

Contribución al estudio de las vitaminas K *

Por el Dr. RUBEN BRETON MANJARREZ,
académico de número

En 1929, estudiando Dam el metabolismo de la colessterina, mediante dietas especiales suministradas a pollos, observó la aparición de hemorragias subcutáneas e intramusculares. Dicho investigador las atribuyó a una carencia de vitamina C y, con el objeto de prevenirlas y de curarlas, suministró a los pollos en experimentación, jugo de limón, medida que resultó inútil, pues las hemorragias persistieron.

Dos años más tarde, es decir, en 1931, Mc. Farlane, en colaboración con Graham y Richardson, consignó en el "Biochemical Journal" una serie de observaciones que hicieron en pollos alimentados con dieta de pescados previamente agotados con éter. De estas observaciones las más importantes para nuestro estudio son las siguientes:

I.—Que el suministro de aceite de hígado de bacalao no suprimía la aparición del síndrome hemorrágico.

II.—Que la adición de cereales a la dieta impedía la aparición del cuadro hemorrágico, y

III.—Que la sangre de los pollos sometidos a este régimen alimenticio presentaba una marcada resistencia a la coagulación.

En 1934, Holst y Halbrook hicieron resaltar la eficacia que tiene el suministro de col en la alimentación de los enfermos con tendencia a cuadros hemorrágicos.

Dam y Schönheyder, en 1934, emprendieron nuevos estudios, encontrando que el tiempo de coagulación de la sangre procedente de pollos sujetos a esta clase de dietas estaba fuertemente aumentado. En este mismo trabajo experimental confirmaron la ineficacia del ácido ascórbico para combatir estas hemorragias.

Estos dos notables investigadores continuaron por un año más sus brillantes experiencias, experiencias que los llevaron a la

* Trabajo reglamentario de turno, leído en la sesión del 17 de octubre de 1945.

convicción de que la aparición de este síndrome hemorrágico era debida a la falta de un factor liposoluble en su alimentación; este factor no fué identificado con ninguna de las vitaminas conocidas. Dam y Schönheyder le asignaron el nombre de vitamina antihemorrágica o vitamina K, y no porque esta letra obedezca al orden establecido en la nomenclatura de Mc Collum, sino en atención a que la letra K es la primera de la palabra danesa "Koagulation".

Halbrook por ese mismo tiempo estudió esta enfermedad en los pollos, encontrando que 5 grs. de alfalfa desecada o su equivalente de extracto etéreo previene la aparición del cuadro hemorrágico.

Posteriormente, Cook, Scott, Almquist y Stockstad han aportado valiosas investigaciones acerca de los resultados obtenidos al adicionar a las dietas cantidades variables de diferentes proteínas.

En 1936, Dam, Schönheyder y Tage-Hansen por una parte y Quick por otra, descubrieron la deficiencia protombínica que presentan los pollos con avitaminosis K y la desaparición de esta deficiencia con el suministro de alfalfa.

Quick, Bancroft y Stanley-Brown verificaron la hipoprotrombinemia en enfermos de obstrucción icterica y llegaron a la conclusión de que la vitamina K es esencial en la producción de protrombina.

Dam, en 1938, realizó interesantes investigaciones buscando el contenido de vitamina K en las plantas; estos estudios le permitieron efectuar hallazgos de gran importancia; por ejemplo, que la hoja de castaño es sumamente rica en dicha vitamina; en cambio las semillas oleosas son sumamente pobres en su contenido.

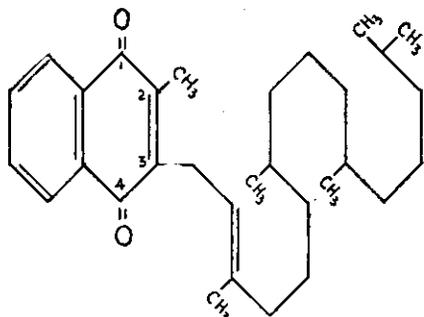
Para el estudio de la vitamina K, fué de gran interés el descubrimiento de Almquist y Stockstad. Este descubrimiento consistió en encontrar que la vitamina K es sintetizada por varias bacterias, comprobando que el hecho de no aparecer hemorragias en mamíferos sujetos a regímenes carenciales de vitamina K, era debido a que esta vitamina la sintetiza la flora intestinal, especialmente el género *Escherichia Coli*.

