

## Tesis de Posgrado

# Hemostasia en leucemias agudas no tratadas

Kordich, Lucía Clelia

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Kordich, Lucía Clelia. (1982). Hemostasia en leucemias agudas no tratadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1746\\_Kordich.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1746_Kordich.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Kordich, Lucía Clelia. "Hemostasia en leucemias agudas no tratadas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1746\\_Kordich.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1746_Kordich.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

HEMOSTASIA EN LEUCEMIAS  
AGUDAS NO TRATADAS

LUCIA CLELIA KORDICH

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1746  
v.1  
EJ 2

A mis padres

A mi esposo

A mi hijo

DESDE 1964, EN QUE ME INICIE EN EL ESTUDIO DE LA HEMOSTASIA Y TROMBOSIS, HASTA LA FECHA, VARIOS SON LOS TRABAJOS PUBLICADOS (TOMO II).

LA ORIENTACIÓN DE LOS ÚLTIMOS AÑOS EN EL TEMA DE HEMOSTASIA EN LEUCEMIAS AGUDAS ME PERMITIÓ DESARROLLAR ESTA MONOGRAFÍA.

AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE AL DOCTOR JUAN MIGUEL CASTAGNINO, PROFESOR TITULAR DE LA CATEDRA DE ANÁLISIS BIOLÓGICOS, POR SU CONSTANTE ESTIMULO PARA EL LOGRO DE ESTE TRABAJO.

### AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Marcos Kleimans, el primer maestro en hematología, quien supo con gentileza, rectitud y afecto, orientarme en el campo de la Hemostasia.

Al Dr. G. Bomchil, director del Instituto Municipal de Hematología del Hospital Ramos Mejía y a la Fundación de Investigaciones Hematológicas por su constante apoyo científico y económico.

A la Dra. Marion Eppinger-Helf, por su colaboración y por la posibilidad de estudiar los pacientes de la sección a su cargo.

Al Dr. J. C. Sánchez Avalos, por su apoyo y valioso aporte crítico.

A mis colaboradoras directas Beatriz Sassetti y Olga Lago, quienes me apoyaron en todo momento con trabajo, discusión de ideas y amistad.

A mis colaboradoras del Hospital Ramos Mejía: M. I. Viscarguénaga y S. Lingua por su trabajo y amistad.

A todas las personas de la Cátedra de Análisis Biológicos y del Instituto Municipal de Hematología que de una u otra manera han contribuido, a través de su trabajo, apoyo y estímulo a facilitarme la tarea.

## INDICE

### INTRODUCCION.

Concepto de Hemostasia.....	1.
Factor vascular.....	2.
Parámetros físico-químicos de los factores de coagulación.	6.
Fibrinógeno.....	7.
Factor II (Protrombina).....	10.
Factor III (Factor tisular tromboplastina).....	13.
Factor V (Labil).....	14.
Factor VII (Proconvertina).....	14.
Factor VIII (Globulina antihemofílica).....	15.
Factor IX (Componente tromboplastico de plasma).....	16.
Factor X (Stuart power).....	17.
Factor XI (Antecedente tromboplastico del plasma).....	19.
Factor XII (Hageman).....	21.
Factor XIII (Factor estabilizante de la fibrina).....	23.
Quininógenos de alto peso molecular.....	24.
Precalicrofina (Fletcher).....	25.
Factor Fitzgerald.....	26.
Factor Passovoy.....	27.
Factor Reid.....	28.
Mecanismo de coagulación.....	29.
Mecanismo de coagulación y sistemas interrelacionados.....	36.
Vitamina K y factores de coagulación.....	37.
Fibrinólisis.....	42.
Plasminógeno.....	42.
Esquema de fibrinólisis.....	43.
Plasmina.....	45.
Activadores del plasminógeno.....	45.
Activador tisular.....	46.
Activador vascular del plasminógeno.....	47.

Fibrinólisis dependiente del factor XII.....	49.
Uroquinasa.....	51.
Estreptoquinasa.....	52.
Inhibidores de activación del plasminógeno.....	52.
Antiplasmina.....	53.
Plasminógeno-antiplasmina.....	53.
Inhibidores farmacológicos.....	55.
Inhibidores de los activadores del plasminógeno.....	56.
Productos de degradación.....	57.
Variaciones fisiológicas de la fibrinólisis.....	59.
Camino fibrinolítico dependiente de los leucocitos.....	59.
Inhibidores naturales de coagulación y fibrinólisis.....	61.
Antitrombina III.....	63.
Heparina y antitrombina III.....	66.
$\alpha_2$ -macroglobulina.....	67.
C <sub>1</sub> -inactivador.....	69.
$\alpha_1$ - antitripsina.....	69.
$\alpha_2$ - antiplasmina.....	69.
Activación y/o consumo.....	71.
Acción de enzimas leucocitarias sobre el sistema de coagulación.....	75.
<u>OBJETIVOS</u> .....	77.
<u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	78.
Dosaje de fibrinógeno.....	79.
Tiempo de trombina.....	79.
Dosaje de protrombina.....	79.
Dosaje de factor V.....	80.
Dosaje de factor VII - X.....	80.
Dosaje de factor VIII.....	80.
Dosaje de factor IX.....	81.
Dosaje de factor XI.....	81.
Dosaje de factor XII.....	82.

Dosaje de factor XIII.....	82.
Dosaje de plasminógeno.....	83.
Extracto salino fenolado de cerebro humano (tromboplastina).....	84.
Cefalina.....	84.
Tiempo de protrombina de Quick.....	85.
Tiempo de tromboplastina parcial con caolín.....	85.
Tolerancia a la heparina.....	86.
Cofactor de la heparina.....	86.
Antitrombina III.....	87.
Anti X <sub>a</sub> .....	88.
Antitrombina III por inmunolectroforesis bidimensional..	90.
productos de degradación de la fibrina.....	91.
Tiempo de plasma recalcificado.....	92.
Determinaciones de proteínas.....	93.
Determinación por inmunodifusión radial.....	93.
Dosaje de factor VIII por electroinmunodifusión.....	93.
Preparación de los extractos leucocitarios.....	94.
Placas de fibrina.....	95.
Cromatografía de los lisados leucocitarios.....	95.
<u>REACTIVOS</u> .....	97.
<u>RESULTADOS</u> .....	99.
<u>DISCUSION</u> .....	127.
<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	137.



## ABREVIATURAS

Tiempo de sangría: T.S.

Tiempo de trombina: T.T.

Tiempo de protrombina de Quick: T.Q.

Tiempo de tromboplastina parcial con caolín: T.T.P.C.

Tolerancia a la heparina: Tol. Hep.

Factor I (Fibrinógeno): I.

Factor II (Protrombina): II.

Factor II activado (Trombina): II<sub>a</sub>.

Factor V (Lábil): V.

Factor VII (Proconvertina): VII.

Factor VII activado: VII<sub>a</sub>.

Factor X (Stuart Power): X.

Factor X activado: X<sub>a</sub>.

Factor VIII (globulina antihemofílica): VIII.

Factor VIII retacionado al Antígeno: VIII<sub>RAg</sub>.

Factor IX (P.T.C.): IX.

Factor IX activado: IX<sub>a</sub>.

Factor XI (P.T.A.): XI.

Factor XI activado: XI<sub>a</sub>.

Factor XII (Hageman): XII.

Factor XII activado: XII<sub>a</sub>.

Fragmento de Factor Hageman: F<sub>XII f</sub>.

Factor XIII (estabilizante de la fibrina): XIII.

Plasminógeno biológico: PGL<sub>b</sub>

Plasminógeno inmunológico: PGL<sub>i</sub>.

Cofactor de la heparina: Cof. Hep.

Antifactor X<sub>a</sub>: anti-X<sub>a</sub>.

Antitrombina III biológica: AT III<sub>b</sub>.

Antitrombina III inmunológica: AT III<sub>i</sub>.

α<sub>1</sub>- Antitripsina: α<sub>1</sub>AT

α<sub>2</sub>- Macroglobulina: α<sub>2</sub> M

Productos de degradación de la Fibrina: P.D.F.

Leucemia Aguda: LA

Leucemia Aguda linfoblástica: LAL.

Leucemia Aguda granulocítica: LAG.

Leucemia Aguda mielomonocítica: LAMMo.

Leucemia Aguda mieloblástica: LAM.

Leucemia Aguda monocítica: LAMo.

## INTRODUCCION

### CONCEPTO DE HEMOSTASIA.

Se entiende por hemostasia todos aquellos mecanismos y procesos que mantienen la integridad vascular evitando la extravasación sanguínea espontánea y que cuando existe una lesión vascular o una hemorragia llevan a cohibirla.

Deben también integrarse en este mecanismo fisiológico los fenómenos que mantienen la sangre circulante incoagulable o que cuando es desencadenado el proceso de la coagulación hacen que esta quede limitada o circunscripta al área de "activación de la coagulación", así como los fenómenos que permiten la recanalización de un vaso trombosado.

Puede considerarse que la hemostasia es un fenómeno complejo que esta interrelacionado con otros sistemas tales como: pared vascular; sistema plaquetario (cantidad y capacidad funcional de las plaquetas); sistema de coagulación y de fibrinólisis, ambos con sus inhibidores los cuales serán tratados con mayor amplitud; sistema bradiquininas-quininas, sistema de complemento y sistema retículoendotelial.

### FACTOR VASCULAR.

La intervención de los vasos sanguíneos en el mecanismo de la hemostasia es múltiple, comenzando por la propiedad del endotelio vascular normal de ser una superficie "no activante" de la coagulación, de la adhesividad y agregación

plaquetaria, constituyendo una de las principales causas del mantenimiento de la incoagulabilidad sanguínea. Esta propiedad del endotelio depende de las características biofísicas de la membrana celular como carga eléctrica, componentes químicos, etc; de su metabolismo: capacidad enzimática para degradar metabolitos con actividad agregante plaquetaria, especialmente derivados de prostaglandinas o para generar metabolitos antiagregantes o para mantener una normal actividad de la membrana; de su normal interconexión con otras células endoteliales (cemento intercelular). La calidad de los elementos constituyentes del subendotelio y del resto de la pared vascular también son importantes, habiéndose descrito tendencias hemorragíparas o trombóticas por alteraciones cualitativas del colágeno subendotelial o del colágeno de la pared. Alteraciones endoteliales pueden iniciar el proceso de adhesión y agregación plaquetaria por diferentes mecanismos (liberación de ADP, de intermediarios de la prostaglandinas, por denudación del colágeno subendotelial, etc.), a la vez que pueden activar la Fase contacto" de la coagulación sanguínea (factores XII y XI).

Las propiedades funcionales de la pared vascular relacionadas a la hemostasia son la contractilidad, la fragilidad y la permeabilidad. La hemostasia en las lesiones de vasos capilares se produce por simple adosamiento endotelial,

mientras que en otros vasos pequeños y en heridas puntiformes de vasos mayores la lesión es cerrada por contracción de la pared. En arteriolas y vénulas, además de la contracción segmentaria de la pared a nivel de la lesión, se observa cierta retracción vascular, necesitándose también la formación de un trombo plaquetario; estos cambios estarían todos relacionados, pues la serotonina y/o intermediarios de la prostaglandinas liberados por las plaquetas serían los agentes inductores de la vasoconstricción temporaria. En esos vasos de gran calibre la contracción vascular, el trombo plaquetario y el coágulo de fibrina son los componentes necesarios para una normal hemostasia, debiéndose señalar la compresión extrínseca del vaso lesionado por el hematoma perivascular para cohibir una hemorragia. En cuanto a la permeabilidad vascular ella estaría relacionada fundamentalmente con la integridad de la unión intercelular endotelial.

En alteraciones congénitas de la pared vascular; dilataciones o aneurismas, como en el síndrome Rendu-Osler; déficit del colágeno, en el síndrome Ehlers-Danlos; lesiones endoteliales de la homocistinuria, etc.) o alteraciones adquiridas; déficit de vitamina C; alteración de acción trófica plaquetaria, en las trombocitopenias y trombocitopatías; por fenómenos inmunológicos, metabólicos o inflamatorios de la pared; por acción de disproteinemias; por tratamiento

corticoide prolongada, son causas que pueden provocar la aparición de fenómenos hemorrágicos o trombóticos.

Estas funciones de la pared vascular pueden estar influenciadas por diversas hormonas, tales como los glucocorticoides, esteroides anabólicos, estrógenos, tiroxina, etc., a través de diversos mecanismos. El bazo también podría tener cierta acción, lo que se deduce de la favorable influencia que la esplenectomía tiene sobre las hemorragias de la púrpura trombocitopénica idiopática, no siempre relacionada a un aumento del número o función de las plaquetas, pero su mecanismo de acción es aún desconocido. La existencia de influencias neurohormonales sobre la función vascular ha sido probada por las observaciones experimentales y de la patología humana que demuestran un aumento de las manifestaciones hemorrágicas en situaciones de "stress", postulándose que su efecto es a través de cambios en la pared o en la presión intravascular.

Otras funciones de la pared vascular recientemente conocidas son las relacionadas con la actividad fibrinolítica y la producción y liberación del factor VIII, actividades que tendrían alguna regulación de tipo neurohormonal. El endotelio vascular o la adventicia, de acuerdo al tipo de vaso considerado, forman y liberan a la circulación activadores del plasminógeno que tienen importancia fisiológica

en la depuración de fibrina o trombos intravasculares; su liberación aumenta marcadamente por acción de sustancias vasoactivas y de estimulación adrenérgica.

En cuanto al factor VIII, se ha visto que su liberación por el endotelio es aumentada por la estimulación betaadrenérgica y por diversas drogas vasoactivas (Sánchez Avalos, 1981).

TABLA I - PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DE LOS FACTORES DE COAGULACION

Factor	Nombre	PESO MOLECULAR		SUBUNIDADES		CONCENTRACION en un 1 ml de plasma
		Forma Inactiva	Forma Activada	Forma Inactiva	Forma Activada	
Factor I	Fibrinógeno	340.000 <sup>h,b</sup>	330.000 <sup>h,b</sup>	6		3 mg
Factor II	Protrombina	72.000 <sup>h</sup>	.38.000 <sup>h</sup>	1	2	200 ug
Factor III	Factor Tisular	220.000 <sup>h,b</sup>				
Factor IV	Iones Calcio	-	-	-	-	-
Factor V	Proacelerina	290.000 400.000 <sup>b</sup>	200.000	?	?	?
Factor VII	Proconvertina	53.000 <sup>h</sup>	63.000	1	?	2 ug
Factor VIII	Globulina antihemofílica	? x 10 <sup>6</sup>	?	?	?	?
Factor IX	Factor Christmas	55.400 <sup>b</sup>	46.500 <sup>b</sup>	1	2	3-4 ug
Factor X	Factor Stuart	55.000	40.000			6-8 ug
Factor XI	Antecedente Tromboplástico Plasmático	124.000 <sup>h</sup>	124.000	2	?	7 ug
Factor XII	Factor Hageman	75.000	75.000			40 ug
Factor XIII	Factor Estabilizante de la Fibrina	320.000 <sup>h</sup>	140.000 <sup>h</sup>	4	2	
	Pre-calicreína	88.000 85.000	88.000 85.000			25-40 ug
	Quimióngeno de Alto Peso Molecular	160.000				80 ug

h = humano      b = bovino



## COAGULACION SANGUINEA.

El proceso de la coagulación sanguínea es un mecanismo de activación enzimática en cadena de los factores que lo componen, el cual puede ser iniciado por diversas causas y que de superar los mecanismos de inhibición, lleva a la formación de un coágulo de fibrina.

Los factores de la coagulación bien identificados y aceptados por el Comité Internacional de Hemostasia y Trombosis son trece, los que estan detallados en la tabla I y serán detallados a continuación.

Existen otros factores recientemente descritos, que aún no tienen numeración, los mismos se conocen como: Passovoy, Fitzgerald, Fletcher, etc.

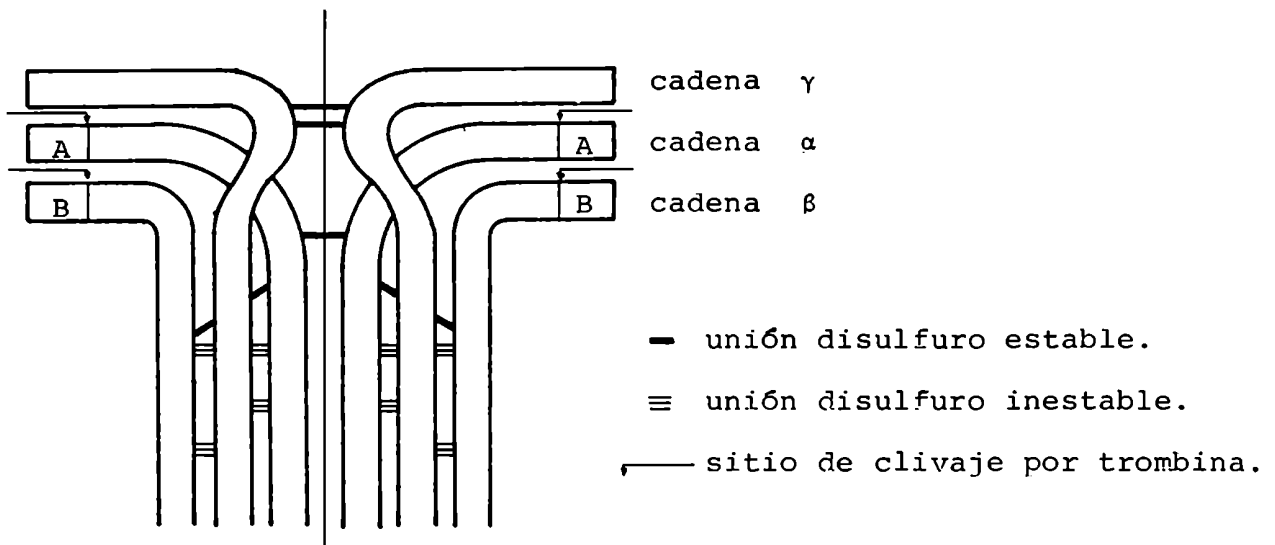
## FIBRINOGENO.

PM 340.000 daltons (A 64.000, B 57.000, 48.000) lo que la hace una de las protefnas más grandes del plasma. Tiene una longitud  $500 \text{ \AA}$  aproximadamente y consiste en 6 cadenas; 2 cadenas Alfa, 2 cadenas Beta y 2 cadenas Gamma, unidas por un puente disulfuro. Los trabajos de Blonback , 1967, 1966; Blomback y Blomback, 1972 y Laki, 1968, aclararon mucho sobre estructura del fibrinógeno y también su conversión a fibrina. Los trabajos de Doolittle y col.1977<sub>a</sub>, Doolittle y col. 1977<sub>b</sub>, Garland y col. 1977, sobre la se-

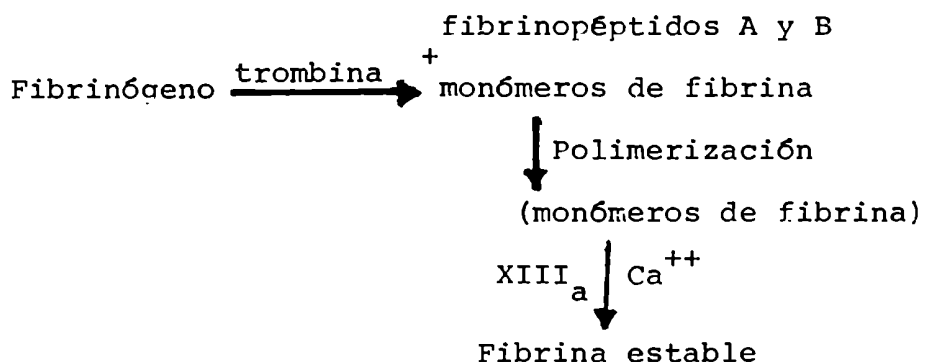
cuencia de aminoácidos de las 3 cadenas dan la caracterización casi completa del fibrinógeno.

Se conoce que la acción de la trombina sobre el fibrinógeno produce la liberación de 4 péptidos 2 A y 2 B, cargados negativamente, con una velocidad de liberación mucho mayor de A que de B. Se conoce la secuencia de aminoácidos de los 2 péptidos A, de 16 aminoácidos y de los 2 B, de 14 aminoácidos. Las moléculas de fibrinógeno que han perdido los péptidos A y B son llamadas monómeros de fibrina. La liberación de estos péptidos conduce a la gelación espontánea de los monómeros de fibrina. Es necesario que los 2 péptidos sean liberados para que la fibrina quede "bien" formada.

#### ESTRUCTURA DEL FIBRINOGENO



El gel de fibrina inicial es estabilizado por fuerzas no covalentes y puede ser disociado por variaciones en pH y fuerza iónica. La acción del f.XIII<sub>a</sub> implica estabilización por formación de uniones covalentes.



Las proteasas de los venenos de víbora tipo reptidase sólo liberan el fibrinopéptido A de las cadenas Alfa y este fibrinógeno modificado gelifica espontáneamente. El veneno de víbora Malaya (*Ankistrodon rhodostoma*), conocido por Ancrod, convierte el fibrinógeno en fibrina liberando únicamente el fibrinopéptido A, sin activar al factor XIII. La fibrina formada es inestable y fácilmente lisada por plasmina (Owen y col., 1975).

Mosesson demostró la existencia de 2 tipos de fibrinógeno humano, utilizando columna de celulosa, encontrando que las dos formas diferían en la composición de las cadenas Gamma.

La concentración de fibrinógeno en el plasma es de 0,15 a 0,32 g/ml. La producción de fibrinógeno por día se estimó en

1,5 a 5 g, la vida media fue estimada de 2 a 5 días.

#### FACTOR II PROTROMBINA.

Es una glicoproteína formada por una sola cadena PM (72.000), contiene un 0,2% de carbohidratos, estos no parecen relacionados a la actividad de la protrombina, ya que en su eliminación no afecta dicha actividad.

La protrombina es el precursor plasmático de la trombina esta proteína se sintetiza en el hígado y es uno de los factores Vit-K dependientes, al igual que los factores VII, IX y X. Se consume más del 80% en el proceso de coagulación, por lo que en suero sólo se encuentra en cantidades menores al 10%.

El mecanismo de conversión de protrombina a trombina ha sido estudiado en diferentes laboratorios (Barton and Hanahan 1969, Bull, Jevon and Barton 1972) dando distintas designaciones a los distintos intermediarios de esta reacción de conversión.

El activador biológico de la protrombina es el complejo  $X_a$ , factor V, fosfolípidos y  $Ca^{2+}$ .

La trombina no circula normalmente en la sangre ya que es inactivada rápidamente por la antitrombina III.

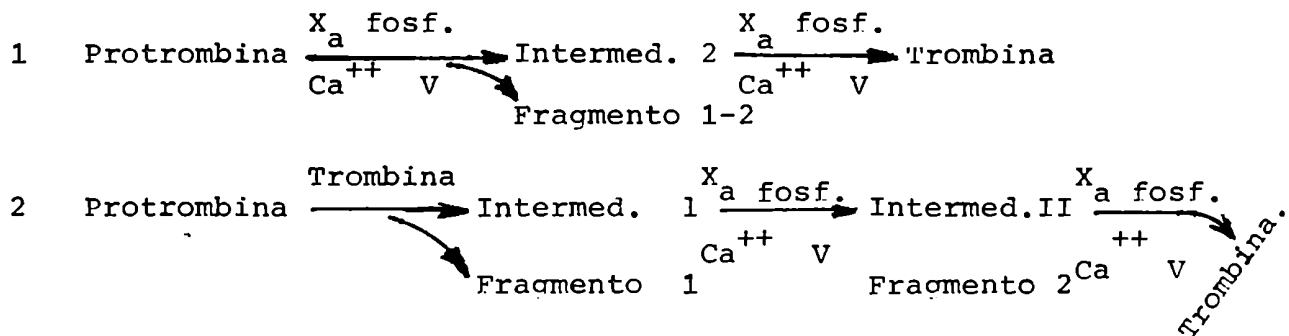
La trombina estimula la función procoagulante de los factores V y VIII y convierte al factor XIII a su forma acti-

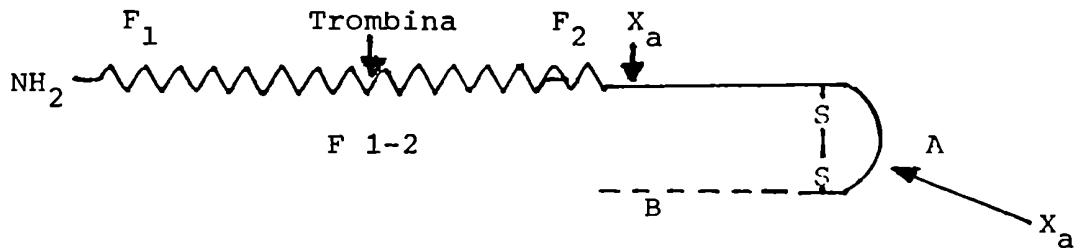
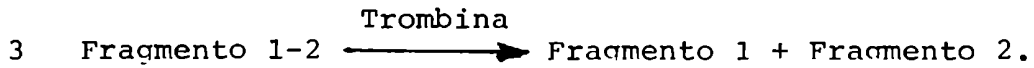
vada.

El primer paso de activación realizado por este complejo es la ruptura de un fragmento N-terminal de la protrombina, que produce un intermediario II, precursor de trombina y un fragmento 1-2.

El intermediario II, formado por una sola cadena polipeptídica, sufre una nueva ruptura por el complejo  $X_a$  y forma una molécula de trombina de 2 cadenas. La trombina a su vez puede usar a la protrombina como sustrato, la ruptura que se produce es diferente a la producida por el complejo  $X_a$  (Benson, Kisiel and Hanahan 1973). La trombina corta a la protrombina liberando un fragmento menor que el que se libera por el complejo  $X_a$ , estos son llamados fragmentos 1 e intermediario I (Owen y col., 1974).

Para que el intermediario I, pase a intermediario II y luego a trombina, es necesaria la presencia del complejo  $X_a$  (Owen and Jackson 1974).





Los sitios de unión de  $\text{Ca}^{++}$  de la protrombina se encuentra en el fragmento 1-2 y más específicamente en el fragmento 1 (Benson y col. 1973; Bajaj y col. 1975).

Se piensa que ésta es una forma mediante la cual la trombina ejerce control sobre su propia producción (reacción 2) ya que al liberarse el fragmento 1 la conversión a trombina por el complejo  $X_a$  es lenta.

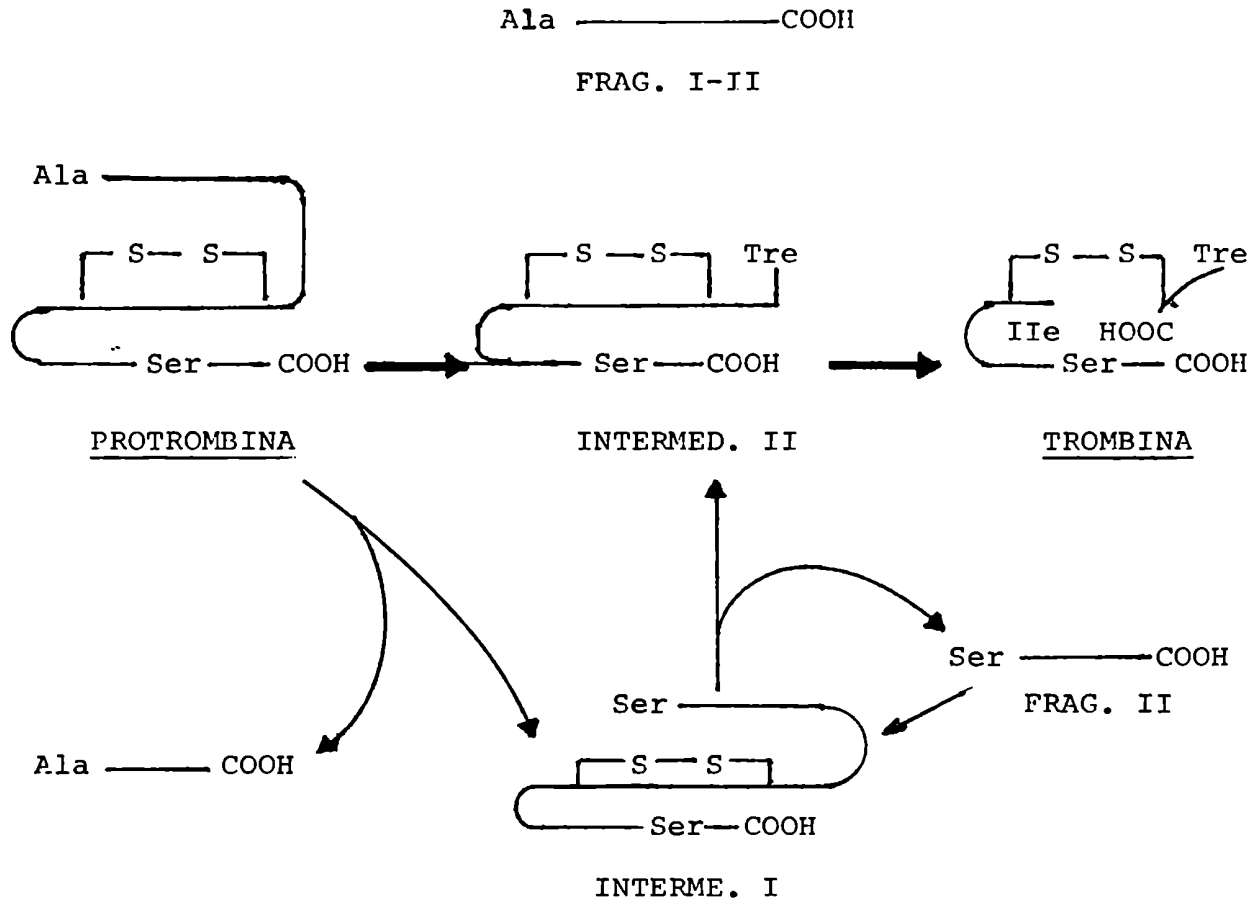
Se ha demostrado que el fragmento 1 es un inhibidor en la conversión de protrombina a trombina, el fragmento 1 compete por el complejo  $X_a$  y así disminuye el factor  $X_a$  disponible.

