

R. 4.015



T.D.
C/24

FANULO CONSTANTINO BERMEJO

Servicio de Hematología del Hospital
Universitario de Sevilla.



FACTORES PLASMATICOS DE COAGULACION EN HIPERLIPEMIAS.

Trabajo realizado para optar al grado
de Doctor en Medicina y Cirugía por la
Facultad de Medicina de Sevilla.

SEVILLA

1976

CATEDRA DE PATOLOGIA MEDICA
FACULTAD DE MEDICINA
Prof. Dr. AZNAR REIG

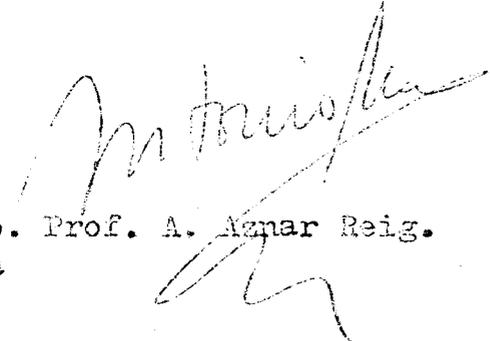
Avda. Dr. Fedriani s/n.
SEVILLA - 9



D. ANTONIO AZNAR REIG, CATEDRATICO NUMERARIO
DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICA, DE LA FACULTAD
DE MEDICINA DE SEVILLA;

CERTIFICA: que he asesorado y dirigido la redacción de
la presente Tesis Doctoral, cuyo título es -
"FACTORES PLASMATICOS DE COAGULACION EN HI-
PERLIPEMIAS", que ha sido realizada en la Fa-
cultad de Medicina "Albert Einstein College
of Medicine" de Nueva York, bajo la dirección
del Prof. Clarence Merskey.

Y para que conste a los efectos oportunos, -
firmo el presente certificado en Sevilla, a
nueve de Abril de mil novecientos setenta y
seis.


Edo. Prof. A. Aznar Reig.

ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE
YESHIVA UNIVERSITY

EASTCHESTER ROAD AND MORRIS PARK AVENUE
BRONX, N.Y. 10461

DEPARTMENT OF MEDICINE

August 5th 1975

Professor D. Antonio Aznar Reig,
Hospital Universitario,
La Macarena, Sevilla 9, Spain.

Dear Professor Aznar,

This letter is written at the request of Dr. Manuel Constantino who spent a year in my department and research laboratory at the above University and Medical School. During this time he did research into the relationship of blood coagulation factors and various types of human hyperlipoproteinemia.

He studied 115 patients and control subjects and measured the following parameters: Plasma fibrinogen, prothrombin (clotting and immunologic), factors V, VII, VIII, IX, X, fibrinogen -fibrin-related antigen in serum, plasma cholesterol and triglycerides. In addition he studied factor VIII-related antigen and the ristocetin co-factor in plasma. Ultracentrifugation of plasma was performed with separation of the lipoprotein fractions according to their relative density. These fractions were then analyzed for clotting content and lipoprotein content and varying proportions were added back to normal plasma and the effect on the clotting factor content determined. As a result of this study we have gained a better knowledge of the effect of the content of various plasma lipids on the coagulation process. Perhaps too of the relationship between the levels of blood clotting components and the hyperlipoproteinemias with some insight perhaps into the genesis of atheroma.

I have agreed to the presentation of this work by Dr. Constantino as a Doctoral Thesis since I feel that the quality of the work is of sufficiently high caliber for this purpose.

Sincerely yours,



Clarence Merskey, M.D.
Professor of Medicine.

A mis hijos.

Deseo expresar mi agradecimiento por sus contribuciones en este trabajo a:

Profesor CLARENCE MERSKEY, de Albert Einstein College of Medicine, quien dirigió, criticó y revisó todos los experimentos.

Profesor AZNAR REIG, de la Facultad de Medicina de Sevilla, quien dirigió la redacción y puesta a punto de este trabajo.

Profesor DAVID J. KUDZMA, de Albert Einstein College of Medicine(New York), por proporcionarme los enfermos hiperlipémicos y las facilidades de su Laboratorio para investigación de lípidos.

Profesor MARJORIE B. ZUCKER, de New York University, quien me proporcionó los medios y supervisó la determinación del factor VIII por radioinmunoensayo y del factor de Von Willebrand por el método de la ristocetina.

Ms. ESTELLE ELLIS, SANTOSH SWAIN, WILMA GRESTON y SOCK-JA KIM por experta asistencia técnica.

Srta M^a ANGELES FERNANDEZ de CODES, quien mecanografió los capítulos I, III, IV y V de esta Tesis.

CAPITULO I : INTRODUCCION. JUSTIFICACION
E HIPOTESIS DE TRABAJO.

CAPITULO II : MATERIAL Y METODOS.

CAPITULO III : RESULTADOS.

CAPITULO IV : DISCUSION.

CAPITULO V : CONCLUSIONES.

CAPITULO VI : BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

CAPITULO I

INTRODUCCION. JUSTIFICACION E HIPOTESIS DE TRABAJO

I MECANISMO DE HEMOSTASIA EN SERES HUMANOS

Los lípidos desempeñan un papel muy importante en la coagulación de la sangre, hecho bien conocido a partir de las observaciones pioneras realizadas ya en el siglo pasado (WOOLDRIDGE 1.883) (1).

Antes de entrar en el estudio de esos lípidos y de su mecanismo de acción vamos a dar un resumen del estado actual del conocimiento acerca de los mecanismos del proceso hemostático.

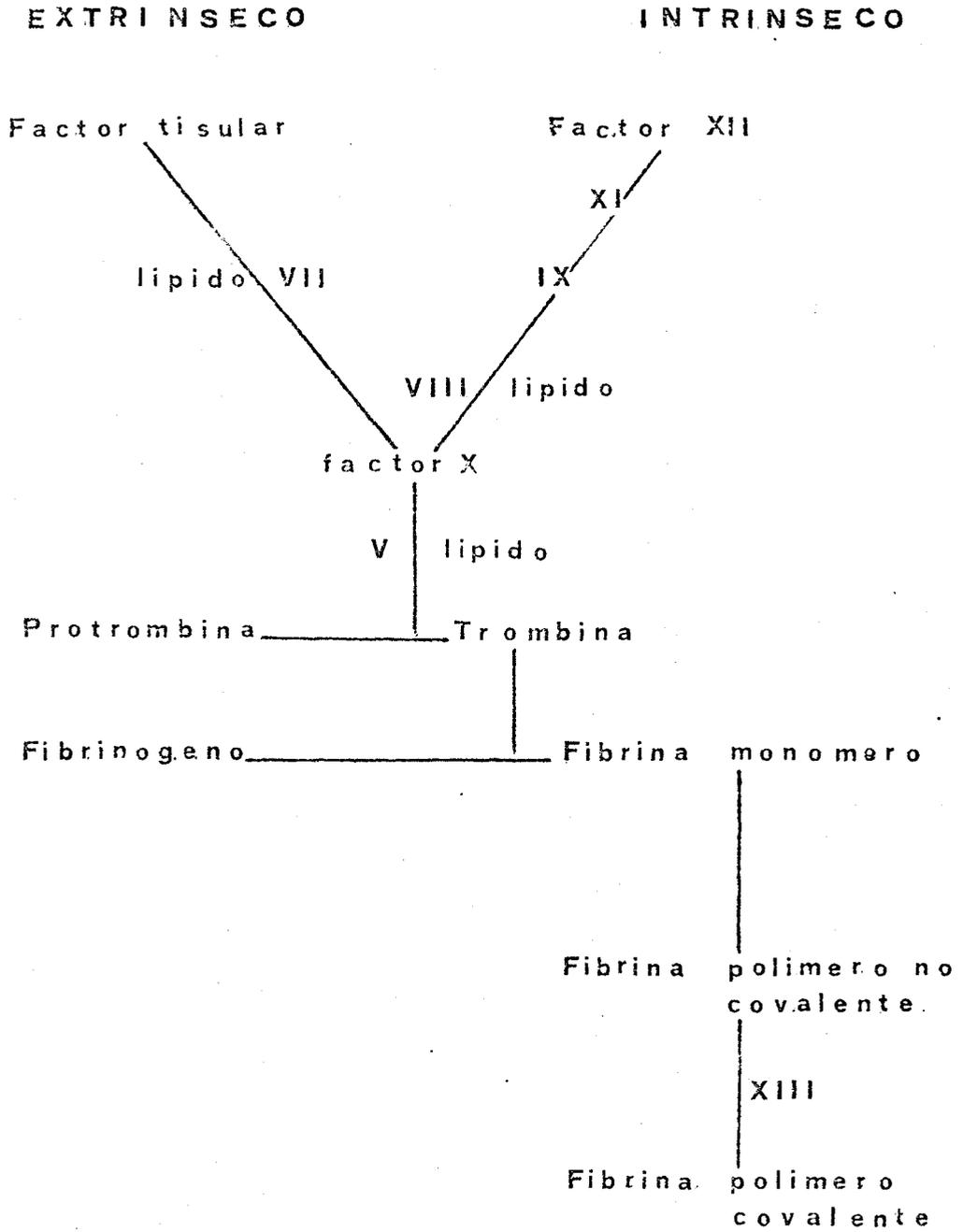
A) FASE VASCULAR Y PLAQUETARIA.- La respuesta más inmediata a una lesión vascular con extravasación de sangre es la constricción vascular la cual ocurre por mecanismos en su mayoría desconocidos.

El desencadenante que inicia las siguientes reacciones hemostáticas es la destrucción del endotelio vascular (ASHFORD et al. 1.967) (2) que pone en contacto la sangre circulante con los tejidos subendoteliales. Las plaquetas son inmediatamente atraídas al tejido colágeno subendotelial y se agregan irreversiblemente. Al ocurrir ésto ellas sufren un proceso de hinchazón con pérdida de la citoarquitectura externa visible y liberan componentes intracelulares incluyendo serotonina, epinefrina y fosfato de adenosina (ADP). Este ADP liberado va a ser el mediador para la acumulación de nuevas plaquetas las cuales responden al ADP en tres fases:

a) Primaria.- Cuando la concentración de ADP es baja (1×10^{-7} M), en que las plaquetas se hinchan, sus membranas se hacen pegajosas y en la presencia de fibrinógeno plasmático se adhieren entre sí formando un agregado que finalmente se dispersa.

b) Secundaria.- A concentraciones más altas de ADP

COAGULACION



Esquema 1

(2×10^{-6} M) las plaquetas no solo se hinchan y hacen adherentes sino que también liberan ADP de los propios depósitos intracelulares.

c) Propagación.- La tercera fase es la formación de un agregado de plaquetas que se propaga por sí mismo. Cuando las plaquetas se adhieren al colágeno subendotelial liberan ADP el cual causa la agregación de las plaquetas en la vecindad del lugar de la lesión vascular y a la vez liberan más ADP. Así pues ADP es el mediador químico y amplificador del estímulo inicial causado por la lesión vascular.

La formación de un tapón plaquetario en un vaso contraído es suficiente para crear una barrera temporal contra la pérdida de sangre. Sin embargo en pocas horas la constricción vascular cesa y las plaquetas tienden a disgregarse en la periferia del tapón hemostático. Por consiguiente puede decirse que aunque el mecanismo del tapón plaquetario es suficiente para iniciar la hemostasia, sin embargo no puede mantenerla.

B) FASE PLASMÁTICA.- Para convertir ese mecanismo temporal en definitivo se pone en marcha el proceso de coagulación de la sangre el cual según nuestro conocimiento actual puede ser esquematizado del modo representado en el esquema 1 (MAC FARLANE 1.964; MAC FARLANE, 1.966) (3, 4).

Como puede observarse el factor X ocupa una posición central en el esquema y su activación puede llevarse a cabo en dos modos distintos llamados mecanismos intrínseco y extrínseco.

MECANISMO INTRINSECO.- Se inicia con la activación del factor XII (Hageman) por superficies cargadas como por ejemplo vidrio. También " in vivo " el colágeno subendotelial activa el factor XII. La activación consiste en una alteración de la configuración de la molécula en que quedan expuestos sitios enzimáticos activos. (DAVIE et al., 1.964) (5).

Actuando como un enzima el factor XII activado ataca al factor XI convirtiéndolo en otro enzima el cual a su vez activa al factor IX.

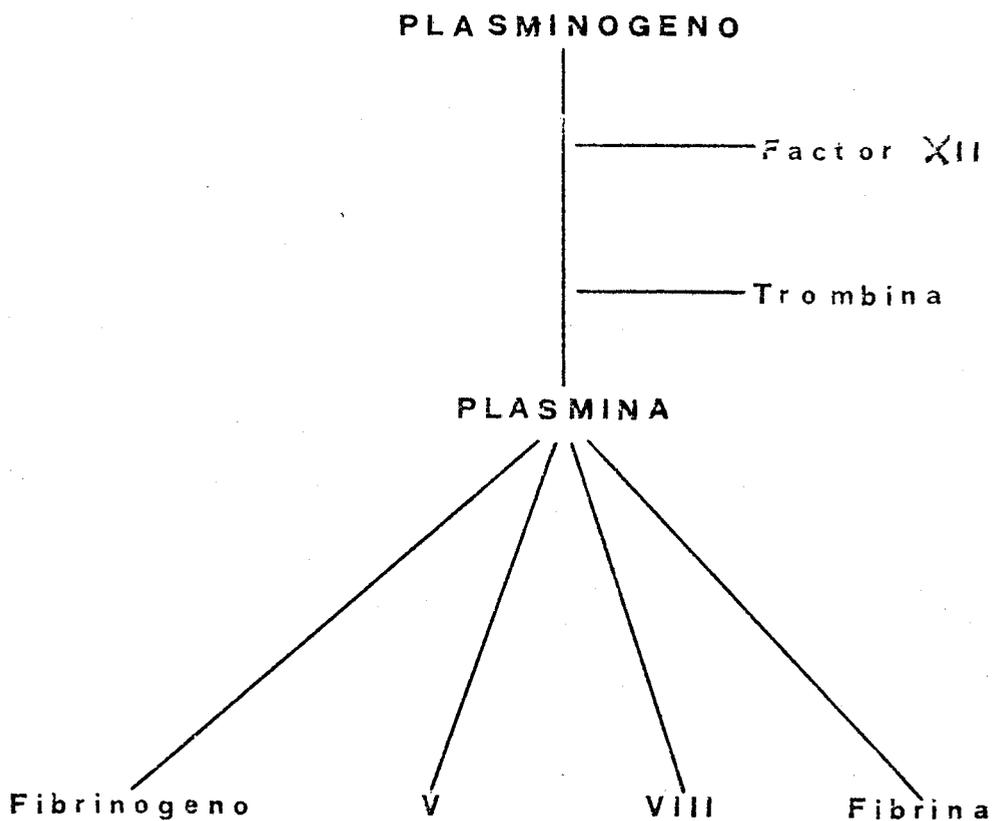
En contraste con la activación de todos los demás, la de los factores XII y XI no requiere calcio. El factor IX activado reacciona con el factor VIII para formar un complejo en la presencia de fosfolípidos derivados de las plaquetas. - Estos lípidos plaquetarios que actúan en las reacciones de - Coagulación son conocidos con el nombre de factor plaquetario III.

El complejo formado por el factor IX activado, fac - tor VIII y fosfolípidos plaquetarios va a producir la activa - ción del factor X a cuyo nivel los mecanismos intrínseco y ex - trínseco se unen.

MECANISMO EXTRINSECO .- (STRAUB, 1.961) (6). Aquí actúa la tromboplastina tisular la cual ha sido separada en dos componentes: uno es un enzima proteolítico localizado en la fracción microsómica de las células; el otro es un fosfo - lípido. El conjunto de ambos componentes forma un complejo con el factor VII el cual activa directamente al factor X sin la necesidad de la cooperación de los factores XII, XI, IX, VIII y plaquetas.

Una vez el factor X ha sido activado por cualquiera de los dos mecanismos, actúa sobre la protrombina y la convierte a trombina. Si el factor X activado actúa solo su acción es - muy lenta, pero cuando forma un complejo con el factor V y fos - folípidos plaquetarios, este complejo actúa sobre la protrom - bina y la conversión a trombina se efectúa con mucha mayor ra - pidez. La trombina entonces actúa sobre el fibrinógeno, una mo - lécula simétrica constituida por dos cadenas alpha, dos cade - nas beta y dos cadenas gamma unidas entre sí por puentes disul - fito (- S - S -). La trombina actúa sobre enlaces arginina - glicina en cada una de las cadenas alpha y beta separando dos péptidos A y dos péptidos B dejando el resto de la molécula -

FIBRINOLISIS



Esquema 2

que es denominado " monómero de fibrina ".

Estos monómeros de fibrina tienden a polimerizar espontáneamente como resultado de la formación de enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos los cuales son fácilmente rotos por urea, concentraciones salinas elevadas y pH extremo.

El frágil polímero de fibrina formado por enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos es convertido en un polímero de fibrina firme constituido por enlaces covalentes gracias a la acción enzimática del factor XIII activado el cual existe en el plasma como un precursor inactivo y es convertido a la forma activa por la acción de la trombina.

Esta fibrina forma una red que engloba el tapón plaquetario constituyéndose así una barrera estructural definitiva contra la pérdida de sangre.

C) SISTEMA FIBRINOLITICO.- (SHERRY et al. 1.959; SHERRY 1.968; SHERRY, 1.972) (7, 8, 9). Una vez la fibrina ha cumplido su misión como estructura de soporte para la reparación del daño tisular, ha de ser lisada lo cual se hace a través del sistema fibrinolítico (véase esquema 2), aunque una acción similar es también llevada a cabo por catepsinas tisulares especialmente procedentes de neutrófilos.

Además de la lisis de fibrina producida en respuesta a una lesión tisular, el sistema fibrinolítico actuaría en caso en que no existe tal lesión, si es cierta la hipótesis de que un proceso lento de Coagulación está teniendo lugar continuamente en el organismo humano el cual está en equilibrio con una actividad también permanente del sistema fibrinolítico.

En cualquier caso este sistema es puesto en marcha - por la activación de un precursor inerte llamado Plasminógeno el cual está ampliamente distribuido en los tejidos, líquidos tisulares y en plasma circulante en el que alcanza una concentración de 0.1 - 0.2 mg. por c.c. La transformación a plasmi -

na, el enzima fibrinolítico activo, se hace por rotura de un enlace específico arginina - valina en la molécula de plasminógeno con separación de fragmentos solubles en ácido equivalentes al 25% de la molécula original. Los activadores del plasminógeno pueden ser encontrados: a) en tejidos (activador tisular) b) orina (uroquinasa) y c) en sangre (activador circulante), el cual puede originarse en las células endoteliales de los capilares y puede ser idéntico al activador tisular aunque ésto no está aún completamente establecido. Estudios de localización han mostrado que el activador está estrechamente relacionado con los endotelios y parece tratarse de un enzima procedente de los lisosomas. El activador tisular puede ser responsable de la fibrinólisis patológica observada en pacientes con ciertos tipos de daño tisular. La urokinasa procede del riñón donde probablemente se forma en las paredes de los vasa recta y otros vasos intrarrenales.

El plasminógeno puede ser activado también a través del mecanismo de coagulación por la acción de la trombina y del factor XII activado pero el significado fisiológico de este mecanismo no está claro.

La plasmina producida por la activación del plasminógeno es un enzima proteolítico que actúa rompiendo enlaces arginina - lisina en varias proteínas entre ellas fibrina, fibrinógeno y factores de coagulación V y VIII.

Es importante el hecho que la plasmina es rápidamente neutralizada en plasma por la acción de inhibidores y a pesar de ello una fibrinólisis puede estar ocurriendo a juzgar por la detección de productos de degradación de la fibrina. Para explicar esta paradoja ha sido postulado que cuando los activadores alcanzan niveles altos en plasma penetran en el coágulo y actúan sobre el plasminógeno absorbido en él. La alta concentración de plasmina dentro del coágulo no es neutralizada por inhibidores; así pues la fibrinólisis que ocurre en circunstancias fisiológicas parece tener lugar en la fase de gol representada por el coágulo, y no en la fase líquida plas

mática. Sin embargo en circunstancias patológicas la fibrinólisis sistémica en fase plasmática puede tener importancia.

II LIPIDOS Y COAGULACION

Vemos pues que los lípidos son importantes para ambos mecanismos intrínseco y extrínseco de la Coagulación y más concretamente actúan a los siguientes niveles:

1) En la activación del factor X por el factor tisular en la presencia del factor VII. Este lípido va incorporado en la tromboplastina tisular.

2) En la activación del factor X por el factor IX en la presencia del factor VIII. Aquí actúan fosfolípidos de origen plaquetario.

3) En la conversión de protrombina a trombina por el factor X activado en presencia del factor V. También aquí actúan lípidos de origen plaquetario.

A.- ORIGEN.- Normalmente las plaquetas son la fuente de esos lípidos pero otros posibles orígenes podrían ser el plasma, la membrana de los hematíes y los leucocitos pero estas probablemente no son importantes. No es suficiente para un lípido el estar presente en una mezcla sino que debe de estar en una forma que sea utilizable para coagulación. Se ha podido demostrar que los hematíes poseen material lipídico el cual puede ser hecho utilizable para Coagulación " in vitro " por destrucción física de esas células (SHINOWARA, 1.951; QUICK et al., 1.954) (10, 11). Sin embargo existe poca evidencia de que los lípidos de las células rojas son importantes para el proceso normal de coagulación puesto que éste pueda tener lugar con normalidad en su ausencia.

Tampoco se ha podido demostrar actividad coagulante de los lípidos de los leucocitos (SHINOWARA, 1961) (12).

En cuanto a las plaquetas, estas contienen un 14% de su peso seco de lípidos. Estos están integrados por un 76% de fosfolípidos, 20% de grasas neutras y 4% de lipoproteínas (MARCUS et al., 1.969) (13).

Los fosfolípidos están constituidos principalmente por lecitina (fosfatidil - colina), fosfatidil etanolamina y esfingomiélna y por cantidades menores de fosfatidil - serina, fosfatidil - inositol, lisolecitina, ácido fosfatídico y cardiolipina.

Las grasas neutras están constituidas por un 85% de colesterol libre y cantidades menores de tri, di, y monoglicéridos, ácidos grasos libres y ésteres de colesterol.

El factor III plaquetario, que desempeña un papel fundamental en el proceso de Coagulación es probablemente un componente lipoproteico de la membrana plaquetaria (MARCUS et al., 1.966) (14) el cual se hace susceptible a la acción de enzimas y cofactores de Coagulación siguiendo la agregación plaquetaria u otro tipo de trauma a las plaquetas (HOWELL, 1.935 ; SURGENOR et al., 1.961) (15, 16). El componente activo de esa lipoproteína es el fosfolípido el cual actúa como un catalizador de superficie. Los fosfolípidos de la membrana plaquetaria que han sido incriminados específicamente son la fosfatidil - serina y la fosfatidil - etanolamina (MARCUS et al. 1.962) (17).

En cuanto a los lípidos plasmáticos, en ayunas tenemos 450 a 750 mg. de lípido total por 100 c.c. de sangre de los cuales 150 a 300 mg% corresponden a fosfolípidos (MILLER 1.960) (18). Esta cantidad es más que suficiente para la generación de tromboplastina " in vitro ", pero sin embargo es dudoso que los lípidos del plasma por sí desempeñen papel alguno en el proceso de Coagulación normal in vivo.

Las plaquetas son los únicos elementos formes de la sangre capaces de sintetizar " de novo " ácidos grasos, lo

cual se hace a través de la vía del malonil - coenzima A (MAJERUS et al., 1.965; DEYKIN et al., 1.968) (19,20), - pués ni los hematíes maduros ni los leucocitos contienen el enzima acetil coenzimaA cocarboxilasa que es necesario para la síntesis a través de ese mecanismo (MAJERUS et al., 1967) (21). También las plaquetas poseen la capacidad de elongar las cadenas de ácidos grasos a través del sistema mitocondrial en el que fragmentos de dos átomos de carbono de acetil coenzimaA son añadidos a ácidos grasos de larga cadena preexistentes (DEYKIN et al., 1.968; HENNES et al., 1.966) (20, 22).

Un intercambio entre lecitina plaquetaria marcada con C₁₄ y ácidos grasos plasmáticos ha sido demostrado (DEIKIN et al., 1.968) (20) lo cual es importante al considerar la posible interrelación entre la composición de los lípidos plasmáticos y la de los lípidos plaquetarios, que dado el papel - que estos lípidos plaquetarios parecen tener en la fisiología de estos elementos formes, podrían condicionar su función en - el proceso de coagulación.

B.- LIPIDOS PLASMATICOS. HIPERLIPOPROTEINEMIAS.- A continuación exponemos un resumen del conocimiento actual sobre lípidos plasmáticos y su influencia en la enfermedad humana antes de revisar su posible relación con el proceso trombótico.

Durante los últimos 15 años ha habido un explosivo aumento en el conocimiento de los lípidos plasmáticos, su transporte y sus determinantes fisiológicos. Hiperlipemia es el signo común de un grupo heterogeneo que varían en sus manifestaciones clínicas, pronóstico y respuesta a la terapia. He aquí unas nociones básicas acerca de la fisiología del transporte - de lípidos en plasma:

Los lípidos plasmáticos colesterol, triglicéridos y fosfolípidos no circulan libremente en plasma sino unidos a proteínas que les confieren solubilidad y es en la forma de complejos de proteínas y lípidos o lipoproteínas el modo en que las grasas entran y salen del torrente circulatorio.

1) Lipoproteínas.- Las lipoproteínas son macromoléculas complejas que contienen lípidos, hidratos de carbono, y proteínas. Simplísticamente ellos pueden ser esquematizados como esferas con un núcleo central de lípido neutro, sobre todo ésteres de colesterol y triglicéridos, y una envuelta solubilizante constituida por proteínas y fosfolípidos. El enlace del lípido a la proteína es no covalente, lo suficientemente laxo como para permitir el fácil intercambio de lípidos entre las lipoproteínas del plasma y las tisulares y sin embargo también lo suficientemente firme como para permitir la separación del complejo lipoproteico por las diferentes técnicas físicoquímicas que aislan e identifican las lipoproteínas.

Normalmente cuatro familias de lipoproteínas pueden ser separadas en el plasma (FREDRICKSON et al, 1.967) (23). - Los medios de separación son fundamentalmente la electroforesis y la ultracentrifugación.

La ultracentrifugación separa moléculas de acuerdo con su densidad y distingue quilomicrones, VLDL o lipoproteínas de densidad muy baja, LDL o lipoproteínas de densidad baja y HDL o lipoproteínas de densidad alta.

La electroforesis separa las moléculas lipoproteicas de acuerdo con su carga relativa. En papel o un gel de agarosa podemos encontrar: una banda que no migra; una banda de migración beta; una banda de migración pre-beta y una banda de migración alpha.

Las partículas muy ricas en lípidos que no migran en electroforesis corresponden a los quilomicrones de ultracentrifugación; las lipoproteínas beta a las LDL; las pre-beta a las VLDL y las alpha a las HDL; cada familia de lipoproteínas tal y como son definidas por estos procedimientos contienen fosfolípidos, triglicéridos, colesterol y proteínas pero en proporciones diferentes.

Una discusión detallada de la estructura y función de las lipoproteínas plasmáticas ha sido objeto de varias revisiones (FREDRICKSON, 1.967; SCHUMAKER et al, 1.969 ; - LEVY et al. 1.972) (23, 24, 25), pero para resumir diremos que los quilomitrones son las más grandes y más ligeras (o menos densas) de las lipoproteínas. Por peso ellas contienen aproximadamente 80 - 95% de triglicéridos todos de origen exógeno; 2-7% de colesterol; 3-6% de fosfolípidos y 1-2% de proteínas. El plasma aparece turbio cuando los quilomicrones están presentes. Si el plasma es dejado a 4° durante 24 horas todos los quilomicrones flotan formando una capa superior en el tubo. Los quilomicrones son sintetizados normalmente en el intestino y sirven para transportar los triglicéridos de la dieta de intestino al plasma y de aquí a los tejidos en que van a ser utilizados. La presencia de quilomicrones en ayunas después de 12 a 14 horas de haber comido es anormal e indica una fisiología anómala en el procesamiento de los lípidos de la dieta.

Las lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL) son las próximas en orden decreciente de tamaño. En peso contienen 55 a 65% de triglicéridos los cuales son de origen endógeno - principalmente; 10 - 15% de colesterol; 15-20% de fosfolípidos y 5-10% de proteínas. Después de dejar el plasma a temperatura de 4° durante 16 horas la turbidez está distribuida - uniformemente por toda la muestra.

Este tipo de lipoproteína transporta triglicéridos - de origen hepático los cuales son sintetizados a partir de varios precursores tales como ácidos grasos e hidratos de carbono. Una pequeña cantidad de estas lipoproteínas puede estar normalmente presente en el plasma en ayunas. En ausencia de quilomicrones un aumento en VLDL suele estar directamente correlacionado con los niveles plasmáticos de triglicéridos.

