

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE LA ADHESIVIDAD PLAQUETARIA
(IN VITRO), COMPARANDO LOS METODOS DE
HELLEM Y BORCHGREVINK MODIFICADOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ANDRES RAFAEL GRANIER MELO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Q. F. B. RAMON GUEVARA ESTRADA
VOCAL: Q. F. B. OSCAR AMOR DODERO
SECRETARIO: Q. F. B. DEA CORONADO PERDOMO
1er. SUPLENTE: Q. F. B. ELVIRA BETANCOURT
2do. SUPLENTE: Q. F. B. MARIA ELENA BUSTAMENTE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

HEMATOLOGIA Y BANCO DE SANGRE DEL C. H.

20 DE NOVIEMBRE

SUSTENTANTE: ANDRES RAFAEL GRANIER MELO

ASESOR DEL TEMA: Q. F. B. DEA CORONADO PERDOMO

SUPERVISOR TECNICO: DR. JORGE HUGO SILVA CAZARES.

A LA MEMORIA DE MIS PADRES.

A MIS HERMANOS

A MIS TIOS:

LIC. ANDRES MELO ABARRATEGUI, y

ELDA CAÑALS DE MELO.

Al Dr. Jorge Hugo Silva Cázares.

por su valiosa ayuda, para la
realización de este trabajo.

A la Profa. Dea Coronado Perdomo,
con mi agradecimiento.

A todos los que me ayudaron a llegar
hoy hasta aquí.

INDICE

	Página
I. - INTRODUCCION.	1
II. - GENERALIDADES.	5
III. - MATERIAL Y METODOS.	18
IV. - RESULTADOS.	34
V. - DISCUSION, RESUMEN Y CONCLUSIONES.	59
VI. - BIBLIOGRAFIA.	65

I. - INTRODUCCION.

IMPORTANCIA DE LA ADHESIVIDAD PLAQUETARIA.

La importancia de las plaquetas en el mecanismo de la hemostasis y en los fenómenos trombóticos es ahora bien conocida y los estudios de su comportamiento "in vitro" han revelado muchos fenómenos -- que están relacionados con aspectos de su función "in vivo", como son -- la función de la membrana como reservorio de sustancias, la acción de éstas en la formación del coágulo y la adhesividad plaquetaria (9).

En 1959 Hugues (8) demostró la importancia de la adhesividad plaquetaria en la formación de trombos cuando hay lesiones vasculares.

El mecanismo de la adhesividad plaquetaria a las paredes vasculares o a las superficies extrañas es pobremente entendido, y han sido propuestas las siguientes teorías:

1. - La adhesividad es debida a alteraciones de la carga eléctrica de la lesión íntima (Sawyer 1953).

2. - Las plaquetas son mecánicamente lesionadas por contacto con las superficies extrañas y sin embargo se adhieren (Loeb 1906).

3. - La adhesión es debida a la alteración (opsonización) de

la superficie íntima de la lesión. El papel de las plaquetas es pasiva e independiente de la viabilidad (Roskam 1922-3).

4. - La adhesión de las plaquetas depende de la acumulación de las redes de fibrina sobre su superficie (Wright 1945).

5. - La formación de trombina junto con algunos cofactores, realizan la adhesividad plaquetaria (Bounameaux 1957).

Estas hipótesis no pueden sin embargo, explicar porqué la adhesividad se presenta inmediatamente después de la lesión.

Actualmente sabemos que las plaquetas o trombocitos, por su adhesividad y porque liberan sustancias que favorecen la coagulación e influyen en la retracción del coágulo, desempeñan un papel muy importante en la realización de la hemostasia. Al adherirse las plaquetas al colágeno se originan cambios en su superficie, liberando sustancias de su interior como el ácido adenosin difosfórico (ADP) el cual favorece la aglutinación de las plaquetas y la liberación de serotonina, esta sustancia vasoconstrictora mantiene la contracción refleja de las fibras musculares lisas en la pared del vaso (18).

Se ha demostrado que no se requieren cationes divalentes para que las plaquetas se adhieran al tejido colágeno, pero la ausencia de éstos cationes retarda la liberación de los constituyentes plaquetarios, inducidos por este tejido.

El tratamiento del tejido colágeno con colagenosa altera sus -

características de modo que las plaquetas no se adhieren (19), pero el tratamiento con enzimas proteolíticas que remueven telopeptidos de los tejidos colágenos no lo hacen (13).

Es evidente el desacuerdo acerca de la adhesividad plaquetaria, probablemente porque los métodos para la investigación de la misma no han sido desarrollados lo suficiente para aclarar el mecanismo.

Debido a esto consideramos necesario emplear un método de fácil reproducibilidad a nivel de laboratorio que nos permita medir la adhesividad, por lo que decidimos modificar el método de Hellem.

1. - Simplificándolo, ya que como se observa en el capítulo III es un método complicado, que requiere mayor tiempo y una serie de aditamentos eléctricos para poder realizar las determinaciones. Estas fueron realizadas por el método de Hellem (in vitro) modificado por nosotros y comparadas con el método de Borchgrevink (in vivo) modificado. (17).

2. - Demostrar que el anticoagulante EDTA- Na_2 (sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético) a una concentración determinada no inhibe la adhesividad plaquetaria. El EDTA- Na_2 es un agente quelante del calcio, en soluciones neutras o alcalinas es un anticoagulante efectivo, pero como altera los factores plasmáticos, solo se puede usar en el estudio de la función plaquetaria (6).

Es bien sabido que los anticoagulantes divalentes no alteran la función de las plaquetas, ni la liberación de las sustancias contenidas den

tro de las mismas, por lo que consideramos que este sería el antioa--
gulante ideal para nuestro estudio.

II. - GENERALIDADES.

El papel de las plaquetas en la supresión de la hemorragia -- fue estudiado por Hayem (1881) y confirmado por Duke (1910); Further y Zucker (1947, 1949); Hugues (1953) y Roskam (1955) demostraron que la formación del tapón plaquetario es la clave para la realización de una hemostasia normal (2).

Las plaquetas cuyo diámetro medio oscila entre 2.5 a 5 micras, tienen una morfología mal definida, variable según su estado funcional.

En ocasiones se encuentran plaquetas más grandes generalmente cuando la regeneración sanguínea es activa, así se han encontrado plaquetas de 25 a 50 micras de longitud.

El microscopio óptico ha permitido diferenciar en una plaqueta tres zonas, (membrana, hialómero y granulómero), sobre cuya --- constitución el microscopio electrónico ha aportado datos complementarios de interés.

1.- Membrana doble, permeable a las secreciones del citoplasma.

2.- Hialómero ópticamente vacío en apariencia, pero que contiene vacuolas y proteínas con actividad específica (factores 2, 4 trom-

bostenina).

3. - Granulómero más central constituido por microestructuras comunes con otros citoplasmas y dos tipos de elementos redondeados:

a) Los gránulos α representan el sustrato de la actividad tromboplástica (factor 3 fosfolipídico).

b) Los gránulos β son mitocondrias que producen las enzimas celulares.

A estas tres regiones visibles de la célula hay que añadir una zona de actividad fisiológica ubicada en la periferia que corresponde a los factores plasmáticos de la coagulación y a otras sustancias adsorbidas en la cara externa de la membrana y que constituye "La atmósfera-plasmática periplaquetaria" (13).

ORIGEN DE LAS PLAQUETAS.

Por mucho tiempo se creyó que las plaquetas derivaban de:

1. - Plasma.
2. - Las capas endoteliales del vaso.
3. - Los eritrocitos y sus corpúsculos.
4. - Los leucocitos (del núcleo de los leucocitos degenerados, o de las granulaciones de los eosinófilos).
5. - Las células (reticuloendoteliales) de los gránulos linfá-

ticos.

6. - El Bazo.

7. - Los megariocitos de la médula ósea.

Esta última posibilidad es la aceptada.

Los megacariocitos (60 - 80 micras) son los elementos ma
duros de los megacarioblastos (célula germinal) (13).

Wright en 1906 (20) descubrió que las plaquetas son porcio-
nes desprendidas del citoplasma de los megacariocitos. Estas células -
se encuentran situadas de tal manera en la médula ósea en relación a -
los vasos sanguíneos, que pequeñas proyecciones o pseudópodos mode-
radamente grandes son fácilmente liberados y transportados a la circu-
lación.

Al estudiar el citoplasma de los megacariocitos se ha demos-
trado que tanto ésta como cada fragmento separado del mismo se revis-
ten de membrana celular.

Unicamente las plaquetas flanquean la barrera medular. No -
así los megacarioblastos ni los megacariocitos.

En estado normal se cuentan de 200,000 a 400,000 por milí-
metro cúbico en sangre periférica y se mantienen constante por un equi-
librio entre las actividades trombopoyéticas (ACTH, corticoides, facto-
res viscerales, nerviosos y humorales) y la acción frenadora del Bazo.
(13).

Estas cifras son muy superiores al mínimo requerido ----- (60,000 a 80,000 por milímetro cúbico) para asegurar una hemostasia satisfactoria, si los elementos formes son cualitativamente normales y no está comprometida la integridad de los otros factores que regulan la función hemostática.

Las plaquetas son destruidas por los macrófagos del tejido -- retículo histiocitario, en particular a nivel del bazo y pulmón, y acci-- dentalmente también cada vez que interviene un proceso hemostático.

FUNCION DE LAS PLAQUETAS.

Todos los estudios experimentales continúan destacando que las plaquetas ejercen un efecto muy complejo y fundamental sobre cada fase del proceso hemostático.

Como cuerpos viscosos taponan mecánicamente a través de la liberación de agentes químicos, cuando se adhieren, aglutinan y desintegran en el sitio de la herida vascular, provocando también vasoconstricción y tomando parte en el proceso de la coagulación de la sangre. Su función en la retracción del coágulo es bien conocida porque constituyen puntos de anclaje para las mallas de fibrina.

Fonio (5) ha sugerido que la retracción del coágulo es debida a un componente específico que ha sido aislado del hialómero de las plaquetas, con esto recordamos el concepto de Glanzman (15) que descubrió la existencia de una retractoenzima. Bioquímicamente las plaquetas tie-

nen aproximadamente un 60% de proteínas, 15% de lípidos, 8.5% de carbohidratos, además iones de Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} .

