales de calcio son activas a condición de que sean solubles y además es necesario que estén dissociadas, es decir, ionizadas. El ion calcio libre es el único verdaderamente activo en el proceso de la coagulación sanguínea, las sales insolubles de calcio (oxalato, fluoruro), lo mismo que las de citrato en que el calcio no está en forma iónica libre; sino formando parte de un complejo molecular, no son utilizables en la formación de la trombina activa.

TEORIAS MODERNAS DE LA COAGULACION SANGUINEA

En el esquema que hemos indicado anteriormente, figura una substancia, la trombina, que tiene según la opinión clásica, los caracteres de un fermento porque obra en cantidades muy pequeñas y porque su acción sería catalítica.

En realidad, después de la coagulación, el suero contiene por lo menos igual cantidad de trombina que el plasma antes de la coagulación; pero no porque sea un fermento como pensaba Nolf, sino porque la trombina después de ejercer su acción sobre el fibrinógeno, queda en libertad.

La existencia de la trombina es indiscutible y se encuentra en todos los tejidos que contienen proteínas; pero según Rettger, Landsberg y otros autores especialmente Albert Fischer, esta substancia que da impulso para la transformación del fibrinógeno en fibrina, no puede ser aceptada con caracteres de fermento, ya que no cumple con las condiciones necesarias para ello. Desde luego no destruye a 100 grados (P. Thomas-160) y tampoco tiene una temperatura óptima de acción, pues obra en igual forma a 17°C y a 40°C. Además, y esto es lo más importante, su acción no es catalítica sino que la cantidad de fibrina formada y la velocidad de coagulación, están en razón directa de la cantidad de trombina puesta en juego.

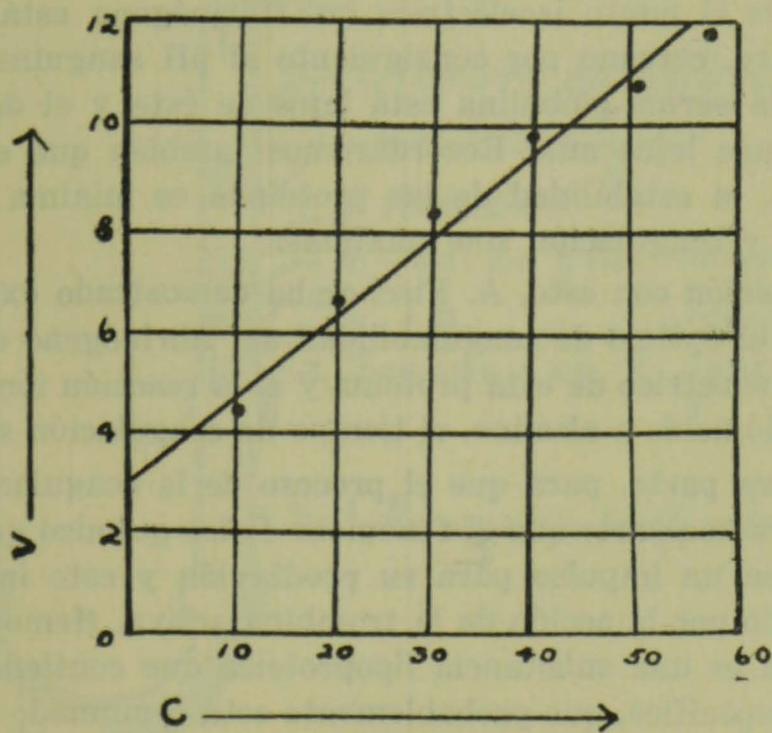
Sobre este punto están de acuerdo la mayoría de los autores y

los trabajos de Albert Fischer son muy demostrativos al respecto. Este autor trabaja con plasma de gallina que es fácil obtener casi libre de trombina, y tomando en varios tubos cantidades iguales (gotas) agrega en cada uno una gota de extracto acuoso de tejidos (trombina) en diferentes diluciones. Se comprueba que mientras la concentración de la trombina aumenta de 5 a 60 (considerando la concentración original igual a 100) el tiempo de coagulación disminuye de 258 a 85 minutos.

