

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**VARIACIONES DE LA ANTITROMBINA III
EN LA TERAPIA CON ANTICOAGULANTES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO

México, D. F.

1969



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

	PRESIDENTE Prof.:	fernando VELEZ OROZCO
	VOCAL "	: RAMON ULACIA ESTEVE
JURADO ASIGNADO ORIGI-	SECRETARIO "	: JUAN J. MANDOKI WEITZNER
NALMENTE SEGUN EL TEMA	1er. SUPLENTE	: ENRIQUE CALDERON GARCIA
	2o. SUPLENTE	: DEA CORONADO PERDOMO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: LABORATORIO CLINICO DEL SANA-
TORIO ESPAÑOL.

SUSTENTANTE: MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO

ASESOR DEL TEMA: Q.F.B. FERNANDO VELEZ OROZCO

SUPERVISOR TECNICO: DR. ALFONSO VELEZ OROZCO

Ma. Elena Bustamante Calvillo
F. Velez O.
Alfonso Velez Orozco

A MIS PADRES:

ENRIQUE BUSTAMANTE N.
YOLANDA CALVILLO DE B.

A MIS HERMANOS:

ENRIQUE, PATRICIA Y MIGUEL ANGEL

A MIS ABUELYTOS:

**ANTONIO CALVILLO T.
MA. ELENA ROSALES DE C. (q.p.d.)**

A LOS SEÑORES:

**MANUEL MONTOYA G.
ROSA MARIA LEON DE M.**

A MIS TIOS Y PRIMOS.

A MIS AMIGOS.

INTRODUCCION

Uno de los conocimientos más recientes e importantes de los últimos años, es el que se refiere a los estados de hipercoagulabilidad, ya que según estadísticas americanas, cerca del 50% de las muertes de los individuos, se deben a una alteración de la coagulación, que conduce a la producción de fenómenos de tromboembolismo. Estos estados de hipercoagulabilidad pueden originarse por un aumento cuantitativo de factores procoagulantes, ó por una disminución de la actividad fibrinolítica normal.

Dentro de los factores que obran como anticoagulantes endógenos, tenemos principalmente a las antitrombinas, que como su nombre lo indica, actúan en contra de esta substancia, ayudando así a que la sangre se mantenga en estado líquido en la circulación. De este grupo poco conocido de las antitrombinas vamos a tratar sobre la antitrombina III, que parece tener un gran interés en relación al proceso de la coagulación.

La importancia de la terapia anticoagulante, para evitar los fenómenos tromboembólicos que se presentan en un gran número de enfermedades, ha sido perfectamente comprobada en los últimos años. Actualmente esta medicación anticoagulante se emplea en todo el mundo, para mantener un estado de hipocoagulabilidad, en el tratamiento del infarto al miocardio y en las tromboflebitis principalmente.

Quiero agradecer al Dr. Alfonso Vélez Orozco la dirección de ésta tesis y al Hospital Español de México por la facilidades que me ha dado en el desarrollo de este trabajo.

GENERALIDADES

— — — — —

COAGULACION

La coagulación es la conversión de un coloide, el fibrinógeno, de sol a gel, pasando a fibrina, en cuyas redcillas quedan englobados elementos figurados y exudándose un líquido llamado suero.

Desde el primer momento de la coagulación sanguínea numerosos factores reaccionan entre sí, en forma muy compleja para producir finalmente el coágulo de fibrina.

FACTORES DE LA COAGULACION

Los numerosos factores plasmáticos que intervienen en el proceso de la coagulación, son designados por un número romano en el orden de su identificación y según las indicaciones de la Comisión de la Sociedad Internacional de Hematología. Son agrupados en la forma siguiente:

Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor III	Tromboplastina
Factor IV	Calcio
Factor V	Proacelerina; Factor lábil
Factor VI	Acelerina
Factor VII	Proconvertina; convertina; factor estable.
Factor VIII	Globulina antihemofílica (AHG)
Factor IX	Factor antihemofílico B; componente tromboplastínico del plasma (PTC) Factor Christmas.
Factor X	Stuart Prower
Factor XI	Antecedente tromboplastínico del plasma (PTA); factor antihemofílico, C.

Factor XII Factor Hageman, factor de contacto.
Factor XIII Factor estabilizador de la fibrina.

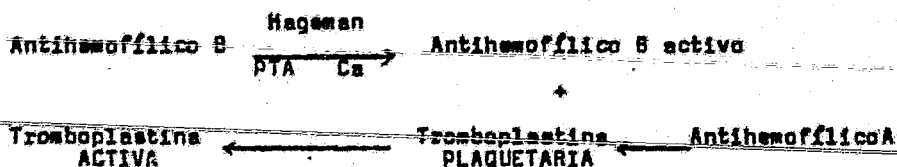
MECANISMO DE LA COAGULACION.

El contacto de la sangre normal con una superficie que no sea el endotelio vascular intacto; trae consigo; en mayor ó menor tiempo según la naturaleza de la superficie; una coagulación completa.

La coagulación ocurre en diferentes fases y son numerosos los conceptos que se refieren al mecanismo de la coagulación; probablemente el más aceptado, es el de que la coagulación ocurre en tres fases:

- 1.- Tromboplastinogénesis
- 2.- Trombinogénesis
- 3.- Fibrinogénesis.

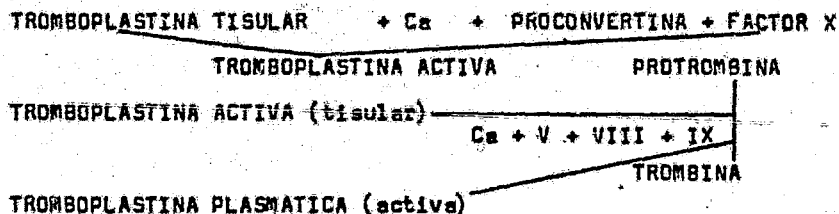
En la primera fase, las plaquetas en contacto con una superficie extraña, generalmente electronegativa, liberan al factor - tromboplastínico ó factor III plaquetario que es una sustancia - inactiva, para activarla necesita que el factor XII ó Hageman se combine con el factor XI ó PTA, que en presencia del factor IV ó Ca^{++} , activan al factor IX o PTC. Este último factor junto con el factor VIII ó AHG activan al factor tromboplastínico, resultando tromboplastina activa.