La región del fragmento 2 en el fragmento 1-2 es el probable sitio de unión del factor V, así todo el fragmento 1-2 es necesario para una producción máxima de trombina.

Ya que el intermediario 2 (reacción 1) no contiene el sitio de unión del complejo  $X_a$ , se podría cuestionar si el complejo  $X_a$  completo es necesario para la segunda ruptura.

Hay resultados cinéticos que hacen pensar que se requiere el complejo completo y que el fragmento 1-2 participa

en la segunda ruptura. El intermediario 2 pasa a trombina más rápidamente si el fragmento 1-2 está en la mezcla de reacción. (Fomon and Lackson, 1974)



Factor III o Factor Tisular (Tromboplastina).

Se usa el término tromboplastina, para denominar la actividad procoagulante de extractos salinos de tejidos (cerebro, pulmón, y placenta). Compuesto por una parte lipídica y otra proteica, ambas son necesarias para su actividad tromboplástica.

Este factor tisular ha sido identificado como un componeno

te de la membrana celular en una gran variedad de células. Sin embargo, ni las plaquetas (Maynard y col. 1975), ni leucocitos, ni células endoteliales lo contienen (Rickles y col. 1973).

El rol de factor tisular ( o actividad tromboplástica ) parece ser el de un cofactor (Howel, 1977).

#### FACTOR V (LABIL).

La inestabilidad de esta factor hace dificultoso su estudio, tanto que los PM que encontraron distintos autores varían de 290.000 a 400.000 (Esnouf et al. 1967). Este factor V purificado de sangre extraída de vena yugular tiene un peso molecular 690.000 Å y consiste en 2 cadenas livianas y una pesada, la trombina actuaría clivando la cadena pesada, aumentando de esta forma varias veces la actividad del factor. Algunos autores piensan en base a estos datos que el factor V sufre proteólisis durante la extracción de sangre por la vena del pliegue de codo.

El rol de factor V en el complejo  $X_a$ -fosf.-V-Ca<sup>2+</sup> es discutido, algunos autores sugieren que este factor hace más accesible a la protrombina para el clivaje por el  $X_a$ .

El factor V es sintetizado en el hígado. La vida media se calcula en 36 hs.

#### FACTOR VII: PROCONVERTINA.

Es una proteína plasmática que participa en el mecanis-



mo extrínseco de la coagulación, se encuentra en el plasma como una glicoproteína de cadena simple PM 63.000 daltons y en forma de zimógeno tiene escasa actividad proteolítica. En su forma activa tiene 2 cadenas y su actividad proteolítica máxima parece ser dependiente de la presencia de factor tisular (Kisiel, Fujikawa and Davie, 1977).

La activación de factor VII a VII<sub>a</sub>, en el proceso proteolítico ha sido demostrada con factor XII<sub>a</sub> (Gjonnaess 1972, Kisiel y col. 1977), calicreínas (Gjonnaess 1972) y por VII<sub>a</sub>-factor tisular (Silverberg, Nemerson y Zur, 1977). Si alguna de estas formas de activación tiene significado "in vivo", no está aún aclarado, el factor VII requiere vitamina K durante su síntesis para tener actividad biológica-coagulante.

#### FACTOR VIII: GLOBULINA ANTIHEMOFILICA (G.A.H.).

Esta glicoproteína se encuentra ausente o disminuída en su actividad procoagulante en la hemofilia A, siendo normal el factor VIII relacionado al antígeno. La hemofilia A fue descrita por primera vez en la Argentina por el Dr. Alfredo Pavlovsky.

También se encuentra disminuída en la enfermedad de Von Willebrand, que difiere de la hemofilia, en que puede cursar con tiempo de sangría prolongado, alteraciones en la adhesividad y agregación plaquetaria con ristocetina, factor VIII<sub>ag</sub>, en niveles disminuídos y en que se hereda de modo autosómico dominante, afectando también a las mujeres

El factor VIII actúa en la vía intrínseca, tiene una vida media de 12 a 18 hs. Este factor no es adsorbible por geles inorgánicos, su actividad coagulante se consume durante la coagulación, por lo que en suero sólo se encuentra factor VIII rag.

El factor VIII (G.A.H.) es una glicoproteína que tiene distintas actividades. En esta molécula compleja se distinguen la actividad del f. VIII (coagulante), f. VIII rag (relacionado al antígeno) y cofactor de ristocetina o f. VW, Hay varias teorías, siendo alguno de ellos partidarios de tres propiedades de una misma molécula, mientras que otros piensan que son tres moléculas distintas. Hay una hipótesis que el f. VIII de PM menor es transportado por f. VIII rag.

#### FACTOR IX (P.T.C.) COMPONENTE TROMBOPLASTICO DEL PLASMA.

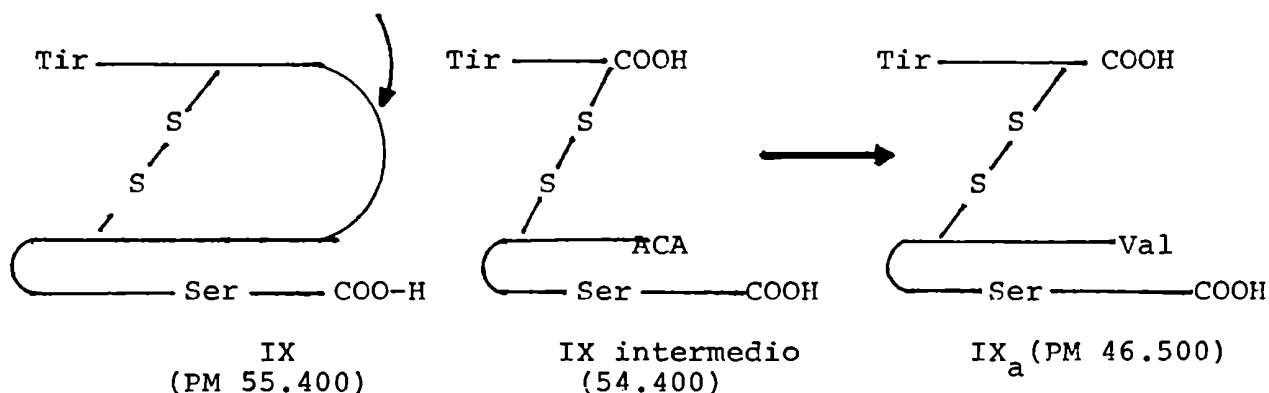
No se consume en el proceso de coagulación y como el resto de los factores Vit.-K dependiente, es producido en el hígado y absorbido por los geles inorgánicos. La vida media es de 18 a 30 horas.

La deficiencia congénita de la actividad procoagulante de este factor, ocasiona la hemofilia B, indistinguible en su aspecto clínico y genético de la Hemofilia A.

Es una serino proteasa, cuyo mecanismo de activación

fué muy bien estudiado por Davie y col. 1973, Fujikawa y col. 1973, 1974 b.

La activación del F. IX por el XI<sub>a</sub> es similar en el bovino (PM 55.400) y en el humano (PM 57.000). La activación ocurriría en 2 etapas, en la primera se formaría una molécula intermedia con dos cadenas polipeptídicas, liviana (PM 16.000) y pesada (PM 37.000) unidas por puentes disulfuros. En la segunda etapa, por ruptura de la cadena pesada (PM 27.000) y liberación de un fragmento se forma el IX<sub>a</sub>. Esta activación por el XI<sub>a</sub> es en presencia de Ca<sup>2+</sup>.



Este factor IX<sub>a</sub> se uniría luego al factor VIII sobre micelas fosfolípidicas(plasmáticas y/o plaquetarias) y en presencia de Ca<sup>2+</sup>, formaría el complejo activador del factor X.

Este factor requiere Vit.-K para su síntesis normal en cuanto a su actividad biológica-coagulante se refiere.

#### FACTOR X. STUART PROWER.

La actividad coagulante de este factor es normal cuando

la síntesis del mismo se realiza en presencia de Vit.-K. Como los otros factores Vit.-K dependientes, se adsorbe por sales inorgánicas (PM: 59.000).

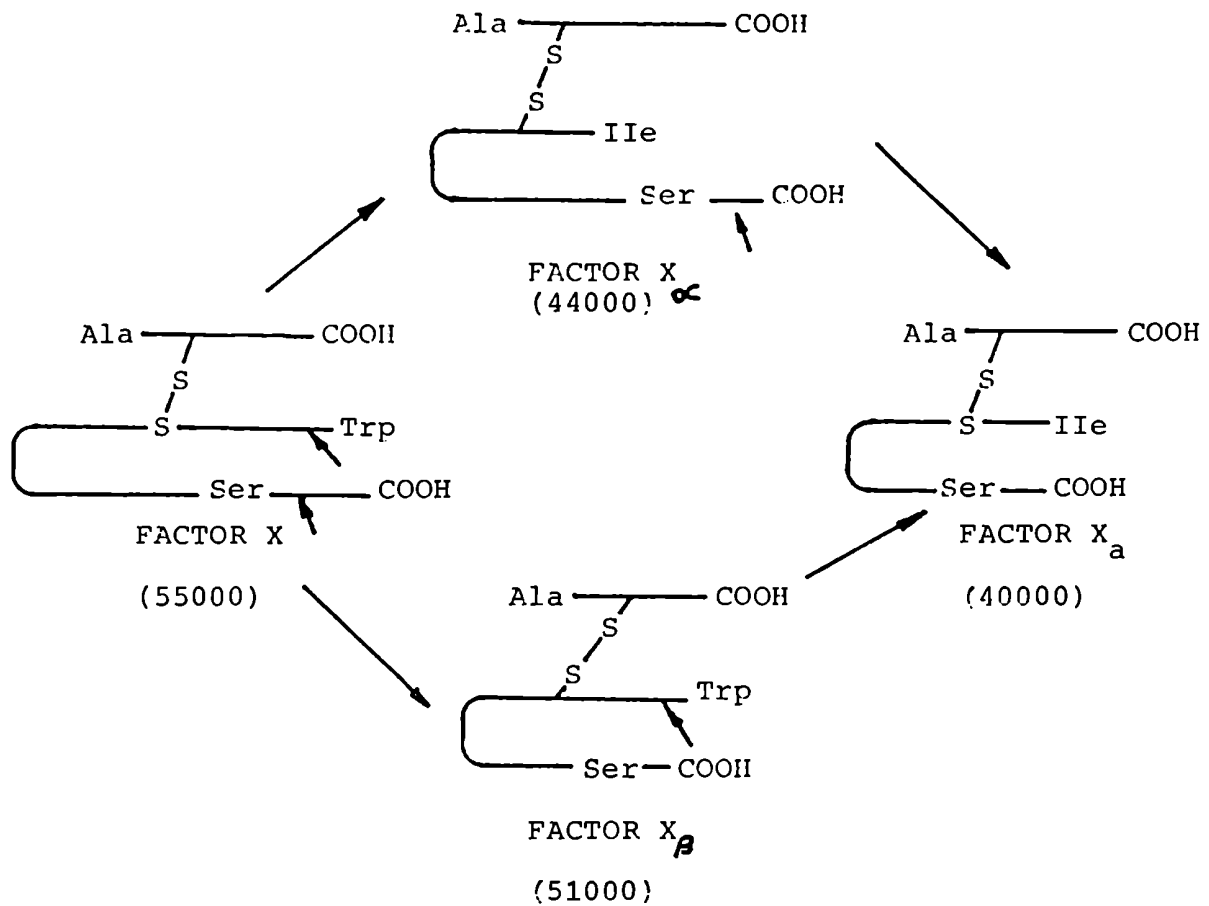
En su forma inactiva circula como una glicoproteína de 2 cadenas polipeptídicas unidas por uno o más puentes disulfuro.

La cadena liviana tiene un PM de 16.000 y la pesada de 38.000 (Fujikawa y col. 1972, Jackson 1972, Enfield y col. 1975). En esta última se encuentran los carbohidratos (10% en total).

Durante el proceso de coagulación el factor X pasa a  $X_a$  ya sea por acción del factor  $IX_a$  con el F. VIII y fosfolípidos o por el F. VII-factor tisular.

El factor X también puede activarse por otras proteasas como tripsina o veneno de víbora Russell a F. X (Bajaj y col. 1973).

La activación del factor X por cualquiera de estos mecanismos se produce por proteólisis limitada de una unión arginina-isoleucina en la región amino-terminal de la cadena pesada liberando el fragmento de PM 9.000. Si ocurre una proteólisis posterior se libera un péptido de PM 4.000, de la misma cadena pesada lo que da lugar a formación del F.  $X_a$  y F. X, ambos con igual actividad coagulante.



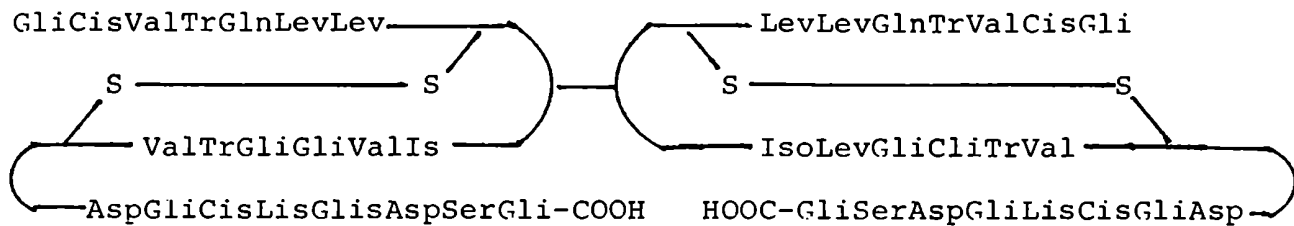
El factor X<sub>a</sub> es capaz de degradar la protrombina (F. II) y generar trombina a través del complejo activador que forma con fosfolípidos y Ca<sup>++</sup> y F. V. La formación del complejo X<sub>a</sub>-V-fosf.-Ca<sup>++</sup> involucra los residuos de X -carboxiglutamínicos del X<sub>a</sub>.

La vida media del factor X es de 40 horas, aproximadamente.

#### FACTOR XI. ANTECEDENTE TROMBOPLASTICO DE PLASMA (A.T.C.).

En su forma inactiva tiene un peso molecular de 124.000 daltons (Kurachi y col. 1977, Bauma y col. 1977) y consiste en 2 cadenas polipeptídicas idénticas unidas por un puente disulfuro.

La forma activada contiene dos sitios activos (Koide y col. 1977) está constituida por cuatro cadenas, dos livianas y dos pesadas. Sus sitios activos son similares a las otras serinoproteasas del sistema de coagulación, ya que mantiene la misma secuencia de amino ácidos vecinos a la serina.



La deficiencia en humanos de factor XI fue descrita en 1953 por Rosenthal y colaboradores, y luego por Kociba y colaboradores (1969), los pacientes suelen sangrar luego de cirugía y traumatismos cuando la deficiencia es severa. Su herencia es autosómica por lo que se presenta en ambos sexos. Este factor también se encuentra en el suero y sólo se consume parcialmente.

El factor XI<sub>a</sub> es inhibido por antitrombina III (Kurachi and Davie, 1977) inhibidor de tripsina de soya, inhibidor de tripsina pancreática (Wuepper, 1972) inhibidor de tripsina (Heck and Kaplan, 1974) e inhibidor de C<sub>1</sub> (Forbes y col., 1970). Con antitrombina III el factor XI<sub>a</sub> forma un complejo estable de un mol de enzima y dos moles de inhibidor (Kurachi

y col. 1977). El inhibidor está unido a la cadena liviana, la que contiene el sitio activo.

#### FACTOR XII HAGEMAN .

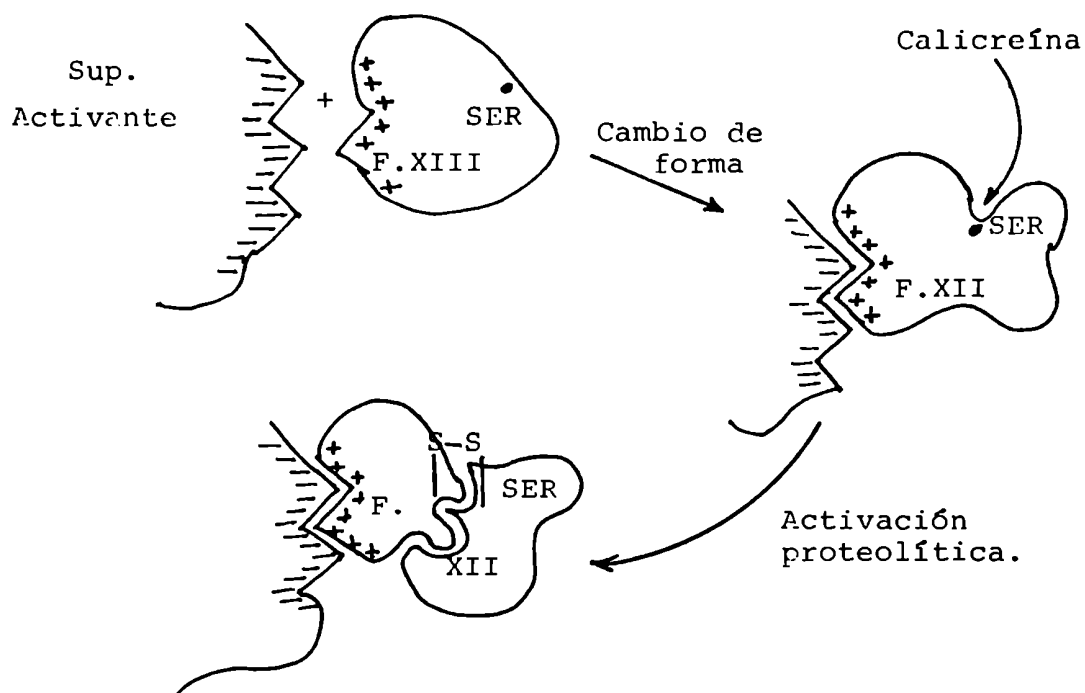
El factor XII humano es una glicoproteína de una cadena polipeptídica con un puente disulfuro (PM 75.000) (Revak, 1977, Chan and Movat, 1977). Este factor puede activarse por superficies rugosas o por elementos con cargas negativas: colágeno, ácido elóxico, caolín, etc.; la activación ocurriría luego de ser adsorbido a la superficie de cargas negativas, este proceso se denomina "activación en fase sólida" o por contacto, y sólo produce un cambio en la estructura molecular sin variar el peso molecular. Sin embargo adquiere con ello mayor susceptibilidad para su proteólisis por otras enzimas (calicreína, plasmina, F. XI<sub>a</sub>, tripsina, proteasas celulares, etc.), las cuales provocarían una primera ruptura molecular sin cambio en el peso molecular, generando el factor XII<sub>a</sub>, éste conserva la capacidad de fijarse a superficies rugosas y adquiere actividad proteolítica para activar la precalicreína, el proactivador del plasminógeno y especialmente el factor XI. Una mayor proteólisis de la molécula del F. XII por estas enzimas genera fragmentos de menor peso molecular (Kaplan y col., 1971, Cochrane y col., 1973, Revak y col. 1974, Revak y col. 1976). uno de los cuales tiene PM

28.000 Daltons y se denomina E o F. XII<sub>a</sub> β o F.XII<sub>af</sub> que posee una importante acción activadora de la precalicreína pero escasa actividad sobre el factor XI. Este fragmento ya no tiene propiedad de unirse a superficies rugosas, por lo tanto, puede liberarse a circulación y activar otras moléculas circulantes de precalicreínas.

Igualmente, una vez generadas la calicreína, plasmina, F. XI<sub>a</sub>, etc., las mismas pueden activar moléculas circulantes de F. XII, proceso que se ha denominado activación en "fase líquida".

Las acciones proteolíticas del F. XII<sub>a</sub> α y β sobre diferentes sustratos son potenciadas por un quininógeno plasmático de alto peso molecular (Revak y col. 1977), que actualmente se puede identificar con los nuevos factores de coagulación denominados: Fitzgerald, Williams, Fleujeac o Reid. Otras acciones de los fragmentos del F. XII<sub>a</sub> son la capacidad activadora de los factores del sistema complemento y propiedades quimiotácticas.





FACTOR XIII. Factor estabilizante de la fibrina.

El factor XIII plasmático es un zimógeno compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas distintas entre sí.

(Alfa<sub>2</sub> Beta<sub>2</sub>).

Estas cadenas están unidas por uniones no covalentes, el peso molecular del tetrámero es de 320.000 Daltons.

La trombina en presencia de iones Ca<sup>2+</sup> convierte el factor XIII \_\_\_ XIII<sub>a</sub>, este último expresa la actividad transglutaminasa.

La unión entre las cadenas alfa, le confiere al coágulo resistencia a la lisis, esto hace al coágulo resistente e insoluble en solución de Urea 5 M o de ácido monocloroacético al 1%. Para mantener una hemostasia normal solamente es necesario 2% de factor XIII. El factor XIII se consume durante la coagulación o sea las cadenas  $a_2$  se consumen quedando en suero las  $b_2$ , estas últimas no poseen la parte funcional, cumplirían la función de transportadoras.

#### QUININOGENOS DE ALTO PESO MOLECULAR (Q.A.P.M.).

En el plasma humano se conocen dos quininógenos, uno de alto peso molecular 110.000 Daltons, que representa 1/5 parte del contenido total plasmático y otro de bajo peso molecular 60.000 (Q.B.P.M.) y representa las 4/5 partes restantes.

Por acción limitada de la calicreína plasmática o tisular sobre los quininógenos se liberan quininas.

La calicreína plasmática es 40 veces más activa para liberar bradiquinina de Q.A.P.M. que de Q.B.P.M.

Los Q.A.P.M. son cofactores no enzimáticos y juegan un papel importante en la activación del sistema de coagulación.

Niveles bajos de Q.A.P.M. se han encontrado en pacientes con enfermedad hepática lo que hace suponer que la síntesis de estas proteínas es en el hígado.

PRECALICREINA (Fletcher).

La calicreína es la enzima derivada de la precalicreína, la cual se encuentra en plasma con dos pesos moleculares distintos: 88.000 y 85.000 Daltons (Mendle y col. 1977). Las dos formas moleculares son activadas a calicreína por el XII<sub>a</sub> produciendo una única ruptura proteolítica que lleva a la formación de una molécula que contiene dos cadenas unidas por puente disulfuro una pesada (PM 52.000) y una liviana (PM 36.000 o 33.000). El sitio activo de la calicreína determinado por la incorporación de <sup>3</sup>H-DFP reside en la cadena liviana de la molécula.

La precalicreína es el componente que falta en la deficiencia de Fletcher (Wuepper, 1973). Se postularon por lo menos tres funciones de la calicreína: 1) la activación del factor XII unida a superficies, la cual es acelerada por el quininógeno de Alto Peso Molecular (Q. A. P. M.), 2) la liberación de un nonapéptido vaso activo, a partir del Q.A.P.M. la bradiquinina (Robinson y col. 1975) y 3) la activación del sistema fibrinolítico, ya sea vía pro activador de plasminógeno o plasminógeno directamente (Vennerod y col., 1976).

La deficiencia de precalicreína (Fletcher) se caracteriza por un prolongamiento en el tiempo de tromboplastina parcial con caolín, que se corrige a valores normales con

mayor tiempo de incubación.

Los deficitarios en precalicreína no tienen transtor-  
nos hemorrágicos.

#### FACTOR FITZGERALD.

Recientemente (Schiffman y Lee 1974), se ha aso-  
mado la posibilidad de que un nuevo factor de coagulación  
actúa entre los factores XII y XI en la fase de activación  
por contacto de la coagulación, lo cual se vió apoyado por  
el descubrimiento de una familia con un nuevo defecto de coa-  
gulación (defecto Fitzgerald) (Saito y col. 1975) en donde  
el factor deficiente es probablemente idéntico al factor des-  
crito por Schiffman y Lee, (Ratnoff y col. 1976; Fitzge-  
rald factor and Fitzgerald trait. Wayne State University  
Symposium 1975, in press; tomado de Stormorken H. 1975). Los  
mismos autores señalan que dicho factor es diferente de la  
precalicreína y de un cofactor del factor Hageman que inter-  
viene en la transformación del plasminógeno en plasmina in-  
ducida por el factor XII (Ogston y col. 1969).

El factor Fitzgerald se considera como uno de los fac-  
tores que intervienen en la activación por contacto del sis-  
tema calicreína-quinina, pero hacen falta estudios adiciona-  
les que definan su exacto papel tanto en ese sistema como en

el de la coagulación.

El factor Fitzgerald parece ser un quininógeno de alto peso molecular ( $210.000 \pm 10.000$  daltons; Donaldson y col. 1976) y probablemente se requiere para la activación del factor XI (PTA) en presencia de factor XII (Hageman), precalificina plasmática (factor Fletcher) y caolín (Ratnoff y Saito, 1976).

El factor descrito como Factor Flaujeac, por Lacombe y col., (1975), y el factor Williams que citan los mismos autores en su trabajo, parecen ser idénticos al factor Fitzgerald.

#### FACTOR PASSOVOY.

Hougie y col. (1975), descubrieron una diátesis hemorrágica moderada transmitida de forma autosómica dominante, caracterizada por un tiempo parcial de tromboplastina prolongada y atribuida a la deficiencia de un nuevo factor, el factor Passovoy, ya que los niveles de todos los factores de coagulación conocidos eran normales. Con frecuencia, estos pacientes eran confundidos con deficiencia de Factor XI.

#### FACTOR REID.

Lutcher (1976) describió recientemente un paciente

hipertenso con un tiempo de tromboplastina parcial con caolín prolongado, sin historia hemorrágica, con deficiencia en un quininógeno al que se llamó factor Reid, pero no es clara su diferenciación con los otros quininógenos como los factores Fitzgerald, Flaoujeac y Willamas ya comentados.

## MECANISMO DE COAGULACION.

En 1964 Mac Farlane y Davie-Ratnoff independientemente proponen un mecanismo de coagulación en cascada, sugiriendo que cada precursor inactivo por acción enzimática pasa a su forma activa y así sucesivamente hasta llegar a la formación de fibrina. De esta forma con un pequeño estímulo inicial se desarrolla un sistema de reacciones en cadenas de amplificación biológica. El mecanismo de coagulación puede ser dividido en tres etapas:

- 1) Fase de contacto (vía intrínseca).
- 2) Formación de trombina.
- 3) Formación de fibrina.

En la etapa inicial del mecanismo intrínseco o fase de contacto, el factor XII es convertido a XII<sub>a</sub> por un cambio conformacional mediado por superficies cargadas negativamente y por la acción de la calicreína.

La calicreína se forma a partir de la precalicreína, esta activación es acelerada por la presencia de quininógenos de alto peso molecular (Schiffman y Lee, 1974).

La actividad proteolítica de F XII<sub>a</sub> es la responsable de la activación del factor XI a XI<sub>a</sub>, esta reacción no requiere Ca<sup>2+</sup>.

El factor XI<sub>a</sub> es una serino proteasa que convierte al factor IX a IX<sub>a</sub>, siendo necesaria la presencia de Ca<sup>2+</sup> en esta

reacción, la que transcurre en dos etapas (Kato y col. 1974).

El f. IX, es uno de los factores Vit. K dependientes, de PM 55.400, formado por una sola cadena (Fujikawa y col., 1974), con un contenido de Hidratos de carbono de 26%.

La primera etapa de activación es la ruptura de una cadena polipeptídica para formar una cadena liviana (PM 16.600) a partir de la región N-terminal de la molécula, y una pesada (PM 38.000) la cual tiene el amino ácido alanina como residuo N-terminal, ambas cadenas están unidas por puentes disulfuro, esta forma intermedia del f. IX no tiene actividad coagulante.

La segunda etapa de activación, tiene una velocidad limitante del proceso que es la liberación de un péptido (PM 9.000) a partir de la porción N-terminal de la cadena pesada, que deja un residuo N-terminal nuevo de valina. Esta etapa va acompañada por la aparición de actividad coagulante.

El f. IX<sub>a</sub> es una serino proteasa y el sitio activo está localizado en la cadena pesada, en una región que tiene una secuencia considerablemente homóloga con otras serino proteasas; la cadena liviana que contiene el sitio de unión para el Ca<sup>2+</sup>, el cual depende de la Vit-K, probablemente gobierna la especificidad de la enzima.

La incubación del f. IX con una mezcla del f. X<sub>a</sub>, fosfolípido y Ca<sup>2+</sup>, también produce f. IX<sub>a</sub> y probablemente esta reacción puede ligar los sistemas intrínsecos y extrínsecos.



El próximo factor a ser activado en la secuencia es el f. X, una reacción que no sólo requiere fosfolípido y  $\text{Ca}^{2+}$ , sino que también es necesaria una proteína adicional, el f. VIII, el f. VIII que, clínicamente es el factor de coagulación más importante ya que su defecto cuali o cuantitativo causa severas hemorragias. El factor VIII y el f. V se asemejan en algunos aspectos, aunque no está totalmente conocida su estructura y su función. No se ha encontrado actividad enzimática de esta proteína, y además el f. VIII no activa al f. X en ausencia de  $\text{IX}_a$ ; pareciera que el f. VIII actúa como una proteína reguladora aumentando la velocidad de activación del f. X de la misma manera que el f. V acelera la conversión de la protrombina. El factor  $\text{XII}_a$  o sus fragmentos de degradación enzimática (f.  $\text{XII}_f$ ), en forma directa o a través de la formación de f.  $\text{XI}_a$  y f.  $\text{IX}_a$ , de plasmina o de calicreína, tendrían la capacidad de activar o modificar la molécula del f. VII (Altman y col., 1966) (Laake y col., 1974) lo que establecería una interacción entre las vías intrínsecas y extrínsecas de la generación de trombina.

