

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



"EFECTO AGUDO DEL ROJO DE RUTENIO SOBRE EL HIGADO Y ALGUNOS PARAMETROS ENZIMATICOS Y DE COAGULACION EN LA RATA ADULTA"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
GERMAN DE LA MORA RIVAS

GUADALAJARA, JAL., 1988

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA01501

Autor:

De la Mora Rivas German

Tipo de Anomalia:

Errores de Origen: Sin indice de contenido

INTRODUCCION

El Rojo de Rutenio $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})\text{Cl}_2]$ (24) es un colorante sintético, inorgánico, de aproximadamente 20Å de diámetro (Luft, 1968) ó 1.17 nm (Carrondo, Griffith, Hall; 1980). Este catión polivalente ha sido usado por largo tiempo como un colorante semiespecífico para pectinas en paredes celulares de plantas. Luft (1964) encontró que cuando es usado con tetróxido de osmio, el Rojo de Rutenio (RR) se combina con la capa superficial externa de las células epiteliales intestinales para formar un material electrodensó fácilmente visible bajo microscopía electrónica. Una desventaja importante del método es la pobre penetración del RR en el tejido sólido. En general, una reacción uniforme es vista solamente en la periferia de las células de epitelios de absorción, células epiteliales del alveolo pulmonar, y células endocapilares, reacción limitada a dos ó tres de las capas celulares más superficiales (22).

El RR ha sido un marcador importante para la observación del glicocálix celular, determinando con esto el posible papel que éste juega con la propia membrana y en la unión con las células circundantes. Además, con células de hepatoma ascíticas (AH 130) tratadas con papaína pueden liberar ciertas sustancias de unión con el RR a partir de la superficie celular, e incluso determinar los carbohidratos de tal superficie: la primera fracción conteniendo hexosamida y ácido urónico, y la segunda con ácido siálico (38).

Al estudiar el RR junto con la Neuraminidasa, se encontró que ambos tienen el mismo "blanco" que es el Acido Siálico, situándose éste último en la superficie interna de la terminal presináptica e involucrándose entonces en la liberación de neurotransmisores (4).

El RR ha sido utilizado por la técnica de microscopía electrónica para la detección de algunos carbohidratos, como el ácido mucopolisacárido, de la fibre elástica aórtica en -

ratas neonatales (40), y de diferentes tejidos conectivos como el granuloma de carrageenin, tejido subcutáneo de ratas -- adultas y neonatales, y mixofibroma obtenido de piel de humano (17).

Con el empleo del RR se ha podido estudiar el comportamiento del calcio a nivel celular en hepatocitos, mitocondrias de hepatocitos y células tumorales ascíticas de Ehrlich en ratas. El calcio afecta numerosos aspectos del metabolismo celular, y el transporte del calcio por la mitocondria es un factor importante en la regulación de la distribución intracelular de este ión (8). Los sistemas de conducción específicos para la traslocación del calcio están localizados en al menos tres fracciones celulares: Mitocondria, Microsoma, y Membrana Plasmática; aunque todos participan activamente en el control del calcio celular, el RR inhibe específicamente el transporte del calcio mitocondrial, teniendo poca influencia sobre el calcio dependiente de la membrana plasmática y nula sobre la microsomal (3).

Aunque todos los estudios concuerdan en que el RR tiene influencia sobre el inlfujo, retención y/o eflujo del calcio en la mitocondria, hay varias teorías en cuanto a cómo lo hace la propia mitocondria. Una de ellas dice que reacciona específicamente con mucopolisacáridos (en la forma de mucoproteínas ó muco ó glicolípidos) y ser éstos el centro activo de los sitios de mediación del transporte de calcio mitocondrial (24); otra que el RR inhibe ese transporte de calcio al competir con los sitios de unión con el calcio sobre ó dentro de la membrana mitocondrial interna (25, 30); otra que oxidando el piridín nucleótido específico (31, 34); ó que causa incluso cambios en la estructura de la membrana (27); por intercambio del calcio por hidrógeno (8); ó bien que controla el inlfujo pero no el eflujo de calcio previniendo la liberación del calcio acumulado que es medida por la adición de un anión permeante, el fosfato (21).

Con estas experiencias, y para ampliar los conocimientos en otras estructuras celulares y especies animales, continuó el estudio del comportamiento del calcio con la ayuda del RR' en vesículas del retículo sarcoplásmico (23), en mitocondria del músculo de la mosca *Lucila Cuprina* (7, 35), en mitocondrias aisladas de corazón de bovino de carne (en donde el RR' indujo la pérdida de potasio endógeno con los mismos títulos' que con los que inhibía la unipuerta del calcio) (16), y en la membrana terminal del huso muscular de rana (en donde el RR modula los cambios de sodio y calcio) (15).

La concentración de calcio libre en el exterior e interior de las neuronas es una determinante importante del funcionamiento del sistema nervioso. El potencial de acción del nervio está asociado con el influjo de iones de calcio y la concentración de calcio intracelular también afecta la excitabilidad. Además, la liberación de neurotransmisores en la terminal nerviosa depende del calcio, y parece ser disparada por una elevación en el nivel de calcio citoplásmico. Gracias al RR se llegó a la conclusión de que el influjo y eflujo de calcio a través de canales de entrada y salida (membrana sensible a la despolarización) dependen de un mecanismo de intercambio de la pareja sodio-calcio (10).

En ratones, el RR administrado intracranealmente produce estatus epilépticos y convulsiones tónicas; en contraste, intraperitonealmente induce a parálisis flácida total después de varias horas. Los efectos son parcialmente bloqueados por la administración simultánea de CaCl_2 . En gatos, la administración intraventricular ó intrahipocámpal produce a los pocos minutos actividad paroxismal subclínica en todas las regiones del cerebro registradas, y a las varias horas accesos epilépticos. Intraperitonealmente no afectó el EEG pero deprimió marcadamente la actividad muscular, luego de que el carbacol produjo respuestas mioclónicas. Con ésto se demuestra el efecto del RR sobre el transporte de calcio y la unión a las membranas, y el papel de este catión sobre la liberación de -

neurotransmisores (37).

Mediante otro estudio se hizo cuestionable el fenómeno de barrera hematoencefálica al RR en ratas adultas, comparado por otros autores en ratones y gatos. Después de la administración intraperitoneal a ratas adultas, se observó que bajo la dosis de 20 mg/kg se indujo secuencialmente a debilidad muscular, parálisis flácida, actividad motora atípica y accesos tónico-clónicos; con sólo 10 mg/kg solamente fué observada actividad motora atípica (1).

Posteriormente se comprobó que el RR tiene un efecto aglutinante sobre los eritrocitos de ratas adultas, tanto in vivo como in vitro. Para los estudios in vivo, 20 mg/kg de RR administrados intraperitonealmente produjeron aglutinación progresiva en relación con el tiempo transcurrido. In vitro, se observó aglutinación con concentraciones tan bajas como 10.7 M, la que se incrementó proporcionalmente a la concentración del RR; la aglutinación fué reducida significativamente cuando los eritrocitos fueron tratados con neuraminidasa. Dado que el RR tiene una naturaleza policatiónica y que en las superficies celulares predominan las cargas electronegativas, es posible suponer que pudieran participar ciertas interacciones electrostáticas entre los grupos cargados eléctricamente en la superficie celular y el RR en la aglutinación de los eritrocitos. Según ésto, el RR actuaría aparentemente como un ligando entre los glucocálices de los eritrocitos vecinos, produciéndose así su aglutinación. Además, el RR también produjo modificaciones en la forma de los eritrocitos manifestadas por la formación de proyecciones citoplásmicas cortas y gruesas (2).

En base a estos estudios, existen dos hipótesis que tratan de explicar el efecto tóxico del RR sobre los distintos modelos biológicos empleados. Y éstas son:

- a) Que en el sistema nervioso central llegue a través de sitios que carecen de barrera hematoencefálica.
- b) Que el RR se asocie al glucocálix, modifique y/o compi-

ta por canales iónicos (calcio, sodio, etc.).

Sin embargo, hay estudios (2) que sugieren que el RR podría tener un efecto tóxico directo sobre las células.

Bajo su cubierta peritoneal, el hígado se encuentra rodeado por la cápsula de Glisson que es más rica en el hilio hepático y que se introduce, junto con los conductos y vasos hepáticos, en el interior del órgano rodeando allí los lobulillos hepáticos (unidad funcional básica). Estos lobulillos son islotes poliédricos que se ordenan radialmente desde el centro pero que se comunican entre sí a modo de retículo limitando a los sinusoides. Los sinusoides venosos están revestidos de dos tipos de células: 1) Células endoteliales típicas, y 2) Células de Kupffer, voluminosas células reticuloendoteliales dotadas de prolongaciones, con poder fagocitario y movimientos ameboides. Entre las células endoteliales y las células hepáticas se encuentra un estrecho espacio llamado espacio de Disse (11, 13, 36).

La célula hepática parenquimatosa de la rata se ha estudiado más ampliamente quizá que cualquier otro tipo celular. La célula hepática es poligonal y tiene un núcleo esférico central con nucleolo bastante notable y citoplasma homogéneo. Son frecuentes las duplicaciones nucleares. Los granos citoplásmicos están formados por glicógeno, gotitas de grasa y témpanos de bilirrubina pardo-amarillenta. Esta célula posee los organitos corrientes, con abundancia particular de mitocondrias y de retículo endoplásmico, uniforme y rugoso. El aparato de Golgi se destaca de manera especial y a menudo está orientado hacia el espacio de Disse (11, 29).

Se calcula que más de 500 actividades metabólicas se efectúan en una célula hepática. Las funciones básicas del hígado pueden dividirse así: (9, 13, 19)

1. Funciones vasculares, de almacenamiento y filtración de sangre.
2. Función metabólica:
 - a) Regulación del metabolismo de los hidratos de carbo-

no y grasas.

- b) Metabolismo proteico, entre los que se encuentran la síntesis de casi la totalidad de las albúminas, y -- parte de las globulinas (la mayoría de los factores' de la coagulación).
- c) Participación en la regulación del metabolismo hormonal.
- d) Formación de bilis mediante la conjugación de la bilirrubina libre con ácido glucorónico y sulfuros.
- e) Función desintoxicante.

Cabe recordar que la reserva funcional hepática es tan grande que el 80% del órgano puede encontrarse destruido antes de que se hayan detectado algunas anormalidades (5).

Por otro lado, el hígado posee una enorme capacidad para aumentar la síntesis de proteínas. La resección del 80% de la masa de este órgano disminuye la producción de los factores de la coagulación únicamente al 50% de su valor inicial (12).

Como todas las células del organismo, los hepatocitos -- pueden manifestar cambios morfológicos que resultan de lesión no mortal llamadas degeneraciones. Con el microscopio de luz' se reconocen varios cuadros netos; a saber: Tumefacción celular, vacuolación hidrópica y metamorfosis grasa (29).

1. Tumefacción celular: Es el aumento del diámetro de las' células que resulta del desplazamiento del agua extracelular' al interior. La respiración aerobia, la síntesis de ATP y el funcionamiento adecuado de la "bomba de sodio" se cuentan entre las funciones metabólicas celulares más susceptibles. El' aumento de la permeabilidad de la membrana contribuye a la -- aparición de la tumefacción. Este tipo de degeneración puede' carecer de efecto funcional importante.