La segunda fase de la coagulación, consiste en la formación de trombina que resulta de la activación de un precursor plasmático, la protrombina. Fisiológicamente la trombina puede producirse de dos maneras por lo menos. Los líquidos tisulares llevan la

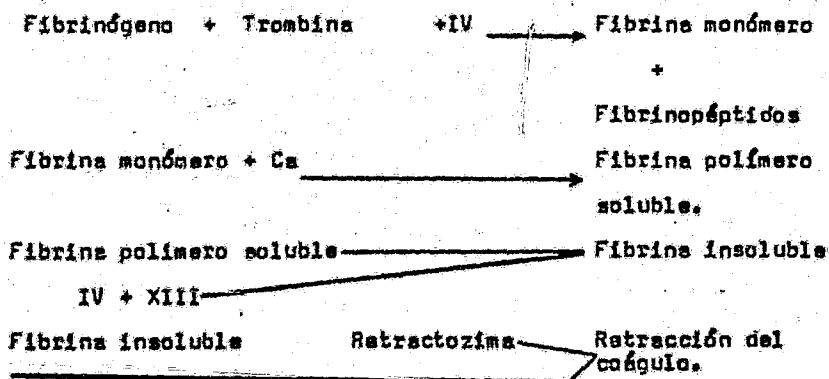
tromboplastina tisular, extrínseca o exógena, inactiva, se combina quizá estequiométricamente, con una globulina plasmática - la proconvertina que en presencia del factor Stuart Prower ó - factor X y de los iones cálcicos, forman la tromboplastina activa, que actúa sobre la protrombina transformándola en trombina.

La trombina se pueda formar igualmente en ausencia de líquidos tisulares a partir sólo de dos elementos sanguíneos (coagulación intrínseca), al contacto con una superficie extraña la sangre elabora una tromboplastina sanguínea (tromboplastina -- plasmática, intrínseca ó endógena). Esta tromboplastina exige - como la tromboplastina tisular, la presencia de calcio ionizado, del factor Stuart Prower, convertina y proacelerina para adquirir su actividad óptima y convertir rápidamente la protrombina en - trombina:



La última fase de la coagulación es la transformación de - una globulina soluble; el fibrinógeno, en un derivado insoluble; la fibrina; en presencia de una enzima proteolítica, la trombina. Esta insolubilización se realiza en varias fases: durante la primera, la trombina libera a partir del fibrinógeno, polipéptidos - muy ácidos ó fibrinopéptidos, probablemente por una ruptura de ligaduras arginina*glicina (Lorand). Esta pérdida de carga negativa facilitaría la polimerización ulterior de las moléculas de fibrinógeno modificadas y la formación de fibrina. La fibrina estaría-

finalmente reforzada por la formación de uniones - S-S-, en presencia de iones cálcicos y de una globulina plasmática es estabilizada por la cisteína, (factor estabilizador de la fibrina o FSF). Esta fibrina reforzada es insoluble en urea al 30% (Laki-1953). La fibrina es una malla que engloba plaquetas, y éstas al dejar en libertad la enzima retracto^zima, sufre una retracción la fibrina, y en algunas horas la contracción del coágulo origina la expulsión de la mayor parte del suero.



Plaquetas en contacto con
una superficie extrínseca

Tromboplastina plaquetaria

o factor tromboplastínico III

Tromboplastina Tisular

+

Proconvertina + factor X + Ca

Factor XII + Factor IX (inactivo) + Factor XI

Ca

Factor VIII + Factor IX (activado)

Tromboplastina activa + Ca + Factor VII + Factor X + Factor V

+

Protrombina

Trombina + IV + XIII

Fibrinógeno

Fibrina

Retracción del coágulo → Retractilina

TROMBINA.

Es una enzima proteolítica que se destruye por el calor a 60°C.

Su principal papel es el de actuar sobre el fibrinógeno para transformarlo en fibrina.

La trombina es una sustancia que no existe en la sangre circulante, sino que se forma en el momento de la coagulación. Su precursor es la protrombina y al paracer, de cada molécula de protrombina se forma otra molécula de trombina. Las pequeñas cantidades de esta última, que sin hemorragia alguna, pueden formarse en la sangre circulante, son rápidamente destruidas por la acción de una antitrombina plasmática fisiológica.

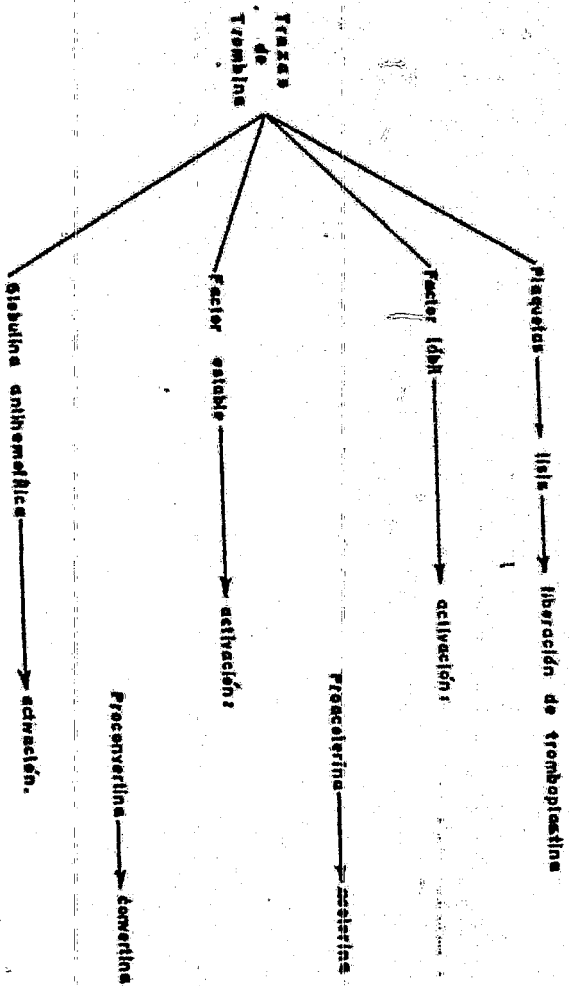
La trombina presente en el suero de la sangre coagulada, sólo permanece activa de 2 a 4 horas, ya que se combina con la antitrombina III, transformándose en un cuerpo, que ya no tiene poder coagulante, denominado Metatrombina.

Una vez formado el coágulo se exude de nuevo trombina, que aún en pequeñas cantidades actúa:

- a) sobre otras muy grandes de fibrinógeno.
- b) En la lisis de las plaquetas.
- c) En la activación del factor Lábil
- d) Activando la globulina antihemofílica
- e) En la activación del factor estable.

Estas dos últimas acciones no han sido del todo demostradas. (Esquema # 1).

La cantidad de trombina puede evaluarse por su acción coagulante, de aquí que la unidad Malleby es la correspondiente a la cantidad de trombina que hace coagular 1 ml. de plasma oxalato en 30" a 37° C.



ANTITROMBINAS

Normalmente están presentes en la sangre; se piensa que - -
tienen algo que ver con la prevención de la coagulación intra- -
vascular, evitando que un proceso iniciado localmente (por algún-
tipo de hemostasis); se extienda más allá del área requerida.

Un incremento patológico de la actividad de los inhibidores-
endógenos de la coagulación; da como resultado desórdenes hemo- -
rrágicos pronunciados; ya que en ocasiones no son neutralizados -
por los procoagulantes naturales. También parece ser que la dis-
minución de los inhibidores de la coagulación endógena pueda dar-
origen a trombos y embolias.

Las inhibidores naturales ejercen su acción principalmente -
sobre dos factores activos; la trombina y la tromboplastina.