En la siguiente figura tenemos transcrito un gráfico de coordenadas ortogonales de A. Fischer en el cual se han anotado en las abscisas las concentraciones y en las ordenadas las velocidades de coagulación; pero no directamente en minutos sino en sus valores recíprocos $v = \frac{1}{t} \cdot 1000$. Si el plasma estuviera total y absolutamente privado de trombina, la recta pasaría por cero; pero como contiene siempre una pequeña cantidad de substancia coagulante habrá que agregar en cada observación la constante b, a la variable, quedando entonces:

$$v = K \cdot (c - b)$$

Por consiguiente la velocidad de coagulación es proporcional a la concentración de la trombina.



Rettger completa estos trabajos en otro sentido tomando cantidades iguales suficientemente grandes de plasma de gallina o soluciones apropiadas de fibrinógeno y agregando cantidades crecientes de trombina.

Comprueba por ejemplo que con 5, 10, 20 y 40 gotas de trombina obtiene 0.20, 0.35, 0.60 y 1.58 grs. de fibrina. En consecuencia la cantidad de fibrina formada es proporcional a la cantidad de trombina puesta en juego.

Por esta y por otras razones, numerosos autores están ahora de acuerdo en que en la coagulación de la sangre, no es posible ni tampoco necesario suponer la existencia de un fermento especial de coagulación y se piensa que todo el fenómeno se debe a fenómenos químicos y físico-químicos que en parte conocemos pero que en parte desconocemos todavía.

Desde luego, para comprender por qué razón la trombina obra exclusivamente sobre el fibrinógeno dejando intactas a las otras proteínas del plasma, conviene recordar y tomar en cuenta que el fibrinógeno es una proteína de gran labilidad y de fácil precipitación y coagulación por agentes físicos y químicos, que en igualdad de condiciones no ejercen acción sobre la serum-globulina y la serum-albúmina.

Además el punto isoelectrico del fibrinógeno está cercano al punto neutro, cercano por consiguiente al pH sanguíneo; en cambio, el de la serum-globulina está lejos de éste y el de la serum-albúmina más lejos aún. Recordaremos también que en el punto isoelectrico, la estabilidad de las proteínas es mínima y la precipitabilidad y coagulación son máximas.

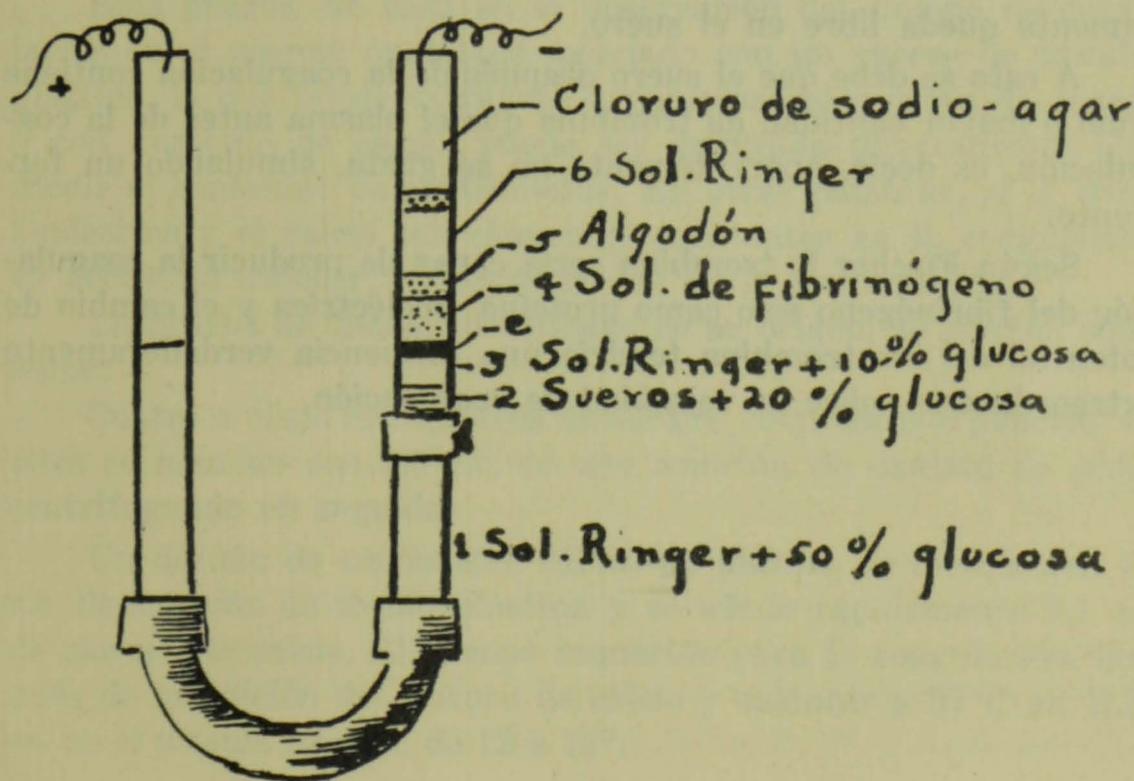
En relación con esto, A. Fischer ha demostrado experimentalmente que el óptimo de coagulabilidad del fibrinógeno corresponde al punto isoelectrico de esta proteína y si la reacción iónica se aleja en el sentido ácido o alcalino, el tiempo de coagulación se prolonga.