Tienen la propiedad de integrar en su citoplasma cierto número de componentes (agentes químicos, enzimáticos y coagulantes).

La siguiente lista de los componentes de las plaquetas ya sean intrínsecos, o adsorbidos reafirman el papel importante de éstos corpúsculos en la regulación de todas las fases del proceso hemostático (15).

ATP (ácido adenosin trifosfórico).

Adenina.

Hipoxantina.

Glucoproteínas.

Sulfato de condroitina que contiene mucopolisacaridos ácidos, mucopolsacáridos libres de ácido urónico.

Histamina.

Calcio.

Lípidos.

RNA (ácido ribonucléico).

Proteínas.

Carbohidratos.

AMINOACIDOS (en órden de concentración)

<u>Muy elevada</u>	<u>Elevada</u>	<u>Media</u>	<u>Baja</u>
Taurina	Fenilalanina	Glutacion	Tetrametil- cistina.
Acido aspártico	arginina	Ac. Glutamí- nico.	tirosina
	alanina	treonina	triptófano
	leucina	valina	ácido cistei- co.
	cisteina		serina.
	isoleucina		glicina

Fosfato ácido

Citocromos

Acido láctico

pigmentos carote-
noides.

Serotonina

Adrenalina.

ENZIMAS PRESENTES EN LAS PLAQUETAS HUMANAS.

I ESTEARASAS

Acetilcolinesterasa

Aliesterasa

fosfomonoesterasa

triacetina, tributirina esterasa

II FOSFATASAS.

Glicerofosfatasa ácida

nitrofenilfosfatasa ácida

fosfatasa ácida

pirofosfatasa ácida

adenilpirofosfatasa

fosfatasa alcalina

ATPasa

monofosfatasa

nucleotidasa

III DESHIDROGENASAS

deshidrogenasa láctica

6-fosfato deshidrogenasa

6-fosfogluconico deshidrogenasa

IV OXIDASAS

Citocromo oxidasa

DPNH oxidasa

- V TRANSAMINASAS
- transaminasa glutámico-oxalacética
- transaminasa glutámico-pirúvica
- VI PROTEASAS
- alanilglicinasa
- triptasa
- VII CARBOHIDRASAS
- amilasa
- hialuronidasa
- lisozima
- VIII AMINOACIDO DESCARBOXILASA
- L-histidina descarboxilasa
- IX SULFATASAS
- Arisulfatasa
- X GRUPOS DIVERSOS
- 5-aminonucleotidasa
- catalasa
- β_1 - glucoronidasa
- varias enzimas glucolíticas
- histaminasa

tirosinasa.

La existencia de estos componentes de las plaquetas se ha --
demostrado no sólo por la evidencia de sus funciones fisiológicas, sino
también por su parcial purificación en el laboratorio a partir de plaqueu
tas humanas lisadas.

Los resultados del fraccionamiento de las plaquetas y las obu
servaciones clínicas en caso de un déficit cualitativo plaquetario indica
que procesos tales como tiempo de hemorragia, la fragilidad capilar, -
la retracción del coágulo, la formación de tromboplastina incompleta y
completa y la aceleración de la formación de trombina y fibrina son re-
gulados total o parcialmente por los distintos factores plaquetarios.

FACTORES PROPIOS.

Se entiende por tales las sustancias químicas individualizadas por su actividad que son esencialmente de origen plaquetario que se liberan en el medio ambiente durante la metamorfosis viscosa o en forma artificial tras la lisis de las células.

Para diferenciarlos de los factores plasmáticos de la coagulación se designan con números arábigos.

El acelerador de la trombinoformación designado como número 1 ha sido identificado por Owren (1955) y otros autores como la acelerina del plasma, adsorbida a la superficie celular y por tal razón se ha retirado del grupo y añadido al de los factores prestados*.

Factor plaquetario 2. - Protídico, termostable, se localiza en el hialómero y se comporta como un acelerador de la fibrinoformación activando la polimerización de los monómeros de fibrina y favoreciendo la elaboración de las estructuras primarias (sinéresis).

Factor plaquetario 3. - Es el más importante de los factores plasmáticos dado que constituye una molécula esencial de la tromboplastina plasmática, de naturaleza lipídica (cefalina), tiene por sustrato los gránulos densos del cronómero (Fonio, Maupin).

* Factores prestados.- Se trata de proteínas biológicamente activas o de sustancias químicas no elaboradas por las plaquetas, pero que presentes en el plasma. se adhieren más o menos fuertemente a su superfi

cie. En ciertas condiciones de permeabilidad de la membrana, varios de estos productos pueden franquearla y penetrar en forma reversible en el interior del citoplasma.

ADHESIVIDAD PLAQUETARIA. -

Se define como la propiedad que tienen las plaquetas de adherirse a superficies sólidas, particularmente a la superficie de los vasos, siendo importante para la formación del coágulo.

Ha despertado gran interés el estudio y aplicación de las pruebas de adhesividad de las plaquetas en los trastornos trombóticos habiéndose descrito aumento de la adhesividad en trombosis venosa y embolismo pulmonar, enfermedad coronaria y diabetes mellitus, y después de esplenectomía. Por lo contrario, la adhesividad de las plaquetas disminuye después de la infusión de dextrano.

La adhesividad de plaquetas a las fibras colágenas se lleva a cabo en unos cuantos segundos debido probablemente a fuerzas electrostáticas no específicas de superficie, sabemos que cationes divalentes como el calcio, magnesio y adenosin difosfato favorecen la adhesividad (8), que contrariamente puede ser disminuída por sustancias medicamentosas entre ellas la cocaína, la quinina y otros antipalúdicos, Dipyridamol, aspirina, butaxolidina, etc.

Se ha sugerido que la adhesión también tiene lugar entre plaquetas y partículas orgánicas (levaduras, microbios, etc.), e inorgá-

nicas (sulfato de bario, cuarzo, etc.) (13).

Hellem (7) encontró en el Factor R que es una sustancia que se forma en el estroma del eritrocito se fija al plasma rico en plaquetas y aumenta la adhesividad plaquetaria, esta se ha demostrado que depende primordialmente de la liberación de ADP de las células rojas dañadas.

III. MATERIAL Y METODOS.

Con objeto de desarrollar nuestro trabajo en el laboratorio - en que se practicó, analizamos a personas que conjuntamos en diferentes grupos, con el fin de demostrar que nuestra modificación propuesta está en las mejores condiciones de metodología, en la siguiente forma:

- a) Estudio de 30 personas "Clínicamente sanas", para establecer valores normales.
- b) Estudio de 20 personas tratadas con diferentes dosis de dipiridanol. 7 personas que estaban recibiendo como medicamento anticoagulantes, 4 personas con Policitemia, 1 con anemia hemolítica, 1 con insuficiencia renal crónica.

Todas las determinaciones fueron realizadas por ambas modificaciones.

METODOS. -

1. - METODO DE HELLEM PARA DETERMINAR LA ADHESIVIDAD PLAQUETARIA (IN VITRO).

La determinación de la adhesividad plaquetaria se efectúa con sangre citrada; la sangre de una jeringa graduada se hace pasar a través

de una columna estandarizada de perlas de vidrio, a una velocidad constante, mediante un aparato eléctrico.

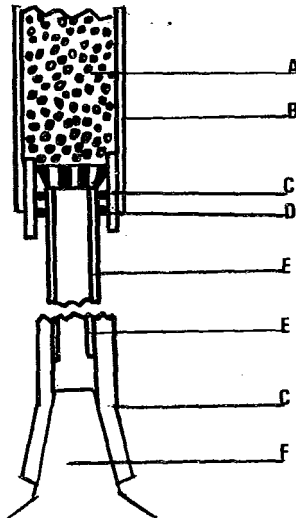
La reducción del número de plaquetas, después del paso a través de dicha columna, constituye un índice de la adhesividad plaquetaria. (7)

Material Biológico: Sangre venosa citratada.

Material Químico y Aparato. -

- a) citrato de Sodio.
- b) perlas de vidrio (Perlen Reflex).
- c) Columna de perlas de vidrio.

- A) Perlas de vidrio; B tubo de material plástico de 5 mm. - de diámetro; C) tubo de material plástico de 3 mm. de diámetro; D) Tela de Seda; E) tubo de plástico de 2 mm. de diámetro; F) cono de la jeringa.



REACTIVOS:

Sol.de citrato de Sodio al 3.8%

$C_6H_5Na_3O_7$ 3.8 g

H_2O c.b.p. 100 ml.

1 vol. para 9 vol. de sangre.

Motor de 220 v. a 50 w gira con una velocidad de 2900 rpm. que se reduce por medio de un sistema adecuado, a 20 rpm. A través de tres engranajes, se transmite el movimiento a un árbol sobre el cual está insertado un tornillo de conexión para el émbolo de la jeringa. Se coloca la jeringa en una acanaladura del aparato y se mantiene fija por medio de una lámina de plástico transparente. Un interruptor automático detiene el motor un instante antes de que la jeringa quede vacía; una manivela, que se maneja a mano, lleva el tornillo de conexión sobre el émbolo de la jeringa.

Columna.- Consiste un un tubo de plástico de cerca de 20 cm. de largo y de 5mm. de diámetro que se llena con 5 g. de perlas de vidrio, de 0.5 mm. de diámetro cada una, para dar una superficie total de $12,000 \text{ mm}^2$. En los dos extremos del tubo se coloca una tela de seda para sostener las perlas de vidrio; se aplica entonces un sistema de conexión constituido por otros dos tubos de material plástico, uno dentro del otro, uno de diámetro exterior de 3 mm. y el otro de 2 mm. de diámetro (como se muestra en la figura).

Tanto las jeringas como los tubos deben ser siliconados.

Se pasan 2 ml. de sangre citratada a través de la columna, a velocidad constante (tiempo de tránsito 26 ± 1 segundo), por medio del motor.

La sangre que emerge de la columna se toma con un tubo de -

plástico seco y se practica en la misma un recuento de plaquetas. La diferencia en el recuento antes y después de su paso a través de la columna, expresada como porcentaje del recuento inicial, será la medida de la adhesividad plaquetaria.