Los inhibidores endógenos de la coagulación son;

a) Inhibidores de la fibrinogénesis.- Se reducen a los inhi-
bidores de la trombina o antitrombinas; numeradas del I al IV se-
gún la clasificación propuesta por Seegers; Johnson y Fell (1954)
Las antitrombinas V y VI fueron más tarde añadidas (Loelliger y -
Hers 1957; Niewiarowski en 1959).

b) Inhibidores de la trombogénesis.- Aquí se agrupan a las -
antitromboplastinas; antiproconvertinas y anticonvertinas; los in-
hibidores eventuales; las proacelerinas; acelerinas y protrombi-
nas; los inhibidores lípidos de Tocantina; de Overman y de Hooch;
en la exclusión de los inhibidores propios de la Tromboplastinoge-
nética intrínseca.

Sus propiedades principales están marcadas en el cuadro No. 2

INHIBIDORES DE LA FIBRINOGENESIS:

Antitrombina I

La trombina desaparece rápidamente de la sangre después de la coagulación. La inactivación inmediata de la trombina, es de bida a su adsorción por la fibrina (Quick y Favre-Gilly 1949; - Klein y Seegers 1950). Seegers llama a la fibrina antitrombina I.

La fibrina purificada, formada a partir de 1 ml. de plasma, podría adsorber de 1500 a 2000 unidades de trombina. La can tidad de trombina adsorbida depende no obstante de su concentración inicial, es del orden del 90%, en una concentración de 1000 unidades por ml. Esta fijación es muy inestable y la fibrina libera la trombina adsorbida en el momento de la retracción del coágulo. Esta propiedad de la fibrina, constituye un medio exce lente de prevenir la extensión de un trombo.

ANTITROMBINA II

Es llamado también Co-factor ó complemento de la heparina.

La heparina no puede ejercer su acción antitrombínica en presencia de trombina y fibrinógeno purificados; requiere un co factor que fué encontrado en la fracción albúmina (Quick 1939; Brinkhous, Smith Warner y Seegers, 1939).

Shellman, Sylven y Julian 1951, pudieron mostrar que el co factor es una lipoproteína que acompaña a las α globulinas. - Cuando el co-factor está libre se destruye a 56°C. en 5 minutos; en cambio cuando está combinado con heparina es destruido a 65°C. La diferencia de la antitrombina II con la antitrombina III es minima, consiste sólo en diferencias de precipitación con el sulfato de amonio, destrucción por el calor, consumo por un exceso de trombina ó separación electrofóretica.

La heparina asociada a su co-factor, ejerce una acción de antitrombina, que puede ser reforzada por la antitrombina III - (Seegers y colaboradores en 1942 - 1954).

ANTITROMBINA III

Se denomina también antitrombina natural, sérica o progresiva, albúmina X.

La desaparición de la trombina después de la coagulación ha sido atribuida a su neutralización por una antitrombina, resultando un complejo llamado metatrombina. Dicho complejo sería disociable por ácidos y álcalis (Schmidt-1892). Este inhibidor denominado antitrombina III es destruido a pH inferiores de 6 y superiores de 9.5, igualmente que por éter o el cloroformo; y es considerado como una α globulina. No es adsorbible en sulfato de Sodio.

ANTITROMBINA IV

Se puede llamar acelerador antitrombina (AA).

El éter tiene la propiedad de precipitar la antitrombina III del plasma. El plasma tratado con esta sustancia es incapaz de inactivar la trombina formada, pero en cambio este mismo plasma puede inactivar una trombina que se forme nuevamente por la reacción protrombina + Ca + Tromboplastina) o sea, que después de precipitada la antitrombina III por el éter aún queda una cierta capacidad antitrombínica; a este factor se le ha denominado antitrombina IV.

Según Glauck (1948) la antitrombina IV estaría igualmente presente en el suero normal e inhibiría la actividad de la protrombina purificada, en tanto que la proacelerina actúa en el sentido inverso. Un substrato sintético, el TAME (Tosil-arginina; metil éster, hidrolizado enzimáticamente por la trombina) es opor-
dría a bajas concentraciones, como la proacelerina; a la acción de la antitrombina IV, protegiendo la trombina naciente y favoreciendo el consumo de la protrombina.

ANTITROMBINA V

Esta antitrombina es localizada en la fracción anormalmente aumentada de las γ globulinas séricas (euglobulinas precipitables a un pH de 6.5). Termo estable; no adsorbible por el sulfato de bario, no dializable, insoluble en agua - destilada y éter, se distingue por sus propiedades, de otras antitrombinas (cuadro # 2).

La antitrombina V sería, según Losliger y Hers (1957) - una antitrombina patológica, que interviene en la polimerización de la fibrina.

ANTITROMBINA VI

Niewiarowsky y Kowalski (1958) han descrito un inhibidor de la trombina que aparece durante la acción proteolítica de la plasmina y la tripsina, sobre el fibrinógeno y la fibrina. Este anticoagulante es parcialmente neutralizado por la protamina y el azul de toluidina, pero termolábil, no adsorbible por el sulfato de bario; precipitable por el sulfato de amonio al 50%. Es destruido por la plasmina y la trombina; se trataría de un producto de degradación de la fibrina, con peso molecular bastante elevado, y es considerado como un inhibidor endógeno patológico, que interfiere con la polimerización de la fibrina.

PROPIEDADES PRINCIPALES DE LAS ANTITROMBINAS

ANTITROMBINAS NATURALES	Modo de Acción	Destrucción de la trombina	Presencia en el suero	Sensibiliza- ción al ester	Adsorción per- manente BaSO ₄ NaCO ₃	Cóprico Al(OH) ₃	Movilidad Electroforética	Precipitación por (NH ₄) ₂ SO ₄ Saturado	Tracción por Etanol (100%)	Coagula- ción estable 1-4 meses	Termo- Estable Labil (10 min)
I FIBRINA	Instantáneamente	—	—	—	—	—		30 %	I	+	55°
II LIPOPROTEÍNA		+	+	—	—	+	α globulinas	50—70 %	IV	+	56° 60°
III LIPOPROTEÍNA	Progresivamente	+	+	+	—	+	α globulinas	50—70 %	IV	+	56° 60°
IV	Instantáneamente	+	+	—	—	—					60° 70°
V EUGLOBULINA	> >	—	+	—	—	—	γ globulinas				56° 100°
VI FRACCION PÉPTICO	> >	—	—	—	—			80%			60°(1)

HIPO E HIPERCOAGULABILIDAD

Existe en la sangre circulante un balance muy delicado en tres factores que favorecen (procoagulantes), y otros que previenen la coagulación (anticoagulantes); en caso de que este equilibrio homeostático se rompa, resulta un trastorno de la coagulación. Dicha ruptura puede deberse a una deficiencia de procoagulantes ó exceso de anticoagulantes, resultando un estado de hipocoagulabilidad. Por el contrario, una deficiencia de anticoagulantes y predominio de procoagulantes dará hipercoagulabilidad.

Los estados de hipocoagulabilidad se pueden clasificar según la deficiencia de los factores en las tres fases de la coagulación.

