

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad de Navarra

## Propiedades fibrinolíticas del "factor contacto"

por

J. Aznar

(Recibido para publicar el 28 de febrero de 1964)

En 1954, RATNOFF (9) describe un trastorno de la coagulación que se debe a la falta de un factor plasmático denominado factor Hageman. Este factor juega un papel importante en la génesis del activador intrínseco de la protrombina. En 1959, SOULIER y PROU-WARTELLE (11), y NIEWIAROWSKI y PROU-WARTELLE (7) prueban que el factor Hageman tiene propiedades fibrinolíticas, tras la activación con celite o kaolín. Posteriormente, FERGUSON y col. (3) asignan carácter fibrinolítico a una fracción plasmática que muestra propiedades semejantes a las del factor Hageman. IATRIDIS y col. (6) e IATRIDIS y FERGUSON (4) realizan un estudio más detenido de este hecho y consideran al factor Hageman como activador endógeno de la fibrinólisis; aunque últimamente el mismo IATRIDIS (5) lo identifica como activador del proactivador plasmático. BECKER (2) prueba que el factor Hageman es una esterasa y RATNOFF y col. (10) confirman estos resultados. Finalmente, NIEWIAROWSKI y col. (8) demuestran que es una arginín-esterasa.

También AZNAR y col. estudian el carácter fibrinolítico del factor Hageman, por medio de la tromboelastografía, habiendo sido ya descritas (1) las experiencias preliminares.

En este trabajo se confirman las propiedades fibrinolíticas del factor Hageman. Asimismo se valora dicha actividad fibrinolítica por separado en los factores Hageman y PTA, que, como se sabe, son los únicos constituyentes del «factor contacto», y que hasta ahora siempre se habían estudiado conjuntamente.

### Material y métodos

Se han utilizado: 1) Tromboelastógrafo «Hellige». 2) Oxalato sódico 0,1 M. 3) Cloruro cálcico 0,025 M. 4) Celite (Dicalite Speedex Great Lakes Carbon Corporation). 5) Silicona (Siliclad Clay-Adams). 6) Estreptoquinasa (Varidasa Lederle). 7) «Plasma nativo», obtenido con material siliconado y recogido sobre oxalato sódico 0,1 M (1 parte de oxalato y 9 partes de sangre). Después de agitar suavemente se transfiere a un tubo sili-

conado. Tras dos horas de reposo a temperatura ambiente se obtiene la muestra de plasma. 8) «Plasma contacto». (7). 9) «Plasma exhausto». (12). 10) «Factor contacto». 10 ml. de «plasma nativo» fueron recogidos sobre material silicificado. Se añaden 300 mgr. de celite, agitando durante 10 minutos. Después se centrifuga la mezcla durante 15 minutos a 3.000 r.p.m. El precipitado se lava con agua destilada y con solución salina, y, finalmente, se practica un último lavado con solución salina de pH 10,5. El sobrenadante se separa por centrifugación durante 15 minutos a 3.000 r.p.m. Este sobrenadante constituye el eluido de «factor contacto». Seguidamente se tampona a un pH de 7,4 y se congela a  $-25^{\circ}$  C, conservándose en estas condiciones durante varios meses. El precipitado de celite que queda después de esta última centrifugación, se eluye de nuevo con tampón veronal de pH 10,5, a fin de comprobar si en el mismo han quedado trazas de factor Hageman (a este reactivo lo denominamos «reactivo A»). 11) Eluido que contiene únicamente factor XI (PTA). 5 ml. de plasma de un enfermo Hageman, se mezclan con 150 miligramos de celite, agitando bien durante 10 minutos. Después se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos. El precipitado se lava dos veces, una con agua destilada y otra con solución salina, y finalmente se practica un último lavado con solución salina de pH 10,5, centrifugando después durante 15 minutos a 3.000 r.p.m. El sobrenadante constituye el eluido de PTA. 12) Plasma carente de factor Hageman. Nos fue amablemente proporcionado por el Prof. Soulier, del Centro Nacional de Transfusión Sanguínea de París. 13) «Plasma nativo» activado con estreptoquinasa. Se realiza una dilución de estreptoquinasa de 1.000 unidades por ml. y a partir de la misma se practican el resto de las diluciones. Para activar el plasma se incubaba con la cantidad de estreptoquinasa requerida