Por otra parte, para que el proceso de la coagulación se desencadene, es necesario que el fenómeno físico-químico que lo caracteriza reciba un impulso para su producción y este impulso está representado por la acción de la trombina activa. Hemos dicho que la trombina es una substancia lipoproteica que contiene calcio como metal específico, que probablemente está combinado en una for-

ma característica y que es reemplazado con gran dificultad por el bario y el estroncio.

De este complejo que constituye la trombina, ha sido posible separar por extracciones etéreas una fracción que probablemente corresponde a la cefalina (un mono-amino-mono-fosfátido que contiene ácido glicerofosfórico, ácido esteárico, ácido linoleico o cefálico y como base nitrogenada la colamina o aminoetilalcohol). La cantidad que es posible extraer de este lipóide de diversos preparados de trombina, está en relación directa con la actividad y eficacia coaguladora de estos preparados (Fischer). Resultan así dos fracciones que separadamente no tienen actividad; pero que la pueden recuperar por acoplamiento.

Del Baere ha hecho experimentos de cataforesis, con los cuales pretende demostrar que la trombina activa tiene carga eléctrica positiva y la trombina activa, inactiva por precipitación del calcio con citrato, tiene como el fibrinógeno carga negativa. En las experiencias de cataforesis, como la trombina es invisible, no se puede hacer la observación del transporte eléctrico a simple vista y como el único reactivo conocido para demostrar la existencia de la trombina es el fibrinógeno, Del Baere ha ideado un dispositivo especial:



Establecido el circuito de 110 volts se observa que ya a los 10 minutos en la solución de Ringer, que separa la solución de fibrinógeno de la trombina, aparece un enturbiamiento que se acentúa poco a poco, extendiéndose hacia el polo negativo.

El enturbiamiento es debido al precipitado formado por la acción de la trombina al encontrarse con el fibrinógeno, el cual por su carga negativa avanza en sentido contrario aunque más lentamente.

Del Baere hace experimentos de control y además según él es posible demostrar que inactivando la trombina por adición de citrato de sodio al sistema, ya no se produce el transporte eléctrico, hacia el polo negativo, sino hacia el polo positivo, es decir, separando los iones calcio de la trombina, ésta se hace inactiva y simultáneamente cambia de carga eléctrica. En consecuencia, la carga positiva de la trombina se debería a la unión con los iones calcio, unión que se haría probablemente por adsorción.

La trombina activa, obrando sobre el fibrinógeno de carga eléctrica contraria produciría su transformación en fibrina mediante un proceso físico-químico que no alcanza a afectar por las razones que hemos dado a las otras proteínas del plasma. El fibrinógeno al transformarse en fibrina, pierde en parte o totalmente su carga eléctrica primitivamente negativa y la trombina cargada positivamente queda libre en el suero.

A esto se debe que el suero después de la coagulación contiene igual o mayor cantidad de trombina que el plasma antes de la coagulación, es decir, aparentemente no se gasta, simulando un fermento.

Según Fischer la trombina sería capaz de producir la coagulación del fibrinógeno sólo como proteína isoeléctrica y el cambio de potencial del ion trombina tendría una influencia verdaderamente extraordinaria sobre la velocidad de coagulación.

CAPITULO III

PRUEBA DE QUICK EN CASOS NORMALES

Para la debida interpretación de lo que es la protrombina, precisa ponerse de acuerdo acerca de la cifra que debe tomarse como normal correspondiente al estado fisiológico.

Todas las diferencias se deben principalmente a errores en los procedimientos de investigación, o porque no han mediado las mismas condiciones en el momento de la toma de la sangre.

Las cifras patológicas de la protrombina pueden alcanzar valores de consideración, y justamente por la importancia que este dato tiene en la clínica, debe investigarse por procedimientos exactos.

La prueba de Quick nos permite conocer la concentración de ésta de una manera rápida y precisa.