A) Déficit en la fase tromboplastínica:

- 1.- Deficiencia del factor VIII ó globulina antihemofílica (Hemofilia clásica ó hemofilia A).
- 2.- Deficiencia del factor IX ó PTC (Enfermedad de Christmas ó hemofilia B).
- 3.- Deficiencia del factor XI ó PTA (Hemofilia C).
- 4.- Deficiencia del factor Hageman, y del factor Stuart - Prower.
- 5.- Deficiencia de tromboplastina plaquetaria (plaquetopenias, trombastenias, y otros trastornos plaquetarios).

B) Déficit en la fase trombínica:

- 1.- Hipoprotrombinemias en deficiencias del factor II
- 2.- Deficiencia del factor V ó lábil.
- 3.- Deficiencia del factor VII ó estable.

C) Déficit de la fibrinogénesis:

- 1.- Afibrinogenemias congénitas.
- 2.- Fibrinogenopenias adquiridas.

D) Fibrinólisis:

- 1.- Hiperfibrinólisis.

E) Anticoagulantes circulantes:

- 1.- Anticoagulantes de la fase tromboplastínica que actúan en la profase de la coagulación y se crean por estímulos tipo antígeno-anticuerpo. La antitromboplastina resultante de las reacciones anteriores posee un gran poder inhibitorio; es termolabile, muy resistente a la conservación, no es adsorbible ni dializable y se localiza electroforéticamente entre las globulinas Beta y Gamma, identificándose como una antitromboplastina que posee una acción específica contra el factor IX (PTC). La acción inhibitoria de este anticoagulante se neutraliza con suero de cerdo.

- 2.- Hiperheparinemias, o sea anticoagulantes contra la fase de la transformación de la protrombina en trombina y sobre esta última sustancia, siendo clínicamente la más importante, la heparina y los heparinoides.

HIPERCOAGULABILIDAD

La hipercoagulabilidad es una actividad aumentada de uno o más factores de la coagulación, o a la disminución de la actividad de los inhibidores naturales de la misma, incluyendo al sistema fibrinolítico, lo que crea condiciones favorables para la coagulación intravascular.

La hipercoagulabilidad no significa necesariamente que los individuos que la presentan van a tener fenómenos de coagulación in

travascular, pero esos sujetos estarán más predispuestos a ella.

También se ha estudiado que existe una tendencia a presentar fenómenos tromboembólicos cuando hay una disminución de los inhibidores, como se ve por ejemplo en la disminución de la antitrombina III.

Los trastornos producidos por la hipercoagulabilidad de la sangre (los trombos y embolias) toman cada día mayor importancia, hasta el punto de haberse considerado como una de las principales causas de la mortalidad.

Pueden presentarse estados de hipercoagulabilidad sanguínea, después de intervenciones quirúrgicas complicadas, de heridas, en sangrías abundantes, en estados de hemoconcentración por deshidratación (diuréticos mercuriales, digitálicos, etc.)

Proceso trombótico.- El trombo inicial tiene tendencia a crecer por capas sucesivas de material sanguíneo coagulado. Está formado por capas fibrino-leucocitarias (trombo blanco) y otras capas, especialmente eritrocitos (trombo rojo), dando al final trombos - estratificados. De esto puede deducirse el interés de los medicamentos anticoagulantes, que permiten frenar en un momento dado estas sucesivas capas de material coagulado, y detener el proceso de crecimiento del trombo intravascular.

Von Kaulia sugiere la siguiente clasificación de los estados de hipercoagulabilidad:

1.- Permanente.- Es una hipercoagulabilidad que perdura, esto no quiere decir que se va a originar necesariamente coagulación intravascular. Sus causas más frecuentes son las enfermedades malignas como el cáncer del pulmón o del páncreas, o a la tromboflebitis migrans.

2.- Transitoria.- Son los estados de hipercoagulabilidad que alternan con estados de coagulación normal. Se puede presentar en

la exposición a ciertos insecticidas; en el estrés que tras un aumento de algunos factores como el VIII, desarrollando tal hipercoagulabilidad una activación del sistema fibrinolítico.

3.- Enmascarada.- Es posiblemente la más importante en la Clínica y se puede definir como la condición en la cual la actividad de uno ó varios factores de la coagulación se encuentran disminuidos; pero la coagulación en conjunto está aumentada. Este caso frecuentemente se presenta en el tratamiento con dicumarínicos y se vuelve peligrosa al suspender el tratamiento en forma brusca.

4.- Relativa.- Se presenta cuando la coagulación está muy deprimida en niveles bajos, y sube a niveles normales ó casi - normales. Este caso se presenta al suspender el tratamiento con anticoagulantes.

SISTEMA FIBRINOLITICO

La fibrinólisis es la disolución enzimática de la fibrina. El conocimiento de la fibrinólisis es relativamente reciente; ya que en 1915 se observó que el aumento de la actividad fibrinolítica era capaz de producir hemorragias y que, por el contrario, la falta de una actividad fibrinolítica normal podría conducir a la coagulación intravascular.

MECANISMO

En la sangre existe una proteína con acción enzimática cuyo precursor, el plasminógeno, está presente en la sangre, linfa y otros fluidos orgánicos. También nuestro organismo cuenta con un material enzimático llamado "activador" que está presente en los tejidos y en la orina.

Al contacto del activador con el plasminógeno, hay activación de este último, resultando una enzima proteolítica llamada plasmina, que hasta antes de aparecer la estreptoquinasa se denominaba fibrinolisisina.

La plasmina en contacto con la fibrina la hidroliza en pequeños fragmentos, que son polipéptidos, que adquieren propiedades anticoagulantes; debiendo recordarse siempre que cuando se disuelve el coágulo, se desarrolla una actividad anticoagulante.

En 1950-1951, se descubrió que el estreptococo α hemolítico producía una sustancia llamada estreptoquinasa que podía activar el plasminógeno a plasmina; lo mismo que la uroquinasa que es excretada en la orina humana. Esta última se investiga en los Estados Unidos.

Se encontró que el mecanismo de la estreptoquinasa es distinto al de los activadores naturales; pues necesita un paso in-

termadio más, ya que actúa sobre una proteína plasmática que es un proactivador que, convertido en activador, va a activar a su vez al plasminógeno transformándolo en plasmina.

La elevación espontánea de la actividad fibrinolítica se presenta en la felle aguda del hígado. Este aumento puede ó no causar hemorragias, dependiendo de su intensidad y; cuando se prolonga, puede originar una hemorragia secundaria; ya que la plasmina no sólo destruye la fibrina, sino también a los factores V y VII, originando una marcada disminución de ambos.

INHIBIDORES DE LA FIBRINOLISIS

Existen inhibidores naturales; son tres probablemente; que se encuentran en la sangre, y los tejidos, excepto en la orina. Estos inhibidores bloquean la activación del plasminógeno.

Hay inhibidores sintéticos como el ácido epsilon amino caproico, que se aplica cuando un paciente presenta un aumento de la actividad fibrinolítica.