1) Activador Extrínseco del Factor X.

El factor tisular, agente activo de los tejidos, es una lipoproteína, cuando ésta se disocia en lípidos y proteína, pierde actividad procoagulante, la cual se recupera cuando el lípido y la proteína se recombinan (Studer, 1946).

Estudios más recientes han demostrado que el compo-

nente lipídico puede ser reemplazado por lípidos sintéticos (Nemensson y Pitlick, 1972) y que la proteína aislada a partir de numerosos y diferentes tejidos, contiene dos componentes similares, difiriendo sólo en sus pesos moleculares (220.000 y 300.000).

La exposición del plasma al factor tisular produce una rápida activación del f. X, pero esto ocurre sólo en presencia de f. VII.

El f. VII es una glicoproteína (PM 45.500) formada por una sola cadena que requiere Vit. K durante su síntesis, y fue aislada a partir de plasma bovino (Kisiel y Davie, 1975; Radcliffe y Nemerson, 1975).

Si durante la preparación los inhibidores de proteasas no son incluidos en las distintas etapas, se obtiene una forma de f. VII de dos cadenas que tiene una actividad específica por lo menos 80 veces mayor que la del f. VII de una sola cadena.

Una característica del f. VII es que la forma de una sola cadena de la proteína existe en el plasma con un residuo activo serina, pero quizás no pueda unirse al sustrato (f. X) hasta que el complejo con el factor tisular no se haya formado.

Hay diferencias entre el peso molecular del f. VII plasmático (PM 59.000) y el f. VII que se encuentra en suero (PM 45.000).

Radcliffe y Nemerson (1975) investigaron la activación del f. VII bovino, y encontraron que en presencia de cantidades catalíticas de f.  $X_a$  fosfolípido y  $Ca^{2+}$  se rompe una unión específica arginina-isoleucina dando dos cadenas peptídicas de casi igual tamaño unidas por uniones disulfuro, la prolongación de la incubación del f. VII de dos cadenas con  $X_a$ , produce la pérdida de un fragmento peptídico de peso molecular 12.500 y de la actividad coagulante.

Otras proteínas activan el f. VII, además de  $X_a$ , éstas son trombina, el fragmento f del f. XII, calicreína, f.  $IX_a$  y plasmina.

## 2) Formación de Trombina.

Vía común a los dos mecanismos de activación.

La activación del f. X ya sea por vía intrínseca o extrínseca se lleva a cabo por ruptura de uniones peptídicas de sus moléculas.

La rápida conversión de protrombina a trombina por el f.  $X_a$  requiere fosfolípidos,  $Ca^{2+}$  y f. V, el factor V acelera la conversión de protrombina en presencia de  $X_a$  pero no tiene actividad por sí misma. El mecanismo de activación de la protrombina por el complejo  $X_a$  lleva a la formación de trombina (ver factor II). La trombina es una serino proteasa de dos cadenas polipeptídicas la cual tiene una especificidad similar a la tripsina. La cadena B es la más pesada y tiene una secuencia homóloga a la de las serino proteasas pancreá-

ticas, pero difieren en el contenido de hidratos de carbono y en que contiene tres puentes disulfuro intracadena, comparado con los cuatro encontrados en las enzimas pancreáticas. La cadena liviana A es la que confiere la especificidad de la enzima.

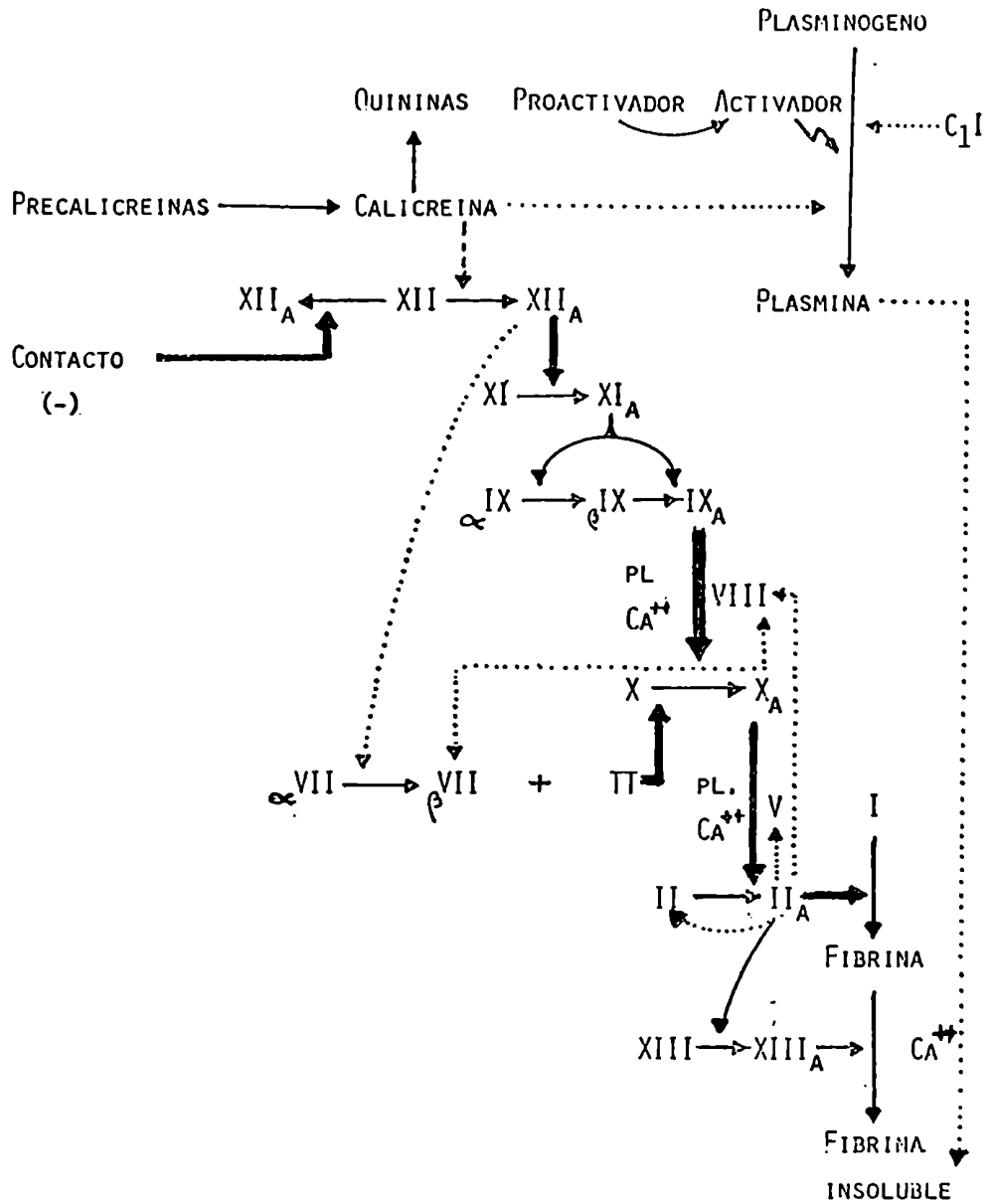
### 3) Formación de Fibrina.

La interacción de trombina con fibrinógeno (ver fibrinógeno) da lugar a la etapa final de polimerización y estabilización de fibrina. El primer paso de conversión del fibrinógeno es la liberación del fibrinopéptido A a partir de la región N-terminal de la cadena A, se cree que esto produce un cambio conformacional que no sólo permite la asociación termino-terminal de las moléculas de fibrina, sino que también expone el péptido B a la acción de la trombina. La liberación del péptido B de la cadena Beta es seguida por la asociación lateral de las moléculas de fibrina. El polímero de fibrina formado de esta manera es susceptible a la acción de enzimas proteolíticas presentes en el plasma; el paso final de la coagulación es la formación de una fibrina más resistente a la degradación enzimática.

La estabilización de la fibrina es llevada a cabo por el factor XIII<sub>a</sub>. El factor XIII es activado por la trombina e iones Ca<sup>2+</sup>, cataliza la formación de uniones isopeptídicas, entre las cadenas Gamma y forma dímeros δ-δ y más rápidamente entre cadenas Alfa para formar polímeros Alfa (Mc Kee y col., 1970) (Ver F. XIII).

El coágulo entrecruzado de esta manera es insoluble y considerablemente más resistente a la acción de enzimas proteolíticas tal como plasmina.

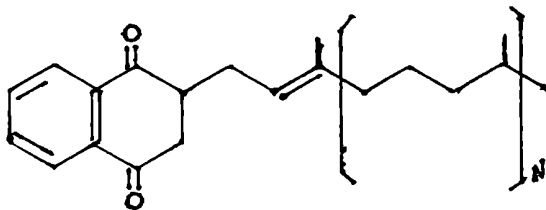
MECANISMO DE COAGULACION Y SISTEMAS INTERRELACIONADOS.



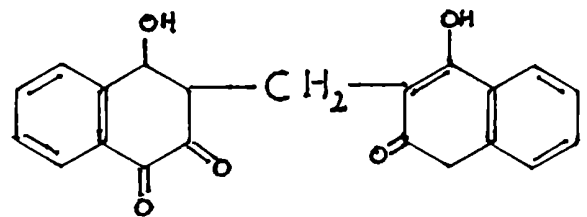
VITAMINA K Y FACTORES DE COAGULACION.

Es conocido el hecho de que la vitamina K es esencial para la síntesis completa de los factores II, VII, IX y X. Hace pocos años se conoce la existencia de otras proteínas cuyas funciones aún no son claras y que también son dependientes de la vitamina K, como: Proteínas C, M, S de plasmas bovinos (Stenflo, 1976, Prowese y col., 1977) y proteínas C y S de plasmas humanos (Diseipo, Davie, 1979, Kisiel 1979). También en tejidos se encuentran proteínas carboxiladas involucradas en el transporte de  $Ca^{2+}$ , en riñón (Hauschka, 1976), placenta (Friedman y col., 1979), páncreas (Traverso y col., 1980), bazo (Buchthal y col., 1979), pulmón (Bell y col., 1979), y en huesos, llamada osteocalcina.

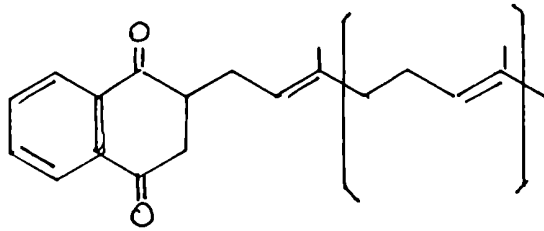
En 1943 Dan y Doisy aislan de la alfalfa y del pescado las vitaminas  $K_1$  y  $K_2$  respectivamente, en la misma época Paul Link aisla del trébol dulce el agente que provoca hemorragia en el ganado bovino, éste tiene estructura de bishidroxycumarina. Este compuesto llamado cumarol es un antagonista de la vitamaina K.



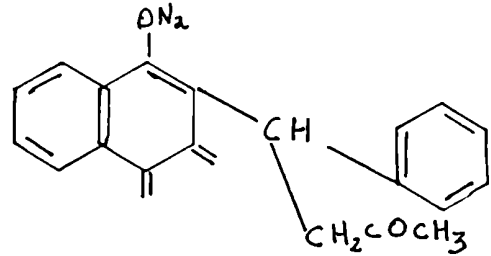
VIT  $K_1$  (N=3)



DICUMAROL



VIT K<sub>2</sub>

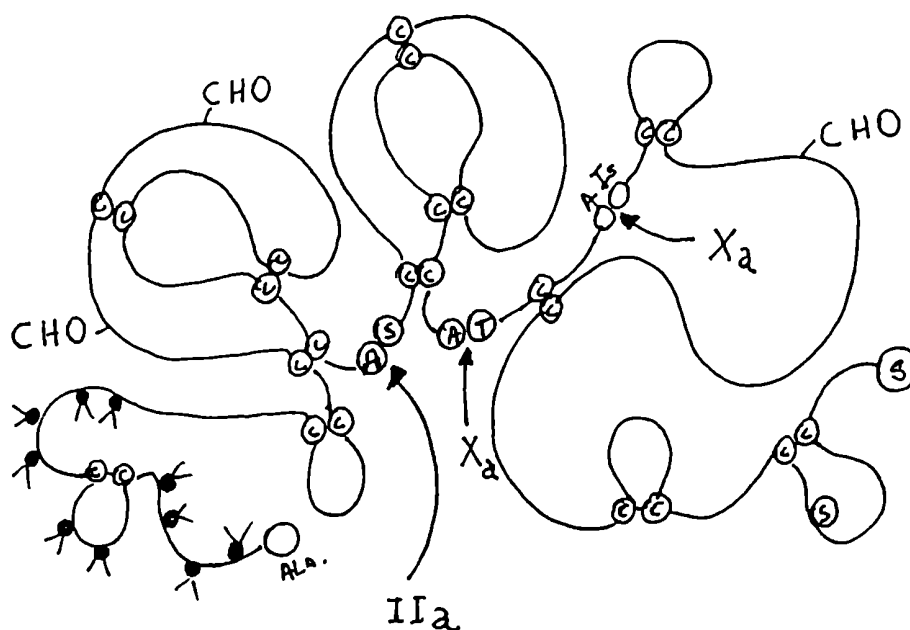


WARFARINA

El aporte exógeno de vitamina K al organismo es por ingesta de vegetales verdes. La vitamina K es sintetizada por la flora bacteriana del intestino delgado.

En 1974 comienza una nueva etapa en la investigación sobre la vitamina K. Stenflo y col., 1974 y Nelsestven y col., 1974, demostraron que la protrombina funcional contiene residuos de un nuevo aminoácido ácido carboxi-glutámico. Estos están en la región N-terminal de la cadena polipeptídica. Los ácidos glutámicos son carboxilados después que la proteína ha sido sintetizada, pero antes de ser excretada por el hígado. El grupo carboxi adyacente de los residuos del ácido glutámico es necesario para que estas proteínas (Vit. K dependientes) puedan unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos. Veamos en la figura la representación de la protrombina con los sitios dicarboxilados y los sitios de acción del  $\text{Xa}$  y  $\text{IIa}$ .



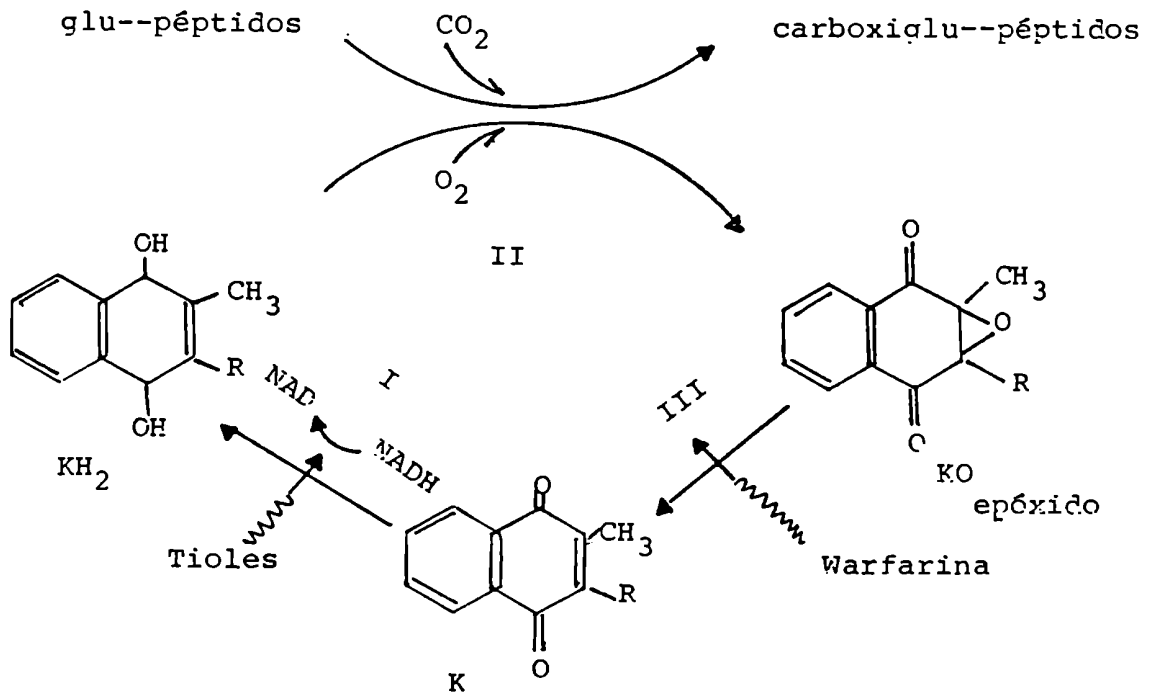


Estructura secundaria de la protrombina.

En los casos de deficit inducido de vitamina K (Dicumarínicos o Warfarina) las moléculas de estos factores (Precursores o proenzimas) tienen características inmunológicas similares, pero no funcionantes ya que no pueden unirse al  $Ca^{2+}$ , fosfolípido y Xa en el mecanismo de coagulación para la activación de la protrombina.

Estas proteínas formadas en ausencia de vitamina K, tienen función inhibitoria en algunas pruebas plasmáticas de coagulación y se denominaron P.I.V.K.A. (Proteína inhibitoria en ausencia de vitamina K). En la actualidad se llaman acarboxiladas o hipocarboxiladas.

La existencia de los factores II, VII, IX y X con actividad coagulante deficiente ha sido demostrada por su falta de adsorción a sales de  $Ba^{2+}$  y por su comportamiento electroforético y cromatográfico diferente respecto al factor normal. La participación de la vitamina K en la carboxilación de estas proteínas, se inicia con la forma reducida de la vitamina K  $H_2$ ; esa puede ser producida por reducción de vitamina K por NADPH o NADH y por ciertos compuestos tiólicos.



En 1976 Stenflo aisla una proteína C, de plasma bovino, distinta de los otros factores de coagulación vitamina K dependiente.

Su síntesis también es inhibida por dicumarol. El mecanismo por el cual la proteína C inhibe la coagulación no se conoce aún; hay trabajos que demuestran que es un inhibidor competitivo de la activación de protrombina y que este efecto inhibitorio se puede revertir por incremento en la concentración de factor V. Recientes trabajos demuestran que la proteína C activada (Proteasa) inhibe la coagulación por inactivación proteolítica del factor V.

Se conoce el contenido de residuos ácidos carboxiglutámicos en las siguientes proteínas:

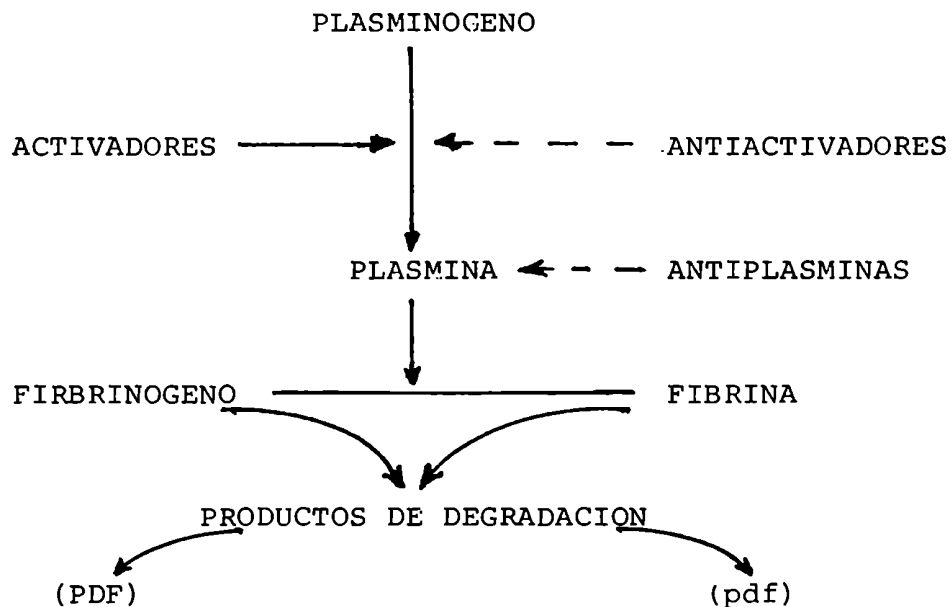
Protrombina bovina.....	10.0
Protrombina humana.....	10.1
Factor VII bovino.....	9.4
Factor IX bovino.....	12.2
Factor IX humano.....	12.4
Factor X bovino.....	12.3
Factor X humano.....	11.8
Factor X humano.....	11.6
Proteína C bovina.....	10.8
Proteína C humana.....	10.4
Proteína S bovina.....	10.0
Proteína S humana.....	10.3

La similitud en el contenido de los residuos ácidos carboxiglutámicos está de acuerdo con la estructura similar que tienen estos factores y se conoce la coincidencia en la secuencia de aminoácidos de los factores II, X, VII proteínas C y S de origen bovino.

## FIBRINOLISIS.

Son varios los mecanismos y caminos por los cuales se puede manifestar la actividad fibinolítica plasmática.

La fibrinólisis es el proceso responsable de la digestión que promueve o inhibe la conversión de plasminógeno (precursor inactivo) a plasmina (serino proteasa activa).



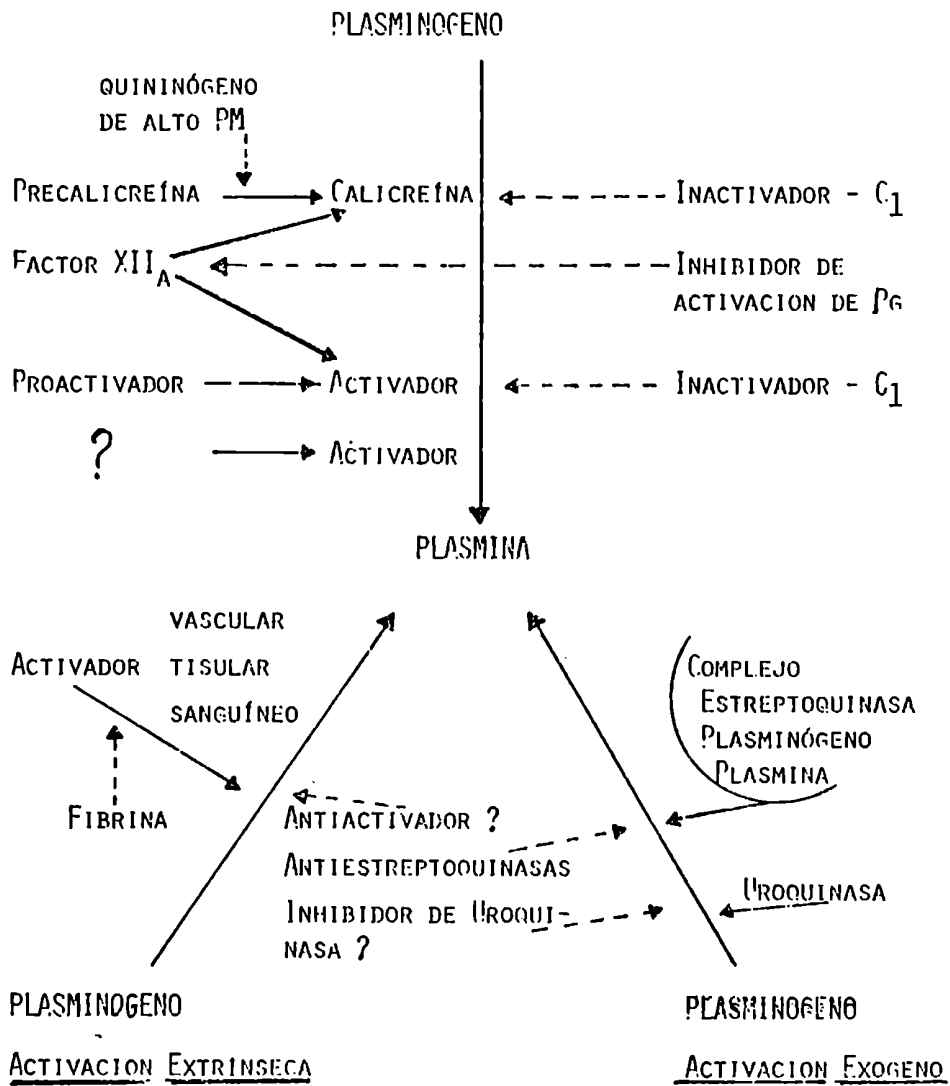
## PLASMINOGENO.

El plasminógeno es una globulina formada por una sola cadena, la concentración en el plasma normal adulto es de 200 ug/ml, el P.M. es de 92.000 Daltons y el grupo N-terminal es ácido glutámico (Glu-Pg).

También se forma como intermediario el lisina-plasminógeno (P.M. 83.000), pero el plasminógeno circulante es

ESQUEMA DE FIBRINOLISIS.

ACTIVACION INTRINSECA

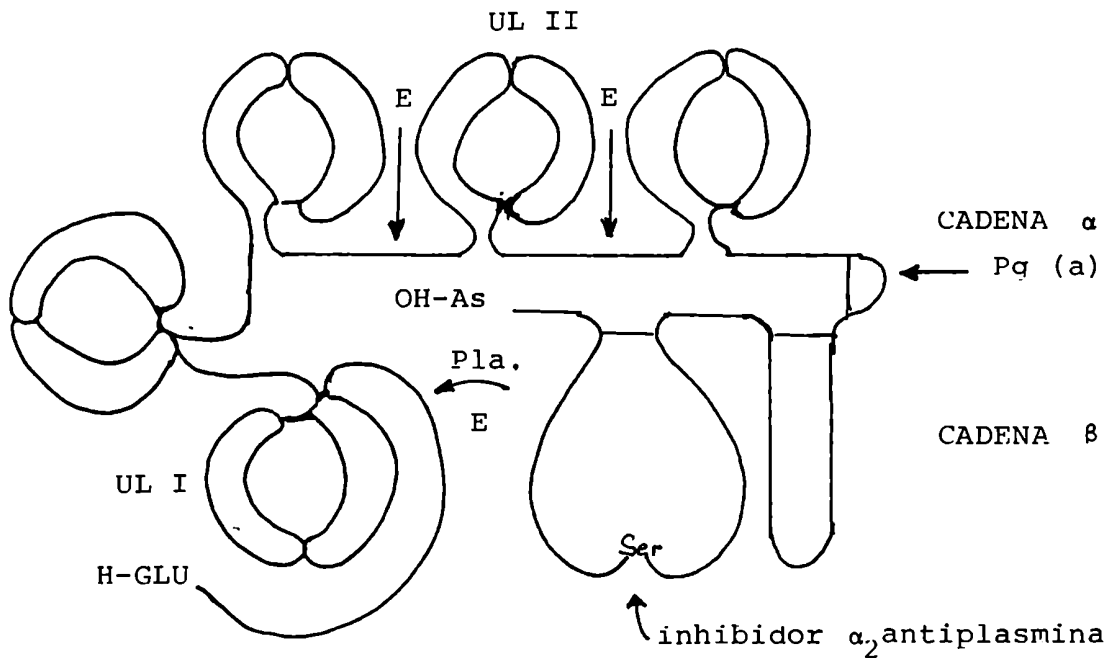


glutámico-plasminógeno cuya vida intermedia es de 2-2,5 días, mientras que el Lisina-plasminógeno es de 0.8 días.

Se sintetiza en el hígado, pero también se cree que se produce en médula ósea (eosinófila) y riñón.

Los activadores del plasminógeno a plasmina pueden ser: vasculares, tisulares mediados por el factor XII, estreptoquinasa.

Representación esquemática de la molécula de plasminógeno y los sitios de clivaje por Elastasa (E), plasminógeno activado Pg(a), y los sitios de unión a lisina (UL. I y UL. II).

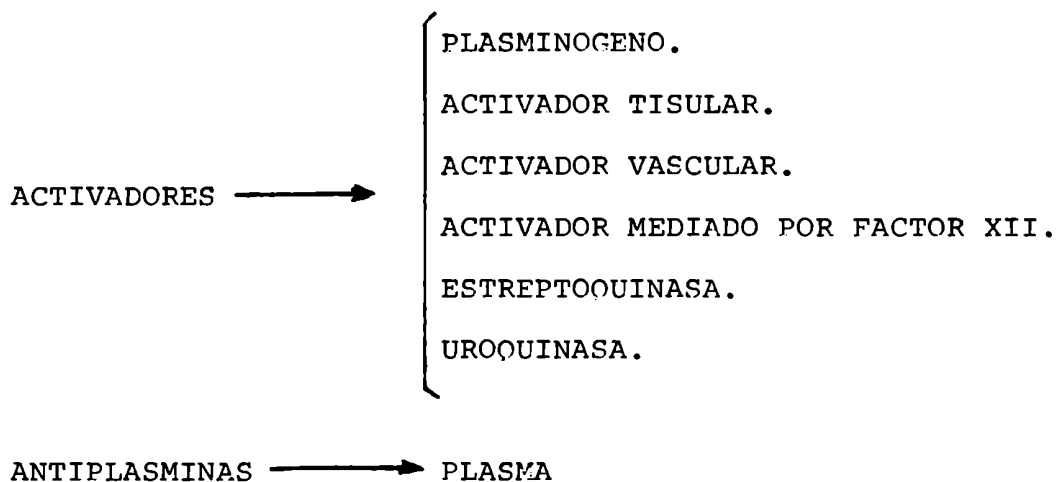


## PLASMINA.

La plasmina es formada por dos cadenas, una pesada y otra liviana unidas por dos puentes disulfuro, su centro activo serina se localiza en la cadena liviana; los sitios de unión a lisina se localizan en la cadena pesada, siendo estos sitios específicos para su unión con la fibrina (Wiman 1979).