durante 10 minutos en baño maría a  $37^{\circ}$  C. 14). Plasma de un paciente afecto de hemofilia A. 15) Plasma de un paciente afecto de hemofilia B. 16) Plasmas carentes de los factores II-V-VII. Nos fueron amablemente proporcionados por la casa Behringwerke. 17) Plasma carente de factor X. Plasma normal absorbido con sulfato de bario se mezcla a partes iguales con veneno de serpiente Russell «Stypen» (Wellcome Research Laboratories) y se diluye al 1/200.000 con cefalina al 0,5 %.

La valoración de los reactivos se efectúa según la técnica descrita con anterioridad (1).

### Métodos

#### 1. Test de fibrinolisis.

En una serie de tubos de hemolisis de 8 mm. de diámetro, se introducen 0,2 ml. de cloruro cálcico 0,025 M y 0,2 ml. de plasma reciente, con lo que se obtienen coágulos similares. Sobre estos coágulos se hacen actuar los diversos reactivos a valorar, anotando el tiempo requerido para su lisis. En otras experiencias se midió la intensidad de la lisis a intervalos fijos.

#### 2. Estudio de la fibrinolisis por medio de la tromboelastografía.

Las cantidades requeridas de los reactivos a valorar se mezclan en un tubo de hemolisis y se incuban durante 10 minutos a  $37^{\circ}$  C. A continuación se realiza el correspondiente tromboelastograma.

El área circunscrita por las ramas del trazado, la denominamos «área tromboelastográfica». Se mide en  $\text{mm}^2$ . El tamaño de esta área (fig. 1) depende tanto de la amplitud máxima como del tiempo de lisis. El producto de estos dos parámetros refleja la consistencia del coágulo y, por tanto, es inversamente proporcional a la intensidad de la lisis. A menor área tromboelastográfica mayor intensidad de lisis. En los trazados de la figura 2 se muestran 3 plasmas con dis-

tinta actividad fibrinolítica, siendo el de mayor intensidad el correspondiente al trazado superior.

Los resultados de estas experiencias se expresan en mm<sup>2</sup> correspondientes al tamaño de las áreas tromboelastrográficas obtenidas.

**Resultados**

1. *Estudio de las propiedades fibrinolíticas del «factor contacto».*

La tabla I muestra las propiedades fibrinolíticas del eluido de «factor contacto» incubado con estreptoquinasa. Esta actividad lítica ha sido comparada con la del mismo factor no incubado con estreptoquinasa y con la de solución salina, con y sin incubar con estreptoquinasa. Todas las muestras se hicieron actuar sobre coágulos iguales preparados con anterioridad, valorándose la total destrucción de los mismos. Se pudo comprobar cómo los tiempos de lisis obtenidos en la prueba realizada con «factor contacto» incubado con estreptoquinasa, fueron más cortos, que los conseguidos con eluido de «factor contacto» solo o con estreptoquinasa y solución salina.

También se estudió la intensidad de la lisis desarrollada sobre coágulos iguales y valorada en intervalos fijos de tiempo.

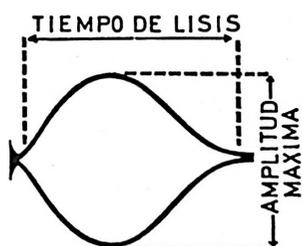


FIG. 1.

FIG. 1. El área circunscrita por las dos ramas del trazado la denominamos «área tromboelastrográfica». El tamaño de la misma es inversamente proporcional a la intensidad de la lisis.

FIG. 2. Plasma con distinta actividad fibrinolítica. La mayor intensidad corresponde al trazado superior.