El año de 1939 fué el año de la química de la vitamina K. Dam y Almquist, independientemente uno del otro, estudiaron la

constitución química de esta vitamina y llegaron a la conclusión de que no era ningún derivado de los esteroides.

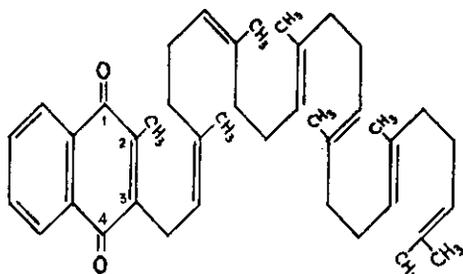
Lograron preparar extractos de una elevada concentración y el análisis orgánico elemental les reveló que estaba constituida solamente por carbono, hidrógeno y oxígeno.

A fines de ese mismo año, Dam en colaboración con el eminente químico Karrer, determinó el núcleo fundamental de la vitamina K: la naftoquinona. Simultáneamente, Doisy y sus colaboradores anunciaron el aislamiento de dos vitaminas K, una procedente de la alfalfa que designaron K_1 y otra extraída de sardinas en putrefacción que le llamaron K_2 . Almquist, Fieser y Doisy cerraron con toda brillantez este ciclo experimental al llevar a cabo la síntesis de estas dos vitaminas.



VITAMINA K_1
2-metil-3-fítíl-1-4-naftoquinona

fig. No 1.



VITAMINA K_2
2-metil-3-difarnesil-1-4-naftoquinona

fig. No. 2.

La vitamina K_1 es la llamada etiofiloquinona de Karrer; su radical fitilo indica sus relaciones con la clorofila, con los carotenos y con las vitaminas A y E.

La vitamina K_2 de origen animal tiene un radical difarsenilo, que le permite establecer una relación con los hidrocarburos llamados espinocénicos de fórmula general $C_{30}H_{50}$, que se encuentran en los aceites pesados.

Estas dos cadenas hidrocarbурadas confieren a las vitaminas ese marcado carácter liposoluble. La vulnerabilidad a la oxidación y al calor se debe a las dobles ligaduras que presentan.

En cambio, el núcleo naftoquinónico es perfectamente esta-

ble; basta mencionar el hecho de que permite el arrastre de vapor de agua sin sufrir modificación alguna.

La vitamina K₁ es un líquido oleoso ligeramente amarillo, en tanto que la vitamina K₂ se nos presenta como sólido cristalino amarillento.

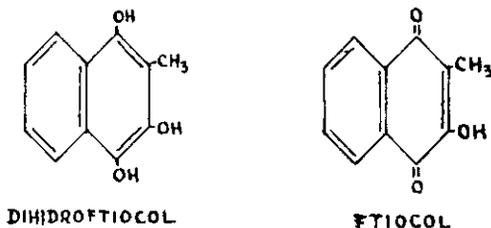
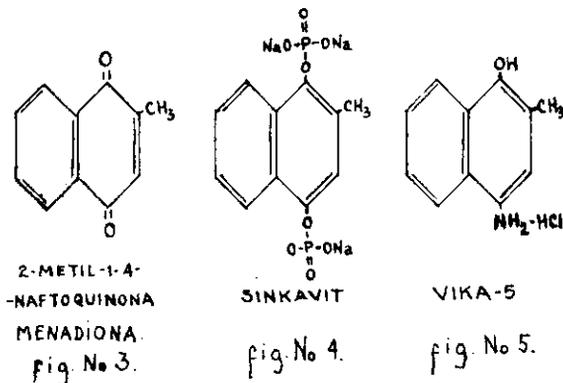


Fig. No. 2

La exhumación de los trabajos de Anderson por Almquist, relacionados con el aislamiento del pigmento del bacilo de Koch, lo identificaron con el phticol, e inclinaron a un grupo de investigadores a ensayar en algunas sustancias que contienen el núcleo naftoquinónico la acción antihemorrágica, obteniendo resultados satisfactorios.