2. Degeneración vacuolar: Si el agua sigue acumulándose -- dentro de la célula, la tumefacción ulterior se acompaña de -- aparición de pequeñas vacuolas claras en el citoplasma. No se acompaña de alteración nuclear, pero denota forma moderadamen

te grave de daño celular.

3. *Metamorfosis grasa*: Denota acumulación anormal de grasa cuya cantidad no depende de la patogenia sino que manifiesta algún desequilibrio en la producción, la utilización ó la movilización de grasa. Va precedida de tumefacción celular, a menudo anuncia muerte celular y, en muchas circunstancias, se observa en células adyacentes a las que han muerto y experimentaron necrosis.

Existe una gran cantidad de pruebas de laboratorio para evaluar la función hepática. Entre las pruebas enzimáticas que más se utilizan están: (5, 14, 29)

A. *Transaminasa glutámica pirúvica sérica (TGPS)*.

B. *Transaminasa glutámica oxalacética sérica (TGOS)*.

Las transaminasas catalizan la transferencia de un grupo amino (NH_2) de un ácido alfa amino a un ácido alfa-ceto formando un nuevo aminoácido y un nuevo cetoácido.

TGP: Cataliza la transferencia del grupo alfa-amino de la alanina a ácido alfa-cetoglutárico produciendo la formación de ácidos pirúvico y glutámico respectivamente.

Las cantidades mas grandes de TGP se encuentran en las células hepáticas de los perros, gatos y primates; y en pequeña cantidad en el caballo, ganado bovino, oveja y cerdo.

Un aumento en los valores de TGPS resulta por lo tanto debido a un daño hepático por: Necrosis hepática (por hepatotoxinas), Congestión pasiva del hígado, *Metamorfosis grasa* (con elevaciones normales a moderadas), Enfermedades específicas (Hepatitis Infecciosa Canina, Peritonitis Infecciosa Felina, neoplasias), Fármacos (Corticosteroides, estrógenos, andrógenos; Antibióticos: cloranfenicol, ampicilina, gentamicina, lincomicina, eritromicina; Salicilatos).

TGO: Cataliza la transferencia del grupo alfa-amino del ácido aspártico a ácido alfa-cetoglutárico, produciendo la formación de ácido oxaloacético y ácido glutámico respectivamente.

Las concentraciones más elevadas se encuentran en las células musculares, con cantidades ligeramente menores en el hígado y en el músculo cardíaco; no es específica de un órgano. En pequeñas cantidades también se encuentra en el riñón, páncreas, cerebro, y eritrocitos.

Entre los fármacos que causan aumento de la TGOS se encuentran los Salicilatos, Corticosteroides, Estrógenos, Andrógenos, Antibióticos (eritromicina, lincomicina, gentamicina), Fenotiacinas, Anestésicos capaces de producir daño hepático (cloroformo).

El hígado es, al parecer, el órgano más importante para la elaboración de diversos factores plasmáticos de la coagulación.

La coagulación sanguínea puede ser descrita como una serie de reacciones en el que el producto de la reacción A es una enzima que cataliza la reacción B, y el producto de la reacción B es la enzima que cataliza la reacción C, y así llevar a la conversión del fibrinógeno soluble en fibrina insoluble. La serie de reacciones puede ser denominada de "cascada".

Los factores de la coagulación han sido asignados en números romanos por el Comité Internacional para la Nomenclatura de los Factores de la Coagulación (1962) (ANEXO I). Los factores están numerados de acuerdo a la prioridad de descubrimiento y no a su lugar en la secuencia. Los factores son proteínas, con excepción del calcio (designado factor IV), y cada factor (excepto la Tromboplastina tisular ó factor III) están presentes en el plasma. Los factores proteicos están presentes inicialmente en una forma inactiva ó precursora. Su activación asemeja la bien conocida pro-enzima-enzima de transición que involucra a las enzimas proteolíticas (33).

El proceso de la coagulación está dividido en dos sistemas: el sistema intrínseco y el sistema extrínseco. Todos los factores requeridos por el sistema intrínseco están contenidos en la sangre; el sistema extrínseco cuenta con la trombo-

plastina (factor III) que es liberada de las células y tejidos dañados (ANEXO II).

El mecanismo de activación de la coagulación tiene tres etapas importantes (6, 12, 28):

1. La generación de la "tromboplastina" ó "activador de la protrombina" ó "protrombinasa".
2. La generación de trombina.
3. La formación de fibrina.

1. Generación de la tromboplastina:

El mecanismo extrínseco se inicia cuando la sangre entra en contacto con elementos tisulares; un factor tisular relacionado con los microsomas y las membranas celulares y compuesto por fosfolípidos y una fracción proteica, se combina en forma estequiométrica con el Factor VII (F.VII) y en presencia del calcio iónico forma una enzima ó complejo enzimático capaz de activar el F.X. El F.X activado (F.Xa), que adquiere una importante actividad proteásica, formaría con moléculas de fosfolípidos (plasmáticos y/o plaquetarios), calcio y el F.V, un complejo activador ó "protrombinasa" que actúa sobre la protrombina (F.II) y genera la trombina (F.IIa).

El mecanismo intrínseco ocurre cuando la sangre tiene mínimo contacto con factores tisulares. Esta vía de activación se inicia por la acción sobre el Factor Hageman (F. XII) de superficies rugosas, colágeno, ciertos mucopolisacáridos ó ácidos grasos, plaquetas activadas, endotoxinas, etc., que modificando la conformación molecular facilitan su conversión en F.XIIa por diversas enzimas (calicreína, plasmina, F.XIa, tripsina, proteasas celulares, etc.). El F.XIIa tiene una menor solubilidad en medio acuoso y adquiere una actividad proteásica que la ejerce sobre diversos sustratos plasmáticos, especialmente el F.XI. El F.XI se convierte entonces en F.XIa ó "Factor Contacto". El F.XIa continúa la reacción en cadena activando el F.IX y transformándolo, en presencia de calcio, en F.IXa. El F.IXa se une posteriormente al F.VIII sobre partículas ó micelas de fosfolípidos (plasmáticos y/o plaqueta -

rios) y en presencia de calcio forma un complejo activador -- del F.X, similar al referido en la vía extrínseca. El F.X sufre una doble proteólisis para convertirse en F.Xa.

2. Generación de la trombina:

El F.Xa activado por la vía intrínseca ó extrínseca ó -- por enzimas exógenas como el veneno de vívora de Russell ó la tripsina es capaz, a su vez, de activar en forma directa a la protrombina (F.II), pero esta acción se acelera y aumenta marcadamente (hasta 20,000 veces) en presencia de F.V, fosfolípidos y del calcio, con los cuales forma un "complejo activador de la protrombina" ó "protrombinasa", convirtiéndose el F.II en Trombina.

3. Formación de fibrina:

La formación de la fibrina sucede por la acción de la -- trombina sobre el fibrinógeno. La molécula de fibrinógeno consiste de tres cadenas de polipéptidos. La trombina divide dos pequeños sobre cada lado de la molécula del fibrinógeno. El - Fibrinopéptido A es liberado a partir de la cadena alfa primero por la acción de la trombina. Después, el Fibrinopéptido B es liberado de la cadena beta (por la acción de la trombina)' para producir el monómero de fibrina. Estos monómeros de fi - brina entonces se polimerizan para formar un polímero de fi - brina. (Los Fibrinopéptidos A y B están cargados negativamente y deben ser removidos de la molécula del fibrinógeno a fin de que tome lugar la polimerización). El F.XIII, activado por la trombina y el calcio, convierte entonces al polímero de fi - brina en un estado más estable al cambiar las uniones de hí - drógeno por enlaces covalentes.

Los Factores de la Coagulación pueden ser divididos en - tres grupos funcionales en base a sus propiedades. El grupo - del Fibrinógeno consiste de los factores I, V, VIII y XIII y, por consiguiente, están ausentes en el suero y presentes en - el plasma. Los factores V y VIII son susceptibles a la desna - turalización y son reducidos en cantidades en el plasma almace - nado. La vitamina K no es necesaria para la síntesis de estos

factores. Hay una concentración incrementada de los factores - de este grupo durante una respuesta inflamatoria y en la pre - ñez. El grupo de la Protrombina incluye los factores II, VII, IX y X. La vitamina K es necesaria para su síntesis en el hígado. Los cumarínicos, que inhiben a la vitamina K, causan un de cremento en estos factores. Los factores VII, IX y X no son -- consumidos durante el proceso de la coagulación y, por lo tan- to, están presentes en el suero así como en el plasma. Estos - factores son bien preservados en el plasma almacenado. El gru- po de Contacto está compuesto por los factores XI y XII; son - relativamente estables, no son consumidos durante la coagula-- ción y no dependen de la vitamina K para su síntesis.

Es en la primera etapa de la coagulación ó fase de contac to en donde intervendrían algunos factores recientemente descu biertos, como son: El Factor Fletcher, identificado como una - precalicreína plasmática; el "actor Fitzgerald ó "cofactor de' la actividad de contacto", identificado como un quininógeno de alto peso molecular; y el Factor Passovoy.

En el plasma existen sistemas de inhibidores ó sistemas - antiproteasas, siendo los mejores caracterizados hasta el mo - mento los siguientes: Antitrombina I, II, III y VI; alfa-2-ma croglobulina; alfa-1-antitripsina; alfa-2-antitripsina; Proteí na C.

La desaparición de la fibrina, una vez cumplida su misión, ocurre por diversos mecanismos, entre ellos su degradación por la fibrinólisis. La enzima activa en este sistema es la plasmi na, enzima proteolítica capaz de degradar el fibrinógeno, la - fibrina, el F.V y el F.VIII. Normalmente la plasmina no se en - cuentra en la sangre circulante pero está presente en su forma inactiva, el plasminógeno. El plasminógeno es convertido a plag mina por activadores (enzimas proteolíticas) encontrados en pe- queñas cantidades en la mayoría de los tejidos y en todos los' flúidos del cuerpo, así como en la orina (el activador aquí es denominado urokinasa). Se piensa que la trombina es activada - por el plasminógeno también. Existe un equilibrio entre el sig

tema de coagulación y el de fibrinólisis, aumentándose el segundo cuando el primero se ve incrementado.

La coagulación puede ser evaluada por diferentes procedimientos. Los ensayos pueden incluir la función Vascular, Plaquelar, de los Anticoagulantes (Inhibidores), de Fibrinólisis, de los Productos de Degradación de la Fibrina, y el comportamiento de los Factores de la Coagulación del Plasma. Entre estos últimos están el Tiempo de Protrombina, Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada, Tiempo de Trombina, y Titulación del Fibrinógeno.