TABLA I

*Actividad fibrinolítica del «factor contacto» con y sin activación con estreptoquinasa. Se consideró como tiempo de lisis el transcurrido desde el inicio de la prueba hasta que la lisis del coágulo fue completa. Las muestras problema se hicieron actuar sobre cuatro coágulos iguales preparados con anterioridad.*

Problema *	Estreptoquinasa en U. U.	Tiempo de lisis
S	100	12 horas
S	—	más de 24 horas
E.F.C.	100	5 horas
E.F.C.	—	más de 24 horas

\* Volumen añadido en cada caso 0,5 ml. S = Solución salina. E.F.C. = Eluido de factor contacto.

Los resultados se muestran en la tabla II, en la que se puede observar cómo después de 10 minutos, la lisis ha comenzado únicamente en el tubo que contiene el «factor contacto» incubado con estreptoquinasa. Idéntico resultado se observó a los 30 minutos. Después de 4 horas, la lisis también había comenzado en el tubo que solamente contiene es-

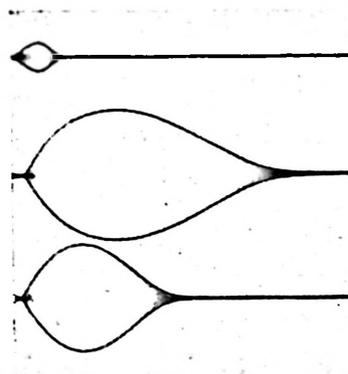


FIG. 2.

TABLA II

Actividad fibrinolítica del eluido de «factor contacto» con y sin incubar con estreptoquinasa. Se midió la intensidad de la lisis (L) en intervalos fijos de tiempo. Las muestras se hicieron actuar sobre diversos coágulos iguales preparados con anterioridad.

Problema *	Estreptoquinasa en U. U.	Tiempo mm	L
S.	—	10	—
S.	100	10	—
F. C.	—	10	—
F. C.	100	10	+
S.	—	30	—
S.	100	30	—
F. C.	—	30	—
F. C.	100	30	++
S.	—	240	—
S.	100	240	+
F. C.	—	240	—
F. C.	100	240	+++
S.	—	420	—
S.	100	420	+
F. C.	—	420	—
F. C.	100	420	++++

\* Volumen añadido en cada caso 0,5 ml.  
S = Solución salina. F.C. = Factor contacto.  
L = intensidad de la lisis : ++++ = Total.  
— = Nula.

treptoquinasa, y a las 6 horas hubo lisis parcial en el tubo con estreptoquinasa, y total en el del eluido de «factor contacto» incubado con estreptoquinasa.

2. Estudio de las propiedades fibrinolíticas por medio de la tromboelastografía.

Se examinaron muestras de plasmas «nativo» y «contacto» activados con cantidades diversas de estreptoquinasa (tabla III). En cada caso las experiencias se realizaron con cinco plasmas diferentes. En todos ellos el «plasma contacto» muestra una mayor actividad fibrinolítica, lo que se traduce por ser menores las áreas tromboelastográficas obtenidas con el mismo que las conseguidas con el «plasma nativo» (fig. 3).

Considerando que la actividad fibrinolítica desencadenada por la celite podía ser debida a la activación de cualquier otro factor hemocoagulativo diferente del factor Hageman, se realizaron experiencias similares con el eluido que contiene únicamente «factor contacto». Se usó como prueba testigo la realizada con solución salina y con el eluido de celite que se obtiene después de haber separado de la misma el «factor contacto» (a este reactivo lo hemos denominado «reactivo A»). Los resultados se muestran en la tabla IV, en la que se puede comprobar cómo el eluido de «factor contacto» tiene mayor

TABLA III

Actividad fibrinolítica de plasma «contacto» y «nativo» activados con estreptoquinasa.

Problema *	Estreptoquinasa en U. U.	Áreas tromboelastográficas en mm <sup>2</sup>					Áreas medias en mm <sup>2</sup>
		3	4	5	6	4	
«Plasma contacto»	100	3	4	5	6	4	4.5
«Plasma nativo»	100	13	20	18	22	16	17.8
«Plasma contacto»	50	10	16	14	49	52	13.5
«Plasma nativo»	50	40	60	47	49	52	49.6
«Plasma contacto»	30	58	84	82	62	56	68.4
«Plasma nativo»	30			más de 1000			más de 1000

\* Volumen añadido en cada caso 0,5 ml.