El peso molecular es entre 8.000 y 9.000 Daltons menor que el del plasminógeno. La plasmina hidroliza uniones arginina y lisina, degrada además del fibrinógeno, fibrina, al factor V y VIII; esta última acción es más manifiesta en sistemas purificados.

## ACTIVADORES DEL PLASMINOGENO.



La conversión de plasminógeno a plasmina es llevada a cabo por acción del activador del plasminógeno, se sabe poco sobre el activador del plasminógeno y del mecanismo por el

cual lo lleva a interactuar con el plasminógeno.

Hasta el presente el principio activo conocido como activador del plasminógeno se sabe que abarca un grupo de activadores originados a partir de diferentes sistemas.

In vivo ocurre fibrinolisis a pesar de la alta concentración de inhibidores circulantes. Existen varias hipótesis que tratan de explicar esto: Chesterman sugiere que los activadores de plasminógeno se unen selectivamente a la fibrina y activan al plasminógeno que difunde dentro del trombo. Ambrus y Markus proponen que la plasmina circula como complejo plasmina-inhibidor y el complejo se disocia en presencia de fibrina.

Alkjaersig y col, 1959 dan por cierto que el plasminógeno se adsorbe en la fibrina y luego es convertido a plasmina por activadores que difunden al interior del trombo, este último está relativamente libre de inhibidores; esta hipótesis es la que se acerca más a la realidad.

#### ACTIVADOR TISULAR.

La mayoría de los tejidos contienen una cierta cantidad de activador del plasminógeno, una de ellas es soluble en solución salina y una cierta cantidad de otro activador menos soluble, se extrae de los tejidos con tiocianato de potasio.



Este último activador en contraste con el activador vascular es muy estable y se encuentra en la mayoría de los tejidos, es muy alto su nivel en el útero, ovarios, adrenales, próstata, etc. y está virtualmente ausente en hígado.

Se encuentra en células endoteliales y se sabe que la actividad es mayor en venas que en arterias; se ha encontrado también en glóbulos rojos.

Los leucocitos contienen plasminógeno, activador del plasminógeno y serino proteasas no plasmínicas que constituyen un probable sistema fibrinolítico alternativo importante (Plow y Edgington, 1975).

El rol del sistema celular de activación de plasminógeno sería la regulación de cicatrización de heridas y reparación de tejidos y el sistema humoral mantendría una integridad vascular además de contribuir a la cicatrización de heridas.

Algo muy interesante y novedoso en la actualidad es que las células neoplásicas producen una mayor cantidad de activador del plasminógeno y una actividad fibrinolítica no dependiente del plasminógeno; este proceso puede ser importante en la migración celular y metástasis tumoral.

#### ACTIVADOR VASCULAR DEL PLASMINOGENO.

Es extremadamente lábil in vitro, se desnaturaliza y

pierde rápidamente su actividad a temperaturas superiores a los 4°C Por esta razón ha sido parcialmente caracterizado químicamente.

Aoki y Von Kaula , 1971, han desarrollado una técnica que les permitió una caracterización limitada del mismo, aislado del árbol vascular de cadáveres humanos, el peso molecular estimado es de 65.000.

Tood demostró que las células endoteliales vasculares contienen activador del plasminógeno y parece probable que el mismo se forme en las células endoteliales de las pequeñas venas y quizás también en otros vasos, y sea liberado a la circulación.

El mecanismo de liberación del activador vascular a partir del endotelio vascular es hasta el presente desconocido, parece que las células endoteliales jóvenes son más ricas en activador que las maduras y que la producción del activador ocurre durante la diferenciación celular y maduración; parece que las catecolaminas tienen un rol importante en el mecanismo, aunque todavía no está totalmente aclarado.

Se especula que el activador sintetizado en las células endoteliales de las pequeñas venas es liberado a una velocidad muy lenta para mantener el nivel de activador vascular en condiciones de reposo, ya que en el plasma normal se detectan pequeñas cantidades de "activador espontáneo".

Parece también posible que estas células endoteliales en estado de reposo contienen un depósito o reserva del activador del plasminógeno, el cual puede ser movilizado o descargado totalmente o en parte por una gran variedad de estímulos, tales como: ácido nicotínico, adrenalina, ejercicio físico, oclusión venosa, stress emocional, etc. Se postula que el activador vascular puede estar disminuido por: a) síntesis defectuosa; b) almacenamiento defectuoso y c) por liberación defectuosa.

Nilsson (1975) comprueba por biopsias en un grupo de pacientes con trombosis venosa recurrente, síntesis o almacenamiento defectuoso del activador vascular del plasminógeno.

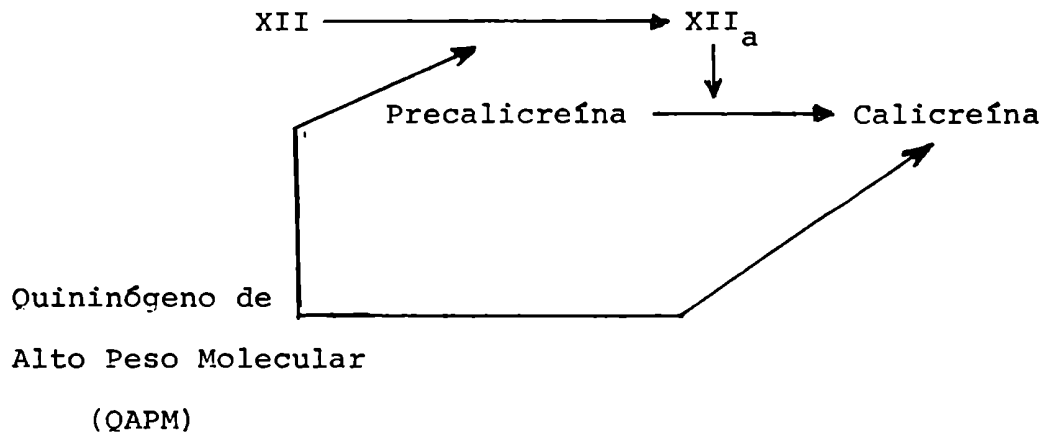
#### FIBRINOLISIS DEPENDIENTE DEL FACTOR XII.

Este mecanismo requiere la interacción de una superficie con por lo menos tres proteínas plasmáticas: factor XII, precalicreína y quininógeno de alto peso molecular (Q APM). Los plasmas deficitarios en algunos de estos tres componentes poseen una conversión anormal de plasminógeno a plasmina. Si se utilizan plasma normal y plasmas congénitamente deficientes, diluidos y acidificados y se incuban con caolín y se mide la generación de plasmina a través del tiempo se observa que:

La plasmina se genera rápidamente en el plasma normal, sin

embargo no hay conversión de plasminógeno a Plasmina en el plasma deficitario en factor XII, y en el plasma defecitario en Quininógenos de alto peso molecular (Williams, Fitzgerald, Fleujac). En el plasma deficiente en precalicreína (Fletcher) hay una menor conversión de plasminógeno a plasmina pero a medida que la incubación prosigue con superficies cargadas negativamente la velocidad aumenta paulatinamente. Esto es paralelo a la anomalía existente en coagulación en cada uno de los plasmas deficientes.

La precalicreína y el quininógeno de alta peso molecular circulan como complejos y quizás son absorbidos en forma conjunta a la superficie.



No hay unión detectable de calicreína a plasminógeno y la activación de éste último es dependiente del sitio activo de la calicreína.

Por varios trabajos se llega entonces a que la preca-

licreína es un proactivador del plasminógeno, o quizás el llamado cofactor de Hageman de otros investigadores.

Sin embargo, la actividad de proactivador del plasminógeno fue descubierta en la fracción globulínica del plasma deficitario en precalicreína por Kaplan y col. (1976).

El factor XI es de particular interés pues parece ser, según Thompson y col. (1977), que circula unido al quininógeno de alto peso molecular y, además, la activación del factor XI por el factor XII se aumenta por el quininógeno de alto peso molecular y el factor XI puede activar al factor XII unido a la superficie. Así, el complejo XI-QAPM interactúa con el factor Hageman unido a la superficie y una activación recíproca de los factores XI y XII puede llevar a cabo la autocorrección de los plasmas deficitarios en calicreínas, observada con una incubación prolongada en superficies contactables.

Se deben realizar más estudios para corroborar lo anterior o para determinar si lo que, en realidad, actúa es un contaminante no identificado.

#### UROQUINASA (UQ)

Se encuentra en la orina, es una  $\alpha_2$ - globulina compuesta por una sola cadena de PM 54.000. Es una enzima estable, producida por el riñón y quizás en algún otro lugar del cuerpo.

### ESTREPTOQUINASA (ST).

Muchas bacterias producen sustancias con actividad de activador del plasminógeno; clínicamente la única importante es la ST que es una  $\alpha$ -globulina de PM 47.000 Daltons producida por un estreptococo  $\alpha$ -hemolítico.

### INHIBIDORES.

#### Inhibidores de activación del plasminógeno.

Los antiactivadores están menos definidos que las antiplasminas pero se sabe que se encuentran naturalmente en el plasma.

La  $\alpha_2$ -Macroglobulina ( $\alpha_2$ -M) que es una antiplasmina, es un inhibidor competitivo de la UQ y parece probable que sea un antiactivador plasmático.

El suero contiene un antiactivador que se desarrolla durante la coagulación de la sangre y fue descrito por varios autores, este inhibidor fue purificado y parcialmente caracterizado por Hedner, es una  $\alpha$ -globulina que inhibe al Factor XII<sub>a</sub> de dos cadenas y reacciona inmediatamente con la UQ y ST. Se encontró elevado en algunos pacientes con trombosis venosa profunda recurrente, infarto de miocardio, cirugía, embarazo, algunas enfermedades renales y luego de transplantes renales. Se han descrito varias  $\alpha$ -globulinas que quizás inhiban la activación del plasminógeno, más que el

activador.

#### ANTIPLASMINA.

Existen varias antiplasminas (AP), pero la más importante es la  $\alpha_2$ -antiplasmina (AP), es una glicoproteína de PM 70.000 formada por 500 residuos de aminoácidos y un 14% de H de Carbono , La asparagina y la leucina son los aminoácidos amino y carboxi terminal respectivamente.

La reacción entre Plasmina y Antiplasmina resulta en la formación de un complejo estequiométrico 1:1 entre las dos proteínas, muy estable, enzimáticamente inactivo que no tiene actividad de esterasa o proteasa.

#### PLASMINOGENO-ANTIPLASMINA.

La formación del complejo estable (PM 140.000) parece ocurrir por interacción entre el sitio activo de la plasmina (serina) de la cadena liviana y una unión específica peptídica arginina-metionina en la antiplasmina.

Luego de la activación plasmática del plasminógeno, la plasmina formada es preferentemente unida a la antiplasmina; sólo una activación completa del plasminógeno (conc. plasm.

1.5 uM/l) resulta en la saturación de la antiplasmina (conc. plasm. 1.0uM/l) , la plasmina en exceso es neutralizada por la  $\alpha_2$ -Macro globulina

En presencia de concentraciones normales de estos dos inhibidores los otros inhibidores plasmáticos de proteasas, según Collen no juegan un rol en la inactivación de la plasmina.

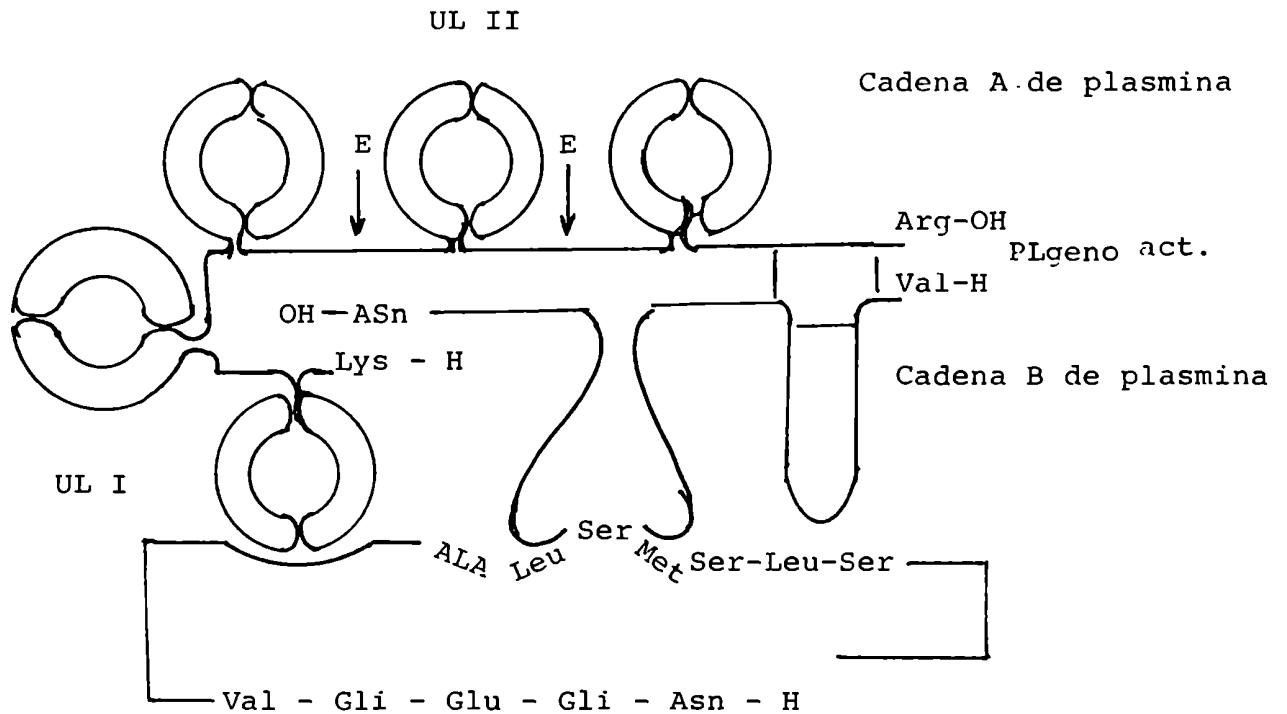
Hay por lo menos 5 inhibidores de proteasas plasmáticas que actúan como antiplasminas en sistemas purificados:  $\alpha_2$ -M,  $\alpha_1$ -AT, AT-III-cof. hep,  $C_1$  inactivador e inhibidor de la inter  $\alpha$ -tripsina, son inhibidores que tienen un amplio rango de especificidad que se superponen.

La vitamina E en concentraciones fisiológicas actúa como inhibidor de la plasmina; las plaquetas tienen actividad antiplasminica y aunque la cantidad total es mucho menor comparada con la que circula por el plasma, seguramente debe ser importante en la estabilización del trombo.


Los granulocitos contienen actividad antiplasminica, así como otros tejidos humanos, incluyendo las paredes arteriales y la placenta.



Representación esquemática de la interacción entre plasmina  
 $\alpha_2$ -antiplasmina.



INHIBIDORES FARMACOLOGICOS.

Varios aminoácidos sintéticos tienen actividad antifibrinolítica y son utilizados clínicamente. Los más estudiados son el ácido E-aminocaproico (EACA):  $H_2N-(CH_2)_5-COOH$ , ácido tramexánico  $H_2N-H_2C$    $COOH$  y el trasylol o aprotinina que es un polipéptido que se extrae del pulmón bovino.

Mc. Koe v col. , encontraron que a bajas concentraciones de EACA 0.0025 M aumenta la activación del plasminógeno a plasmina, ellos creen que a esta concentración el EACA produce un cambio conformacional de la molécula de plasminógeno haciéndola más susceptible a la ruptura, a concentraciones más altas de EACA, la activación del plasminógeno es inhibida y en los estudios que realizaron con UQ consideran que se debe a una inhibición directa de la UQ.

El ácido 6-aminohexanoico y sus derivados como el ácido tramexánico son capaces de unirse al plasminógeno a través de los sitios de unión de lisina disociando la unión plasminógeno-fibrina o impidiendo la formación de la misma y por lo tanto la activación del plasminógeno es mucho más lenta y en consecuencia se pierde el efecto proteolítico sobre la fibrina.

El trasyolol es un inhibidor competitivo del plasminógeno y no competitivo del activador del plasminógeno.

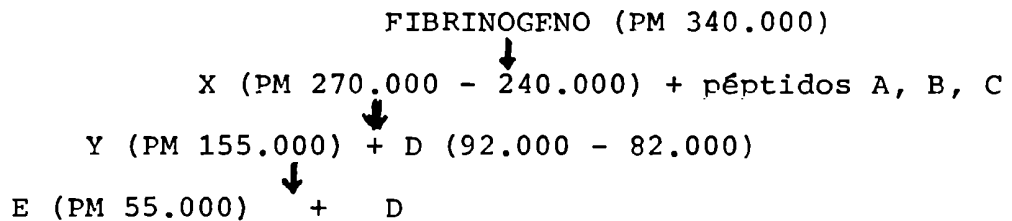
#### Inhibidores de los activadores del plasminógeno.

Estos inhibidores se podrían clasificar en extrínsecos e intrínsecos; estas investigaciones se encuentran aún en fase preliminar, el rol fisiológico de los mismos no se ha establecido y el papel que éstos tienen en la regulación y control del mecanismo de fibrinólisis son especulaciones

PRODUCTOS DE DEGRADACION.

La degradación del fibrinógeno y de la fibrina por la plasmina lleva al reconocimiento de una serie de fragmentos intermedios y estables que se han podido estudiar por sus características inmunológicas.

Marder propone un esquema de degradación enzimática secuencial del fibrinógeno por la plasmina sobre las bases de las propiedades físico-químicas e inmunológicas de los productos de degradación del fibrinógeno.



El fibrinógeno por acción de la plasmina se convierte en fragmento X, con la aparición en solución de fragmentos de menor PM.

El fragmento X se presume que tiene la estructura básica del fibrinógeno y es coagulable por trombina.

A medida que avanza la digestión, disminuye la cantidad de fragmento X y se originan los fragmentos Y y D, pero hasta que no se digiere el fragmento Y no aparece el fragmento D.

Por placas de Ouchterlony se demuestra que los fragmentos X e Y contienen sitios antígenicos primarios en el fibrinógeno que están localizados en los fragmentos resistentes

a plasmina que son el D y el E.

Los productos de degradación del fibrinógeno primarios, X e Y, conjuntamente con el D inhiben la polimerización de los monómeros de fibrina, mientras que el E inhibe la actividad de trombina, o sea, que tienen efecto anticoagulante.

De la digestión del fibrinógeno con plasmina se aislan tres fragmentos D (PM 92.000, 86.000 y 82.000) que difieren sólo en la longitud de la cadena (el de PM 82.000 perdió el sitio de entrecruzamiento).

El fragmento X, proveniente del fibrinógeno, contiene fibrinopéptidos y es coagulable por trombina ( $X^{fp}$ ), en cambio, el que proviene de la fibrina ( $X^o$ ) no contiene fibrinopéptidos.

Según Regañon, Vila y Aznar (Thrombos. Haemostas., 368: 40, 1978) la digestión con plasmina de la fibrina entrecruzada permite aislar un fragmento Y-D (X), un dímero Y-Y, tres dímeros D-D que difieren en la longitud de la cadena y tres fragmentos que tienen características de fragmento D.

Dos neoantígenos, el  $fg-D_{neo}$  y el  $fg-E_{neo}$  han sido identificados y caracterizados como determinantes que están ocultos en el fibrinógeno nativo, pero que son expuestos por degradación de la molécula por enzimas específicas (Plow y Edgington, 1975).

### VARIACIONES FISIOLÓGICAS DE LA FIBRINOLISIS.

El ejercicio y el stress profesional producen un aumento del activador plasmático.

Hay un ciclo circadiano, con más actividad durante el día que a la noche. La actividad fibrinolítica es mayor en las personas mayores que en las más jóvenes y está disminuída en el obeso, particularmente en el obeso diabético. La actividad fibrinolítica disminuye progresivamente a medida que el embarazo progresa, con niveles de plasminógeno y fibrinógeno aumentados pero con antiplasmina normal; esto sugiere un nivel disminuído del activador del plasminógeno o bien el inhibidor del activador del plasminógeno que es responsable de la fibrinólisis disminuída. La actividad fibrinolítica se normaliza de 15 minutos a una hora luego de producido el parto.

### CAMINO FIBRINOLITICO DEPENDIENTE DE LOS LEUCOCITOS.

En el compartimento vascular los leucocitos siempre están asociados con trombos formados por fibrina y plaquetas; en el espacio extravascular la acumulación de leucocitos en el lugar de la lesión y de posición de fibrina es frecuente como elemento central de la respuesta inflamatoria.

Aunque los componentes del sistema humoral del plasminógeno, incluyendo proactivadores del plasminógeno y plas-

mina han sido identificados como componentes de los leucocitos, varios estudios han documentado claramente la presencia de un sistema fibrinolítico independiente del plasminógeno dentro de los leucocitos.

Los fragmentos generados por las proteasas leucocitarias son estructuralmente e inmunológicamente distintos de los fragmentos producidos por plasmina y poseen actividad anticoagulante potente.

La elastasa y la quimotripsina son las proteasas neutras primarias responsables de la actividad fibrinolítica de los leucocitos.

La especificidad de la enzima símil-elastasa para las uniones peptídicas alanil y de la símil-quimotripsina para las uniones aminoácidos aromáticos y leucil explican las diferencias observadas, tanto estructurales como inmunoquímicas entre los fragmentos generados por proteasas leucocitarias y plasmina.

In vivo, el camino fibrinolítico leucocitario puede ser importante para la degradación de fibrina intracelular asociada o extracelularmente ya que las proteasas fibrinolíticas están sujetas a reacciones de liberación (Plow y Eginton, 1975).

Ambos mecanismos fibrinolíticos leucocitarios pueden contribuir al proceso fibrinolítico necesario para la disolución de coágulos en salud y pueden contribuir a los desórdenes hemorrágicos en algunas enfermedades (Egbring y col. 1977).

INHIBIDORES NATURALES DE COAGULACION Y FIBRINOLISIS.

Los sistemas de coagulación y fibrinólisis están compuestos por múltiples enzimas y proenzimas. La regulación de estos sistemas pueden ser:

- a) Una controlada activación de proenzimas a serino proteasas (similares a tripsina) o por liberación de enzimas a la sangre.
- b) Por activación enzimática y amplificación del sistema en cascada.
- c) Neutralización de las enzimas activadas por los inhibidores.

El plasma humano contiene varios inhibidores de proteasas bien identificados que intervienen en el sistema de coagulación y fibrinólisis.

	Concentración plasmática mg/100 ul.	Peso Molecular	% de amino ácidos	% de carbo- hidra- tos.	N°de cade- nas.
$\alpha_1$ -Antitripsina	290 - 45	54.000	86	12	1
$\alpha_1$ -Antiquimo- tripsina	49 - 7	69.000	73	25	1
Inhibidor inter- $\alpha$ tripsina	50	160.000	90	8	1
Antitrombina III	24 - 2	65.000	85	13	1
Inactivador C1	24 - 3	104.000	65	35	1
$\alpha_2$ -Macroglobulina	260 - 70	725.000	92	8	4

	Concentración plasmática mg/100 ul.	Peso Molecular	% de amino ácidos.	% de carbo- hidra- tos	N° de cade- nas.
$\alpha_2$ -Antiplasmina	7 - 1	70.000	87	13	1
Inhibidor del activador del plasminógeno		80.000			

Todos estos inhibidores con excepción de  $\alpha_2$ -macroglobulina formarán complejos enzimáticamente inactivos, con estequiometría 1:1.

El exacto mecanismo de esta reacción no está bien establecido, uno de los más estudiados es el de tripsina antitripsina el que parece ser similar al de trombina-antitrombina III. Se cree que hay mucha similitud de mecanismos entre proteasas e inhibidores de bajo peso molecular de plantas o de origen animal, con formación de uniones covalentes entre un residuo del centro activo del inhibidor y del centro activo serino de la proteasa.

Debido a las diferentes velocidades de reacción de inhibición se los puede clasificar en rápidos y lentos. Así la antitrombina III es un inhibidor progresivo de varias proteasas, pero la reacción es marcadamente acelerada en presencia de heparina.

La  $\alpha_2$ -antiplasmina es un rápido inhibidor de plasmina, pero inhibe lentamente a otras proteasas del plasma.



### ANTITROMBINA III.

Es el principal inhibidor fisiológico de trombina y del factor Xa. El efecto inhibidor sobre XIIa, XIa, IXa está bien demostrado pero no está establecida la importancia de un inhibidor en la primera fase o fase alta del mecanismo de coagulación.

La existencia en la sangre de un inhibidor de trombina fue sugerida en 1905 en la teoría de Morawitz.

En 1954 Fell y col. , distinguen cinco antitrombinas en su clasificación de inhibidores de trombina, incluyen la inhibición de la polimerización de fibrina y de la formación de trombina.

La acción inhibitoria progresiva de antitrombina en el plasma se designó antitrombina III.

La  $\alpha_2$ - macroglobulina también inactiva progresivamente trombina, lo cual llevo a mayor confusión.

Por trabajos de distintos autores se llegó a la misma estructura química de la antitrombina III o cofactor de la heparina con la antitrombina III y anti Xa. (Abildgaard, 1979<sub>a</sub>).

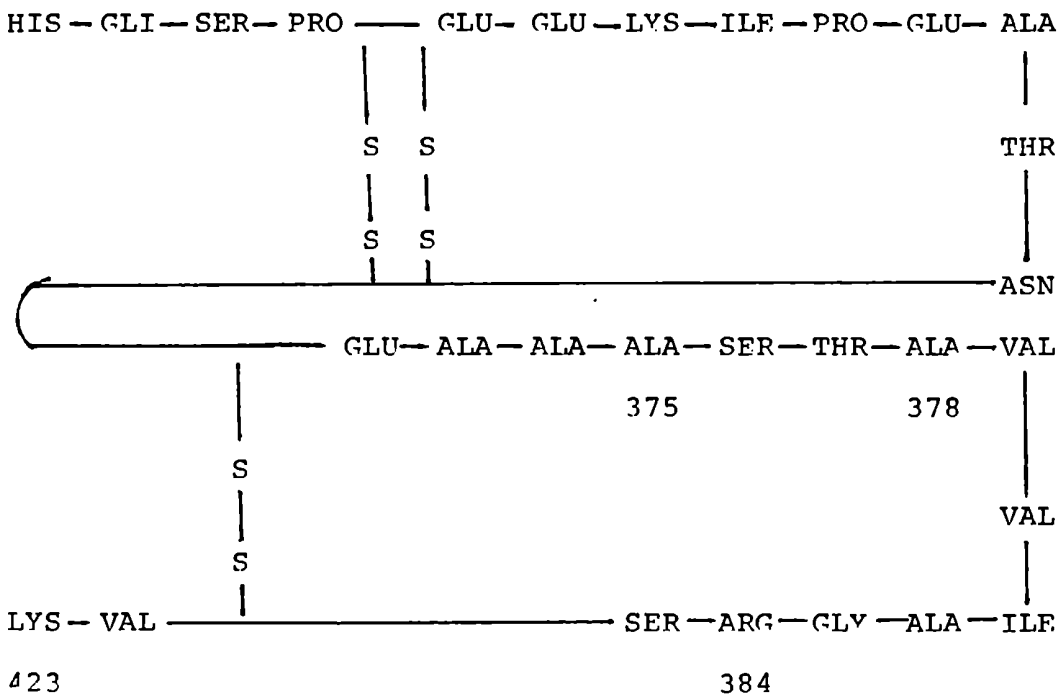
La vida media es de 2,83 días (Collen y col., 1977) y se sintetiza en el hígado. Cuando está bajo la forma de complejo la vida media es de minutos, lo cual indica una rápida depuración.

Es indudable que el factor Xa y su inhibidor anti Xa

juegan un papel importante en el equilibrio hemostático. Una idea clara de este rol lo da el hecho de que un microgramo del inhibidor anti Xa neutraliza 15 unidades de Xa impidiendo indirectamente la formación de 750 unidades de trombina, las cuales tendrían que ser neutralizadas por 1500 unidades de anti Xa (Yin, 1974).

El complejo trombina antitrombina III es debido a una interacción específica entre el sitio activo serina de la enzima y la unión Arginina-Serina en la región carboxiterminal del inhibidor.

La antitrombina sería clivada por la trombina en serina 384-Arg para luego formar el complejo (Lawrence, v col.).



La importancia de la antitrombina III como regulador del mecanismo de coagulación se ve claramente en la fuerte tendencia a la trombosis venosa y ocasionalmente arterial que presentan las deficiencias congénita de este inhibidor.

Estas manifestaciones trombóticas comienzan a edad temprana 7-8 años, algunas con desenlace fatal.

Las deficiencias de antitrombina III pueden ser:

A) Congénita y hereditaria:

Tipo I: Descenso correlativo del nivel inmunológico y de la actividad funcional.

Tipo II: Cuantitativamente normal pero con déficit funcional.

Tipo III: Cuantitativamente normal con función normal si se estudia sin heparina, pero con heparina en el medio se demuestra que está alterada su capacidad de unión a la misma in vivo e in vitro.

B) Deficiencias adquiridas:

1) Por falta de producción: en enfermedades hepáticas severas.

2) Consumo o gasto: coagulación intravascular, tromboembolismo pulmonar, etc.

Pacientes en tratamientos con anticonceptivos.

Pacientes en tratamiento con heparina.

Enfermedades con grandes pérdidas proteicas, renales, quemados, etc.