Las lipoproteínas de densidad baja (LDL) por peso contienen aproximadamente 45% de calesterol; 22% de fosfolípidos; 10% de triglicéridos y 25% de proteínas. Probablemen-

te proceden en parte o totalmente del catabolismo de las lipoproteínas de densidad muy baja. Hasta ahora su función es desconocida; normalmente ellas transportan 50 a 75% del colesterol en ayunas. Incluso en altas concentraciones no producen turbidez en el plasma almacenado en frío.

Las lipoproteínas de densidad alta (HDL) son las más pequeñas de las especies de lipoproteínas y contienen 45 a 50% de proteínas; 30% de fosfolípidos y 20% de colesterol. Al igual que las LDL estas transportan muy poco triglicérido; su función no está clara. Son un constituyente normal del plasma en ayunas y no producen turbidez cuando presente en cantidades aumentadas.

El primer paso en la evaluación de un paciente con alta concentración de colesterol o triglicéridos es definir el tipo de hiperlipoproteinemia que lo está causando.

La determinación de la concentración de colesterol y triglicéridos en plasma seguido del estudio del fenotipo lipoprotéico por electroforesis y a veces del estudio por ultracentrifugación de las distintas fracciones ha llevado a la delineación de unos grupos o tipos a los cuales han podido ser adscritos diferentes complejos de signos y síntomas que les son característicos.

2) Hiperlipoproteinemias.- (LEVY et al. 1.972; - HAVEL, 1.971) (25, 26). Veamos ahora la nomenclatura y breve descripción de estos diferentes tipos de hiperlipoproteinemias.

a) TIPO I.- Caracterizado por la presencia de cantidades masivas de quilomicrones cuando el paciente está comiendo - una dieta normal y por la completa desaparición en pocos - dias cuando una dieta libre de grasas es instituida.

Estos pacientes son deficientes en el enzima lipasa de las lipoproteínas y presumiblemente por esta razón son in

capaces de aclarar los quilomicrones del plasma.

Estos enfermos frecuentemente han de ser hospitalizados debido a episodios de dolor abdominal secundario a Hepatoesplenomegalia, pancreatitis o ambos y durante estos episodios a veces se encuentran hipertriglicerinemias de hasta 15.000 mg. por 100 c.c.

La edad de las primeras manifestaciones de este trastorno metabólico suele ser la infancia y niñez. No existe ningún medicamento eficaz en el tratamiento de esta enfermedad.

b) TIPO II.- Puede adoptar una forma familiar y otra adquirida. La hiperbetalipoproteinemia familiar es heredada como un rasgo dominante y es caracterizada por una concentración elevada de LDL de composición normal. El específico defecto molecular o enzimático responsable de este trastorno no es conocido pero es posible que el catabolismo de la molécula proteica específica esté alterado.

Clínicamente el trastorno es detectado en el período neonatal o poco después como una hipercolesteronemia con ó sin incremento de los triglicéridos. Las lesiones típicas, los xantomas, no aparecen hasta después de la pubertad y característicamente afectan al tendón de Aquiles y los tendones plantares y también aunque de menor tamaño a los tendones extensores de las manos. Xantelasma, placas amarillas situadas alrededor de los párpados y cerca del ángulo interno del ojo y arco corneal no son lesiones específicas pues pueden ser vistas en individuos sin aparente anormalidad en sus lipoproteínas. La incidencia de enfermedad coronaria prematura está varias veces aumentada cuando son comparados a individuos control con lipoproteínas normales. Lo mismo sucede con la enfermedad oclusiva periférica de carácter arteriosclerótico cuya incidencia también está aumentada.

La hiperbetalipoproteinemia de carácter secundario aparece en hipotiroidismo, síndrome nefrótico, hipercortisismo adrenal y excesos dietéticos en individuos ingiriendo grandes cantidades de colesterol.

Según la cuantía de los triglicéridos que acompañan a los elevados niveles de colesterol la hiperbetalipoproteinemia se ha subdividido en dos tipos:

IIa, con elevado colesterol y triglicéridos normales

IIb, con elevados niveles de ambos, colesterol y triglicéridos.

Como tratamiento aparte del de la enfermedad causal si existe, es necesaria una dieta restringida en colesterol y grasas saturadas y rica en grasas poliinsaturadas para proporcionar una ingesta grasa de un 30 a 35% del total de calorías ingeridas.

Entre los medicamentos, colesteramina, substancia no absorbible que previene la reabsorción en el ileon de ácidos biliares es la más efectiva, pero otros como el ácido nicotínico en grandes dosis, estrógenos y D-tiroxina pueden ser usados.

c) TIPO III.- Probablemente heredado con carácter recesivo, se caracteriza por la acumulación de lipoproteínas beta anormales las cuales son similares a las betas en tamaño y características de ultracentrifugación pero difieren en composición. Su movilidad electroforética es también distinta, comprendiendo la región beta y extendiéndose a la prebeta.

Xantomas de localización en las palmas de las manos - y en los pliegues de los dedos de la mano son característicos pero xantomas tuberosos y lesiones tendinosas también pueden ocurrir.

Las manifestaciones clínicas raramente empiezan antes de la edad adulta y se traducen en la aparición de los citados xantomas cuando el paciente gana peso. Estas lesiones tienen un color amarillo naranja, localizadas en los surcos de las palmas de las manos y dedos.

Los xantomas tuberosos tienden a ser más pequeños y más numerosos que en la hiperbetalipoproteinemia y son a veces confluentes y rodeados por un halo eritematoso (tubero-eruptivo). Ocurre sobre todo en las rodillas, codos y zonas gluteas. Las lesiones tendinosas aparecen sobre todo en los extensores de las manos.

El diagnóstico se basa fundamentalmente en la electroforesis que muestra una banda ancha de lipoproteínas beta - con una lipoproteína alpha normal y en la ultracentrifugación del suero a su propia densidad para demostrar una lipoproteína beta flotante.

Como tratamiento la dieta es fundamental, la cual debe ser restringida en calorías en sujetos obesos y pobre en azúcares y colesterol. Si el paciente no se adhiere a la dieta o ésta no es suficientemente efectiva, Atromid S es la droga de elección. Con un tratamiento efectivo los niveles de lípidos en sangre bajan y los xantomas desaparecen, pero el efecto sobre lesiones arterioscleróticas ya establecidas no se conoce.

d) TIPO IV.- También conocido con el nombre de hiperlipemia endógena, es un cuadro patológico común, a veces de carácter familiar y que es caracterizado por la acumulación de VLDL de normal composición y movilidad electroforética, y por resistencia a la insulina, a veces acompañados por xantomas - eruptivos y pancreatitis recurrente.

La etiología y patogenia de este cuadro no son conocidas pero a podido ser demostrado un catabolismo anormal de la

VLDL así como una secreción aumentada de triglicéridos sintetizados en el hígado.

Por otra parte el hecho de que el nivel de triglicéridos esté relacionado a hiperinsulinismo y resistencia a la insulina, hace que este trastorno se considere íntimamente ligado a un metabolismo anormal de los hidratos de carbono.

La mayoría de estos pacientes son descubiertos - cuando se presentan con manifestaciones de enfermedad vascular oclusiva y se hacen investigaciones para buscar una enfermedad metabólica. La mayoría de estos pacientes son obesos y algunos de ellos tienen hiperglicemia en ayunas. Cuando la hiperlipidemia es severa xantomas eruptivos y pancreatitis pueden ocurrir.

El diagnóstico debe ser sospechado en pacientes obesos con enfermedad vascular oclusiva prematura. El diagnóstico de presunción se hace cuando el suero en ayunas es lactescente de modo uniforme sin la formación de ninguna capa. El diagnóstico se hace cuando se encuentran niveles elevados de triglicéridos y normales de colesterol y es definitivamente confirmado con los hallazgos de electroforesis y ultracentrifugación.

Lo fundamental en el tratamiento es una dieta hipocalórica y reducida en azúcares. Como medicación puede ser usado el Atromid S si no hay respuesta adecuada a la dieta.

e) TIPO V.- Es un raro trastorno de la adolescencia en el cual VLDL y quilomicrones de composición normal se acumulan en sangre mientras consumiendo dietas normales. Se acompaña usualmente de diabetes manifiesta y de xantomas eruptivos y pancreatitis aguda recurrente.

En la patogenia de este trastorno probablemente varios trastornos genéticos se hallan implicados, los cuales

combinan una resistencia a la insulina con una actividad deficiente de la lipasa de las lipoproteínas.

Como manifestaciones clínicas el trastorno suele presentarse con ataques de dolor abdominal de etiología obscura. Xantomas eruptivos de carácter confluyente, hepatoesplenomegalia y lipemia retinalis son encontrados a menudo.

Entre los análisis de laboratorio hiperglicemia e hiperuricemia son frecuentemente encontrados.

El diagnóstico de presunción se hace por observación del suero en ayunas después de 16 horas a 4º; se observa una capa superior cremosa de quilomicrones y otra subyacente de aspecto lactescente debido al incremento de VLDL. La determinación de triglicéridos da valores muy altos, en general superiores a 1.000 mg%, mientras que el colesterol es normal ó elevado. La electroforesis y ultracentrifugación confirman el diagnóstico aunque no son necesarias para hacerlo.

Como tratamiento la reducción de la ingesta calórica y de etanol usualmente reduce los niveles de ambos quilomicrones y VLDL. Sulfanilureas junto con la restricción calórica son efectivas para la hiperglicemia. Atromid S también puede ser usado en estos casos si la dieta no es por sí sola suficiente.

Estos tipos de hiperlipoproteinemias descritos pueden ocurrir como ya se dijo, como enfermedad familiar de carácter hereditario o bien como un trastorno secundario, siendo en este caso una manifestación más de la enfermedad básica.

Así hiperbetalipoproteïnemia puede ocurrir en hipotiroidismo, síndrome nefrótico, síndrome de Cushing y en sujetos ingiriendo grandes cantidades de colesterol principalmente como huevos y productos lácteos.

Hiperprebetalipoproteïnemia o lipemia endógena ha -

ocurrido en diabetes, alcoholismo, uso de medicación anti-conceptiva, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I, lipodistrofia y hiperlipemia de stress entre otras.

En cuanto a la influencia de hiperlipoproteinemia en el desarrollo de enfermedad vascular arteriosclerótica se han encontrado que los pacientes sobre todo antes de la década de los sesenta suelen tener niveles elevados de ambos LDL y VLDL. El riesgo de desarrollar enfermedad coronaria parece ser directamente proporcional a la concentración de LDL en hombres de mediana edad. La relativa importancia de LDL y VLDL como factor de riesgo no está clara pero parece ser que ambas son importantes.

La importante cuestión de si la reducción de los niveles lipémicos en sangre permitirá la regresión o causará una regresión de las lesiones arterioscleróticas no ha sido aún del todo contestada pero los resultados de importantes estudios prospectivos que se están llevando a cabo en la actualidad están ya apareciendo en la literatura médica como veremos más adelante.

3) Lípidos plasmáticos y Coagulación.- Aún cuando es conocido que los lípidos juegan un papel fundamental en el proceso de coagulación y que estos lípidos son de origen plaquetario en circunstancias fisiológicas, el hecho bien conocido de que los pacientes con hiperlipemias desarrollan precoz y frecuentemente complicaciones trombóticas y arterioscleróticas, ha promovido a muchos investigadores a tratar de determinar el grado en que ese exceso de grasas puede estar asociado con la promoción o aceleración del desarrollo de trombosis o ateromas.

La idea de esta asociación ha sido reforzada por el hecho de que los valores medios de lípidos plasmáticos en individuos con evidencia clínica de arteriosclerosis son más altos que los de individuos sanos. También es conocido que pueblos menos civilizados como por ejemplo los bantues que están

relativamente libres de arteriosclerosis y trombosis, tienen valores de lípidos plasmáticos más bajos que los habitantes de pueblos más civilizados (MERSKEY, 1.960) (27).

Es también posible que la organización de un trombo mural pueda jugar un papel en la patogenia de la arteriosclerosis (ROKITANSKI, 1.855; DUGUID, 1.946) (28,29), y en consecuencia cualquier cosa que pudiera acelerar la Coagulación de la sangre podría ser importante en el desarrollo de esta complicación .

Considerados estos hechos, las más elementales cuestiones que en un principio los investigadores en este campo trataron de resolver fueron:

1º.- Si la Coagulación y la fibrinólisis serían afectadas por una comida rica en grasas.

2º.- Cual es el efecto de una alimentación rica en grasa durante un período prolongado de tiempo sobre estos parámetros.

3º.- La posibilidad de alterar la incidencia de enfermedad trombótica humana modificando la ingestión grasa.

4º.- Si existe realmente una diferencia en la Coagulación y fibrinólisis entre individuos arterioscleróticos y otros aparentemente sanos pertenecientes al mismo o diferente grupo racial.

a) Influencia de grasas dietéticas en Coagulación y fibrinólisis. En principio no existe unanimidad en la respuesta a esta cuestión y los trabajadores en este campo están divididos entre los que creen que la ingestión de grasas afecta a la Coagulación sanguínea y aquellos que dudan esta afirmación.

Muchos parámetros de Coagulación han sido estudiados:

tiempo de coagulación en tubo de vidrio y en tubos silicados; tiempo de coagulación de plasma recalcificado; recuentos plaquetarios, adhesividad plaquetaria; variantes de análisis de generación de tromboplastina, por mencionar unos pocos ejemplos y en la literatura médica encontramos artículos sosteniendo que una comida de alto contenido en grasas acelera la coagulación (MATHUR et al, 1.960 ; MUSTARD et al, 1.962) (30, 31), mientras que otros afirman que no tienen ningún efecto (SHEEHY 1.958; NITZBERG et al 1.959) (32, 33), o producen este resultado en individuos de vida sedentaria pero no en aquellos de vida activa (MC DONALD et al, 1.960) (34).

Otros autores (MUSTARD, 1958; DAILEY et al, 1.960) (35, 36) encontraron una mayor aceleración de la Coagulación por comidas grasas en individuos con arteriosclerosis que en aquellos no afectados, pero estos hallazgos no han sido confirmados por otros (O'BRIEN, 1.958 ; MATHUR et al 1.960) (37, 38).

Existen muchas condiciones clínicas asociadas con excesivos episodios trombóticos. Parece pues lógico esperar a que estos episodios o condiciones puedan estar asociados con hallazgos de laboratorio que indiquen un estado de " hipercoagulabilidad". Ocasionalmente es posible demostrar la elevación de uno o varios factores de coagulación pero ello no significa necesariamente que una acelerada tendencia a trombosis existe. Es todavía incierto que la identificación de un estado hipercoagulable a través de un test de laboratorio existe. Esto podría explicar las dificultades que han sido encontradas al intentar demostrar la posible aceleración de la Coagulación después de comidas de alto contenido en grasas. También sería posible que las grasas de la dieta no afecten a la coagulación.

En cuanto a la relación de lípidos y fibrinolisis es concebible que la trombosis puede ser mediada a través de al

gún mecanismo que promueva la interferencia con la disolución del coágulo más que acelere la coagulación. Hay artículos indicando que una comida rica en grasas inhibe la fibrinólisis (BILLIMORIA et al, 1.959; KWAAN et al, 1.957; GILLMAN et al, 1.957) (38, 39, 40), pero ésto ha sido denegado por otros (BUCKELL et al, 1.959; HOUGIE et al, 1.960) (41 42). Un artículo concluye que ésto ocurre en arterioscleróticos pero no en sujetos normales (GAJEWSKI, 1.961) (43).

Se ha podido demostrar que los quilomicrones tienen una marcada actividad antifibrinolítica (JOHNSON et al, 1953; STEFANINI et al, 1.956) (44, 45). Otros han demostrado que suspensiones de quilomicrones y plaquetas tienen una marcada actividad como proactivadores (GREIG et al, 1.961) (46). BANG y CLIFFTON, 1.960 (47) informaron que coágulos formados durante la hiperlipemia alimenticia fueron particularmente resistentes a una terapia fibrinolítica y en otro estudio BERGENTZ et al, 1.961 (48) encontraron que la administración de grasas por vía oral o intravenosa producían una tendencia acelerada a la formación de trombos en venas ligadas.

BUZINA et al, 1.961 (49) encontraron que una prolongada alimentación con grasas insaturadas produce un alargamiento en el tiempo de Coagulación cuando se hace en tubos tratados con silicona, mientras que CLIFFTON et al, 1.961 (50) encontraron con la misma dieta un descenso en la actividad antiplasminica. Por otro lado PEYMAN et al, 1.960 (51) y GAJEWSKI, 1.961 (51, 43) fueron incapaces de encontrar cambios significativos en los parámetros de coagulación y fibrinólisis en pacientes con hipercolesteronemia y enfermedad coronaria después de la prolongada suplementación de la dieta con grasas no saturadas. (MERSKEY et al, 1.963) (52)

b) Coagulación de la sangre, fibrinólisis y enfermedad trombótica.- Estudios de la Coagulación y fibrinólisis en sujetos con arteriosclerosis comparados a individuos normales - aún han añadido más confusión.

Mc DONALD et al, 1.959 (53) afirman que pacientes que se han recuperado de un infarto de miocardio tienen una regeneración de la tromboplastina elevada, fibrinógeno en plasma elevado y una adhesividad plaquetaria aumentada. Una restricción dietética o terapia con heparina podía modificar estos cambios (Mc DONALD et al, 1.958) (54).

MERSKEY et al, confirmaron un incremento en fibrinógeno y también una acelerada generación de la tromboplastina. Sin embargo individuos de la raza bantú mostraban una generación de la tromboplastina más rápida a pesar de que tienen una ausencia virtual de arteriosclerosis (MERSKEY et al, 1960) (27).

Otros han encontrado aceleración de un test de generación de la tromboplastina modificado en pacientes con enfermedad oclusiva periférica arterial o venosa (PASCUZZI et al, 1.961) (55).

El tiempo de Coagulación de la sangre de nativos de Nueva Guinea, quienes están libres de enfermedad arteriosclerótica es más corto que el de australianos blancos (GOLDRICK et al, 1.958) (56) mientras que los bantús tienen unos - tiempos de Coagulación similares pero niveles de factores VII y protrombina más bajo que los de los sudafricanos blancos. Ambos, los bantús y los aborígenes australianos tienen niveles elevados del factor VIII (MERSKEY et al, 1.960; PITNEY et al, 1.960) (27, 57).

La fibrinolisis ha sido encontrada inhibida en pacientes con arteriosclerosis por algunos autores (NAIMI et al, 1.960; GZARNIECKI 1.960) (58, 59), y no afectada según - otros (MERSKEY et al 1.960) (27).

Estos hallazgos conflictivos han sido mencionados para demostrar el estado de confusión en este tema y la dificultad en obtener conclusiones válidas. El hecho de que es difi -

cil seleccionar grupos control adecuados y de que los tests de Coagulación hasta ahora mencionados son bastantes insensibles ha contribuido a esos resultados a veces conflictivos.

Para el esclarecimiento de esta confusión que era prevalente después de los estudios citados eran necesarios análisis a largo plazo en los que se viese si la restricción de grasas de la dieta o la sustitución de unos tipos por otros, en realidad reduciría la incidencia de enfermedad trombótica humana. Pues bien, numerosos estudios epidemiológicos retrospectivos han demostrado que la enfermedad coronaria está relacionada al nivel del colesterol sérico y al consumo de grasas saturadas en la dieta (STORMORKEN, 1.974; KEYS, 1.970) (61, 62). Además un estudio prospectivo internacional a gran escala fué realizado en siete países (KEYS, 1.970) (62) sobre la relación existente entre la dieta y la incidencia de enfermedad coronaria. Los resultados indican que las muertes por enfermedad coronaria, en las que se cree que trombosis desempeña un papel prominente, y todos los casos coronarios estan relacionados íntimamente a la ingestión de grasas saturadas.

En el mecanismo por el que grasas de origen dietético podrían influenciar la enfermedad coronaria, considerable énfasis ha sido dada a arteriosclerosis (STAMLER, 1.973) (60). Sin embargo la trombosis coronaria parece ser uno de los acontecimientos más dramáticos en el curso de la enfermedad coronaria aún cuando a veces un trombo no puede ser encontrado en casos de isquemia miocárdica aguda (SPAIN et al, 1.970; BAROLDI, 1.965) (63, 64). Sin embargo agregados plaquetarios en las arterias intramiocárdicas (HAEREM, 1961) (65) y epicárdica (HAEREM, 1.972) (66) son encontrados frecuentemente en casos de muerte súbita de origen coronario.

Además está bien documentado que trombos murales pueden contribuir a la formación de placas arterioscleróticas -

(DUGUID, 1.946; HAUST, 1.959) (29, 67).

Por consiguiente la trombosis arterial parece tener un significado clínico importante en poblaciones susceptibles a enfermedad coronaria. La cuestión es si las grasas de la dieta predisponen a la enfermedad coronaria a través de un mecanismo de trombosis a parte de los cambios sobre la pared vascular que ellas inducen.

Los estudios " in vitro " se han enfocado sobre el efecto de ciertos constituyentes grasos sobre las plaquetas, lo cual está justificado por el prominente papel que estos corpúsculos juegan en la génesis de trombosis arterial, y también sobre el proceso de Coagulación o formación de fibrina más importante en la génesis de la trombosis venosa. Estos estudios demostraron que solo los ácidos grasos saturados de larga cadena (más de 14 átomos de carbono) fueron efectivos en la inducción de agregación plaquetaria (WARNER, et al - 1.967; KERR et al, 1.965) (68, 69) y la activación de ciertos factores de la Coagulación (CONNOR et al, 1.965 ; DIDISH-EIM et al, 1.963) (70, 71). De todos ellos ácido esteárico era el más eficaz. Estos estudios subrayan la posibilidad de que los ácidos grasos libres en plasma podrían iniciar el fenómeno de trombosis y que las grasas de la dieta podrían influenciar este efecto desencadenante cambiando la concentración y el tipo de esos ácidos grasos.

Además podría esperarse que cambios dietéticos en la composición de ácidos grasos libres podrían modificar la conducta de las plaquetas cambiando su composición lipídica. Así rápidos cambios en los ácidos grasos plaquetarios han sido observados " in vitro " por la incubación de las plaquetas con varios ácidos grasos (ANDREOLI et al, 1.974) (72).

Siguiendo ahora con la evidencia obtenida de individuos humanos NORDOY et al, 1.971 (73), han demostrado que en seres humanos un cambio en la dieta, con más ácidos grasos de-

saturados será reflejado subsecuentemente en las plaquetas: los cambios observados no fueron caracterizados por un cambio en el nivel de colesterol o fosfolípidos en las plaquetas sino por un incremento en el contenido en ácido linoleico de varios fosfolípidos plaquetarios a expensas de los ácidos palmíticos y oléicos. Ellos también observaron que la actividad plaquetaria en factor III estaba consistentemente disminuida en individuos alimentados con una dieta rica en grasas desaturadas lo cual concuerda con los resultados obtenidos de experimentos con animales (RENAUD et al, 1.974) (74).

IACOMO et al, 1.974 (75) han descrito que individuos del área de Cincinnati muy susceptibles al desarrollo de enfermedad coronaria y que comen la típica dieta americana, tienen el nivel de ácidos oléico y esteárico en los fosfolípidos plaquetarios más alto que individuos de Milán o Sicilia.

RENAUD, 1.970 (76) ha mostrado que el patrón de ácidos grasos en las plaquetas de individuos que han padecido un infarto de miocardio recientemente se caracterizan, cuando se compara con el de individuos que no tienen factores de riesgo de enfermedad coronaria por un incremento en ácidos oléicos, esteárico y palmítico a la expensa de ácidos linoleico y araquidónico, lo cual es un patrón semejante al de las plaquetas de animales alimentados con dietas trombogénicas.

NORDOY y RODSET, 1.970 y 1.971 han demostrado que la actividad del factor plaquetario III estaba incrementada en pacientes con enfermedad coronaria (77) y en pacientes con hiperbetalipoproteinemia (78). Este incremento en el factor plaquetario III, también encontrado por otros autores (RENAUD et al, 1.973) (79), se ha creído que es responsable de la hipercoagulabilidad "in vitro" evaluada por el tiempo de Coagulación de plasma recalcificado cuando las plaquetas fueron separadas por centrifugación a baja velocidad y el Tiempo de Cefalina determinado en el plasma restante se halló alargado. Esta prolongación peculiar del Tiempo de Cefalina ha sido tam-

bién encontrada por otros investigadores (COTTON et al, - 1.972) (80) y de ello se ha concluido que los factores plasmáticos de coagulación probablemente no son responsables del estado de hipercoagulabilidad observado en casos de enfermedad coronaria. Esta hipercoagulabilidad observada en enfermos coronarios y evaluada por el 'Tiempo de Coagulación en tubos siliconados de plasma rico en plaquetas, ha sido también observada en enfermos supervivientes de infarto de miocardio (KORSAN BENGSTSEN, 1.972) (81). Estos investigadores concluyen que ni el nivel de fibrinógeno ni el de los factores de Coagulación II, VII, VIII, ó X podía ser responsable del tiempo de Coagulación observado.

Acerca de la agregación plaquetaria, una incrementada susceptibilidad de las plaquetas a la agregación por ADP y - una desagregación defectiva ha sido encontrada en enfermedad arterial oclusiva.

Aumentada su susceptibilidad a trombina ha sido encontrada en enfermos coronarios en otro estudio (RENAUD et al, 1.974) (82).

También en un estudio reciente CARVALHO et al, 1.974 (83) encontraron que las plaquetas de pacientes con hiperlipoproteinemia del tipo 2a agregaban en respuesta 1 : 25 de la concentración media de agrenalina, 1:3 de la concentración media de colágeno y que la liberación de nucleótidos fué 4 a 6 veces mayor, todos estos datos cuando comparados a un grupo de normales.

Una evidencia adicional sobre el papel de las grasas de la dieta puede ser obtenida de los estudios de prevención por modificaciones dietarias. Varios estudios han mostrado - que cambiando el tipo de grasa y reduciendo la cantidad de calorías suministradas en la dieta, la incidencia de enfermedad coronaria puede ser reducida significativamente en una población que inicialmente está libre de manifestaciones clínicas

de enfermedad coronaria (CHRISTAKIS et al, 1.966) (84) o en supervivientes de infartos de miocardio (LEREN, 1966) (85).

Un estudio de 12 años de duración fué llevado a cabo en Finlandia (MIETTINEN et al, 1.972) (86). La modificación en la dieta consistió principalmente en reemplazar mantequilla por margarina de origen vegetal y leche por leche descremada. La más sorprendente diferencia fué una marcada reducción en la tasa de mortalidad por enfermedad coronaria. Esto sugiere que la trombosis coronaria fué reducida - marcadamente por esta modificación dietética relativamente simple.

El mecanismo íntimo por el que las hiperlipoproteinemias plasmáticas afectan la composición, función y papel de las plaquetas en la génesis de lesiones ateromatosas y trombóticas está pobremente definido. Es posible que los cambios sean inducido por vía humoral modificando el metabolismo de las plaquetas ó más simplemente inducen la incorporación o adsorción de material lipídico a las membranas plaquetarias.

c) Resultados de la experimentación animal.- Antes de finalizar este capítulo vamos a exponer la evidencia obtenida de la experimentación animal acerca de los cambios inducidos en la Coagulación de la sangre en circunstancias de hiperlipemia.

En ratas alimentadas con dietas constituidas por una combinación de tiouracilo, colato sódico, colesterol y grasas animales se ha producido infarto de miocardio (HARTROFT et al, 1.957)(87). En estos animales fué demostrada una aceleración de la coagulación e inhibición de la fibrinólisis.

Estudios adicionales de Coagulación y fibrinólisis en estos animales han sido llevados a cabo por otros grupos de investigadores: DAVIDSON et al, 1.962 (88) encontraron niveles aumentados de los factores de Coagulación II, V, VII, VIII

IX y X con niveles normales de plaquetas y fibrinógeno. Cambios similares fueron encontrados por MERSKEY et al , 1.964 (89) y por NAIMI et al, 1.961 (90).

Un hecho sorprendente de las alteraciones trombóticas inducidas es que ocurrían en superficies vasculares que no estaban alteradas. Sin embargo hay que considerar que la dieta usada en estos casos está muy lejos de ser fisiológica. Además estos animales enferman, se hacen muy anémicos y mueren pronto por lo que las conclusiones obtenidas de este tipo de experimentos deben ser muy cautas.

Quizás más importante en la relación entre grasas de la dieta y trombosis en humanos podría ser la tendencia trombótica resultante de la alimentación a largo plazo de dietas ricas en grasas a animales de experimentación. MUSTARD et al 1.963 (91) han examinado el efecto de grasa de cerdo y yema de huevo alimentados a cerdos con una circulación extracorpórea. Bajo estas condiciones la tendencia de la sangre a formar trombos fué aumentada por la dieta rica en grasas.

Un resultado similar fué obtenido por MATHUES et al 1.968 (92) en conejos alimentados con aceite de coco. En ratas alimentadas con una dieta rica en aceite de coco una tendencia aumentada a la aparición de trombos oclusivos arteriolares iniciados por la inyección intravenosa de ADP fué observada por NORDOY et al, 1.968 (93).