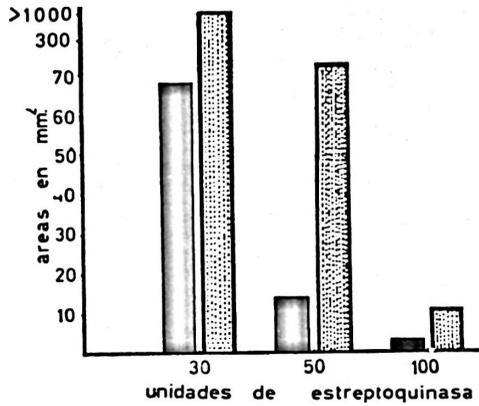


FIG. 3. Estudio de la actividad fibrinolítica de plasma «nativo» y «contacto», incubados con cantidades diversas de estreptoquinasa.

En ordenadas áreas tromboelastográficas en mm<sup>2</sup>.

En abscisas unidades de estreptoquinasa añadidas en cada experiencia.

Las medias de las áreas tromboelastográficas son menores en las experiencias realizadas con el «plasma contacto» (negro) que con el «plasma nativo» (punteado).

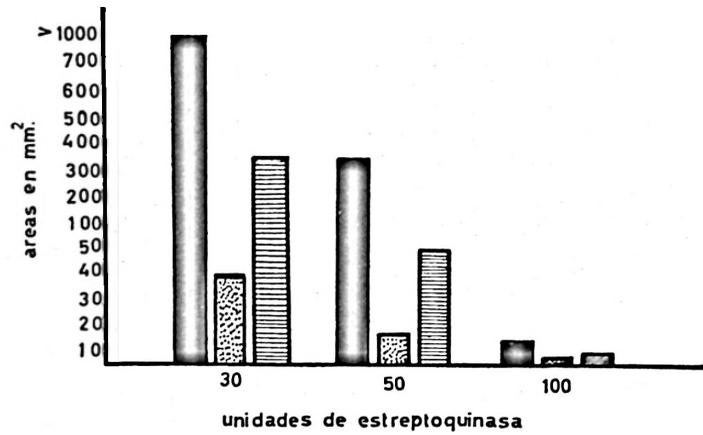


FIG. 4. Estudio de la actividad fibrinolítica del eluido de «factor contacto». Se compara con solución salina y «reactivo A» incubados todos con cantidades diversas de estreptoquinasa.

En ordenadas áreas tromboelastográficas en mm<sup>2</sup> y en abscisas las unidades de estreptoquinasa añadidas en cada experiencia.

Se observa como las medias de las áreas tromboelastográficas en las cinco pruebas realizadas, son menores con el eluido de «factor contacto» (punteado), que con el «reactivo A» (rayado) o con solución salina (negro).

TABLA IV

Actividad fibrinolítica del eluido de «factor contacto» incubado con cantidades diversas de estreptoquinasa. Se compara con solución y con reactivo «A».

«Plasma nativo» en ml.	Estreptoquinasa en U. U.	Problema *	Áreas tromboelastográficas en mm <sup>2</sup>					Áreas medias en mm <sup>2</sup>
0.5	100	Solución salina	12	16	18	10	8	12.8
0.5	100	«factor contacto»	2	3	2	4	2	2.6
0.5	100	Reactivo «A»	3.5	4.5	5	2	3	3.6
0.5	50	Solución salina	270	310	415	290	280	313
0.5	50	«factor contacto»	13	15	27	19	11	17
0.5	50	Reactivo «A»	42	48	74	36	41	48.2
0.5	30	Solución salina	más de 1000					más de 1000
0.5	30	«factor contacto»	28	40	52	28	28	35.8
0.5	30	Reactivo «A»	290	340	410	230	320	318

\* Volumen añadido en cada caso 0,5 ml.

actividad lítica que los otros dos reactivos. La media de las cinco pruebas realizadas nos muestra claramente estas diferencias (fig. 4).