A. TIEMPO DE PROTROMBINA: Esta prueba evalúa la eficiencia del sistema extrínseco de la coagulación al medir la formación del coágulo plasmático en presencia de un exceso de extractos tisularesal añadirsele cloruro de calcio. Se miden la protrombina (F.II), F.V, F.VII y F.X, en presencia de Fibrinógeno. Aproximadamente un 30% de la concentración de factores VII, X ó V proporcionan la suficiente formación de trombina para obtener un valor normal en el tiempo de protrombina; si la concentración de alguno de estos factores se encuentra por debajo de este nivel, la reacción puede disminuir y dar un tiempo de coagulación prolongado. Son causa de ello: 1) Deficiencia hereditaria de los factores I, II, V, VII ó X; 2) Terapia con warfarina; 3) Deficiencia de vitamina K; 4) Ciertas enfermedades hepáticas; 5) Anticoagulantes circulantes (como la heparina, productos de degradación de la fibrina, etc.); 6) Consumo de los factores I, II y V en el síndrome de coagulación intravascular.

B. TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA: Se fundamenta en la medición del tiempo de coagulación del plasma en presencia de una "Tromboplastina Parcial" (Cefalina) la cual sustituye la acción del factor 3 plaquetario. El tiempo de cefalina refleja la integridad global del sistema intrínseco de la coagulación, siendo especialmente sensible a los defectos de los factores que intervienen en la primera fase, e insensible al F.VII, F.Plaquelar 3 y F.XIII. Son causa de un tiempo prolongado: 1) Deficiencias congénitas de factores I, II, V, VIII, IX, X, XI, -- Fletcher, Fitzgerald; 2) Terapia con warfarina; 3) Enfermedades

hepáticas; 4) Anticoagulantes circulantes; 5) Consumo de factores I, II, V y VIII en el síndrome de coagulación intravascular.

C. TIEMPO DE TROMBINA: Mide la tercera etapa de la coagulación, la conversión del fibrinógeno a fibrina (esto es, la habilidad funcional del fibrinógeno). Este tiempo se altera por: -- 1) Una deficiente concentración del fibrinógeno; 2) Un fibrinógeno anormal; 3) Presencia de inhibidores de la trombina (Antitrombina III, heparina, productos de degradación de la fibrina). Puede estar normalmente prolongado en el recién nacido y en el mieloma múltiple (la globulina anormal interfiere con la polimerización de la fibrina).

D. TITULACION DEL FIBRINOGENO: Esta prueba es utilizada para detectar una deficiencia en el fibrinógeno y una alteración en la conversión del fibrinógeno a fibrina. Un nivel bajo de fibrinógeno es visto en: 1) Afibrinogenemia hereditaria; 2) Coagulación intravascular; 3) Fibrinólisis primaria y secundaria; -- 4) Enfermedades hepáticas. Se incrementa normalmente en desórdenes inflamatorios y en la preñez.

La experiencia clínica ha permitido demostrar que la intensidad de la disminución del nivel de algunos de los factores de la coagulación, entre ellos el F. II, V, VII, IX y X, y la Antitrombina III, se correlacionan perfectamente con la extensión ó la gravedad del daño hepático. Es importante hacer notar que estos factores de la coagulación se encuentran disminuídos en las hepatopatías de larga evolución y normales cuando hay insuficiencia hepática leve (como en hígado graso) (12).

Existen sustancias que por su naturaleza pueden causar toxicidad a la célula hepática y provocar uno ó varios cambios degenerativos antes mencionados reflejados no sólo en un proceso prolongado de la coagulación sino también en la elevación de algunas enzimas que evalúan la función y estado hepático, sobre todo la TGP.

Por ello, y en base a todo lo antes mencionado, nos proponemos investigar el efecto tóxico directo del Rojo de Rutenio so--

bre algunas células, como los hepatocitos, así como también - de determinar la TGFS y TGOS cuya alteración indicarían un daño celular hepático, y encontrarse entonces la posible relación entre los cambios morfológicos, la elevación de las enzimas y la modificación en la actividad de coagulación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio intenta analizar cómo el Rojo de Rutenio modifica algunos parámetros que evalúan el fenómeno de la coagulación en base a los antecedentes descritos.

JUSTIFICACION

Este estudio nos permitirá acrecentar los conocimientos sobre los efectos que las sustancias tóxicas policatiólicas tengan sobre los distintos modelos biológicos ensayados.

META

Al finalizar este trabajo obtendremos resultados que tratarán de explicar el efecto del Rojo de Rutenio como - una sustancia tóxica directa sobre el hígado y su correlación bioquímica (TGP, TGO y parámetros de la coagulación) y morfológica (estudio histopatológico).

HIPOTESIS

Por ser el hígado un órgano de almacenamiento temporal y metabolizarse en él sustancias introducidas al organismo (en este caso el Rojo de Rutenio) y de elaborar la mayoría de los Factores de la Coagulación, creemos que éstos últimos se encuentren alterados por el efecto tóxico que cause sobre las células hepáticas.

OBJETIVOS

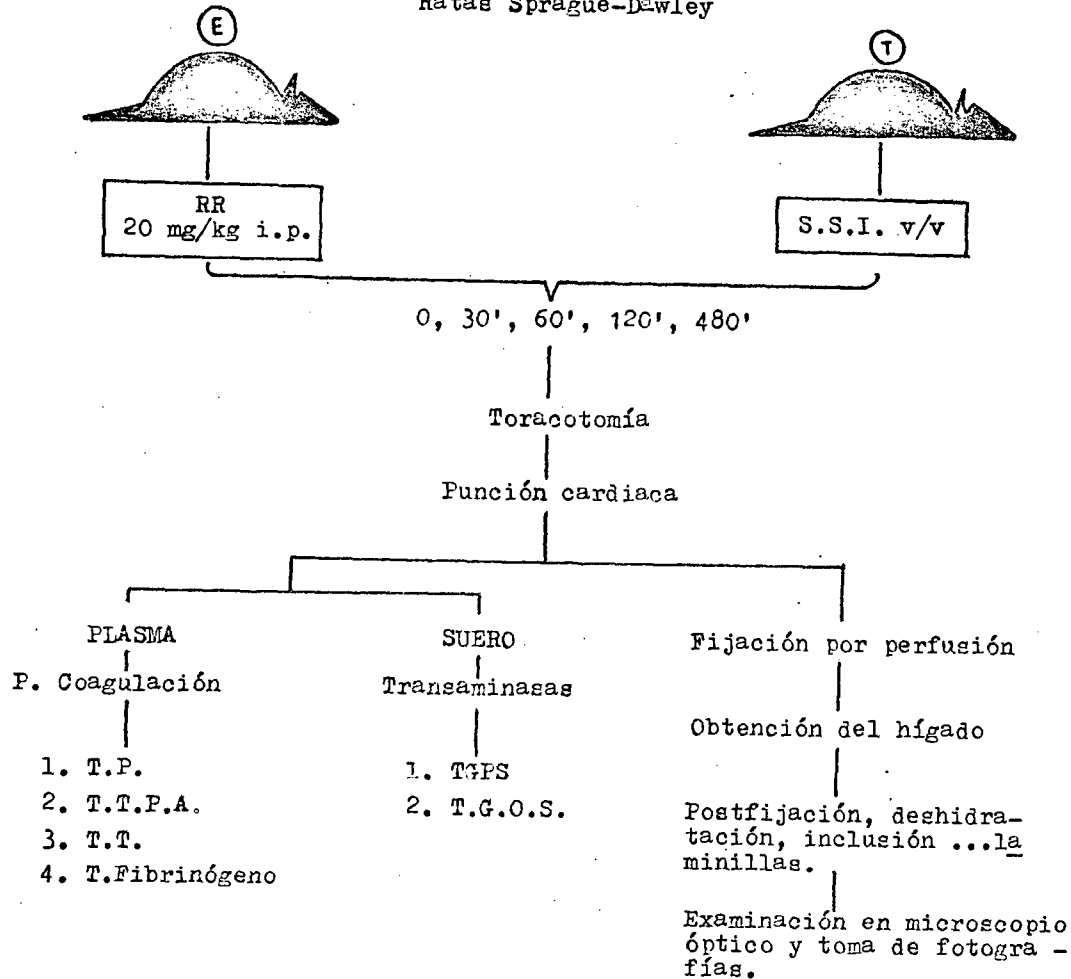
1. Conocer el posible efecto tóxico que pueda tener el Rojo de Rutenio sobre las células hepáticas encargadas de su metabolismo.
 - 1.1 Su efecto secundario sobre algunas pruebas de coagulación:
 - 1.1.1 Tiempo de Protrombina.
 - 1.1.2 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada.
 - 1.1.3 Tiempo de Trombina.
 - 1.1.4 Titulación del Fibrinógeno.
 - 1.2 Su efecto sobre las enzimas Transaminasa Glutámica Pirúvica y Transaminasa Glutámica Oxalacética.

2. Análisis Histopatológico

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Ratas Sprague-Dawley



Se utilizaron ratas adultas de sexo masculino de la cepa Sprague-Dawley. Todos los animales se encontraron en condiciones óptimas de bioterio, esto es, periodo controlado de luz/obscuridad de 12 por 12 horas, temperatura controlada, - alimentación con Chow (Nutri-cubos) Purina y agua bidestilada ad libitum. Se formaron 10 grupos de 6 ratas cada uno, to mándose como testigos 5 de ellos. De los 6 animales por grupo, 3 se utilizaron para las pruebas bioquímicas de coagulación y 3 para la determinación de las Transaminasas (N=3).

A los animales experimentales se les inyectó intraperitonealmente (i.p.) 20 mg por kg de Rojo de Rutenio en solución acuosa al 0.3% amortiguado en fosfatos 0.1M, en dosis única. Los testigos recibieron i.p. volúmenes proporcionales de solución salina isotónica (SSI).

Tanto los animales experimentales como los testigos se anestesiaron con éter etílico a los 0, 30, 60, 120 ó 480 minutos después de la inyección del RR ó de la SSI.

Se realizó una toracotomía y las muestras de sangre se extrajeron del ventrículo izquierdo mediante punción cardíaca con una aguja Num. 20. Para la obtención del plasma (necesario en las pruebas de coagulación), las muestras se anticoagularon con una solución preparada de Citrato de Sodio al 3.8%, bajo una proporción de 0.5 ml de anticoagulante por -- 4.5 ml de sangre, centrifugándose a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Para la obtención del suero (utilizado en la determinación de las transaminasas), se tomaron 4 ml de sangre y se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.

Las pruebas de coagulación que se llevaron a cabo fueron las siguientes:

- A. Tiempo de Protrombina (TP).
- B. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA).
- C. Tiempo de Trombina (TT).
- D. Titulación del Fibrinógeno.

Las pruebas de coagulación fueron realizadas de manera - semiautomática mediante el uso del Fibrómetro. Este aparato - cuenta con los siguientes componentes:

- a. Switch de encendido y apagado.
- b. Luz indicadora que se enciende cuando se ha alcanzado - la temperatura de 37°C .
- c. Un cronómetro que indica el tiempo transcurrido para la formación del coágulo. Da lecturas en segundos y décimas de segundos.
- d. Un botón que retorna los dígitos a 000.0
- e. Seis celdillas en las que el plasma ó reactivo son colo - cados a fin de precalentarse a 37°C .
- f. Una celdilla central donde se lleva a cabo la reacción' de la mezcla del plasma que está siendo testado.
- g. Un par de electrodos que mediante el movimiento de uno' de ellos hace posible la mezcla del plasma con el reac - tivo cada mitad de segundo hasta formación del coágulo.
- h. Barra que detiene el cronómetro cuando la pipeta automá - tica no es usada.
- i. Contacto para la conexión de la pipeta automática cuan - do es utilizada.