HEPARINA Y ANTITROMBINA III.

La heparina es una mezcla de muconpolisacáridos sulfatados extraída de homogenatos de intestino y pulmon bovino. Solo un 25 a 35% de la heparina comercial es fracción activa, el peso molecular de esta fracción es muy variado entre 6.000 y 25.000, siendo las fracciones de menor peso molecular las más activas.

La estructura requerida de la heparina para la unión a la antitrombina III no ha sido determinada.

Rosemberg y Lau (1979) encuentran un tetrasacárido compuesto por ácido hialurónico, N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato en la heparina activa y no en la inactiva.

Rosemberg y col. (1979) dan evidencia de la existencia de los sitios activos de unión entre antitrombina III y heparina.

El mecanismo por el cual la heparina aumenta la velocidad de unión trombina antitrombina III fué estudiado por varios grupos y muchos son los modelos propuestos, Anderson y col. (1977), Hook y col. (1976), asumen que la heparina se une a la antitrombina III formando un complejo y transformando al inhibidor en más activo por cambios conformacionales en su molécula.

Machovich (1975) sostiene que la heparina se une a la trombina para aumentar su velocidad de unión a la antitrombina III.

Holmer y col. (1980) dice que la heparina aumenta la velocidad de reacción para la formación del complejo, primero por unión a la antitrombina III y luego a la trombina. Bjork y Nordnman (1976), demuestran la afinidad de la heparina por el complejo trombina - antitrombina III libre. la heparina puede ser reutilizada en la reacción o sea que tendría acción catalítica. La cinética de la reacción entre trombina y antitrombina III fue estudiada por Jordan y col. (1979). Sin heparina la constante (velocidad cinética de segundo orden) es  $4,34 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . En presencia de heparina de bajo peso molecular la constante de la velocidad de reacción es  $8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

#### $\alpha$ 2- macroglobulina.

Es una glicoproteína con peso molecular 725.000 y contiene 8% de carbohidratos.

Concentración normal en niños 1-3 años 4,5 g/l y en adultos hasta 25 años 2g/l, en las mujeres es de 10 a 20% más alto. No se han encontrado deficiencias congénitas.

La vida media de la  $\alpha$ 2- macroglobulina es de 135 horas, mientras que el complejo  $\alpha$ 2- macro-enzima es depurado rápidamente de la circulación.

Hay niveles aumentados en cirrosis y nefrosis, se encontraron valores bajos durante el tratamiento con estreptoquinasa

Sobre los aspectos bioquímicos y fisiológicos de  $\alpha_2$  - macroglobulinas hay diferentes conceptos. Barret y col. (1974), Laurell and Jeppsson (1975) Harpel (1976<sub>b</sub>).

Este inhibidor no sólo forma complejo con proteasas neutras tales como: tripsina, plasmina, trombina; sino también con tiol proteasas como papaína, ficina y bromelina; con carboxiproteasas como catepsina y con metal proteasas como termolisina y colagenasa, (Barret y Starkey (1973)).

El sitio activo de la enzima se une al inhibidor; su actividad proteolítica no es totalmente inhibida con la formación del complejo.

La  $\alpha_2$  - macroglobulina unida a la enzima tiene baja actividad proteolítica sobre los sustratos naturales de alto peso molecular pero una actividad hidrolítica alta o normal sobre sustratos sintéticos.

Soybean trypsin inhibidor, inhibe rápidamente la plasmina libre y también inhibe la actividad enzimática del complejo

$\alpha_2$ -macroglobulina-plasmina. Barret y col. (1973), (1974), proponen como mecanismo de acción que la  $\alpha_2$ -macroglobulina debe sufrir un ataque proteolítico que cambie su estructura conformacional quedando la enzima atrapada en forma irreversible dentro de la  $\alpha_2$ -macroglobulina. No está claro si la

$\alpha_2$ -macroglobulina se une a una o dos moléculas de plasmina.

El rol de la  $\alpha$  2-macroglobulina en coagulación: Es un inhibidor de trombina (25% de la actividad antrombínica plasmática) pero no de los factores Xa, XIIa y probablemente tampoco de otros factores de coagulación (Abildgaard (1979), Schapiro y Anderson (1977)).

#### C 1 - INACTIVADOR.

Es una  $\alpha$  2-glicoproteína con un peso molecular P.M. de 104.000. La concentración plasmática es de 0.018-0.05g/l. Inhibe C I s, calicreína plasmática, plasmina, factor XIIa y XIa. La deficiencia congénita de C 1 inactivador aparece en el edema angioneurótico ¿Causa o consecuencia?, pero no parece estar asociada con accidentes trombóticos y/o hiperfibrinolíticos.

#### $\alpha$ 1 - ANTITRIPSINA.

Este inhibidor no parece tener ningún rol en condiciones fisiológicas en la inhibición de trombina. Learned y col. (1976) Heck y Kaplan (1974) demuestran que tiene acción sobre XIa.

#### $\alpha$ 2 - ANTIPLASMINA.

La  $\alpha$  2-antiplasmina es una simple cadena polipeptídica con P.M. 70.000 y 13% de carbohidratos.

Este inhibidor es inmunológicamente diferente a  $\alpha$  1-anti-quimotripsina, inhibidor inter  $\alpha$ -tripsina,  $\alpha$  2-macroglobulina, C 1 inactivador y de antitrobina III.

Como todos los inhibidores, forma un complejo muy estable 1:1 con plasmina y el complejo no tiene actividad proteásica ni esterásica. El sitio activo serina de la plasmina actúa en la unión leucina-metionina de la región carboxiterminal del inhibidor (Iman y Collen (1979)).

La reacción entre plasmina y  $\alpha$  2-antiplasmina se produce en dos etapas, una muy rápida y reversible (de segundo orden) y la siguiente lenta e irreversible, de primer orden.

La vida media en sujetos normales es de  $2.64 \pm 0.32$  días: Durante el tratamiento trombolítico la vida media es de 0.5 días, el complejo inhibidor-enzima tiene vida media más prolongada.

Los niveles plasmáticos normales de  $\alpha$  2-antiplasmina son 80 - 120%, la concentración en plasma es 1 uM/L.

La concentración de  $\alpha$  2-antiplasmina puede llegar a valores bajos en: enfermedad hepática severa y en coagulación intravascular. Eddy y col. (1978) Aoki (1979).

Se encuentra normal en enfermedades renales, cardiovasculares y enfermedades malignas.

Este inhibidor es un débil reactante de fase aguda. Tager-Nilsson (1977).



## ACTIVACION Y/O CONSUMO

La activación del sistema de coagulación y fibrinolisis a partir de la activación del factor XII a XIIa, consiste en la aparición, en forma secuencial, de enzimas cuya actividad proteolítica está dada por un núcleo serina, por lo cual a estos factores activados XIa, IXa, Xa y IIa (Trombina) se los denomina serino-proteasas.

En el plasma existen otros sistemas enzimáticos que también pueden ser activos en ciertas circunstancias. Algunos de ellos como el de quininas-calicreínas y de complemento tienen una interrelación con el sistema de coagulación-fibrinolisis. También, bajo ciertas circunstancias, pueden tener acción, sobre el sistema de coagulación, otras enzimas serino-proteasas como tripsina, quimotripsina y elastasa.

Estudios recientes demostraron que la liberación o aparición en el plasma de estas u otras actividades enzimáticas, a veces de origen celular, podría tener acción directa sobre proteínas o factores de la coagulación y fibrinolisis.

Sin embargo, el sistema de inhibidores enzimáticos anti-serino proteasas tratará de regular y frenar la acción de todas las enzimas serino-proteasas neutras.

Los inhibidores más estudiados son  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, antitrombina III, inhibidor de  $C_1$  esterasa y  $\alpha_2$ -antiplasmina y, como se mencionó, estos inhibidores forman complejos inhibiendo la acción de la enzima, complejos

que son rápidamente depurados de la circulación. En el caso de los factores "activados" de la coagulación se ha visto que el sistema Antitrombina III (Anti Xa - Cofactor de la heparina) es el más importante representando el 75% de la capacidad antitrombínica del plasma; esta acción es marcadamente aumentada en presencia de heparina. Los otros inhibidores tal vez tengan menos importancia como inhibidores del sistema de coagulación pero tienen un espectro más amplio de las enzimas sobre las cuales pueden actuar. La detección de factores activados intermedios o de trombina circulante en plasma, sería una forma directa de demostrar activación en el sistema de coagulación. Esto es difícil de detectar por las técnicas actualmente empleadas en el laboratorio. Para detectar esta "activación" se hace en forma indirecta, o sea, a través del acortamiento de los tiempos de algunas pruebas o por la disminución de la actividad biológica de ciertos factores de coagulación y su relación con su concentración antigénica o por la aparición, en circulación, de fragmentos moleculares de otros factores (Fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno) originados por la acción proteolítica de estas enzimas. Cuando la "activación" del sistema de coagulación es superior al equilibrio o a la regulación ejercida por los inhibidores naturales estariamos detectando, en el plasma, un consumo de factores, plaquetas e inhibidores que llevan, generalmente, al paciente a un cuadro hemorrágico. Los factores de coagulación que se "consu

men" o gastan en su acción biológica procoagulante serían el I, II, V, VIII y, en menor grado, XI y XII.

El hallazgo de niveles disminuidos de plasminógeno o la presencia de productos de degradación del fibrinógeno y/o de fibrina indicaría activación del sistema de fibrinolisis. Dado que los inhibidores antiserino-proteasas tienen una rápida capacidad de neutralización de estas enzimas la determi  
nación de los niveles de éstos nos daría evidencias de acti  
vación intravascular del sistema de coagulación. También la detección en plasma del complejo inhibidor-enzima por técnicas de inmuno  
electroforesis bidimensional tiene un patrón de  
finido (semejante al suero) claramente diferenciado de la co  
rrida observada en plasma normal donde el inhibidor no se en  
cuentra formando complejos.

Por esto, algunos investigadores consideran que el aumento del pico II y III es característico en la coagulación intravascular. Sin embargo, esto no es compartido por otros autores ya que existen evidencias de que estos cambios pueden ser provocados por la acción de otras enzimas proteolíti  
cas que se liberan al plasma y que no están directamente relacionadas con las proteasas del sistema de coagulación.

En pacientes con leucemias agudas (LA) es frecuente encontrar múltiples alteraciones en los parámetros de coagulación cuyo mecanismo fisiopatológico no es aún claro y que

serían la causa de las manifestaciones hemorrágicas.

La severa tendencia hemorrágica en pacientes con leucemias agudas, especialmente del tipo granulocítico, es una de las complicaciones más frecuentes. Es atribuída fundamentalmente a la trombocitopenia, a la deficiencia de factores protrombínicos por infiltración hepática, cambios en la función vascular, a la coagulación por consumo Gralnick y col. 1973, Gralnick y col. 1972 y a la proteólisis inespecífica por enzimas leucocitarias Sakuragawa y col. 1976, alteraciones que en varias oportunidades han sido evidenciadas en pacientes que recibieron o habían recibido previamente tratamiento quimioterápico.

Dada la importancia que los sistemas de inhibidores naturales tienen en el equilibrio dinámico de la coagulación, la especialmente la Antitrombina III (Anti-T III), es de interés estudiarlos juntamente con otros parámetros de la coagulación y de la fibrinólisis, tratando de correlacionar y poder evaluar en forma integral las alteraciones de la hemostasia que presentan los pacientes con LA en el período inicial de la enfermedad.

Las enzimas símiles a elastasa y quimotripsina aisladas de leucocitos de LA, producen cambios en factores de coagulación en su función procoagulante y también en la antitrombina III estudiada por electroforesis bidimensional (Sasseti B. y col. 1980).

ACCION DE ENZIMAS LEUCOCITARIAS SOBRE EL SISTEMA DE COAGULACION.

Los leucocitos humanos normales y en mayor grado, los provenientes de individuos leucémicos y sépticos poseen actividad procoagulante, fibrinolítica y neutralizante de la heparina.

Hay quienes identificaron la actividad procoagulante liberada por los leucocitos con la proveniente de cerebro humano, encontrando una identificación parcial por métodos inmunológicos.

En los linfoblastos se demostró la ausencia de actividad fibrinolítica. El empleo de otra tecnología permitió la separación de actividades procoagulante y fibrinolítica y la purificación parcial de las proteasas neutras leucocitarias con actividad semejante a elastasa y a quimotripsina.

Por métodos histoquímicos se confirmó una mayor cantidad de elastasa en blastos leucémicos y en granulocitos sépticos.

La aparición de proteasas granulocíticas en el plasma de pacientes con leucemias agudas o con septicemia, resulta de la liberación de enzimas por los leucocitos normales o patológicos bajo varias condiciones: liberación espontánea, liberación inducida por complejos antígeno-anticuerpo, endotoxinas o fiebre alta. La liberación de elastasa a partir de blastos leucémicos puede deberse a la frecuente complicación séptica con subsecuente endotoxemia, a la fragilidad de la membrana leucocitaria o a la acción de drogas citolíticas utilizadas en el tratamiento de esta patología.

Sakuragawa comprobó que hay liberación de elastasa aún antes de la quimioterapia, ya que en el plasma de estos pacientes se detectó el complejo de proteasas leucocitarias con los inhibidores antitripsina y macroglobulina. Estas enzimas leucocitarias tienen actividad proteolítica sobre factores de coagulación, activándolos o degradándolos. El trabajo de Egbring demuestra que la proteasa similar elastasa purificada de leucocitos humanos, actúa en el plasma normal sobre el fibrinógeno y factores II, V, VIII, IX y XIII. En cambio la proteasa similar quimotripsina purificada tienen, principalmente, actividad proteolítica sobre factores VIII y XII.

## OBJETIVOS

Esclarecer el mecanismo de la diátesis hemorrágica de los pacientes con leucemias agudas, especialmente del tipo granulocítico en el período inicial de la enfermedad y previo a todo tratamiento terapéutico.

Se evaluán todos los parámetros de coagulación, fibrinolisis e inhibidores naturales, datos que hasta el presente se desconocían.

En este trabajo se trató de reproducir in vitro las alteraciones encontradas en estos pacientes, para ello se incubaron plasmas normales con enzimas leucocitarias no purificadas evaluándose los resultados.

### MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 47 pacientes con leucemia aguda (LA) en el período inmediato posterior a su diagnóstico y previo a la iniciación del tratamiento quimioterápico: 11 linfoblásticas (LAL), 36 granulocíticas (LAG), que comprenden: 12 promielocíticas (LAP), 11 mielomonocíticas (LAMMO), 9 mieloblásticas (LAM) y 4 monocíticas.

#### LA MUESTRA DE SANGRE

Para la extracción se usaron jeringas plásticas siliconadas. La sangre se colocó en tubos plásticos con anticoagulante citrato de sodio 3,8% en la relación 1 de anticoagulante a 9 de sangre. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos y los plasmas se pasaron a tubos plásticos. Los plasmas que no fueron procesados en forma inmediata se fraccionaron en ampollas plásticas y se congelaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Se realizaron las siguientes técnicas:

- Tiempo de sangría (Mielke y col., 1969) T.S.)
- Recuento de plaquetas (Brecher y col., 1950).
- Tiempo de protrombina de Quick (T.Q.) (Quick, 1952).
- Tiempo de tromboplastina parcial con caolín (T.T.P.C.).  
(Protor, y col., 1961).



DOSAJE DE FIBRINOGENO (FACTOR I)

A 0,1 ml de plasma citratado, se le agrega 2 ml de solución de trombina (200 unidades), se mezcla rápidamente, se deja 15 minutos hasta coagulación completa.

Se recoge la fibrina formada sobre una varilla de vidrio. Se lava la fibrina recogida con agua destilada durante 1 a 2 minutos, luego se coloca la varilla en etanol (100 de etanol en 900 ml de solución fisiológica) durante 2 minutos. Se seca a 80°C durante 30 minutos y se pesa. (V.N.= 0,1 a 0,3 g/100ml). (Wycoff 1966).

TIEMPO DE TROMBINA.

A 0,2 ml de plasma citratado a 37°C se le agrega 0,1 ml de solución de trombina de 8 unidades/ml y se toma el tiempo de formación de la fibrina.

DOSAJE DE PROTROMBINA (FACTOR II).

Se diluye el plasma a estudiar 1/10 en buffer Michaelis pH: 7,38; 0,1 ml de plasma a estudiar se agrega a un tubo que contienen 0,1 ml de plasma deficitario en factor II y 0,1 ml de tromboplastina a 37°C. Se deja incubar 60 segundos y se agrega 0,1 ml de  $Cl_2Ca$  0.025M, se toma el tiempo de formación de fibrina y se refiere a la curva patrón (Valor Normal 80 - 120%). (Duckert, 1960).

DOSAJE DE FACTOR V (FACTOR LABIL)

Se procede igual que en el dosaje anterior pero usando plasma deficitario en factor V y se refiere a la curva correspondiente (V.N.: 80 - 1000%). (Duckert, 1960)

DOSAJE DE FACTOR VII-X.

El plasma deficitario en factores VII-X debe tener por lo menos 20% de factor II. Se obtiene filtrando plasma bovino por filtros Seitz de 20 - 80% de amianto, el valor del blanco de este plasma deficitario en VII-X debe ser mayor de 3 minutos.

La muestra se trabaja en la misma forma que para factor II, reemplazando el plasma deficitario por el plasma bovino deficitario en VII-X. Los valores obtenidos se refieren a la curva correspondiente V.N. = 80 - 120%. (Duckert, 1960)

DOSAJE DE FACTOR VIII(G.A.H.).

El plasma citratado a medir se diluye 1/10 (valor 100%); como activador del sistema se utiliza, cefalina dilución 1/500 en buffer Michaelis pH: 7,35.

El plasma deficitario en factor VIII se activa con celita 512 (2mg/ml de plasma a 37°C) durante 3 minutos, luego se centrifuga 15 minutos para retirar la celita. El sobrenadante o sea el plasma deficitario en factor VIII queda en

condiciones de ser usado.

En un tubo de Kahn se pipetea 0,1 ml de plasma deficitario en VIII activado, 0,1 ml de cefalina, 0,1 ml de la dilución del plasma a medir.

Se incuba 60 segundos y se recalifica con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,025M; se toma el tiempo de coagulación que se refiere a la curva patrón. V.N.: 50 -150%. (Duckert, 1960, mod. )

#### DOSAJE DE FACTOR IX (P.T.C.).

Se trabaja en las mismas condiciones que para el dosaje de factor VIII pero con plasma deficitario en factor IX activado. V.N.: 50 - 150%. (Duckert, 1960, mod.)

#### DOSAJE DE FACTOR XI (P.T.A.).

Los plasmas a estudiar se diluyen en citrato salino (1/5) en las siguientes proporciones 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

Como activador del sistema se usa cefalina 1/500 y suspensión de celita 512: 20 mg/ml.

En un tubo de Khan a 37°C se pipetea 0,1 ml de la dilución del plasma a medir, 0,1ml de cefalina, 0,1ml de la suspensión de celita 512 y 0,1 ml de plasma deficitario en factor XI. Se coloca a 37°C durante 60 segundos. Se recalifica con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,025M; se toma el tiempo de coagulación. La dilución 1/8 se considera 100%.

Los tiempos obtenidos se refieren a la curva patrón.  
V.N.: 50 - 150%. (Nossel, 1964)

#### DOSAJE DE FACTOR XII (Hageman).

Se procede en la misma forma que para factor XI, reemplazando el plasma deficitario, por el deficitario en XII.  
V.N.: 50 - 150%. (Nossel, 1964)

#### FACTOR XIII.

Se mezcla 0,2 ml de plasma citratado con 0.05 ml de glicerol 50% y se incuba durante dos minutos y medio a 56°C, luego de enfriarlo a 0°C se deja a temperatura ambiente.

A 0,2 ml de la mezcla se agrega 0,05 ml de glutatión 0,2 M y 0,2 ml de trombina 125 U/ml la que se deja actuar 20 minutos.

A continuación se agrega 0,5 ml de monodansilcadaverina 2 mM y 1 ml de caseína 0,4%. A los 30 minutos se detiene la reacción con 2 ml de ácido tricloroacético 10%.

La proteína se lava 6 veces por centrifugación con 10 ml de una mezcla etanol-eter (1:1). se seca. se disuelve en 2 ml tris-ClH 0.05 M, Urea 8M. dodecil sulfato de sodio 0,5% pH:8 y se mide la amina unida a la proteína.

La fluorescencia se mide a una excitación de 355 mμ y emisión de 525 mμ (Lorand y col. 1969).

DOSAJE DE PLASMINOGENO.

En dos tubos de ensayo se colocan los siguientes reactivos: caseína 3 ml, buffer fosfato 2,4 ml, solución de euglobulinas 0,5 ml, estreptoquinasa 0,1 ml, se incuba 60 minutos a 37°C. Al tiempo 0 y 60 minutos se sacan 2 ml de la mezcla de incubación que se agregan a un tubo de centrifuga conteniendo 3 ml de ácido tricloroacético 11,5% y se deja a temperatura ambiente 30 minutos. Se centrifuga a 5.000 rpm durante 20 minutos, se decanta el sobrenadante y se filtra sobre lana de vidrio hasta obtener un líquido perfectamente claro.

Se prepara un tubo control, conteniendo 3 ml de buffer fosfato y 3 ml de caseína que se incuba y trata en las mismas condiciones a los 0 y 60 minutos.

Se lee en el espectrofotómetro a 280 nm. La diferencia entre el tiempo 60 y 0 minutos corresponde a la tirosina liberada en 1 hora a 37°C.

Los resultados se expresan en unidades de caseína por ml de plasma.

Según Rememert y Cohen, 1 unidad de caseína corresponde a la liberación de 450 microgramos de tirosina en 1 hora a 37°C. La curva de referencia se obtiene a partir de una solución de tirosina 100 ug/ml.

EXTRACTO SALINO FENOLADO DE CEREBRO HUMANO (TROMBOPLASTINA).

A cerebro humano obtenido dentro de las 24 h. post mortem y sin evidencias de congestión, absceso, tumores o traumatismo, se le separan las meninges y se lo lava bien con agua fría para eliminar todo resto de sangre y se corta en rodajas de a 2 cm lavándolo nuevamente con agua fría.

Se secan los trozos sobre papel de filtro y en una licuadora eléctrica a la menor velocidad posible se trata de obtener trozos grandes. Al cerebro así tratado se agrega 1500 ml de solución salina fenolada precalentada a 45°C, se mezcla y se deja 30 minutos a 37°C. Se deja decantar en heladera durante 48 hs.

Se separa el sobrenadante y se agrega al mismo un volumen de la capa superior del sedimento, equivalente a la décima parte del volumen total del sobrenadante.

Los tiempos normales de protrombina son de 12 a 13 segundos.

CEFALINA

El cerebro humano limpio y sin restos de sangre, se corta en trozos pequeños y se macera en un mortero con acetona tratando de formar películas finas, procedimiento que se repite sucesivamente con cinco alícuotas de acetona.

El polvo de cerebro obtenido se filtra a través de pa-

pel de filtro y se seca a temperatura ambiente y luego a 37°C.

Se pesa 1,2 g del polvo de cerebro y se agrega 25 ml de cloroformo; esta suspensión se agita durante 2 h y se descarta el sedimento.

El líquido sobrenadante se evapora hasta sequedad y la película se emulsiona con 12,5 ml de solución fisiológica.

La solución de trabajo es: 0,1 ml de cefalina en 50 ml de solución fisiológica.

#### TIEMPO DE PROTROMBINA DE QUICK.

Los plasmas citratados se procesan dentro de las 2 h posteriores a la extracción de sangre.

En un tubo de Kahn se coloca 0,1 ml de tromboplastina y 0,1 ml del plasma a estudiar, esta mezcla se incuba 1 min a 37°C, luego se agrega a la mezcla 0,1 ml de Cloruro de calcio 0,02 M, tomando el tiempo de coagulación de la misma.

El tiempo obtenido se refiere a una curva patrón realizada con una mezcla de plasmas normales.

#### TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL CON CAOLIN.

En un tubo de Khan conteniendo 0,2 ml de mezcla cefalina caolín se agrega 0,2 ml de plasma citratado, incubándose 3 min a 37°C. A dicha mezcla se le agrega 0,2 ml de Cloruro de calcio 0,02 M y se registra el tiempo de coagulación. Los Valores Normales son de 35 a 45 segundos. (Proctor, 1960)

TOLERANCIA A LA HEPARINA EN EL SISTEMA DE TIEMPO DE TROMBINA.

A 0,2 ml de plasma se agrega 0.6 U de heparina/ml y luego de agregar 0,1 ml de solución de trombina de 10 U/ml se registra el tiempo de formación del coágulo. Los valores normales son:  $25 \pm 3$  segundos.

COFACTOR DE LA HEPARINA (METODO CON SUSTRATO CROMOGENICO S-2160).

Se agrega un exceso de trombina al plasma en estudio diluido en buffer con heparina y EDTA y se incuba la mezcla a 37 °C durante un cierto tiempo. Luego de neutralizar la heparina con Polybrene, la cantidad remanente de trombina cataliza la liberación de p-nitroanilina del sustrato cromogénico, y luego de detener la reacción por acidificación se lee a 405 nm.

La concentración de Antitrombina III se calcula a partir de una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración de AT III o con patrón de AT III, preparada con diluciones en buffer heparina de una mezcla de plasma normales (10) (0,24%, 50%, 75%, 100%).

El plasma problema y los testigos se diluyen en buffer Tris Heparina pH: 8,4 (con 3.000 U/ml de Heparina para un litro).

A 400 ul de la dilución del plasma incubado a 37°C durante 2-6 min., se agrega 100 ul de la solución de trombina de 10 U/ml, se incuba 30 segundos y se agrega 300 ul de



sustrato S-2160-polybrene (2/1 u/u), lo que se deja actuar a 37°C exactamente 30 segundos, luego se detiene la reacción con 300 ul de ácido acético al 50%.

El blanco se prepara con 400 ul de la dilución del plasma, 300 ul de sustrato S-2160-polybrene y 400 ul de agua destilada. Las muestras y los testigos se leen contra el blanco a 405 nm.

### ANTITROMBINA III.

El método consiste en agregar una solución de trombina a distintas diluciones de plasma desfibrinado por calor y luego de una hora de incubación a 37°C, medir la trombina residual.

Las diluciones 1/12,5, 1/18, 1/25 y 1/50 de los plasmas se realizan en buffer imidazol-albúmina. A 0,2 ml de cada una de las diluciones se le agrega 0,2 ml de la solución de trombina 10 /ml, se mezcla y se incuba 1 h a 37°C. Se toma 0,1 ml de esta mezcla y se agrega a 0,4 ml de solución de fibrinógeno 1% en solución fisiológica. Los tiempos de coagulación (por duplicado) se grafican en función de la concentración de plasma normal en papel semilogarítmico.

El valor del blanco debe ser 17 segundos. V.N.: 70 - 130%. (Biggs, 1972).

ANTI X<sub>a</sub>

A una solución de X<sub>a</sub> bovino, se agrega la dilución de plasma a estudiar desfibrinado por calor; después de 1 h. de incubación se mide el factor X<sub>a</sub> residual.

PREPARACION DE FACTOR X BOVINO:

A 1 l. de plasma bovino se agrega 10 gr. de SO<sub>4</sub>Ba y luego de 30 minutos de agitación, se centrifuga.

El sulfato de bario (Adsorbe factor II-VII-IX-X) se lava 5 veces con ClNa 0,45% en citrato sódico 0,001 M.

Los factores adsorbidos se eluyen con 100 ml de citrato sódico 0,1 M pH: 6,8.

El eluido del sulfato de bario se diluye con 25 ml de buffer Tris 20 mM pH: 7,5 y se agita 15 minutos con 250 mg de DEAE Sephadex A-50 en la forma citrato.

Esta mezcla se lava con alícuotas de 75 ml de buffer tris 0,02 M pH: 7,5; ClNa 0,1 M en buffer tris 0,02 M pH:7,5 y ClNa 0,01 M en buffer tris 0,01 M pH: 7,5 sucesivamente. El Sephadex lavado se resuspende en 10 ml de la última solución.

Esta suspensión se coloca en una columna conteniendo 2 grs. de Sephadex A-50 equilibrada en la misma solución.

El cromatograma se desarrolla con 1 litro de gradiente lineal 0,12 - 0,47 M de ClNa en buffer Tris 0,1 M pH: 7,5.

El factor X separado se diluye a una concentración de cloruro 0,3 M y se pasa a una columna de DEAE Sephadex A-50 previamente equilibrada con ClNa 0,2 M tamponada con Tris 0,1 M pH: 7,5. La columna se eluye con un litro de gradiente de ClNa tamponado con tris 0,1 M pH: 7,5 a ClNa 0,5 M tamponada con tris 0,02 M pH: 7,5.

El factor X recuperado de la columna se concentra y se guarda en ClNa 0,2 M tamponado con tris 0,02 M pH: 7,5 a -20°C.

#### FACTOR X<sub>a</sub>.

El factor X se diluye al 50% de actividad (referido al 100% de un plasma normal) y se incuban volúmenes iguales del factor X diluido y veneno de víbora Russell (R.V.V.) 1/100.000 en solución fisiológica y cloruro de calcio 0,025M durante 20 minutos a 37°C.

El factor X<sub>a</sub> se diluye 1/50 con buffer citrato imidazol-albúmina.

Para determinar el anti-X<sub>a</sub> se trabaja en tubos plásticos y con las mismas diluciones (4 para cada paciente) utilizadas para medir antitrombina III.