Recientemente HORNSTRA et al, 1.973 (94) describieron una ingeniosa técnica para inducir trombos oclusivos en las ratas por medio de una cánula de polietileno insertada en la aorta abdominal. Con este modelo el efecto de las grasas de la dieta en la génesis de trombosis ha sido estudiado de un modo sistemático. De los resultados obtenidos HORNSTRA, 1.974 (95) concluye que en las grasas solo los ácidos grasos mirístico, palmítico y esteárico son trombogénicos. Por el contrario los ácidos linoleico y probablemente linolénico parecen tener un efecto antitrombótico. En estos experimen-

tos el efecto trombogénico de las grasas fué relacionado a la susceptibilidad de las plaquetas a agregación.

Otros autores han encontrado igualmente que las dietas y grasas ricas en ácidos saturados de larga cadena predisponían a ratas a la aparición de trombosis, las cuales según fuese el agente desencadenante pueden ocurrir en venas por endotoxinas (RENAUD, 1.969) (96); en cavidades cardíacas por epinefrina (RENAUD et al, 1.969) (97), o incluso en arterias coronarias por la acción del ácido elálgico. En estos estudios los ácidos mirístico, palmítico y principalmente esteárico fueron encontrados trombogénicos (RENAUD, 1.969; RENAUD, 1.968) (96, 98) mientras que el ácido linoléico fué el principal ácido antitrombogénico.

Los mismos autores han encontrado que uno de los mecanismos por los que las grasas predisponen a las ratas a trombosis es a través de un cambio en la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos plaquetarios (RENAUD et al, 1.970 ; GAUTHERON et al, 1.972) (76, 99) lo cual resultaba en una susceptibilidad aumentada de las plaquetas a la agregación (RENAUD et al, 1.969) (97) y un aumento en la actividad del factor plaquetario III (RENAUD et al, 1.970) (100), el único factor de Coagulación de naturaleza lipídica.

En estudios llevados a cabo en conejos fué encontrado que la mantequilla no solo fué muy eficaz en enducir una hipercoagulabilidad, pero que también fué la más aterogénica e hipercolesteronemiante de todas las grasas lo cual se debe probablemente a su alto contenido en ácidos palmítico y esteárico y el bajo contenido en ácido linoleico.

Es interesante reseñar como consecuencia de estos estudios que la alimentación a largo plazo a base de grasas ricas en ácidos palmítico y esteárico no resultan necesariamente en un aumento de esos mismos ácidos grasos en las plaquetas: así el esteárico puede ser el más trombogénico de los ácidos grasos

al incrementar principalmente el nivel de ácido oléico en las plaquetas. Los fosfolípidos ricos en ácido oléico y no aquellos ricos en ácidos grasos saturados son los más activos en Coagulación (RENAUD, 1.974) (74).

Con estos estudios como base y dado el hecho de que los factores plasmáticos de Coagulación no tenían un papel bien definido y estudiado en la situación de hipercoagulabilidad encontrada en las hiperlipoproteinemias, KIM et al, 1.976 (101) pertenecientes a la escuela médica Albert Einstein College of Medicine de New. York, bajo la dirección del Prof. Merskey, iniciaron un nuevo estudio en el que descubrieron que ratas congénitamente hiperlipémicas tenían niveles de factores de Coagulación II, V, VII, VIII y X más altos que los controles constituidos por ratas normolipémicas. Recíprocamente ratas hipolipémicas del mismo tipo tenían los niveles de los citados factores de coagulación más bajos que las ratas control.

En varias de esas ratas una cánula de polietileno - fué insertada en la aorta abdominal según la técnica descrita por HORNSTRA et al, 1.973 (94), para evaluar la tendencia a trombosis y fué encontrado que el grupo hiperlipémico obstruía la cánula más pronto y el grupo hipolipémico más lentamente que el grupo normolipémico control.

En el mismo estudio un grupo de ratas fueron hechas hipertensas e hipercolesteronémicas por ligación unilateral de una arteria renal y encontraron niveles más altos de los factores VII y X que en el grupo control. Resultados similares fueron obtenidos con monos Rhesus hechos hiperlipémicos por medio de una dieta apropiada.

III JUSTIFICACION E HIPOTESIS DE TRABAJO

Los accidentes vasculares trombóticos particularmente aquellos afectando a las arterias coronarias y cerebrales constituyen hoy en día una auténtica plaga de la humanidad -

clamando más vidas que el mismo cáncer.

Los dos componentes principales, arteriosclerosis y trombosis, están relacionados entre sí por mecanismos aún no dilucidados.

Un factor que puede ser importante en la génesis de ambos - arteriosclerosis y trombosis- puede ser la hiperlipidemia, es decir la perturbación congénita o adquirida del metabolismo lipídico que conduce a cifras anormalmente altas en los lípidos plasmáticos.

La hiperlipidemia como factor importante en la génesis de arteriosclerosis parece ser un hecho bien establecido (BRONTE-STEWART et al, 1.955; GOFMAN et al, 1.956) (102, - 103). El propósito de este trabajo ha sido el de buscar una relación entre hiperlipidemia y trombosis en seres humanos a través de su posible influencia en el mecanismo de la Coagulación sanguínea.

Como puede observarse de lo escrito anteriormente, la mayor parte de la investigación ha sido enfocada hacia las anomalías en la fisiología plaquetaria encontradas en las situaciones clínicas de hiperlipidemia, mientras que los factores plasmáticos de Coagulación no han sido apropiadamente estudiados, no encontrando un trabajo previo en la literatura médica que estudie a fondo y resalte el papel de estos factores.

KIM, MERSKEY et al (101) encontraron significativas diferencias en factores de Coagulación en animales de experimentación hiperlipémicos comparados a grupos controles normolipémicos.

En la misma institución - Albert Einstein College of Medicine, New York- y trabajando bajo la orientación del Prof. Merskey he tratado de comprobar si los resultados acabados de citar de experimentación animal (101) son aplicables a las hiperlipemias que encontramos en patología humana. De aquí ha surgido este trabajo.

CAPITULO .II

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

I. PACIENTES Y CONTROLES.

En total 105 personas de ambos sexos fueron estudiadas siendo hombres el 89% de ellos. Los pacientes estaban siendo estudiados en una Clínica especial para el diagnóstico y tratamiento de hiperlipidemias en el Bronx Municipal Hospital Center de la ciudad de Nueva York.

Todas las muestras de sangre eran recogidas por la mañana en ayunas y aquellos que estaban recibiendo medicaciones que son conocidas como capaces de influenciar los valores de lípidos séricos o de factores de coagulación fueron excluidos del grupo.

Los controles fueron adultos de ambos sexos aparentemente sanos con valores de lípidos sanguíneos normales. Estaban incluidos individuos erróneamente referidos para estudios de hiperlipemia o acompañando a los pacientes que venían a la Clínica.

Los pacientes hiperlipémicos fueron clasificados en los siguientes grupos:

- 1.- Tipo IIa, constituido por aquellos pacientes que tenían colesterol elevado, triglicérido normal y LDL colesterol elevado.
- 2.- Tipo IIb, pacientes en que ambos, colesterol y triglicéridos, estaban elevados y además la LDL colesterol estaba también elevado.
- 3.- Tipo IV, de pacientes con triglicéridos elevados, colesterol normal y LDL también normal.

HIPERLIPOPROTEINEMIAS

grupo	colesterol, mg/100 c.c.	triglic. mg/100 c.c.	pacientes.
Control <30	≤250	≤150	14
Control ≥30	≤250	≤150	15
II a	+	N	14
II b	+	+	24
IV	N	+	32
V [▲]	N o +	+	6

▲ = quilomicrones en ayunas
N = normal

TABLA 1

4.- Tipo V, de pacientes con triglicéridos marcadamente elevados, con quilomicrones en plasma en ayunas y con colesterol normal o elevado.

En la tabla I puede verse el número de pacientes incluidos en cada uno de esos tipos de hiperlipemias, en total 76, así como el número de individuos normales, en total 29. Nosotros hemos tomado como límite superior de la normalidad las cifras de 250 mg % para el colesterol plasmático y 150 mg % para los triglicéridos.

II. METODOS.

Los lípidos plasmáticos fueron determinados en el modo que será descrito detalladamente más adelante (MANUAL OF LABORATORY METHODS, 1974) (104).

Para los estudios de lípidos la sangre fue extraída en el anticoagulante EDTA (sal dipotásica) en la proporción de 1 mg por c.c. de sangre. Para los estudios de Coagulación la sangre fue coleccionada en citrato trisódico al 3.8%, un volumen para nueve volúmenes de sangre, y centrifugada dos veces a 20.000 g. a la temperatura de 4º C. Los factores V y VIII fueron determinados el mismo día de la colección de sangre y otros factores de Coagulación después de un variable período de almacenamiento a -35º C. en tubos de poliestireno.

El factor V fue calculado siguiendo un método de tiempo de protrombina en una fase y usando como substrato plasma humano recogido en oxalato como anticoagulante y tratado con Celite (SHAMBERGE et al. 1967) (105).

El factor II o Protrombina fue calculado de modo similar pero usando como substrato plasma bovino oxalato adsorbido con sulfato de Bario y con suero envejecido añadido para asegurar la presencia de otros factores estables de la Coagulación (OWREN et al. 1951) (106).

El factor X fue analizado similarmente pero usando como sustrato plasma de un paciente congenitamente deficiente en ese factor.

El factor VII fue determinado de dos modos diferentes: a) con un método de tiempo de protrombina en una fase usando como sustrato plasma bovino citratado tratado con diisopropilfosforofluoridato (DPP), que selectivamente inhibe el factor VII, según técnica descrita recientemente (NEMERSON et al. 1974) (107); b) siguiendo una técnica similar pero usando como sustrato plasma procedente de un paciente congenitamente deficiente en factor VII que amablemente nos suministró el Dr. Robert Goldstein.

Los análisis de los factores II, V, VII y X fueron llevados a cabo con tromboplastina procedente de cerebro humano extraído con acetona, y de un modo automático usando un fibrómetro (BBL Division of Beckton Dickinson and Co., Cockeysville, Md.).

Los factores VIII y IX fueron analizados usando un método de tiempo de tromboplastina parcial en una fase usando un reactivo comercial como tromboplastina parcial (Activated Cephaloplastin, Dade Division, American Supply Corp., Miami, Fla.) y como sustrato plasma citratado procedente de pacientes congenitamente deficientes en esos factores.

El fibrinógeno fue medido por un método turbidimétrico usando trombina y Calcio como coagulante (ELLIS et al. 1961) (108). Otro método no turbidimétrico, basado en la estimación del contenido en tirosina (RATNOFF et al. , 1951) (109) fue usado para los plasmas del tipo V, que eran demasiado turbios para ser analizados por el método anterior, así como para los respectivos controles.

Los productos de degradación de la fibrina fueron medidos en suero por el método de inhibición de la hema-

glutinación de hematíes tratados con ácido tánico en Auto-analizador (MERSKEY et al., 1972) (110). El suero fue preparado coagulando plasma citratado durante 4 horas a 40 C. después de la adición de 1 Unidad de trombina por c.c., EACA (ácido épsilon amino caproico) 0.05 M. y cloruro calcico 0.025 M.

La medida de la protrombina antigénica fue hecha por el método de la inmunolectroforesis cuantitativa según técnica descrita por LAURELL, 1972 (111), usando un antisuero preparado y amablemente cedido a nosotros por el Dr. Sandor Shapiro de Filadelfia.

El factor VIII antigénico fue medido por Radioinmunoensayo (HOYER, 1972) (112) usando un antisuero comercial de Behring Diagnostics, American Hoechst Corp., Somerville, N.J.).

El factor de von Willebrand fue estudiado por el método de la ristocetina (MAC FARLANE et al., 1975) (114) usando plaquetas fijadas con formalina (WEIS et al., 1973). Las muestras de plasma procedentes de pacientes hiperlipémicos de los tipos IIb, IV y V mostraban una turbidez que no se eliminaba tras centrifugación durante 30 minutos a 20.000 g, y por consiguiente no pudieron ser estudiados por este método de la ristocetina puesto que las diferentes diluciones de plasma disminuían la transmisión de la luz en diferente grado.

En los estudios de coagulación los plasmas de pacientes y controles fueron comparados a una mezcla de plasmas normales procedentes de 10 individuos aparentemente sanos guardada a -35° C. Para el Radioinmunoensayo y el método de la ristocetina, los pacientes y controles fueron comparados a una mezcla de plasmas procedentes de 20 individuos sanos, la cual había estado guardada a -60° C.

II. METODOS

He aquí una detallada descripción de los métodos utilizados en este trabajo:

1.-DETERMINACION AUTOMATICA DEL COLESTEROL Y LOS TRIGLICERIDOS PLASMATICOS.

Los análisis fueron llevados a cabo usando un método en dos partes para 1) preparación de un extracto de plasma con isopropanol y subsiguiente tratamiento con una mezcla de celite para extraer fosfolípidos, glucosa, bilirrubina y ciertas otras sustancias que pueden interferir con las determinaciones y 2) la determinación simultánea del colesterol y triglicéridos mediante el uso del Autoanalizador TM II de Technicon Instruments Corp., Tarrytown, N.Y.

La determinación colorimétrica del colesterol en el Autoanalizador TM II depende de la formación de un color azul desarrollado con una mezcla de ácidos sulfúrico y acético conteniendo anhídrido acético, con lo cual se miden ambos el colesterol libre y el esterificado.

La determinación de triglicéridos se lleva a cabo en el Autoanalizador II fluorométricamente después de la hidrólisis a glicerol libre y subsiguiente oxidación del glicerol a formaldehído seguido de la reacción con acetilacetona para dar el producto fluorescente 3,5-diacetil-4dihidrolutidina.

I.- PREPARACION DE LOS EXTRACTOS PLASMATICOS.

A)EQUIPO DE DILUCION DE LAS NUESTRAS DE SANGRE.

Una pipeta automática Micromédic suministrada por Micromédic Systems, Inc, Pennsauken, N.J., fue utilizada para proporcionar cantidades de 0.5 c.c. de plasma, o standard de Isopropanol, 99% Isopropanol o suero salino y 9 c.c. de Isopropanol al 99%. Cada dos semanas una calibración meti-

culosa debe ser llevada a cabo para determinar si las cantidades proporcionadas son exactas.

B) MATERIAL DE VIDRIO VOLUMETRICO.

Pipetas de vidrio A y frascos volumétricos fueron usados para la preparación de las soluciones. Pipetas serológicas no fueron nunca usadas.

C) TUBOS DE EXTRACCION Y TAPONES.

Tubos de 16.125 mm. con tapones de rosca recubiertos de teflón suministrados por Dupont Co., de Wilmington, Delaware fueron utilizados.

D) DISPENSADOR DEL ADSORBENTE.

Una cuchara de metal que contenía unos 2 gramos de la mezcla cuando llena enrasada fue utilizada. Un embudo de teflón (Dupont Co., Wilmington, Delaware) de tallo ancho fue utilizado para añadir esos dos gramos de la mezcla de Celite a cada de extracción (tubo).

E) CENTRIFUGA PARA LOS TUBOS DE EXTRACCION.

Una centrifuga refrigerada Servall Superspeed RC-2 automática fue utilizada. Las muestras fueron dejadas para la equilibracion con la temperatura de la habitación antes de ser analizadas.

F) EQUIPO ANALITICO AUTOMATIZADO.

Como se ha citado antes el Autoanalizador TM 11 fue utilizado y las instrucciones que acompañaban al aparato fueron seguidas cuidadosamente.

G) REACTIVOS NECESARIOS PARA LA PREPARACION DE EXTRACTOS.

Isopropanol al 99% de fluorescencia mínima fue usado.

II.- LAVADO DEL MATERIAL DE VIDRIO.

Los tubos de extracción eran utilizados una sola vez mientras que los tapones a rosca recubiertos interiormente de teflón eran cuidadosamente lavados en agua, enjuagados en agua destilada y secados en un horno a la temperatura de 40° C.

Todo el material de vidrio usado en la determinación de triglicéridos debe ser cuidadosamente lavado para la eliminación de sustancias que puedan producir fluorescencia. Detergentes con componentes que puedan producir fluorescencia deben ser eliminados. El material de vidrio es lavado en ácido nítrico al 20% y enjuagado con agua destilada. El material de vidrio volumétrico no debe ser secado en hornos a elevada temperatura.

III.- STANDARDS.

Soluciones concentradas combinadas de colesterol puro y trioleína en Isopropanol al 99% fueron suministradas por el Lipid Standardization Laboratory, CDC, Atlanta, Ga. a las siguientes concentraciones(colesterol en mg./100 c.c. y trioleína en mg./100 c.c.): S₁ 100/50 ; S₂ 200/100 ; S₃ 300/200 ; S₄ 400/300 ; S₅ 50/0. Estos Standards son guardados en refrigerador en tubos opacos cerrados apretadamente. El Standard S₅ es usado específicamente para analizar plasmas que tienen una concentración baja en colesterol (menos de 100 mg./100 c.c.).

La temperatura media del Laboratorio era de 23° C. y se procuró que todos los líquidos estuviesen alrededor de esa temperatura durante las operaciones volumétricas. Las muestras de sangre (problemas o mezclas control) fueron también traídas a esa temperatura antes de ser medidas.

Las soluciones standard en Isopropanol fueron prepa-

radas usando un sistema Micromedic con la jeringa de 1 c.c. enrasada al 50% y la de 5 c.c. enrasada al 90%.

Las soluciones standard (S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , o S_5), el suero salino 0.15 M. y el Isopropanol al 99% fueron dispensadas en los tubos de extracción con la siguiente secuencia:

- a) 0.5 c.c. de standard concentrado
- b) 4.5 c.c. de Isopropanol al 99%
- c) 0.5 c.c. de suero salino 0.15 M.
- d) 4.5 c.c. de Isopropanol al 99%

El reactivo usado como blanco fue preparado con la misma secuencia que para el standard pero en a) substituyendo Isopropanol al 99% en vez del standard concentrado.

Los extractos hechos con soluciones standard fueron entonces tratados con la mezcla de Celite como será descrito a continuación.

IV.- CONTROL DE CALIDAD.

Para este proyecto de investigación las muestras para control de calidad (sueros congelados con concentraciones conocidas de colesterol y triglicéridos) fueron suministradas por el Lipid Standardization Laboratory, CDC, Atlanta, Ga. Las muestras fueron mantenidas a -20 a -60°C . en posición vertical hasta que eran usadas.

Estas muestras eran introducidas cada día en que se hacían las determinaciones. Dos extractos eran preparados con las muestras de concentración mas baja y otros dos extractos de las de concentración mas alta. Cada extracto era introducido en duplicado de modo que cuatro determinaciones del suero control de concentración baja y otras cuatro determinaciones del suero control de concentración alta eran introducidas cada día.

Cada día las muestras para control de calidad eran sacadas de congelador y dejadas hasta su paso al estado líquido y posterior equilibración con la temperatura del laboratorio antes de ser sometidas a las siguientes manipulaciones.

V.- EXTRACCION Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PLASMA, STANDARDS Y MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD.

a) Extracción del plasma y muestras de control de calidad.-

Los plasmas problemas y los sueros de control de calidad son colocados en tubos de extracción y extraídos con Isopropanol. El plasma y el Isopropanol deben estar alrededor de 23° C. de temperatura. El sistema de pipeteo Micromedic (jeringa de 1 c.c. regulada para dispensar 0.5 c.c. y la jeringa de 5 c.c. para 4.5 c.c.) es usado en la siguiente secuencia:

- a) 0.5 c.c. de plasma
- b) 4.5 c.c. de Isopropanol al 99%
- c) 0.5 c.c. de Isopropanol al 99%
- d) 4.5 c.c. de Isopropanol al 99%

Cada tubo es tapado a rosca e inmediatamente pasado por un agitador mecánico durante 10 segundos. Una fina dispersión de un precipitado de proteína resulta de este modo.

b) Tratamiento de los extractos con una mezcla de Celite.

Esto aplica a los pacientes así como a los standards y a las muestras de control de calidad: el tapón de rosca es quitado al primer tubo y dos gramos de la mezcla de Celite son añadidos y el tubo es puesto en el agitador mecánico durante 10 segundos. Los siguientes tubos son tratados de modo análogo y todos son dejados en reposo durante al menos 30 minutos después de la agitación. Después de este tiempo son agitados de nuevo durante 10 segundos.

Los tubos son ahora centrifugados a 1500.g durante 15 minutos para precipitar firmemente el Celite. El sobrenadante puede ser decantado directamente en las cubetas que van

a ser usadas en el Autoanalizador.

VI.- REACTIVOS PARA EL AUTOANALIZADOR II.

A) REACTIVO DE LIEBERMAN-BURCHARD.

Este es el reactivo de color del colesterol. Gran cuidado debe ser tomado cuando se está preparando este reactivo dada la extrema corrosividad y volatilidad de sus componentes. Un dispositivo de protección de los ojos debe ser llevado todo el tiempo y la preparación y manejo de este reactivo se llevará a cabo en una campana de humos con adecuada salida al exterior.

Colocar 600 c.c. de anhídrido acético en un frasco de tipo erlenmeyer de un litro de capacidad, cerrado con un tapón de vidrio y conteniendo una barra para agitación magnética. Lentamente añadir 300 c.c. de ácido acético glacial y aplicar agitación magnética durante 5-7 minutos hasta que ambos reactivos estén adecuadamente mezclados. Transferir el frasco a un recipiente de volumen suficiente para acomodarlo y añadir a este recipiente alcohol al 95% hasta un límite ligeramente inferior al nivel del líquido en el frasco erlenmeyer. Añadir unas piezas de hielo seco al alcohol para enfriarlo, colocar el recipiente en una plataforma magnética y agitar lentamente.

Montar una bureta conteniendo 100 c.c. de ácido sulfúrico concentrado y frío sobre el frasco erlenmeyer y añadir el ácido lentamente. Después de haber sido añadido quitar el erlenmeyer del recipiente y colocarlo de nuevo en el agitador magnético durante 10 minutos. Transferir el reactivo a una botella de vidrio ámbar con tapón también de vidrio y almacenar a 4º C. Esta solución debe ser clara y prácticamente sin color. El reactivo puede ser almacenado durante una semana a 4º antes de su uso.

B) HIDROXIDO POTASICO 0.8 N.

Colocar 500 c.c. de agua destilada en un frasco volu-

métrico de un litro y añadir 45 gramos de hidróxido potásico. Agitar hasta la disolución completa y completar hasta un litro con agua destilada.

C) REACTIVO DEL PERIODATO DE SODIO.

Debe ser preparado en la campana de humos. Colocar 500 c.c. de agua destilada en un frasco volumétrico de un litro. Añadir lentamente 115 c.c. de ácido acético glacial y agitar hasta mezclarlos; añadir 5.4 gramos de periodato de sodio y después de estar completamente disuelto añadir agua destilada hasta la marca del litro.

D) ACETATO AMÓNICO 2 M.

Disolver 154 gramos de acetato amónico y diluir hasta un litro con agua destilada. La solución debe ser ajustada cada día a pH 6 por adición de ácido acético glacial.

E)- REACTIVO DE ACETILACETONA.

Debe ser preparado fresco cada día. Para ello 7.5 c.c. de 2,4-pentanediona (acetilacetona) son disueltos en 25 c.c. de Isopropanol en un frasco volumétrico de un litro. Después de la completa disolución diluir hasta un litro con acetato amónico 2M (pH 6) y transferir a una botella ambar. Este reactivo debe ser dejado a la temperatura de la habitación antes de usar y debe ser guardado en un bote ambar durante la determinación analítica.

F) MEZCLA DE CELITE.

Moler Celite y convertirla en polvo usando una batidora-trituradora de alta velocidad. Colocarla en una bandeja y calentar a 100° C. durante la noche. Enfriar y colocar 200 en un frasco de boca ancha. Triturar 10 gramos de sulfato de cobre ($SO_4Cu \cdot 5H_2O$) en un mortero. Mezclar el sulfato de cobre molido, 200 gramos de Reactivo de Lloyd, 20 gramos

de hidróxido cálcico y el celite. El jarro debe ser cerrado herméticamente y guardado en un desecador con sulfato cálcico anhidro hasta que vaya a ser usado.

G) GENERAL.

Todos los reactivos usados deben ser de alta calidad y particularmente es necesario estar seguro que el Iso-propanol está libre de fluorescencia. Una vez todos estos reactivos están preparados se pasa a la determinación analítica poniendo en marcha el Autoanalizador II.

2.-DETERMINACION DEL FIBRINOGENO PLASMATICO.

En todas las muestras la determinación se llevó a cabo por el método turbidimétrico descrito por Ellis y Stransky, pero en los plasmas del grupo V de hiperlipemias el método de Ratnoff y Menzie fue también aplicado.

A) METODO DE ELLIS STRANSKY(108)

Principio. Se basa en la conversión del fibrinógeno a fibrina por la acción de la trombina y calcio y en la medida espectrofotométrica del incremento de Densidad Optica así producido.

Reactivos. Los siguientes fueron preparados:

a) plasma citratado usando citrato sódico al 3.8% en la proporción 1:9 con sangre.

b) mezcla Calcio-Trombina compuesta de: trombina 100 U./c.c. 1 c.c.; suero salino fisiológico 2 c.c.; cloruro cálcico 3.38 M. 3 c.c. Mantener a -20°.

c) tampón compuesto de:

barbital sódico, P.M. 206	5.73 gramos.
cloruro sódico, P.M. 58.4	2.93 "

Diluir en aproximadamente 800 c.c. de agua destilada y añadir 22.3 c.c. de ácido clorhídrico 1N. para poner

a un pH de 7.2. Añadir agua destilada hasta un litro. Para usar añadir 0.1 c.c. de Trasylol a 20 c.c. de tampón.

Metódo. Se mezclan 6 c.c. del tampon y 0.5 c.c. del plasma problema y de esa mezcla se ponen 3 c.c. en un tubo Coleman de 12.75 mm para un espectrofotómetro de la misma marca. El resto-3.5 c.c.- se pone en un segundo tubo que servirá comp blanco. Al primer tubo se le añaden 0.02 c.c. de la mezcla calcio-trombina y se invierte rápidamente un par de veces y se deja en reposo durante 20 minutos a la temperatura de la habitación verticalmente situado. Se lee a la longitud de onda de 470 mu contra el blanco constituido por el segundo tubo al que no se añadió trombina. La densidad óptica a 470 da una línea de dilución recta hasta el límite de una densidad óptica de 0.4. Si una mayor es obtenida entonces el plasma debe ser diluido antes de usar.

B) METODO DE RATNOFF MENZIE.

Nosotros usamos una modificación del método originariamente descrito por esos autores en 1951 (109) según descrita por NERSKEY et al. en 1967 (115). Debido al hecho que plasmas de pacientes con hiperlipoproteinemia del tipo V son muy turbios, el método anteriormente descrito de Ellis-Stransky no era adecuado por lo que este segundo metodo fue aplicado a 11 pacientes y a 11 sujetos normales de control.

Principio. La cantidad de fibrinógeno en plasma es determinada convirtiendo a fibrina en presencia de vidrio triturado. La fibrina se adhiere al vidrio y puede ser cuantificada midiendo su contenido en tirosina con el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu.

Reactivos y aparatos.

a) plasma citratado obtenido de modo análogo al descrito en el método anterior. La centrifugación se llevó a cabo durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. en una centrifuga automática refrigerada Servall Superspeed modelo RC-2. El plasma fue congelado a -30° hasta su uso.

b) vidrio triturado; nosotros usamos un preparado

comercial pero no obstante puede ser preparado usando vidrio pirex y un mortero, prosiguiendo la trituración hasta que el diámetro de las partículas mas grandes no sea superior a 0.5 mm. Entre cada uso las partículas son lavadas con ácido crómico, enjuagadas y secadas completamente.

c) embudos de Hirsh

d) trombina bovina "tópica" conteniendo 1000 U./c.c. fue usada diluida en el tampón de coagulación en la cantidad de 0.05 c.c. (50 U.) cada 5 c.c.

e) hidróxido sodico al 10%. Pesar 10 gramos de esa substancia y completar con agua destilada hasta 100 c.c.

f) carbonato sódico al 20%. Pesar 20 gramos y completar agua destilada hasta 100 c.c.

g) reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu provisto por Fisher Scientific Co.

h) solución standard de tirosina: 200 mg de tirosina por litro de ácido clorhídrico 0.1 N. Provisto por Mann Research Labs.

i) espectrofotómetro tipo Coleman II Junior.

j) tampón de coagulación constituido por:

fosfato sódico monobasico, P.M. 138,	7 gr.
fosfato disódico, P.M. 142,	6.8 gr.
cloruro sódico, P.M. 58.4,	5.8 gr.
EACA, P.M. 132,	2.6 gr.
agua destilada hasta 1000 c.c. y ajustar pH a 6.8	

k) tampón de lavado constituido por:

Tris, P.M. 121,	6.1 gr.
cloruro sódico, P.M. 58.4,	5.8 gr.
ácido clorhídrico 1 N	26.8 c.c.
agua destilada hasta 1000 c.c. y ajustar pH a 8.	