MECANISMO

El activador tisular se liberado hacia la sangre continuamente y en pequeñas cantidades, pero en ciertas condiciones pueden pasar dosis mayores, que en general no producen una mayor acción fibrinolítica por dos razones, porque pueden ser neutralizados por los inhibidores naturales de la activación, y si hay mayor cantidad de activador otro inhibidor puede bloquear la formación de la plasmina.

Además tenemos la antiplasmina que previene la hidrólisis de la fibrina por la plasmina. Estos son mecanismos naturales de protección en contra de una mayor producción de plasmina; ya que si se tiene una gran cantidad de ella; habrá una digestión de los coágulos interfiriendo con el proceso de la hemostasia.

Entonces, para producir una reacción fibrinolítica se necesi-

ta una acción más intensa de los activadores que la de los -
inhibidores, o mayor de la que la antiplasmina puede inhibir.
Esto es necesario tomarlo en cuenta en la terapia trombolítica,
ca, pues eso es precisamente lo que se trata, cuando se in-
yectan activadores como la estreptoquinasa, para convertir
una gran cantidad de plasminógeno en plasmina, mayor de la
que el inhibidor pueda inhibir y entonces, sí se obtiene la -
acción fibrinolítica que disolverá el coágulo, lo que es de-
seable, pero resulta completamente indeseable en los sujetos
que no padecen coagulación intravascular.

Se deben usar activadores y no plasmina en los trata-
mientos trombolíticos, ya que el coágulo debe tener plasmi-
nógeno en su interior para que actúe cuando es activado, --
pues la plasmina no penetra en el coágulo ya formado; ade-
más es inactivada por la antiplasmina circulante. Cuando se
inyecta un activador, éste es parcialmente neutralizado por
el anti-activador, pero el resto del activador penetra en el
coágulo y actúa sobre el plasminógeno, transformándolo en -
plasmina; igualmente el coágulo por alguna razón desconocida,
no deja penetrar a la antiplasmina.

En el esquema siguiente se resume todo lo anterior:

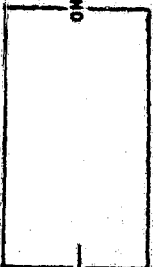
ACTIVACION INDIRECTA

ESTREPTOKINASA

TRANSFORMA

PROACTIVADOR → ACTIVADOR

PLASMINOGENO



PLASMINA

HIDROLISIS
DE LA FIBRINA

PRODUCTOS DE DEGRADACION
DE LA FIBRINA (CON
PROPIEDADES ANTICUASU-
LANTES)

INHIBICION INDIRECTA

INHIBIDORES NATURALES DE LA
ACTIVACION, ACIDO E-AMINO CAPROICO:
BLOQUEA LA ACTIVACION DEL PLASMINOGENO

ACTIVADORES
TISULAMES

ORINA (UROKINASA)

ANTIPLASMAS (SUECOS),
(INHIBIDORES EXTRACTADOS DE
PANCREAS, PANCREASITIS MORGAN
LA ACCION DE LA PLASMINA)

ACTIVACION DIRECTA

INHIBICION DIRECTA

ANTICOAGULANTES

Son sustancias que tienen acción retardante ó bien opuesta a la coagulación. Muchos de ellos tienen sólo una acción limitada dentro de ciertas circunstancias; ó bien sólo actúan neutralizando los excedentes de los factores coagulantes.

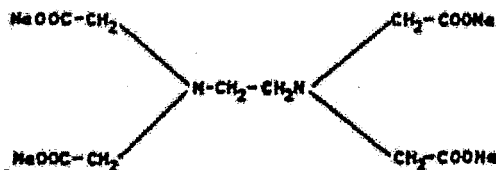
Los anticoagulantes se clasifican:

A) Anticoagulantes de acción "in vitro". Son los usados en el laboratorio para conservar la sangre incoagulable; para este fin se emplean:

Oxalatos. Es un agente descalcificante; únicamente para uso "in vitro"; suelen usarse principalmente los oxalatos de sodio, potasio, litio y amonio.

Citratos. Pertenecen al grupo de los defionizantes y se emplean en cantidades mayores que los precipitantes; para inhibir la concentración iónica del calcio a un nivel tal que impida la coagulación. Se emplea "in vivo" e "in vitro".

Veresatos (E.D.T.A.) Se emplea "in vitro" e "in vivo"; son las sustancias denominadas quelatos; debido a su fórmula estructural forman complejos que bloquean los cationes; inhibiendo su ionización. En estos complejos, un catión es incapaz de desalojar a otro de acuerdo con su potencial de ionización; siendo el veresato de calcio uno de los más estables y de tan baja constante de ionización que inhibe perfectamente la coagulación. El anticoagulante empleado; es el veresato de sodio ó etilén di amino tetra acetato de sodio; cuya fórmula:



El disacárido fundamental de la heparina está formado por una molécula de glucosamina y ácido glucurónico. Se caracteriza porque la porción del ácido sulfúrico forma un enlace amídico con el radical amino de la glucosamina; ambos se encuentran en forma de piranósidos y con enlace entre los carbonos 1 y 4 entre sí, y con las unidades siguientes.

Las preparaciones comerciales de heparina están formadas - posiblemente por una mezcla de ésteres mono, di, tri y tetra-sulfúricos de mucitina. La movilidad electroforética es muy elevada e independiente del pH. La actividad anticoagulante resultaría de la carga eléctrica negativa elevada.

Se han producido heparinas tan activas que 1 mg. es capaz de mantener incoagulable hasta 500 ml. de sangre; lo más común es encontrarlas que 1 mg. basta para evitar la coagulación de 100 ml. de sangre.

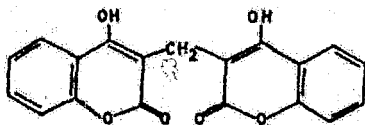
El sulfato de protamina y el azul de toluidina neutralizan la acción de la heparina.

En los tratamientos con heparina Von Kaula recomienda el uso de 4 mg. ó 400 unidades/kg., de una solución de heparina al 40% por vía subcutánea. Esta dosis es la empleada para controlar a un paciente por 24 horas y representa un método muy conveniente. Únicamente en casos de trombosis pulmonar muy seria se emplea la vía endovenosa.

La acción de la heparina es detectada por el tiempo de protrombina y por lo general se consigue un retraso de 30"; - que son los deseables y mejor por la tolerancia a la heparina.

DICUMAROL.

El dicumarol fué aislado del trébol dulce en 1941 por Campbell y Link; cuya fórmula:



Muchos otros compuestos de acción dicumarizante se han descubierto, entre los cuales se pueden citar a: cumarina, --tromexán; fenil hidantoína, warfarín sódico; etc. cuya acción es similar a la del dicumarol; variando el tiempo en que esta acción empieza a hacerse apreciable. Todos estos agentes se dan por vía oral y actúan in vivo; bloqueando la síntesis de la protrombina, de la proconvertina y el factor Stuart Prower en el hígado. Son de acción retardada ya que actúan después de 24-36 horas de su ingestión.

Así pues, tienen efecto amplio e incluso alterando más o menos la fragilidad capilar.