Se incuban 0,12 ml de las diluciones del plasma con 0,2 ml de X<sub>a</sub> 1 h a 37°C, luego de lo cual se determina el X<sub>a</sub> residual. A tubos que contienen 0,1 ml de Cl<sub>2</sub>Ca 0,05 M a 37°C

se agrega en forma simultánea 0,1 ml de la dilución en la que se desea medir el  $X_a$  y 0,2 ml de una mezcla de partes iguales de plasma deficiente del factor X y cefalina. Se registra el tiempo de formación de fibrina.

Se grafica el logaritmo del tiempo de coagulación de las diluciones del plasma en función de la concentración de plasma en %. (V.N.: 70 - 140%). (Biggs y col., 1970).

#### ANTITROMBINA III POR INMUNOELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN ACETATO DE CELULOSA GELIFICADO.

Se coloca la tira de cellogel, previamente equilibrada con el buffer en una cuba para electroforesis equilibrada con el mismo buffer.

Con un extensor de 1 cm de ancho se esparce la solución de heparina (0,05 ml de 20 u/ml) sobre uno de los bordes de la tira, desde el compartimiento anódico hacia el catódico hasta que se absorbe en el gel.

Se siembra 4  $\mu$ l de plasma coloreado con azul de bromofenol, en el extremo inferior catódico, se colocan los puentes en los extremos catódicos y anódicos, se corre durante 45 minutos a 20 voltios/cm a temperatura ambiente en buffer veronal pH; 8,6.

Después de 45 minutos de corrida se rota la tira 90°,

se barre el resto de la superficie de la tira libre de heparina, con antisuero (20 ul en 50 ul de buffer) hasta que se absorbe en antisuero, luego se efectua la electroforesis durante 140 minutos a 20 voltios/cm a temperatura ambiente.

La tira se lava durante toda la noche en solución fisiológica, luego se colorea durante 30 minutos con azul brillante Coomassie y se lava hasta decoloración.

Se secan hasta el estado blanco mediante fijación en formaldehido 40% 1 minuto y luego se coloca en glicerina 7% durante 3 minutos y se seca en estufa sobre una placa de vidrio a 70 - 80°C durante 4 ó 5 minutos. (Sasseti y col., 1980)

#### PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA.

##### Preparación de la suspensión de estafilococos.

se parte de una cepa de Staphulococcus aureus Newman D<sub>2</sub>C, coagulasa negativa con factor aglutinante positivo. Se mantiene la cepa en estrías en agar con infusión de corazón-cerebro.

El crecimiento bacteriano se realiza en agar con una infusión de cerebro-corazón a 37°C durante 18 horas en un agitador a 90 rpm.

Se centrifuga el cultivo y el sedimento bacteriano se suspende en cloruro de sodio 0,154 M y se calienta a 70°C

durante 90 minutos. Después de calentar y hacer el control de esterilidad, se lava una vez con cloruro de sodio 0,154 M y dos veces con agua deionizada. Se resuspende en agua deionizada y se liofiliza. La estabilidad es de 8 meses a 4°C.

Para realizar la determinación de P.D.F., se prepara una suspensión de bacterias de 3 mg por ml de buffer imidazol pH: 7,5.

#### Determinación.

El suero de los pacientes y los normales se extraen con ácido aminocaproico.

Se realizan diluciones sucesivas del suero a estudiar, se agrega 1 gota de la suspensión de estafilococos, se mezcla y después de dos minutos se lee la aglutinación. La última dilución en que se observa aglutinación se multiplica por el factor de sensibilidad de los estafilococos V.N.: hasta 4 ug/ml. (Hawigerrj, 1970)

#### Tiempo de plasma recalcificado.

Se incuba a 37°C 0,2 ml de plasma libre de plaquetas al cual se le agrega 0,2 ml de cloruro de calcio 0,025 M. Se mezcla y se toma el tiempo de formación del coágulo.

Los valores normales son 70 a 140 segundos.

### Determinaciones de proteínas

Se usa el método de Lawry y col.

Se basa en dos reacciones: 1) una interacción inicial de la proteína y los iones  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (relacionada con la reacción del Biuret) y 2) una reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y azul de molibdeno respectivamente, debida a la acción del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína. El producto final se mide espectrofotométricamente.

### Determinación por inmunodifusión radial

Por esta técnica se determinaron  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, Antitrombina III, plasminógeno y fibrinógeno; utilizando placas comerciales Partigen.

### Dosaje de factor VIII por electroinmunodifusión

Se preparan diluciones 1/2, 1/4 y 1/8 de mezcla de plasmas normales para realizar la curva de referencia.

Se hacen diluciones 1/2 y 1/4 de las muestras. Se considera 100% la dilución 1/2.

Se utiliza CelloGel (7x14) cm como soporte. Se divide cada tira de CelloGel por la mitad y en cada mitad se siembran 3 ul de las tres diluciones para la curva de referencia e igual volumen de cada una de las dos diluciones de tres muestras distintas.

Se esparcen 200  $\mu$ l de antisuero Antifactor VIII, por toda la superficie del soporte y se corre 16 hs a 200V. Como buffer de corrida se usa Veronal-HCl pH: 8.6.

Se tiñe con Coomassie-Blue durante 30 minutos y se lava con etanol:acético:agua (475:50:475).

Se blanquea el soporte por inmersión de 1 minuto en formol 40%, seguida de una inmersión de 3 minutos en glicerina 7%. Luego se coloca sobre placa de vidrio y se seca a 80°C en estufa.

La altura de los picos se grafica en función de la concentración para la curva de referencia.

Los porcentajes de las muestras se obtienen por extrapolación de la mencionada curva patrón. (Laurell, 1.966, mod. )

#### Preparación de los extractos leucocitarios

Para obtener leucocitos se realiza la extracción de sangre de dadores normales y pacientes leucémicos con oxalato de sodio 0.1 M como anticoagulante en la relación 1 ml a 9 ml de sangre.

Se mezcla 80 ml de sangre con 160 ml de Dextrano Sigma (PM medio 184.000) 3% P/V en cloruro de sodio.

Esta mezcla se deja sedimentar a 0°C durante 60 minutos. Se decanta el sobrenadante y se centrifuga 7 minutos a



800 rpm. Se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 2 ml de cloruro de sodio 0,34% por cada 10 ml del volumen de sangre inicial. La suspensión se deja 5 minutos a 37°C y luego se agrega 4 ml de solución fisiológica; se centrifuga 7 minutos a 800 rpm y el sedimento se lava cinco veces con solución fisiológica tal que se obtenga una concentración final de  $10^9$ - $10^{10}$  leucocitos por ml.

Se trabaja con material plástico.

La lisis de los leucocitos se realizó por sonicación durante 10 segundos.

#### Placas de fibrina

En placas de Petri estériles se colocan 10 ml de una solución fibrinógeno 1% recientemente preparada con solución fisiológica estéril la que se coagula por agregado de 0.2 ml de solución de trombina (SU/ml) mezclando rápidamente.

Las placas destinadas a estudiar la acción directa de plasmina se calientan a 60°C durante 1 hora.

En las placas así preparadas se siembra 5,0  $\mu$ l de las soluciones o extractos en las que se estudia la actividad fibrinolítica. Se observa el área de lisis de cada muestra

#### Cromatografía de las lisados leucocitarias

Se realiza en las siguientes condiciones:

Columna: 1.2 x 90 cm

Tampón: fosfato 0.05 M pH: 7.2

Velocidad de flujo: 12ml/hora

Cantidad de muestra sembrada: 1ml

Soporte: Sephadex 6-200

En la figura 10 se observa el gráfico correspondiente a la separación de los picos I y II

## REACTIVOS

### Marca Abbott:

- Heparina
- Polybrene

### Marca Astra:

- Acido epsilonamino-caproico

### Marca Behringwerke Ag (W. Germany):

- Partigen Anti  $\alpha_1$ - Antitripsina
- Partigen Antifactor VIII
- Partigen Antifibrinogeno
- Partigen Anti  $\alpha_2$ - Macroglobulina
- Partigen Antiplasminogeno
- Partigen Antitrombina III

### Marca Chemetron (Italia):

- Cellogel

### Marca Kabi (Suecia):

- S-2160

### Marca Merck:

- Folin - Cincaulteau
- Sulfato de Bario

### Marca Parke Davis:

- Trombina

### Marca Pharmacia Fine Chemicals Co. (Suecia):

- DEAE - Sephadex A-50
- Sephadex G-200

Marca Richmond:

- Caolín

Marca Sigma Chemical Co. (USA):

- Azul brillante Coomassie R
- Caseína
- Celita 512
- Dextrano FM (medio) 184.000
- Elastasa Pancreática
- Estafilococos aureus Newman D<sub>2</sub>C  
American Type Culture Collection
- Glutation
- Imidazol
- Mono dansilcadaverina
- Stypven

Las drogas no específicas utilizadas son de grado analítico

## RESULTADOS

De los 36 pacientes con LAG el 13% (5 casos) presentaron manifestaciones hemorrágicas mayores tales como hemorragias digestivas hematemesis, melena, proctorragia, hematomas en zonas críticas, y el 88% (31 pacientes) manifestaciones hemorrágicas menores como epistaxis, petequias, hematuria microscópica, gingivorragia, hematomas en áreas no críticas.

De los 11 pacientes con LAL el 18% (2 casos) tuvieron manifestaciones hemorrágicas mayores y el 80% (9 pacientes) manifestaciones hemorrágicas menores.

El tiempo de coagulación fue normal en 46 casos. El tiempo de sangría se encontró alargado en 46 pacientes correlacionándose con el número de plaquetas que en todos los casos estuvo descendido, con valores entre 1.000 y 60.000 / ul. En las fig. 1 y 2 se representan los datos obtenidos de TTPC, TQ y dosaje de factores de coagulación.

El TTPC no presentó gran variación respecto del valor normal salvo en 8 casos, 17% de los mismos, entre 37 y 230 seg. y en 3 casos, 6% de los mismos, se encontró valores acortados (30 seg.).

El TQ fué alterado en el 80% de las LAG, cuyos valores estuvieron entre 15 y 75%, y en el 55% de las LAL, con valores entre 45 y 70%, los valores menores se correspondieron





con los niveles más bajos de fibrinógeno. El TQ, en la mezcla con plasma normal, sólo mostró corrección parcial en la mayoría de los pacientes.

El nivel del factor II se halló descendido en 15 casos (42%) de las LAG, con valores entre 35 y 75% y en dos casos (18%) de las LAL se encontraron ligeramente disminuidos, con valores entre 70 y 75%. El factor V estuvo alterado en 19 casos (52%) de las LAG, con valores entre 30 y 75%, en cuatro casos (36%) de las LAL, con valores entre 35 y 70%.

Los factores VII-X dosados en conjunto, se encontraron bajos en 16 casos (47%) de las LAG, con valores entre 40 y 75% y solamente en dos casos de LAL, valores entre 70 y 75%.

El factor X presentó disminución de sus niveles en 14 casos (36%) de las LAG, con valores entre 40 y 75%, mientras que las LAL no presentaron alteración.

Correlacionando el TQ y los niveles de los factores protrombínicos II, V, VII y X, se evidencia que los valores de ellos eran más altos de lo esperado para los porcentajes obtenidos en el TQ.

En la determinación de los factores VIII, IX, XI y XII no se encontraron alteraciones significativas en LAL y sólo en 7 casos de LAG se encontraron aumentados y/o disminuidos.

El fibrinógeno se encontró francamente descendido en



8 pacientes, 22% de los casos, con valores entre 20 y 80 mg/100 ml en LAG siendo normal en todas las LAL (fig. 2).

El factor XIII se dosó en 9 LAG hallándose disminuido en 8 de ellas, 89% de los casos, y fué normal en las 2 LAL estudiadas.

En la fig. 3 se representan los valores de factor VIII R Ag, de las actividades biológicas e inmunológicas del plasminógeno y de PDF.

El dosaje de factor VIII R Ag se realizó en 9 pacientes con LAG obteniéndose un rango de 50-150% y en 8 con LAL se encontró entre 60-170%.

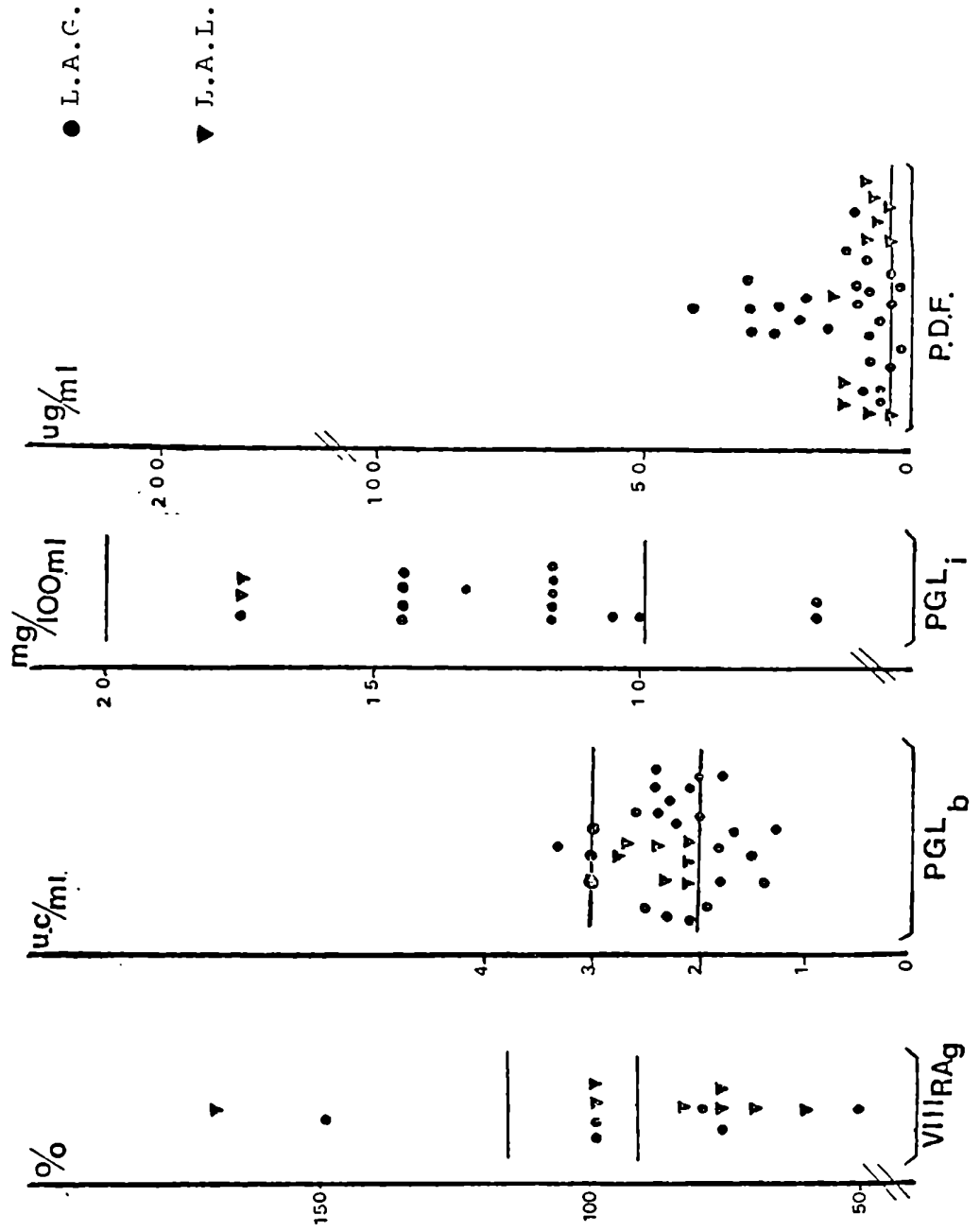
El promedio de la relación VIII R Ag/VIII<sub>c</sub> fué 0.84 para LAG y 0.82 para LAL.

La actividad biológica del plasminógeno (PLGb) se determinó en 24 LAG y estuvo descendido en 8 de los casos (33%), con valores entre 1.3 y 1.9 U.C./ml, en dos de las cuales coincidió con descenso en el nivel inmunológico. En las LAL el PLGb se determinó en 7 casos y el PLGi en dos casos, encontrándose por ambos métodos valores normales.

Los niveles de PDF estuvieron aumentados en el 89% de las LAG, con valores entre 8 y 200 ug/ml, en el 33% de las cuales superaron el nivel de 20 ug/ml, mientras que en LAL existió sólo un ligero aumento en 8 casos, 72% de los mismos, con valores entre 7 y 12 ug/ml.

FIGURA 3

Las barras indican rango de normalidad



En la fig. 4 se representan TT, Tol. Hep. y Anti-X<sub>a</sub>-Anti-TIIII-Cof.Hep. El TT estuvo prolongado en 12 casos (37%) de las LAG y en 4 pacientes (36%) con LAL. La Tol. Hep. estuvo notablemente acortado en el 46% de las LAG y alargado en el 9% de las mismas. En las LAL estuvo acortado en el 45% de los casos.

El inhibidor Anti-X<sub>a</sub>-Anti-TIIII estuvo descendido en 14 LAG, 38% de las mismas y en 3 LAL, 27% de las mismas, y el Cof. Hep. en 18 LAG, 50% de los casos y en 8 LAL, 72% de los casos.

Relacionando el inhibidor Anti-X<sub>a</sub>-Anti-TIIII, medido con dos métodos distintos, se encontró una buena correlación (fig. 5) con un  $r=0.77$ . En cambio, no se halló buena correlación relacionando Anti-TIIII y Cof. Hep. ya que se obtuvo un  $r=0.014$ .

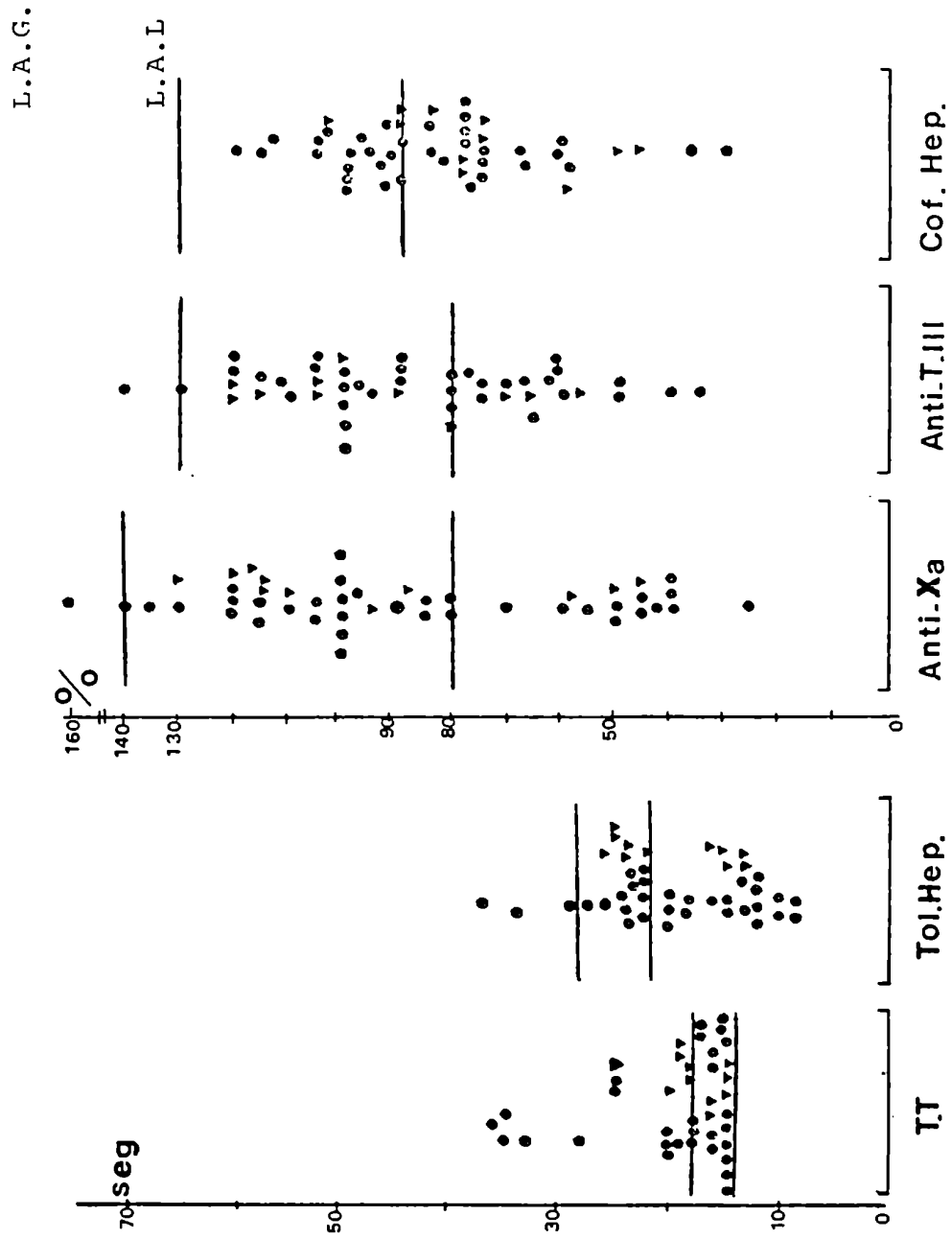
En 20 pacientes con leucemia aguda no tratadas se determinó: ATIIII: actividad biológica e inmunológica cofactor de la heparina (Cof. Hep.), X, antitripsina ( $\alpha_1$ , AT) y  $\alpha_2$ -macroglubulina ( $\alpha_2$ M).

La actividad de ATIIII biológica (ATIIII<sub>b</sub>) se encontró disminuida en el 45% de los casos y el Cof. Hep. en el 65% (fig. 6).

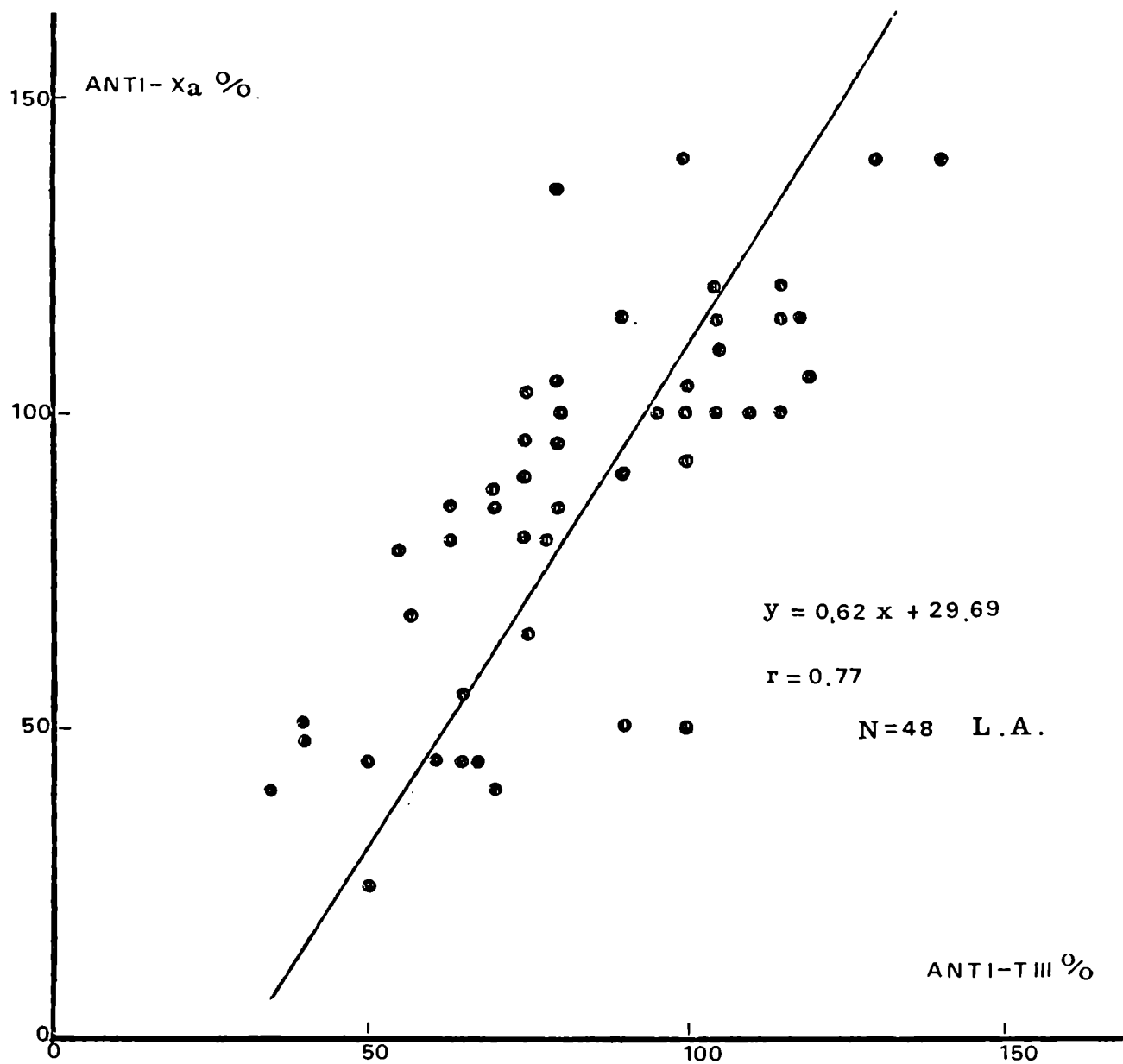
La ATIIII<sub>i</sub> aumentó en el 45% de los pacientes llegando a 43 mg/100 ml; en el resto los valores estaban en el límite

F I G U R A 4

Las barras indican rango de normalidad



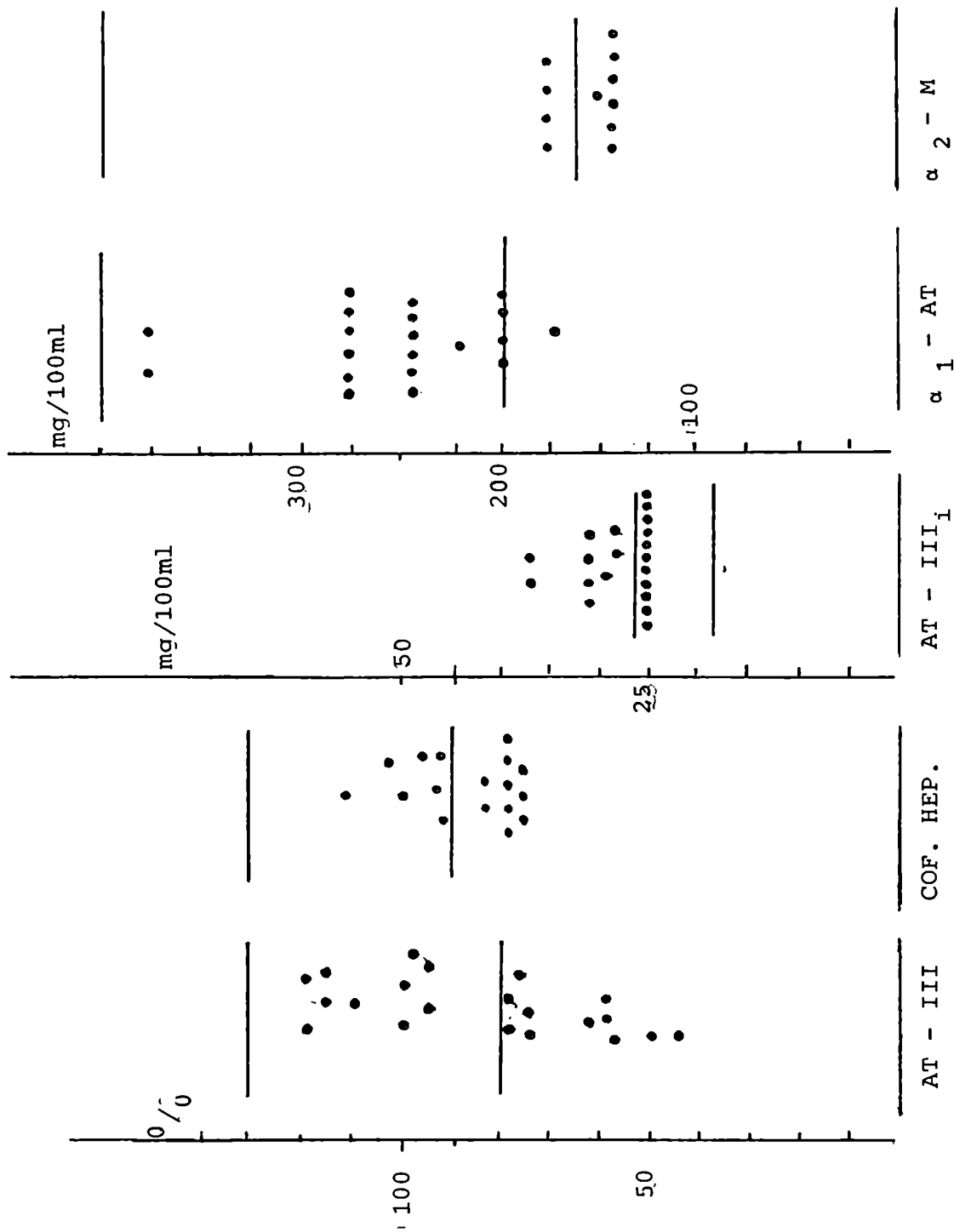
F I G U R A 5



Correlación entre AntiX<sub>a</sub> y Anti TIII

F I G U R A 6

Las barras indican rango de normalidad



superior normal.

La relación  $ATIII_i/ATIII_b$  en todos los casos fue mayor que 1 y no se encontró correlación entre ambas ( $r=0.088$ ).