Metódica. En tubos de centrifuga de fondo redondo y 50 c.c. de capacidad se coloca 0.5 del plasma problema medido con pipeta volumétrica. Aparte de las muestras problema que son hechas en duplicado, un blanco es preparado usando 0.5 c.c. del tampón de coagulación en vez del plasma problema. A una probeta graduada se añaden tantas veces 5 c.c. del tampón de coagulación como muestras queramos analizar y a continuación 50 U. de trombina por cada 5 c.c. de tampón.

De esta mezcla se añaden 5 c.c. a cada uno de los tubos de centrífuga conteniendo ya 0.5 c.c. del plasma problema de nuevo usando pipetas volumétricas.

Todos los tubos conteniendo ahora plasma, tampón y trombina son dejados a la temperatura del laboratorio durante dos horas agitando de vez en cuando. Después de ese tiempo el contenido de esos tubos es vertido en pequeños embudos de Hirsh de porcelana en cuyo fondo se ha colocado un disco de papel de filtro Whatmann nº 1 de unos 15 mm de diámetro y sobre este disco una pequeña cantidad de vidrio triturado. Vacío es aplicado a los frascos en que los embudos van colocados con es fin de acelerar el proceso de filtración. Después que este ha terminado el embudo y el filtro son lavados dos veces con 10 c.c. del tampón de lavado y después de ello se espera hasta que los filtros estan secos y entonces se les sacan de los embudos usando pinzas y se les coloca en el interior de tubos Pyrex de 13.150 mm y a través de los embudos se añaden 1 c.c. de hidróxido sódico al 10% y 1 c.c. de agua destilada. Se comprueba que el líquido recubre los discos y a continuación se colocan esos tubos al baño María hirviendo durante 10 minutos y después se dejan enfriar.

A continuación 6 c.c. de agua y 3 c.c. de solución de carbonato sódico al 20% son añadidos; se mezclan adecuadamente en un agitador mecánico y se añade 1 c.c. del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezclan de nuevo. Se espera al menos 10 minutos hasta que el color azul esté plenamente desarrollado y se lee en el espectrofotómetro Coleman II Junior usando una dilucion 1:4 en agua destilada.

El Standard se prepara mezclando 1 c.c. de solución de hidróxido sódico al 10%; 1 c.c. de la solución de tirosina conteniendo 200 mg. por litro; 6 c.c. de agua destilada; 3 c.c. de carbonato sódico al 20% y 1 c.c. de reactivo de fenol. Tanto la muestra como este Standard son leídos después de 10 minutos diluidos 1:4 con agua destilada. Un segun-

do Standard puede ser utilizado usando 0.5 c.c. de la solución de tirosina en vez de 1 c.c. y por tanto 6.5 c.c. de agua en vez de 6 c.c.

El blanco es preparado mezclando 1 c.c. de hidróxido sódico, 7 c.c. de agua destilada, 3 c.c. de carbonato sódico y 1 c.c. de reactivo de fenol. También debe ser calentado en el baño María hirviendo con el fin de obtener resultados exactos y también debe ser diluido 1:4 para la lectura espectrofotométrica.

Calculo. Para calcular la concentración de fibrinógeno se multiplica la actividad tirosínica por el factor 11.7. La actividad tirosínica se calcula por comparación de la densidad óptica con la de la solución standard de tirosina. La solución standard cuya densidad óptica se aproxima mas a la de la muestra es usada para este calculo. Finalmente el contenido de fibrinógeno en la muestra se multiplica por el factor necesario para expresar el resultado en mg. por 100 c.c. de plasma. Por ejemplo si la densidad óptica de una muestra de 0.5 c.c. es 0.500 y la densidad óptica del standard de tirosina de 100 ugr es 0.550 entonces:
 $(0.500:0.550)11.7 \cdot 200 = 213$ mg de fibrinógeno por 100c.c. de plasma.

3.-DETERMINACION DEL FACTOR II (PROTROMBINA).

Objeto. Este método fue descrito por OWREN et al. en 1951 (106). El tiempo de protrombina en una fase es sensible a deficiencias en los factores de coagulación I, II, V, X, y VII. Cuando necesitamos información acerca de la concentración de un solo factor los otros cuatro han de ser suministrados en cantidades adecuadas. Esto precisamente es realizado por el método de determinación de la protrombina en una fase descrito por los autores arriba citados.

Principio. Así pues la validez del método estriba en que la única variable sea la concentración de factor II. Los

factores I y V son proporcionados por plasma bovino oxalata-
do del que los factores II y VII han sido eliminados median-
te adsorción con sulfato de bario. Suero humano es añadido
para incorporar el factor VII sin añadir con ello el factor
II.

Reactivos y aparatos.

- a) baño María termorregulado a 37°
- b) pipetas de 1 c.c. y 0.1 c.c.
- c) cronómetro
- d) gradillas para colocación de tubos.
- e) solución de cloruro cálcico 1:30 M.
- f) suero salino isotónico tamponado con Veronal o
también llamado tampón VBIS.
cloruro sódico, P.M. 58.4, 5.75 gr.
barbital sódico, P.M. 206, 4.12 gr.
agua aproximadamente hasta 800 c.c.
ClH 0.1 N. 144 c.c.
ajustar pH a 7.4
completar hasta 1000 c.c.
- g) substrato.

Sangre de origen bovino es coleccionada en oxalato potásico
0.1 M., 1 volumen para 9 volúmenes de sangre. Primeramente
200 c.c. de ese plasma son pasados a través de un filtro es-
terilizante de Seitz con vacío aplicado para acelerar la fil-
tración y el plasma es recogido en 5 gramos de sulfato de
bario. Tanto el filtro de Seitz como el sulfato de Bario ac-
túan reteniendo los factores de la coagulación II, VII y X,
mientras que el fibrinógeno y el factor V pasarán y serán
conservados.

Una vez la filtración ha terminado se agita en el
agita en el agitador magnético durante 10 minutos y entonces
se centrifuga 10 minutos a 10.000 r.p.m. en una centrífuga
refrigerada. A continuación ese plasma centrifugado se ana-
liza viendo el grado de corrección que produce en un plas-
ma que es deficiente en factor II. Una vez que el factor II
ha sido eficazmente eliminado, se realiza una segunda centri-

fugación de 10 minutos a 10.000 r.p.m. para eliminar algun sulfato de Bario residual que aun pudiera estar presente. Después de esa segunda centrifugación se añade suero al plasma en una proporción de 1:5, es decir se añade 1 c.c. de suero por cada 4 c.c. de plasma. La idea de la adición de suero es la de proveer los factores VII y X.

A continuación se añade oxalato potásico 0.1 M., 20 c.c. por cada 200 c.c. de plasma y por último se hace otra comprobación haciendo una línea con diferentes diluciones de plasma normal usando como substrato el recientemente preparado y otro que es conocido como deficiente en factor II. Si son similares el substrato obtenido es valido. Entonces ese substrato se guarda a -30° en porciones de 5 a 10 c.c. dispuestas para ser usadas.

h) tromboplastina

Nosotros preparamos la tromboplastina a partir de cerebro humano usando el siguiente procedimiento: primero el cerebro es limpiado de vasos sanguíneos y pía madre tan bien como es posible y a continuación es lavado con agua, después con salino y después es secado colocandolo sobre papel de filtro y a continuación se corta en pequeñas porciones.

Unos 200 gr son colocados en una batidora a prueba de explosión y se cubren con acetona y se baten durante 12 segundos. Entonces ese batido de cerebro y acetona es colocado en una probeta de dos litros y se añade acetona hasta la señal de 1800. Se agita y se deja en reposo para que el cerebro sedimente. Se decanta entonces la mayor parte de la acetona y el resto se añade a la batidora y el proceso se repite dos veces más.

Después de la última vez la mayor parte de la acetona es decantada y el resto se hace pasar a través de un filtro de Büchner que retiene el cerebro y deja pasar la acetona. Con un aplicador de madera se trata de romper y triturar los fragmentos grandes de cerebro que aun existen en el interior del embudo del filtro de Büchner facilitando así la desecación. Para este propósito vacío es aplicado al sistema de

vez en cuando y así se mantiene ese cerebro en el embudo varias horas del día hasta que se seca y entonces se guarda en un bote de plástico en el congelador hasta que vaya a ser usado para preparar el extracto de tromboplastina del modo que se describe a continuación:

Se añaden 0.5 gramos de polvo de cerebro a 10 c.c. de suero salino fisiológico y se colocan en un frasco de tipo erlenmeyer en el baño María a 48-52° durante 14 minutos con agitación cada 2 minutos. A continuación se filtra a través de una gasa cubriendo un vaso de precipitado y el filtrado se pasa a tubos y se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. Después de ello los tubos son decantados vertiendo los sobrenadantes juntos mientras los sedimentos son descartados. Antes de guardar en el congelador a -20° en porciones de 5 a 10 c.c. se hace un tiempo de protrombina de un plasma normal para ver si el resultado obtenido es similar al conseguido previamente con otros extractos, usualmente menos de 14 segundos.

i) Fibrómetro para determinación automática, obtenido de BBL Division of Beckton Dickinson and Co., Cockeysville, Mariland.

j) Standard: fue utilizada una mezcla de plasmas obtenidos de 10 personas normales.

Metódica. Dos diluciones al 1:15 y 1:30 eran preparadas con las muestras de plasmas usando el tampón VBIS como diluyente. A la cubeta del fibrómetro se añaden:

0.1 c.c. de substrato

0.1 c.c. de dilución del plasma problema

0.1 c.c. de tromboplastina

se esperan 3 minutos

0.1 c.c. de cloruro cálcico 1:30 M. y se pone en marcha el fibrómetro.

Las soluciones de cloruro de calcio y la tromboplastina son previamente calentadas a 37° en el baño María. Cada dilución se determina dos veces y se toma como valor el promedio de

los resultados obtenidos. Si la diferencia entre ellos era de mas de 1 segundo entonces se repetía la determinación.

Cada día se dibujaba una línea standard en papel logarítmico doble uniendo cuatro puntos correspondientes a las diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:60 del standard en tampón Vbis. De esta línea se obtenían los valores correspondientes a los plasmas problemas.

4.-DETERMINACION DEL FACTOR V.

Se llevó a cabo según métodos previamente descritos (SHANBERGE et al. 1967)(105); (CRROL, 1953)(116).

Principio. La formación de trombina en un sistema de protrombina, fibrinógeno y tromboplastina en cantidades controladas es directamente proporcional a la cantidad de factor V presente.

Aparatos y reactivos. Este análisis fue realizado automáticamente en el fibrómetro usando el mismo material descrito en la determinación del factor II. Los reactivos usados fueron:

- a) solución de cloruro de calcio 1:40 M.
- b) tromboplastina, como descrita para la determinación del factor II.
- c) Standard, como descrito para la determinación del factor II.
- d) substrato, artificialmente preparado por nosotros del modo siguiente: sangre de embarazadas coleccionada en oxalato potásico de anticoagulante (proporción 9:1 de sangre:oxalato) es tratada con la adición de Celite (analytical filter aid) de Fisher Scientific Company, en la proporción de 50 mg por cada c.c. de plasma y la mezcla es mantenida durante dos horas en el agitador magnético. A continuación centrifugar durante 15 minutos a 2.000g y decantar el plasma que se coloca en el baño María a 37° otras dos horas. Después se determina el tiempo de protrombina de ese plasma y si es mas de 1 minuto entonces el substrato es válido.

Metódica del análisis. Para cada plasma problema se hacen dos diluciones al 1:15 y 1:30 en el tampón de suero salino y veronal (tampón VBIS). A la cubeta del fibrómetro se añaden:

0.1 c.c. de substrato

0.1 c.c. de la dilución del plasma problema

0.1 c.c. de tromboplastina

se espera un minuto

0.1 c.c. de cloruro cálcico 1:40 M. y se inicia el fibrómetro.

Las soluciones de calcio y tromboplastina han sido previamente calentadas a 37° en el baño María. Cada dilución del plasma problema es calculada dos veces y se toma como resultado la media aritmética de los valores obtenidos. Si la diferencia entre estos es de mas de 1 segundo entonces se repetía la determinación.

Cada día se trazaba una línea standard formada por la unión de cuatro puntos obtenidos de modo idéntico al descrito en la metódica del factor II.

V.-DETERMINACION DEL FACTOR VII.

Aparatos y reactivos. Este test fue realizado automáticamente en el fibrómetro. Los reactivos usados fueron:

a) solución de cloruro de calcio 1:40 M.

b) tromboplastina, como descrita para la determinación del factor II.

c) **Standard**, como descrito para la determinación del factor II.

d) substrato. Este test fue llevado a cabo usando dos substratos distintos:

1.-ARTIFICIAL.

Obtenido según una técnica previamente descrita (NEMERSON et al. 1974)(107). El principio de esta obtención es el hecho demostrado con anterioridad que el di-isopropilfosforofluoridato (DFP) inhibe rápidamente el factor VII del plasma bovino, mientras que los factores fibrinógeno, protrombina, V. y X permanecen intactos. DFP fue obtenido de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Plasma bovino anticoagulado con 0.1 volumen de citrato só-

dico al 3.8% fue obtenido fresco o bien en forma liofilizada de Pentex, Kankakee, Ill. Celite fue comprada a Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.

Al plasma liofilizado reconstituido se le añade Celite para una concentración final de 10 mg por c.c. Después de 5 minutos a la temperatura ambiente con constante agitación en el agitador magnético el plasma se hace 5.5 mM. en DEP añadiendo 1:1000 en volumen de este preparado. El plasma es entonces agitado en el interior de una campana de humos para permitir que la reacción se complete y que el DEP se hidrolize completamente. El Celite se elimina entonces por centrifugación y se comprueba que el tiempo de protrombina del plasma así obtenido es de mas de 1 minuto, comparado al inicial de 15 segundos y a continuación se guarda a -50° en porciones de 3-5 c.c.

2.-NATURAL.

Substrato constituido por plasma procedente de un paciente congénitamente deficiente en factor VII, el cual fue amablemente proporcionado a nosotros por el Dr. Robert Goldstein.

Metódica de la determinación. Como en determinaciones descritas anteriormente del plasma problema se hacen diluciones al 1:15 y 1:30 usando el tampón VBIS como diluyente.

A la cubeta del fibrómetro se añaden:

0.1 c.c. del substrato artificial o natural

0.1 c.c. de la dilución del plasma problema.

0.1 c.c. de tromboplastina

se espera un minuto

0.1 c.c. de solución de cloruro de calcio 1:40 M.

y se inicia el fibrómetro al mismo tiempo.

La solución de calcio y la tromboplastina han sido previamente calentadas a 37° en el baño María. Cada dilución del plasma problema se calcula dos veces y como resultado se toma el valor medio. Si los valores para la misma dilución difieren en mas de 1 segundo entonces se repite la determinación.

Al igual que se describió anteriormente para la determinación de los factores II y V, cada día se trazaba una línea standard en papel logarítmico doble de la que se leían los resultados correspondientes a los plasmas problemas.

6.-DETERMINACION DEL FACTOR VIII.

El método usado está basado en el tiempo parcial de tromboplastina en una sola fase y esta descrito previamente por otros autores (LANGDELL et al. 1953; MC LENDON et al. 1961) (117,118).

Principio. El tiempo parcial de tromboplastina alargado en enfermos hemofílicos puede ser corregido por la adición de pequeñas cantidades de plasma normal. Dentro de ciertos límites ese acortamiento es proporcional a la cantidad de factor VIII presente. Comparando la eficacia relativa de un plasma normal y del plasma problema, el efecto correctivo o actividad antihemofílica puede ser expresado como un tanto por ciento de lo normal.

Material y aparatos.

- a) baño María termorregulado a 37°
- b) pipetas de 0.1 y 1 c.c.
- c) cronómetros
- d) gradillas para la colocación de tubos
- e) tubos de vidrio 10 . 75 mm
- f) solución de cloruro de calcio 1:30 M.
- g) tampón VBIS, descrito para la determinación del factor II.
- h) standard, mezcla de 10 plasmas normales frescos.
- i) plasmas problemas, obtenidos en 0.1 volumen de citrato sódico al 3.8%
- j) cefaloplastina activada, obtenida de Dade Division, American Hospital Supply Corp., Miami, Fla.
- k) sustrato, para lo que usamos plasma procedente de un paciente hemofílico con una actividad de factor VIII en plasma menor de 1%.

Metódica del análisis.

Fue realizado a las pocas horas de la obtención del plasma el cual se mantuvo en hielo para evitar al máximo la pérdida de actividad del factor VIII. Dos diluciones al 1:15 y 1:30 en tampón VBIS fueron realizadas para cada plasma problema.

A los tubos de análisis de 10 . 75 mm colocados en el baño María a 37° se les añade en orden sucesivo:

0.1 c.c. de substrato

0.1 c.c. de dilución del plasma

0.2 c.c. de cefaloplatina activada

se esperan 10 minutos con agitación ocasional

0.1 c.c. de cloruro cálcico 1:30 M. y se pone en marcha el cronómetro y se ve el tiempo que tarda en coagular.

Cada día se traza una línea standard formada por la unión de cuatro puntos correspondientes a las diluciones 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 de la mezcla standard de 10 plasmas normales. De esta línea standard se obtienen los valores correspondientes a las dos diluciones del plasma problema y se usa la media aritmética como resultado.

7.-DETERMINACION DEL FACTOR IX.

Seguimos una técnica descrita con anterioridad por otros autores. El principio, aparatos y reactivos son idénticos a los de la determinación del factor VIII solo que como substrato fue utilizado plasma procedente de un paciente con hemofilia B.

8.-DETERMINACION DEL FACTOR X.

Principio. Al igual que la determinación de factores V y VII, esta se basa en el grado de corrección que la adición de una dilución del plasma problema provoca en el tiempo de protrombina de un plasma congénitamente deficiente en factor X, comparado a la corrección producida por la adición de la misma dilución de un plasma standard constituido por la mez-

cla de plasmas procedentes de 10 individuos normales.

Reactivos y equipo. Este análisis fue realizado automáticamente mediante el fibrómetro y el resto del equipo fue el mismo que el usado para la determinación del factor II.

Los reactivos usados fueron:

- a) solución de cloruro de calcio 1:40 M.
- b) tromboplastina, como descrita para la determinación del factor II.
- c) Standard, como descrito para la determinación del factor II.
- d) substrato, usandose como tal plasma procedente de un paciente congénitamente deficiente en factor X.

Metódica. La descripción es idéntica a la hecha para la determinación de los factores V y VII por lo que no va a ser repetida.

9.-RECUENTO PLAQUETARIO.

Fue llevado a cabo usando un método automático con el COULTER COUNTER modelo B.

Material y reactivos.

- a) Coulter Counter modelo B.
- b) tubos de 10 . 75 mm
- c) micropipetas desechables conteniendo 3 ul
- d) tampón salino Handy-Boy de Coulter Distributors.
- e) centrífuga para microhematocrito
- f) serofuga modelo Clay Adams
- g) sangre recogida en EDTA en tubos de vacío.
- h) calculador de plaquetas Coulter Counter

Metódica.

- a) se determina el microhematocrito
- b) se añade la sangre anticoagulada con EDTA a tubos de 10 . 75 mm hasta que aproximadamente estén 3:4 llenos y se centrifuga durante 5 seg.

en una serofuga Clay Adams.

- c) con una micropipeta desechable del tipo descrito se toman 3 ul de plasma rico en plaquetas que se añaden a 9 c.c. del salino Handy-Boy.
- d) contar en el Coulter Counter modelo B en duplicado y obtener el promedio de los resultados.
- e) usar el calculador de plaquetas para obtener el recuento plaquetario a partir de los resultados del Coulter y del microhematocrito.

10.-DETERMINACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA.

Esta es la descripción de la técnica inmunológica llamada "tanned red cells hemagglutination inhibition immunoassay" (TRCHII) o inmunoensayo de la inhibición de la hemaglutinación de células tanadas, tal y como descrita por su creador, Dr. MERSKEY, y aplicada por nosotros en su Laboratorio. Pero antes de entrar en la técnica en sí veamos como se prepara la muestra de suero para ser estudiada en su contenido en productos de degradación del fibrinógeno y fibrina.

A) OBTENCION DEL SUERO.

Del paciente se extrae sangre venosa que es mezclada con 0.1 volumen de citrato sódico al 3.8% y el plasma es separado tras doble centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada. Se prepara una mezcla de coagulación integrada por:

EACA(ácido epsilon aminocaproico)	0.1 M.
Cloruro cálcico	0.025 M.
Trombina	2 U./c.c. de

la mezcla. Esta trombina, de origen bovino, se prepara por adición al bote conteniendo 5.000 U. en forma de polvo de una emulsión de 2.5 c.c. de glicerol en igual cantidad de salino.

En tubos de plástico de 12 . 100 mm se colocan una cantidad igual, usualmente un centímetro cúbico, de plasma y de la mezcla de coagulación y se agita rápidamente por inversión y se deja en hielo durante 4 horas, al cabo de las cuales usando dos aplicadores de madera se exprime el coágulo de fibrina para eliminar la fibrina que pueda contener tras haber extraído el suero en él contenido. El suero es entonces centrifugado a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos y a continuación se puede guardar en el congelador a -20° hasta su uso.

B) DESCRIPCION DEL METODO.

El método que paso a describir es una modificación del original descrito por MERSKEY et al. en 1966 (119) en el que usaba hematíes de cordero tratados con formalina, ácido tánico y el antígeno fibrinógeno. En este método se usaron en vez células rojas del grupo O de origen humano tratadas con ácido tánico pero no con formalina(MERSKEY et al. 1969)(120). Las células una vez tratadas con ácido tánico y sensibilizadas con el antígeno pueden ser almacenadas a 4° antes de su uso durante 3 semanas como mínimo; cuando se almacenan en glicerol a -20° permanecen sensibles durante 4 meses como mínimo.

Reactivos.

1.- Hematíes humanos del grupo sanguíneo O, procedentes de sangre anticoagulada con 0.1 volumen de citrato sódico al 3.8%.

2.- Tampones

a) tampón fosfato salino a pH 6.4

:1 volumen de tampón fosfato 0.15 M.

:1 volumen de salino normal

b) tampón citrato-fosfato pH 6.4

:1 volumen de tampón fosfato 0.15 M.

:1 volumen de citrato sódico 0.1 M.

3.- Albúmina, de origen bovino o humano.

4.- Plasma normal Standard, constituido por una

mezcla de plasmas normales recogidos en citrato sódico al 3.8% conteniendo 50 U. de Trasylol por c.c. y almacenado en frigorífico a -20° .

5.- Placas para la realización de la reacción, tipo transparente del usado en Bancos de Sangre, constituidas por una serie de pocillos de 1.6 cms de diametro y 1.6 cms de profundidad.

6.- Antisuero a fibrinógeno diluido en el tampón fosfato citrato. Nosotros usamos anticuerpo preparado por nosotros mismos por inmunización de conejos por inyección de fibrinógeno altamente purificado y libre de plasminógeno (MERS+KEY et al. 1966)(119), 250 ugr. en adyuvante completo de Freund subcutánea e intramuscularmente; dos semanas mas tarde 100 ugr de fibrinógeno en 0.25 c.c. de hidróxido de aluminio (suspension suministrada por Cutter Laboratory de Berkeley-Calif.) eran inyectados intravenosamente. Las inyecciones intramusculares eran administradas a intervalos de 14 dias hasta que un antisuero de título alto era obtenido.

El antisuero era entonces adsorbido 3 a 6 veces con suero humano envejecido y liofilizado (1-2 mg/c.c.) a 37° C. durante 4 horas y después a 4° durante 12-18 horas. El antisuero para ser almacenado se guardaba a -60° con 1 mg./c.c. del antiséptico azida sódica añadido mientras que el antisuero para uso diario se almacenaba a 4° . La prueba de que el antisuero era adecuado se obtenía por inmunodifusión o por inmunoelectroforesis frente a plasma humano o fibrinógeno purificado: si el antisuero era puro solo una banda de precipitación se producía.

Antisueros preparados comercialmente pueden también ser utilizados por ejemplo de Hyland Laboratories, Los Angeles, California; o de Behringwerke A.G., Marburg-Lahn, Germany.

Sensibilización de las células.

a) lavar las células tres veces en 20 veces su volumen de tampón fosfato-salino para quitar el plasma.

b)mezclar volúmenes iguales de suspensión de hemáties al 2% en tampón fosfato salino y de solución recientemente preparada de ácido tánico al 1:20.000 en el mismo tampón.

c)incubar durante 60 minutos a la temperatura ambiente mezclando con un agitador magnético a poca velocidad.

d)lavar y centrifugar las células tres veces en 20 veces su volumen de tampon fosfato citrato para eliminar el ácido tánico y resuspender a la concentración del 4% en el mismo tampón.

e)dividir esta suspensión de hemáties en dos fracciones: el 90% es incubado a 37° durante una hora con agitación de vez en cuando con un volumen igual de una dilución 1:250 de plasma citratado normal en tampón fosfato citrato; el 10% restante es igualmente incubado con una dilución 1:250 de suero normal. En este paso los hemáties previamente tratados con ácido tánico son recubiertos por fibrinógeno y otras proteínas séricas cuando es incubado con plasma y por proteínas plasmáticas, pero no fibrinógeno, cuando es incubado con suero. Estas células tratadas con suero proporcionan un importante control ya que ellas no deben ser aglutinadas por el anticuerpo anti-fibrinógeno específico y de ese modo son capaces de detectar una aglutinación no específica como por ejemplo la provocada por la presencia de una panaglutinina.

f)lavar y centrifugar las células tres veces en 20 veces su volumen del tampón fosfato citrato para eliminar el plasma o suero.

g)antes de usar suspender los hemáties a la concentración 4% en tampón fosfato citrato.

h)para preparar las células para almacenamiento a 4° suspenderlas a la concentración 4% en tampon fosfato citrato conteniendo 0.25% de albumina sérica bovina o humana y 0.1% del antiséptico azida sódica. Antes de usar lavar las células una vez y resuspenderlas en el tampón fosfato citrato.

Metódica.(MERSKEY et al. 1969)(120)

1.-Las muestra son diluidas para asegurar una concentración de proteínas relativamente constante. El tampón

fosfato citrato conteniendo un 2% de albúmina sérica bovina es usado para todas las diluciones a excepción de las dos primeras diluciones del suero en las que el tampón es usado sin la adición de albúmina.

2.-Determinar la concentración del antisuero que ha de ser utilizada. Preparar diluciones del antisuero cada cual duplicando a la anterior en una placa transparente de las usadas en Banco de Sangre, usando un volumen de 0.1 c.c. del antisuero y añadiendo 0.1 c.c. del tampón y una gota (0.025 c.c.) de hematíes sensibilizados. La concentración que se ha de usar debe ser 1-2 diluciones duplicantes menos que la mayor dilución del antisuero que da una buena aglutinación en 15 minutos; por ejemplo si la dilución 1:20.000 da una buena aglutinación se debe usar 1:5000 en el test.

3.-Preparar las diluciones del plasma normal Standard, el cual es una dilución 1:100 en tampón fosfato citrato de una mezcla de plasmas normales procedentes de sangre citrada, con un volumen de 0.1 c.c. de ese plasma inicialmente, diluido con 0.1 c.c. del tampón y duplicando las diluciones en los pocillos sucesivos con el mismo tampón. Así pues la dilución inicial del plasma será 1:200 y se duplica a continuación. La línea de diluciones del plasma Standard debe ser doble, es decir dos hileras de pocillos de la placa deben estar ocupadas por el Standard.

4.-Preparar diluciones similares de las muestras de suero, el cual o no se usa diluido para empezar o bien con diluciones en consonancia con la concentración de productos de degradación de la fibrina que esperamos encontrar.

5.-Añadir un volumen (0.1) de antisuero a cada uno de los pocillos. En el caso que no hemos dado el paso 2 para determinar la concentración del antisuero, éste debe ser usado diluido al 1:1000 o 1:2000.

6.-Incubar la mezcla antígeno anticuerpo durante 30 minutos a 49 C. Añadir entonces una gota (0.025 c.c.) de hematíes tratados con plasma a cada pocillo, mezclar bien y dejar a la temperatura de la habitación otros 30 minutos y entonces leer los resultados.

7.-el resultado es determinado por el último pocillo

en el que la aglutinación ha sido inhibida por examen macroscópico. La inhibición producida la dilución de la muestra desconocida es comparada directamente a la del plasma Standard dando el resultado inmediatamente. Por ejemplo: el plasma normal Standard en una dilución 1:3200 usualmente inhibe la aglutinación; si el plasma contiene una concentración de 320 mg% de fibrinógeno la dilución citada contendrá 1 ul/c.c. Si una muestra desconocida en una dilución 1:25 causa una inhibición similar entonces se consideraría que contiene 25 ul por c.c. de fibrinogeno o mejor, puesto que se trata de suero de productos de degradación del fibrinógeno o fibrina.

C) TRCHII EN AUTOANALIZADOR.