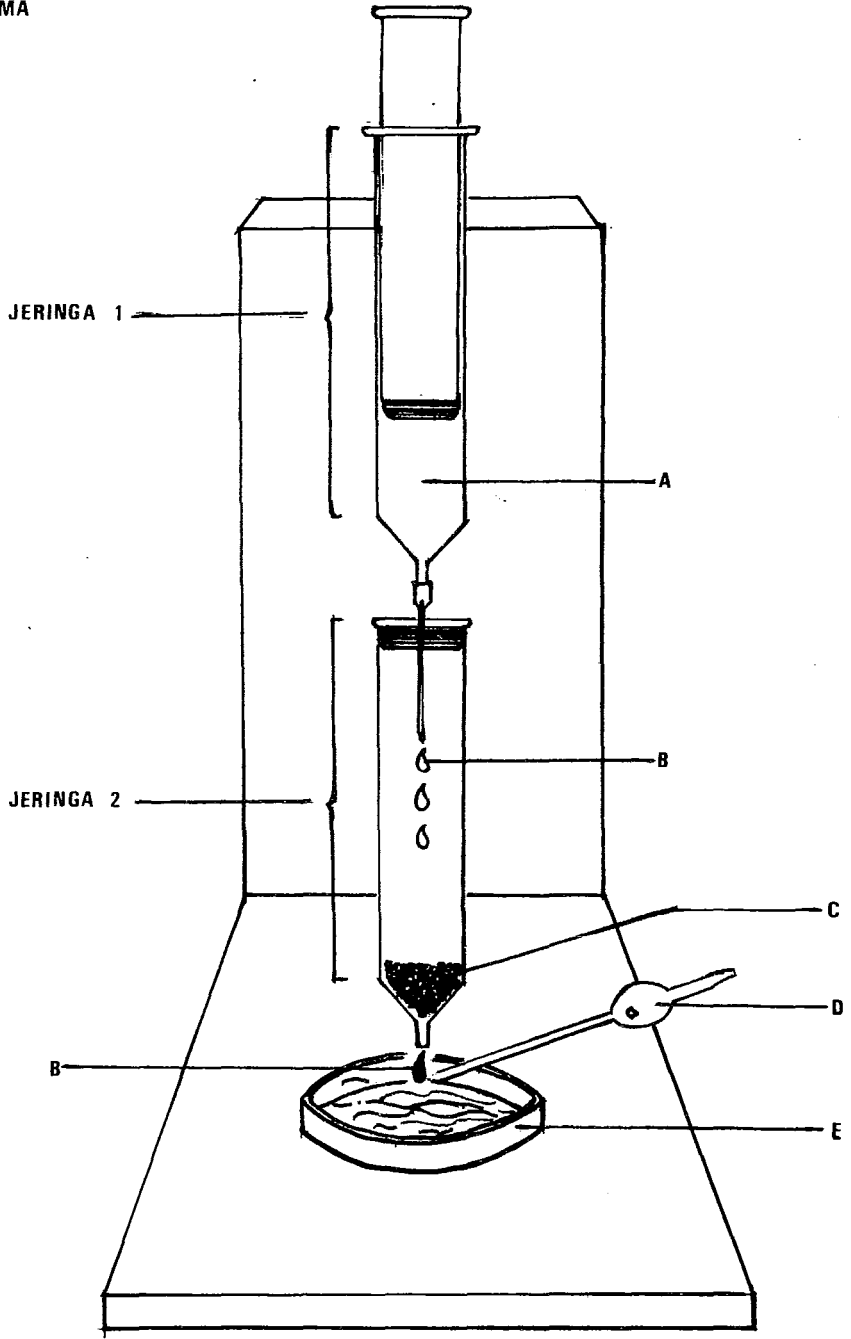
Valores Normales: 25 a 39%.

METODO DE HELLEM

MODIFICADO

- A SANGRE VENOSA CON EDTA- Na_2
- B GOTAS DE SANGRE
- C PERLAS DE VIDRIO
- D PIPETA DE GLOBULOS ROJOS
- E RECIPIENTE SILICONADO

ESQUEMA



2. - MODIFICACION AL METODO DE HELLEM REALIZADO POR NOSOTROS.

Se efectúa con sangre venosa conteniendo como anticoagulante EDTA-Na₂ al 10%.

La sangre colocada en la jeringa No. 1 se hace pasar a través de una columna de perlas de vidrio jeringa No. 2 (como se observa en el esquema).

La reducción del número de plaquetas en la primera gota obtenida después de haber pasado la columna de perlas de vidrio, se considera en relación con el número de plaquetas que no han atravesado la columna, y se obtiene el % de Adhesividad Plaquetaria.

MATERIAL QUIMICO. -

El estudio de la coagulación de la sangre se realiza casi siempre utilizando instrumental de vidrio siliconado es decir hidrorrepelente. En efecto, en la sangre que se recoge con instrumental de vidrio común, se verifican modificaciones estructurales de las plaquetas.

Las siliconas son compuestos sintéticos cuya estructura se caracteriza por un átomo de silicio unido a dos átomos de oxígeno y a dos de carbono, que pertenecen a dos radicales orgánicos. Las siliconas pueden ser de cadena directa o de cadena ramificada (en este caso constituyen las resinas). Son sustancias estables hidrorrepelentes, inertes. El proceso de siliconado se efectúa por medio de una solución comercial de

silicona o bien una solución formada por cuatro partes de éter de petróleo y una parte de silicona.

El instrumental de vidrio que se va a siliconar, debe ser previamente bien lavado y secado.

Siliconado de las pipetas de Glóbulos Rojos.

Las pipetas llenas con la solución de silicona, se sumergen en la misma solución; después de unos 10 minutos se retiran de la solución de silicona, se llenan con agua destilada y se dejan en ellas durante 30 minutos y después a 120°C durante 60 minutos.

Todo el material de vidrio debe ser lavado enseguida de haberse usado, después de lavar repetidamente con jabón y agua corrientes, y aún con agua destilada, se coloca el instrumental de vidrio durante algunas horas en una mezcla sulfocrómica y se lava sucesivamente -- varias veces con agua destilada, y se deja secar perfectamente en la estufa.

Los frascos y pipetas de glóbulos rojos siliconados, después de haber sido utilizados de una atres veces, antes de ser usados de nuevo deben ser desiliconadas, lavadas y vueltas a siliconar.

Para el desiliconado del instrumental de vidrio es suficiente - colocarlo durante 24 horas en la siguiente solución.

NaOH	150 g.
Agua destilada	2,000 ml.
Acetona	1,000 ml.

Primero se disuelven 150 g. de NaOH en 900 ml. de agua destilada, se agrega acetona (Tocantins). Esta solución es cáustica, por lo tanto se debe evitar su contacto con la piel. Durante el desiliconado no se deben dejar burbujas de aire dentro de las pipetas, lo que impedirá que el proceso se cumpla en forma total.

a) La Silicona: Fue preparada mezclando un Vol. de silicona (General Electric)* con nueve volúmenes de éter de petróleo.

b) Las perlas de vidrio fueron fabricadas con vidrio neutro - conteniendo los siguientes compuestos: (Perlen Reflex).

SiO ₂	74.72%
Al ₂ O ₃	5.72%
Fe ₂ O ₃	0.08%
CaO	0.326%
MgO	1.093%
Na ₂ O	6.822%
K ₂ O	0.926%
B ₂ O ₃	9.77%

Las perlas de vidrio tienen un peso de 0.00035 g. cada una.

Diámetro de una perla = 0.5 mm. c/u

Radio de una perla = 0.25 mm. c/u

Area de una perla

$4 \times 3.1416 \times (0.25)^2$ 1 perla 0.00035 g.

La jeringa No. 2 es de la misma medida que la anterior, aquí es donde se coloca 1 g. de perlas de vidrio, en el fondo de la misma colocamos una malla de Nylon del mismo diámetro interno de la jeringa - para evitar que las perlas de vidrio caigan y disminuya la superficie de contacto.

En la parte superior de la jeringa dejamos el émbolo de la -- misma, que sirve como tapón en el cual se inserta una funda de Punzo - cat (Vizcarra) *, esto es lo que va a permitir la conexión con la jeringa No. 1 (como se muestra en el esquema del equipo).

4. - Se empieza a presionar el émbolo de la jeringa No. 1 de manera uniforme para controlar la presión y así las gotas se esparzan - uniformemente sobre las perlas de vidrio. Las gotas empiezan a atravesar la columna, el tiempo que tarda en pasar la primera gota hasta la - punta de la jeringa es de 2 minutos, esto es controlado por nosotros mediante el émbolo de la jeringa No. 1.

5. - Cuando la primera gota aparece en la punta de la jeringa cargamos de ésta una pipeta de glóbulos rojos de igual manera como se indicó en el paso No. 2 y se continúa el mismo procedimiento.

Con el número de plaquetas obtenidas en esta gota y relacio--nándolas al número obtenido en sangre venosa total se determina el nú--mero de plaquetas adheridas.

6. - Seguimos presionando el émbolo y así tomamos muestras

de las gotas No. 6 y 13 a los 4 y 6 minutos respectivamente por ser las gotas media y final, correspondientes a 1 ml. de sangre. Nuevamente - se continúa el procedimiento indicado en el paso No. 2.

* (marca conocida).

CALCULOS. -

El número de plaquetas obtenidas de la sangre venosa total se considera el 100%.

El número de plaquetas adheridas es igual a la diferencia entre la cuenta obtenida en sangre venosa total y plaquetas obtenidas en la primera gota, después del paso de la sangre a través de la columna de perlas de vidrio.

EJEMPLO

Plaquetas en sangre venosa total	338, 000 x mm ³
Plaquetas en la primera gota de sangre después de atravesar la columna de perlas de vidrio.	200, 000 x mm ³
Número de plaquetas adheridas	138, 000 x mm ³
% de plaquetas adheridas	41%

$$338, 000 \text{ _____ } 100\%$$

$$338 - 200 = 138, 000 \text{ _____ } X$$

$$X = 41\%$$

3.- METODO DE BORCHGREVINK MODIFICADO. (17)

Se hace una punción venosa y se realiza una cuenta de plaquetas en sangre venosa, se punciona la vena con aguja siliconada y se desechan los 2 o 3 primeros ml. de sangre.

Después se deposita la sangre en frasco siliconado sin anti-coagulantes.

En seguida se hace una dilución 1:100 con líquido de Ress Ecker en pipeta de glóbulos rojos, se agita durante 15 minutos se carga -- una cámara de Neubauer y se deja reposar 30' en ambiente húmedo, y se hace la cuenta en microscopio de contraste de fases.

