

NOTA SOBRE LA ACCION DE ALGUNAS TOXINAS, ENZIMAS PROTEOLITICAS Y HEPARINA SOBRE EL TIEMPO DE PROTROMBINA

Por ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de Biología.

Antecedentes.

El estudio de la acción de los venenos de serpiente sobre distintos organismos animales, ha mostrado que dichas toxinas intervienen en el fenómeno de la coagulación de la sangre, bien sea acelerándola o bien retardándola. La primera observación de estos hechos es probablemente la de Brainard en el año de 1854; demostró que en la autopsia de animales muertos por mordedura de crotálo, la sangre aparece completamente coagulada cuando la muerte ha sido rápida, o líquida, por lo contrario, cuando la sobrevida es más o menos larga.

Weir Mitchell y Reichter (Cit. por Phisalix), señalan, más tarde, que el veneno de *Crotalus adamanteus*, así como el de *Anastrodon Piscivorus*, crotárido también, poseen propiedades anticoagulantes in vitro e insisten en que in vivo, dosis fuertes de estas toxinas aumentan la coagulabilidad de la sangre. Algunos otros investigadores señalaron el hecho de que el veneno de cobra retarda y hasta impide, in vitro, la coagulación de la sangre, y que el suero antitóxico específico neutraliza esta acción retardante o inhibidora sobre la coagulación, habiéndose emitido la hipótesis de que esta acción inhibidora es de naturaleza química.

Experimentalmente se pudo demostrar en 1901 (Lamb) que el veneno de *Daboia* interviene en el proceso de la coagulación con efecto análogo al de los iones de calcio, efectivamente, el plasma obtenido de sangre citratada y hecho, por lo tanto incoagulable, coagula al añadirsele la toxina mencionada, como también coagula cuando se

le agrega cloruro de calcio. Por otra parte, el mismo autor ha podido demostrar que cantidades de veneno de cobra (acción anticoagulante), que oscilan entre una y cuatro décimas de miligramo, impiden la coagulación de los plasmas citratados u oxalatados cuando a los mismos se añade la cantidad de calcio suficiente para coagular los mismos plasmas en condiciones normales.

Otra fase de estas investigaciones se inició con Mellanby, quien de acuerdo con las teorías sobre la coagulación existentes en su época (1909), trató de averiguar si las toxinas de serpiente de acción coagulante, poseen trombina (trombasa), tromboquinasa, o alguna otra sustancia diferente a las anteriores pero con propiedades análogas; en el primer caso, o sea existencia de trombina, se explicaría fácilmente la coagulación por el peso del fibrinógeno o fibrina, y en el segundo se facilitaría la formación de la propia trombina. Los experimentos de Mellanby parecen indicar que las toxinas de acción coagulante estudiadas por él y correspondientes a *Notechis scutatus* y a *Echis carinatus*, contienen más bien quinasa que trombina; estas investigaciones demuestran que ambas toxinas, la de *Notechis*, sobre todo, poseen gran poder coagulante sobre plasma sanguíneo de pájaros; esta toxina es capaz de coagular, a la dosis de tres milésimas de miligramo dos C.C. de plasma diluido en no más de cuatro minutos; una cantidad de toxina veinte veces mayor reduce el tiempo de coagulación a un minuto; ahora bien un aumento correspondiente en cantidad de trombina, reduciría el tiempo de coagulación a unos cuantos segundos solamente, de esto parece deducirse que la acción coagulante de las toxinas se debe no a efecto de trombina propiamente dicha, sino a la presencia de quinasa; por otra parte, el poder coagulante de las mezclas aumenta proporcionalmente a los minutos transcurridos desde el momento en que el veneno se pone en contacto con los plasmas, como si el poder coagulante aumentara a medida que la toxina entra en combinación más íntima con algún elemento del plasma, verosíblemente con los iones calcio. El mecanismo de acción de estas toxinas está lejos de ser aclarado por completo; de los experimentos de Mellanby se desprende que la adición de cloruro de calcio a la toxina aumenta su poder coagulante: al doble en el caso de *Notechis* y al triple en el caso de *Echis*; las deducciones de Mellanby con respecto a este último aspecto de la acción de las toxinas son las siguientes: quizá solamente una parte de la quinasa contenida en la toxina se encuentre combinada con iones de calcio, y se explique así el aumento del poder coagulante de la propia toxina al serle añadido cloruro cálcico, puesto que el exceso de esta sal permitiría que la quinasa no com-

binada se combinase fácilmente. Las conclusiones de este autor sobre la acción in vitro de los venenos coagulantes son, por lo tanto, considerar que obran como mezclas de quinasa y sales de calcio, y que al ponerse en contacto con una solución de fibrinógeno y protrombina, forman trombina y más tarde fibrina. La acción anticoagulante de algunas toxinas, particularmente de cobra, podría interpretarse, desde este punto de vista, como debida a la existencia, en ellas, de anti-quinasas.