El método que acabo de describir fue adaptado a un Autoanalizador con lo cual se aumentó su sensibilidad considerablemente(MERSKEY et al. 1972)(121). El fundamento es idéntico al descrito, solo que las reacciones en vez de ocurrir en los pocillos de una placa de Banco de Sangre, ocurren en un sistema de tubos de diametro uniforme de 2 mm. conectados entre si a intervalos convenientes.

En este sistema despues que el antisuero y la muestra problema reaccionan entre si un tiempo adecuado dado por la longitud de los tubos y la velocidad de flujo en ellos, reciben la adición de hematíes sensibilizados que serán aglutinados en la medida en que existen anticuerpos que no han sido neutralizados por los productos de degradación del fibrinógeno y fibrina contenidos en la muestra de suero problema.

Los grumos así formados son eliminados por tres decantadores adecuadamente situados en el sistema, mientras que la suspensión de hematíes que sobreviven es ulteriormente sometida a la acción del detergente hemolizante Tritón y la solución de hemoglobina así formada es medida por un colorímetro y en un registrador anexo se dibuja una onda proporcional a la medida colorimétrica. El resultado se obtiene por comparación con una línea Standard.

11.-DETERMINACION DEL FACTOR VIII POR RADIOINMUNO- ENSAYO.

Fue llevado a cabo segun técnica descrita por HOYER en 1972 (112).

Material y reactivos.

1.-Factor VIII marcado con I_{125} .

Fue preparado por Ms. Valeri Macdonald en el Laboratorio de los doctores JOHNSON y ZUCKER de New York University según técnica descrita por HOYER en el artículo citado cuyos pasos esenciales son:

a)preparación de anticuerpo anti-factor VIII, lo cual se consigue por inmunización del conejo con factor VIII purificado de acuerdo con los métodos descritos por ZIMMERMAN et al. en 1971 (127); BOUMA et al. en 1972 (128) o HOYER en 1972 (129).

b)separación de la fracción IgG del suero del conejo, lo cual conlleva primero la separación de la fracción globulínica por la adición de una solución saturada de sulfato amónico y después a partir de esa fracción globulínica la IgG es separada por medio de cromatografía en columna de DEAE celulosa.

c)marcaje de la fracción IgG, para lo cual se usó I_{125} por el método de la lactoperoxidasa.

d)purificación del anticuerpo anti-factor VIII, para lo que el anticuerpo ya marcado(0.5-2 mg) es mezclado con 5 c.c. de plasma humano normal durante 30 minutos a 37°. la mezcla es entonces añadida a una columna de agarosa al 6% que ha sido previamente equilibrada con suero salino tamponado con barbital. La velocidad de flujo se mantiene a 20 c.c. por hora mediante el uso de una bomba peristáltica y fracciones de 5 c.c. son coleccionadas y la radioactividad es medida en todas ellas y son coleccionadas juntas las fracciones que corresponden a los mas altos contajes del volumen vaciado de la columna. Aproximadamente 3-7% de la radioactividad añadida a la columna es recuperada en las fracciones del volumen vaciado. Después suero de conejo, 0.25 c.c., es añadido

a la mezcla la cual pasa a ser dializada durante una hora a la temperatura ambiente contra un tampón 0.05 M. de glicina, 0.1 M. de cloruro sódico y pH 2.4.

Después de la dialisis el material es cromatografiado en una columna de Sephadex G-200 que ha sido equilibrada con el mismo tampón. La velocidad de flujo es mantenida a 10 c.c. por hora y fracciones de 5 c.c. son coleccionadas y la radioactividad es medida en ellas. Las fracciones correspondientes a la segunda onda de proteínas se mezclan.

A continuación 2 c.c. de suero de conejo son añadidos a las fracciones coleccionada juntas y un volumen igual de solución saturada de sulfato amónico y el pH es llevado a 8 con hidróxido sódico 4N. Se deja una hora a la temperatura ambiente y el precipitado se separa por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 20 minutos a la misma temperatura. El precipitado es redissuelto en 5 c.c. de agua destilada y además son añadidos 2.5 c.c. de plasma de conejo y 2.2 c.c. de solución saturada de sulfato amónico y se deja 1 hora a temperatura ambiente. El precipitado de nuevo se separa por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 20 minutos y se elimina mientras que el sobrenadante se dializa 3 veces contra salino tamponado con borato. Después de la dialisis el material es almacenado a -20° en porciones de 1 c.c. Una dilución del anticuerpo marcado en suero salino tamponado con barbital conteniendo una concentración de 40-60 nanogramos de IgG por c.c. es entonces usada para el radioinmunoensayo.

2.-Contador Gamma.

Nosotros usamos uno marca Packard, modelo 5285 Auto-Gamma en el Laboratorio del Dr. Johnson en New York University.

3.-Tampones.

Nosotros usamos los siguientes tampones:

a)barbital salino, pH 8.4	
:ácido dietilbarbitúrico(barbital)	2.76 gr.
:barbital sódico	2.06 gr.

:cloruro sódico	7.3 gr.
:agua desionizada	hasta 1 litro
b)borato pH 8.4	
:ácido bórico	6.4 gr.
:borato sódico	9.5 gr.
:cloruro sódico	4.4 gr.
:agua desionizada	hasta 1 litro
c)borato salino pH 7.85	
:ácido bórico	2.2 gr.
:hidróxido sódico	0.2 gr.
:cloruro sódico	9.29 gr.
:agua desionizada	hasta 1 litro.
d)glicina salino pH 2.4	
:glicina	3.75 gr.
:cloruro sódico	5.85 gr.
:ácido clorhídrico 4N.	8.4 c.c.
:agua desionizada	hasta 1 litro.

4.-Solución saturada de sulfato amónico.
Será diluída al 50% en agua destilada.

5.-Centrífuga RC-3 Sorval de diametro grande.

6.-Plasma de conejo normal

7.-Tubos de poliestireno de 12 . 75 mm desechables
obtenidos de Scientific Products.

Metódica de la determinación.

Primero se hacen las diluciones de una mezcla de 20 plasmas normales usando el tampón barbital salino como diluyente. Tres diluciones al 1:20, 1:40 y 1:80 fueron hechas, la primera con 0.95 c.c. de tampón y 0.05 c.c. de plasma y las siguientes doblando a la primera.

Para los pacientes hacemos dos diluciones a 1:30 y 1:60, la primera añadiendo 25 microlitros a 0.725 c.c. de tampón y la segunda doblando a la anterior. Estas dilucio-

nes son preparadas en tubos de plástico desechables y al mismo tiempo otros tubos especiales llamados de contaje para el radioinmunoensayo son adecuadamente marcados y a estos últimos se añaden:

:0.1 c.c. de cada una de las diluciones; para las del plasma standard un cuarto tubo será preparado que es el blanco conteniendo solo 0.1 c.c. del tampón.

:0.1 c.c. de plasma de conejo

:0.2 c.c. del anticuerpo anti-factor VIII el cual era diluido 1:17, siendo este factor de dilución calculado cada vez que el anticuerpo anti-factor VIII es nuevamente preparado y depende de los contajes obtenidos durante la operación de marcaje del mismo (alrededor de 8-12 nanogramos del anticuerpo son añadidos).

: todos estos componentes son cuidadosamente mezclados y agitados en el agitador mecánico y son incubadas durante 30 minutos a 37° en el baño María. Para todas estas maniobras es necesario el uso de guantes con el fin de evitar el contacto con la piel del material radioactivo.

: después de haber extraído las muestras del agua se añade a cada una 0.4 c.c. de solución saturada de sulfato amónico la cual ha sido diluida al 50% con agua destilada. Después de ello son pasadas dos veces por el agitador mecánico y a continuación se les centrifuga en una centrífuga Sorval RC-3 de gran diametro durante 30 minutos a 4000 r.p.m. y a temperatura ambiente. Después de ello el sobrenadante se desecha arrojandolo a un recipiente desechable que tiene la indicación "radioactivo".

: el sulfato amónico al 50% se hace al 25% por dilución 1:1 con agua destilada y de este se añade 1 c.c. a cada uno de los tubos los cuales son agitados mecánicamente y después de ello se colocan de nuevo en la centrífuga a la misma velocidad y durante 20 minutos

: los sobrenadantes son de nuevo desechados y el precipitado se lleva a un contador gamma donde el contaje se realiza durante 10 minutos para cada tubo.

: la cantidad de antígeno (factor VIII) en cada muestra se calcula por referencia a una curva standard para una mez-

cla de plasmas normales de la cual han sido preparadas varias diluciones en el modo descrito anteriormente.

12.-DETERMINACION DEL FACTOR VON WILLEBRAND.

Se ha llevado a cabo según el método descrito por MAC FARLANE et.al. 1975 (114).

Principio. El defecto hemostático en la enfermedad de von Willebrand es producido por niveles reducidos en el plasma de una proteína (factor Von Willebrand) la cual está relacionada al factor VIII y como demostraron HOWARD et al. en 1971 (122) es un cofactor necesario para la aglutinación de las plaquetas por el antibiótico Ristocetina.

WEISS et al. en 1973 (113) demostraron que el grado de aglutinación de plaquetas lavadas por ese antibiótico estaba relacionado a la concentración de ese factor. MEYER et al. 1974 (123) y OLSON et al. 1974 (124) publicaron técnicas similares pero midiendo la velocidad de la aglutinación. Todas estas técnicas presentan la desventaja de que se necesitan plaquetas recientemente preparadas las cuales tienen actividad metabólica que puede influenciar la aglutinación.

ALLAIN et al. 1975 (125) y KIRBY et al. 1975 (126) han demostrado que plaquetas fijadas por formaldehído o formalina respectivamente pueden ser aglutinadas por ristocetina en la presencia del factor Von Willebrand. Nosotros empleamos en el Laboratorio de los doctores JOHNSON y ZUCKER de New York University un método con plaquetas fijadas en formalina que son preparadas de la siguiente forma:

Concentrados de plaquetas obtenidos de sangre recogida en anticoagulante ACD (no fresca) o bien plasma rico en plaquetas obtenido a partir de sangre citratada fresca e incubado a 37° durante una hora, son diluidos con un volu-

men igual de una solución de formalina al 2% en suero salino o tampón isoosmótico. Después de incubar la mezcla a 4º durante 18 horas como mínimo las plaquetas son sedimentadas por centrifugación a 2.500 g durante 10 minutos a 4º y son resuspendidas en un volumen grande de salino o tampón fríos. La sedimentación y resuspensión son repetidas dos o tres veces a 4º y las plaquetas son finalmente resuspendidas en suero salino tamponado de pH 7.2 conteniendo 0.05% del antiséptico azida sódica, para una concentración de 300.000 plaquetas por c.c. u otra deseada. Nosotros usamos tampón Imidazol salino de pH 7.2 aunque tampón Tris o fosfato pueden también ser usados.

Material y reactivos.

1.-Tampón Imidazol-Salino pH 7.2

Disolver 3.40 de Imidazole (Edcan Laboratories, South Norwalk, Conn.) y 5.85 gramos de cloruro sódico en 150 c.c. de ácido clorhídrico 0.1 N y completar a 1000 c.c. con agua destilada. El pH puede ser ajustado a 7.2 con unas gotas de ClH o NaOH concentrados.

2.-Albúmina bovina (Sigma)

Es añadida al tampón diluyente en una concentración de 40 mg. por c.c. con el objeto de prevenir la precipitación de proteínas plasmáticas que puede ocurrir cuando la concentración de Ristocetina requerida para la agregación óptima (1 mg/c.c.) es añadida al plasma diluido.

3.-Plasma Standard

Constituido por una mezcla de 20 plasmas procedentes de sangre de individuos normales recogida en 0.1 volumen de citrato trisódico al 3.8%.

4.-Agregómetro

Nosotros usamos un agregómetro Payton-dual-channel el cual al tener dos canales nos permitía hacer las determinaciones por duplicado.

5.-Ristocetina solución al 1%, es decir 10 mg por c.c. de suero salino.

6.-Micropipetas automáticas para medir 50 ul y
baño María termorregulado a 37°.

Metódica de la determinación.

Primero se preparan diluciones del plasma Standard al 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40 usando como diluyente el tampón Imidazol-salino pH 7.2 y se determina la agregación inducida por ellas. Para ello ponemos 0.2 c.c. de una suspensión de plaquetas que contiene 700.000 por c.c. en la cubeta del agregómetro y se añade 0.25 c.c. de la dilución plasmática correspondiente y una pequeña barrita metálica para agitación magnética. La cubeta se pone al baño María a 37° durante 2 minutos y a continuación se pone en el agregómetro y una vez iniciado el trazado se añaden 50 ul de la solución de Ristocetina lo que provoca la aparición de la curva de agregación.

Obsérvese que usamos una suspensión de 700.000 plaquetas por c.c. y solo 0.2 c.c. de ella mas 0.25 c.c. de la solución del plasma. Si hubiésemos diluido las plaquetas hasta 350.000 por c.c. hubiéramos puesto en la cubeta del agregómetro 0.4 c.c. de suspensión plaquetaria mas 50 ul de plasma, mas 50 ul de la solución de Ristocetina: el volumen final hubiese también sido 0.5 c.c.

La aglutinación es estimada midiendo la pendiente de la porción mas inclinada de la curva de agregación y se lleva el resultado a un papel de gráfica logarítmico doble emparejando las diferentes diluciones con la cuantía de la agregación inducida.

Con los plasmas problemas se hacen dos diluciones al 1:10 y 1:20 y la medida de la agregación es llevada a la curva Standard para obtener la actividad correspondiente que se expresa como una fracción de la actividad del plasma Standard que es definida como 1 U./c.c. o 100%.

Este método no pudo ser aplicado a los plasmas de alto contenido en triglicéridos y en consecuencia muy turbios debido a que las diferentes diluciones producían un grado variable de turbidez antes de la adición de la Ristocetina.

13.-ULTRACENTRIFUGACION DE LIPOPROTEINAS PARA EXPERIMENTOS DE ADICION.

La ultracentrifugación fue realizada en dos ocasiones y cada vez en dos pacientes hiperlipémicos: en una ocasión utilizamos un gradiente de densidad de 1.063 con lo que las lipoproteínas se separaban en una fracción superior, flotante que contenía LDL y VLDL y una capa inferior que contenía HDL; en la segunda ocasión los plasmas procedentes de los pacientes hiperlipémicos fueron ultracentrifugados en un gradiente de 1.210 con lo que todas las fracciones lipoproteicas flotaban.

Los detalles de la ultracentrifugación fueron similares en ambas ocasiones solo variando la cantidad de bromuro potásico añadida para elevar la densidad plasmática hasta el valor deseado 1.063 o 1.210.

Material y métodos.

1.-muestras de plasma.

Fueron obtenidas a partir de sangre anticoagulada con EDTA y la ultracentrifugación se realizó dos días después de la extracción manteniendose el plasma a 4º.

2.-Ultracentrífuga.

Nosotros usamos una marca Beckman, modelo L-2 50.

3.-Rotor y tubos.

El modelo de rotor 40.3 fue usado y los tubos eran de nitrato de celulosa, de 0.5 . 2.5 pulgadas y con cubiertas de aluminio.

4.-Cortador de tubos.

Hecho de acero inoxidable y un polímero acrílico.

5.-Soluciones acuosas de bromuro potásico de densidades 1.063 o 1.210.

6.-Jeringas de 2.5 y 5 c.c.

Las agujas usadas eran del calibre nº 20 y de 1.5 pulgadas(unos 4 cms) de longitud; sus puntas eran arrancadas para facilitar la aspiración de las muestras.

7.-Bromuro potásico.

Fue utilizado en forma de solución acuosa como acabado de citar y también en forma de polvo para añadir al plasma o suero en cantidad suficiente para elevar la densidad hasta el nivel deseado; el bromuro potásico era primero secado al horno para garantizar la exactitud de su pesada y a continuación se añadía al agua o plasma. Para elevar la densidad de 5 c.c. de plasma a 1.063 nosotros necesitamos 0.4177 gramos y para elevar la densidad de esa misma cantidad de plasma a 1.210 añadimos 1.64 gramos.

Metódica de la Ultracentrifugación.

1.-Primero enfriar el rotor 40.3 a 4º en la ultracentrífuga Beckman L2-50.

2.-Marcar adecuadamente los tubos de nitrato de celulosa de 0.5 . 2.5 pulgadas y colocar en ellos 5 c.c. de plasma cuya densidad ha sido llevada a 1.063 o 1.210 por la adición de la cantidad adecuada de bromuro potásico. Para cada paciente se usaron dos tubos cada uno de ellos conteniendo 5 c.c. de plasma con bromuro potásico.

3.-Colocar a los tubos de nitrato de celulosa los tapones de aluminio los cuales conservan abierto un pequeño orificio central que sirve para completar de llenar el tubo. A través de ese orificio y usando una jeringa y aguja del nº 26 se llena el tubo hasta su capacidad máxima con la solución acuosa de bromuro potásico de la densidad correspondiente.

4.-A continuación los tubos son herméticamente cerrados aplicando un pequeño tapón de rosca a ese orificio central anteriormente descrito situado en el centro del tapón de aluminio. Entonces los tubos son presionados para detectar posibles fugas de líquido.

5.-Colocar los tubos en el rotor estando seguros de que están cuidadosamente balanceados.

6.-Centrifugar las muestras a 4º y a 114.480.g(unas 40.000 r.p.m. en la centrífuga que usamos) durante 48 horas.

7.-Detener la ultracentrífuga sin usar el freno y sacar los tubos con sumo cuidado tratando de evitar movimientos bruscos que pudiesen perturbar las capas de ultracentrifugación ya formadas.

8.-Colocar los tubos en el cortador y cortar a un nivel situado entre las capas superior e inferior cuando la ultracentrifugación fue a 1.063, o bien por debajo de la capa única superior cuando la densidad 1.210 fue usada. Las fracciones superior e inferior de cada tubo de nitrato de celulosa son así coleccionadas en dos tubos distintos adecuadamente marcados.

9.-A continuación a cada una de las muestras así separadas se las sometió a tres procesos de diálisis el primero de 24 horas de duración y los otros dos de 12 horas cada uno. Como líquido de diálisis se usaron cada vez dos litros de un líquido constituido por 4 partes de suero salino fisiológico y 1 parte de citrato sódico al 3.8%.

10.-Después de la diálisis se estudió la concentración de los factores II, VII y X en las fracciones superior e inferior viendose que la superior no contenía actividad alguna de ellos, la cual estaba situada en la capa inferior. Igualmente ambas fracciones fueron usadas para la determinación de colesterol y triglicéridos según métodos descritos al comienzo de este capítulo.

A continuación las fracciones superiores, ricas en colesterol y triglicéridos y que no contenían los factores de coagulación II, VII y X fueron añadidas a un plasma normal en las proporciones de 0, 25, 50, 75 y 100% y se hicieron la determinación de factores en las diferentes mezclas. En la referencia nº 104 se halla descrito este método.

14.-DETERMINACION DE LA PROTROMBINA POR IMMUNOELECTROFORESIS CUANTITATIVA.

Fue llevado a cabo según tecnica descrita por LAURELL en 1972(111).

1.-Tampón para electroforesis.

Barbital sódico 0.2 M. pH 8.6 es la solución

tampón madre.

Diluir 1:4 con agua destilada y colocar la cantidad necesaria en cada una de las cámaras de electroforesis

Diluir 1:8 para la solución tampón usada con la agarosa.

2.-Agarosa para las placas.

Agarosa al 0.8% es usada. Para ello poner 8 gramos de agarosa en 1000 c.c. de la solución de tampón madre diluida 1:8 en agua destilada. Colocar esta mezcla en el baño María hasta que la suspensión se aclara.

A continuación la mezcla se filtra a través de un filtro de Büchner con vacío aplicado y se añade 1 gramo de azida sódica y se coloca la agarosa así filtrada en frascos erlenmeyer para almacenamiento.

3.-Preparación de las placas.

Láminas de vidrio de 20.5 . 10.7 cms fueron usadas. Un molde de plástico en forma de U es colocado entre las dos placas las cuales son mantenidas unidas entre sí por medio de pinzas metálicas. Cuando van a ser montadas se les coloca en el horno para calentamiento a 50-60°.

4.-Anticuerpo anti-protrombina.

Proporcionado a nosotros por el Dr. Sandor Shapiro de Filadelfia.

5.-Montaje de las placas.

La agarosa se funde en el baño María por calentamiento a 50-55° y se añade el anticuerpo en la proporción del 1%: es decir a 99 c.c. de la solución de agarosa se añade 1 c.c. del anticuerpo e inmediatamente se aplica agitación por inclinación y rotación del frasco.

Las placas son colocadas en posición vertical con la U abierta hacia arriba y entonces con una pipeta de 10 c.c. calentada a 60° se añade la agarosa a las placas usándose aproximadamente 33 c.c. para cada una.

Las placas son dejadas en posición vertical hasta que la agarosa se endurece y entonces las pinzas se quitan, las placas se colocan en posición horizontal y la superior se retira por desplazamiento horizontal.

6.-Aplicación de las muestras.

Se abren en el agar agujeros de 4 mm separados entre sí 1 a 2 cms. Usando una micropipeta automática Hamilton se colocan 15 ul de cada muestra en cada agujero.

En cada placa usamos un Standard formado por la mezcla de 10 plasmas de sujetos normales. Esta mezcla es diluída al 75, 50 y 25% (además del 100%), usando como diluyente el mismo tampón usado para diluir el agar. Para cada plasma problema dos diluciones al 50 y 25% fueron usadas.

En uno de los agujeros una gota de azul de bro-mofenol es colocada como indicador para detectar el movimiento electroforético.

7.-Electroforesis.

Se lleva a cabo del polo negativo al positivo. Para establecer la conexión entre las placas y las cámaras electroforéticas se usa papel de filtro que es empapado en tampón contenido en las cámaras. Nosotros usamos un sistema de dos cámaras, una dentro de la otra, entre las cuales circulaba de modo continuo una corriente de agua fría.

La electroforesis fue llevada a cabo a 150 V. durante 15-20 horas para cada dos placas y después de ello las placas son sumergidas en suero salino al 0.85% haciendo 2 o 3 cambios durante 2 o 3 días y a continuación se secan cubriendolas con papel de filtro.

8.-Tinción de las placas.

Se usó Negro Búfalo al 1% en la mezcla Metanol-Agua-Acido acético (5:5:1) durante 45 segundos. Entonces se les lava en Metanol-Agua-Acido acético (5:5:1) durante 5 minutos y a continuación las placas se dejan secar al aire.

9.-Lectura.

Se pueden apreciar una serie de columnas triangulares alargadas siendo la longitud de ellas proporcional a la concentración del antígeno en las muestras aplicadas.

Con los valores correspondientes a las cuatro diluciones de la mezcla Standard se traza una línea Standard en un papel de gráfica logarítmico doble llevando a las abscisas las concentraciones y a las ordenadas la longitud de las columnas. De esa línea Standard se deducen los valores correspondientes a los plasmas problemas.

15.-ANALISIS ESTADISTICO.

Procedimientos standard en Estadística fueron aplicados a la interpretación de los resultados obtenidos. En las líneas que sigue expondré brevemente tales métodos(130).

1.-Medio aritmético o Valor Medio.

Todos los resultados de nuestros experimentos vienen dados para cada grupo como el medio aritmético de los valores correspondientes a cada uno de los individuos integrantes de esos grupos. El medio aritmético es por tanto obtenido como la suma de los valores dividida por el número de ellos y su formula es:

$$\bar{X} = \frac{\text{sum. } x}{n}$$

\bar{X} = valor medio o aritmético

sum. = suma de

x = cada uno de los volores integrantes del grupo

n = numero de valores integrantes del grupo.

2.-Desviación Standard o típica.

Este valor sirve para precisar el grado de dispersión de los valores del grupo respecto a la media aritmética del mismo. Por definición es la raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de los valores respecto a la media elevadas al cuadrado. Su fórmula es:

$$S_x = \sqrt{\frac{\text{sum. } (x - \bar{X})^2}{n}}$$

S_x = Desviación Standard o típica.

sum. = suma de

x = cada valor del grupo

\bar{X} = valor medio o medio aritmético

n = numero de valores integrantes del grupo.

En las tablas de resultados no se expresa este parámetro pero hubo de ser calculado para obtener el Error Standard o típico que se explicará a continuación y que si acompaña al valor medio en las citadas tablas. El 95% de todos los individuos del grupo se encuentran entre dos desviaciones Standard por encima y dos por debajo del valor medio.

3.-Error Standard o típico.

Puesto que nuestros estudios se han realizado en un grupo limitado de individuos y no en todos los hiperlipémicos de la población resulta que el valor medio obtenido por nosotros necesariamente difiere del valor medio referido a un estudio ideal de toda la población de hiperlipémicos del Universo. Para tratar de precisar la distancia a que se encuentra el valor medio general del valor medio del grupo estudiado se aplica a éste el concepto de Error Standard o típico.

Este depende de dos factores: del tamaño del grupo examinado y de la variabilidad de los individuos entre sí dentro de ese grupo tomado como muestra. Su fórmula es:

$$ES_x = \frac{Sx}{\sqrt{n}}$$

ES_x = Error Standard o típico

Sx = Desviación Standard

n = número de individuos en el grupo.

Si el valor medio del grupo es \bar{X} podemos concluir que el verdadero valor medio de la población no está separado de ese valor medio obtenido en mas de dos veces el Error Standard y esto será cierto en un 95% de casos.

4.-Test "t" de Student.

En el estudio para un determinado análisis del grado de significancia de las diferencias entre los valores

medios de los grupos hiperlipémicos y de los normales, este estudio estadístico fue llevado a cabo del siguiente modo:

Supongamos que para el factor X hemos obtenido en el grupo IV estudiando 39 pacientes un valor medio \bar{X} de 107.59% con una desviación Standard (S_{x1}) de 25.44.

En el grupo de normales de edad mayor de 30 años en el que tenemos 17 pacientes el valor medio \bar{Y} es 90.58 con una desviación Standard (S_{x2}) de 22.408. Así pues:

$$\begin{aligned} n_1 &= 39 \\ \bar{X} &= 107.59 \\ S_{x1} &= 25.44 \\ A_1 &= (S_{x1})^2(n_1-1) = (25.44)^2(39-1) = 24593.435 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} n_2 &= 17 \\ \bar{Y} &= 90.588 \\ S_{x2} &= 22.408 \\ A_2 &= (S_{x2})^2(n_2-1) = (22.408)^2(17-1) = 8034 \end{aligned}$$

$$B = \sqrt{\frac{A_1 + A_2}{n_1 + n_2 - 2}} = 24.58; \quad C = \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} = 3.4408$$

$$t = \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) \cdot C}{B} = 2.3799$$

El valor de p para ese valor de t se obtiene de las tablas, teniendo en cuenta el número total de casos que han sido estudiados en ambos grupos: $n_1 + n_2 - 2$ son los grados de libertad que han de ser considerados al obtener los valores de p a partir de las tablas. Para ser considerada como significativa una diferencia entre medios debe tener un p inferior a 0.05.

5.-Análisis de la correlación.

Algunas de las determinaciones fueron llevadas

a cabo por dos métodos distintos: por ejemplo el factor VII fue calculado por un método usando substrato artificial y por otro que usa substrato natural; la protrombina fue calculada por un método de coagulación y por otro de Inmuno-electroforesis cuantitativa.

En este caso calculamos el Coeficiente de Correlación "r" entre los valores obtenidos por el primer método (x) y los obtenidos por el segundo (y). La fórmula es:

$$r_{xy} = \frac{\text{sum. } (x-\bar{X})(y-\bar{Y})}{\sqrt{\text{sum. } (x-\bar{X})^2 \text{sum. } (y-\bar{Y})^2}}$$

r_{xy} = coeficiente de correlación

sum. = suma de

x = cada valor de los obtenidos con el método 1

\bar{X} = valor medio obtenido con el método 1

y = cada valor de los obtenidos con el método 2

\bar{Y} = valor medio obtenido con el método 2

Para facilitar los cálculos tengamos en cuenta que:

$$\text{sum. } (x-\bar{X})^2 = \text{sum. } (x^2) - (\text{sum. } x)^2/n$$

$$\text{sum. } (x-\bar{X})(y-\bar{Y}) = \text{sum. } (xy) - \text{sum}(x)\text{sum}(y)/n$$

Se considera que la correlación es tanto mas perfecta cuanto mas se acerca a 1 el valor de r. El grado de significancia de r depende del número de valores comparados por lo que a partir de r y de n (número de parejas de valores comparadas) se obtiene de las tablas el valor p que nos habla del grado de significancia del valor r obtenido.

-----oOo-----

CAPITULO III

CAPITULO III

RESULTADOS

1) EFECTO DE LA EDAD EN LOS NIVELES DE LOS FACTORES DE COAGULACION.