Esta prueba se basa en la observación del tiempo de coagulación en el plasma oxalatado mezclado con un exceso de trombo-plastina, la que puede extraerse y valuarse del cerebro de conejo, y con aumento de calcio, puede ser empleado directamente para medir el contenido de protrombina. En otras palabras, si la trombo-plastina y el calcio son elementos constantes en la coagulación, es necesario conocer la concentración de la protrombina.

La prueba de Quick, modificada en su origen, se efectúa como sigue:

Cuatro o cinco centímetros de sangre obtenida por punción venosa se mezclan con 0.5 c.c. de una solución de oxalato de sodio, centrifugando en seguida.

Un décimo de centímetro cúbico de plasma se mezcla con 0.1 c.c. de solución de trombo-plastina y se añade rápidamente 0.1 c.c. de cloruro de calcio. El tiempo requerido para la coagulación, después de la adición del cloruro de calcio y calentar a 37°C en B.M. es, en el plasma normal, de 12 a 13".

Cuando hay deficiencia de protrombina, el tiempo de coagulación es retardado. La relación del tiempo de coagulación del plasma recalcificado, conteniendo un exceso de tromboplastina, a la concentración de protrombina, según Quick, se interpreta de la manera siguiente:

12-13 segundos	-----	100%-80%	protrombina
13-15	„ -----	80-60 %	„
15-20	„ -----	60-34 %	„
21	„ -----	30%	„
24	„ -----	25%	„
26	„ -----	20%	„
30	„ -----	16%	„
34	„ -----	14%	„
36	„ -----	12%	„
38	„ -----	10%	„
Más de 38	„ -----	10-0 %	„

El tiempo de coagulación puede ser convertido directamente a concentración por ciento de protrombina, por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de protombina} = \frac{K}{C. T. - a}$$

C.T.—Tiempo de Coagulación. K.—Es una constante con valor de 302 y a es una segunda constante con valor de 8.7.

Ejemplo: Si se obtiene un tiempo de coagulación de 21 segundos, la concentración de protrombina sería $\frac{302}{21-8.7} = 25\%$

Las soluciones requeridas para esta prueba son las siguientes:

I.—Oxalato de sodio.—Disolver en un matraz volumétrico 1.34 gr. de oxalato de sodio anhidro Q.P. en agua destilada hasta completar 100 c.c.

II.—Cloruro de calcio.—Disolver en un matraz volumétrico 1.11 gr. de cloruro de calcio Q.P. en suficiente cantidad de agua destilada y aforar después a 100 c.c.

III.—Solución de tromboplastina. Mezclar 0.3 gramos de cerebro deshidratado de conejo, con 10 c.c. de suero fisiológico conteniendo 0.1 c.c. de oxalato de sodio; mezclar por inversión e incubar a 45 grados C por 10 minutos, centrifugar en seguida lentamente hasta obtener un líquido lechoso homogéneo.

El cerebro se deshidrata de la manera siguiente:

Después de eliminar los pequeños vasos, la pía y toda la sangre, se lava y se tritura en un mortero junto con acetona, y se deja en reposo; se decanta la solución acetónica y se repite el proceso varias veces, hasta obtener un polvo granular, que después de seco y convenientemente envasado se mantiene en refrigerador. Su actividad se conserva solamente por una semana, según se ha comprobado.

Recientemente, Siffren ha propuesto un método nuevo para la determinación de la protrombina, en el que se utilizan pulmones frescos de bovino o de conejo. Para ponerlo en práctica, se requiere una solución de tromboplastina, que se prepara del modo siguiente:

Una determinada cantidad de pulmones frescos de bovino o de conejo, se tritura en un mortero, agregando poco a poco igual proporción de solución de cloruro de sodio al 0.9 por ciento, a fin de conseguir una suspensión uniforme, la que se deja en reposo por algunas horas, filtrando después por gasa. El filtrado, en el cual está disuelta la tromboplastina, conserva su actividad por dos días si se coloca en el refrigerador.

Técnica:

En un tubo de hemólisis conteniendo 0.9 c.c. de sangre venosa, se agrega 0.1 c.c. de la solución de tromboplastina; se mezcla bien por inversión y se toma nota del tiempo en que ocurre la coagulación ($tc-2$).

La cantidad de tromboplastina se deduce de la fórmula siguiente:

$$\frac{tc-100}{tc-2} = a \% \text{ de protrombina.}$$

Este método no me parece muy práctico, debido principalmente al escaso margen de actividad de la solución de tromboplastina.