El tratamiento cumarínico requiere el control del tiempo de protrombina; debiendo ser reducida la tasa de ésta para que la terapia anticoagulante sea eficaz; a valores correspondientes entre 20-30% de la protrombina normal.

Es de recomendarse sin embargo; el empleo de una prueba que mida globalmente la coagulación, pues con el tiempo de protrombina se aprecian exclusivamente los factores de la segunda fase, aún estando éstos deprimidos; si hay aumento de un factor de la primera fase; la globulina anti hemofílica; -- por ejemplo; la coagulación será normal o aumentada a pesar de la baja de protrombina.

MATERIAL Y METODOS.

TIEMPO DE PROTROMBINA.

Fundamento.- La prueba mide la cantidad de complejo protrombínico existente en el plasma cuando se hace reaccionar - dicho complejo con una cantidad conocida de tromboplastina y - cloruro de calcio.

Material.- a) Jeringas de 5 ml.

b) Aguja hipodérmica No. 20

c) Tubos de centrifuga de 5 ml.

d) Centrifuga.

e) Pipetas Pasteur

f) Pipetas de 0.2 ml.

g) Baño María

h) Cronómetro.

Reactivos.- a) Patrón de plasma normal.

b) Cloruro de calcio 0.02 N.

c) Oxalato de sodio 0.1 N.

d) Tromboplastina.

Método.- Por punción se toman 4.5 ml. de sangre, que se - vierten en un tubo de centrifuga que contiene 0.5 ml. de oxalato de sodio; inmediatamente se invierte el tubo varias veces.

Centrifugar a 2,500 r.p.m. durante 5 minutos y separar el plasma.

El tubo precalentado en Baño María a 37°C, agregar 0.1 ml. de tromboplastina activada; añadir 0.1 ml. de plasma; reposar a baño María 1' y agregar 0.1 ml. de cloruro de calcio previamente calentado a 37°C (el tubo que lo contiene está en el baño de - agua desde el inicio de la prueba). En el momento de añadir cloruro de calcio se marca el tiempo. El tubo se inclina repetidas veces sumergiéndolo cada tiempo dentro del baño María y el punto

final será cuando aparezcan los hilos de fibrina. Con el stand dar se siguen los mismos pasos substituyendo el plasma problema por el SNP. El tiempo resultante de protrombina puede convertirse en por ciento de protrombina activa, restando el valor standar y el del problema al factor 8.7 (factor determinado por Quick), con las diferencias se efectúa la división:

$$\frac{\text{Diferencia del Standar}}{\text{Diferencia del problema}} \times 100 = \% \text{ de protrombina activa}$$

NOTA: Esta prueba mide los siguientes factores:

- a) Factor II o protrombina.
- b) Factor V ó proacelerina.
- c) Factor VII ó proconvertina.
- d) Factor X ó Stuart-Prower.

ANTI TROMBINA III

FUNDAMENTO.- Esta determinación se basa, en el tiempo que toma la formación de un coágulo de Fibrinógeno al añadirle el suero que contiene cierta cantidad de trombina residual.

Esta reacción dependerá entonces de la cantidad existente de la trombina que ha quedado después de que ha actuado la anti trombina III.

MATERIAL.- a) Jeringas Siliconadas de 5 ml.

b) Tubos de 13 X 100

c) Papel parafilm

d) Tubos de 10 X 75 mm.

e) Centrífuga.

f) Pipetas Pasteur

g) Pipetas de 0.1 ml.

h) Pipetas de 0.2 ml.

i) Dos cronómetros.

REACTIVOS: a) Trombina trópica (Lab. Parke Davis) conteniendo 1000 U que son reconstituídas con 5 ml. de glicérol al 50%.

b) Amortiguador salino. Se mezcla una parte de amortiguador de barbital-acetato de sodio pH 7.4 y 4 partes de solución salina y se conservan 6 partes a la temperatura de 40°C.

c) Fibrinógeno bovino al 1% (Fibrinógeno bovino liofilizado que es reconstituido sin agitarse con una solución amortiguadora de pH 7.42 a la temperatura ambiente hasta obtener la solución al 1%; se agrega 1 mg. de BaSO_4 por ml. y se agita durante 5' y se congela; al momento de usarse se deshela a 37°C.

METODO.- Con jeringa siliconada, se extraen 5 ml. de sangre que se

vierten en un tubo de 13 X 100 mm.; se tapan con papel parafilm y se dejan a temperatura ambiente dos horas hasta que la sangre se ha coagulado completamente; se desprende el coágulo de la pared y se centrifuga a 1,500 r.p.m. durante 5'.

0.6 del sobrenadante se transfieren a un tubo de 13 X 100 y se ponen a 37°C. Inmediatamente 0.15 ml. de solución de trombina se soplan mezclándose en un tubo de Lusteroid con 0.15 ml. de amortiguador salino y se mantienen a temperatura ambiente. De esta mezcla, se soplan en el suero 0.15 ml. sumergiendo la pipeta—simultáneamente se marca el reloj.

Dos tubos de 10 X 75 mm se preparan con 0.1 ml. de fibrinógeno y se ponen en el baño. Exactamente 3' después de que se le añadió la solución de trombina al suero, se toman 0.2 ml. de la mezcla limpiando la pipeta y se sopla en la solución de fibrinógeno marcando un segundo reloj; se mide el tiempo de coagulación del fibrinógeno.

Se repite lo mismo a los 6'; el tubo se mueve lenta y regularmente de modo que la mezcla de suero y fibrinógeno sea homogénea.

El punto final es la coagulación completa del contenido del tubo, y en la mayoría de los casos dicho contenido se adhiere a las paredes del tubo y no se mueve más. El coágulo tiene una apariencia de gelatina transparente.

El tubo tomado a los 6', da una separación más clara entre lo normal y lo patológico.

Blanco.— Reemplazando la mezcla de trombina y suero por solución de trombina en buffer salino, dará valores de 9 a 10".

Normalmente se obtiene la coagulación a los 20.1" en el tubo de los 3' y a los 59.9" en el tubo de los 6'. Límites normales de variación de estas cifras no han sido establecidos aún.

TOLERANCIA A LA HEPARINA IN VITRO.

FUNDAMENTO.— La prueba se basa en que sangres con generación normal de trombina durante la coagulación, requieren cantidades determinadas de heparina para neutralizar dicha trombina; por lo que muestras normales al ser tratadas con cantidades adecuadas de heparina muestran un retardo moderado en la coagulación, en cambio si la sangre problema presenta por cualquier motivo una escasa formación de trombina, la misma cantidad de heparina produce retardos muy marcados en la coagulación.

MATERIAL.— a) Jeringas de 5 ml.

b) Aguja hipodérmica No. 20.

c) Tubos de centrífuga de 5 ml.

d) Centrífuga

e) Pipetas Pasteur

f) Tubos de 10 x 75 mm

g) Tubos de 13 x 100 mm

h) Pipetas de 10 divididas en 1/10 ml.

i) Pipetas de 1 divididas en 1/100 ml.

j) Baño de María

k) Cronómetro.