Los estudios de Arthus le han permitido establecer algunas conclusiones interesantes: las toxinas de *Crótalus terrificus*, *Crótalus adamanteus* y *L. Lanceolatus*, coagulan los plasmas como si contuvieran trombina, y en el caso de *Vipera russelli* el fenómeno acontece como si la toxina correspondiente acelerara la transformación de protrombina (acción quinásica); en el caso de Daboia, la toxina se comporta como los extractos tisulares, es decir, como tromboquinasa o trombo-plastina.

Según Hirschfeld y Klinger la actividad de la tromboquinasa de los extractos tisulares (cerebro, pulmón, etc.), es inhibida por el veneno de cobra, el que, como ya se ha mencionado, es francamente anticoagulante; la explicación de este hecho consiste en considerar que la tromboquinasa es de estructura lipóide y que el veneno de cobra actúa destruyendo este cuerpo graso mediante lipasas; el hecho de que el calentamiento de la toxina hasta cien grados centígrados no le haga perder esta propiedad, es una seria objeción para aceptar que existan lipasas y que a ellas se deba la inactivación de la quinasa.

El antagonismo real y evidente entre venenos coagulantes y anticoagulantes no es aceptado por Houssay y Sordelli: si el veneno de cobra se añade a toxinas coagulantes, la acción de estas últimas no desaparece; estos hallazgos restan solidez a lo afirmado acerca del mecanismo de acción de los venenos coagulantes, puesto que si en estos el principio activo fuese una quinasa de acción biológica y probablemente de constitución química análogas a las de la quinasa contenida en los tejidos, no existe razón aparente para que esta sea destruida y la quinasa de las toxinas coagulantes no lo sea; si se considera, en cambio, como parecen establecerlo estos investigadores, que los venenos actúan como trombinas especiales, no hay razón para considerar el asunto desde este punto de vista, puesto que entonces debe aceptarse que la acción anticoagulante del veneno de cobra y de otras serpientes se explica por la destrucción de la tromboquinasa contenida en la sangre o en los extractos tisulares, y que si dicha toxina es incapaz de inactivar a los venenos coagulantes es porque en ellos la

propiedad de acelerar la coagulación se debe no a la presencia de quinasa, sino de algún otro principio activo (trombina), resistente a la acción enzimática de las toxinas anticoagulantes.

Eagle (Cit. por But. y Snell) afirma que algunas toxinas de serpiente de acción proteolítica son capaces de transformar la protrombina en trombina aún en ausencia de extractos de tejidos, de calcio y de plaquitas, lo que puede interpretarse como que la toxina poseyera una quinasa y sales de calcio, es decir, los elementos necesarios para transformar la protrombina en trombina.

El mismo autor afirma que la tripsina, o sea la enzima proteolítica del páncreas, efectúa la misma transformación, es decir, obra también como quinasa, de esto parece deducirse que la actividad quinásica esta ligada a la existencia de enzimas proteolíticas capaces de modificar la estructura de algún substrato que no puede ser otro que la protrombina y transformarlo en trombina. La acción de los venenos anticoagulantes, por otra parte, se ha explicado precisamente por la capacidad proteolítica de los mismos, que permite la desintegración del fibrinógeno con la consiguiente imposibilidad para que pueda formarse fibrina; de acuerdo con lo anterior habría que considerar que el mismo veneno proteolítico podría tener dos diferentes comportamientos, según las condiciones en que fuese empleado; coagulante cuando actúa como quinasa obrando sobre un substrato (protrombina) al que transforma en trombina, o anticoagulante cuando es capaz de provocar la proteólisis del fibrinógeno.

Vaz y Pereira afirman que el calor disminuye la toxicidad del veneno de *Bothrops jararaca*, lo que hace posible el empleo de esta toxina como coagulante: señalan que la actividad hemocoagulante es grande, pues bastan dos diez milésimas de miligramo del mismo para obtener efectos en la paloma; afirman, por último, que el veneno calentado carece de propiedades proteolíticas tanto in vitro como in vivo.

Barbosa Hargreaves de Río Janeiro concluye que la mezcla veneno (*Bothrops*), más calcio y más plasma, es igual a la de tromboquinasa más calcio y más protrombina. De estas observaciones parece deducirse que la actividad coagulante de la toxina es independiente de su poder proteolítico y que el veneno mencionado constituye un material tromboplástico cuya acción es semejante a la de la tromboquinasa propiamente dicha.