Determinación del tiempo de protrombina por el método de Howell:

Técnica.

I.—Extraer 2 c.c. de sangre venosa, utilizando una jeringa estéril.

II.—Colocar la sangre en un tubo de centrífuga que contiene 0.25 c.c. de oxalato de sodio al 1 por ciento en suero fisiológico.

III.—Mezclar por inversión varias veces y centrifugar.

IV.—Poner 5 gotas del plasma claro en cada uno de cuatro tubos.

V.—Añadir al primer tubo 2 gotas de solución de cloruro de calcio al 0.5 por ciento, tres al segundo, cuatro al tercero y cinco al cuarto. Mezclar suavemente.

VI.—La coagulación puede tener lugar en todos los tubos, aunque no a la vez, pero el tiempo en que la coagulación ocurra primeramente en cualquiera de ellos, será el que corresponda al de protrombina. Operar con un testigo.

Por este método el tiempo de coagulación es de 10 a 12 minutos, pudiendo a veces llegar a 30 minutos.

La experiencia que me ha dado este trabajo, me permitió conocer de manera categórica que la determinación del tiempo de protrombina por el procedimiento de Quick es más exacta y más rápida que con el método de Howell.

Determinando en una muestra de sangre de un paciente, los tiempos de coagulación, sangrado y protrombina, y en algunos casos la determinación del índice ictérico y la prueba del Rosa de Bengala, se puede saber en qué grupo de enfermos hay aumento o disminución del tiempo de protrombina.

Yo, en la prueba de Quick, experimenté con cerebro humano en vez de cerebro de conejo, no obteniendo resultados satisfactorios, debido probablemente a exceso de material tromboplástico.

Sucede todo lo contrario con el de conejo; pero en mi concepto y apoyándome en la experiencia adquirida, el cerebro más apropiado para la determinación de la protrombina, es el de res, porque la acetona arrastra menos principios aprovechables (tromboplastina).

Partiendo de estas observaciones, procedí a la determinación del tiempo de protrombina, haciendo uso de una tromboplastina preparada a partir de un cerebro de res, al cual después de quitar los vasos y restos de sangre y de un tratamiento bastante prolongado con acetona, puse a desecar a 37 grados C, obteniendo un

polvo blanco sumamente fino, que pude conservar hasta por 15 días sin que perdiera su actividad.

A partir de este polvo, preparé la solución de tromboplastina, para lo cual pesé 0.3 gramos, añadí 10 c.c. de suero fisiológico y mezclé bien; llevé a B.M. a 45 grados C, por espacio de 10 minutos, centrifugando después lentamente. Antes de proceder a las determinaciones, comprobé su actividad en un plasma normal.

La determinación del tiempo de protrombina en individuos normales, dió un margen que fluctúa entre 10" y 15"; en cambio, en diversos estados patológicos encontré retardos considerables.

La importancia del tiempo de protrombina es evidente y sirve para el diagnóstico y pronóstico de las innumerables enfermedades hemorrágicas.

La tabla siguiente muestra los tiempos de protrombina que obtuve en pacientes sin ninguna manifestación hemorrágica.

TIEMPO DE PROTROMBINA

Nombre	Diagnóstico	T. Protr.	T. Coag.	T. Sangrado
Camilo Castillo	Hernia de la línea blanca	12"	6'30"	1'
Cecilia Mercado	s/d	13"	7'	1'
Luis Chávez	Cataratas	10"	6'30"	1'30"
Delfín López	En estudio	11"	6'	2'
Roberto Saldívar	s/d	13"	7'	2'30"
Filomena Arce	Retroversión	13"	6'30"	1'30"
Rafael Hernández	Cistocele	11"	6'30"	1'
Concepción Paz	Neuralgia	15"	8'	3'
Juana Romero	Bocio	13"	7'	1'
Dolores Aranda	Fibroma	8"	5'30"	1'40"
Carmen Campos	Probable úlcera	9"	6'30"	2'
Alberto Uribe	Cataratas	13"	6'30"	2'

CAPITULO IV

LA PRUEBA DE QUICK EN CASOS PATOLOGICOS

La clasificación de los padecimientos hemorrágicos es muy poco satisfactoria a causa del conocimiento incompleto de los procesos fundamentales de su patogenia.