Junto con el fibrómetro, se cuenta con otros aditamentos tales como:

- Pequeñas copas para la colocación del plasma ó reactivo, mismas que irán en las celdillas del fibrómetro.
- Fibro-tip: Pequeña pipeta que se agrega a la pipeta auto - mática.
- Pipeta Automática, que cuenta con:
 - a. Cable de contacto con el fibrómetro.
 - b. Disparador del plasma ó reactivo contenidos en el fi - bro-tip. También puede hacer la operación inversa.
 - c. Calibrador para tomar, a través del fibro-tip, 0.1 ó 0.2 ml (según se requiera) de plasma o reactivo.
 - d. Switch para la activación de los electrodos del fibró - metro una vez expulsado el contenido del fibro-tip.

A. TIEMPO DE PROTROMBINA

a. Muestra:

- Plasma citratado rico en plaquetas del animal experimental.
 - Plasma citratado rico en plaquetas del animal testigo.
- Mantenerlos a 4°C por no mas de 2 horas.

b. Reactivo:

- Tromboplastina tisular (Laboratorio LAFON).
- Cloruro de Calcio 0.02M

c. Equipo:

- Tubos de 10x75 mm.
- Baño maría a 37°C.
- Baño de hielo.
- Fibrómetro con pipeta automática.

d. Procedimiento:

1. Mezclar cantidades iguales de tromboplastina más cloruro de calcio.
2. Se pipetea 0.2 ml de la mezcla y se depositan en un fi-
bro-tip y de ahí incubarlos a 37°C durante 3-5 minutos.
3. Se incuba una pequeña cantidad de plasma a probar a
37°C por 2-3 minutos.
4. Se agrega 0.1 ml de plasma a la copilla que contiene la
mezcla y se pone en marcha el fibrómetro hasta forma-
ción del coágulo. Estas pruebas se harán por duplicado.

B. TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA

a. Muestra:

- Plasma citratado rico en plaquetas del animal experimental.
 - Plasma citratado rico en plaquetas del animal testigo.
- Mantenerlos a 4°C por no mas de 2 horas.

b. Reactivo:

- Tromboplastina Parcial Activada (Lab. IAFON). Líquido.
- Cloruro de Calcio 0.025M (Lab. IAFON).

Ambos vienen ya mezclados.

c. Equipo:

- Tubos de 10x75 mm.
- Baño de hielo.
- Baño maría a 37°C.
- Fibrómetro con pipeta automática.

d. Procedimiento:

1. Incubar una cantidad suficiente de Cloruro de Calcio - 0.025M a 37°C.
 2. Pipetear 0.1 ml de plasma (experimental ó testigo) y depositarlo en la copilla.
 3. Pipetear 0.1 ml de tromboplastina parcial en la copilla que contiene el plasma a testar.
 4. Mezclar el contenido suavemente e incubarlo a 37°C por 5 minutos como mínimo.
 5. Transcurrido ese tiempo, pipetear 0.1 ml de cloruro de calcio precalentado y agregarlo a la mezcla de Plasma/Tromboplastina Parcial-Calcio, poniendo en marcha el fibrómetro hasta formación del coágulo.
- Las pruebas se harán por duplicado.

C. TIEMPO DE TROMBINA**a. Muestra:**

- Plasma citratado rico en plaquetas (experimental y testigo).

Mantenerlo a 4°C por no mas de 2 horas.

b. Reactivo:

- Trombina humana (Fibrindex, Lab. ORTHO DIAGNOSTICS). Ampula de 50U/ml.
- Solución Salina al 0.85%.

c. Equipo:

- Tubos de 10x75 mm.
- Baño maría a 37°C.
- Baño de hielo.
- Fibrómetro con pipeta automática.

d. Procedimiento:

1. Se pipetea 0.2 ml de trombina diluida.
2. Se adiciona 0.1 ml de plasma, contándose inmediatamente el tiempo que tarda en formarse el coágulo.

Las pruebas se harán por duplicado.

NOTA: La Trombina de 50U/ml se diluye con solución salina' al 0.85% hasta obtener tiempos en una mezcla de plasmas normales que oscilen entre 18 y 23 segundos.

D. TITULACION DEL FIBRINOGENO

a. Muestra:

- Plasma citratado rico en plaquetas del animal experimental ó testigo.

b. Reactivo: Ninguno.

c. Equipo:

- Tubos capilares.
- Tubo de 12x75 mm.
- Baño de agua a 56°C .
- Mechero de Bunsen.
- Microcentrífuga.
- Cuadrícula milimétrica.
- Lupa.

d. Procedimiento:

1. Se marca un tubo capilar a 4 cm y se llena con plasma - hasta dicha marca; luego se cierra a la flama de un mechero comenzando con el extremo opuesto al que se llenó.
2. El tubo capilar se introduce en un baño de temperatura'

- constante a 56°C dentro de un tubo de 12x75 mm.
3. Se deja incubando 15 minutos.
 4. Transcurrido ese tiempo se centrifuga el capilar por 3 minutos en una microcentrífuga.
 5. La lectura se hace sobre cuadrícula milimétrica utilizando una lupa.

La altura del fibrinógeno y del plasma se miden en mm. Esta debe hacerse inmediatamente al terminar el tiempo de centrifugación.

Para obtener el resultado del fibrinógeno se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Altura del Fibrinógeno en mm} \times 100}{\text{Altura total en mm}} = \text{Fibrinocrito}$$

$$\text{Fibrinocrito} \times \text{Factor de calibración} = \text{Fibrinógeno.}$$

NOTAS: El factor de calibración equivale a 54.7

El fibrinógeno se mide en mg/dl.

MEDICION DE TRANSAMINASAS

Para la medición de las transaminasas, se utilizaron reactivos ALT-Optimizado (Alanina-Aminotransferasa) y AST-Optimizado (Aspartato-Aminotransferasa), de Beckman Instruments Inc (1982). Los reactivos fueron preparados conforme al instructivo anexo al kitt.

Se utilizó un espectrofotómetro Coleman, Junior II, - calibrándose a una longitud de onda de 340 nm, temperatura de incubación 25°C, y como medida Absorvancia. Esta última se leyó y registró a intervalos de un minuto por 3 minutos (3 lecturas). Posteriormente se calculó el promedio de cambio de absorvancia por minuto (A/min).

La actividad de ALT se calculó como sigue:

$$\text{ALT (UI/L)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{\text{Absortividad}} \times \frac{V_1}{V_2} \times 1000$$

ALT = Aminotransferasa.

UI/L = Unidades Internacionales por litro.

$\Delta A/\text{min}$ = Promedio de cambio de absorvancia por minuto.

Absortividad = Absortividad milimolar del NADH a 340 -
nm = 6.22

V_1 = Volumen total = 1.75 ml.

V_2 = Volumen muestra = 0.25 ml.

La fórmula anterior equivale a :

$$\text{ALT(UI/L) a 340nm} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6.22} \times \frac{1.75}{0.25} \times 1000 = \Delta A/\text{min} \times 1125$$

NOTA: $\Delta A/\text{min}$ se obtiene restando a la lectura máxima la mínima y dividiendo el resultado entre 3.

Los resultados de todas las pruebas se analizaron estadísticamente mediante la "T" de Student.

Irmediatamente después de extraídas las muestras de sangre, las ratas fueron perfundidas por vía intracardiaca mediante un catéter al ventrículo izquierdo y un corte a nivel de la aurícula derecha para pasar las soluciones "A" y "B":

SOLUCION "A" (Solución Lavadora):

- Amortiguador de fosfato 0.1 M.
 - Heparina 1000 UI/1000 ml de solución.
 - Procaína 1 gr/1000 ml de solución.
 - Cloruro de Calcio 0.001 M, 1 gota/10 ml de solución.
- (Se ajustó la osmolaridad a 290-300 mosm. con sacarosa).
El pH fué de 7.3-7.4

SOLUCION "B" (Solución Fijadora):

- Amortiguador de fosfatos 0.1 M.
 - Glutaraldehído al 2.5%.
- (La osmolaridad se ajustó a 350-375 mosm.). El pH fué -

de 7.3-7.4

El método de perfusión utilizado fué el de Feria Velasco y Karnovsky, con una presión de 1.4 metros. La Solución "A" - fué infundida por espacio de 2-3 minutos; la Solución "B" por 10 a 15 minutos. Después de esto se realizó la extracción del hígado sometiéndose éste a una post-fijación en la Solución - "B" por espacio de 1.30 horas.

RESULTADOS

1. Evaluación Enzimática

La TGP se encontró aumentada a los 60 y 120 minutos, dándonos un 20.35% y 35.53% de incremento respectivamente en relación a los testigos. Si bien gráficamente se observa también un incremento a los 30 minutos, éste no es estadísticamente significativo (Gráfica No. 1).

La TGO mostró un patrón de comportamiento parecido al de la TGP, pero los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos (Gráfica No. 2).

2. Pruebas de Coagulación

Entre los parámetros de la coagulación estudiados, el TP mostró modificaciones en todos los tiempos ensayados (30, 60, 120 y 480 minutos) pero los estadísticamente significativos ocurrieron a los 30 minutos con un 5.15% de incremento en relación al testigo, y de 8.51% a los 60 minutos (Gráfica No. 3).

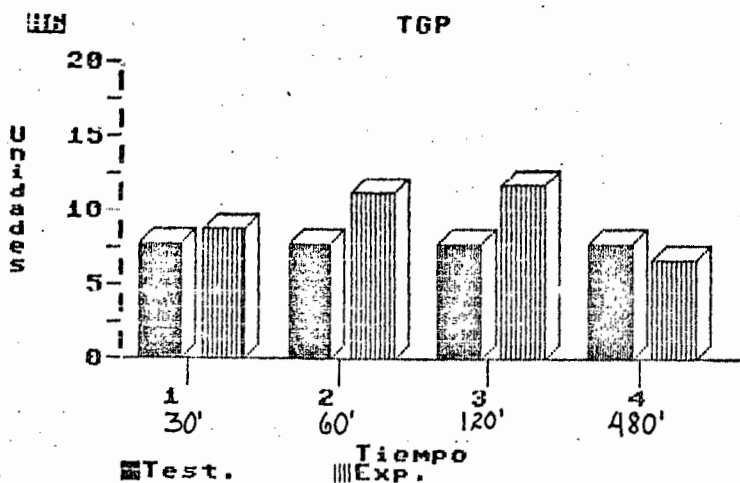
En el TTP pudo ser observado el comportamiento más claro de incremento, pero los estadísticamente significativos ocurrieron a los 30 minutos con un 0.60% de incremento y 5.47% a los 60 minutos en comparación con el testigo (Gráfica No. 4).

En el TT no hubo alteraciones en los tiempos estudiados al mostrar una uniformidad gráfica y estadística en comparación con los testigos (Gráfica No. 5).