Wazen y De Moura, de Río de Janeiro, encuentran que por vía intramuscular, el veneno botrópico calentado, mantiene por más de cinco horas su efecto coagulante, el cual no es seguido de fase alguna de aumento del tiempo de coagulación.

Interacciones físico químicas en el fenómeno de la coagulación sanguínea.

Según Howell, la coagulación de la sangre resulta de la acción de la trombina sobre el fibrinógeno, con transformación de este en fibrina. En la sangre circulante existen, según el autor, protrombina, sales de calcio y heparina, esta sustancia se comporta como antiprotrombina, es decir, que impide la transformación de la protrombina en trombina inhibiendo la acción quinásica de la tromboplastina; en el caso de que la heparina fuese insuficiente para impedir totalmente la formación de trombina, las pequeñas cantidades de esta sustancia que pudieran formarse, serían neutralizadas por una antitrombina existente en la sangre misma.

La antitrombina existe, según Howell, en gran cantidad en la sangre de pájaros y en pequeña proporción en la sangre de mamíferos.

La nomenclatura de Mellanby difiere de la anterior, este autor afirma que la protrombina y la trombina poseen caracteres de enzima y las llama, por lo tanto, protrombasa y trombasa, y da el nombre de tromboquinasa a la llamada por Howell tromboplastina: La diferencia fundamental consiste, sin embargo, en que Mellanby afirma que los iones de calcio no son indispensables para la formación de trombina (trombasa), aunque admite que este metal acelera notablemente la reacción. Mellanby afirma que la heparina no es antiprotrombasa sino antitrombasa, es decir, que no impide la formación de trombasa y actúa solamente inactivando a esta después de formada, y la tromboquinasa, además de transformar a la protrombasa en trombasa, neutralizaría la acción de la heparina.

Cuando la heparina y la trombasa se encuentra en la sangre en cantidades suficientes para mantenerla fluida, la adición de tromboquinasa provoca la coagulación, sin que el fenómeno se encuentre influenciado por las sales de calcio. El mismo autor hace notar que la inactivación de la trombasa por la heparina solo se efectúa en presencia de sales neutras.

En el trabajo original de Howell y Holt, los autores afirman también que la heparina es capaz de provocar la formación de antitrombina cuando se añade a la sangre, al plasma o al suero, y que la cantidad de esta antitrombina es proporcional a la cantidad de heparina añadida.

Se tiene la evidencia de que cuando la heparina se añade al plasma, se combina con la albúmina o con alguna porción integrante de la misma, y la unión con este co-factor, designado también con

el nombre de albúmina X origina la formación de un nuevo cuerpo con propiedades antitrombónicas. En un sistema integrado por protrombina o trombina purificadas, la heparina se muestra incapaz de inhibir tanto a la primera como a la segunda, esto quiere decir que es necesario que previamente entren en contacto con alguna sustancia existente en el plasma o en el suero para que aparezcan las propiedades anticoagulantes de la misma; por lo tanto, la antitrombina presente en el plasma y que aumenta proporcionalmente a la cantidad de heparina que se añade, es un compuesto de albúmina con heparina.

La acción antiprotrombina de la heparina se efectúa también, según parece demostrado, mediante la intervención de un co-factor proteinico (albúmina) existente en el plasma.

Las plaquitas de la sangre intervienen en el fenómeno de la coagulación mediante la tromboplastina que contienen, y el mecanismo de acción de la heparina puede referirse también a la propiedad de impedir que las mencionadas plaquitas liberen la tromboplastina.

Cuando la heparina se añade a plasma oxalatoado, no se obtiene coagulación aún agregando el cloruro cálcico necesario para neutralizar al oxalato; en estas condiciones, la adición de tromboplastina, aún en exceso, no lleva a la coagulación del plasma, lo que quiere decir que la tromboplastina es incapaz de inactivar a la heparina.

El tiempo de protrombina y su apreciación.

El llamado tiempo de protrombina se refiere al tiempo que tarda en coagular el plasma calcificado, al que se agrega tromboplastina hasta un punto óptimo.

Se han ideado diversos procedimientos para medirlo, como el de Ziffen, Owen, Hoffmann y Smith, el micrométodo de Kato y Poncher, el de Quick, etc. Creemos que el método de Quick es el más apropiado para estas determinaciones, porque su técnica es relativamente sencilla y proporciona indicaciones bastante precisas.