REACTIVOS: a) Solución de oxalato de sodio 0.1 M.

b) solución de heparina (Lab. Abbott). Que se prepara 1 ml. de heparina en 100 de solución salina.

c) solución salina isotónica.

d) Cloruro de calcio 0.025 M.

METODO: El plasma restante de la prueba de protrombina, se puede emplear para la determinación de la tolerancia a la he -

parina.

Se colocan tres tubos de 10 X 75 en una gradilla y se agregan de la forma siguiente los reactivos:

	Tubo # 1	Tubo # 2	Tubo # 3
Solución de heparina (IU/ml)	0.03	0.07	0.1 ml.
Solución salina isotónica	0.07	0.03	-----
Plasma oxalatado	0.5	0.5	0.5

CALENTAR A BAÑO MARIA A 37°C durante 1'.

Cloruro de calcio	0.5	0.5	0.5
-------------------	-----	-----	-----

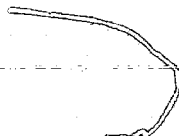
Se pone en marcha el cronómetro en el momento de agregar el cloruro de calcio, se mezclan los tubos y dejar en reposo en baño de María. Leer a los 4', 6' y 10' respectivamente los tubos 1, 2 y 3.

La lectura se hace inclinando el tubo y se considera como punto final cuando se forme un menisco sólido y no haya desplazamiento del líquido.

Los tiempos normales de la formación de coágulo son respectivamente 5', 7' y 12'.

Estos valores en estados de hipocoagulabilidad se encuentran aumentados y en estados de hipercoagulabilidad disminuidos.

RESULTADOS.



CASO #	NORMALES A LOS 3' (Tiempo en segundos)	NORMALES A LOS 6'
1	11	28
2	10	22
3	10	28
4	12	30
5	10	25
6	10	24
7	8	26
8	10	28
9	10	42
10	13	42
11	11	40
12	8	20
13	9	25
14	11	32
15	13	39
16	17	37
17	15	31
18	17	39
19	21	44
20	18	46
21	11	26
22	12	40
23	10	28
24	12	36
25	14	32
26	14	25
27	13	36
28	14	21
29	12	36
30	18	28
31	13	24
32	13	25
33	14	28
34	14	38
Media (M)	12.26	31.03
Desviación standar (σ)	3.05	7.34
Error (σ)	0.523	1.259
M ± 2σ	18.4	45.7
	6.2	16.4
Prueba de F _a	Experimental 5.72	5% 1.77
HETEROGÉNEO.		
Prueba de t _x	Experimental 3.42	5% 2.03
SIGNIFICATIVO.		

CASO #	WARFARIN SODICO	WARFARIN SODICO	TIEMPO DE PROTROMBINA	TOLERANCIA A LA HEPARINA		
	A LOS 3' (Tiempo en segundos)	A LOS 6'				
1	16	120	18	7'	10'	15'
2	11	180	20	8'	14'	19'
3	14	160	21	8'	14'	19'
4	16	153	26	7'	8'30"	18'
5	16	130	27	8'30"	16'	22'
6	17	177	27	7'30"	10'30"	18'30"
7	28	160	28	10'	14'	24'
8	29	106	28	6'30"	8'	17'
9	29	150	34	8'30"	8'30"	16'
10	27	180	34	6'	10'	16'
11	28	168	34	6'	8'	14'
12	15	90	37	4'30"	8'30"	14'
13	21	82	37	6'	8'	24'
14	35	180	37	8'30"	9'	14'30"
15	43	175	37	5'30"	9'	14'30"
16	30	169	41	6'30"	9'30"	17'
17	30	180	41	6'	7'30"	14'
18	15	100	41	7'	2'	15'
19	24	86	43	5'30"	9'	18'
20	14	143	46	7'	9'30"	16'
21	18	95	52	6'30"	9'30"	18'
22	13	145	52	7'30"	10'30"	17'
23	17	186	60	6'	9'	12'
24	35	180	60	6'30"	9'30"	14'30"
25	14	110	60	6'30"	10'	16'
Media (M)		21.28	141.53			
Desviación estándar (σ)		8.46	33.76			
Error (σ)		1.692	6.752			
N± 2σ		38.2	289.4			
		4.4	74.4			
Prueba de F: Experimental 18.78 3% 1.94						
HETEROGÉNEO						
Prueba de t: Experimental 4.13 3% 2.06						
SIGNIFICATIVO						

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Como hasta donde nosotros sabemos la prueba de la antitrombina III no se ha estudiado en nuestro medio, hemos comenzado - nuestro trabajo estableciendo las cifras normales, para lo cual, se estudiaron 34 casos que se resumen en el cuadro No. 3. De la observación de las dos columnas, podemos sacar las siguientes conclusiones: la acción de la antitrombina III es lenta y por lo tanto el tiempo que toma el tubo que marca la reacción a los 3' es siempre más corto que el que se observa en la segunda columna, es decir a los 6', ésto es tan notable que siendo la media de 12.26 para el primer tubo, la media para el segundo es de 31.05. Lo anterior nos explica el porque Von Kaulle concede mucho más importancia al resultado que se obtiene en el tubo de los 6'.

En cuanto a los resultado en sí, vemos que en el tubo de los 6' (tercera columna), las cifras obtenidas con una media de 31.05 están dentro de las cifras que Von Kaulle considera como normales, para los Estados Unidos, es decir, arriba de 20". Estas cifras son representativas ya que tenemos una σ de 7.34 con un error probable de 1.259 y una F experimental de 5.72, que al 5% resulta ser de 1.77, además de tener una t experimental de 3.42, que al 5% es de 2.03.

Las observaciones se hicieron según hemos visto, a los 3 y 6' pero nosotros nos vamos a referir sobre todo a la segunda cifra, ya que es la que en la clínica tiene mayor importancia.

Es importante recordar, que la antitrombina III es de acción lenta, y que actúa plenamente a los 6 minutos, de ahí que exista una diferencia entre los tubos de los 3 y los 6' en personas normales.

Respecto a las cifras extremas que se han obtenido, tenemos

en el segundo tubo 20" como tiempo mínimo y 46 como máximo. Las cifras inferiores quizá en ciertos casos; puedan indicar alguna hipercoagulabilidad ligera; pero dentro de los sujetos normales no encontramos un aumento marcado de antitrombina III que pudiera indicarnos una tendencia al sangrado. Es posible entonces que en sujetos que no presenten una tendencia hemorrágica clara, - esta prueba puede ser más útil para poner de manifiesto hipercoagulabilidades, más que hipocoagulabilidades. Desde luego, existiendo una franca hipocoagulabilidad, debida a insuficiencia de alguno de los factores de la coagulación que traiga consigo una formación deficiente de trombina, el tiempo en el segundo tubo - será prolongado. Es importante aclarar que en éstos sujetos normales, el tiempo de protrombina (normal 100%) así como la tolerancia a la heparina (normales 5' - 7' - 12') se encontraron dentro de los límites normales.