La mayor parte de las diátesis hemorrágicas están asociadas con algún defecto del mecanismo de la coagulación de la sangre; otras, tienen relación con defectos vasculares dependientes más o menos específicamente de factores nutritivos, infecciosos, congénitos, tóxicos, alérgicos y otros.

El propósito de este capítulo es poner de manifiesto el hecho muy significativo de que la tendencia a sangrar en la mayor parte de los casos, se debe a la deficiencia de protrombina e indirectamente a la carencia de la vitamina K.

La protrombina fluctúa ampliamente y con frecuencia desciende a valores muy bajos.

Las enfermedades hemorrágicas primitivas son: la púrpura trombocitopénica idiopática, la hemofilia y la melena del recién nacido.

Al parecer, la púrpura hemorrágica es causada por la disminución de plaquetas, pudiendo sobrevenir la hemorragia cuando el número de trombocitos es menor de 60,000 a 100,000 por mm³.

Generalmente el tiempo de coagulación es normal; pero el coágulo no se retrae en el tiempo normal. El tiempo de sangrado se prolonga.

En la hemofilia, el tiempo de coagulación en relación con la protrombina está marcadamente acrecentado, hay notable aumento en el tiempo de coagulación (sangre venosa) pero una vez que se forma el coágulo se retrae normalmente.

En niños que padecen melena neonatorum, hay por lo común, aumento en los tiempos de coagulación y de protrombina; pero no se reduce el número de plaquetas; hay también una prolongación del tiempo de sangrado. No se ha aclarado el mecanismo de este estado morbosos. La hemorragia se presenta entre el segundo y quinto días de nacimiento.

La púrpura simple o atrombopénica (púrpura de Henoch, enfermedad de Schoenllin) no presenta ninguna anormalidad en el proceso de la coagulación de la sangre.

La hemorragia sintomática (púrpura secundaria) ocurre en infecciones (viruelas, sífilis congénita, etc.), envenenamientos (sustancias químicas, sueros), en la alergia, en la insuficiencia de vitaminas (escorbuto) en la anemia aplásica y en la leucemia.

La tendencia hemorrágica debida a la deficiencia del fibrinógeno, se observa en las enfermedades del hígado; sin embargo, de los trabajos experimentales de Smith, Warner y Brukhous (envenenamiento de los perros con cloroformo) parece que la tendencia a la hemorragia en las enfermedades del hígado (ictéricas por obstrucción y fístulas biliares) es causada probablemente por deficiencia del fibrinógeno y de la protrombina a la vez.

Waddell y Guerry dedujeron que la vitamina K es eficaz en la prevención y en el tratamiento de las hemorragias espontáneas, manifiestas u ocultas, asociadas con deficiencia de protrombina.

En los animales, la insuficiencia de la vitamina K liposoluble va acompañada con insuficiencia de protrombina, con tendencia a la hemorragia. (Editorial Journal. Amer. Med. 108;2403-1937).

Las lesiones del hígado que causan hemorragias, parecen producir su efecto, disminuyendo la protrombina (Quick. Jour. Amer. Med. 110;1658-1938).

Cuando la cantidad de protrombina es superior a 20 por ciento de lo normal, el tiempo de coagulación no sufre variación suficiente para ocasionar hemorragias; pero cuando se reduce a menos del 20 por ciento, el tiempo de coagulación es tan dilatado que es fácil la hemorragia.

Esto según Magath, explica por qué los pacientes ictericos con un tiempo de coagulación al parecer normal, súbitamente y sin que nada lo haga prever comienzan a sangrar, a consecuencia de una

operación, aun cuando durante la operación no hayan sangrado mucho.

Debe llamarse la atención acerca de la relación que parece existir entre la deficiencia de protrombina y la carencia de vitamina K.

La absorción intestinal de la vitamina K es defectuosa y ésta falla va acompañada de reducción de protrombina (aumento del tiempo de protrombina).

Por otra parte, la administración de la vitamina K junto con las sales biliares a los enfermos de ictericia, va seguida de un franco aumento de protrombina (disminución del tiempo de protrombina).

Observaciones personales de la prueba de Quick en diversos estados patológicos

Las siguientes tablas muestran las modificaciones patológicas de la protrombina. Los valores observados en individuos con cirrosis hepáticas, fueron los de mayor significación encontrando un **paralelismo franco entre los tiempos de protrombina, coagulación** (método de Bogg's) y sangrado, con las unidades de índice icterico y la retención del Rosa de Bengala en la sangre.