En las anteriores pruebas queda perfectamente comprobada la actividad fibrinolítica del eluido de «factor contacto», y, por consiguiente, debemos atribuirle a uno de los dos factores hemo-

coagulativos contenidos en el mismo: PTA o factor Hageman. Para demostrar a cuál de ellos se debe esta propiedad, fueron obtenidos por separado y su actividad fibrinolítica estudiada aisladamente, tras la adición de cantidades diferentes de estreptoquinasa.

En una experiencia preliminar (figs. 5, 6 y 7) se comprobó que las áreas trombo-

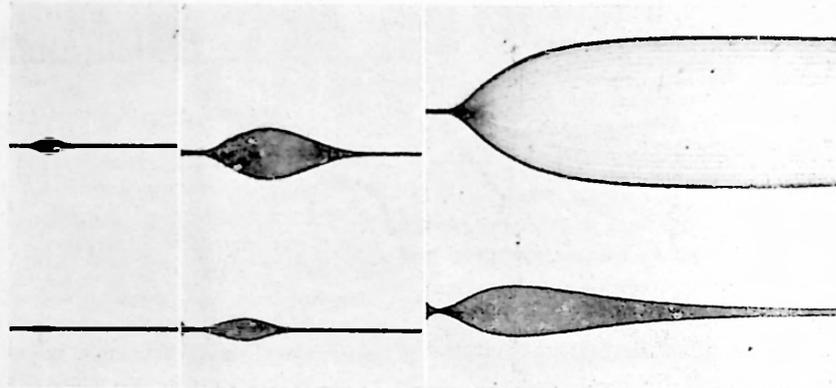


FIG. 5.

FIG. 6.

FIG. 7.

FIG. 5. Areas tromboelastográficas obtenidas haciendo actuar sobre cantidades iguales de «plasma nativo» cantidades, asimismo iguales, de eluido de «factor contacto» y PTA, incubados con 30 U. U. de estreptoquinasa.

Trazado superior obtenido con el eluido de PTA.

Trazado inferior obtenido con el eluido de «factor contacto».

Se comprueba como es menor el área tromboelastográfica correspondiente al eluido de «factor contacto», lo que indica en el mismo una mayor actividad fibrinolítica que en el PTA.

FIG. 6. Igual que la figura 5, pero incubando con 50 U. U. de estreptoquinasa.

FIG. 7. Igual que la figura 5, pero incubando con 100 U. U. de estreptoquinasa.

TABLA V

Actividad fibrinolítica de los eluidos de «factor contacto» y PTA, incubados con cantidades diversas de estreptoquinasa.

«Plasma nativo» en ml.	Estreptoquinasa en U. U.	«Factor contacto» en ml.	PTA en ml.	Áreas tromboelastográficas en mm <sup>2</sup>					Áreas medias en mm <sup>2</sup>
0.5	100	0.2	—	2	4	4	2	4	3.2
0.5	100	—	0.2	12	18	20	10	16	15.2
0.5	50	0.2	—	29	44	48	46	37	40.6
0.5	50	—	0.2	230	420	540	370	300	372
0.5	30	0.2	—	290	400	590	420	430	426
0.5	30	—	0.2	más de 1000					más de 1000

elastográficas eran menores en las pruebas realizadas con el «factor contacto» que en las obtenidas con el PTA, tras incubarse a ambos con las mismas cantidades de estreptoquinasa.

Se repiten las experiencias con cinco muestras diferentes (Tabla V) obteniéndose similares resultados, ya que la media de las áreas tromboelastográficas (figura 8) fue siempre menor para el «factor contacto», lo que indica que éste posee una mayor actividad fibrinolítica; por lo que dicha propiedad en el «factor contacto» creemos se debe únicamente al factor Hageman.

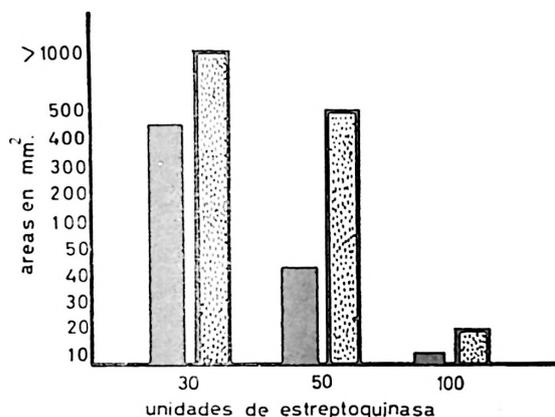


FIG. 8. Estudio comparativo de la actividad fibrinolítica de los fluidos de «factor contacto» y PTA.