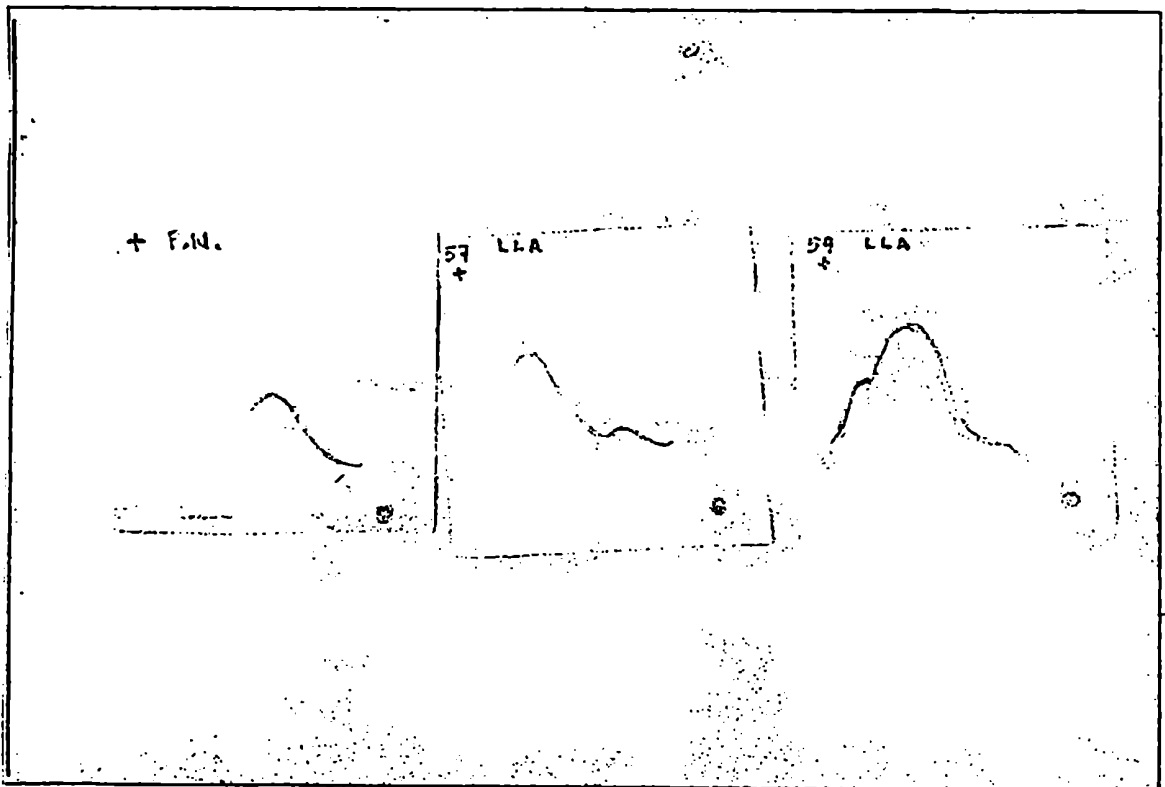
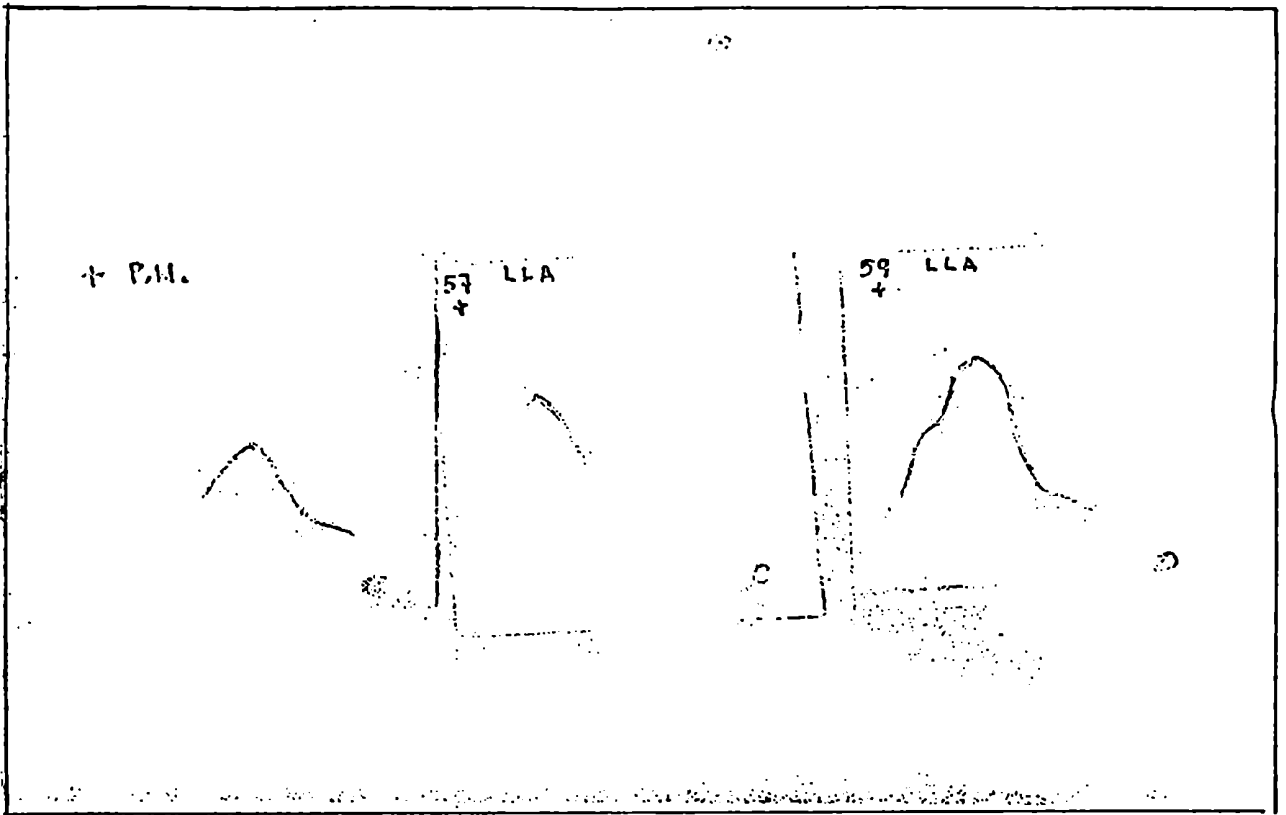
La M se encontró disminuida en el 60% de las LA mientras que la AT se encontró baja en un solo caso, con un valor de 180mg/100ml.

Los pacientes con valores de  $ATIII_i$  entre 34 y 35,5 mg/100ml presentaban un cuadro clínico y de laboratorio compatible con los de una coagulación intravascular. Los plasmas de estos pacientes fueron estudiados por inmunoelectroforesis bidimensional con Antisero Anti  $ATIII$  en presencia de heparina (fig. 7, 8 y 9).

Sólo en dos casos se encontraron los picos I, II, y III característicos del complejo trombina-antitrombina, que para algunos autores sería una demostración de coagulación intravascular.

Los demás perfiles electroforéticos muestran gran variación con desaparición o disminución del pico I y contornos irregulares del resto del trazado. Estas curvas alteradas no son características de ningún tipo de LAG en particular, tampoco son debidas a un artefacto ya que fueron reproducibles en varias oportunidades

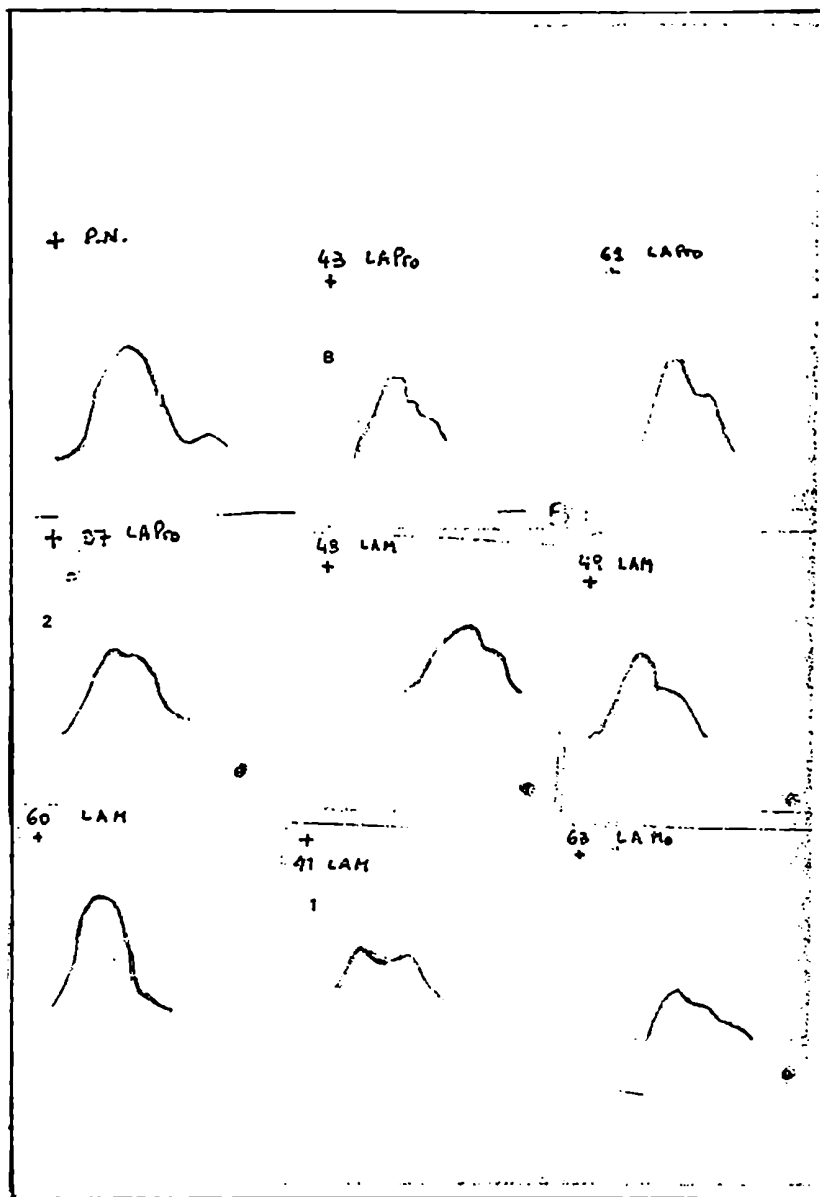
F I G U R A 7



Imunoelectroforesis bidimensional. (Antisuero anti-Antitrombina III)  
L.L.A.: Leucemia linfoblástica (plasma)  
P.N.: plasma normal

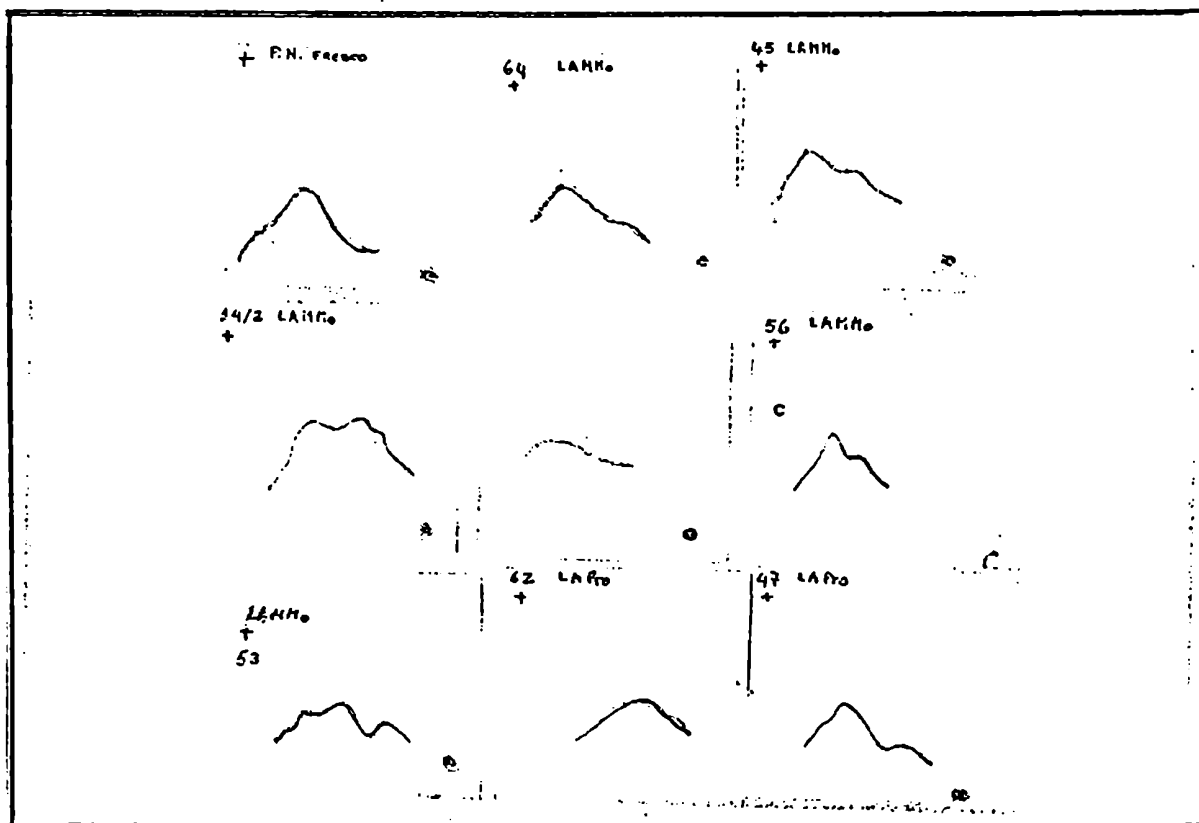


FIGURA 8



Imunoelectroforesis bidimensional de ATIII en plasma de:  
P.N.: Plasma normal  
LAMMo: leucemia mielomonocítica  
LAMPro: leucemia promielocítica  
LAM: leucemia mieloblástica

F I G U R A 9



Imunoelectroforesis bidimensional de ATIII en plasmas de:

P.N.: Plasma normal

LAMMo: Leucemia mielomonocítica

LAMPro: Leucemia promielocítica

Las alteraciones encontradas en las corridas bidimensionales no tienen relación con el número de leucocitos de los pacientes en el momento de la toma de muestra plasmática.

En la tabla I se muestran los valores promedio con una desviación standard, de los estudios realizados en los dos grupos de LA. No se hallaron diferencias significativas en los resultados obtenidos excepto que las LAC presentaron una mayor tendencia a la hipofibrinogenemia, niveles de PDF más altos, y mayor descenso de factores protrombóticos y TQ.

Por otro lado, comparando los diferentes subgrupos de LAG: LAP vs LAM y LAP vs LAMMO no se encontraron diferencias significativas en los valores de las determinaciones realizadas (tabla III), razón por la cual las distintas leucemias de tipo granulocítico fueron evaluadas en conjunto.

Sin embargo, comparando los resultados de pacientes con LAP y LAL, se observaron diferencias significativas en los valores de TQ, F VII-X, PDF y Cof. Hep., presentando éstos mayor alteración en las LAP.

En la tabla II se comparan los valores encontrados en las LA con los controles normales, observándose diferencias significativas en: TQ, Factores II, VII-X y X, Anti-TIII, AntiX<sub>a</sub>, Cof. Hep. y en PDF.

La tabla IV muestra los valores promedios con una desviación standard.

T A B L A I

VALORES OBTENIDOS EN LEUCEMIAS AGUDAS GRANULOCITICAS Y LEUCEMIAS AGUDAS LINFOLASTICAS  
PROMEDIOS CON UNA DESVIACION STANDARD

	<u>T.T.P.C. (seg)</u>	<u>T.O. (%)</u>	<u>I (mg/100 ml)</u>	<u>II (%)</u>	<u>V (%)</u>	<u>VII-X (%)</u>
V.N.	40±5 (n=50)	90±10 (n=50)	325±175 (n=50)	100±20 (n=50)	100±20 (n=50)	100±20 (n=50)
L.A.G.	40±8 (n=36)	57±20 (n=36)	192±109 (n=30)	79±18 (n=36)	71±20 (n=36)	72±17 (n=36)
L.A.L.	40±6 (n=11)	70±19 (n=11)	265±31 (n=11)	90±13 (n=11)	80±21 (n=11)	90±12 (n=11)
		<u>VIII (%)</u>	<u>IX (%)</u>	<u>XI (%)</u>	<u>XII (%)</u>	<u>XIII (%)</u>
V.N.	100±20 (n=50)	100±50 (n=50)	100±50 (n=50)	100±50 (n=30)	100±50 (n=50)	100±30 (n=15)
L.A.G.	78±16 (n=30)	119±38 (n=33)	100±14 (n=34)	91±27 (n=19)	82±33 (n=36)	62±16 (n=9)
L.A.L.	90±10 (n=5)	105±9 (n=11)	108±23 (n=11)	105±7 (n=8)	94±18 (n=7)	85 (n=2)
	<u>Anti-Xa (%)</u>	<u>Anti-T III (%)</u>	<u>Cof. Hep. (%)</u>	<u>T.T. (seg)</u>	<u>Tol. Hep. (seg)</u>	<u>VIII (%)</u>
V.N.	110±30 (n=50)	105±25 (n=50)	110±20 (n=50)	16±2 (n=50)	25±3 (n=50)	102±12 (n=17)
L.A.G.	88±33 (n=36)	87±25 (n=36)	85±20 (n=36)	21±9 (n=29)	21±10 (n=34)	105±16 (n=9)
L.A.L.	95±29 (n=11)	94±28 (n=11)	75±17 (n=11)	18±3 (n=11)	20±5 (n=11)	81±13 (n=8)
	<u>P.L.G.b (U.C./ml)</u>	<u>P.L.G.i (mg/100ml)</u>	<u>P.D.F. (µg/ml)</u>			
V.N.	2,5±0,5 (n=30)	15±5 (n=20)	2±2 (n=50)			
L.A.G.	2,2±0,5 (n=24)	12±2,8 (n=16)	26±24 (n=32)			
L.A.L.	2,5±0,4 (n=7)	17,5 (n=2)	8±3 (n=11)			

T A B L A II

VALORES NORMALES Y VALORES OBTENIDOS EN LEUCEMIAS AGUDAS  
PROMEDIOS CON UNA DESVIACION STANDARD

V.N.	<u>T.T.P.C. (seg)</u> 40±5 (n=50)	<u>T.O. (%)</u> 90±10 (n=50)	<u>II (%)</u> 100±20 (n=50)	<u>V (%)</u> 90±10 (n=50)	<u>VII-X (%)</u> 100±20 (n=50)
L.A.	40±7 (n=47)	61±22 (n=46)	80±17 (n=47)	75±19 (n=47)	80±18 (n=47)
N.S.	p < 0,0002	p < 0,0002	p < 0,0002	p < 0,0002	p < 0,0002
V.N.	<u>X (%)</u> 100±20 (n=50)	<u>VIII (%)</u> 100±50 (n=50)	<u>IX (%)</u> 100±50 (n=50)	<u>XI (%)</u> 100±50 (n=30)	<u>XII (%)</u> 100±50 (n=50)
L.A.	80±16 (n=35)	116±33 (n=44)	102±21 (n=35)	99±23 (n=27)	81±30 (n=42)
N.S.	p < 0,0002	N.S.	N.S.	N.S.	p < 0,05
V.N.	<u>I (mg/100 ml)</u> 325±175 (n=50)	<u>XIII (%)</u> 100±30 (n=15)	<u>VIIIi (%)</u> 104±12 (n=17)	<u>Tol. Hep. (seg)</u> 25± 3 (n=50)	<u>T.T. (seg)</u> 16± 2 (n=50)
L.A.	208± 89 (n=41)	66±17 (n=11)	100±31 (n=17)	21±10 (n=45)	18± 6 (n=40)
N.S.	N.S.	p < 0,01	N.S.	p < 0,01	p < 0,05
V.N.	<u>Anti-Xa (%)</u> 110±30 (n=50)	<u>Anti-T III (%)</u> 105±25 (n=50)	<u>Cof. Hep. (%)</u> 110±20 (n=50)	<u>FIG b (U.C./ml)</u> 2,5±0,5 (n=30)	<u>FIG i (mg/100ml)</u> 15± 5 (n=20)
L.A.	90±32 (n=47)	88±24 (n=47)	87±21 (n=46)	2,3±0,5 (n=31)	13± 2 (n=18)
N.S.	p < 0,002	p < 0,001	p < 0,0002	N.S.	N.S.

T A B L A III

VALORES OBTENIDOS EN LEUCEMIAS AGUDAS  
PROMEDIOS CON UNA DESVIACION STANDARD

	<u>T. D. (s)</u>	<u>F II (%)</u>	<u>F V (%)</u>	<u>F VII-X (%)</u>	<u>F X (%)</u>	<u>Anti-TIII (%)</u>	<u>Cef. Hep. (s)</u>	<u>PDF (ur/ml)</u>
L.A.P.	48±28	80±19	73±19	77±20	82±19	90±23	88±14	-
L.A.N.	71±15	82±17	81±20	83±12	83±14	105±20	93±19	-
P <	0.01	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.05	N.S.	
L.A.P.	48±28	80±19	73±19	77±20	82±19	90±23	88±14	
LAN No	62±15	75±19	77±16	81±16	82±12	76±25	81±23	
P <	0.05	N.S. m	N.S.	N.S.	N.S.	0.05	N.S.	
L.A.P.	48±28	80±19	73±19	77±20	82±19	90±23	88±14	35±33
L.A.L.	70±19	90±13	80±21	90±12	90±10	94±28	75±17	8±3
P <	0.025	0.05	N.S.	0.025	N.S.	N.S.	0.025	0.005

TABLA IV

VALORES NORMALES Y VALORES OBTENIDOS EN LEUCEMIAS AGUDAS

PROMEDIOS CON UNA DESVIACION STANDARD

	<u>Anti-x<sub>a</sub> (%)</u>	<u>Anti-TIII<sub>b</sub> (%)</u>	<u>Cof. Hep. (%)</u>
V.N.	110 30 (n=50)	105 25 (n=50)	110 20 (n=50)
L.A.	84 31 (n=20)	85 24 (n=20)	76 23 (n=20)
para n=47			
	p 0.002	p 0.001	p 0.0002
	<u>Anti-TIII<sub>i</sub> (mg/100ml)</u>	<u>α<sub>1</sub>-AT (mg/100ml)</u>	<u>α<sub>2</sub>-M (mg/100ml)</u>
V.N.	23,5 6,5 (n=20)	300 100 (n=20)	275 125 (n=20)
L.A.	32,4 4,4 (n=20)	253 49 (n=20)	151 50 (n=20)
	p 0.01	N.S.	p 0.01

Reproducción in vitro de las alteraciones de la hemostasia en leucemias.

En la tabla 5 se ve el efecto del extracto crudo leucocitario proveniente de: normales, LAMMO y LAL incubados 60 minutos con una concentración proteica de 100 y 400  $\mu\text{g}$  por ml de plasma. Se observó variación en el T.T. con los extractos provenientes de LAMMO y LAL. El TQ varió 3 segundos con leucocitos normales a la concentración menor. El TTPC sólo se modificó 5 segundos con 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plasma de LAMMO. Los factores en algunos casos disminuyeron su actividad procoagulante: V, VIII y XII y otros como el IX y el XI aumentaron su actividad.

Con los extractos provenientes de LAMMO se encontró mayor acción sobre el factor XII y VIII que con los provenientes de leucocitos normales y de LAL (tabla 6).

Con los extractos leucocitarios de LAMMO los tiempos de plasma recalcificado mostraron un acortamiento de 35-45 segundos. También se modificó el cofactor de la heparina de 80 a 50%. La antitrombina III inmunológica bidimensional se encontró modificada y la actividad fibrinolítica se demostró en placas de fibrina calentadas y sin calentar.

La fig. 10 muestra la separación de los picos 1 y 2, que se obtienen por cromatografía de los extractos leucocitarios. Cuando se trabajó con el pico 1 (tabla 7) proveniente de la cromatografía de los lisados de leucocitos normales y de LAMMO



a la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  de plasma, sobre plasma normal se vió que el factor V es francamente modificado en su actividad y en cambio los factores VIII, IX, X, XI y XII aumentaron su actividad. El efecto de esta activación se ve claramente en el acortamiento del plasma recalcificado (40 segundos) respecto del control normal, acompañado con una disminución en el cofactor de la heparina y una modificación de ATIII bidimensional. En la tabla 8 se muestran los resultados de la misma experiencia empleando concentraciones proteicas de 10 y 30  $\mu\text{g}$  del pico I/ml de plasma. Se observó un descenso de los factores V, IX y XII cuando se empleó el pico I proveniente de leucocitos de LAMMO en una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . A esa misma concentración el pico I proveniente de leucocitos normales sólo produjo la disminución del factor XII. A una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$  del pico I de leucocitos normales se observó una activación de los factores IX, XI y XII mientras que la misma concentración proveniente de leucocitos de LAMMO produjo descenso de los factores VIII y XII y activación del IX y XI.

En la fig. 11 se pueden observar las corridas electroforéticas bidimensionales con las modificaciones que produjeron las enzimas provenientes de los lisados leucocitarios de LLA, LAMMO y Normales sobre la ATIII del plasma normal con períodos de incubación de 0, 30 y 60 minutos a 37°C.

La fig. 12 muestra las corridas electroforéticas de los lisados leucocitarios (extracto crudo) después de 30 minutos de incubación con plasma normal y de los eluidos cromatográficos (Pico I) después de 30 y 60 minutos de incubación, correspondientes a LAMMo y LLA. Se observó la modificación de la ATIII<sub>1</sub> del plasma normal.

EXTRATOS CRUDOS LEUCOCITARIOS INCUBADOS 60 MINUTOS					
µg/ml PLASMA	L. Normales	L. Mielomonoc.	L. Linfoblast.		
	100	100	100	100	400
F: V	35	100	100	100	100
F: VIII	50	80	50	20	100
F: IX	150	200	150	100	170
F: XI	100	200	250	200	90
F: XII	250/40	100	33	33	120
T.T. seg.	Δ 0	Δ 0	Δ -2	Δ 2	Δ -2
T.Q. seg.	Δ 3	Δ 0	Δ 0	Δ 1	Δ 2
T.T.P.C. seg.	Δ 0	Δ 0	Δ 0	Δ 5	Δ 0

EXTRACTOS LEUCOCITARIOS CRUDOS INCUBADOS CON PLASMA NORMAL				
ug/ml plasma	L. Normales 100 400	L. Linfoblástica 100 400	L. Mielomonocítica 100 400	
FACTORES %: V	40-15 40	80-40 100	80-40 100	
VIII	40-25 40	50-30 100	100-220 25	
IX	150-200 200	100-70 200	100-250 170	
XI	100-120 250	100-300 100	200-400 250	
XII	300-200 200	100-15 180	70-10 33	
<p>Plasma recalcificado † 35 a 45 segundos más corto que el control normal.                      Cofactor de la heparina 80-50%.                      Antitrombina III inmunológica bidimensional modificada.                      Placas de fibrina sin calentar positivas.                      Placas de fibrina calentadas positivas.</p>				

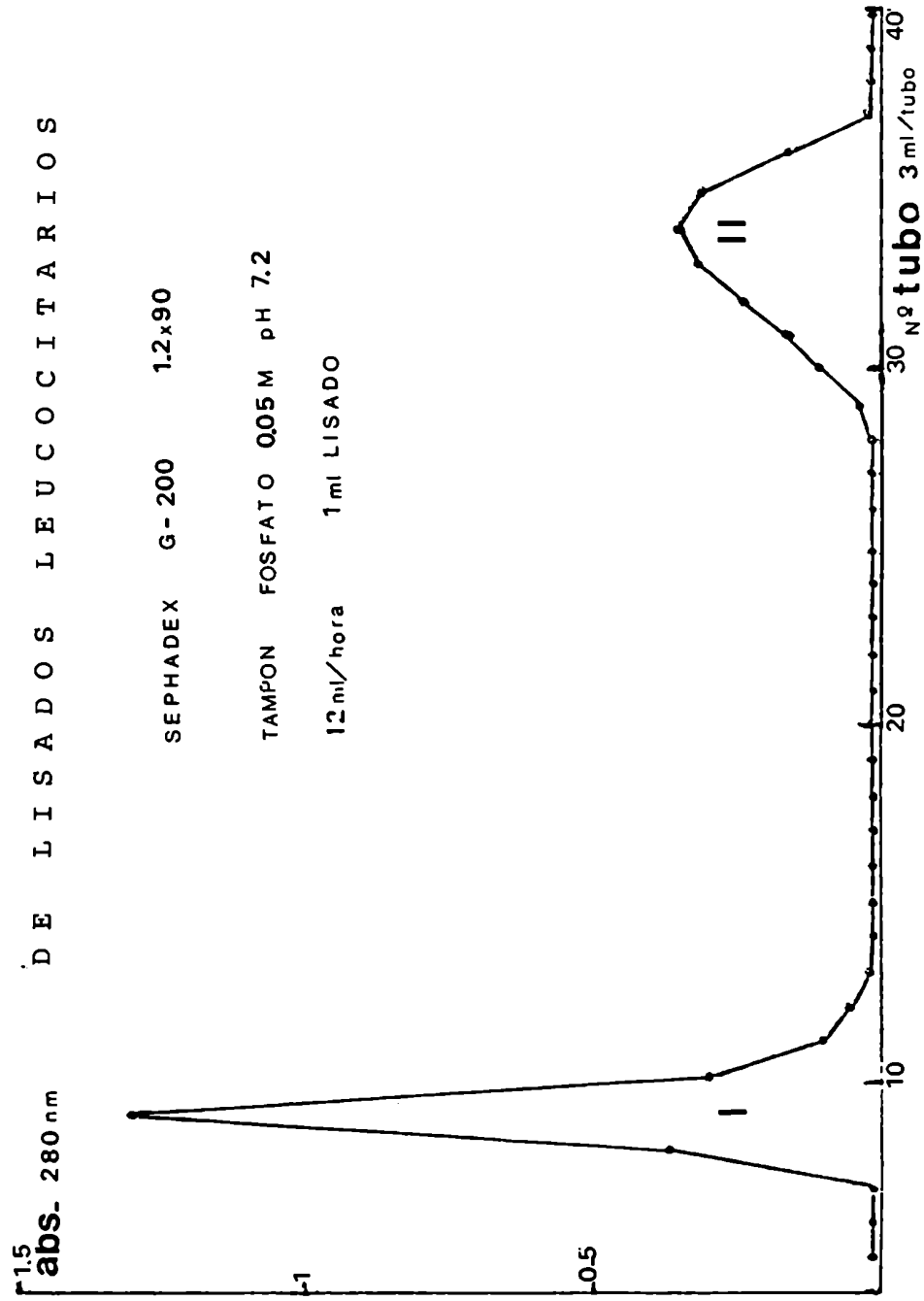
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO CATIONICO DEL PICO 1		
Conc. Protéica ug/ml plasma	L. Normales 1,0	L. Mielomonocítica 1,5
FACTORES % V VIII IX XI XII	40-25 200-500 200-500 240-500 250-500	40-25 150-200 200-500 100-200 200-300
Plasma recalificado acortado 40 segundos respecto del control normal. Cofactor de la heparina 50%. AntitrombinaIII inmunológica bidimensional modificada. Placa de fibrina sin calentar positiva. Placa de fibrina calentada negativa.		