También se hace la cuenta de plaquetas en sangre capilar obtenida de la yema del dedo.

En esta modificación se utilizó sangre venosa, sangre capilar primera gota y sangre capilar segunda gota encontrándose que el número de plaquetas de la primera gota no es diferente al de sangre venosa; mientras que en la segunda aparece disminuía por las plaquetas que se adhieren a los bordes de la punción, excepto en los casos donde no hay adhesividad así tenemos que:

Ejemplo:

Punción venosa	315,000 plaquetas X mm ³
Punción capilar 1a. gota	317,000 plaquetas X mm ³
Punción capilar 2a. gota	225,000 plaquetas X mm ³

Plaquetas adheridas 90,000 plaquetas X mm³

adhesividad _____ 29%

315 _____ 100%

315 - 225 = 90,000 _____ X

X = 29%

IV. RESULTADOS.

a) PRIMER GRUPO.

Se tomaron 30 personas consideradas "clínicamente sanas" - porque no tenían antecedentes familiares ni personales de sangrado, no estaban tomando medicamento que alterasen la función de las plaquetas o coagulación de la sangre, ni presentaban enfermedad intercurrente alguna.

Cuyos resultados observamos en la Tabla de Valores #1 y gráficas 1, 2; éstos están expresados como $n \times 10^3$.

n = número de plaquetas.

TABLA No. 1

Número	Sangre Venosa total	1a. gota - después de pasar la - columna.	% de Adhesi- vidad.	6a. gota -- después de pasar la -- columna	% de Adhesivi- dad.	13a. gota -- después de- pasar la --- columna.	% de Adhesivi- dad.
1	288	190	32	160	43	140	50
2	406	270	34	230	43	190	53
3	410	270	34	240	41	210	49
4	260	170	35	140	46	110	57
5	320	210	35	170	47	120	62
6	280	210	35	180	36	120	57
7	270	174	35	160	41	130	52
8	420	260	38	200	52	170	59
9	400	250	38	220	45	200	50
10	324	198	39	160	51	146	55
11	260	158	39	130	50	98	62
12	312	190	39	150	52	120	62
13	264	160	39	140	47	110	58
14	260	160	39	152	41	124	52
15	400	240	40	196	51	174	56
16	200	120	40	84	58	66	67
17	250	150	40	120	52	80	68
18	338	200	41	180	47	140	59
19	180	106	41	100	44	90	50
20	324	190	41	168	48	102	68
21	224	130	42	100	55	86	61
22	300	170	43	150	50	98	67
23	250	140	44	90	64	70	72
24	350	196	44	150	57	108	69
25	180	100	44	86	52	60	67
26	362	198	45	150	58	130	64
27	360	196	46	176	51	106	70
28	405	216	47	190	53	187	54
29	450	236	48	184	59	168	62
30	350	180	49	170	51	150	57

PLAQUETAS SANGRE VENOSA TOTAL



1a. GOTA DESPUES DE PASAR LA COLUMNA.



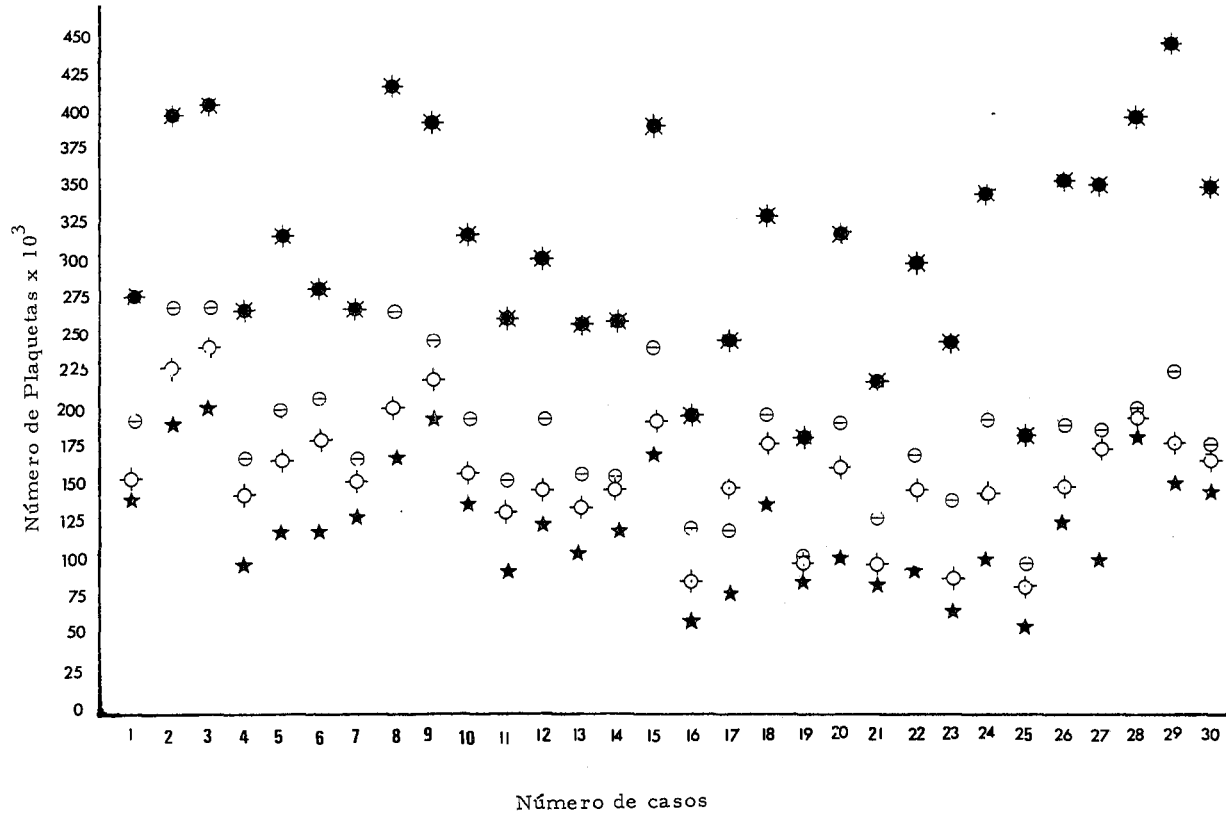
2a. GOTA DESPUES DE PSAR LA COLUMNA.



13a. GOTA DESPUES DE PASAR LA COLUMNA.

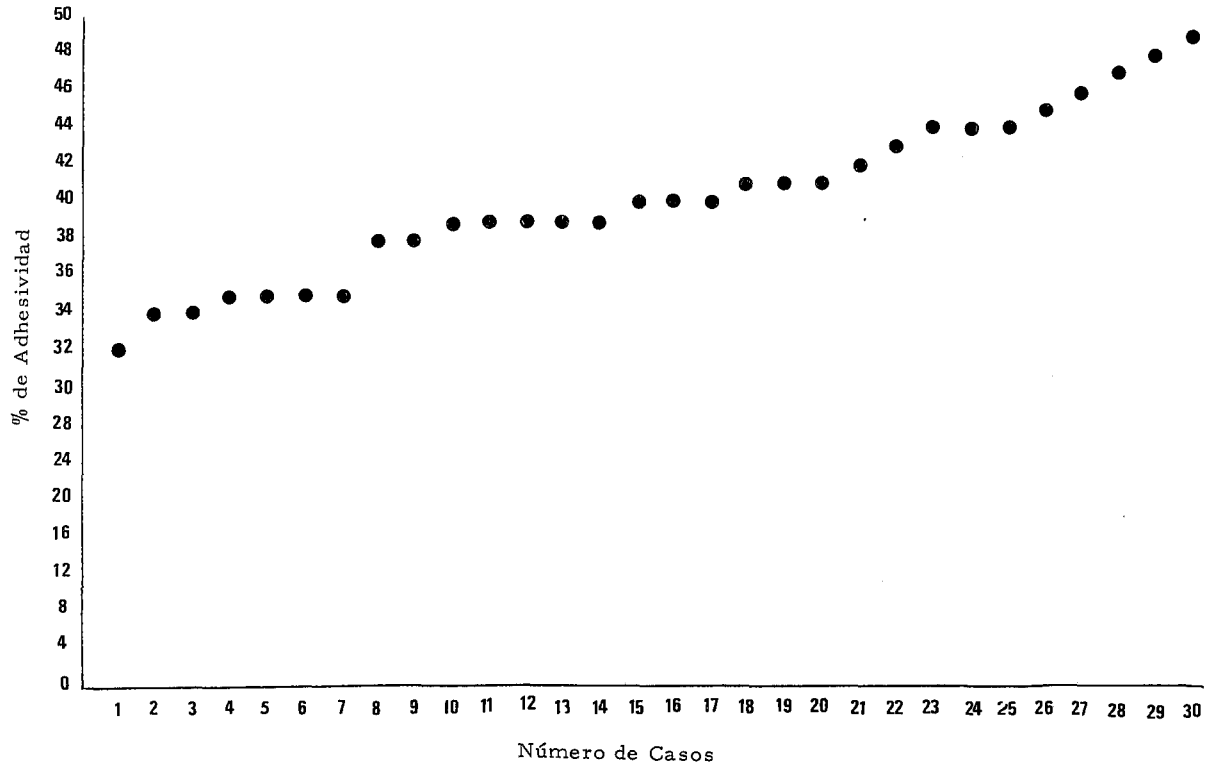


CASOS NORMALES



CASOS NORMALES

Gráfica No. 2



CALCULOS ESTADISTICOS

Observando los porcentajes obtenidos de la primera gota, --- consideramos como cifras normales de adhesividad plaquetaria de 32 a 49% por nuestra modificación.

Así tenemos para la primera gota:

$$\bar{x} \text{ (media aritmética) } = 40.2$$

$$\sigma \text{ (desviación estándar) } = 4.42$$

r (rango de aceptación)

$$a) \quad r = \bar{x} \pm \sigma$$

$$r_1 = 44.62\%$$

$$r_2 = 35.78\%$$

Si empleamos 2σ tenemos:

$$b) \quad r = \bar{x} \pm 2\sigma$$

$$r_1 = 49.04\%$$

$$r_2 = 31.36\%$$

6a. gota:

$$\bar{x} = 49.5$$

$$\sigma = 6.28$$

$$a) \quad r_1 = 55.78\%$$

$$r_2 = 43.22\%$$

$$\text{b) } r_1 = 62.06\%$$

$$r_2 = 36.94\%$$

13a. gota:

$$\bar{x} = 59.63$$

$$s = 6.78$$

$$\text{a) } r_1 = 66.41\%$$

$$r_2 = 52.85\%$$

$$\text{b) } r_1 = 73.19\%$$

$$r_2 = 46.07\%$$

b) SEGUNDO GRUPO.