En ordenadas áreas tromboelastográficas en mm<sup>2</sup>. En abscisas unidades de estreptoquinasa añadidas en cada experiencia.

Se observa como las medias de las áreas tromboelastográficas en las cinco pruebas realizadas son menores, cuando se usó el fluido de «plasma contacto» (negro), que cuando se experimentó con el fluido de PTA (punteado).

### Discusión

Las experiencias encaminadas al estudio de la actividad fibrinolítica del «factor contacto» son escasas, por lo que nos ha parecido oportuno, realizar un trabajo, que aportando nuevos datos sobre la actividad lítica del referido fac-

tor, la relacionase con alguno de sus componentes, los factores Hageman y PTA, dado que hasta ahora no se ha especificado a cuál de los dos pertenece la actividad fibrinolítica mostrada por el «factor contacto».

Como técnica de trabajo se ha usado la tromboelastografía, pues aunque nos parece que la misma no es la más adecuada para el estudio de las diátesis hemorrágicas de origen fibrinolítico, cambio, es útil para el estudio de procesos experimentales en los que la actividad lítica puede ser activada.

En las experiencias preliminares se ha demostrado por un sencillo procedimiento, que el «factor contacto» tiene una marcada actividad fibrinolítica, cuando es incubado con estreptoquinasa.

Asimismo ha podido ser demostrada esta actividad lítica del «factor contacto» por medio de la tromboelastografía, comprobándose cómo una muestra de «plasma contacto» activada con estreptoquinasa es capaz de lisar un coágulo con mayor rapidez que otra de «plasma nativo» en las mismas condiciones. Esta mayor rapidez en la lisis se refleja por una menor área tromboelastográfica, justo exponente de su mayor actividad fibrinolítica.

Igualmente ha sido comprobado que el fluido de «factor contacto» posee una marcada actividad fibrinolítica tras su incubación con estreptoquinasa, lo que excluye que dicha actividad pueda ser debida a cualquier otro factor hemocoagulativo, ya que ha sido comprobado cómo el fluido de «factor contacto» únicamente está compuesto por los factores Hageman y PTA. (1)

Sólo sería posible pensar que el fluido problema contuviera plasminógeno, siendo éste responsable de la actividad lítica desarrollada por el mismo. Esto puede ser desechado en vista de que el fluido obtenido del plasma de un enfermo Hageman no muestra actividad fibrinolítica manifiesta, como debería ocurrir en caso

de que dicho eluido contuviese plasminógeno, plasmina o proactivador.

Tanto el «plasma contacto» como el eluido de «factor contacto» aumentan su actividad tras incubación con estreptoquinasa. Esto confirma nuestra opinión de que este factor tiene un papel, o bien semejante al del proactivador plasmático, ya que es sabido cómo este último necesita de activación para convertirse en el activador, capaz de transformar el plasminógeno en plasmina, o bien parecido al del activador del proactivador y, por tanto, similar al de la estreptoquinasa, en cuyo caso el mayor efecto fibrinolítico conseguido tras la incubación de ambos factores juntos, FH y estreptoquinasa, no se debería a una activación del primero por la segunda, si no más bien a una sumación de efectos.

Para ejercer el papel de activador del proactivador, el factor Hageman debe sufrir previamente la «activación de contacto».

En las experiencias de IATRIDIS y NIEWIAROSWKI los estudios sobre la actividad fibrinolítica del factor Hageman se realizan con «plasma contacto» o con eluido de «factor contacto». En consecuencia es difícil afirmar, como así lo hace notar NIEWIAROSWKI (8) a cuál de los factores hemocoagulativos que componen dicho eluido se debe la actividad fibrinolítica del mismo.