Los individuos del grupo control en número total de 29 fueron divididos en dos subgrupos: uno integrados por aquellos de edad inferior a los 30 años, en total 14; otro por aquellos de edad igual o superior a 30 años, en número de 15. Los resultados obtenidos son expuestos en la tabla nº 2 en la que puede observarse que el fibrinógeno y el factor V presentaban niveles significativamente más elevados en el segundo subgrupo (mayor ó igual a 30 años) que en el primero por lo que en lo sucesivo todas las comparaciones estadísticas serán hechas en relación al segundo grupo y puesto que los pacientes estudiados tenían más de 30 años de edad, los grupos traídos a comparación estarán armonizados en cuanto al factor edad. El factor VII estaba también significativamente elevado cuando usamos el método con substrato artificial (tabla 5) pero no cuando usamos un substrato natural y tubos siliconados resultados que se exponen en la tabla 2.

2) NIVELES DE LOS FACTORES DE COAGULACION.

Las tablas nº 3 y 4 muestran los resultados de los estudios de factores de coagulación en pacientes y controles. En la tabla nº 3 se exponen los resultados para los factores fibrinógeno, factor V, factor VIII y plaquetas, los cuales no estaban significativamente aumentados en los grupos hiperlipoproteinémicos. Obsérvese que cuando medimos el fibrinógeno por un método turbidimétrico lo encontramos significativamente más bajo en pacientes pertenecientes al tipo V que en controles. Como sospechamos que la turbidez era responsable de este hecho, determinamos fibrinógeno por el método de RATNOFF y MENZIE que se basa en la determinación del contenido en tirosina del plasma cuyo fibrinógeno se ha convertido en fibrina por la acción

de la trombina y en tal caso puede observarse que no existe diferencia significativa en los niveles de fibrinógeno plasmático entre los citados grupos.

La tabla nº 4 muestra que los factores de Coagulación II, VII, IX y X estaban significativamente elevados en las hiperlipoproteinemias IIb y V; los factores VII y IX lo estaban en la hiperlipoproteinemia IIa y el factor X en el tipo IV. Para el factor VII hemos expuesto los resultados del análisis con substrato natural y tubos siliconados; también se determinó este factor con un substrato artificial y los resultados son mostrados en la tabla nº 5. Se hizo un estudio del coeficiente de correlación entre los resultados obtenidos con substrato artificial y los obtenidos con substrato natural: el coeficiente de correlación r fué igual a 0.6085 correspondiente a un valor de p menor de 0.01 indicando con ello la buena correlación entre ambos grupos de resultados.

3) FACTOR VIII POR RADIOINMUNOENSAYO Y FACTOR VON WILLEBRAND:

En la tabla nº 6 muestra los resultados obtenidos en la determinación del factor VIII por radioinmunoensayo y la del factor VON WILLEBRAND por el método de la ristocetina. Como puede observarse no encontramos diferencia significativa en los niveles de ambos factores entre los grupos hiperlipémicos y los controles. No se pudo llevar a cabo una correlación con los estudios del factor VIII por el método de coagulación puesto que se utilizaron para el radioinmunoensayo muestras de plasma que aún cuando pertenecían a los mismos pacientes, estaban tomadas en diferentes momentos, separados dos ó tres meses de las muestras iniciales tomadas para estudios de Coagulación.

En cuanto al factor VON WILLEBRAND por el método de la ristocetina, fué determinado en plasmas previamente congelados y debido al problema de la interferencia que la turbidez ocasionaba en el análisis, solo pudo ser calculado en los plasmas de la hiperlipoproteinemia tipo IIa y controles. No -

se encontró diferencia significativa entre ambos grupos. Un estudio de correlación se llevó a cabo en los trece pacientes del grupo IIa y los doce del grupo control entre los valores del factor VIII por radioinmunoensayo y los del factor VON WILLEBRAND obteniéndose un coeficiente de correlación r igual a 0.49 correspondiente a un valor de p menor de 0.01.

4) PROTROMBINA POR INMUNOELECTROFORESIS CUANTITATIVA.

La tabla nº 7 muestra los resultados del análisis de la protrombina en plasmas hiperlipémicos y controles llevado a cabo por un método de inmunolectroforesis cuantitativa según la técnica de LAURELL. Los niveles de protrombina son significativamente más altos en todos los grupos hiperlipémicos que en el grupo control, confirmando así los resultados de los tests de Coagulación. Se encontró una buena correlación ($r = 0.45$, p menor de 0.01) entre la protrombina medida inmunológicamente y la medida en análisis de Coagulación.

5) PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA.

Los resultados quedan expuestos en la tabla nº 8. De los distintos tipos de hiperlipoproteinemias sólo en el IIb encontramos valores que están significativamente elevados en relación al grupo control, aún cuando los tipos V y IIa también presentan niveles más elevados que el grupo de normales pero sin llegar a alcanzar las diferencias una significancia estadística.

6) EXPERIMENTOS DE ADICION DE LIPOPROTEINAS.

Para descartar la posibilidad de que lípidos plasmáticos adicionales pudiesen afectar los niveles aparentes de los factores de Coagulación en el plasma, influenciando de ese modo el resultado de los análisis, (por ejemplo el lípido podría actuar como un cofactor en el plasma), el siguiente experimento fué llevado a cabo:

De dos pacientes hiperlipémicos se extrajo sangre recogida en EDTA como anticoagulante, la cual se centrifugó a 20.000 X g para separar el plasma. La densidad de éste fué llevada a 1.210 por la adición de bromuro potásico del modo descrito en el capítulo anterior. La ultracentrifugación de este plasma, ahora de densidad 1.210, a 40.000 r.p.m. (114.480 X g) durante 48 horas a 4° hace que todas las fracciones lipoproteicas (HDL, LDL, VLDL) floten en una capa superior, separada de una inferior que no tiene ó tiene muy poca cantidad de lípidos. Ambas fracciones fueron separadas, dializadas durante 48 horas a 4° con tres cambios de cuatro partes de suero salino y una parte de citrato trisódico al 3.8% y después de ello fueron analizadas para determinar sus contenidos en lípidos y factores de Coagulación.

Como puede observarse en la tabla nº 9 la fracción sobrenadante contenía casi todos los lípidos y no contenía los factores II, VII y X los cuales estaban en la fracción inferior, la cual tenía a su vez nada ó sólo una pequeña cantidad de lípidos.

Entonces tomamos plasma normal al que determinamos lípidos y factores II, VII y X y le añadimos proporciones crecientes de 25, 50, 75 y 100% en volumen de la fracción superior de ultracentrifugación, con lo que obtuvimos una serie de mezclas con una concentración creciente en colesterol y triglicéridos (tabla nº 9).

Puede observarse como esa concentración creciente en lípidos no se acompaña de un incremento en la actividad de los factores de Coagulación determinados, viniendo de ese modo a probar que la presencia de mayor cantidad de lipoproteínas por sí no produce un aumento de la actividad de los factores II, VII y X y en consecuencia que los aumentos en concentración de factores de Coagulación encontrados en los pacientes hiperlipémicos es real, es decir un verdadero aumento en la proteína constituyente de esos factores y no un mero incremento en la actividad tal y como se observa en los estudios

de Coagulación. Obsérvese que los resultados de la inmuno~~elec~~troforesis cuantitativa para la protrombina vienen a apoyar - esta conclusión.

Los resultados de los experimentos de adición tras ultracentrifugación a densidad 1.210 (tabla nº 9) fueron repetidos y confirmados con los de ultracentrifugación a densidad 1.063 (tabla nº 10), en los que las lipoproteínas se separan en una fracción superior conteniendo LDL y VLDL y una fracción inferior que contiene HDL. La fracción superior que no contiene los factores de Coagulación II, VII y X fué utilizada para los experimentos de adición a plasma normal, obteniéndose resultados similares a los citados anteriormente para la adición tras la ultracentrifugación en un gradiente de densidad 1.210.

-----oOo-----

**INFLUENCIA DE LA EDAD EN EL NIVEL
DE FACTORES DE COAGULACION**

control	I	II	V	VII	VIII	X
<30	212	103	100	92	85	93
	10.3 [▲]	7.1	4.7	8.8	11.2	4.5
≥ 30	293 [●]	101	119 [▲]	96	100	91
	22.6	4.1	5.0	4.5	14.3	5.4

▲ = ± Error Standard

● = p < 0.01

▲ = p < 0.01

fibrinogeno en mg %

factores en %

TABLA 2

FACTORES NO AUMENTADOS

	grupos- control ≥ 30	IIa	IIb	IV	V
pacientes	15	14	24	32	6
fibrinog. (Ellis)	293 22.6 [▲]	261 10.7	302 16.7	252 10.4	204 [■] 16.9
fibrinog. (Ratnoff)	313 16.1				314 13.4
VIII	100 14.3	107 11.5	92 7.2	93 8.2	109 7.9
plaquetas-	197000- 10376	261875- 35126	215380- 20815	214570- 8070	185000 17000
V	119 5.2	114 5.0	117 3.9	104 3.8	98 5.3

▲ = ± Error Standard

■ = p < 0.05

fibrinogeno en mg%

factores en %

TABLA 3

FACTORES AUMENTADOS

	grupos-control ≥30	IIa	IIb	IV	V
pacientes	15	14	24	32	6
II	101 4.1▲	115 6.1	124● 4.0	112 3.5	134● 6.6
VII	96 4.5	119▲ 6.1	127● 6.0	113 5.9	157● 6.6
IX	84 6.7	103■ 4.2	114● 4.1	95 4.5	118■ 4.1
X	91 5.4	99 6.3	114● 4.0	108▲ 4.1	111■ 7.2

▲ = ± Standard Error

● = p < 0.01

▲ = p < 0.02

■ = p < 0.05

factores en %

TABLA 4

FACTOR VII CON SUBSTRATO ARTIFICIAL

grupo	f. VII(%)
control <30	87 4.1 [▲]
control ≥30	107 [▲] 7.0
IIa	118 7.1
IIb	126 [■] 5.6
IV	106 3.9
V	129 15.9

▲ = ± Error Standard

▲ = p < 0.02

■ = p < 0.05

**FACTOR VIII POR RADIOINMUNOENSAYO
Y FACTOR DE VON WILLEBRAND**

grupo	f. VIII [○]	f. V. Willeb. [○]
control ≥ 30	0.97	1.20
	0.06 [▲]	0.12
IIa	0.93	1.10
	0.09	0.12
IIb	1.31	
	0.13	
IV	1.28	
	0.11	
V	1.19	
	0.13	

▲ = \pm Error Standard
○ = en Unidades

TABLA 6

PROTROMBINA ANTIGENICA

grupo	Prot. ant.(%)
control <30	87 4.5 ▲
control ≥30	85 3.7
IIa	109 ● 6.7
IIb	120 ● 5.7
IV	103 ● 3.8
V	114 ● 11.7

▲ = ± Error Standard
● = p < 0.01

TABLA 7

PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA

grupo	PDF(ugr-c.c.)
control <30	1.3 0.17 [▲]
control ≥30	1.4 0.16
IIa	1.8 0.16
IIb	1.9 [■] 0.14
IV	1.4 0.13
V	1.7 0.17

▲ = ±Error Standard

■ = p < 0.05

ULTRACENTRIFUGACION A DENSIDAD 1,210

adicion	PLASMA 1					PLASMA 2				
	factores %			lipidos(mg%)		factores %			lipidos(mg%)	
	II	VII	X	colest.	triglic.	II	VII	X	colest.	triglic.
0	86	84	88	126	46	76	80	74	126	48
25	82	86	90	132	39	78	88	84	140	42
50	82	98	84	213	60	76	86	78	211	58
75	86	96	86	271	72	78	94	74	290	75
100	82	88	80	351	91	76	90	74	356	93
fraccion sup.	106	150	90	82	18	90	106	80	0	0
fraccion inf.	0	0	0	566	130	0	0	0	564	128

TABLA 9

ULTRACENTRIFUGACION A DENSIDAD 1.063

adicion	PLASMA 1					PLASMA 2				
	factores %			lipidos(mg%)		factores			lipidos	
	%	II	VII	X	colest.	triglic.	II	VII	X	colest.
0	66	71	75	152	48	65	68	80	160	58
25	68	71	75	188	149	65	86	85	193	104
50	68	80	81	214	224	61	80	80	276	137
75	71	84	75	235	272	71	88	82	304	159
100	71	84	72	245	304	66	80	80	328	177
fraccion sup.	0	0	0	342	572	0	0	0	499	300
fraccion inf.	166	188	110	27	16	148	222	128	31	7

TABLA 10

CAPITULO IV

CAPITULO IV

DISCUSION

I RESULTADOS OBTENIDOS

Esta investigación ha revelado que individuos aparentemente normales de edad igual o superior a 30 años tienen unos niveles plasmáticos de fibrinógeno y factor V más elevados cuando son comparados a individuos también normales de menos de 30 años de edad.

El factor VII también está elevado estadísticamente cuando es determinado por un método con sustrato artificial, pero la diferencia no es significativa cuando el análisis es llevado a cabo usando un sustrato natural y tubos de ensayo siliconados. El hecho del aumento del nivel de factor VII con la edad ha sido previamente publicado (BROZOVIC et al, 1.974) (131).

La elevación del Factor VIII con la edad ha sido encontrado por algunos autores (NILSSON et al, 1.959; COOPERBERG et al, 1.961) (132, 133) pero negado por otros (PRESTON et al, 1.964) (134).

Un aumento en el nivel de fibrinógeno con la edad, pero no en los factores V y VII, ha sido encontrado en pacientes con enfermedad coronaria manifiesta (PITNEY et al; 1960) (57).

Más importancia sin embargo, tiene el hallazgo en esta investigación de un incremento en el nivel de varios factores de coagulación en pacientes con hiperlipidemias, comparados a grupos de edad similar de individuos aparentemente normales. Esto es particularmente cierto para las hiperlipoproteíneas de los tipos IIb y V, pero también aplica en un grado menor a los grupos IIa y IV. Durante el tiempo de esta investigación no hemos tenido pacientes de los tipos

I y III.

Los factores VII y IX estaban aumentados significativamente en los tipos IIa IIb y V mientras que el factor II estaba aumentado en los tipos IIb y V, y el factor X en los tipos IIb, IV y V. Los niveles medios de los factores II, VII, IX y X eran más elevados que en los controles en los cuatro grupos analizados pero las diferencias no fueron siempre significativas estadísticamente. Probablemente si hubiéramos incluido en nuestro estudio un número más elevado de pacientes todas esas diferencias se hubiesen hecho significativas.

Un intento ha sido llevado a cabo para determinar si estos resultados representan un verdadero aumento en la concentración de la proteína constitutiva del factor de Coagulación, o bién un simple artefacto, es decir un simple aumento en la actividad del factor. En un estudio previo (KIM et al, 1.976) (101) realizado en el mismo laboratorio sobre animales hiperlipémicos el nivel de protrombina fué determinado usando métodos en una sola fase (OWREN et al, 1.951) (105) o en dos fases (WARE et al, 1.949) (135) y fueron encontrados niveles comparablemente elevados en los dos tipos de determinación. En el presente estudio hemos obtenido un anticuerpo antiprotrombina específico y hemos analizado las muestras de plasma por dos métodos, uno de coagulación y otro inmunológico: el nivel de antígeno relacionado a la protrombina (o protrombina antigénica) estaba aumentado significativamente en las cuatro variedades de hiperlipoproteinemia analizadas.

Otra posible fuente de error considerada aquí fué que el nivel aumentado de lípidos plasmáticos pudiese afectar el sistema analítico y jugar un papel no específico, aumentando así el nivel aparente de los factores en los estudios de coagulación. Los lípidos podrían actuar de este modo al proveer una superficie catalítica adicional facilitando así su interacción con los factores analizados.

Sin embargo esto parece improbable por un número de -

razones: a) uno de los factores analizados, el V, no mostró aumento en los grupos hiperlipidémicos aún cuando la metodología de su análisis fué muy similar ó idéntica a la de otros factores que encontramos aumentados; b) la mayoría de los análisis llevados a cabo se hacen con lípidos añadidos los cuales deben ser de una clase bastante específica y estar en concentración óptima (MARCUS et al, 1.962) (17); c) el colesterol por sí mismo es inactivo en varios sistemas de Coagulación - tiempo de recalcificación, generación de la tromboplastina - pero combinado con otras fracciones fosfolípidas, principalmente fosfatidil-colina y fosfatidil-serina, tiene un efecto marcadamente sinérgico (SORBYE et al, 1.971; STERZING et al, 1.973) (136, 137).

En cualquier caso la mayoría de los lípidos plasmáticos no están libres sino unidos a proteínas por lo que los resultados de experimentos de adición a plasma de varias clases de lípidos con determinación de factores de Coagulación antes y después de la adición son de interpretación dudosa.

Sin embargo nosotros usamos ultracentrifugación para la separación de las lipoproteínas, es decir lípidos unidos a sus proteínas transportadoras, a partir de plasmas hiperlipémicos y así estudiar el posible efecto de su adición en sistemas de Coagulación.

De este modo hemos podido comprobar que la totalidad de los factores II, VII y X estudiados estaba en la fracción inferior que no contenía lipoproteínas, y que la adición de la capa superior lipídica a plasma normal no tenía ningún efecto sobre los análisis de Coagulación. Por ello parece probable que los lípidos plasmáticos aumentados no causan un aumento en la actividad de los factores de Coagulación sino que existe un aumento real en la concentración de éstos, paralelamente con el aumento de lípidos en sangre, probablemente a partir de mecanismos fisiopatológicos que están relacionados entre sí a nivel hepático o a nivel de la utilización periférica.

Este estudio ha sido limitado a los factores de Coagulación presentes en plasmas pobres en plaquetas, por lo que la función de estos elementos sanguíneos no ha sido evaluada. Sin embargo un reciente estudio (CARVALHO et al, 1.974) (83) de la función plaquetaria en individuos con hiperlipoproteinemias ha mostrado que en pacientes del tipo II las plaquetas agregan en respuesta a 1:25 de la concentración media de epinefrina, 1:3 de la concentración de colágeno y 1:3 de la concentración de ADP, cuando comparados a las respuestas de plaquetas procedentes de individuos normales. Además la total liberación de nucleótido estaba incrementada de 4 a 6 veces con todos los agentes agregantes. Sin embargo la liberación de los factores plaquetarios III y IV, la adhesividad plaquetaria y la retracción del coágulo fueron normales en estos pacientes de hiperlipoproteinemia de tipo II.

En contraste plaquetas procedentes de individuos con hiperlipoproteína del tipo IV mostraban una sensibilidad a ADP y colágeno normal, una liberación de nucleótido normal y una liberación de serotonina marcada con C_{14} normal.

Estos datos sugieren que una función plaquetaria incrementada puede contribuir a las complicaciones trombóticas de las hiperlipoproteinemias y puede complementar el efecto del aumento de nivel de los factores plasmáticos de Coagulación encontrado en este estudio.

En este momento quisiéramos hacer una observación - cuya validez puede ser limitada por el corto número de pacientes a que se aplica: entre los individuos que estudiamos, cinco tenían una hiperlipoproteinemia de tipo IIa familiar. Ellos tenían todos menos de 30 años; aún cuando se conoce que estos pacientes suelen desarrollar una arteriosclerosis muy temprana y a menudo mueren en las décadas de los 20 ó 30, ninguno de ellos tenían hasta el momento manifestaciones clínicas de arteriosclerosis. Si comparamos sus niveles plasmáticos en -

FACTORES K DEPENDIENTES

EN GRUPO IIa <30

grupo	n	II	II	IX	X
normal <30	16	103	87	101	93
		7.0▲	4.1	5.6	4.5
IIa <30	5	109	86	68	76
		11.5	4.7	5.7	6.1

▲ = ± Error Standard
factores en %

TABLA 11

DESCENSO DE LIPIDOS Y FACTORES CON DIETA

pacientes	fecha	colest.	triglic.	II	VII	X
Wilkowski	1-10-74	253	821	98	153	120
	13-11	198	268	92	79	73
Grienberg	2-10-74	330	118	100	150	78
	13-11	216	129	95	75	79
Levine	8-10-74	266	551	142	138	100
	26-11	217	134	136	80	62
Feeney	22-10-74	159	517	132	120	165
	5-11	170	274	114	86	101
	26-11	151	169	114	61	85
Peterson	22-10-74	309	1400	178	141	115
	12-11	282	176	119	123	130

colest. y triglic. en mg por 100 c.c.
factores en %

TABLA 12

factores del complejo protrombínico (II, VII, IX, X) a los obtenidos en el grupo de sujetos normales de menos de 30 años (tabla nº 11) puede observarse que ciertamente los valores medios no son más altos en los hiperlipémicos sino incluso más bajos -con la excepción del factor II- aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. La edad media de los cinco pacientes hiperlipémicos -17 años- bastante menor que la del grupo de normales-25 años- puede ser un factor pero de todos modos si esta observación se confirma con mayor número de pacientes, es importante afirmar que los niveles elevados de factores plasmáticos de Coagulación no parece ser una circunstancia precursora o concomitante con el desarrollo de arteriosclerosis.

Otra observación es la deducida de la tabla nº 12 que también ha de ser mirada con cierta reserva por el reducido número de pacientes. Entre los individuos hiperlipémicos estudiados, los incluidos en la citada tabla fueron seguidos en las fechas indicadas y los valores lipídicos en plasma fueron reducidos sin otro tratamiento que una dieta adecuada. Puede observarse como existe una tendencia manifiesta para los niveles de factores de Coagulación a descender al mismo tiempo que bajan los niveles lipídicos en sangre; o en otras palabras, que el tratamiento de la hiperlipidemia puede corregir los valores elevados de factores de Coagulación y la posible hipercoagulabilidad que ello conlleva.

El estudio del factor VIII por radioinmunoensayo (tabla nº 6) vino a confirmar los hallazgos de los tests de Coagulación de que no parecía existir una significativa diferencia entre los valores encontrados en hiperlipémicos y en individuos normales.

Tampoco hubo diferencia en el nivel del factor Von Willebrand en hiperlipémicos del grupo IIA y en normales.

En referencia a l estudio de los productos de degradación de la fibrina en individuos normales y en pacientes hiper

lipémicos (tabla nº 8), puede observarse como con excepción del grupo IV, estaban elevados en los otros grupos estudiados aunque la diferencia solo alcanzase significado estadístico en el grupo IIb. Probablemente si se hubiesen incluido más pacientes los productos de degradación del fibrinógeno y fibrina hubiesen estado elevados significativamente en los grupos IIIa y V también.

Solo se puede afirmar el hecho de estar elevados pues el significado es oscuro, particularmente a la vista de algunos estudios previos que mostraban una disminución de la actividad fibrinolítica y enfermedad cardíaca isquémica y otros que han mostrado que existe una respuesta fibrinolítica disminuida al estímulo del ejercicio en pacientes con hiperlipoproteinemias del tipo IV(EPSTEIN, 1.970) (138). Este hecho no podrá ser explicado hasta que no alcancemos un mejor conocimiento acerca del metabolismo del fibrinógeno y de la fibrina en circunstancias normales y patológicas. Sin embargo cabe la posibilidad a ser tenida en cuenta, que esos productos sean derivados de fibrina depositada en los vasos sanguíneos como consecuencia de un estado hipertrombótico. Así por ejemplo usando una técnica de inhibición de la hemaglutinación fué en contrado (RUCKLEY et al, 1.970) (139) un nivel medio de productos de degradación de la fibrina en suero más elevado en un grupo de pacientes en el postoperatorio afectados con trombosis venosa profunda, cuando comparados a otro grupo de postoperados sin trombosis venosa profunda.

También están aumentados PDF a más alto nivel en embolismo pulmonar aunque en este caso no está claro si se debe a la trombosis venosa profunda, al infarto pulmonar o a la Coagulación intravascular que puede complicar el infarto pulmonar.

La relevancia que pueden tener los hallazgos de esta investigación en enfermedad humana no está clara. Un aumento en los niveles de factores de Coagulación puede ser importante en la génesis de un estado hipercoagulable y de ese modo promover trombosis, pero la asociación no es directa.

Sin embargo estos hallazgos podrían indicar que los estados hiperlipoproteinémicos pueden ser también hipertrombóticos en virtud de los niveles elevados de algunos factores de Coagulación, y podría seguirse una terapia preventiva ya que como se muestra en la tabla nº12 el descenso en las cifras lipémicas parece conducir a un descenso paralelo en los niveles de factores de Coagulación.

II HIPERCOAGULABILIDAD SANGUINEA

Como capítulo final a esta discusión deseo exponer el resumen de la experiencia de otros investigadores que han tratado de dilucidar las circunstancias y cambios patológicos - que pudiesen definir un estado pretrombótico.

En realidad desde que WIRCHOW, 1.846 formulase su hipótesis acerca de la patogenia de las trombosis incorporando la triada de alteraciones en el flujo sanguíneo, alteraciones en los constituyentes de la sangre y alteraciones en la pared vascular, poco han cambiado las cosas pues la hipótesis sigue en pie, si bien algo modificada, pues hoy se reconoce que los tres factores no necesitan operar simultáneamente en cada caso de trombosis. Desafortunadamente a pesar de los años transcurridos, del dinero y esfuerzo consumidos en esta tarea aún hoy no disponemos de un simple análisis de sangre capaz de predecir un riesgo aumentado de trombosis o bien indicar que un estado inicial del accidente trombótico está ocurriendo. Sin embargo si conocemos una serie de alteraciones en los factores hemostáticos que pueden indicar un estado pretrombótico e igualmente una serie de factores genéticos, adquiridos y ambientales que predisponen a trombosis. Así pues en dos apartados sucesivos vamos a estudiar esos factores.

A.- ALTERACIONES EN LOS FACTORES HEMOSTATICOS QUE PUEDEN INDICAR UN ESTADO PRETROMBOTICO.-

1) Recuento y función plaquetaria.- Puesto que estos elementos juegan un papel fundamental en trombosis sobretudo arte-

rial, podría ser esperado que alteraciones en su número ó función pudiesen poner en evidencia una tendencia trombótica. La relación del recuento plaquetario y trombosis no es clara. Aún cuando existe un aumento en el número de plaquetas en situaciones en que trombosis es común como postoperatorio y postparto, sin embargo el incremento es máximo alrededor del décimo día en el postoperatorio mientras que alrededor del 50% de los casos de trombosis venosa profunda detectados con la técnica del fibrinógeno marcado con I₁₃₁ empiezan en el primer día postoperatorio (FLANC et al, 1.968) (140). Además un incremento muy marcado en el número de plaquetas está más ligado a accidentes hemorrágicos que trombóticos. Así pues un aumento en el recuento plaquetario es un pobre índice de predisposición trombótica (GUNZ, 1.960) (141).

En cuanto a la función plaquetaria tanto adhesividad aumentada al vidrio como agregación incrementada en respuesta al ADP han sido encontrados en pacientes con enfermedad cardíaca isquémica (ZAHAVI et al, 1.969) (142).

Igualmente adhesividad aumentada ocurre en casos de enfermedad vascular periférica y en pacientes con infarto agudo de miocardio o trombosis venosa reciente(HIRSH et al, 1.965; BYGDEMAM et al, 1.969) (143, 144). También adhesividad y agregación aumentada han sido encontradas en el postoperatorio y postparto, circunstancias en que aumenta la posibilidad de trombosis (BYGDEMAN et al, 1.966; BENNET, 1.967) (145, 146). Sin embargo otros autores (NEGUS et al, 1.969) (147) no hallaron diferencia en la adhesividad plaquetaria en el postoperatorio entre aquellos que desarrollan trombosis y aquellos que no la desarrollan aún cuando todos ellos la tuvieran incrementada.

Las complicaciones trombóticas son muy frecuentes en el período postesplenectomía lo cual puede ser debido no solo al incremento de la adhesividad plaquetaria sino también

a la trombocitosis tan común en esta circunstancia (HIRSH et al, 1.966) (148).

Aún cuando la adhesividad y agregación plaquetaria aumentadas observadas en el postoperatorio, postparto y postinfarto pueden ser debidas a una reacción de stress no específica, sin embargo existen buenas razones teóricas para creer que una alteración de la función plaquetaria está relacionada causalmente a un aumentado riesgo de trombosis; sin embargo aún no es posible identificar a los individuos susceptibles a través de estos estudios plaquetarios lo cual es debido en parte a las dificultades técnicas y a los errores que esos estudios conllevan.

2) Mecanismo de Coagulación.- Hipercoagulabilidad puede resultar teóricamente de la presencia de factores de Coagulación activado en exceso de la actividad inhibitoria. La importancia de la "actividad" de los factores opuesta a la "concentración" se ilustra por los experimentos en los que la infusión del factor X no activado en la vena yugular de un conejo no condujo a la formación de trombosis a pesar del estasis establecido pero la infusión de menos de una centésima parte de la cantidad del factor X en estado "activado" condujo a trombosis(WESSLER et al, 1.968) (149). A este respecto son de gran interés los experimentos en animales en los que se demostró que el hígado de conejo es capaz de eliminar de la circulación sanguínea los factores IX y XI activados con lo que la situación de hipercoagulabilidad inducida por la inyección de suero es rápidamente atenuada; sin embargo si experimentalmente la circulación hepática es ocluida después de la inyección de suero, el estado hipercoagulable se prolonga y trombosis difusas ocurren en los sitios de estasis venoso(DEYKIN, 1.966) (150).