CIRROSIS

Caso Núm.	Nombre	Tiempo Protro.	Tiempo Coag.	Tiempo Sang.	Indice Ictérico	Rosa Bengala
1	Carlos Arredondo.	11"	7'	1'40"	6.25 U	
2	Nicolás Montiel.	21"	9'	2'	8.75 U	
3	Moisés García.	19"	8'	2'	9.75 U	
4	Catarino Mejía	18"	8'	1'40"	3 U	
5	Luz Velasco.	20"	10'	3'	50 U	
6	Eugenia Pérez	22"	10'	3'30"	40 U	80%
7	Porfiria González	1'	10'20	4'40"	70 U	90%
8	Luis López.	28"	10"	2'40"	55.75 U	50%
9	Guadalupe Servín.	25"	9'	2'30"	12 U	
10	Luis Pérez	28"	8'40"	2'30"	30 U	
11	José Cordero	23"	8'40"	2'30"	21.45 U	
12	Enriqueta Reyes.	20"	8'	1'30"	9.50 U	
13	Domingo Cruz	21"	7'	1'20"	8.75 U	
14	Enrique Barrera	22"	8'	2'20"	9.5 U	
15	Gloria Ruiz	21"	7'	1'40"	8.45 U	
16	Bernardo Adame	19"	7'	1'	7.25 U	

En las hepatitis agudas encontré modificaciones constantes; en la siguiente tabla hay un caso (6) en que la protrombina no se encuentra alterada, y sí, los tiempos de coagulación y sangrado. El índice ictérico coincide con gran retención del Rosa de Bengala en la sangre.

HEPATITIS AGUDAS

Caso Núm.	Nombre	Tiempo Protro.	Tiempo Coag.	Tiempo Sang.	Índice Ictérico	Rosa Bengala
1	Sabina González	13"	7'	1'30"	2.5 U	
2	Carlos Mancera	18"	7'40"	1'30	5 U	
3	Ramón Rojas	19"	7'	2"	8 U	15%
4	Jesús Montero	17"	9'40"	2'	2.75 U	
5	Alejandro Barrera	13"	8'	2'	2.75 U	
6	Agustín Arce.	13"	11'20"	2'20"	60 U	90%
7	Carmen Barbosa	14"	7'40"	1'40"	9.32 U	
8	Margarita López	19"	8'	1'40"	7.4 U	
9	Esther Ongay	20"	8'30"	1'30"	2.30 U	
10	Heriberto Luna	18"	7'	1'20"	4 U	
11	Gabriel Camacho	25"	7'40"	2'	10 U	
12	Ignacio Rojas	20"	8'	1'40	3.75 U	
13	María Unda	16"	7'	1'	2 U	
14	Beatriz Soto	15"	7'	1'		

ABSCESOS HEPATICOS

Caso Núm.	Nombre	Tiempo Protro.	Tiempo Coag.	Tiempo Sang.	Índice Ictérico	Rosa Bengala
1	Carlos Pimentel	14"	7'	1'40"	12.35 U	
2	José Luis Arreola	25"	9'20"	2'20"	15.27 U	
3	Petra Reynoso	15"	9'40"	2'20"	60 U	
4	Consuelo Ramírez	20"	7'40"	1'40"	14 U	
5	Juan Mendoza	20"	7'40"	1'40"	10 U	
6	Humberto Lira	19"	8'	2'	7.25 U	
7	Juana Mendoza	20"	8"	3'	3.75 U	
8	Justo Hernández	21"			3.75 U	
9	Alberto Guzmán	22"	7'30"	1'40'	4.5 U	

HEMOFILIA

1	María Elena Lira	18"	7'	5'20"		
---	------------------	-----	----	-------	--	--

En la hemofilia estudiada en un solo caso, encontré únicamente un aumento en el tiempo de sangrado y una ligera modificación de la protrombina.

COLECISTITIS

Caso Núm.	Nombre	Tiempo Protro.	Tiempo Coag.	Tiempo Sang.	Índice Ictérico	Rosa Bengala
1	María Ceja	11"	7'	1'20"	7.5	U
2	Arturo Solías	15"	7'	1'40"	9.92	U
3	Luz Martínez	18"	8'	2'	6.5	U
4	Ana Avila	16"	7'	2'	4.35	U
5	Luisa Vargas	19"	8'	2'20"	7.75	U

ANEMIAS

Caso Núm.	Nombre	Tiempo Protro.	Tiempo Coag.	Tiempo Sang.
1	Dolores Villa	11"	7'	2"
2	Vicente Hernández	15"		1'40"
3	Concepción Frey	14"	7'	1'20"
4	Alejandro Huerta	18"	7'40"	1'30"
5	Consuelo Herrera	19"	8'	2'30"
6	Amalia Cruz	22"	9'	4'
7	Elena Valencia	19"	8'40"	3'20"

En las colecistitis y las anemias confirmé el paralelismo entre los tiempos de protrombina y coagulación.

