

## COMPARACION DE DOS AGENTES REDUCTORES, A DIFERENTES TEMPERATURAS, PARA LA CONSERVACION DE CEFALINA DE CEREBRO HUMANO\*

Ana A. Porras\*\*, Freddy Castro\*\*, José Jiménez\*\*\*

Key Word Index: cephalin production and stability, addition of tioglycolate 0.05 percent cephalin oxidation.

### Resumen

*Se preparó cefalina a partir de cerebro humano de acuerdo con las recomendaciones dadas por el grupo de Manchester, Inglaterra. A fin de evitar el proceso de oxidación de la cefalina, se probaron dos diferentes medios de conservación para mantener su estabilidad: tioglicolato y atmósfera de nitrógeno; para substituir los métodos tradicionales de conservación que son la congelación a -40°C y la liofilización.*

*El análisis de los resultados mostró que la cefalina mantiene su estabilidad, adicionando tioglicolato al 0,05 por ciento a temperatura de -4° C durante 12 semanas. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1983; 4(Sup. 1): 17—26].*

### Introducción

El Tiempo de Tromboplastina Parcial (T.T.P.), fue originalmente descrito por Langdell y Col. (7), como una prueba para detectar deficiencias del factor VIII. Posteriormente se encontró que también es sensible a las deficiencias de factores II, V, IX, X, XI, XII, ya sean hereditarias o adquiridas por terapia anticoagulante u otros estados clínicos patológicos (6).

La prueba de T.T.P. consiste en una recalcificación del plasma en presencia de un reactivo lipídico (cefalina) en substitución del factor plaquetario 2 (1, 12). La activación de los factores de contacto se realiza mediante la incubación previa con una suspensión de activadores (Kaolín, Celite), durante un tiempo determinado antes de la recalcificación (2).

Este reactivo lipídico llamado cefalina, está compuesto por diferentes clases de fosfolípidos procedentes de materiales tan diversos como pueden ser el tejido cerebral, eritrocitos, plaquetas, habichuelas, huevos, levaduras y hongos (3, 16). Se ha comprobado que la cefalina de tejido encefálico es más activa que el fosfolípido plaquetario purificado(16).

Los estudios realizados de la cefalina humana son numerosos. Se ha probado su sensibilidad, especificidad (9), su empleo en el control de la terapéutica anticoagulante con heparina (15), deficiencias de factores y otros (6). De su estructura bioquímica se sabía que era un fosfolípido, pero no fue sino hasta 1980 que Poller relacionó la composición de los fosfolípidos presentes y la actividad de la cefalina en la determinación de T.T.P.

---

\* Presentado en el IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica. Noviembre—Diciembre 1982.

\*\* Laboratorio Clínico Dr. Clodomiro Picado, H.S.J.D., CCSS.

\*\*\* Banco Nacional de Sangre, CCSS.

Para ello, empleó la técnica de cromatografía de alta presión y encontró que los componentes grasos más abundantes de los diferentes extractos de cerebro son fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, cardiolipina, ácidos grasos, triglicéridos, esfingomielina y otros (10).

Se sabe que estos fosfolípidos suelen interferir entre sí y también con diversos tipos de sustancias presentes en la sangre como sales inorgánicas, mucopolisacáridos, proteínas y otros (16).

De acuerdo a Tocantins y Kazal (16), mientras mayor sea el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de una preparación de cefalina, más actividad muestra esta. Además, estos ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles a la oxidación por contacto con el oxígeno del aire. Poller (10), considera que esta puede ser la razón del deterioro de la actividad procoagulante en la determinación de T.T.P. Dos de sus principales componentes, fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina, tiene ácidos grasos poliinsaturados por lo que son susceptibles a la acción del oxígeno ambiental (4).

La determinación del T.T.P. es una prueba sensible. Se han reportado en la literatura resultados discrepantes cuando se usan diferentes cefalinas comerciales, ante una misma muestra patrón (6). Esto se debe a que la cefalina ha sido extraída de tejidos de diferentes especies de animales y además usan diferentes activadores de los factores de contacto (13, 14).

Creemos que con el uso de un solo tipo de reactivo para todo el país, de buena sensibilidad y debidamente estandarizado, se puede obviar este problema. Para su preparación seguimos las recomendaciones de Poller utilizando cefalina de cerebro humano, que por ser más específica ha mostrado tener mayor sensibilidad (8, 9). Otro inconveniente que presentan los reactivos comerciales es el de tipo económico, que por provenir de mercados foráneos son de alto costo y constituye una fuga de divisas significativa. Esta puede ser evitada usando reactivos producidos en Costa Rica.