Este procedimiento es muy conocido y se utiliza frecuentemente para poner en evidencia estados de hipoprotrombinemia o avitaminosis K, entidades nosológicas caracterizadas por disminución en la coagulabilidad de la sangre, es decir, por aumentos del tiempo de protrombina; a pesar de ser conocida la técnica, vamos a describirla, sin omitir algunos detalles importantes, que por aparentemente insignificantes muy frecuentemente se pasan por alto y restan validez a los resultados.

Para preparar el plasma se coloca medio centímetro cúbico de una solución de oxalato de sodio al 1.34% en un tubo de ensaye de bordes redondeados, se agregan cuatro centímetros y medio de sangre inmediatamente después de extraerla y se mezclan ambos líquidos cuidadosamente; la sangre se hace incoagulable y más tarde se obtiene el plasma, dejando que los elementos figurados se sedimenten espontáneamente, lo que se consigue al cabo de hora y media a dos horas, o bien centrifugando a velocidad baja para impedir que se provoque hemolisis. El líquido claro que se obtiene, o sea el plasma, se calcifica mediante una solución de cloruro de calcio 0.4 Mol, o sea que contenga 0.28 de la sal anhidra en 100 c.c. de agua destilada.

La preparación de la tromboplastina es más laboriosa: inmediatamente después de sacrificar a un conejo mediante golpe en la nuca o por medio de la inyección de aire en la vena marginal de la oreja, se extrae el cerebro y se libera cuidadosamente de sus meninges y vasos, se fragmenta en seguida con una espátula hasta convertirlo en fina papilla, en seguida se trata con acetona, preferentemente en un mortero de ágata o porcelana para poder triturar la papilla y hacer más íntima la unión con el líquido; la acetona deshidrata rápidamente el tejido cerebral y disuelve algunos de los componentes grasos del mismo, con excepción, fundamentalmente de los fosfolípidos, hecho interesante, pues se acepta, en relación con la naturaleza química de la tromboplastina, que es una sustancia compleja, compuesta por un fosfolípido y por una proteína, en la proporción de 41.6% del primero y 58.4 del segundo. Los disolventes habituales de las grasas pueden separar la mayor parte del fosfolípido, pero una fracción del mismo permanece unido a la proteína, en combinación más estable que solo puede romperse por medio de la hidrólisis parcial de la proteína. La acción quinásica solamente existe cuando ambas fracciones se encuentran unidas, independientemente son inactivas. El fosfolípido integrante de la tromboquinasa es una cefalina. Cuando se ha deshidratado suficientemente el tejido cerebral, lo que se consigue con cuatro o cinco agotamientos con volúmenes de acetona iguales al volumen del tejido hecho papilla. Por desecación a 38 grados en estufa, se obtiene un polvo fino que debe conservarse en refrigerador para que su actividad se prolongue una o dos semanas; este inconveniente de la poca duración de la tromboplastina se ha resuelto últimamente mediante la liofilización de la misma.

Cuando este polvo va a utilizarse, se mezclan cincuenta centigramos del mismo con cinco c.c. de solución de cloruro de sodio al 0.85 por cien; la mezcla se coloca en baño de maría o en estufa a tem-

peratura constante de 56 grados durante quince minutos; después se deja reposar o se centrifuga a baja velocidad, para separar un líquido de aspecto lechoso que será utilizado como material tromboplástico.

Medición del tiempo de protrombina.

En un tubo de ensaye de 13 por 100 mm., se coloca un décimo de centímetro cúbico del plasma oxalatado y en seguida igual cantidad de tromboplastina, se mezclan cuidadosamente evitando la aparición de burbujas y se coloca en baño de maría cuya temperatura sea de 37 grados y medio; se añade luego un décimo de centímetro cúbico de la solución de cloruro de calcio y se agita el tubo fuertemente; de cuando en cuando se extrae el tubo del baño de maría y se observa el momento en que aparece la coagulación del plasma; el tiempo de protrombina se cuenta desde el momento preciso en que se añadió el cloruro de calcio, hasta el momento, preciso también, en que apareció el coágulo; inútil es decir que debe utilizarse un cronógrafo.

Como la actividad de las distintas tromboplastinas no es la misma, siempre se debe determinar el tiempo de protrombina con plasma normal en todas las lecturas.

Con esta técnica hemos encontrado que el tiempo de protrombina en individuos sanos es de 18 a 20 segundos.

Modificaciones del tiempo de protrombina por toxinas de *Bothrops* y *Crótalus*.

Diluciones al uno por 25.000.

Experimentos con 0.1 c.c. de plasma calcificado al que se añade 0.01 de la solución de toxina al título anterior.