FIEBRE DE MALTA

Caso Núm.	Nombre	Tiempo Protro.	Tiempo Coag.	Tiempo Sang.
1	Agustín Alcántara	11"	8'	3'40"
2	Ricardo Gómez	35"	10'	6'
3	Carmen Alamillo	23"	14'	6'20"
4	Luis Martínez	19"	8'40"	2'40"
5	Alfonso Alfaro	22"	7'30"	1'40"

En las observaciones hechas en la tabla anterior está confirmado que en la fiebre de Malta hay un aumento del tiempo de sangrado.

CARCINOMAS

Caso Núm.	Nombre	Diagnóstico	Tiempo Proto.	Tiempo Coag.	Tiempo Sang.
1	María Vázquez	Cáncer matriz	21"	8"	2"
2	Pedro Pérez	Cáncer nariz	20"	7'40"	1'40"
3	Macaria Páramo	Cáncer páncreas	25"	7'	2'
4	José Avila	Cáncer vesícula	23"	6'30"	1'30"
5	Juan Aguilar	Cáncer páncreas	21"	7'	2"
6	María Soto	Cáncer hígado	20"	8'	2'
7	Luis Páez	Cáncer páncreas	23"	6'20"	1'20"
8	Manuel García	Cáncer hígado	26"	7'	1'
9	Luz Unda	Cáncer vesícula	19"	7'	2'20"
10	Jovia Narcía	Cáncer vesícula	21"	8'	2'

Encontré una marcada deficiencia de protrombina en los estados cancerosos.

CONCLUSIONES

Como consecuencia de los trabajos realizados en el laboratorio llegué a las siguientes conclusiones:

1o.—Que en los hepáticos existe una relación franca entre los datos que suministran los tiempos de protrombina de coagulación y de sangrado, con las unidades de índice icterico y la retención del Rosa de Bengala en la sangre.

2o.—Que la prueba de Quick, es rápida y exacta, permitiendo:

a).—Indicar que agentes farmacológicos son necesarios para obtener la máxima actividad terapéutica antihemorrágica.

b).—Conocer la función fisiológica de la vitamina K, que es la formación de protrombina.

c).—Señalar notables alteraciones que existen en las cirrosis y hepatitis graves, septicemias y abscesos del hígado, causas frecuentes de hemorragias prolongadas.

d).—Mostrar cuando el hígado es capaz, o no, de sintetizar debidamente la protrombina.

e).—Marcar la deficiencia de protrombina en diversos estados cancerosos, principalmente en los carcinomas de los conductos biliares, de la vesícula biliar, y cabeza del páncreas.

CONCLUSIONES

1. El presente estudio ha demostrado que el uso de...

2. Los resultados obtenidos indican que...

3. Se concluye que...

4. En consecuencia...

5. Finalmente...

BIBLIOGRAFIA

- Frederik Fitzherbert Boyce b.S.M.D.—The Role of the Liver in Surgery.
Best and Taylor.—The Fisiological Basis of Medical practice.
Geoffrey Hadfield and Laurence P. Garrod.—Recent Advances in pathology.
—Fourth edition.
Dr. W. Stepp-Doz, Dr. Küunan, Dr. Shroleder.—Las vitaminas.
Tood and Sanford.—Clinical Diagnosis By Laboratory Method. Tenth edition.
Manuel Varela.—Hematología Clínica.
Maxwell M. Wintrobe. M. D. Ph. D.—Clinical Hematology.
W. E. Bray.—Sinosis de los métodos de laboratorio.
Hoffman La Roche.—Inc. Vitaminas.
Bodansky y Bodansky.—Bioquímica de la enfermedad.
Armand J. Quick.—The Hemorrhagic diseases and Physiology of Hemostasis.
Klett.—Bio New York. Wintrop Chímical Co. 170 Varicle Street New York.
Dr. Leonidas Corona.—Química Normal y Patológica de la Sangre.
Boletín Médico Científico. Dic. 1943.
Roy R. Kracke; M. D.—Diseases of the blood and Atlas of Hematology. Second
edition 1941.