En lo que se refiere a los pacientes tratados con warfarin sódico se estudiaron 25 casos que se resumen en el cuadro No. 4. Vemos que en todos ellos hay una prolongación marcada del tiempo de la coagulación; muy notable en el segundo tubo; ya que las cifras del tubo de los 3' entran prácticamente todas; dentro de los límites normales que hemos mencionado para el 2o. tubo; aunque la media sea de 21.28; es decir; casi el doble de los sujetos normales.

En donde se observe una franca prolongación del tiempo de coagulación es en el segundo tubo, indicando que los depresores de la protrombina producen un aumento en la antitrombina III que, por la observación de los resultados de la 3a. columna, es decir; a los 6', se ve que son cifras muy representativas con una de 33.76; con un error de 6.75 y una F experimental de 15.70, que al 5% es de 1.94, además de tener una t experimental de 4.13, que con el 5% es de 2.06.

Para el control efectivo de los anticoagulantes que actúan como depresores de la protrombina, la prueba más importante es - indudablemente la tolerancia a la heparina in vitro, ya que nos mide la coagulación global, que es en último término el dato de mayor importancia, pues el fin del tratamiento es en realidad - producir una hipo-coagulabilidad.

Las cifras del tiempo de protrombina son en general paralelas con la tolerancia a la heparina, sin embargo, en ciertos casos como los marcados con los números 7 y 8 ; a un mismo tiempo-de protrombina corresponden cifras muy diferentes a la tolerancia a la heparina, indicando que en el caso # 7 debe haber una - baja de algún otro factor que prolonga la coagulación. Casos como éste son los que en la práctica dan hemorragias aún con cifras de protrombina que el clínico considera dentro del "margen de seguridad".

Entre el segundo tubo (Warfarin sódico a los 6') de la antitrombina III, el tiempo de protrombina y la tolerancia a la heparina existe un cierto paralelismo, ya que todos ellos se prolongan, pero no hay una relación absoluta, es decir, hay ciertos casos como el 13, 14, 19 y 21 en los cuales la protrombina se encuentra más baja, y aún no existe un aumento marcado en la antitrombina III; ésto es debido probablemente a que con los depresores de la protrombina, el aumento de la antitrombina III no es completamente simultáneo, sino que baja rápidamente la protrombina, y probablemente su rapidéz de recuperación sea a la inversa.

En todas formas, el aumento de la cantidad de antitrombina III constituye un mecanismo protector añadido que puede inclusive tener un efecto de la prolongación de la coagulación en el 3er. tubo de la prueba de la tolerancia a la heparina.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

— — — — —

Se hace un breve estudio sobre la coagulación; mencionando su mecanismo, y los factores que intervienen en la misma; hablan- do principalmente de la trombina y sobre todo de las antitrombinae I, II, III, IV, V, VI, estudiando sus características. Se mencio- nan algunos estados de hipocoagulabilidad, estudiando el fenómeno opuesto o sea la hipercoagulabilidad. Se estudian algunos mecanis- mos protectores como la fibrinolisis y se hace un breve estudio de los anticoagulantes.

Se describen en detalle el material y los métodos seguidos - en esta tesis.

Los resultados obtenidos son expresados en una tabla en la que se anotan 34 casos normales; para establecer los límites de- normalidad en nuestro medio y a continuación aparecen 25 casos de sujetos tratados con Warfarin sódico y a los que, además de anti- trombina III se les determinó el tiempo de protrombina y la tole- rancia a la heparina.

De la interpretación de dichos resultados podemos extraer - las siguientes conclusiones:

1.- La prueba de Von Kaula para determinar antitrombina III es fácil, precisa y segura al poner de manifiesto las variaciones de dicho anticoagulante.

2.- La lectura más útil en la clínica es la que corresponde al 2o. tubo (a los 6').

3.- En los pacientes tratados con Warfarin sódico hay un - franco retraso en la prueba de la antitrombina III; indicando que éste anticoagulante fisiológico aumenta cuantitativamente con di- cho tratamiento.

4.- El incremento de la antitrombina III en pacientes trata-

dos con depresores de la protrombina es en general paralelo - con la baja de la protrombina y la tolerancia a la heparina, aunque no enteramente simultáneas.

5.- El aumento de la antitrombina III constituye un mecanismo de protección añadido en los enfermos tratados con anti coagulantes depresores de la protrombina.

BIBLIOGRAFIA

— — — — —

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

- 1.- Arkin, H. y Colton, R.R.
Tables for statisticians.
2a. Edición, Edit. Barnes y Noble, New York, 1966.
- 2.- Bradford Hill.
Principios de Estadística Médica
3a. Edición, Edit. el Ateneo, México, 1965.
- 3.- Ciscar, R.F., y Farreres, V.
Diagnóstico hematológico..
Edit. Jims, Barcelona, 1964, Pag. 601, 714.
- 4.- Masura, R.
Les inhibiteurs normaux et pathologiques de la coagulation sanguine.
Edit. Arscia, S.A., París, 1960, Pag. 20 - 50
- 5.- Quick, A.J.
Hemorrhagic Diseases.
Edit. Lea and Febiger, Philadelphia, 1957.
- 6.- Seegers, W.H.
A modern theory of blood clotting.
J. Mich. M. Soc. ; 55, 272, 1956.
- 7.- Seegers, W.H.
Coagulation of the blood.
Harvey Lect., 47, 180, 1951-1952.
- 8.- Seegers, W.H.
Initiation of the blood coagulation mechanism.
Circ. Res., 4, 126, 1956.
- 9.- Stefanini, M. y Dameshark, W.
The hemorrhagic disorders.
Edit. Grune and Stratton, New York, 1955.
- 10.- Tocantins, L.M. y Kazal, L.A.
Blood coagulation, hemorrhage - Thrombosis.
Edit. Grune and Stratton, Inc. New York, 1964.
- 11.- Vélez Orozco, A.C. y Cañizares Proaño, C.
Prueba de tolerancia a la heparina "in vitro".
Bol. Inst. Est. Med. y Biol. Mex., 21, 541 - 555, 1963.
- 12.- Vélez Orozco, F.
Apuntes de Análisis Químico Clínicos.
3a. Edición, México, 1967, Pag. 42 - 62
- 13.- Von Kaulle, K.N. y Von Kaulle, E.
Antitrombins III and Diseases.
Am. J. Clin. Pathol, 48, 69 - 79. 1967.
- 14.- Von Kaulle, K.N.
Inhibidores patológicos de la coagulación
Hemorragias por anticoagulantes circulantes.

Uso Clínico del dicumarol y la heparina (control por el laboratorio).

Sistema fibrinolítico.

Conferencias sustentadas por el autor en el curso de -

"Avances Recientes en el Estudio de la Coagulación".

Instituto de Estudios Médicos y Biológicos, México, D.F.;

Feb. 19 de 1968.

15.- Von Kaulla; K.N.

New Instrumental study of clotting and fibrinolysis.

Fed. Proc., 12; 149; 1953.

16.- Von Kaulla; K.N. y Von Kaulla, E.

Spontaneous fluctuations of the coagulability of human blood.
in vivo.

Thomb. Diath; Haen; 5; 605; 1951.