La dificultad de distribuir este reactivo por todo el país, es que no permite mantener a la cefalina a temperaturas superiores de  $-20^{\circ}\text{C}$  (16), excepto liofilizada. Esto imposibilita su transporte y permanencia en la mayoría de los laboratorios, ya que un cuentan con congeladores que den esa temperatura. La liofilización es un procedimiento que no está a nuestro alcance con facilidad. Nos propusimos por lo tanto buscar otros métodos de preservación que no permitan la oxidación y así poder transportarla y mantenerla un tiempo razonable en todos los laboratorios de Costa Rica.

## **Materiales y Métodos**

Se extrae la cefalina de cerebro humano en polvo con éter de petróleo químicamente puro, según recomendaciones de Poller (11).

La cefalina extraída se suspende en 10 ml de amortiguador de Owren pH 7,35 como solución madre.

La dilución primaria se prepara también con amortiguador de Owren.

Se ensayaron cuatro métodos de preservación para la cefalina:

- a) Liofilización (16).
- b) Preservación a diferentes temperaturas:  $-35^{\circ}\text{C}$  (16),  $-4^{\circ}\text{C}$  y temperatura ambiente

c) Atmósfera de gas nitrógeno (16).

Mantuvimos las muestras en atmósfera de gas nitrógeno a temperatura de  $-35^{\circ}\text{C}$ ,  $-4^{\circ}\text{C}$  y a temperatura ambiente.

d) Tioglicolato de sodio.

Agregamos tioglicolato de sodio (5) en una concentración de 0,05 por ciento y se mantuvieron muestras a  $-35^{\circ}\text{C}$ ,  $-4^{\circ}\text{C}$  y a temperatura ambiente.

Para cada método de conservación se hizo el tiempo de tromboplastina parcial (11), usando como muestra una mezcla de plasmas normales, cuyo valor de referencia fue de 38 a 50 segundos y que se mantuvo congelada a  $-35^{\circ}\text{C}$ .

Este rango se estableció con 314 muestras de personas sanas, empleando el promedio más dos desviaciones estándares. Se usó como cefalina de referencia la del Laboratorio de Investigación del Hospital México.

El tiempo de la experiencia fue de doce semanas, haciendo para cada variable una determinación (por duplicado), cada semana.

## Resultados y Conclusiones

En la Fig. 1 se observa que la liofilización mantiene a la cefalina en buenas condiciones a  $-4^{\circ}\text{C}$ , pues su actividad se mantuvo dentro de los valores de referencia durante todo el tiempo de experimentación.

En la Fig. 2 la cefalina también conserva su actividad procoagulante a una temperatura de  $-35^{\circ}\text{C}$ , de conformidad con los reportes de la literatura (16). Obsérvese además, que a esta temperatura la presencia de gas nitrógeno y de tioglicolato, no intervinieron en la actividad de la cefalina.

La Fig. 3 muestra cómo la cefalina mantenida con tioglicolato conservó su actividad hasta el final del estudio (doce semanas) a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

La Fig. 4 muestra cómo la atmósfera de nitrógeno mantiene estabilidad hasta la 8a semana pero luego pierde su función, pues se sale del rango normal establecido.

A temperatura ambiente, la actividad procoagulante de la cefalina se perdió rápidamente (Fig. 4), tanto en forma pura como con los agentes antioxidantes utilizados.

De estos resultados obtenidos observamos que no es posible mantener la cefalina en forma líquida un tiempo suficiente que permita su distribución y permanencia en los laboratorios del país. Esto sí se logra liofilizándola o agregándole un agente antioxidante como el tioglicolato de sodio a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

El uso de gas nitrógeno y de tioglicolato de sodio no evitaron la oxidación de la cefalina a temperatura ambiente, por lo que es necesario congelarla a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