Pacientes tratados con dipiridanol.

Los resultados para ambas modificaciones se observan en las tablas de valores #2 (para nuestro método) y #2' (para la modificación de Borchgrevink).

Born, Hounor y Mitchel utilizaron la adhesividad y la 2 cloro adenosina con el fin de prevenir o tratar la trombosis vascular humana, encontrando que la adenosina produce un marcado descenso de la presión arterial además de metabolizarse rápidamente por desaminación y que la 2-cloro adenosina se desintegra menos rápidamente pero causa inhibición respiratoria, por lo cual dedujeron que no son útiles en la clínica.

Bunag, en 1964 comprobó que el dipiridamol retarda "in vitro" la inactivación de la adenosina exógena y pensó en la posibilidad de emplearlo combinado a dosis menores de adenosina, al iniciar estos estudios el autor llegó al inesperado y sorprendente resultado de que el dipiridamol por sí mismo sin necesidad de añadir adenosina, inhibe la adhesividad plaquetaria producida por el ADP.

Es un hecho que el dipiridamol modifica el comportamiento de las plaquetas in vitro y acorta la duración de la oclusión vascular por trombo.

Los pacientes que respondieron con inhibición de la adhesividad de las plaquetas no presentaron modificación en ninguna de las otras

pruebas de tendencia hemorrágica, debido a la especificidad de acción del Dipyridamol.

* PERSANTIN (marca comercial).

El resto de los pacientes que no respondieron a la administración del dipyridamol son los que tienen el porcentaje más elevado de adhesividad plaquetaria, de donde se estima que la dosis usada quizás fue insuficiente, aunque ninguno de éstos presentó trombosis durante el transcurso del estudio.

El mecanismo por el cual el dipyridamol reduce la adhesividad plaquetaria es desconocido, pero es posible que al inhibir el transporte de adenosina a través de la membrana del eritrocito, ésta no sea catalizada por la adenosina - deaminasa, lo que permite su actividad de inhibir la adhesividad plaquetaria.

Al confirmarse la acción del dipyridamol sobre la adhesividad plaquetaria in vitro queda un campo muy amplio para su aplicación, ya que dicha acción puede ser más importante en la prevención de la enfermedad tromboembólica que la terapia anticoagulante convencional; hecho que obliga al investigador a obtener mayores experiencias con dicho fármaco en todos los padecimientos tromboembólicos.

TABLA No. 2

43

Número	Sangre Venosa Total	1a. gota des pués de pa-sar la co-lumna.	% de ad hesivi-dad.	6a. gota des pués de pa-sar la co-lumna.	% de ad hesivi-dad	13a. gota des pués de pa-sar la co-lumna.	% de ad hesivi-dad.
1	100	90	10	70	30	52	48
2	400	340	15	300	25	230	42
3	170	140	18	100	41	86	49
4	168	138	18	112	33	66	61
5	110	88	20	56	49	50	54
6	444	350	21	266	40	238	46
7	170	134	22	106	37	94	44
8	246	185	25	130	47	100	59
9	276	200	28	170	38	130	53
10	238	170	29	132	44	120	49
11	204	146	29	126	38	84	59
12	315	225	29	210	33	180	43
13	200	150	29	136	32	130	35
14	400	280	30	240	40	200	50
15	350	240	31	225	36	176	50
16	142	94	34	78	45	42	70
17	272	180	34	144	47	94	65
18	274	170	39	140	49	104	62
19	360	220	39	170	53	114	68
20	240	140	42	100	50	86	64

Teniendo:

1a. gota:

$$\bar{x} = 27.1$$

$$\sqrt{s} = 8.46$$

a) $r_1 = 35.55\%$

$r_2 = 18.64\%$

b) $r_1 = 44.02\%$

$r_2 = 11.0 \%$

6a. gota:

$$\bar{x} = 39.75$$

$$\sqrt{s} = 7.59$$

a) $r_1 = 47.34\%$

$r_2 = 32.16\%$

b) $r_1 = 54.93\%$

$r_2 = 24.57\%$

13a. gota:

$$\bar{x} = 53.55$$

$$\sqrt{s} = 9.29$$

a) $r_1 = 62.84\%$

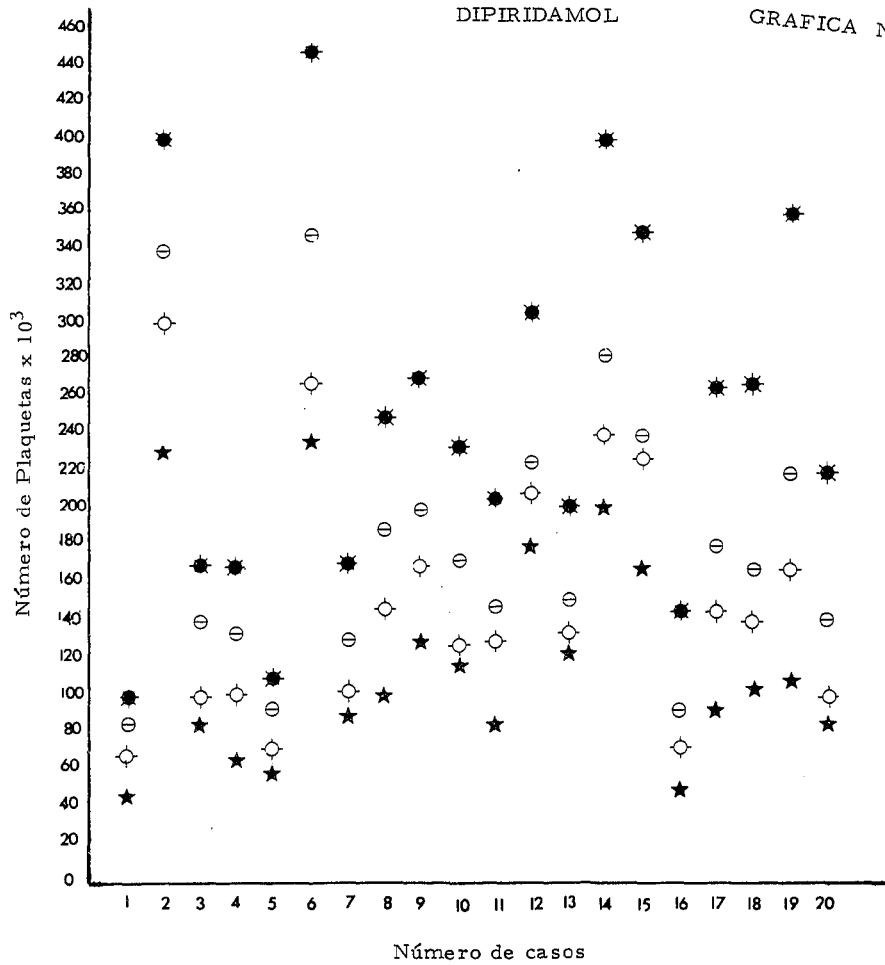
$r_2 = 44.26\%$

b) $r_1 = 72.13\%$

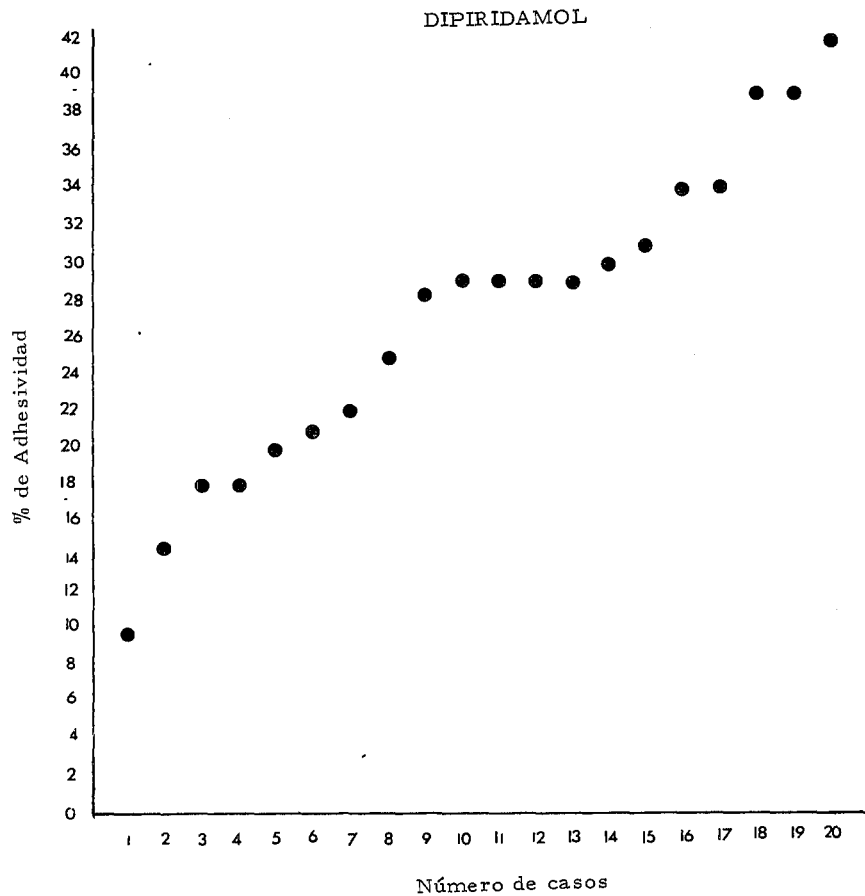
$r_2 = 34.97\%$

DIPIRIDAMOL

GRAFICA No. 3



GRAFICA No. 4



METODO DE BORCHGREVINK
MODIFICADO

PLAQUETAS SANGRE VENOSA TOTAL



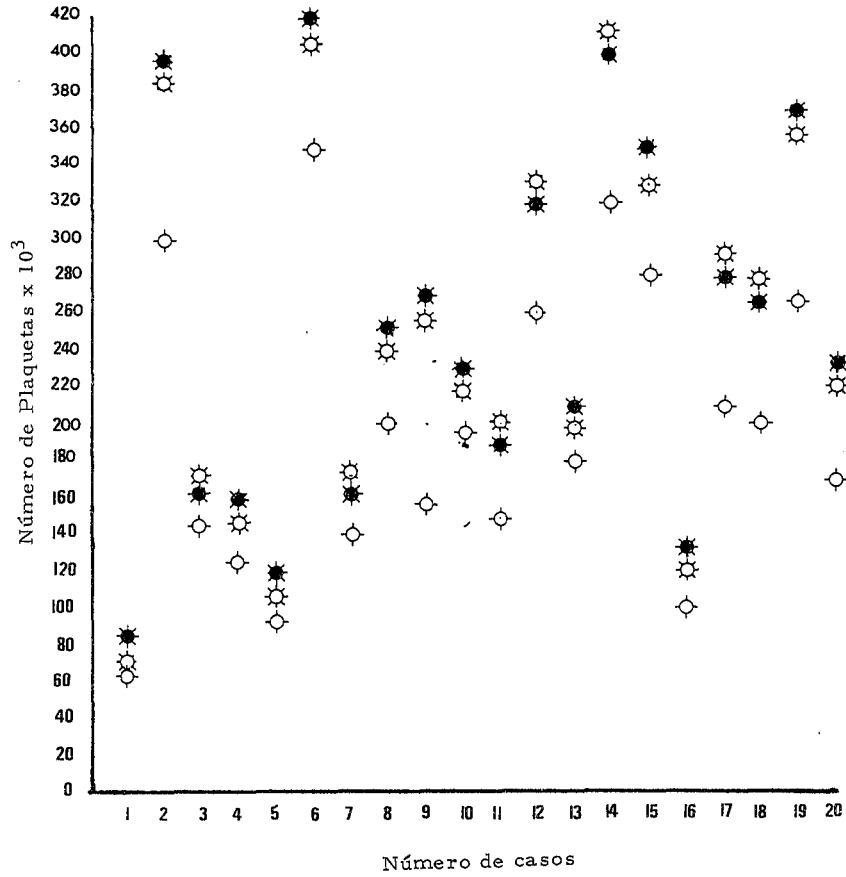
PLAQUETAS 1a GOTA CAPILAR



PLAQUETAS 2a GOTA CAPILAR



DIPIRIDAMOL



DIPIRIDAMOL

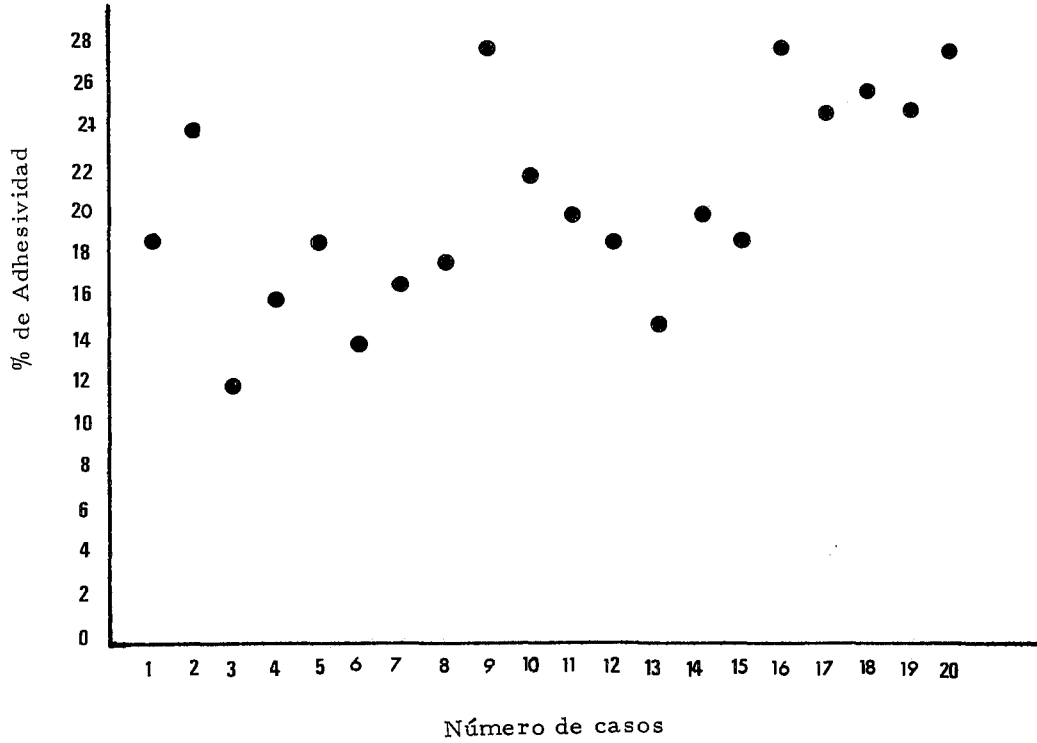


TABLA No. 2

NUMERO	VENOSA	MUESTRA DE SANGRE		No. DE PLAQUE TAS ADHERIDAS	% DE ADHE- SIVIDAD.
		1a. Gota C.	2a. Gota c.		
1	86,000	76,000	70,000	16,000	19
2	396,000	386,000	300,000	96,000	24
3	170,000	176,000	150,000	20,000	12
4	160,000	150,000	130,000	30,000	16
5	120,000	110,000	98,000	22,000	19
6	410,000	404,000	354,000	56,000	14
7	168,000	170,000	140,000	28,000	17
8	244,000	240,000	200,000	44,000	18
9	276,000	272,000	200,000	76,000	28
10	230,000	226,000	180,000	50,000	22
11	186,000	200,000	150,000	36,000	20
12	320,000	327,000	260,000	60,000	19
13	210,000	200,000	180,000	30,000	15
14	404,000	408,000	320,000	84,000	20
15	350,000	335,000	280,000	70,000	19
16	136,000	132,000	100,000	36,000	28
17	280,000	284,000	210,000	70,000	25
18	268,000	274,000	200,000	68,000	26
19	366,000	360,000	274,000	92,000	25
20	236,000	228,000	170,000	66,000	28

$$\bar{M} = 20.7$$

$$\sqrt{\quad} = 4.68$$

$$a) r_1 = 25.38\%$$

$$r_2 = 16.02\%$$

$$b) r_1 = 30.06\%$$

$$r_2 = 10.44\%$$

Se estudiaron pacientes que padecían diversas enfermedades y debido a esto estaban recibiendo diferentes tipos de medicamentos.

Los resultados obtenidos se observan en las tablas No. 3 y 3' ya que estos fueron procesados por ambas modificaciones, comprobando una vez más la efectividad de nuestra modificación.

Así tenemos que: (ver Tabla No. 3)

TABLA No. 3

Pacientes que estaban recibiendo como tratamiento Anticoagulantes							
Número	Sangre Venosa Total	1a. gota después de pasar la coagulumna.	% de adhesividad.	6a. gota después de pasar la coagulumna.	% de adhesividad.	13a. gota después de pasar la coagulumna.	% de adhesividad.
1	400	320	20	270	32	200	50
2	200	160	21	136	32	130	35
3	238	190	21	170	28	158	34
4	260	190	27	164	37	140	46
5	194	140	28	90	53	60	68
6	238	170	28	132	44	120	49
7	200	142	29	120	40	90	55

Teniendo:

1a. Gota

$$\bar{x} = 24.71$$

$$\sqrt{s} = 4.17$$

a) $r_1 = 28.88\%$

$$r_2 = 20.54\%$$

b) $r_1 = 32.51\%$

$$r_2 = 16.37\%$$

6a. Gota

$$\bar{x} = 38$$

$$\sqrt{s} = 8.54$$

a) $r_1 = 46.54\%$

$$r_2 = 16.37\%$$

b) $r_1 = 55.08\%$

$$r_2 = 20.92\%$$

13a. Gota

$$\bar{x} = 48.1$$

$$\sqrt{s} = 11.63$$

a) $r_1 = 59.73\%$

$$r_2 = 36.47\%$$

b) $r_1 = 78.34\%$

$$r_2 = 24.84\%$$

POLICITEMICOS

8	290	154	47	138	52	100	66
9	280	132	53	118	58	80	71
10	290	120	59	100	66	88	69
11	400	120	70	100	75	82	78

Teniendo:

1a. Gota

$$\bar{M} = 57.5$$

$$\sqrt{V} = 10.24$$

a) $r_1 = 67.74\%$

$r_2 = 47.26\%$

b) $r_1 = 77.9\%$

$r_2 = 37.1\%$

6a. Gota

$$\bar{M} = 62.7$$

$$\sqrt{V} = 9.98$$

a) $r_1 = 72.78\%$

$r_2 = 52.72\%$

b) $r_1 = 82.66\%$

$r_2 = 42.74\%$

13a. Gota

$$\bar{M} = 71$$

$$\sqrt{V} = 5.1$$

a) $r_1 = 76.1\%$

$r_2 = 65.9\%$

b) $r_1 = 81.2\%$

$r_2 = 60.8\%$

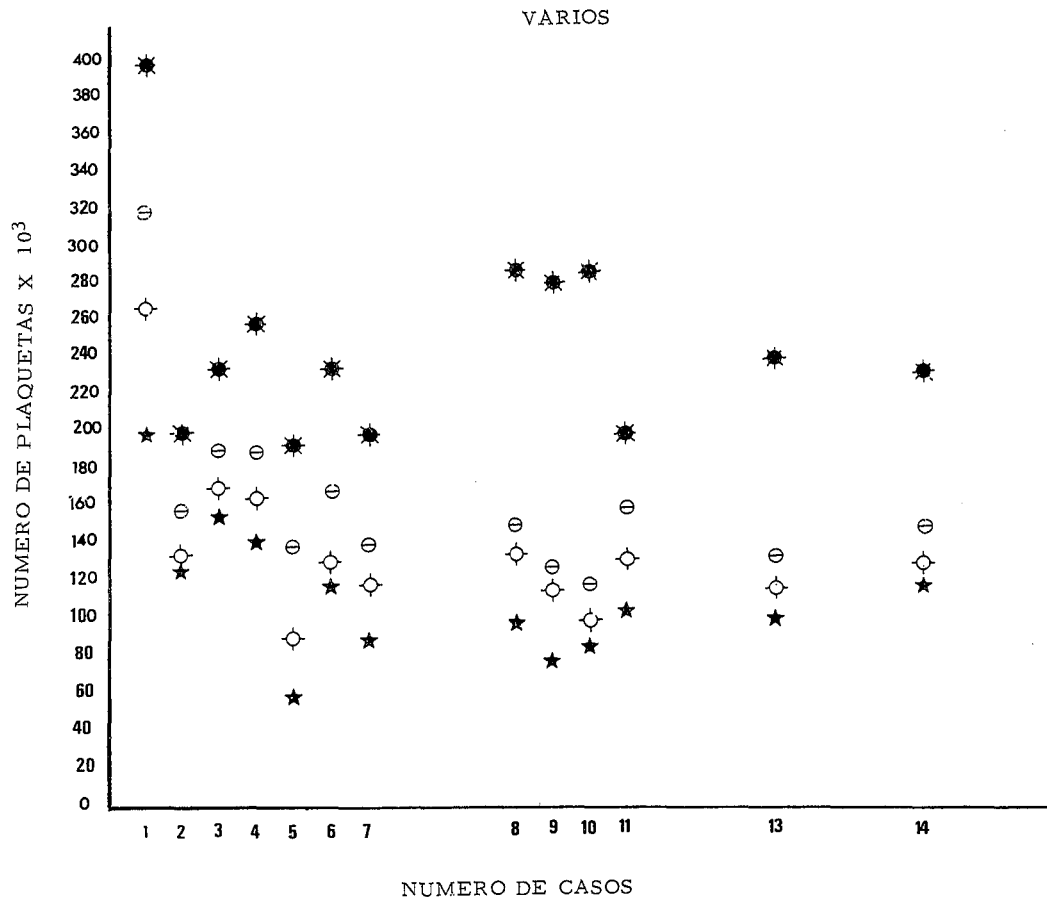
ANEMIA HEMOLITICA

12	240	136	43	120	50	100	58
----	-----	-----	----	-----	----	-----	----

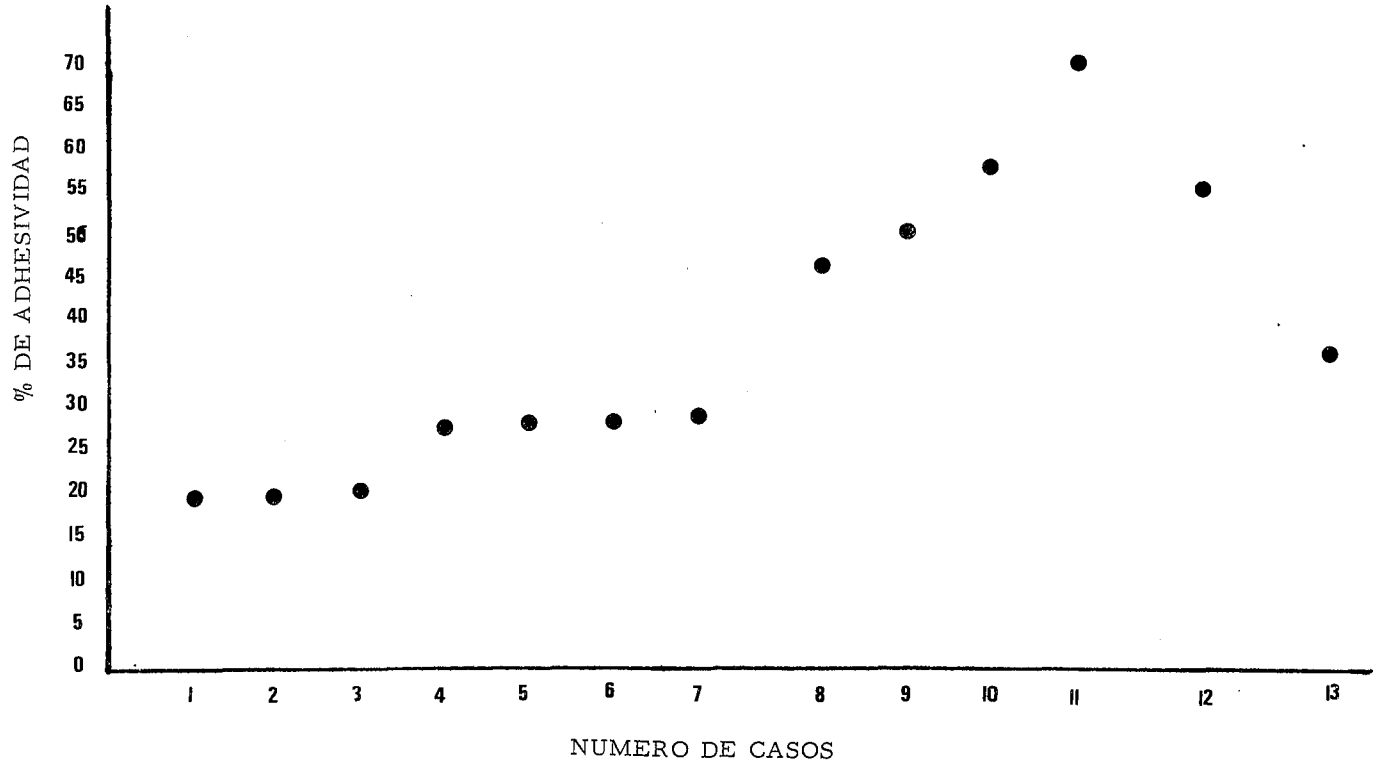
INSUFICIENCIA RENAL CRONICA

13	236	150	36	134	43	120	49
----	-----	-----	----	-----	----	-----	----

GRAFICA No. 7



VARIOS



METODO DE BORCHGREVINK MODIFICADO

Pacientes que están recibiendo como tratamiento anticoagulantes.

	Sangre Venosa Total	1a. gota capilar	2a. gota capilar	No. de pla- quetas ah- heridas.	% de ad- hesivi- dad.
1	380,000	374,000	350,000	30,000	8
2	210,000	200,000	193,000	15,000	8
3	220,000	224,000	184,000	56,000	17
4	260,000	258,000	200,000	60,000	24
5	190,000	198,000	150,000	40,000	22
6	250,000	230,000	200,000	50,000	20
7	198,000	204,000	150,000	48,000	24

$$\bar{M} = 17.57$$

$$\sqrt{\sigma} = 6.972$$

a) $r_1 = 24.54$

b) $r_1 = 31.51$

$r_2 = 10.60$

$r_2 = 3.63$

POLICITEMICOS

8	296,000	300,000	180,000	116,000	39
9	284,000	280,000	180,000	104,000	37
10	296,000	290,000	150,000	146,000	49
11	204,000	200,000	110,000	94,000	47