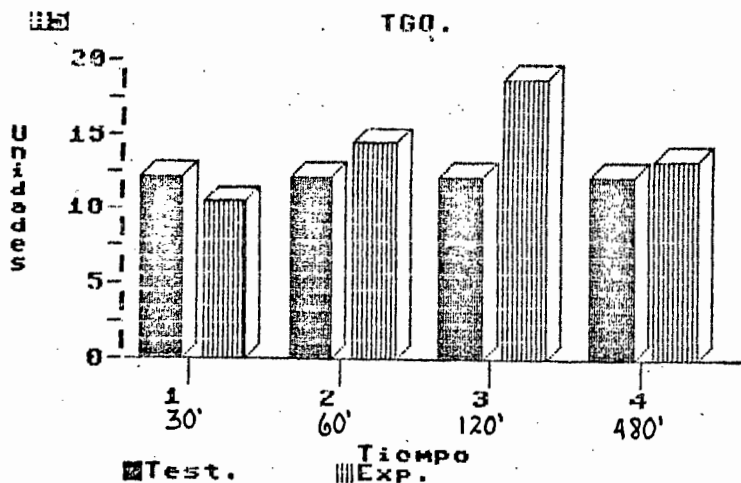
Aunque en la Titulación del Fibrinógeno la gráfica tendió a elevarse a los 60 y 480 minutos, estos resultados no son estadísticamente significativos (Gráfica No. 6).

3. Hallazgos Histopatológicos

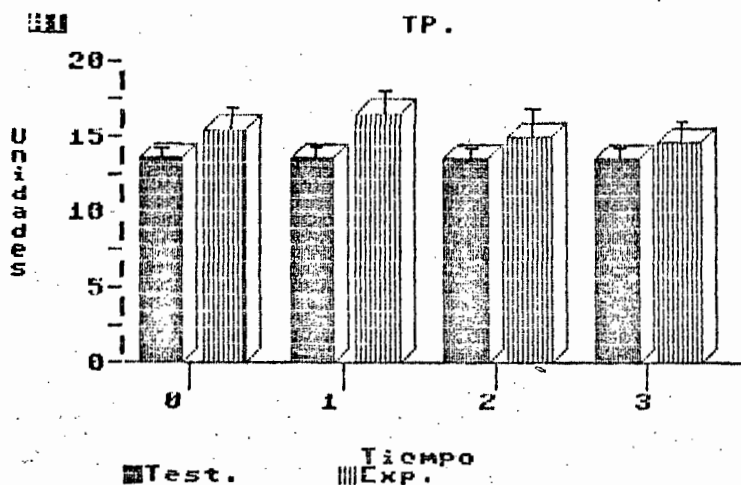
El hígado mostró cambios degenerativos al compararlo con tra los testigos a los 30, 60, 120 y 480 minutos post-inyec -



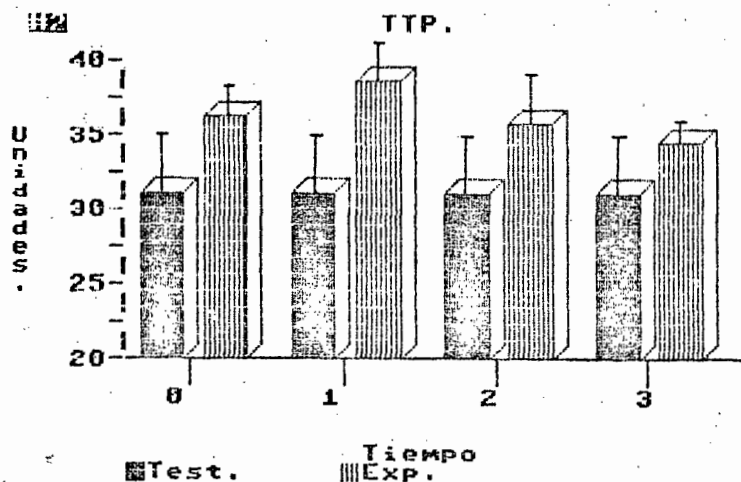
GRAFICA No. 1: Medición de la TGP en los diferentes tiempos estudiados. Los estadísticamente significativos ocurrieron a los 60 y 120 minutos (20.35% y 35.53% respectivo.)



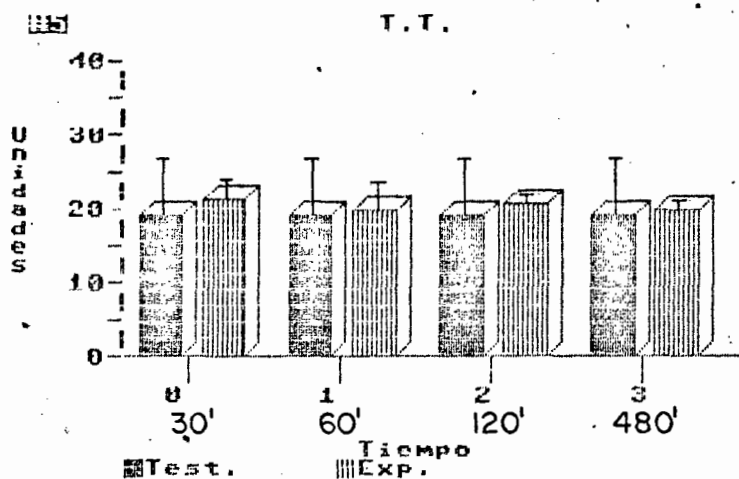
GRAFICA No. 2: Medición de la TGO en los diferentes tiempos estudiados. Ninguno fué estadísticamente significativo.



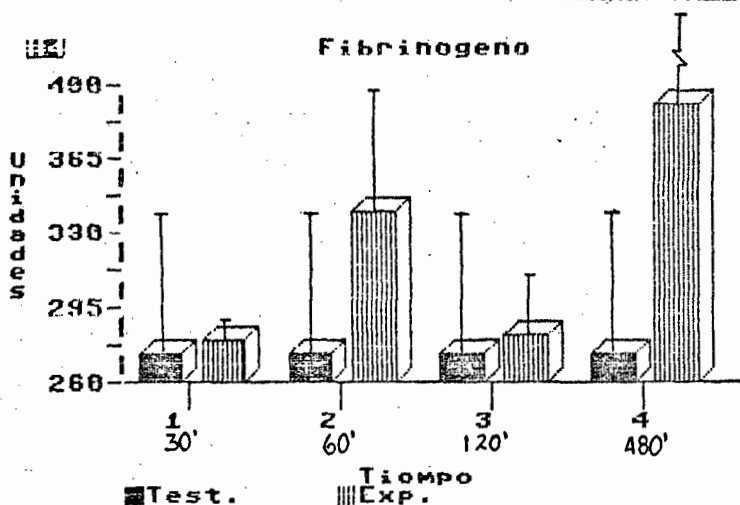
GRAFICA No. 3: El TP muestra incremento en todos los tiempos estudiados, pero los de significado estadístico ocurrieron a los 30 (5.15%) y 60 minutos (8.51%).



GRAFICA No. 4: El TTP muestra el incremento general más claro. Estadísticamente, los de significancia ocurrieron a los 30 (0.60%) y 60 minutos (5.47%).



GRAFICA No. 5: En el TT puede apreciarse la uniformidad gráfica y estadística en todos los tiempos estudiados.



GRAFICA No. 6: En la titulación del fibrinógeno no hubo resultados estadísticamente significativos.

ción.

A los 30 minutos se observa ya palidez del citoplasma en donde también se aprecian pequeñas vacuolas. El núcleo - aparece contraído, redondeado y de una tonalidad oscura, - sin distinción total del nucleolo (Fig. 2).

A los 60 minutos se aprecia una pérdida (aunque inicial) en la uniformidad de los cordones hepáticos, mayor palidez del citoplasma y un número creciente de vacuolas. Si bien el núcleo presenta el mismo aspecto que el tiempo anterior, en algunas células se observa a un lado de su posición central (Fig. 3).

A los 120 minutos se observa el cambio más drástico, en donde las pequeñas vacuolas se han fusionado para dar lugar a grandes espacios amorfos. Se ha perdido totalmente la citoarquitectura, no alcanzándose a diferenciar el acomodo en cordones de los hepatocitos (Fig. 4).

Es ya a los 480 minutos cuando el hígado tiende a retornar a su morfología normal aunque aún se observen vacuolas citoplasmáticas y algunos núcleos contraídos, diferenciándose ya en la mayoría de ellos los nucleolos (Fig. 5).

Cabe señalar que las Células de Kupffer no mostraron cambios morfológicos aparentes en los animales experimentales.

Los resultados obtenidos de los animales tratados con SSI no mostraron alteraciones en todas las pruebas realizadas (evaluación enzimática, pruebas de coagulación y hallazgos histopatológicos), asemejándose a los observados con los testigos.

SECUENCIA CRONOLOGICA DEL EFECTO TOXICO
DEL ROJO DE RUTENIO SOBRE LOS HEPATOCI-
TOS VISTA A 200 y 450 AUMENTOS. TECNICA:
HEMATOXILINA-EOSINA.

FIGURA 1: Testigo.

Disposición radial y en cordones de los hepatocitos a partir de la vena central. Célula hepática poligonal con núcleo esférico y nucleolo. Células de Kupffer con tonalidad más oscura y localizada cerca del borde externo del hepatocito.

FIGURA 2: Experimental 30 minutos.

Citoplasma pálido y vacuolado. Núcleos picnóticos.

FIGURA 3: Experimental 60 minutos.

Pérdida inicial de la disposición radiada. Número creciente de vacuolas citoplásmicas. Células de Kupffer aparentemente normales.

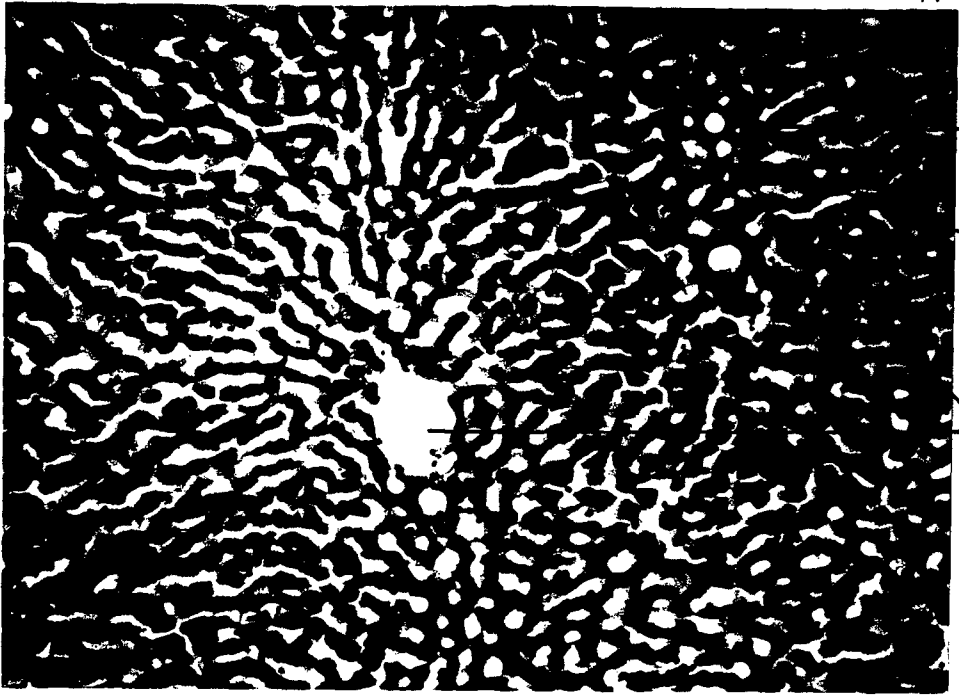
FIGURA 4: Experimental 120 minutos.