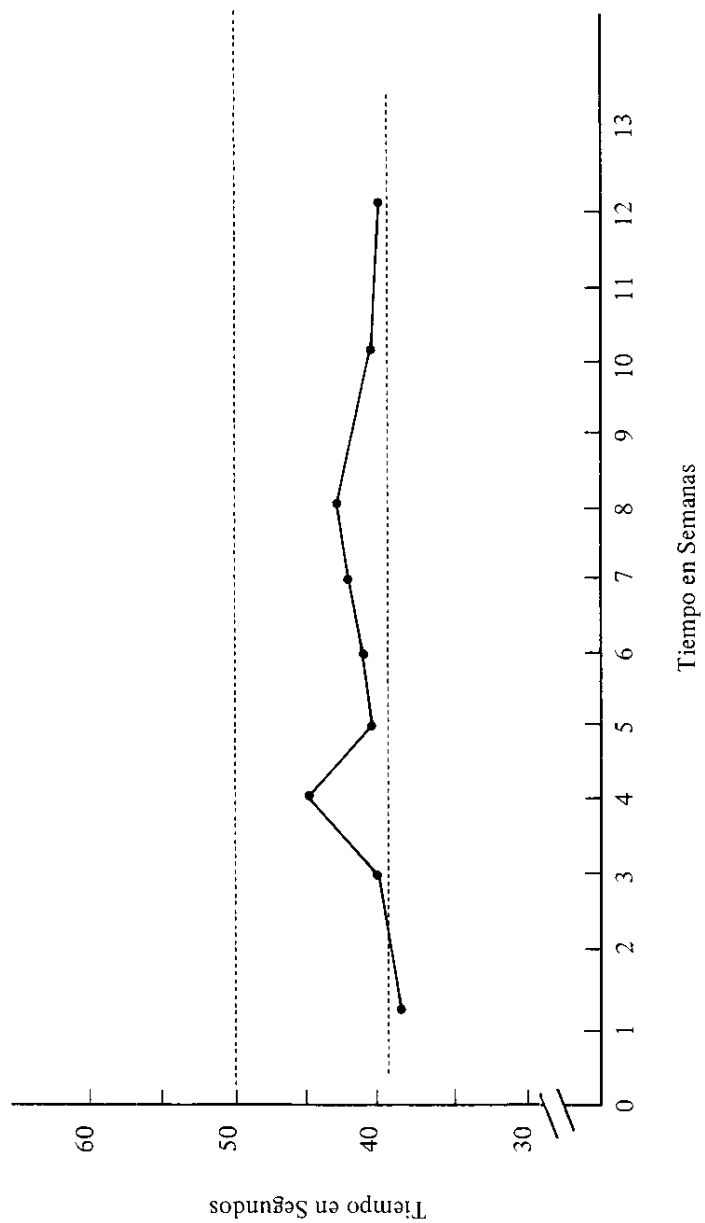
El uso de la liofilización del tioglicolato de sodio evita el uso de congeladores costosos que den temperaturas menores de  $-35^{\circ}\text{C}$ , que no están al alcance de todos los laboratorios del país.

## ABSTRACT

*We prepared cephalin from human brain tissue, according to the Manchester Group recommendations. However, since the traditional methods for conservation of this substance: liophyllization and freezing at  $-40^{\circ}\text{C}$  are not easily available in the clinical laboratories in this country, an alternative to prevent oxidation of the cephalin was sought.*

We present the results of the investigation, in wich the addition of tioglycolate 0.05 percent, at  $-4^{\circ}$  C is adecuate for cephalin stability, up to at least 12 weeks.

FIGURA I  
ACTIVIDAD DE LA CEFALINA LIOFILIZADA DURANTE 12 SEMANAS



**FIGURA 2**  
**ACTIVIDAD DE LA CEFALINA MANTENIDA A  $-35^{\circ}\text{C}$  BAJO UNA ATMOSFERA DE NITROGENO O ADICIONADA DE TIOLICOLATO, DURANTE 12 SEMANAS**