La relación de una concentración aumentada de uno ó más factores de Coagulación a " hipercoagulabilidad " no está totalmente definida aún cuando ha sido aceptada por muchos autores (EDITORIAL, LANCET, 1.973) (151). En efecto exis -

ten varias enfermedades o situaciones en las que se presenta una elevación de factores de Coagulación y una tendencia aumentada a padecer accidentes trombóticos: por ejemplo la elevación de los factores VII, VIII y X en el embarazo (PECHET et al, 1.961; STRAUSS et al, 1.963; TALBERT et al, 1.954) (152, 153, 154); el aumento del factor V después del parto (DAVIDSON et al, 1.963a) (155) y de los factores VIII, IX y X en el período postoperatorio (EGEBERG, 1.962b) (156); (DAVIDSON et al, 1.963b) (157).

Elevación de un número de factores de Coagulación ha sido observada en pacientes que han sufrido previamente un accidente trombótico: aumento en el factor VII (ALEXANDER, 1.959) (158); factor V (OLWIN et al, 1.950) (159); factor VIII (COOPERBERG et al, 1.961) (133) han sido encontrados por esos autores. Además las observaciones de familias con niveles elevados de factor V (GASTON, 1.966) (160) ó factor VIII (PENICK, et al, 1.966) (161) que tienen una alta incidencia de trombosis espontáneas presta apoyo al concepto de que niveles elevados de factores de Coagulación pueden ser responsables de un estado hipercoagulable.

Además animales con hiperlipidemia inducida por dieta (DAVIDSON et al, 1.962; MERSKEY et al, 1.964; NAIMI et al, 1.961) (88, 89, 90) ó congénita (KIM et al, 1.976) (101) tienen niveles aumentados de factores de Coagulación y ratas hiperlipidémicas congénitamente obstruyen un by-pass aórtico implantado mucho más rápidamente que ratas normales.

También es importante considerar que los cambios conducentes a Coagulación y trombosis pueden ocurrir solo localmente y no ser detectado en la circulación general. Así se ha visto que el tiempo de Coagulación de sangre venosa uterina en el momento de la separación placentaria está marcadamente acortado cuando comparado a solo un cambio mínimo que ocurre en la sangre venosa periférica en ese momento (BONNAR et al 1.970) (162).

A pesar de todos estos hechos es posible que un aumento en la concentración ó actividad de factores de Coagulación por sí solos no puedan provocar trombosis como lo demuestran los experimentos de BOTTI et al, 1.964 (163). Ellos creaban en animales de experimentación un estado hipercoagulable por infusión de ácido elálgico, el cual activa el factor XII (RATNOFF et al, 1.964) (164). De ese modo aquellos autores encontraban un marcado acortamiento del tiempo de Coagulación pero trombosis no ocurría. Estasis venoso sólo, tampoco daba lugar a trombosis ero ésta surgía después que el animal había sido hecho hipercoagulable por la inyección de ácido elálgico y estasis era provocado en un territorio venoso. Es posible pués que al menos dos de los tres factores de WIRCHOW sean necesarios para la producción de trombosis, y que un aumento en la concentración o actividad de los factores de Coagulación suponga un riesgo de trombosis.

En cuanto al fibrinógeno plasmático éste se halla aumentado en un número de situaciones en que trombosis es común, como por ejemplo en embarazo, puerperio y período postoperatorio pero como se ha dicho antes otros factores están también aumentados y por ello la influencia de este factor individualmente considerado es defícil de evaluar. Puede que parte de su efecto pro-trombótico se haga por incremento de la viscosidad sanguínea (DINTENFASS, 1.962; MERRILL et al, 1.963) (165, 166) pero en conjunto la evidencia de que un nivel de fibrinógeno elevado predispone a trombosis es escasa.

3) Complejos de los monómeros de fibrina.- La trombina ataca enzimáticamente al fibrinógeno y separa dos fragmentos llamados fibrinopéptidos A y B y deja un fragmento mayor llamado monómero de fibrina, el cual polimeriza para dar origen a los polímeros de fibrina que formarán el coágulo. El monómero de fibrina puede formar complejos solubles con fibrinógeno ó con productos de degradación de la fibrina producidos por la acción de la plasmina sobre el fibrinógeno o fibrina.

En 1.970 FLETCHER et al (167) usando una técnica de cromatografía en gel detectaron en plasma la presencia de esos complejos y encontraron una buena correlación con la técnica del fibrinógeno marcado con I_{131} para la detección de trombosis venosas incipientes. Ellos concluyen que la presencia de complejos de monómeros de fibrina y fibrinógeno - indican un estado de hipercoagulabilidad que precede a trombosis. Este trabajo es ciertamente importante y está pendiente de confirmación y extensión.

La presencia de los citados complejos puede ser detectada más simplemente aunque menos específicamente a través de los tests de paracoagulación usando etanol, sulfato de protamina ó reducción de la temperatura. Todos ellos actúan liberando el monómero de fibrina del complejo permitiendo así su polimerización y visualización como fibrina. Se ha dicho que el test del etanol es más específico para la presencia de monómeros de fibrina en plasma (GODAL et al, 19 71) (168) pero la confirmación clínica de esta afirmación es aún necesaria.

4) Inhibidores de la Coagulación.- Si existe un descenso en los inhibidores de la Coagulación, teóricamente se producirá un estado de hipercoagulabilidad. Tenemos una confirmación de ello en la práctica por el hecho de que pacientes con una deficiencia congénita de antitrombina III muestran una incidencia aumentada de trombosis (EGEBERG, 1.955) (169). El nivel también se ha notado descendido en trombosis venosas ó fenómenos embólicos (KAULLA et al, 1.967) (170) pero ello puede ser una consecuencia más que una causa de la trombosis,

5) Actividad fibrinolítica.- Una disminución de la actividad fibrinolítica podría teóricamente aumentar la tendencia a trombosis al permitir la acumulación de fibrina y oclusión de los vasos sanguíneos. Muchos estudios se han llevado a cabo acerca de este tema con resultados no siempre concordantes: - Así usando técnicas que miden el activador del plasminógeno

circulante, una disminución de la actividad fibrinolítica ha sido encontrada en pacientes con arteriosclerosis de las extremidades inferiores (NESTEL, 1.959) (171); enfermedad coronaria (CHAKRIBARTI et al, 1.968) (172) e infarto pulmonar previo (ELLISON et al, 1.965) (173). En cambio no tal diferencia fué encontrada en otros estudios como por ejemplo en pacientes con enfermedad coronaria (MERSKEY et al, 1.960; KATZ et al, 1.963) (27, 164) cuando se les compara a controles de edad similar.

La frecuencia de enfermedad tromboembólica aumenta con la edad pero no existen datos concluyentes de que la actividad fibrinolítica disminuya con la edad. Es también conocido el hecho de que la oclusión venosa conduce a una liberación del activador del plasminógeno de la pared vascular; pues bien, se ha encontrado que tal respuesta aumenta con la edad en los miembros superiores, mientras que disminuye en los miembros inferiores (ROBERTSON et al, 1.972) (175) lo cual puede ser significativo dada la mayor relativa frecuencia de trombosis venosas en miembros inferiores.

Por otra parte un estudio llevado a cabo usando una modificación de la técnica de TODD, 1.958 (176) ha demostrado que la actividad fibrinolítica en venas trombosadas es casi nula a nivel de la trombosis y está disminuida en regiones distantes del trombo (PANDOLFI et al, 1.969) (177) aunque estos cambios pueden ser simplemente una consecuencia más que una causa del proceso trombótico. Igualmente se puede criticar de otros estudios que han encontrado una disminución de la actividad fibrinolítica después de episodios trombóticos. Estos hallazgos no pueden ser extrapolados y considerados como importantes factores de un estado pretrombótico. En conjunto, la medida de la actividad fibrinolítica en sangre tiene un escaso valor discriminatorio en la evaluación de una predisposición a trombosis.

En cuanto a los inhibidores de la fibrinolisis tampoco del estudio de éstos se ha obtenido una evidencia conclusi-

va que pueda ser usada para predecir trombosis, aún cuando un nivel elevado del inhibidor de la activación ha sido encontrado en pacientes con trombosis venosa recurrente (NILSON et al, 1.961) (178). También han sido encontrados niveles altos de actividad antiplasminica en algunos pacientes con trombosis (MAEYE, 1.961) (179).

B.- CONDICIONES AMBIENTALES, GENETICAS Y ADQUIRIDAS QUE PREDISPONEN A TROMBOSIS.

Estas condiciones ó factores han sido implicados por medios epidemiológicos y serán revisados brevemente con referencia especial a los cambios hemostáticos que pueden ser responsables de tal asociación.

1) Grupo sanguíneo.- Se ha visto que entre los pacientes tratados por tromboembolismo venoso el grupo O es más raro que en la población general (DICK et al, 1.963) (180). También ha sido notado un aumentado riesgo de infarto de miocardio en personas del grupo A (BRONTE-STEWARD et al, 1.962) (181) e igualmente ha sido hallado que la oclusión arterial de las extremidades inferiores está unida al grupo A (KINGSBURY, 1.971) (182). Todo ésto puede significar que factores mediados por los grupos sanguíneos pueden tener un papel en la génesis de trombosis. Así el factor VIII ha sido encontrado elevado en personas del grupo A (PRESTON et al 1.964) (134). También la concentración media de antitrombina III ha sido encontrada más baja en donantes normales del grupo A que en los del grupo O (FAGERHOLD et al, 1.971) (183) aunque ésto puede ser secundario a un aumentado consumo durante la trombosis.

2) Hiperlipoproteinemias.- Estas constituyen el objeto de este trabajo y han sido ampliamente discutidas anteriormente.

3) Homocistinuria.- Es un error innato del metabolismo - asociado con retardo mental y una tendencia marcada a trombosis arterial y venosa (CARSON et al, 1.965) (184). La causa de esta tendencia ha sido atribuida a adhesividad plaquetaria au-

mentada (Mc DONALD et al, 1.964) (185) ó a la activación del factor XII por homocisteína (RATNOFF, 1.964) (186).

4) Policitemia Vera.- Trombosis es una complicación frecuente y la más común causa de muerte (CHIEVITZ, et al, 1.962) (187). El aumento de viscosidad es clásicamente considerado el factor principal, pero el elevado recuento plaquetario puede ser importante también.

5) Enfermedad maligna.- Desde las primeras observaciones de TROUSSEAU en 1.872 la tendencia a desarrollar trombosis por muchos cánceres es un hecho conocido y entre las alteraciones encontradas en el mecanismo hemostático figuran el aumento en el recuento plaquetario(LEVIN et al, 1.964) (188); adhesividad plaquetaria aumentada (MOOLTEN et al, 1.963) (189); factor IX aumentado (WATERBURY et al, 1.967) (190) y aumento en la concentración del factor VIII(AMUNDSEN et al, 1.963) (191) y aumento en los factores V, VIII, IX y XI (MILLER et al, 1.967) (192).

6) Diabetes Mellitus.- Esta es una enfermedad con reconocida tendencia a arteriosclerosis prematura y a oclusión vascular como complicaciones. En diabéticos ha sido encontrado - un aumento en la adhesividad plaquetaria al vidrio(MOOLTEN et al, 1.963)(189); aumento en la secreción del factor plaquetario IV (CHMIELEWSKI et al, 1.970) (193); elevación del factor VIII (EGEBERG, 1.963) (194) y una actividad fibrinolítica disminuida(FEARNLEY et al, 1.963) (195).

7) Contraceptivos orales.- A través de estudios epidemiológicos se ha podido evidenciar una tendencia aumentada a padecer accidentes tromboembólicos en mujeres tomando contraceptivos a base de estrógeno y progesterona (VESSEY et al, 1.968) (196).

La mayoría de los investigadores han encontrado solo alteraciones mínimas en el número de plaquetas ó en su adhesividad, pero sin embargo la agregación plaquetaria ha sido en -

contrada elevada en respuesta a ADP en mujeres tomando contraceptivos conteniendo estrógenos (POLLER et al, 1.969) (197) pero no progestágenos solo (POLLER et al, 1.971) (198).

Una acelerada generación de tromboplastina ha sido encontrada así como niveles altos de fibrinógeno (AMBRUS et al, 1.969) (199); protrombina elevada (RUTHERFORD et al, 1.964) (200); factor VIII elevado, y los factores VII y X están siempre aumentados después del tercer ciclo (POLLER et al, 1.966) (201). Una reducción en la actividad de la - antitrombina III en plasma ha sido encontrada (HOWIE et al, 1.970) (202). Los efectos de los contraceptivos sobre el - sistema fibrinolítico no estan del todo aclarado.

Complejos de monómeros de fibrina han sido detectados en mujeres tomando contraceptivos (ALKJAERSIG et al, - 1.970) (203) según la técnica descrita anteriormente en este capítulo y también fibrinógeno precipitable por el frio se - encontró en 25% de esas mujeres (PINDYCK et al 1.970) (204)

8) Tabaco.- Fumar cigarrillos ha sido incriminado como un factor causal de enfermedad coronaria arterial (DOLL et al 1.964) (205). El mecanismo no ha sido del todo aclarado pero se ha podido observar un aumento transitorio de la actividad plaquetaria, concretamente de su adhesividad, relacionado a un aumento en el nivel de ácidos grasos no esterificados (MURCHISON et al, 1.966) (206). También se ha observado que el aumento normal del fibrinógeno con la edad está acentuado en fumadores (OGSTON et al, 1.970) (207).

Puede observarse pues que son muchas las circunstancias implicadas en la aparición de accidentes trombóticos, en la mayoría de los casos por mecanismos que no están del todo - dilucidados (RAWLES et al, 1.973) (208).

Nuestro propósito ha sido el de tratar de contribuir al esclarecimiento de los posibles mecanismos a través de los cuales las hiperlipoproteinemias pudiesen promover su reconocida tendencia a desarrollar complicaciones trombóticas y arterioscleróticas.

-----oOo-----

CAPITULO V

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1.- Hemos estudiado el componente plasmático de la Coagulación sanguínea en pacientes con diversos tipos de hiperlipoproteinemias comparándolos a sujetos normales de edad similar, tratando de encontrar una diferencia que explique la marcada predisposición de esos pacientes a sufrir complicaciones vasculares trombóticas.

2.- Hemos estudiado 105 individuos de ambos sexos, 29 normales y 76 padeciendo hiperlipoproteinemias de los tipos IIa (14), IIb (24), IV (32) y V (6). En ellos hemos determinado:

- a) Colesterol y triglicéridos plasmáticos.
- b) Concentración en plasma de los factores de Coagulación Fibrinógeno, Protrombina, V, VII, VIII, IX, X y Plaquetas siguiendo procedimientos standard de Coagulación.
- c) El factor VIII por radioinmunoensayo.
- d) El factor de VON WILLEBRAND en los grupos IIa y normal por el método de la ristocetina.
- e) Los productos de degradación de la fibrina por un método inmunológico de inhibición de la aglutinación de hematíes tratados con ácido tánico.
- f) La protrombina en plasma por medio de una inmuno-electroforesis cuantitativa según técnica descrita por LAURELL.
- g) Ultracentrifugación en gradientes de densidad

1.063 y 1.210 fué empleada para la separación de las fracciones lipídicas y la realización de experimentos de adición a plasma normal.

3.- Hemos dividido los individuos normales en dos grupos: aquellos de edad igual ó superior a 30 años y aquellos de edad inferior a 30 años; hemos encontrado que existe un aumento en el nivel de fibrinógeno y factores de Coagulación V y VII (factor VII cuando determinado con la técnica usando substrato artificial) con la edad. Los controles de edad igual ó superior a 30 años presentan niveles más altos de estos factores que los controles normales de edad inferior a 30 años.

4.- Los pacientes con hiperlipoproteinemias de los tipos IIb y V tienen niveles de los factores de Coagulación del complejo protrombínico (II, VII, IX y X) significativamente más elevados que los controles normales de edad comparable. Los factores VII y IX están también elevados en la hiperlipoproteinemia del tipo IIIa y el factor X en el tipo IV.

5.- Ninguna diferencia entre hiperlipémicos y normales ha sido encontrada para plaquetas ni para los factores de Coagulación fibrinógeno, V y VIII (este último determinado por un método de Coagulación y por radioinmunoensayo).

6.- El factor de VON WILLEBRAND no está aumentado en la hiperlipoproteinemia de tipo IIIa comparado al grupo control.

7.- Los métodos turbidimétricos aplicados a la determinación de fibrinógeno en plasma dan resultados falsamente bajos en las hiperlipoproteinemias de elevado contenido en

triglicéridos. En efecto nosotros encontramos niveles significativamente más bajos en la hiperlipoproteinemia de tipo V comparados al grupo control normal cuando usamos el método - turbidimétrico descrito por ELLIS y STRANSKY, mientras que no tal diferencia fué hallada cuando a esos mismos plasmas se aplicó el método no turbidimétrico de RATNOFF y MENZIE.

8.- Los productos de degradación de la fibrina están aumentados en la hiperlipoproteinemia del tipo IIb lo cual podría reflejar una incrementada tendencia trombótica en este grupo, siendo aquellos el resultado de la eliminación de depósitos de fibrina en los vasos sanguíneos.

9.- El aumento en el nivel de protrombina encontrado en estudios de Coagulación es también detectado al estudiar el antígeno relacionado a la protrombina por un método inmunológico, lo cual indica que no se trata simplemente de un aumento de actividad sino de un verdadero aumento de la proteína - constituyente de ese factor de Coagulación.

10.- La fracción rica en colesterol y triglicéridos que flota en gradientes de densidad 1.210 ó 1.063 por ultracentrifugación no contiene actividad alguna de los factores de Coagulación II, VII y X, los cuales se hallan todos contenidos - en la fracción inferior ausente ó pobre en lípidos.

11.- La adición de esa fracción superior de ultracentrifugación, ausente en factores de Coagulación y rica en lipoproteínas, a un plasma normal no produce un aumento en éste de la actividad de los factores de Coagulación II, VII y X, lo - cual interpretamos como una prueba adicional de que el aumento de esos factores en las hiperlipemias es real y no un simple artefacto inducido por la aumentada concentración de lípidos.

12.- El descenso en los niveles lipídicos en sangre por medio del tratamiento dietético parece ir acompañado de un descenso en los niveles de factores de Coagulación previamente aumentados; ésto sugiere que los mecanismos fisiopatológicos responsables de la hiperlipidemia y aquellos responsables del incremento de los factores del complejo protrombínico están de algún modo interconectados.

13.- Los hallazgos expuestos pueden tener importancia en la génesis de arteriosclerosis y trombosis que comúnmente afectan a estos pacientes hiperlipoproteínémicos y particularmente, de un modo más directo, contribuyen al esclarecimiento de las relaciones existentes entre los lípidos sanguíneos y el proceso de Coagulación de la sangre.

-----oCo-----

CAPITULO VI

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-WOOLDRIDGE, L.C. On intravascular clotting.
J. Physiology (London) 4, 226 (1883).
- 2.-ASHFORD, T.P. and FREIMAN, D.G. The role of the endothelium in the initial phases of thrombosis.
American Journal of Pathology 50, 257, 1967.
- 3.-MAC FARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biologic amplifier. Nature 202, 495, 1964.
- 4.-MAC FARLANE, R.G. The basis of the cascade hypothesis of blood clotting. Thromb. Diath. Hemorrh. 14, 591, 1966.
- 5.-DAVIE, E.W. and RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science 145, 1310, 1964.
- 6.-STRAUB, W and DUCKERT, F. The formation of the extrinsic prothombin activator. Thromb. Diath. Haemorrh. 5, 402, 1961.
- 7.-SHERRY, S., ALKJAERSIG, N. and FLETCHER, A.P. Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man. Physiology Review 39: 343, 1959.
- 8.-SHERRY, S. Fibrinolysis. Annual Review of Medicine. 19, 247, 1968.
- 9.-SHERRY, S. Mechanisms of Fibrinolysis. Chapter 134 (p. 1105) in Williams, W. J. et al. eds. Hematology. Mc Graw-Hill. New York, 1972.

- 10.--SHINOWARA, G. Y. Enzyme studies in human blood. The isolation and characterization of thromboplastic cell and plasma components. *J. Lab. Clin. Medic.* 38, 11, 1951.
- 11.--QUICK, A.J., GEORGATOS, J.G. and HUSSEY, C.V. The clotting activity of human erythrocytes. *Amer. J. Medical Scienc.* 228, 207, 1954.
- 12.--SHINOWARA, G.Y. Thromboplastic cell component: the lipoprotein of erythrocytes and platelets. *Acta Haematologic Jap.* 24, 716, 1961.
- 13.--MARCUS, A.J., ZUCKER-FRANKLIN, D., ULLMAN, H.L., SAFIER, L.B. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *Journal of Lipid Research* 10: 108, 1969.
- 14.--MARCUS, A.J., ZUCKER-FRANKLIN, D., SAFIER, L.B. and ULLMAN, H.L. Studies on human platelets granules and membranes. *J. Cli. Invest.* 45: 14, 1966.
- 15.--HOWELL, W.H. Theories of blood coagulation. *Physiology Review* 15: 435, 1935.
- 16.--SURGENOR, D.M. and WALLACH, D.F.H. Biophysical aspects of platelet reaction mechanisms of clotting. In *Blood platelets*, edited by S.A. Johnson et al.(p. 289) Little, Brown; Boston 1961.
- 17.--MARCUS, A.J., ULLMAN, H.L., SAFIER, L.B. and BALLARD, H.S. Platelet phosphatides. Their fatty acid and aldehyde composition and function in different clotting systems. *J. Cli. Invest.* 41: 2198, 1962.

- 18.-MILLER, S.E. A textbook of Clinical Pathology. 6th Edition (p. 237). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1960.
- 19.-MAJERUS, P.W., SMITH, M.B. and CLAMOS, C.H. Lipid metabolism in human platelets. Evidence for a complete fatty acid synthesizing system. J. Clin. Invest. 48: 156, 1965.
- 20.-DEYKIN, D. and DESSER, R.K. The incorporation of acetate and palmitate into lipids by human platelets. J. Clin. Invest. 47: 1590, 1968.
- 21.-MAJERUS, P.W. and LASTER, R. Fatty acid biosynthesis in human leucocytes. J. Clin. Invest. 46: 1596, 1967.
- 22.HENNES, A.R., AWAI, K., HAMMARSTRUND, K. and DUBOFF, G. Carbon 14 in the carboxil carbon of fatty acids formed by platelets from normal and diabetic subjects. Nature 210: 839, 1966.
- 23.-FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I., REES, R.S. Fat transport in lipoproteins: an approach to mechanisms and disorders. N. Engl. J. Medicine 276: 34, 94, 148, 215, 273, 1967.
- 24.-SCHUMAKER, U.W. and ADAMS, C.H. Circulating lipoproteins. Ann. Rev. Biochemistry 38: 113, 1969.
- 25.-LEVY, R.I. et al. NIH Conference. Dietary and drug treatment of primary hyperlipoproteinemia. Annals Int. Medicine 77: 267, 1972.
- 26.-HAVEL, R.J. Disorders of the lipid metabolism. In Cecil-Loeb Textbook of Medicine. Beeson and Mc Dermott eds. W.B. Saunders Company, 1971.

- 27.-BERSKEY, C., GORDON, H., LACKNER, H., SCHRIRE, V., KAPLAN, B.J. et al. Blood coagulation and fibrinolysis in relation to coronary heart disease. Brit. Medical Journal 1: 219, 1960.
- 28.-ROKITANSKI, C. In A Manual of Pathological Anatomy, IV (p. 261). Blanchard and Lea. Philadelphia, 1855.
- 29.-DUGUID, J.B. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of aortic atherosclerosis. J. Path. Bacter. 58: 207, 1946.
- 30.-MATHUR, K.S., WAHI, P.N. and MALHOTRA, K.K. Factors influencing thrombus formation in vivo. Indian Journal Med. Research 48: 31, 1960.
- 31.-MUSTARD, J.F. and MURPHY, E.A. Effect of different dietary fats on blood coagulation, platelet economy and blood lipids. Brit. Med. J. I: 1951, 1962.
- 32.-SHEEHY, T.W. and EICHELBERGER, J.W. Alimentary lipemia and the coagulability of blood analyzed by thromboelastography and silicone clotting time. Circulation, 7: 929, 1958.
- 33.-NITZBERG, S.I., PEYMAN, M.A., GOLDSTEIN, R. and PROGER, S. Studies of blood coagulation and fibrinolysis in patients with idiopathic hyperlipemia and primary hypercholesteremia before and after a fatty meal. Circulation 19: 676, 1959.
- 34.-MC DONALD, G.A. and FULLERTON, H.W. Effect of phenindione and bed rest in blood coagulability following a high fat intake. Lancet II, 1111, 1960.

- 35.--MUSTARD, J.F. Blood coagulation in subjects with and without clinical evidence of atherosclerotic vessel disease. Canadian Med. Assoc. J. 79: 735, 1958.
- 36.--DAILLEY, J.P., FULLGRABE, E.A., COLESCOTT, R.L. and TILLDESON, Z.P. American Journal of Clinical Nutrition, 8: 34, 1960.
- 37.--O,BRIEN, J.R. Blood coagulation before and after a fatty meal in patients with coronary artery disease and healthy controls. Lancet I, 410, 1958.
- 38.--BILLIMORIA, J.D., DRYSDALE, J., JAMES, D.C.O., MACLAGAN, N.F. Determination of fibrinolytic activity of whole blood with special reference to the effects of exercise and fat feeding. Lancet II, 471, 1959.
- 39.--KWAAN, H.C., MC FADZEAN, A.J. Inhibition of fibrinolysis in vivo by feeding cholesterol. Nature, 179: 260, 1957.
- 40.--GILLMAN, T., NAIDOO, S.S., HATHORN, M. Fat, fibrinolysis and atherosclerosis in Africans. Lancet II, 696, 1957.
- 41.--BUCKELL, M. and ELLIOT, F.A. Effect of butter lipemia on the rate of clot lysis in normal males. Lancet I, 662, 1959.
- 42.--HOUGIE, C. and AYERS, F. Lipemia and fibrinolytic potentiality. Lancet I, 186, 1960.
- 43.--GAJEWSKI, J. Effect of the consumption of various fats on the fibrinolytic activity of the serum in normal subjects and coronary patients. J. Athe-

- rosclerosis Research I, 222, 1961.
- 44.--JOHNSON, S.A., SCHNEIDER, C.L. Platelets and their plasma cofactor activity in the action of purified prothrombin. *Science* 117: 229, 1953.
- 45.--STEFANINI, M. and MURPHY, I.S. *Journal of Clinical Investigation*. 35: 355, 1956.
- 46.--GREIG, H.B.W. and CORNELIUS, E.M.S. Inhibition of fibrinolysis by alimentary lipemia. *African J. of Medical Sciences* 26: 4, 1961.
- 47.--BANG, N.U. and CLIFFTON, E.E. The effect of alimentary hyperlipemia on thrombolysis in vivo. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 4: 149, 1960.
- 48.--BERGENTZ, S.E., GELIN, L.E. and RUDENSTAM, C.M. Fat, thrombosis and anticoagulants. A clinical study. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 5: 474, 1961.
- 49.--BUZINA, R., KARVONEN, M.J., ROINE, P. and TURPEINEN, O. Blood coagulation after a fatty meal. *Lancet* II, 287, 1961.
- 50.--CLIFFTON, E.E. and BURCHELL, A.R. Thrombosis and Diathesis Haemorrhagic 5: 463, 1960-61.
- 51.--PEYMAN, M.A., NITZBERG, S.I., GOLDSTEIN, R., NOTHMAN, M. and PROGER, G. *American Journal of Medicine*, 28, 384, 1960.
- 52.--MERSKEY, C. and MARGUS, A.J. Lipids, coagulation and fibrinolysis. *Annual Review of Medic.* 14: 323, 1963.
- 53.--MC DONALD, L. and EDCILL, M. Coagulability of blood in ischaemic heart disease. *Lancet* I, 115 1959.

- 54.-MC DONALD, L. and EDGILL, M. Dietary restrictions and coagulability of blood in ischaemic heart disease. *Lancet* I, 996, 1958.
- 55.-PASCUZZI, C.A., SPITTEL, J.A., THOMPSON, J.H., OWEN, C.A. and MATHEES, C. Thromboplastin generation accelerator, a newly recognized component of the blood coagulation mechanism present in excess in certain thrombotic states. *J. Clin. Invest.* 40: 1006, 1961.
- 56.-GOLDRICK, R.B., WHITE, H.M. *Nature* 182: 1743 1958.
- 57.-PITNEY, W.R. and ELLIOT, M.H. Plasma antihemophilic factor concentration in the Australian aborigine and in conditions associated with hyperglobulinemia. *Nature* 185: 397, 1960.
- 58.-NAIMI, S., GOLDSTEIN, R., PROGER, S. *Bulletin Tufts-New England Medical Center*, 6: 8, 1960.
- 59.-GZARNIECKI, W. Fibrinolytic activity of blood in intermittent claudication. *Lancet* I, 289, 1960.
- 60.-STAMLER, J. Epidemiology of coronary heart disease. *Medical Clinics of North America* 57, 1, 1973.
- 61.-STORMORKEN, H. In *Dietary fats and thrombosis*, S. Renaud and A. Nordøy editors. Basle, S. Karger, 1974.
- 62.-KEYS, A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 41 (suppl. 1), 1970.
- 63.-SPAIN, D.M. and BRADES, V.A. Sudden death from coronary heart disease. *Chest*, 58: 107, 1970.