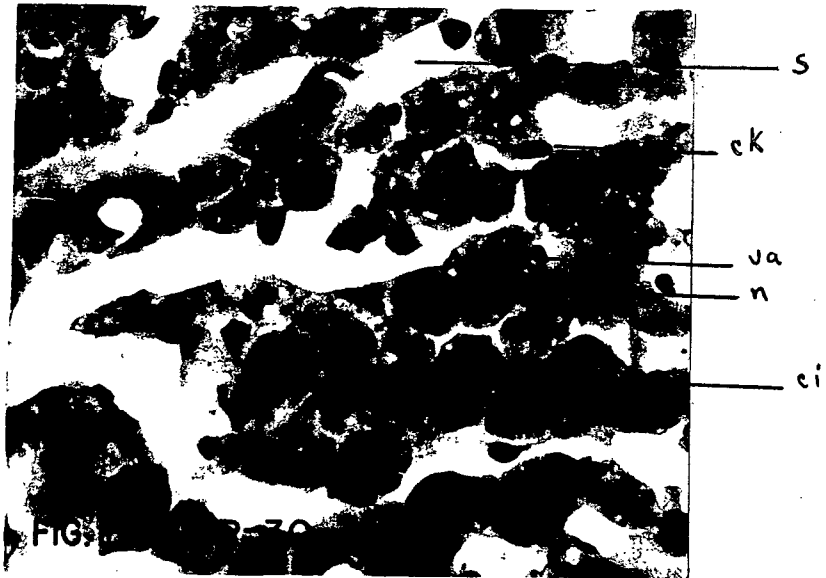
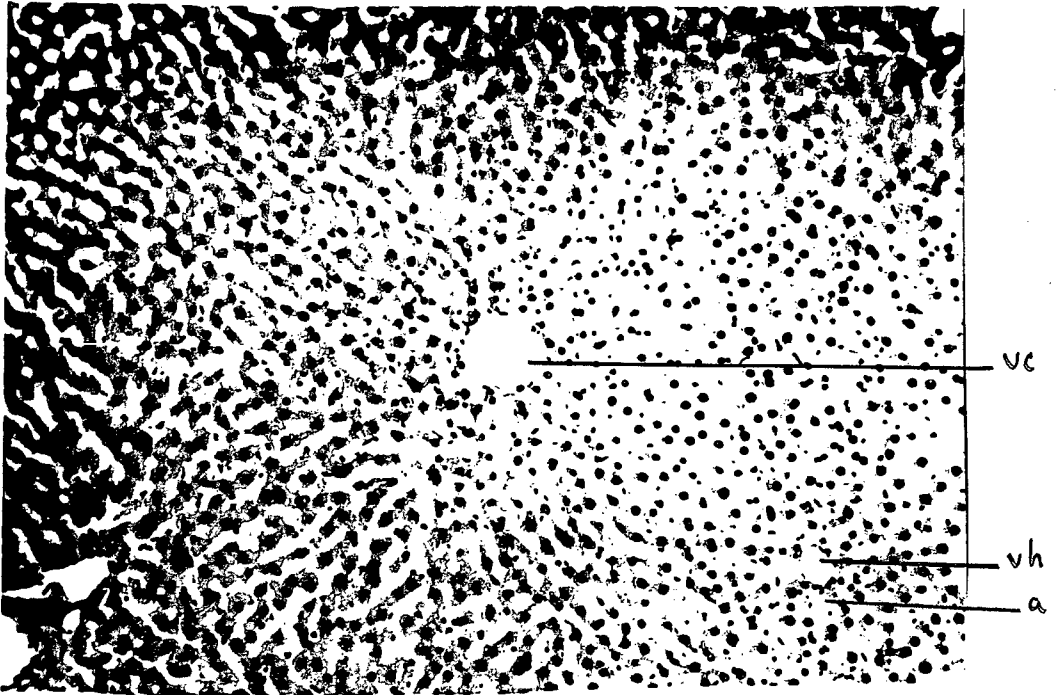
Grandes espacios amorfos en el citoplasma. Desplazamiento de algunos núcleos picnóticos hacia la periferia de la célula. Células de Kupffer aparentemente normales.

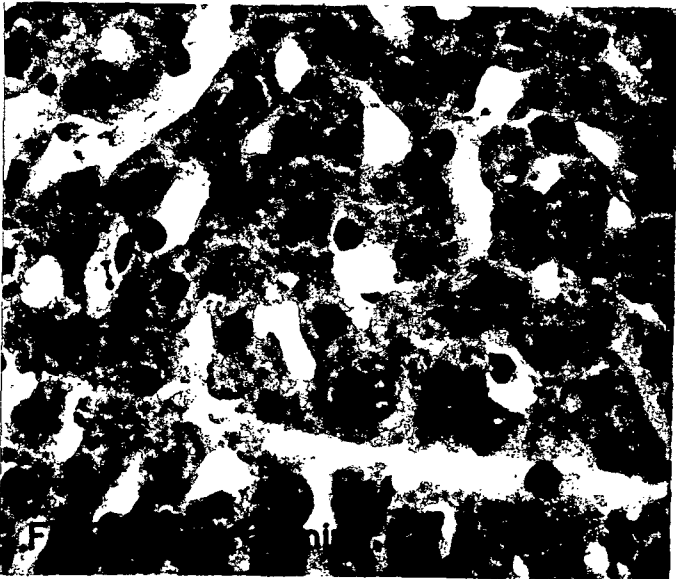
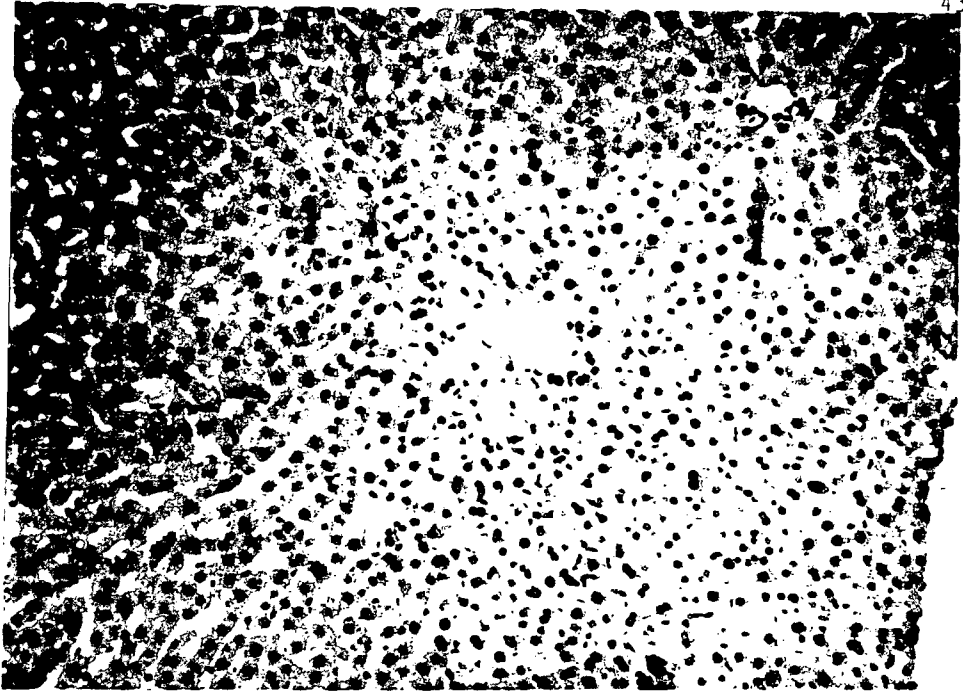
FIGURA 5: Experimental 480 minutos.

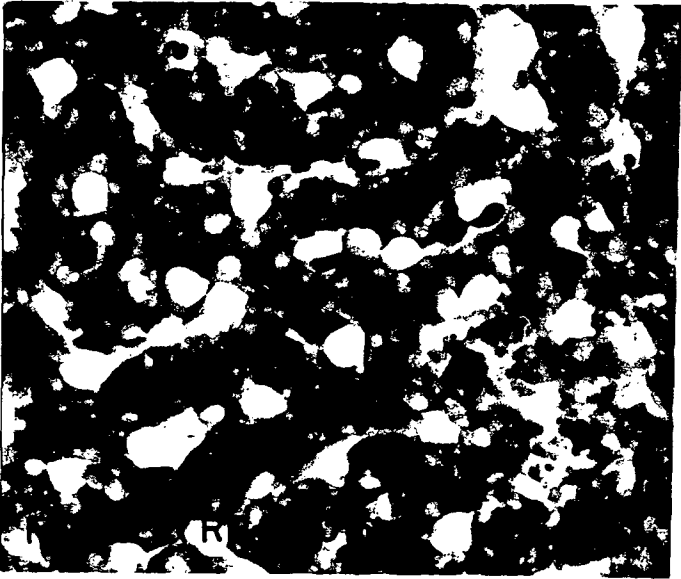
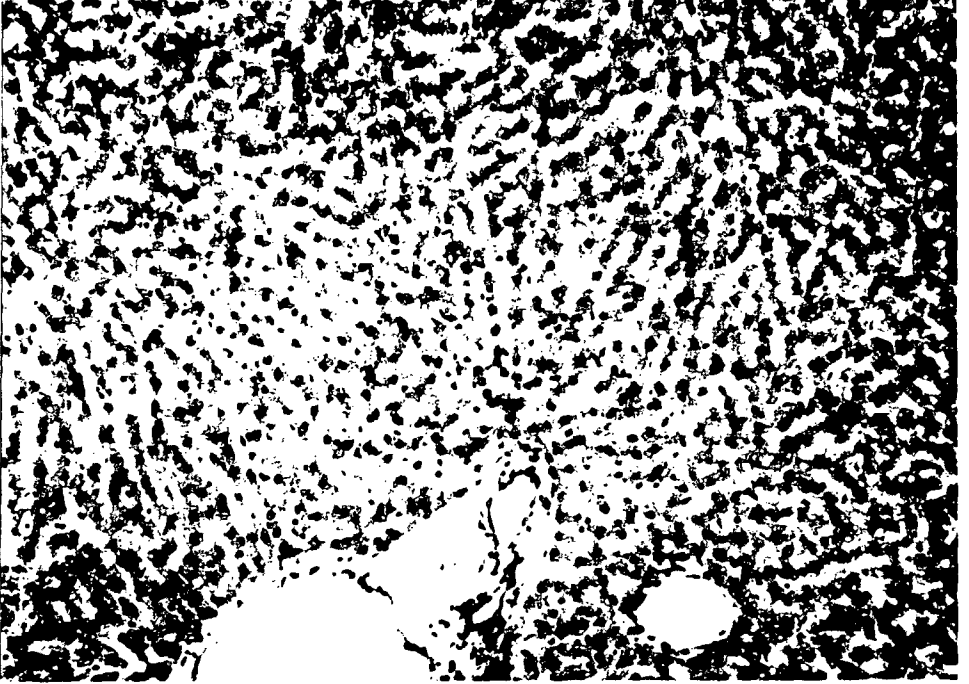
Tendencia a la normalidad.