A fin de aportar alguna luz sobre este punto se ha intentado el estudio por separado de la actividad fibrinolítica del factor XI (PTA) y del «factor contacto», que, como anteriormente hemos enunciado, está compuesto por los factores XI y XII (Hageman).

En orden a la obtención por separado de los mismos, el plasma de un enfermo Hageman fue tratado con celite. Como en dicho plasma no existe factor Hageman, únicamente se aislará, tras la elución de la celite con solución salina de pH 10,5, el factor XI (PTA). Practicadas experiencias con el reactivo así obtenido

y con el eluido de «factor contacto», ha sido comprobado cómo las propiedades fibrinolíticas son manifiestas en el eluido de «factor contacto», siendo en cambio mínimas para el eluido de factor XI (PTA).

Esto viene a confirmar la teoría de que la actividad fibrinolítica desarrollada por el «factor contacto» se debe a la presencia en el mismo del factor Hageman, y que por lo tanto este factor puede ser considerado fibrinolíticamente activo.

### Resumen

Se han estudiado las propiedades fibrinolíticas del «factor contacto» por medio de la tromboelastografía. Estas han sido confirmadas e identificadas como similares a las del proactivador plasmático, o bien a los del activador de dicho proactivador. La actividad lítica fue estudiada por separado en los factores Hageman y PTA, encontrando que este último es fibrinolíticamente inactivo, por lo que la actividad fibrinolítica del «factor contacto» ha sido atribuida al factor Hageman.

### Summary

#### The fibrinolytic properties of the contact factor

The fibrinolytic properties of the «contact factor» have been studied. The thromboelastographic area determined with the thromboelastography has been used as a measure of the fibrinolytic activity.

The fibrinolytic properties of «contact factor» have been confirmed. It was also shown that a previous activation with streptokinase is useful in order to bring about such fibrinolytic activity. The lysis time (table I) was decreased and the activity of lysis (table II) increased when streptokinase-activated «contact factor» eluate was tested on clots of the same size. Similar results were obtained with the thromboelastography (tables III and IV).

The lytic activity of both haemocoagulative factors — Hageman factor and PTA — which form the «contact factor», was also separately studied (table V). The lytic activity of PTA was found to be so low that it can be considered as inactive. This seems to indicate that the lytic activity of «contact factor» is mainly due to Hageman factor.

The activating effect of streptokinase on «contact factor» could be explained as being similar to that of plasma proactivator.

### Bibliografía

- (1) AZNAR, J., A. LÓPEZ-BORRASCÁ, R. CALATAYUD y J. J. BARATA : *Rev. Clin. Esp.*, **89**, 276, 1963.
- (2) BECKER, F. L. : *J. Lab. Clin. Med.*, **56**, 136, 1960.
- (3) FERGUSON, J. H., F. G. WILSON, S. G. IATRIDIS, H. A. RIERSON and B. R. JOHNSTON : *J. Clin. Invest.*, **39**, 1942, 1960.
- (4) IATRIDIS, S. G. and J. H. FERGUSON : *Thromb. Diath. haem.*, **6**, 411, 1961.
- (5) IATRIDIS, S. G. and J. H. FERGUSON : *J. Clin. Invest.*, **41**, 1277, 1962.
- (6) IATRIDIS, S. G., F. G. WILSON, J. H. FERGUSON and H. A. RIERSON : *Thromb. Diath. haem.*, **5**, 50, 1960.
- (7) NIEWIAROWSKI, S. and O. PROU-WARTELE : *Thromb. Diath. haem.*, **3**, 539, 1959.
- (8) NIEWIAROWSKI, S., J. STACHURSKA and Z. WĘGRZYNOWICZ : *Thromb. Diath. haem.*, **7**, 514, 1962.
- (9) RATNOFF, O. D. : *J. Lab. Clin. Med.*, **44**, 915, 1954.
- (10) RATNOFF, O. D., F. W. DAVIE and D. L. MALLETT : *J. Clin. Invest.*, **40**, 803, 1961.
- (11) SOULIER, J. P. and O. PROU-WARTELE : *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.*, **4**, 932, 1959.
- (12) WAALER, B. A. SCAND : *J. Clin. Lab. Invest.*, **11** (suppl. 37), 1959.