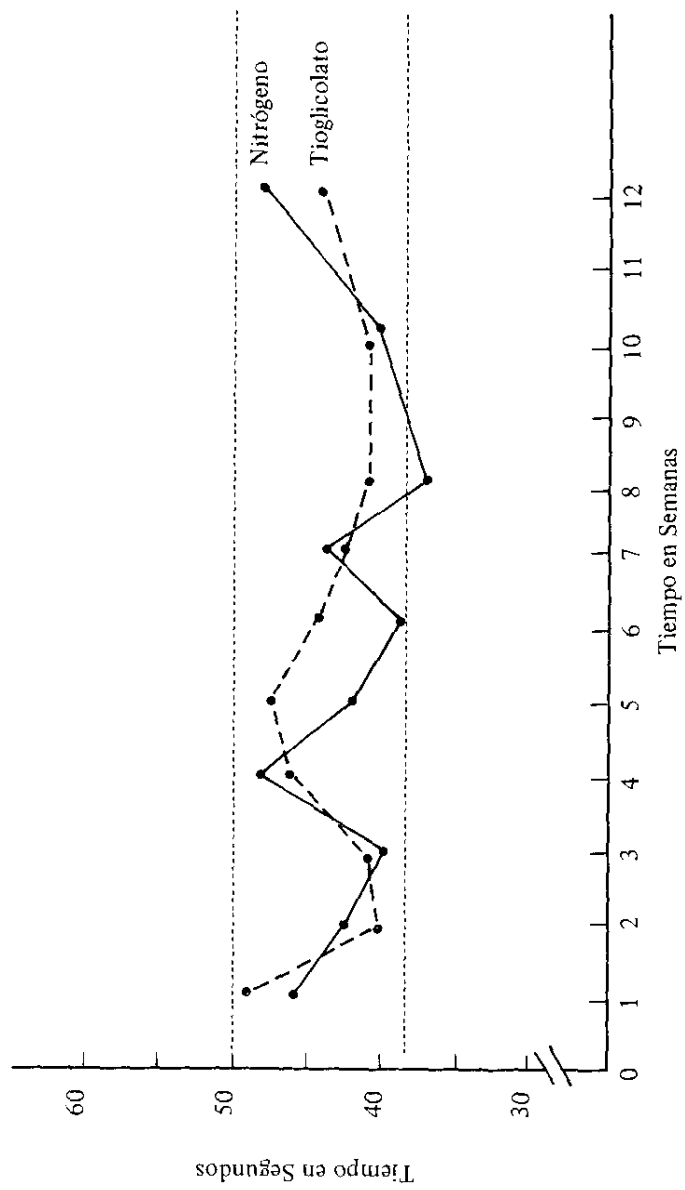


FIGURA 3  
ACTIVIDAD DE LA CEFALINA A  $-4^{\circ}\text{C}$   
CON TIOLICOLATO, DURANTE 12 SEMANAS

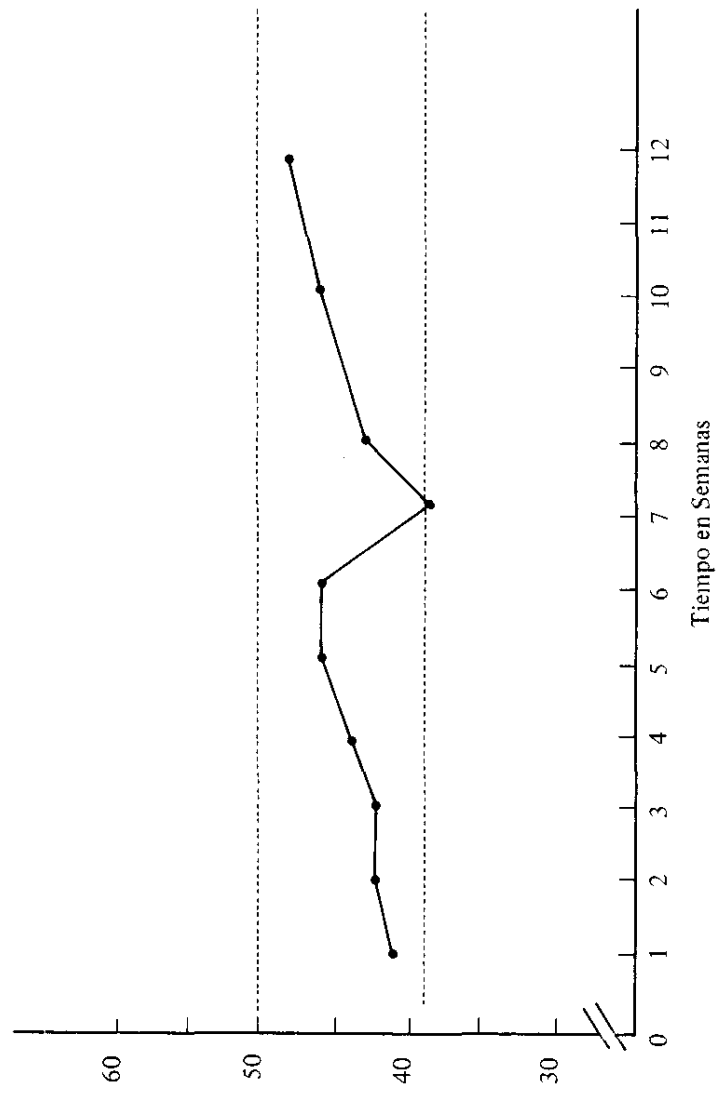


FIGURA 4  
ACTIVIDAD DE LA CEFALINA MANTENIDA A  $-4^{\circ}\text{C}$  BAJO UNA  
ATMOSFERA DE NITROGENO, DURANTE 12 SEMANAS