$$\bar{M} = 43$$

$$\sqrt{\sigma} = 5.887$$

a) $r_1 = 48.88$

b) $r_1 = 54.6$

$r_2 = 37.2$

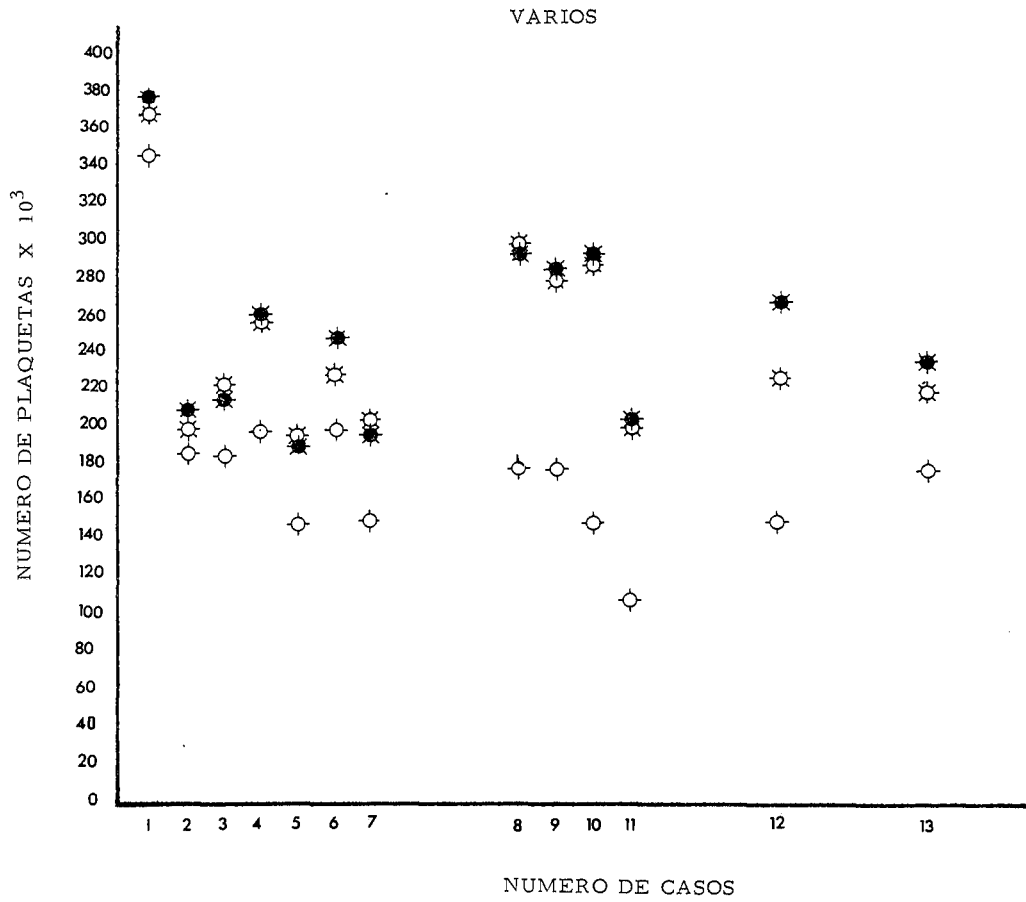
$r_2 = 31.4$

ANEMIA HEMOLITICA

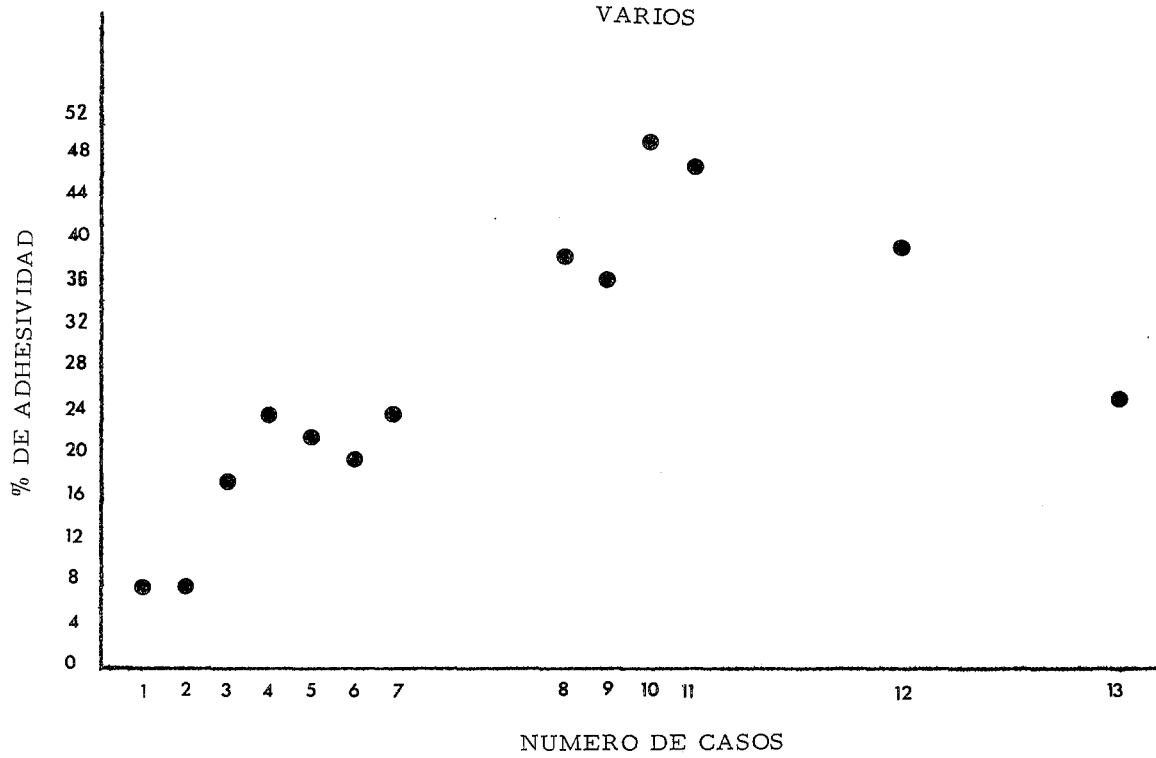
12	270,000	230,000	150,000	50,000	40
----	---------	---------	---------	--------	----

INSUFICIENCIA RENAL CRONICA

13	240,000	220,000	180,000	60,000	25
----	---------	---------	---------	--------	----



GRAFICA No. 10



V. DISCUSION, RESUMEN Y CONCLUSIONES.

DISCUSION.

Después de revisar la literatura sobre las técnicas de adhesividad plaquetaria "in vitro", nosotros decidimos modificar el método de Hellem, que como se observa es un método de difícil reproducibilidad por la complicación de su equipo ya que requiere de ciertos aparatos eléctricos de precisión para poder realizar la determinación, además el tiempo de duración de dicha prueba es mucho mayor que el empleado por nosotros.

Se comprobó que nuestro método es bastante sencillo y reproducible, además de económico ya que el material empleado, es barato y puede ser utilizado en determinaciones posteriores sin que ocurra alteración alguna que pueda interferir con los resultados de nuestra prueba.

Sucesivas determinaciones nos demostraron que empleado como anticoagulante EDTA-Na₂ al 15% la adhesividad plaquetaria era mínima, y al usar EDTA-Na₂ al 5 y 7.5% la adhesividad se encontraba aumentada o ocurría coagulación parcial de la sangre.

Por lo anterior, se realizaron determinaciones usando EDTA-Na₂ al 10% observando que el número de plaquetas en sangre venosa total, y plaquetas obtenidas en sangre conteniendo la concentración antes

mencionada, fueron semejantes, a pesar de haberse hecho la cuenta 2 - horas después de realizada la toma. Esto se puede observar en los valores contenidos en las tablas.

Se empleó 1 g. de perlas de vidrio y 1 ml. de sangre, pues son la parte proporcional a los empleados en el método original de Hellm.

Realizando el método de Borchgrevink modificado según la técnica reportada, se observa que se desechan los dos primeros ml. de sangre y a partir del tercero, se utiliza para determinar el número de plaquetas en sangre venosa total.

Al hacer los estudios previos para el desarrollo del presente trabajo comprobamos que el número de plaquetas en los dos primeros ml. de sangre era semejante al número encontrado en los mililitros siguientes, pues éstas variaciones no eran mayores a 10,000 plaquetas, y el número de plaquetas en sangre venosa colectada en recipiente siliconado, era semejante al número obtenido en recipiente siliconado y conteniendo una concentración determinada de EDTA-Na₂ al 10%.

Todas nuestras determinaciones fueron comparadas por el método de Borchgrevink modificado (in vivo) con el objeto de darle una mayor validez a nuestra modificación.

Es de hacer notar, que en todos los casos estudiados se observó que el % de adhesividad se encontraba aumentado o disminuído por am

bos métodos, según el padecimiento del paciente en estudio, comprobando de esta manera la eficacia de la Modificación al Método de Hellem.

RESUMEN.

En el capítulo I y II se revisan las funciones plaquetarias publicadas en la literatura, así como la composición química de las plaquetas.

De las funciones plaquetarias se puso especial cuidado en la función de la adhesividad.

Fue revisada la literatura publicada hasta la fecha principalmente a las determinaciones realizadas (in vitro).

Se describe una técnica para cuantificar la adhesividad plaquetaria, siendo ésta una técnica más sencilla y de fácil reproducibilidad -- que todas las usadas hasta ahora.

Esta técnica nos permite el estudio de diferentes grupos de pacientes con anormalidades plaquetarias, de ahí la enorme importancia -- que representa el estudio de la misma.

CONCLUSIONES.

- 1.- El Método para medir la adhesividad plaquetaria que proponemos - es: sencillo, reproducible y económico.
- 2.- Observamos que los valores obtenidos en la determinación del método propuesto es menor el rango de aceptación que con las gotas - 6a. y 13a. en $\bar{x} \pm \sigma$ y $\bar{x} \pm \sigma$
- 3.- Los valores obtenidos comparando la 1a. gota por nuestro método - con el de Borchgrevink, son mayores que este último, en todos los grupos estudiados.
Estos valores son los que más se acercan al de Borchgrevink, por lo que se debe tomar en todos los estudios el valor de la 1a. gota y no el de la 6a. ó 13a.
- 4.- Está al alcance de cualquier Laboratorio de Análisis Clínicos por su bajo costo y por el poco tiempo empleado, para hacer la prueba.
- 5.- Consideramos que estudios posteriores confirmaron los resultados de esta técnica ya que el estudio de la función de adhesividad de las plaquetas es de gran importancia en la Hemostosis.

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. - Becerra, G.A.; Silva, J.H., Ramos, H. Influencia del Dipiridamol en la adhesividad plaquetaria. Rev. Biol. Pat. S.H. Vol. 16, 1, -- 1961.
2. - Bizzozero, G. - Uber einer neuen Formbestandheil des Blutes and - Lessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung - Verchows Arch. Path. Anat. 90: 267-332. 1882.
3. - Borchgrevink F. A method for measuring Platetel adhesiveness in vivo. Acta Med. Scand 168:3; 1960.
4. - Born: Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets. J. Physiol., 162, 1967.
5. - Fonio A. Ueber die Wirkung des Hyalomers Thrombozyten and den - Retraktionsuorgang. Acta hemat. 8: 363 - 367. 1952.
6. - Gandolfo, G.M. Enfermedades hemorrágicas. - Diagnósticos de Laboratorio. Pág. 92-107 . 1973 Editorial Panamericana.
7. - Hellem, A.J. The adhesiveness of human blood platetel in vitro. -- Scand, J. Clin. Lab. Invest. 12:51, 1960.
8. - Hugus, J. Aglutination precoce des plaquettes an cours de la formation du clou hemostatique thromb. Death Haem. 3:177, 1959.
9. - Marcus, A.J., Zucker, M.B. The Physiology of Blood Platelets. -- Grune & Stratton, Inc. New York, 1965.
10. - Mustard, J.F., Packham, M.A. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mc. Master University, Hamilton, Ontario and Department of Biochemistry, Faculty of Medicine. University of Toronto, Ontario, Canada. 1968.
11. - O'Brien. The Mechanism and Prevention of platelet adhesion and --- aggregation considered in retraction to arterial thrombosis. Blood - 24: 309-314. 1964.

- 12.- Platelets ad structure and Physical properties blod clots. Am. J. Physiol. 114: 709-715. 1936.
- 13.- Raby, C. Hemorragias y Trombosis. Página 18-22. 1968.
- 14.- Spaet, T.H. and Zucker, M.B. Mechanism of platelet plug formation and role of adenosine diphosphate. Am. J. Physiol. 106: 1267 1964.
- 15.- Stefanini M., Dameshek, W. Enfermedades Hemorrágicas. 2a. - Edición. Página 14-24. 1966.
- 16.- Thierry, J.P., Besses, M. Mecanism de la Plaquetogenesis. Etude "in vitro" par la microcenamatographic. Rev. hemat. 11: 162-174. 1956.
- 17.- Tiburcio Gallardo, M.A. Tesis profesional 1966. Universidad Moctonía. México, D.F.
- 18.- Zucker, M.B., and V. Borrelli. Platelet champing produced by - connective tissues suspensions and by collagen. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 109: 779. 1962.
- 19.- Zucker, M.B. ADP- and collagen induced platelet aggregation in vivo and in vitro thromb. Death Haemorrh. Suppl. 26: 173. 1967.
- 20.- Wintrobe. Clinical Hematology. Sixth edition. Pág. 295-311. 1968.

Esta Tesis se Imprimió en Agosto de 1973
empleando el sistema de reproducción Xerox-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 531 (Esq. Adolfo Prieto),
Tel. 523-21-05 Oficinas Mier y Pesado 349-A
Tel. 523-03-33 México 12, D. F.