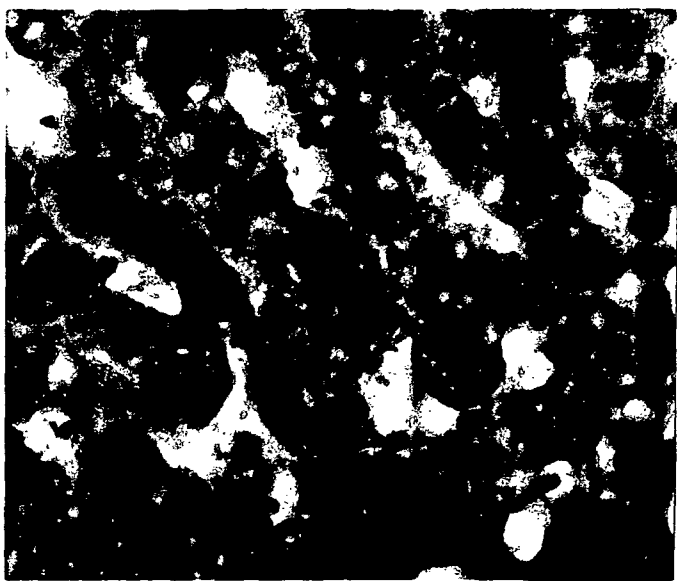
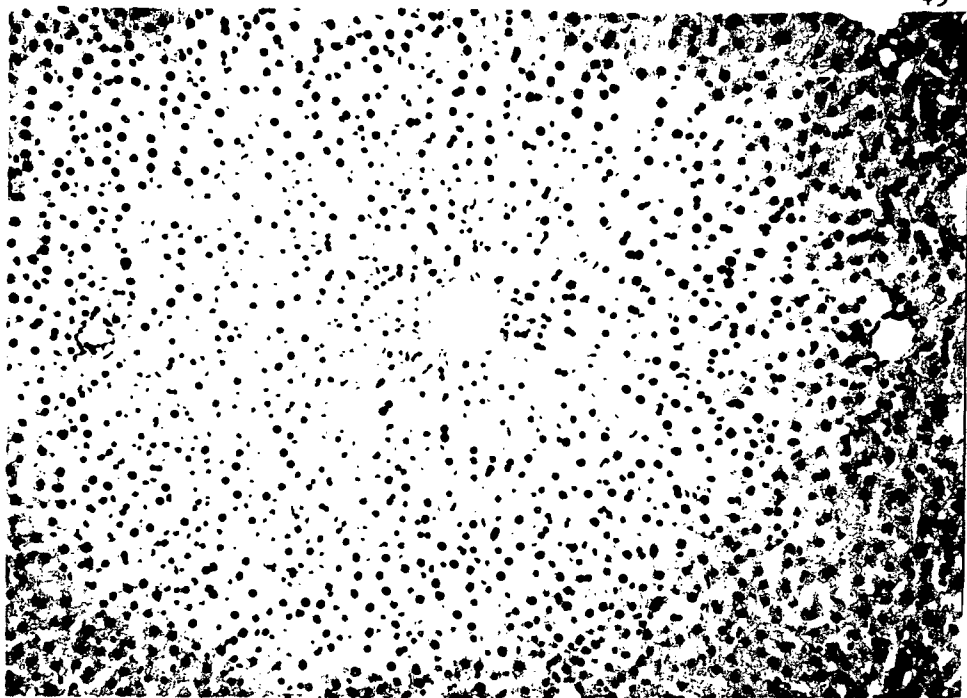
a, Arteria hepática
c, Conducto biliar
ci, Citoplasma
ck, Célula de Kupffer
h, Hepatocito
n, Núcleo
s, Espacio sinusoidal
va, Vacuola
vc, Vena centrolobulillar
vh, Vena hepática











DISCUSION

Los resultados aportados por este estudio demuestran que el Rojo de Rutenio tiene un efecto tóxico directo sobre los hepatocitos.

Fué relevante la relación estrecha entre los cambios degenerativos hepáticos y los parámetros enzimáticos y de la coagulación ocurridos a los 60 y 120 minutos post-inyección, así como también la tendencia a la normalidad que sucede ya a los 480 minutos.

Si bien es cierto que el sitio de mayor importancia para la traslocación del calcio se encuentra localizado en la mitocondria (3), el contacto continuo del RR con la membrana plasmática puede resultar en un efecto de notable repercusión como alteraciones en el sistema microfililar (estructuras calcio dependientes) y sobrevenir el desequilibrio iónico (intra y extracelular) seguido de degeneración.

Aunque se tiene el conocimiento de que el RR tiene una pobre penetración en el tejido sólido (22) por ser un compuesto de alto peso molecular (24), sí provoca un estado de degeneración hidrópica y grasa que puede afectar los sistemas enzimáticos y bloquear la conjugación y la excreción de la bilirrubina, ó la rejugitación de la bilirrubina conjugada hacia la sangre. El daño hepático se acompaña entonces de valores incrementados de TGPS y TGOS así como de hipoprotrombinemia (29); el fibrinógeno se mantiene normal ya que es elaborado en las células de Kupffer (12, 20, 39).

Cabe recordar que el complejo bilirrubina-albúmina no puede atravesar el filtro glomerular y por lo tanto no es eliminado con la orina. La bilirrubina conjugada es hidrosoluble, se elimina con la orina y no es tóxica para las células. En cambio, la bilirrubina no conjugada es insoluble en agua, pero es capaz de disolverse en los lípi-

dos complejos del tejido nervioso (29).

Estos experimentos nos pueden conducir a pensar que la bilirrubina no conjugada pudiera tener otros "blancos" como el propio endotelio vascular y dar como resultado una posible alteración en la elaboración del F.VIII y fallas en el sistema fibrinolítico (12).

Como lo mencionan algunos autores (1, 37), hubo animales que mostraron debilidad muscular desde antes de los 30 minutos post-inyección, seguida de parálisis flácida y continuando algunos de ellos con accesos convulsivos a los 120 minutos ó al manipularlos para la recolección de la muestra de sangre. Estos trastornos neuromusculares pueden ser explicados por el hecho de que el RR se introduzca al sistema nervioso central por zonas carentes de barrera hematoencefálica ó debilitadas por el efecto de la bilirrubina no conjugada e interferir en el mecanismo de intercambio de la pareja sodio-calcio y la liberación de neurotransmisores (10), ó que sea la propia bilirrubina quien penetre por las zonas referidas.

Es importante señalar que los cambios morfológicos -- drásticos sucedieron a los 120 minutos y ocasionaron sólo -- un estado degenerativo sin llegar a la necrosis, por lo tan to de orden reversible.

Deben llevarse a cabo más investigaciones para hacer -- medición del posible incremento de las bilirrubinas (conjugada y no conjugada) e incluso separar por cromatografía -- las fracciones del RR capaces de inducir el efecto tóxico.

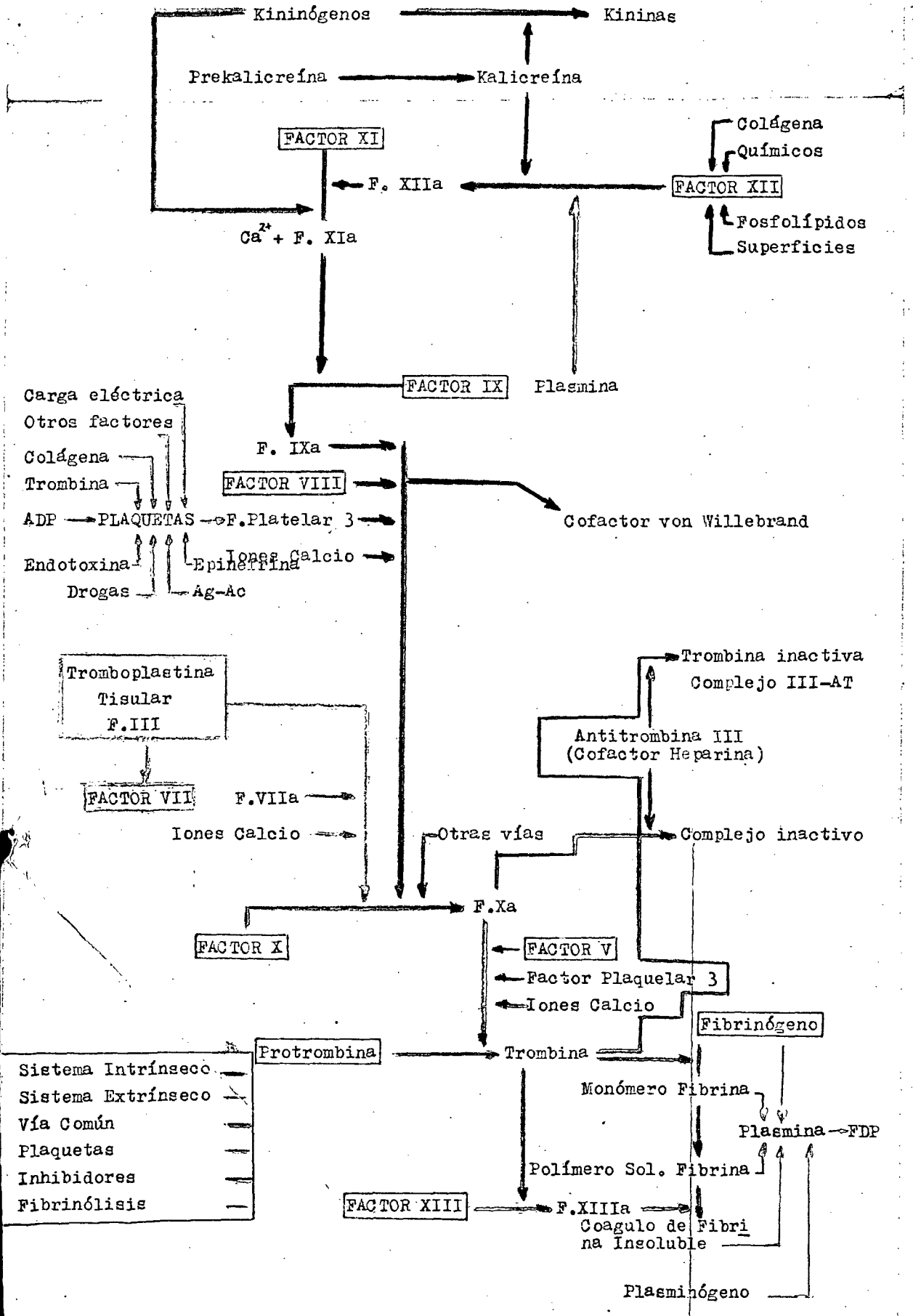
CONCLUSIONES

1. Estos resultados sugieren que al parecer el rojo de rutenio tiene un efecto tóxico directo sobre la célula hepática, pero de orden reversible.
2. Los parámetros de las transaminasas, coagulación y hallazgos histopatológicos coinciden a los 60 y 120 minutos, en cuyos tiempos el daño hepático morfológico se ve reflejado por el incremento en la TGP - así como también en el TP y TTP. A los 480 minutos ya hay una tendencia a la normalidad.