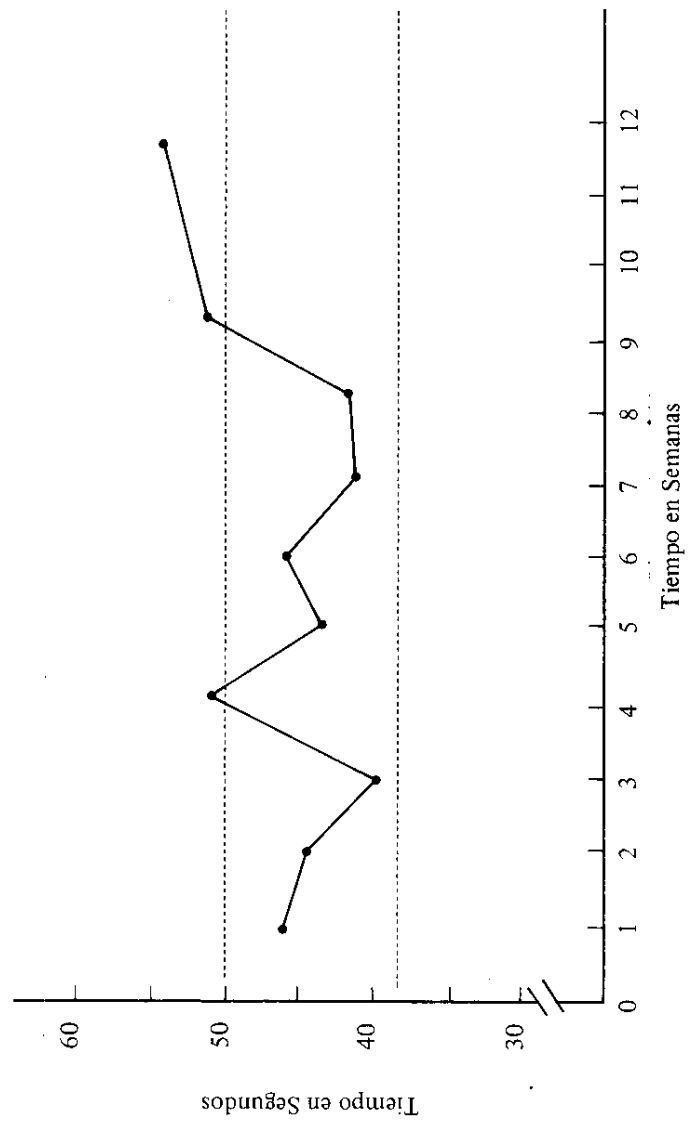
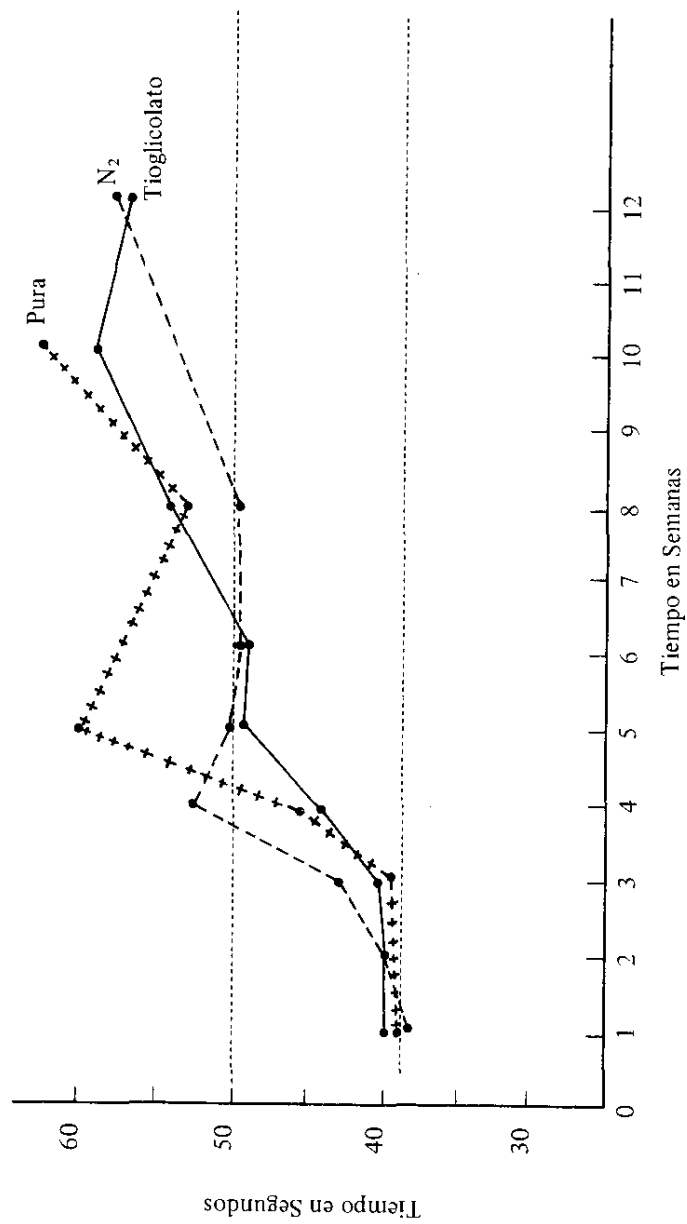