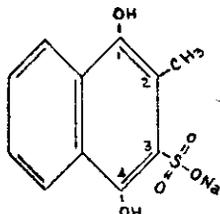
Las sustancias que se ensayaron fueron las siguientes:



Menadiona. 2 metil 1-4 naftoquinona. Soluble en aceites. Tres veces más activa que la vitamina K₁. Fué introducida a la terapéutica por Ansbacher y Fernholz.

Fosfato de menadiona sódica. Soluble en agua. Posee la mitad de la actividad de la vitamina K_1 .

Sinkamin. 4-amino-2 mentil-1 naftol. Soluble en agua. Posee un poder de actividad igual al de la vitamina K_1 .

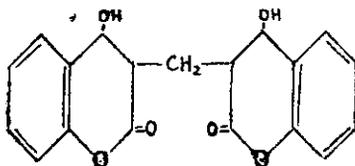


VITAMINA K (hidrosoluble, sintética)
1-4-naftohidroquinona-2-metil-3-sulfonato
sódico

fig. No. 6.

Hiquinona. 2-metil 1-4 naftohidroquinona. 3 sulfonato de sodio. Posee la mitad de la actividad de la vitamina K_1 . Con esta sustancia llevamos a cabo nuestros trabajos experimentales.

En 1941, Campbell y Link lograron aislar y cristalizar el agente hemorrágico del meliloto y a fines de este mismo año determinaron su fórmula de constitución.



DICUMARINA
3-3'-metilenbis-(4-hidroxicumarina)

fig. No. 7.

Dicumarina 3-3 metilen bis-(4-hidroxicumarina).

Según los trabajos de D'Alessandro efectuados en 1942, esta dicumarina inhibe a la vitamina K. Esta observación fué muy interesante porque solamente "in vivo" es en donde se realiza en tanto que "in vitro" resulta ineficaz.

La investigación de D'Alessandro dió origen a que en 1943 Link y sus colaboradores emprendieran nuevas investigaciones, encontrando que ratas con una dieta escasa de vitamina K y adicionada de ácido salicílico presentaron hipoprotrombinemia; esto los indujo a pensar que el verdadero agente hemorrágico del "Sweet Clover disease" no es la dicumarina sino el ácido salicílico producido en su degradación.

Day y Wakim, en 1943, en el Departamento de Química y Farmacología de la Universidad de Indiana, lograron, mediante ratas cecectomizadas, localizar la principal fuente productora de vitamina K, que es el ciego, así como también lograron eliminar la acción inhibidora de las sulfas en la síntesis de la vitamina K con ácido para-amino-benzoico.

El año pasado, es decir, en 1944, la eminente investigadora Natacha Horkewich demostró que la vitamina K tiene una acción activante en la formación de la tripsina.

Richert comprobó que la forma 2 metil 1-4 nafto-quinona es la que tiene mayor estabilidad en el organismo.

Kower y Koller han descartado a los phtalatos como factores determinantes en la formación de la vitamina K, así como también les han negado validez en la acción antihemorrágica.

De lo anteriormente expuesto, se desprende la gran importancia que tiene esta vitamina en el proceso de la coagulación sanguínea, ya sea que se acepte la teoría de Morawitz, de Howell o de Mellanby.

Pero el mecanismo bajo el cual actúa está aún confuso y oscuro. Algunos investigadores, entre ellos Snell y Keller, han tratado de justificar la intervención de la vitamina K como un factor constituyente de la protrombina, cuya síntesis se lleva a cabo en el hígado, es decir que la molécula de vitamina K es fragmento de la molécula de protrombina. A esta teoría se le pueden hacer las siguientes objeciones:

I.—Experimentalmente Schmidt ha demostrado que los productos de desdoblamiento de la protrombina no tienen ninguna acción antihemorrágica.

II.—La vitamina K no provoca la coagulación sanguínea por sustitución de la protrombina.

III.—La protrombina es una sustancia de naturaleza proteica.

IV.—La vitamina K tiene cadenas laterales que le confieren solubilidad en los aceites, propiedad de la que carece la protrombina, la cual es soluble en agua.

Berheim y Baumberger dieron a conocer una teoría, fundada en las propiedades óxido-reductoras del núcleo naftoquinónico frente a los agrupamientos sulfhídricos del fibrinógeno.