ANEXOS

FACTOR	VIDA MEDIA (HRS)		LUGAR DE SINTESIS
		REF.	
I	Fibrinógeno	60-90 (12) 96-120 (20) 36-76 (39)	Cel. de Kupffer Plaquetas
II	Protrombina, Pretrombina.	72-96 65-90 67-106	Hígado
III	Tromboplastina tisular.		Presente en la mayoría de los tejidos; principalmente en Pulmón y Cerebro.
IV	Calcio		
V	Factor lábil, Proaccelerina.	15-24 15-24 15-24	Hígado
VII	Factor estable, Proconvertina, Autoprotrombina I.	4-6 4-6 1.6-5	Hígado
VIII	F. Antihemofílico, Globulina Antihemofílica, F. Antihemofílico A, - Cofactor Plaquetario I	10-18 10-12 9-18	Hígado, Bazo, SRE, Riñón (?), Endotelio vascular, Megacariocito (?).
IX	F. Christmas, Componente plasmático de la tromboplastina, F. Antihemofílico B, Autoprotrombina II, Cofactor plaquetario II.	18-30 18-30 20-24	Hígado
X	Factor Stuart-Prower, Autoprotrombina III.	48-60 40-60 34-57	Hígado
XI	Antecedente de la tromboplastina del plasma, F. Antihemofílico C.	60 45-60 62	Hígado
XII	Factor Hageman	50-70 50-70 48-52	Hígado (?)
XIII	F. estabilizante de la fibrina, F. de Laki-Lorand.	72-96 72-120 108-148	Megacariocito, Hígado, Bazo, Utero, etc.
	F. Fletcher (precalicreína)		?
	F. Fitzgerald (quininógeno de alto peso molecular)		?
	F. Passovoy		

HEMOSTASIS



SUMARIO

Se realizó este estudio con el fin de comprobar si el Rojo de Rutenio pudiera tener un efecto tóxico directo sobre los hepatocitos e interferir indirectamente con los mecanismos de la coagulación. Para ello se utilizaron ratas adultas Sprague-Dawley Macho y se formaron grupos tanto experimentales como testigos. A los animales experimentales se les inyectó i.p 20 mg/kg de RR y a los testigos solución salina fisiológica. De ambos grupos se obtuvieron suero sanguíneo para medir la actividad de las transaminasas glutámico-pirúvica (TGO) y glutámico oxalacética (TGO), y plasma para determinar el TP, TTP, TT y Fibrinógeno. Todos estos estudios se realizaron a los 30, 60, 120 y 480 minutos post-inyección del RR o la SSI. Después de la recolección de las muestras se realizó la fijación por perfusión intracardiaca para la obtención de los hígados y su estudio morfológico en microscopía óptica.

La TGP se encontró aumentada a los 60 y 120 minutos. La TGO, si bien mostró las mismas modificaciones, éstas no fueron estadísticamente significativas.

Para el TP y TTP, los tiempos estadísticamente significativos ocurrieron a los 30 y 60 minutos, y a los 60 y 480 minutos para el Fibrinógeno. El TT mostró uniformidad gráfica y estadística.

El hígado mostró cambios degenerativos ya a partir de los 30 minutos, ocurriendo los más drásticos a los 120, y tendiendo a la normalidad a los 480 minutos.

Con todo ello se llega a la conclusión de que el RR tiene al parecer un efecto tóxico directo sobre la célula hepática, que se manifiesta por el incremento de la TGP y la modificación de los parámetros de la coagulación aquí estudiados.

BIBLIOGRAFIA

1. ARAUZ-CONTRERAS, J.; GOMEZ-PLASCENCIA, J.; FERIA-VELASCO, A.: Induction of flaccid paralysis followed by seizure activity by means of general administration of Ruthenium Red to adult rats. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 1982; 13 (4): 271-277.
2. ARAUZ-CONTRERAS, J.; ORTIZ, G.G.; FERIA-VELASCO, A.: Ru - thenium-induced red blood cell agglutination in the rat. In vivo and in vitro studies. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 1984; 16 (2): 157-168.
3. ASH, G.R.; BYGRAVE, F.L.: Ruthenium Red as a probe in assessing the potential of mitochondria to control intracellular calcium in liver. FEBS Letters, 1977; 78 (2): 166-168.
4. BAUK, G.; SOMONNEAU, M.; TAUC, L.: Blocking action of Ruthenium Red on cholinergic and non-cholinergic synapses: possible involvement of sialic acid-containing substrates in neurotransmission. Brain Res., 1978; 152: 633-638.
5. BENJAMIN, M.M.: Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Limusa, México, D.F. (Méx); 1984. 275, 284-286.
6. BROWN, B.A.: Hematology: Principles and Procedures. Third Edition. Lea and Febiger, Philadelphia (EUA); 1980. 113-119; 127-138.
7. CARAFOLI, E.; SACKTOR, B.: The effects of Ruthenium Red on reactions of Blowfly flight muscle mitochondria with calcium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972; 49 (6): 1498-1502.

8. PISKUM, G.; COCKRELL, R.S.: Ruthenium Red sensitive and in sensitive calcium transport in rat liver and Ehrlich Ascites tumor cell mitochondria. FEBS Letters, 1978; 92 (1): 125-128.
9. GANONG, W.F.: Manual de Fisiología Médica. 7a. Edición. EL Manual Moderno, México, D.F. (Méx); 1979. 434-435.
10. DODDARD, G.A.; ROBINSON, J.D.: Uptake and release of calcium by rat brain sinaptosomes. Brain Res., 1976; 110: 331-350.
11. GRAU, H. y WALTER, P.: Histología y Anatomía Microscópica Comparada de los Mamíferos Domésticos. Labor, Barcelona (Esp); 1975. 109-111.
12. GRUPO COOPERATIVO LATINOAMERICANO DE HEMOSTASIS Y TROMBOSIS. Hemorragia y Trombosis. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. (Méx); 1981. 221-241; 309-321.
13. GUYTON, A.C.: Tratado de Fisiología Médica. Quinta Edición Interamericana, México, D.F. (Méx); 1976. 930-938.
14. HARPER, H.A.: Manual de Química Fisiológica. 7a. Edición. EL Manual Moderno, México, D.F. (Méx); 1980. 89.
15. ITO, F.; FUJITSUKA, N.; KOMATSU, Y.: Effects of Ruthenium Ions on the sensory terminal discharges of the Frog muscle spindle. Brain Res., 1983; 276: 277-288.
16. JUNG, D.W.; BRIERLEY, G.P.: Ruthenium Red-induced loss of matrix K^+ from uncoupled heart mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982; 105 (2): 432-438.

17. KAJIKAWA, K.; NAKANISHI, I.; HORI, I.; MATSUDA, Y.; KONDO, K.: Electron microscopic observation on connective tissues using Ruthenium Red staining. J. Elec. Micros., 1970; 19 (4): 347-354.
18. KLEINEKE, J.; STRATMAN, F.W.: Calcium transport in isolated rat hepatocytes. FEBS Letters, 1974; 43 (1): 75-80.
19. KOLB, E.: Fisiología Veterinaria. Volumen 2. Acribia, Zaragoza (Esp); 1976. 674-689.
20. KRUPP, M.A.; TIERNEY, L.M.; JAWETZ, E.; ROE, R.L.; CAMARGO, C.A.: Manual de Diagnóstico Clínico y de Laboratorio. 7a. Edición. El Manual Moderno, México, D.F. (Méx); 1985. 180, 225.
21. IUTHERA, R.; OLSON, M.S.: The inhibition of calcium uptake and release by rat liver mitochondria by Ruthenium Red. FEBS Letters, 1977; 81 (1): 142-146.
22. MARTINEZ-PALOMO, A.: Surface coats of animal cells. Int. Rev. Cytol., 1970; 29:29-75.
23. MESZAROS, L.G.; IKEMOTO, N.: Ruthenium Red and Caffeine affect the Ca^{++} -ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985; 127 (3): 836-842.
24. MGORE, C.L.: Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by Ruthenium Red. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971; 42 (2): 298-305.
25. NIGGLI, V.; GAZZOTTI, P.; CARATOLI, E.: Experiments on the mechanism of the inhibitions of mitochondrial Ca^{++} transport by Ia^{3+} and Ruthenium Red. Experientia, 1978; 34 (9): 1136-1137.

26. PENNER, J.A.: Blood Coagulation Laboratory Manual. Department of postgraduate medicine and health professions education the University of Michigan Medical Center. September, 1979. 2-21; 23; 65-66; 69-71; 93-94; 116-119; 230.
27. RIGONI, F.; MATHIEN-SHIRE, Y.; DEANA, R.: Effect of Ruthenium Red on calcium efflux from rat liver mitochondria. FEBS Letters, 1980; 120 (2): 255-258.
28. RIZZA, CH.R.: Clínica Hematológica. Vol.7/Num. 1. Salvat Editores, Barcelona (Esp), 1980. 1-22.
29. ROBBINSON, S.L.: Patología Estructural y Funcional. Interamericana, México, D.F. (Méx); 1975. 31-33.
30. ROSSI, C.S.; VASINGTON, F.D.; CARAFOLI, E.: The effect of Ruthenium Red on the uptake and release of Ca^{++} by mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973; 50 (3): 846-852.
31. ROTH, Z.; DIKSTEIN, S.: Inhibition of Ruthenium Red-insensitive mitochondrial Ca^{++} release and its Pyridine Nucleotide Specificity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982; 105 (3): 991-996.
32. RUIZ, R.G.; JIMENEZ, V.T.: Técnica rápida de microprecipitación en tubo capilar para determinación de fibrinógeno. Rev. Méx. Lab. Clín.; 1965. 17: 204.
33. SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROLL, E.J.: Veterinary Hematology. 3rd. edition. Lea and Febiger, Philadelphia (EUA); 1975. 284-300.
34. SCHWERZMANN, K.; GAZZOTTI, P.; CARAFOLI, E.: Ruthenium Red as a carrier of electrons between external NADH and Cytochrome C in rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976; 69 (3): 812-815.

35. SMITH, R.L.; BYGRAVE, F.L.: Enrichment of Ruthenium Red-sensitive Ca^{++} transport in a population of heavy mitochondria isolated from flight-muscle of *Lucila cuprina*. FEBS Letters, 1978; 95 (2): 303-306.
36. SOBOTA, J.; HAMMERSSEN, F.: *Histología*. 2a. Edición. Salvat Editores, Barcelona (Esp); 1982. 132-137.
37. TAPIA, R.; MEZA-RUIZ, G.; DURAN, L.; DRUCKER-COLIN, R.R.: Convulsions or flaccid paralysis induced by Ruthenium Red depending on route of administration. Brain Res., 1976; 116: 101-109.
38. UTSUMI, K.; ODA, T.: Ruthenium-Red induced cell agglutination and surface glycoprotein and mucopolysaccharide. J. Cell Sci., 1973; 13: 901-911.
39. WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES, R.W.: *Hematología*. (TOMO II). Salvat Editores, Barcelona (Esp); 1975. 1075-1110.
40. YU, S.Y.; LAI, S.E.: Structure of aortic elastic fiber: An electron microscopic study with special reference to staining by Ruthenium Red. J. Elec. Micros.; 19 (4): 362-370.