- 64.-BAROLDI, G. Acute coronary occlusion as a cause of Myocardial Infarction and sudden coronary death. American Journal Cardiol. 16: 859, 1965.
- 65.-HAEREM, J.W. Sudden coronary death. The occurrence of platelet aggregates in the epicardial arteries of man. Atherosclerosis 14: 417, 1971.
- 66.-HAEREM, J.W. Platelet aggregates in intramyocardial vessels of patients dying suddenly and unexpectedly of coronary artery disease. Atherosclerosis, 15: 199, 1972.
- 67.-HAUST, M.D., MORE, R.H. and MOVAT, H.Z. The mechanism of fibrosis in atherosclerosis. American J. of Pathology 35: 265, 1959.
- 68.-WARNER, E.D., HOAK, J.C. and CONNOR, W.E. The role of fatty acids in platelet aggregation and thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh. 26: 249, 1967.
- 69.-KERR, J.W., PIRRIE, R., MAC AULAY, I. and BRONTE-STEWART, B. Platelet aggregation by phospholipids and fatty acids. Lancet I, 1296, 1965.
- 70.-CONNOR, W.E., HOAK, J.C., WARNER, E.D. The effect of fatty acids on blood coagulation and thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh. 13: 89, 1965.
- 71.-DIDISHEIM, P. and MIBASHAN, R.S. Activation of the Hageman factor by long-chain saturated fatty acids. Thromb. Diath. Haemorrh. 9: 346, 1963.
- 72.-ANDREOLI, U.M., MAFFEI, F. and THONON, G.C. Platelet lipids modification by fatty acids. In Dietary Fats and Thrombosis. S. Renaud and A. Nordøy editors. Basle, S. Karger, 1974.

- 73.-NORDOY, A. and RODSET, J.M. The influence of dietary fats on platelets in man. *Acta Medica Scandinavia* 190: 27, 1971.
- 74.-RENAUD, S. and GAUTHERON, P. Dietary fats and experimental thrombosis. In *Dietary Fats and Thrombosis*. S. Renaud and A. Nordöy editors (p. 53). Basle, S. Karger 1974.
- 75.-IACONO, A., ZELLNER, D.C., PACLETTI, R. et al. Comparison of blood platelets and erythrocyte lipids in man in three age groups from three regions: Milan, Cincinnati and Sicily. In *Dietary Fats and Thrombosis*. S. Renaud and A. Nordöy editors. Basle, S. Karger 1974.
- 76.-RENAUD, S., KUBA, K., GOULET, C., LEMIRE, Y., ALLARD, C. Relationship between fatty acid composition of platelets and platelet aggregation in rat and man. Relation to thrombosis. *Circulation Research*, 25: 552, 1970.
- 77.-NORDOY, A. and RODSET, J.M. Platelet phospholipids and their function in patients with ischaemic heart disease. *Acta Med. Scand.* 188: 133, 1970.
- 78.-NORDOY, A. and RODSET, J.M. Platelet function and platelet phospholipids in patients with hyperbeta-lipoproteinemia. *Acta Med. Scand.* 180, 385, 1971.
- 79.-RENAUD, S., GAUTHERON, P. and ROSENSTEIN, H. Platelet factor III activity in washed platelets. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 30, 566, 1973.
- 80.-COTTON, R.C., BLOOR, K. and ARCHIBALD, G. Interrelationships between platelet response to ADP, blood coagulation and serum lipids in patients with peripheral occlusive atherosclerosis.

Atherosclerosis 16: 337, 1972.

- 81.-KORSAN BENGSTSEN, K., WILHELMSEN, L., ELMFELDT, D. and TIBBLIN, G. Blood coagulation and fibrinolysis in man after Myocardial Infarction compared with a representative population sample. Atherosclerosis 16: 83, 1972.
- 82.-RENAUD, S., GAUTHERON, P., ARBOGAST, R. and DUMONT, E. Platelet factor III activity and platelet aggregation in patients submitted to coronarography. Scand. J. Haematology 12: 85, 1974.
- 83.-CARVALHO, A., COLMAN, R. and LEES, R.S. Platelet function in hyperlipoproteinemia. N. Engl. J. Medicine, 290: 434, 1974.
- 84.-CHRISTAKIS et al. (9 autores). A dietary approach to the prevention of coronary heart disease- a seven year report. Amer. J. Public Health 56: 299, 1972.
- 85.-LEREN, P. The effect of plasma cholesterol lowering diet in male survivors of Myocardial Infarction. Acta Med. Scand. 181:(suppl. 466), 1, 1966.
- 86.-MIETTINEN, M., TURPEINEN, O., KARVONEN, M.J. Effect of cholesterol lowering diet on mortality from coronary heart disease and other causes. Lancet I, 835, 1972.
- 87.-HARTROTT, W.S. and THOMAS, W.A. Myocardial Infarction in rats fed diets containing high fat, cholesterol, thiouracil and sodium cholate. J. Amer. Med. Assoc. 164: 1899, 1957.
- 88.-DAVIDSON, E. and HOWARD, A.N. Blood coagulation studies in rats given diets which produce thrombosis and atherosclerosis. Brit. J. Experimental Pathology, 43: 166, 1962.

- 89.-MERSKEY, C., WOHL, H. and OKA, N. Changes in blood coagulation and fibrinolysis in rats fed atherogenic diets. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 10: 295, 1964.
- 90.-NAIMI, S., GOLDSTEIN, R., NOTHMAN, M.M., WILGRAM, G.F. and PROGER, S. Changes in blood coagulation and fibrinolysis in the presence of dietary induced lipemia. *Circulation*, 24, 1002, 1961.
- 91.-MUSTARD, J.F., ROWSELL, H.C. and MURPHY, E.A. Diet and thrombus formation. Quantitative studies using an extracorporeal circulation in pigs. *J. Clin. Invest.* 42: 1783, 1963.
- 92.-MATHUES, J.K., WOLFF, C.E., CEVALLOS, W.H. and HOLMES, W.L. Platelet adhesiveness and thrombosis in rabbits on an atherogenic diet. *Medical Experimentation* 18: 121, 1968.
- 93.-NORDOY, A., HAMLIN, J.T., CHANDLER, A.B. and VEWLAND, H. The influence of dietary fats on plasma and platelet lipids and ADP induced platelet thrombosis in the rat. *Scand. J. Haematology* 5: 458, 1968.
- 94.-HORNSTRA, G., VANDELMANS-STARREMBURG, A. Induction of experimental occlusive thrombi in rats. *Atherosclerosis* 17: 369, 1973.
- 95.-HORNSTRA, G. Experimental studies. Dietary fats and arterial thrombosis. In *Dietary Fats and Thrombosis*. S. Renaud and A. Nordöy, editors. Basle, S. Karger, 1974.
- 96.-RENAUD, S. Thrombotic, atherosclerotic and lipemic effects of dietary fats in the rat. *Angiology* 20: 657, 1969.

- 97.-RENAUD, S. and GODU, J. Induction of large thrombi in hyperlipemic rats by epinephrin and endotoxin. *Laborat. Invest.* 21: 512, 1969.
- 98.-RENAUD, S. Thrombogenicity and atherogenicity of dietary fatty acids in rats. *J. Atherosclerosis Research*, 8: 625, 1968.
- 99.-GAUTHERON, P. and RENAUD, S. Hyperlipemia induced hypercoagulable state in rats. Role of an increased activity of platelet phosphatidil-serina in response to certain dietary fatty acids. *Thrombosis Research* 1:353, 1968.
- 100.-RENAUD, S. and LECOMPTE, F. Hypercoagulability induced by hyperlipemia in rat, rabbit and man. Role of platelet factor 3. *Circulation Research* 27: 1003, 1970.
- 101.-KIN, W.M., MERSKEY, C. et al.(5 autores). Hyperlipidemia, hypercoagulability and accelerated thrombosis. Studies in congenitally hyperlipidemic rats and in rats and monkeys with induced hyperlipidemia. *Blood* 47: 275, 1976.
- 102.-BRONTE-STEWART, B., KEYS, A. and BROCK, J.F. Serum cholesterol, diet and coronary heart disease: an interracial study in the Cape Peninsula. *Lancet* II, 1103, 1955.
- 103.-GOFMAN, J.W., ANDRUS, E.C. et al. Evaluation of serum lipoproteins and cholesterol measurements as predictors of clinical complications of atherosclerosis. Report of a cooperative study on lipoproteins and atherosclerosis. *Circulation* 14: 691, 1956.

- 104.-MANUAL OF LABORATORY METHODS, LIPID RESEARCH CLINICS PROGRAM. 1974, 1, 9-37. DHEW Publication. NIH 75-628, U.S. Government Printing Off., Washington, D.C.
- 105.-SHANBERGE, J.N., MATSUOKA, T., FUCUI, H. A simple method for the preparation of a substrate for a one stage factor V assay. Amer. J. Clin. Pathol. 47: 533, 1967.
- 106.-OWREN, P.A. and AAS, K. The control of dicumarol therapy and the quantitative determination of prothrombin and proconvertin. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 3: 201, 1951.
- 107.-NEMERSON, Y. and CLYNE, L.P. An assay for coagulation factor VII using factor VII depleted bovine plasma. J. Lab. Clin. Medicine, 37: 316, 1951.
- 108.-ELLIS, B.C. and STRANSKY, A.J. A quick and accurate method for the determination of fibrinogen in plasma. Lab. Clin. Medic. 58: 477, 1961.
- 109.-RATNOFF, O.D. and MENZIE, C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. J. Lab. Clin. Med. 37: 316, 1951.
- 110.-MERSKEY, C., JOHNSON, A.J. and LALEZARI, P. Increased fibrinogen and fibrin related antigen in human serum due to in vitro lysis of fibrin by thrombin. J. Clin. Invest. 51: 903, 1972.
- 111.-LAURELL, C.B. ELECTROIMMUNOASSAY. Scand. Journal Clin. Invest. 29: (suppl. 124), 21, 1972.
- 112.-HOYER, L.W. Radioimmunoassay for AHT antigen. J. Lab. Clin. Med. 80: 822, 1972.

- 113.-WEISS, H.J., HOYER, L.W., RICKLES, F.R., VARMA, A. and ROGERS, J. Quantitative assay of plasma factor deficient in von Willebrand's disease that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content. J. Clin. Invest. 52: 2708, 1973.
- 114.-MAC FARLANE, D.E., STIBBE, J., KIRBY, E.P., ZUCKER, M.B., GRANT, R.A. and MCPHERSON, J. Thromb. Diath. Haemorrh. (in press 1975)
- 115.-MERSKEY, K., JOHNSON, A.J., KLEINER, J.G. and WOHL, H. The defibrination syndrome. Clinical features and laboratory diagnosis. Brit. J. of Haematology, 13, 528, 1967.
- 116.-CARROL, R.T. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 84: 640, 1953.
- 117.-LANGDELL, R.D., WAGNER, R.H. and BRINKHOUS, K.M. Effect of antihemophilic factor on one stage clotting test. J. Lab. Clin. Med. 41: 637, 1953.
- 118.-MC LENDON, W.W., BARROW, E.M., HURT, J.P., BRYAN, F.T. and WAGNER, R.H. Modified one stage anti-hemophilic factor assay and its use in testing human AHF fractions. Federation Proceed. 20: 151, 1961.
- 119.-MERSKEY, C., KLEINER, G.J. and JOHNSON, A.J. Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum. Relation to diagnosis and treatment. Blood 28,1, 1966.
- 120.-MERSKEY, C., LALEZARI, P. and JOHNSON, A.J. A rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human serum.

Proceed. Society Experim. Biology and Medicine,
131: 871, 1969.

- 121.-MERSKEY, C., JOHNSON, A.J. and LALEZARI, P.
Increase in fibrinogen and fibrin related antigen
in human serum due to in vitro lysis of fibrin by
thrombin. J. Clin. Invest. 51: 4, 1972.
- 122.-HOWARD, M.A. and FIRKIN, B.G. Ristocetin, a new
tool in the investigation of platelet aggregation.
Thromb. Diath. Haemorrh. 26: 362, 1971.
- 123.-MEYER, D., JENKINS, C.S.P., DREYFUS, M.D., FRE-
SSINAUD, E. and LARRIEU, M.J. Willebrand factor
and ristocetin. Relationship between Willebrand
factor, Willebrand antigen and factor VIII activi-
ty. Brit. J. Haematology 28: 579, 1974.
- 124.-OLSON, J.D., BROCKWAY, W.J., FASS, D.N., MAGNUSON,
M.A. and BOWIE, E.J.W. Evaluation of ristocetin
Willebrand factor assay and ristocetin induced
aggregation. Amer. J. Clin. Path. 63: 210, 1975.
- 125.-ALLAIN, J.P., COOPER, H.A., WAGNER, R.H. and
BRINKHOUS, K.M. Platelet fixed with paraformal-
dehyde: a new reagent for assay of von Willebrand
factor and platelet aggregating factor. J. of Lab.
and Clin. Med. 85: 318, 1975.
- 126.-KIRBY, E.P. and MILLS, D.C.B. The interaction
of bovine factor VIII with human platelets.
J. Clin. Invest. In press 1975.
- 127.-ZIMMERMAN, RATNOFF and POWELL. Immunologic diffe-
rentiation of classic hemophilia (factor VIII de-
ficiency) and von Willebrand's disease with obser-
vations on combined deficiencies of antihemophilic

factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J. Clin. Invest.* 50: 244, 1971.

- 128.-BOUMA, B.N., WIEGERINCK, Y., SIXMA, J.J. et al. Immunological characterization of purified antihemophilic factor A (f. VIII) which corrects abnormal platelet retention in von Willebrand's disease. *Nature (New Biology)* 236: 104, 1972.
- 129.-HOYER, L.W. Immunologic studies of antihemophilic factor (AHF, factor VIII). Comparative binding properties of human and rabbit anti AHF. *Blood* 39: 481, 1972.
- 130.-A. BRADFORD HILL. Principles of Medical Statistics. Oxford University Press, 1971
- 131.-BROZOVIC, M., STIRLING, Y., HARRICKS, C., NORTH, W.R.S., MEADE, T.W. Factor VII in an industrial population. *Brit. J. Haemat.* 28: 381, 1974.
- 132.-NILSSON, I.M., BLOMBACK, M., THILEN, A.V. and FRANKEN, I. Carriers of Hemophilia A. A Laboratory study. *Acta Med. Scand.* 165: 357, 1959.
- 133.-COOPERBERG, A.A. and WEITELBAUM, J.L. The concentration of antihemophilic globulins(AHG) in patients with coronary artery disease. *Annals of Internal Medicine* 54: 899, 1961.
- 134.-PRESTON, A.E. and BARR, A. The plasma concentration of factor VIII in the normal population. The effect of age, sex and blood group. *Brit. J. of Haemat.* 10: 238, 1964.
- 135.-WARE, A.G. and SEEGER, W.H. Two stage procedure

for the quantitative determination of prothrombin concentration. Amer. J. Clin. Pathol. 19: 471, 1949.

- 136.-SORBYE, C., PHILLIPS, F.C., LUNDBERG, W.O. Potential function of the cholesterol in blood coagulation: amplification of the phospholipid thromboplastic activity. Lipids 6: 139, 1971.
- 137.-STERZING, P.R. and BARTON, P.G. The influence of cholesterol on the activity of phospholipids in blood coagulation: requirements for a liquid crystalline lipid phase. Chemistry and Physics of Lipids 10: 137, 1973.
- 138.-EPSTEIN, S.E., ROSING, D.R., BRACKMAN, P., REDWOOD, D.R. and ASTRUP, T. Impaired fibrinolytic response to exercise in patients with type IV hyperlipoproteinemia. Lancet II, 631, 1970.
- 139.-RUCKLEY, C.V., DAS, P.C. et al.(6 autores). Serum fibrin-fibrinogen degradation products associated with postoperative pulmonary embolus and venous thrombosis. Brit. Med. Journal, iv, 395, 1970.
- 140.-FLANC, C., KAKKAR, V.U. and CLARKE, M.D. The detection of venous thrombosis of the legs using I_{125} -labelled fibrinogen. Brit. J. Surg. 55: 742, 1968.
- 141.-GUNZ, F.W. Haemorrhagic thrombocytopenia: a critical review. Blood 15: 706, 1960.
- 142.-ZAHAVI, J. and DREYFUSS, F. An abnormal pattern of ADP induced aggregation in acute Myocardial Infarction. Thromb. Diath. Haemorrh. 21: 76, 1969.
- 143.-HIRSH, J. and MC BRIDE, J.A. Increased platelet ad-

- hesiveness in recurrent venous thrombosis and pulmonary embolism. Brit. Med. Journal ii, 797, 1965.
- 144.-BYGDENAN, S. and WELLS, R. Studies on platelet adhesiveness, blood viscosity and the microcirculation in patients with thrombotic disease. J. of Atherosclerosis Research 10, 33, 1969.
- 145.-BYGDENAN, S., ELIASSON, R., JOHNSON, S.R. Relationships between postoperative changes in ADP induced platelet adhesiveness and venous thrombosis. Lancet I, 1301, 1966.
- 146.-BENNET, P.N. Postoperative changes in platelet adhesiveness. J. of Clin. Pathology 20: 708, 1967.
- 147.-REGUS, D., PINTO, D.G. and BROWN, N. Platelet adhesiveness in postoperative deep venous thrombosis. Lancet I, 220, 1969.
- 148.-HIRSH, J., MC BRIDE, J.A. and DACIE, J.V. Thromboembolism and increased platelet adhesiveness in post-splenectomy thrombocytosis. Australasian Annals of Medicine, 15: 122, 1966.
- 149.-WESSLER, S. and YIN, E.T. Experimental hypercoagulable state induced by factor X: comparison of the non activated and activated forms. Journal of Lab. and Clin. Med. 72: 256, 1968.
- 151.-EDITORIAL. Lancet II, 133, 1973.
- 150.-DEYKIN, D. The role of the liver in serum induced hypercoagulability. J. Clin. Invest. 45: 256, 1966.
- 152.-PECHET, L. and ALEXANDER, B. Increased clotting

factors in pregnancy. N. Engl. J. Medic. 265: 1093, 1961.

- 153.-STRAUSS, H. and DIAMOND, L.K. Elevation of factor VIII during pregnancy in normal persons and in patients with von Willebrand's disease. N. Engl. J. of Medicine 269: 1251, 1953.
- 154.-TALBERT, L.M. and LANGDELL, R.D. Normal values of certain factors in the blood clotting mechanism in pregnancy. Amer. J. of Obstetrics and Gynecology 90: 44, 1964.
- 155.-DAVIDSON, E. and TOMLIN, S. The levels of the blood coagulation factors after trauma and childbirth. J. of Clin. Pathology 16: 112, 1963a.
- 156.-EGEBERG, O. Changes in the coagulation system following major surgical operations. Acta Med. Scand. 171: 679, 1962b.
- 157.-DAVIDSON, E. and TOMLIN, S. The level of the plasma coagulation factors in the postoperative period. Thromb. Diath. Haemorrh. 10: 81, 1963b.
- 158.-ALEXANDER, B. Clotting factor VII (proconvertin): synonymy, properties, clinical and clinico-Laboratory aspects. N. Engl. J. Med. 260: 1213, 1959.
- 159.-OLWIN, J.H. and FAHEY, J.L. Ac. globulin levels in thromboembolism. Annals of Surgery 132: 443, 1950.
- 160.-GASTON, L.W. Studies on a family with an elevated plasma level of factor V and a tendency to thrombosis. Journal of Pediatrics 68: 367, 1965.
- 161.-PENICK, G.D., DEJANOV I.I., REDDICK, R.L. and RO-

- BERTS, H.R. Predisposition to intravascular coagulation. *Thromb. Diath. Haemorrh. suppl.* 21, 543, 1966.
- 162.-BONNAR, J., PRENTICE, C.R.M., MC NICOL, G.P. and DOUGLAS, A.S. Haemostatic mechanism in the uterine circulation during placental separation. *Brit. Med. Journal* ii, 564, 1970.
- 163.-BOTTI, R.E. and RATNOFF, O.D. Studies on the pathogenesis of thrombosis. An experimental hypercoagulable state induced by the intravenous injection of ellagic acid. *J. Lab. Clin. Med.* 64: 385, 1964.
- 164.-RATNOFF, O.D. and CRUM, J.D. Activation of factor X XII by solutions of ellagic acid. *J. Lab. Clin. Med.* 63: 359, 1964.
- 165.-DIWTFENFASS, L. Thixotropy of blood and proneness to thrombus formation. *Circ. Research* 11: 233, 1962.
- 166.-MERRIL, E.W., COKELET, G.C., BRITTEN A. and WELLS, R.E. Jr. Non-Newtonian rheology of human blood effect of fibrinogen deduced by subtraction. *Circulation Research* 13: 48, 1963.
- 167.-FLETCHER, A.P., ALKJAERSIG, N., O'BRIEN, J. and TULEVSKI, V.G. Blood hypercoagulability and thrombosis. *Transactions of the Association of American Physicians* 83: 159, 1970.
- 168.-GODAL, H.C., ABILGAARD, H. and NIERULF, P. Ethanol gelation and fibrin monomers in plasma. *Scand. J. Haematology, suppl.* 13, 189, 1971.
- 169.-EGEBERG, O. Inherited antithrombin deficiency

causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.*
13: 516, 1955.

- 170.--KAULLA, E.V. von and KAULLA K.N. von. Antithrombin III and diseases. *Amer. J. Clin. Pathology* 48, 69, 1967.
- 171.--NESTEL, P.G. Fibrinolytic activity of the blood in intermittent claudication. *Lancet* II, 373, 1959.
- 172.--CHAKRABARTI, R., HOCKING, E.D. et al. (4 autores). Fibrinolytic activity and coronary artery disease. *Lancet* I, 987, 1968.
- 173.--ELLISON, R.C. and BROWN, J. Fibrinolysis in pulmonary vascular disease. *Lancet* I, 786, 1965.
- 174.--KATZ, A.M., MC DONALD, L., DAVIES, B. and EDGILL, M. Fibrinolysis and blood coagulation in ischaemic heart disease. *Lancet* I, 201, 1963.
- 175.--ROBERTSON, B.R., PANDOLFI, M. and NILSSON, I.M. "Fibrinolytic capacity" in healthy volunteers at different ages as studied by standardised venous occlusion of arms and legs. *Acta Med. Scand.* 191: 199, 1972.
- 176.--TODD, A.S. Fibrinolysis autographs. *Nature(Lond.)* 181: 495, 1958.
- 177.--PANDOLFI, M., ISACSON, S. and NILSSON, I.M. Low fibrinolytic activity in the walls of veins in patients with thrombosis. *Acta Med. Scand.* 186: 1, 1969.
- 178.--NILSSON, I.M. and KROOK, H. et al.(3 autores).

- Severe thrombotic disease in a young man with bone marrow and skeletal changes and with a high content of an inhibitor in the fibrinolytic system. *Acta Med. Scand.* 169, 323, 1961.
- 179.-MAEYE, R.L. Thrombotic disorders with increased levels of antiplasmin and antiplasminogen. *New Engl. J. of Medicine*, 265: 867, 1961.
- 180.-DICK, W., SCHNEIDER, W., BROCKMULLER, K. and MAYER, W. Interrelations of thromboembolic diseases and blood group distribution. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 9, 472, 1963.
- 181.-BRONTE-STEWART, B., BOTHA, M.C. and KRUT, L.H. ABO groups in relation to ischaemic heart disease. *Brit. Med. Journal* i, 1646, 1962.
- 182.-KINGSBURY, K.J. Relation of ABO groups to atherosclerosis. *Lancet* I, 199, 1971.
- 183.-FAGERHOLD, M.K., ABILGAARD, U. and KORNSTAD, L. Antithrombin III concentration and ABO blood groups. *Lancet* II, 664, 1971.
- 184.-CARSON, M.A.J., DENT, C.E., FIELD, C.M.B. and GAULL, G.E. Homocystinuria. Clinical and pathological review of ten cases. *Journal of Pediatrics* 66: 565, 1965.
- 185.-MC DONALD, L., BRAY, C. et al.(3 autores). Homocystenuria, thrombosis and the blood platelets. *Lancet* I, 745, 1964.
- 186.-RATHOFF, O.D. Activation of Hageman factor by L-Homocystine. *Science*, 162: 1007, 1968.

- 187.-CHIEVITZ, E. and THIEDE, T. Complications and causes of death in polycythemia Vera. Acta Med. Scand. 172: 513, 1962.
- 188.-LEVIN, J. and CONLEY, C.L. Thrombocytosis associated with malignant disease. Archives of Internal Medicine 114: 497, 1964.
- 189.-MOOLTEN, S.E., JENNING, P.B. and SOLDEN, A. Dietary fat and platelet adhesiveness in atherosclerosis and Diabetes. Amer. J. Cardiol. 11: 290, 1963.
- 190.-WARERBURY, L.S. and HAMPTON, J.W. Hypercoagulability with malignancy. Angiology 18: 197, 1967.
- 191.-AMUNDSEN, M.A. and SPITTELL, J.A., THOMPSON, J.H., OWEN, C.A. Jr. Hypercoagulability associated with malignant disease and with the postoperative state: evidence for elevated levels of antihemophilic globulin. Annals of Internal Medicine 58: 608, 1963.
- 192.-MILLER, S.P., SANCHEZ AVALOS, J., STEFANSKI, T. and ZUCKERMAN, L. Coagulation disorders in cancer: clinical and Laboratory studies. Cancer, 20, 1452, 1967.
- 193.-CHAJELEWSKI, J. and FARBISZEWSKI, R. Platelet factor 4 release during human platelet aggregation in diabetic patients. Thromb. Diath. Haemorrhagic, 24: 203, 1970.
- 194.-EGEBERG, O. The blood coagulability in diabetic patients. Scand. J. of Clin. and Lab. Invest. 15: 533, 1963.
- 195.-FARNLEY, G.R., CHAKRABARTI, R. and AVIS, P.R.D.

- Blood fibrinolytic activity in diabetes mellitus and its bearing on ischaemic heart disease and obesity. *Brit. Med. J.* i, 921, 1963.
- 196.-VESSEY, M.P. and WEATHERALL, J.A.C. Venous thromboembolic disease and the use of oral contraceptives. *Lancet* II, 94, 1968.
- 197.-POLLER, L., PRIEST, C.M. and THOMPSON, J.M. Platelet aggregation during oral contraception. *Brit. Med. J.* iv, 273, 1969.
- 198.-POLLER, L., THOMSON, J.M., THOMAS, W. and WRAY, C. Blood clotting and platelet aggregation during oral progesteron contraception: a follow-up study. *Brit. Med. J.* i, 705, 1971.
- 199.-AMBRUS, J.L., NISWANDER, K.R. et al. (3 autores). Progestational agents and blood coagulation II. *Amer. J. Obstetrics and Gynecology*, 103: 994, 1969.
- 200.-RUTHERFORD, R.N., HOUGIE, C., BANKS, A.L. and COBURN, W.A. The effect of sex steroids and pregnancy on blood coagulation factors. A comparative study. *Obstetrics and Gynecology*, 24, 886, 1964.
- 201.-POLLER, L. and THOMSON, J.M. Clotting factors during oral contraception: further report. *Brit. Med. J.* ii, 25, 1966.
- 202.-HOWIE, P.W., MALLINSON, A.C. et al. (3 autores). Effect of combined strogen-progesteron oral contraceptives, estrogen and progestogen on antiplasmin and antithrombin activity. *Lancet* II, 1329, 1970.
- 203.-ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A.P. and BURSTEIN, R. Thromboembolism and oral contraceptive medication.

J. Clin. Invest. 49: 3a, 1970.

- 204.-PINDYCK, J., LICHTMAN, H.C. and KOHL, S.G.
Cryofibrinogenemia in women using oral contraceptives. Lancet I, 51, 1970.
- 205.-DOLL, R. and HILL, A.B. Mortality in relation to smoking: ten years observation of british doctors. Brit. Med. J. i, 1399 and 1460, 1964.
- 206.-MURCHISON, L.E. and FYFE, T. Effects of cigarette smoking on serum lipids, blood glucose and platelet adhesiveness. Lancet II, 182, 1966.
- 207.-OGSTON, D., BENNET, N.B. and OGSTON, C.H. The influence of cigarette smoking on the plasma fibrinogen concentration. Atherosclerosis II, 349, 1970.
- 208.-RAWLES, J.M., OGSTON, D. and DOUGLAS, A.J.
Haemostatic factors in the diagnosis of thrombosis. Clinics in Haematology vol. 2, n^o 1, pages 79-99, 1973.

-----oOo-----