Esta teoría se funda en la forma quetónica que actúa en el núcleo naftoquinónico, frente al fibrinógeno, para oxidar a la función sulfhidrónica y formar la fibrina.

El siguiente esquema (fig. 8) explicaría la reacción:

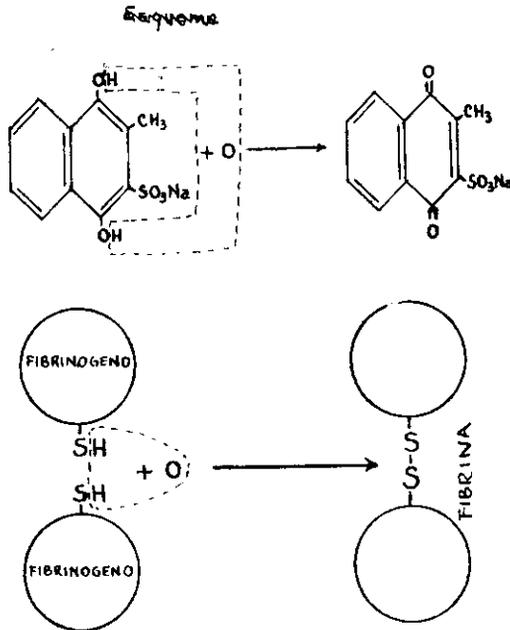


Fig. No. 8.

Hace unos cuantos meses el notable investigador Henrik Dam, al referirse a la vitamina K, decía:

“Futuras investigaciones nos aclararán mejor la forma en que la vitamina K actúa para promover la formación de protrombina, que es uno de los constituyentes químicos esenciales de la sangre para su coagulación normal en las ocasiones en que puede

“haber un desangramiento. Sólo se sabe que el proceso de formación se lleva a cabo en el hígado. También se espera todavía “el descubrimiento del papel que la vitamina K juega en los vegetales y en las bacterias”.

El objeto de este trabajo es dar a conocer algunas experiencias encaminadas a investigar precisamente esta forma íntima de actuar de la vitamina K.

Nuestras investigaciones las realizamos en 60 muestras de sangre, de las cuales 42 fueron proporcionadas por el Banco de Sangre del Hospital General, y las restantes fueron de procedencia particular.

Colaboraron mis ayudantes las químicas Margarita López Reyes y Blanca Gavito.

Los trabajos se llevaron a cabo con la clásica prueba de Quick, a la que se le adicionaron diferentes cantidades de la vitamina K soluble (2 metil 1-4 naftohidroquinona sulfonato de sodio), observándose un marcado descenso del tiempo de coagulación, descenso proporcional a la cantidad de vitamina K adicionada, obteniéndose el mayor con 10 miligramos.

Véase cuadro núm. 1.

Nº del plasma	Edad	Sexo	TIEMPO DE COAGULACION CON LAS SIGUIENTES CANTIDADES EN MILIGRAMOS DE VITAMINA K										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	20	M	14	12	11	10	9	8	7	6.5	6	5.5	5
2	20	M	15	13	11	10	9	8	6	5	4	3	2
3	30	F	11	9	8	7	5	4	3.5	3	3	2.5	2
4	32	F	13	11	9	7	6	5	4	3	2.5	2	2
5	22	F	12	10	9	8	7	6	5	4	3.5	3	2.5
6	33	F	10	9	8	7	6	6	5.5	5	4.5	4	3.5
7	22	F	14	12	11	10	8	7	6	5	4.5	3.5	2.5
8	35	F	15	14	13	12	11	10	9	8	6	5	4
9	27	F	11	10	9	8	7	6	5	4	3.5	3	2.5
10	39	M	12	10	9	7	6	4	3	3	2.5	2	2
11	35	M	11	9	8	6	5	4	3.5	3	2.5	2	2
12	31	M	10	9	8	7	5	4.5	4	3.5	3	2.5	2
13	35	M	12	10	9	8	7	6	5	4.5	4	3	2

Cuadro No. 1.