La coagulación se efectúa al cabo de 45 segundos y el coágulo no tiene el aspecto ni la consistencia del que se obtiene con la adición de tromboplastina.

Diluciones al uno por 10.000.

Se obtiene coagulación, el tiempo de protrombina es de 30 segundos como promedio.

Diluciones menores.

Una décima de miligramo de venenos de bothrops y crótalus añadida a 0.01 c.c. de plasma, más 0.1 c.c. de la solución de cloruro cálcico empleada en la prueba de Quick, impide la coagulación. La adición de tromboplastina, aún en xceso, no hace que aparezca el coágulo. Esto debe interpretarse, verosímilmente, como debido a destrucción del fibrinógeno por las toxinas a concentración relativamente elevada.

La sustitución de la tromboplastina por las enzimas proteolíticas tripsina y pepsina a diversas diluciones, no nos ha permitido obtener coagulación, es decir, que no hemos podido comprobar la actividad tromboplástica, utilizando el método de Quick, de dichas enzimas.

Los experimentos en que se utilizó plasma más tromboplastina, más calcio y más tripsina o pepsina, indican que ambas cimazas acortan el tiempo de protrombina normal cuando se encuentran en estas circunstancias, es decir, que refuerzan la acción tromboquinásica o sea la transformación de la protrombina en trombina. En determinaciones de tiempos de protrombina, cuyo promedio fué fijado en 19 segundos, la adición de tripsina y pepsina al sistema plasma, más tromboplastina más calcio, disminuye este tiempo a 13 segundos (cifra promedio).

Relaciones entre heparina y tromboplastina.

La heparina en soluciones extraordinariamente diluidas no pierde su poder anticoagulante cuando se pone en contacto con tromboplastina; esto se demuestra añadiendo a tromboplastina, 0.1 c.c. o más, unas cuantas gotas de la solución de heparina y después esta mezcla se utiliza como material tromboplástico al ser agregado al plasma calcificado; en estas condiciones no se efectúa la coagulación, lo que quiere decir que in vitro, la quinasa es incapaz de neutralizar la actividad anticoagulante de la heparina, aún cuando aquella se encuentre en exceso. Estos resultados han sido ya mencionados por Quick, utilizando plasma libre de protrombina, y pueden ser estudiados con más detalles mediante la técnica del llamado tiempo de protrombina.

Utilizando las diluciones coagulantes de venenos de bothrops y crótalus como material tromboplástico, hemos encontrado que la propiedad anticoagulante de la heparina tampoco se pierde, cuando esta sustancia, a diluciones muy grandes, se pone en contacto con aquel

y después se añade al plasma calcificado; otro tanto sucede cuando se utiliza como material tromboplástico mezclas de tromboquinasa y toxina.

Teniendo en cuenta la activación quinásica que hemos encontrado en las enzimas proteolíticas, estudiamos la influencia de las mismas sobre la heparina: mezclas de heparina con tromboplastina y tripsina o pepsina, son incapaces de provocar la coagulación del plasma calcificado; la heparina, por lo tanto no es inactivada ni por la tromboquinasa, ni por los materiales tromboplásticos constituidos por las toxinas mencionadas, ni por mezclas de tromboplastina y toxina o de tromboquinasa y enzimas proteolíticas.

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

- BEST y TAYLOR.—1941.—The Physiological Basis of Medical Practice.
- CALMETTE, A.—1907.—Les Animaux Venimeux et la Sérotherapie Antivenimeuse.
- HOUSSAY, B. A. SORDELLI.—1918.—Influencia de los venenos de serpientes sobre la coagulación de la sangre.—Revista del Instituto Bacteriológico del Depto. Nacional de Higiene, Buenos Aires, 1, p. 485.
- HOWELL, W.—1941.—Recent Advances in the Problem of Coagulation Applicable to Medicine.—Journal of the American Medical Association, Vol. 117, No. 13, Sept. 27.
- MACLEODS.—1941.—Physiology in Modern Medicine. BARD.
- PHISALIX, MARIE.—1922.—Animaux Venimeux et Venins.
- QUICK, J. ARMAND.—1942.—The Hemorrhagic Diseases and the Physiology of Hemostasis.
- VAZ, EDUARDO y PEREIRA, ANIBAL.—1940.—Hemocoagulación por el Veneno Botrópico.—Boletim Do Sanatorio Soa Lucas.
- WAZEN, ALFREDO y DE MOURA, RENATO.—1942.—Ensaio com o soluto de Bothrops jararaca na Coagulacao Sanguinea.—O. Hospital, Vol. XXI, p. 83, Rio de Janeiro.
- WIGGERS, CARL J.—1939.—Physiology in Health and Disease.