FIGURA 5  
 ACTIVIDAD DE LA CEFALINA MANTENIDA A TEMPERATURA AMBIENTE  
 EN FORMA PURA, BAJO UNA ATMOSFERA DE NITROGENO O CON TIOLICOLATO



## Bibliografía

1. Barrantes, A. *Hemostasis y Trombosis*. Centro de Docencia e Investigación. CCSS. 1980:27—29.
2. Biggs, Rosemary. *Coagulación sanguínea, hemostasis y trombosis*. Ed. Jims, Barcelona, 1975: 526—527.
3. Deuel, H. *Lipids*. Interscience Publishers, Inc. New York, 1957:55—65.
4. Florkin, M., Stotz, E. *Comprehensive Biochemistry*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1965:97—101.
5. Frankel, S., Reitman, S., Sonnenwirth, A. Bacteriology. IN: *Clinical Laboratory Methods and diagnosis*. A. Gradwohl, Ed. Mosby Co., St. Louis, Mo. 7a. edición, 1970;ll:1046.
6. Hoffman, L., Meulendijk, P. Comparison of Reagents for Determining the Activated Partial Thromboplastin Time. *Thrombos. Haemostas* 1978; 39:640—641.
7. Langdell, R. D., Wagner, R. H., Brinkhous, M. J. Effect of antihemophilic factor on one stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *Lab. Clin. Méd.* 1953;41 :637—647.
8. Poller, L., Thomson, Jean. The Partial Thromboplastin (Cephalin) Time Test. *J. Clin Path.* 1972; 25:1038—1044.
9. Poller, L., Thomson, Jean. Measuring Partial Thromboplastin Time. An International Collaborative Study. *Lancet* 1976; 2:842—846.
10. Poller, L., Slates, P., Stevenson. K. Procoagulant Activity of Parcial Thromboplastin (Cephalin) Reagent and its Phospholipid Composition. *Thrombosis Research* 1980:18:831—838.
11. Poller, L. Comunicación personal.
12. Prector, R., Rapaport, M. The Partial Thromboplastin Time with Kaolin. *Am. J. Clin. Path.* 1961; 36:212—219.
13. Shapiro, G., Huntzinger, S., Wilson, J. Variation among Commercial Activated Partial Thromboplastin Time Reagents in Response to Heparin. *Am. J. Clin Path.* 1977; 67:477—480.
14. Sibley, Carol, Singer, J., Wood, Ross. Comparison of Activated Partial Thromboplastin Reagent. *Am. J. Clin Path.* 1973; 59:581—586.
15. Soloway, B., Cox, Susan, P., Donahoo, Joyce, V. Sensitivity of the Activated Partial Thromboplastin Time to Heparin: Effect of anticoagulant used for sample Collection. *Am. J. Clin. Path.* 1973; 50:760—762.
16. Tocantins, L., Kazal, L. *Coagulación de la sangre, hemorragia y trombosis*. Ed. Científico Médica, España, 1969:159—450.