Con el objeto de investigar si la vitamina K permanecía íntegra desde el punto de vista químico y conservaba su actividad fisiológica, se procedió a dializar 20 coágulos de Quick con diferentes cantidades de vitamina K, dosificando la concentración por medio de la técnica de Pinder y Singer del ciano-acetato de etilo; los otros dializados se emplearon en nuevas pruebas de Quick con resultados satisfactorios.

Véase cuadro No. 2.

PRUEBA DE QUICK + VITAMINA K

CASO NUM	TIEMPO DE COAGULACION NORMAL	VITAMINA K	TIEMPO DE COAGULACION		VITAMINA K ENCONTRADA	
1	12	10	2	A N T E	10	
2	15	10	3		10	
3	11	10	2		10	
4	11	8	2.5	D U R A S	8	
5	10	8	3		8	
6	12	8	3.5		8	
7	13	6	4	I S H	6	
8	12	6	5		6	
9	14	4	8		4	
10	12	4	6	I S I O	4	
CONTROLES						
1		10			D I A L I Z A D O S	10
2		10		10		
3		10		10		

Cuadro No. 2.

De las experiencias anteriores se deduce que la vitamina K conserva su integridad química y fisiológica en el proceso de la coagulación sanguínea, tomando parte en la formación de la protrombina al nivel hepático y en la formación de la fibrina.

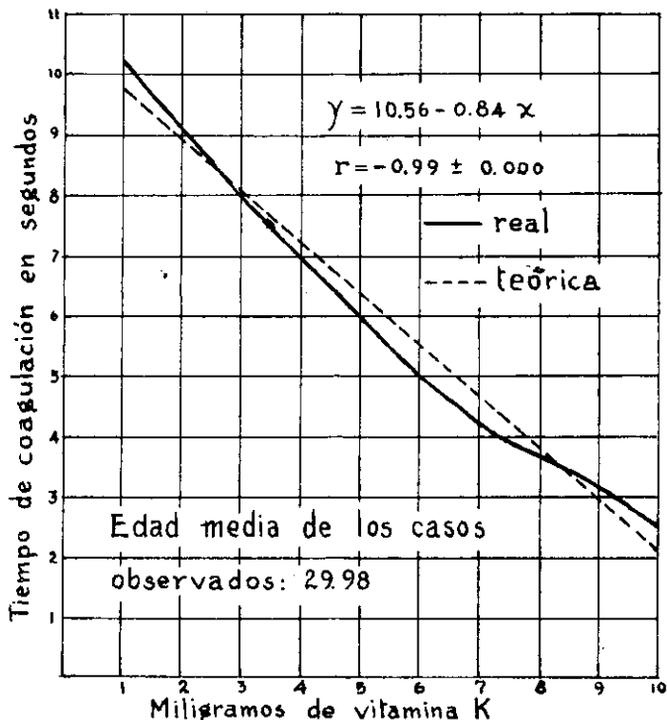
Su intervención es meramente por presencia y cumple exactamente con las exigencias que se requieren para asignarle el papel de catalizador. Según Ostwald, se llama catalizador "a la sustancia que altera la velocidad de reacción, pero que no aparece combinada con los productos finales de la misma".

		x = mgs. de vitamina K										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
y = tiempo de coagulación en segundos	15											
	14	1			CUADRO DE CORRELACION							1
	13	3	1									4
	12	6	2	1								9
	11	5	6	1	1							13
	10	20	5	7	1	1						34
	9	12	19	4	6	2	1					44
	8	3	14	17	5	6		1				46
	7		3	16	16	5	7	1				48
	6			4	16	15	6	6	5			52
	5				5	15	18	8	3	6	2	57
	4					6	14	23	17	6	5	71
	3						4	11	20	23	17	75
	2								5	15	26	46
		SUMAS	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Mc	10.24	9.14	8.02	6.96	6.00	5.04	4.32	3.84	3.26	2.66	

Cuadro No. 3.

De acuerdo con la función catalítica que tiene la vitamina K, procedimos a determinar bioestadísticamente la función que rige entre la concentración y la velocidad de la reacción.

Véanse cuadros 3 y 4.



Cuadro No. 4.

Esta investigación es la primera que se efectúa en la vitamina K para asignarle un mecanismo catalizador, quedando con esto explicado el papel que también desempeña en el metabolismo bacteriano.