PICO 1 ELUIDO DE LISADOS LEUCOCITARIOS FILTRADOS EN GELES		
Conc. Protéica	L. Normales	L. Mielomonocítica
ug/ml plasma	10 30	10 30
FACTORES %		
V	100-40 100-40	80-35 80-40
VIII	200-220 100	180-220 90
IX	100-40 200	40-45 100-180
XI	100-160 200	100-160 100-200
XII	35-25 100/300	30-20 25/180
<p>Plasma recalificado 35 segundos más corto que el control normal.                      Cofactor de la heparina 50%.                      Antitrombina III inmunológica bidimensional modificada.                      Placas de fibrina calentada negativa, sin calentar negativa.</p>		

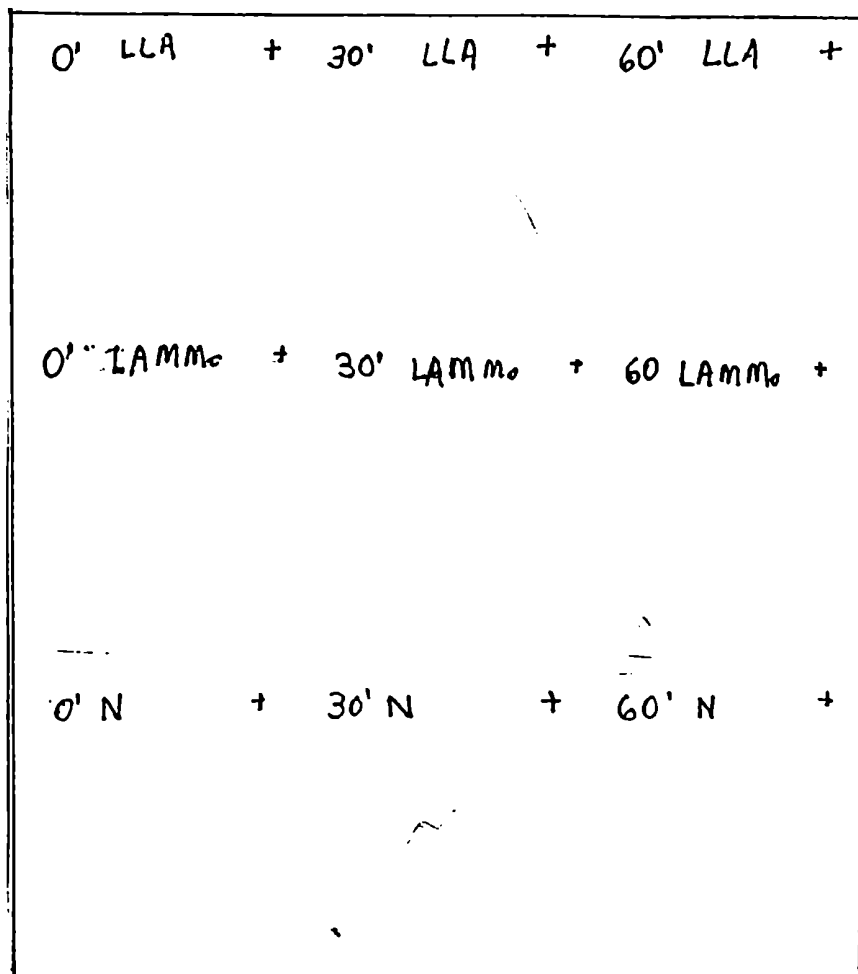
FIGURA 10

CROMATOGRAFIA

DE LISADOS LEUCOCITARIOS



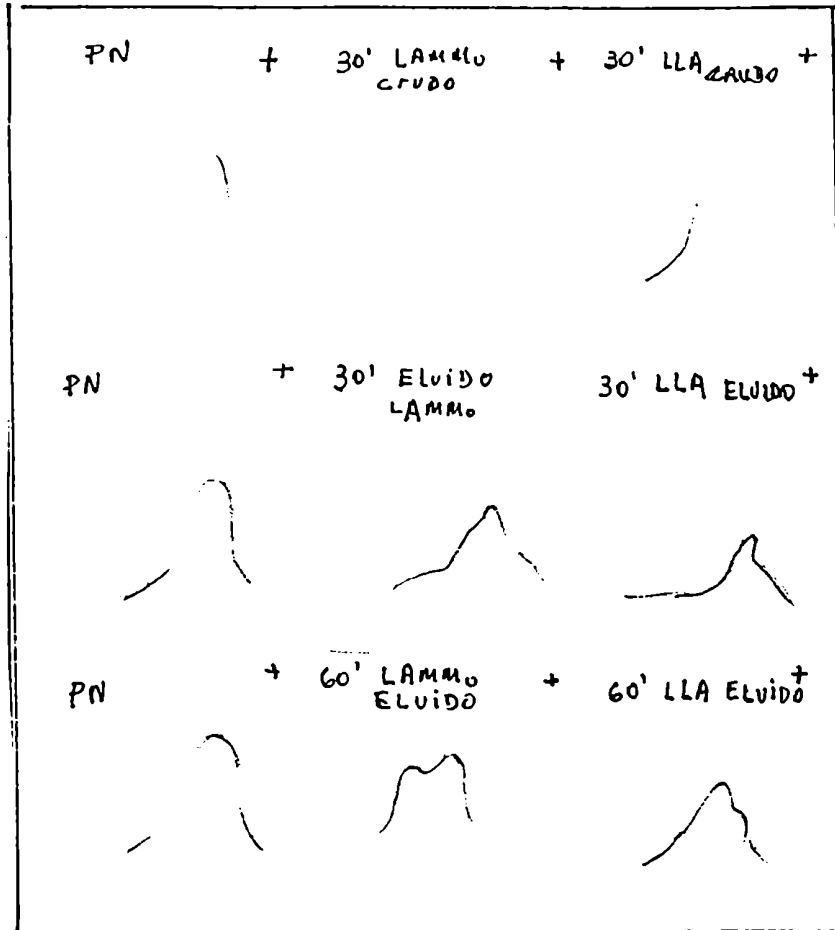
F I G U R A 1 1



Inmunoelectroforesis bidimensional de anti-trombina III en plasma normal incubado con lisado de leucocitos provenientes de: normales, LLA y LAMMo a 37°C durante 30 y 60 minutos.



F I G U R A 1 2



Inmunolectroforesis bidimensional de anti-trombina III en plasma normal incubado con lisados crudos de LAMMO y LLA con 30 y 60 minutos de incubación a 37°C. Plasma normal con eluidos del pico I proveniente de LLA y LAMMO

### DISCUSION

Las manifestaciones hemorrágicas en pacientes con LA son un hecho frecuente; éstas pueden aparecer precozmente en la evolución de la enfermedad o luego de la medicación quimioterápica y principalmente en el período de recaída terminal.

Ello se ha relacionado con diversas alteraciones de la hemostasia tales como trombocitopenia, disminución de factores protrombínicos, coagulación intravascular diseminada (CID) y la acción de enzimas proteolíticas leucocitarias, alteraciones secundarias a la infiltración leucémica tisular (médula ósea, hígado, etc.) y/o a la acción de las células leucémicas o sus enzimas lisosomales.

Gralnick y col. (1973) (1972), Sakuragawa y col, (1976), han comunicado que la incidencia de estas alteraciones hemostáticas son mayores en ciertos tipos citológicos de LA, especialmente en la LAP, en donde la existencia de una CID o de fenómenos de fibrinólisis o proteólisis, son muy frecuentes.

Sin embargo, es posible que la frecuencia y grado de alteración de las pruebas de coagulación sean diferentes en distintos momentos evolutivos de la enfermedad y que varias circunstancias clínicas como: nivel de leucocitosis, grado de infiltración de distintos órganos, la acción del tratamiento quimioterápico, etc., tengan influencia en las modificaciones del sistema hemostá

tico.

En el estudio de nuestros pacientes se pudo observar que en esta patología es frecuente hallar en el período inicial de la enfermedad y antes de la medicación quimioterápica habitual, múltiples alteraciones de la hemostasia. Si bien no se encontraron mayores diferencias entre los diferentes tipos celulares, parece existir una mayor tendencia a dichas alteraciones en las LAG y dentro de ellas en las LAP.

La interpretación de las alteraciones encontradas en las diferentes pruebas de hemostasia y su explicación fisiopatogénica no resulta fácil.

El descenso simultáneo del plasminógeno y de los factores I, II, V, VII, X y XIII, y el alargamiento del TT puede deberse o a la falta de síntesis debida a la infiltración hepática por células leucémicas o a la proteólisis plasmática inespecífica (Kordich y col., 1977; Egbring y col., 1977), causada por enzimas leucocitarias, no siendo explicable por déficit de vitamina K por causas nutricional. No se puede excluir que el descenso de los factores II, V, XIII, del plasminógeno y la alteración del TT puedan estar influenciadas por la presencia de una activación del sistema de coagulación y de una coagulopatía por consumo coexistentes con los mecanismos ya señalados.

La falta de correlación de los valores del TQ con los niveles de los factores que intervienen en la prueba y la

corrección sólo parcial de la misma con plasma normal, hacen suponer que además de un déficit de dichos factores existe una interferencia inhibitoria plasmática.

En el dosaje de factores, por mayor dilución del plasma, se minimiza la inhibición y hace que los valores de los mismos sean más altos de lo esperado. Esto es similar a lo que se observa en sepsis y neoplasias (Kordich y col., 1978), y si bien no se puede explicar aún, puede relacionarse con la acción proteolítica plasmática de enzimas celulares (Kordich y col., 1977; Sánchez Avalos y col., 1977).

De los 8 pacientes con LAG con descenso de plasminógeno, alargamiento del TT y marcada disminución del fibrinógeno, solamente 5 tenían cuadro clínico y alteraciones de otras pruebas de laboratorio (descenso de II, V, VIII, PDF elevados) compatibles con CID.

Por otra parte, la relación VIII R Ag/VIII<sub>C</sub> no mostró la disociación característica descrita en CID, si bien en esta relación utilizamos VIII<sub>C</sub> medido por un método en una etapa cuando se recomienda en cambio la técnica de dos etapas (Biggs, 1972). No se encuentra explicación del descenso de VIII R Ag en 5 pacientes con LAL.

Los valores notablemente alargados de la Tol. Hep. en 3 pacientes con LAG se correlacionaron con la disminución del fibrinógeno, la cual afecta la metodología utilizada en la

prueba de Tol. Hep. Por el contrario, los casos en que se encuentran valores de Tol. Hep. más acortados correspondieron al mayor descenso de Anti-X<sub>a</sub>- Anti-TIII (Kordich y col., 1977) y estaría indicando una activación del mecanismo de coagulación, que se traduce en una Tol. Hep. acortada y en una mayor utilización o consumo de la Anti-TIII, si bien tampoco puede excluirse que el descenso de este inhibidor sea consecuencia de una acción proteolítica leucocitaria.

El descenso del Cof. Hep. se encuentra en un mayor número de pacientes que el observado para Anti-X<sub>a</sub>-Anti-TIII. Esta discrepancia puede deberse a la acción amidolítica producida por enzimas leucocitarias cuando se utiliza el sustrato cromogénico S-2160.

De lo anteriormente expuesto se puede concluir que en las LA es frecuente hallar múltiples alteraciones de la hemostasia, similares en diferentes tipos de citología, aunque no siempre de magnitud severa excepto la trombocitopenia que fue un hallazgo precoz y constante.

El déficit de varios factores, unidos al descenso de plasminógeno, factor XIII, Anti-TIII y PDF aumentados en suero, sólo en 5 pacientes tuvieron la magnitud y la correlación clínica para considerarlo expresión de una CID y coagulopatía por consumo.

El aumento en la relación ATIII<sub>i</sub>/ATIII<sub>b</sub> sólo en 2

de los 20 pacientes se correlacionó con el cuadro clínico y parámetros de coagulación característicos de CID, correlacionándose en la mayoría de los casos con alteración de múltiples factores.

Ello podría interpretarse como que estas alteraciones también pueden aparecer por otras causas, como modificación de AT-III por otras enzimas, que disminuyen o inactivan su actividad biológica y mantienen una normal capacidad inmunológica.

Sin embargo, hasta ahora, no se ha probado que la AT-III inactive o forme complejos con otras enzimas diferentes de las serino-proteasas, por lo cual otra posibilidad sería que la AT-III pueda estar formando complejos con otros factores de coagulación activados o con fragmentos del tipo  $\delta$ -trombina, generados por proteólisis de enzimas leucocitarias, diferentes del fragmento originado por la "protrombinasa" del sistema de coagulación.

Por otra parte, la corrida bidimensional ha mostrado el perfil característico del complejo con trombina, o sea el aumento de ATIII<sub>2</sub> y ATIII<sub>3</sub> a expensas del pico ATIII<sub>1</sub>, sólo en dos casos de los pacientes con LA. En los demás, se encontró un trazado con un aumento de la velocidad de migración y/o picos aplanados o irregulares, muy similares a los que se obtuvieron en estudios "in vitro", por acción de en-

zimas leucocitarias sobre el plasma normal (Kordich y col., 1978).

El aumento de  $\alpha_1$ -AT circulante o formando complejos con elastasa leucocitaria, tal como ha sido descrito en LA, no ha sido hallado en estos pacientes (Egbring y col., 1977).

Esta diferencia podría explicarse porque la mayoría de los pacientes estudiados en la fase inicial de la enfermedad no presentaron cambios muy importantes en otras pruebas de coagulación y, por lo tanto, la acción proteolítica enzimática no fue aún importante para alterar este inhibidor, pero sí para modificar los otros inhibidores en forma más precoz y/o con actividad enzimática menos intensa.

La explicación podría ser la mayor velocidad de eliminación de los complejos no dissociables de la  $\alpha_2$ -M con estas enzimas proteolíticas.

El descenso de  $\alpha_2$ -M, es consistente con lo descrito por otros autores (Ohlsson y col. 1978) y podría estar, también, a favor de una mayor depresión por la formación de complejos con enzimas diferentes de las serino-proteasas, pudiéndose pensar que éstas serían de origen lisosomal leucocitario.

Las causas de liberación de elastasa u otras enzimas proteolíticas a partir de blastos leucémicos es desconocida y, como vimos, éstas son liberadas antes de la quimioterapia,

ya que se detectó en el plasma de estos pacientes el complejo de proteasas leucocitarias con inhibidores como  $\alpha_2$ -M y  $\alpha_1$ -AT.

Los resultados de los incubados de plasma normal con lisados de leucocitos leucémicos demuestran que las enzimas leucocitarias tienen actividad proteolítica contra factores de coagulación activándolos o degradándolos. Así observamos un gran acortamiento en la prueba del plasma recalcificado (40 seg) y una reducción en el nivel de ATIII (50%). Los factores más afectados en su descenso fueron V, VIII y XII, mientras que los factores IX y XI se encontraron activados.

Lo más significativo de estas experiencias lo constituye la modificación encontrada en la electroforesis bidimensional cuando la ATIII del plasma normal se incubó con distintas concentraciones de lisados crudos o eluidos cromatográficos del pico 1 de estos lisados. El tipo de diagrama encontrado (fig. 11 y 12) en estas corridas electroforéticas es semejante a los hallados en la mayoría de las leucemias agudas no tratadas y sin sintomatología clínica de coagulación intravascular (fig. 7, 8 y 9). Es evidente que la ATIII del plasma normal se ha complejoado con alguna serino proteasa distinta de la trombina ya que el diagrama no es el clásico de trombina-ATIII.

Una posibilidad es que la ATIII se una a los factores de coagulación que han sido activados por las enzimas leucocitarias. Es posible, también, que esta activación que comenzó por



una vía no clásica de coagulación pueda llegar a la formación de  $\alpha$ -trombina formando un complejo ATIII y trombina.

Por experiencias, de nuestro grupo de trabajo se conoce la acción de la elastasa pancreática purificada sobre la ATIII del plasma normal, lo que también permite pensar que la ATIII pueda ser complejada con las enzimas liberadas de los leucocitos.

Estas experiencias y los estudios realizados en los pacientes leucémicos sin tratamiento previo permite pensar que las alteraciones encontradas serían el producto de una activación por enzimas leucocitarias, más que una activación por la vía clásica del sistema de coagulación. Sin embargo en algunos casos estas modificaciones pueden llevar a la generación de trombina provocando un cuadro de C.I.D. (como se encontró en 5 pacientes) en la fase inicial de la enfermedad previo al tratamiento.

De acuerdo a las modificaciones encontradas en los sistemas inhibidores plasmáticos, considero que en la LA existen evidencias de un aumento de la actividad enzimática proteolítica plasmática. Este aumento, en algunos casos, se debe a una activación de la coagulación, a la generación de serino-proteasas procoagulantes y/o probablemente, a una C.I.D. aunque, en la mayoría de ellos, es más factible que se trate de enzimas leucocitarias lisosomales, que pueden provocar alteración en

diferentes factores de la coagulación. Además, las modificaciones del sistema de inhibidores provocan, fundamentalmente, un descenso de la  $\alpha_2$ -M, un aumento de la relación  $AT-III_i / AT-III_b$  y cambios en la movilidad y en el trazado electroforético bidimensional de la AT-III en medios con heparina.

Estas últimas modificaciones son de aparición precoz en la evolución de la enfermedad por lo que el método resulta sensible para demostrar este tipo de actividad proteolítica.

De acuerdo con los presentes hallazgos, considero que la alteración de la relación  $AT-III_i / AT-III_b$  no es suficiente para hacer el diagnóstico de C.I.D. ya que la acción de otras enzimas diferentes de las serino-proteasas del sistema de coagulación pueden provocar iguales alteraciones, aunque el mecanismo no ha sido, aún, elucidado.

En la mayoría de los pacientes es más factible que las modificaciones de las pruebas de coagulación sean consecuencia de la actividad de enzimas leucocitarias que pueden producir alteraciones similares a las de una C.I.D. tal como lo demostraron Egbring, Sakuragawa y col. (1972) y nosotros (Kordich y col., 1978; Kordich y col., 1977; Sánchez Avalos y col., 1977).

Cualquiera de los mecanismos pueden ser explicados por la acción de enzimas leucocitarias lisosomales. En algunos casos, ello podría llevar a la activación del sistema de coagulación y generación de trombina; en otros, sólo a activaciones

parciales del sistema sin generación de trombina y/o activación fibrinolítica y en otras circunstancias, a la degradación proteolítica plasmática de factores y a la aparición de interferencias secundarias en la cinética de las reacciones involucradas en las pruebas de laboratorio.



BIBLIOGRAFIA.

- Abildgaard U. (1968). Highly purified antithrombin with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21:89.
- Abildgaard U. (1969). Binding of thrombin to antithrombin III. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 24:23.
- Abildgaard U. (1979 a). A review of antithrombin III. In Collen D., Wiman B., Verstraete M. (eds.). The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis. Elsevier/North Holland, Amsterdam pág. 19-29.
- Abildgaard U. (1979 b). Evidence that antithrombin III is the main physiological inhibitor of coagulation enzymes. In: Collen D., Wiman B., Verstraete M. (eds.). The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis. Elsevier/North Holland, Amsterdam pág. 31-33.
- Altman R., Hemker H.C. (1967). Contact activation in the intrinsic blood clotting system. Thromb. Diath. Haemorrh. 28:182.
- Alkjaersig N., Fletcher A.P. and Sherry S. (1959). The mechanism of clot dissolution by plasmin. J. Clin. Invest. 38, 1086.
- Anderson H. O., Engman L., Henningson E. (1977). Crossed immunoelectrophoresis as applied to studies on complex formation. The binding of heparin to antithrombin III and the antithrombin III-thrombin complex. Journal of Immunological methods 14: 271-281.

- Aoki N. and Von Kaulla K. N. (1971). Human serum plasminogen anti-activator, its destruction from antiplasmin. *Amer. J. of Physiol.* 220: 1137.
- Aoki N. (1979). Natural inhibitors of fibrinolysis. *Process in cardiovascular diseases.* 21: 267-286.
- Bajaj S., Mann K. E. (1973). Simultaneous purification of bovine prothrombin and factor X. Activation of prothrombin by trypsin. Activated factor X. *Journal of Biological Chemistry* 248: 7720-7741.
- Bajaj S., Burkowski R. J., Mann E. (1975). Prothrombin fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 2150-2156.
- Bánhegyi D., Sas Ct. (1979). Immunochemical investigation of antithrombin III/AT III in presence of heparin. *Thrombosis and Haemostasis (Stuttgart)*. VII International Congress on Thrombosis and Haemostasis 16: 170.
- Barbui T., Rodeghiero F. (1978). Two dimensional immunoelectrophoresis of antithrombin III during disseminated intravascular coagulation in leukemia. *Thromb. Res.* 12: 191.
- Barton P. G., Hanahan D. J. (1969). Same lipid-protein interactions involved in prothrombin interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 187: 319-327.
- Barret A. J., Starkey P. M. (1973). The interaction of  $\alpha_2$ -macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochemical Journal* 133: 709-724.

- Barret A. J., Starkey P. M., Munn E. A. (1974). The unique nature of the interaction of  $\alpha_2$ -macroglobulin with proteinases. In: Fritz H., Tschescue H., Green L. J., Truscheit E. (eds.). Proteinase inhibitors. Springer Verlag, Berlino pag. 72-77.
- Bauma B. N., Griffin J. H. (1977). Human blood Coagulation factor XI. Purification, properties and mechanism of activation by activated factor XII. Journal of Biological Chemistry 252: 6432-6437.
- Bell R. G., Matschimer J. T. (1972): Warfarin and the inhibition of vitamin K activity by an oxide metabolite. Nature. 237: 32-33.
- Bell R. G., Buchthal S. D. (1979). In Suttie J. W. ed. Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins. Baltimore University Park Press. pág. 286-293.
- Benson B. J., Kisiel W. and Hanahan D. J. (1973). Calcium binding and other characteristics of bovine factor II and its activation intermediates. Biochemica et Biophysica Acta 329: 81-87.
- Biggs R., Denson K. W. E. (1970). Antithrombin III, Anti-factor X<sub>a</sub> and Heparin. Brit. J. Haemat. 19: 283.
- Biggs R., (1972). Human Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, Blackwell Scientific Publications, pág. 643, Oxford.
- Bjork I., Nordenman B. (1976). Acceleration of the reaction between thrombin and antithrombin III by non-stoichiometric amounts of heparin. European Journal of Biochemistry 68: 507-511.
- Blomack B. (1966). The Fibrinopeptides Throm. Diath. Haemorrh. 20: 201.

- Blomback B. (1967). Fibrinogen-Fibrin transformation in Blood Clotting Enzymology W. H. Seegers Ed. Academic Press. New York and London pág. 143-215.
- Blomback B. and Blomback M. (1972). The molecular structure of Fibrinogen. Ann. NY. Acad. Sci. 202: 77.
- Boyer C., Wolf M., Larrieu M. J. (1979). Formation of Trombin-antithrombin complexes in congenital AT III deficiency. Study of 3 cases. Thrombos. Haemostas. 42:196(abtr.).
- Brecker G., Cronkite E. P. Morphology and enumeration of human platelets. J. Appl. Physiol. 3: 365, 1950.
- Brozovic M., Hamlyn A. M. (1978). Trombotic tendency and probable antithrombin III deficiency. Thrombos. Haemostas. 39: 778-779.
- Bucher D., Nebelin E., Thromsen J. and Stenflo J. (1976). Identification of gamma carboxyglutamic acid residues in bovine factor IX and X and in a new vitamin K-dependent protein. FEBS Lett. 68: 293-296.
- Buchthal S. D., Bell R. G. (1979). Vitamin K-dependent carboxylation in spleen and kidney. In Suttie J. W. ed. vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins. Baltimore University Park Press pág. 299-302.
- Bull R. K., Jevon S. and Barton P. G. (1972). Complexes of prothrombin with calcium ions and phospholipids. Journal of Biological Chemistry 247: 2747-2754.
- Caldwell J. R., Ruddy S., Schur P. H. and Austen K. F. (1972). Clinical Immunology and Immunopathology. 1:39-52.
- Cochrane C. G., Revak S. P., Wvepper R. D. (1973). Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. Jour. Exp. Med. 138: 1564.

- Collen D., Schetz J., de Cock F., Holmer F., Verstrate M. (1977). Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man: effects of venous thrombosis and of heparin administration. *European Journal of Clinical Investigation* 7:27-35.
- Crawford I. P. (1973). Purification and Properties of Normal Human  $\alpha_1$ -Antitrypsin. *Arch. Biochem. and Biophys.* 156:215.
- Chan J. Y. C., Burrowes C. E., Habal F. M. and Movat H. Z. (1977). the inhibition of activated XII (Hageman Factor) by antithrombin III: the effect of plasma proteinase inhibitors. *B.B.R.C.* 74: 150.
- Chang T. L., Feinman R. D., Landis B. H. and Fenton J. W. (1979). Antithrombin reactions with and thrombins. *Amer. Chem. soc.* 18: 113.
- Damus P. S., Hicks M., Rosenberg R. D. (1973). Anticoagulant action of Heparin. *Nature* 246:355 .
- Davie E. W., Kirby E. P. (1973). Molecular Mechanism in blood coagulation. *Current topics of cell Regulation* 7:51-86.
- Di Seipo R. G., Davie E. W. (1979). Characterization of Proteins S, a  $\alpha$ -acetoxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. *Biochemistry* 18: 899-904.
- Donaldson V. H. (1966). Serum Inhibitor of  $C_1$  esterase in health and disease. *J. Lab. and Clin. Med.* 68: 369.
- Donaldson V. H., Glueck H. J., Miller M. A., Movat H. Z., and Habal I. (1976). Kininogen deficiency in Fitzgerald trait: role of high molecular weight kininogen in clotting and fibrinolysis. *J. Lab. Clin. Med.* 87, 327.



- Doolittle R.F., Gassman K. G., Cottrell B. A., Friezner S.J., Takagi T. (1977 a). Aminoacid sequence studies on the chain of human fibrinogen. Covalent structure of the  $\alpha$  chain portion of fragment D. *Biochemistry* 16: 1710-1719.
- Doolittle R.F., Gassman K. G., Cottrell B. A., Friezner S.J., Takagi T. (1977 b). Aminoacid sequence studies on the  $\alpha$  chain of human fibrinogen. Characterization of II cyanogen bromide fragments. *Biochemistry* 16: 1703-1709.
- Duckert F. (1960). Mecanism of the coagulation. *Res. Lab. Praxis* 50, 224.
- Edy J., Collen D., Verstrate M., (1978). Quantitation of the plasma protease inhibitor antiplasmin with the chromogenic substrate S-2251. In: Davidson J. F., Rowman R. M., Samana M. M. Desnoyers P. C. (eds.). *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis* Raven Press. New York. Vol. 3 páq:315-322.
- Egbring R., Schmidt G., Fuchs G. and Havemann K. (1977). Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with Acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood* 49: 129.
- Egeberg O. (1965). Inherited antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb. et Diath. Haemorrh.* 13: 516.
- Enfield D. L., Ericsson L. H., Fujikawa K., Titario K., Walsh K. A., and Neurath H. (1974 b). Bovine factor IX(Christmas factor). Further evidence of homology with factor X(stuart factor) and prothrombin. *FEBS Letters* 47: 132-135.

- Enfield D. L., Ericsson L. H., Walsh K., Neurath H., Titani K. (1975). Bovine factor X (Stuart factor). Primary structure of light chain. Proceedings National Academy of Science USA. 72: 16-19.
- Esmon D., Jackson C. (1974). The Conversion of prothrombin to thrombin III. The factor X<sub>a</sub>-catalysed activation of prothrombin. J. Biol. Chem. 249: 7782-7790.
- Esnouf M. P., Jobin F. (1967). The isolation of factor V from bovine plasma. Biochem. J. 102: 660-665.
- Fell C., Ivanovich N., Johnson S.A., Seegers W. H. (1954). Differentiation of plasma antithrombin activities. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 85: 199-202.
- Fish W., Bjork I. (1979). Production by thrombin of a proteolytically modified form of antithrombin and release of the same form of antithrombin-thrombin complex. Thrombosis and Haemostasis 42:129 (Abstract).
- Forbes C. D., Pensky J., Ratnoff O. D. (1970). Interaction of activated Hageman factor and activated plasma thromboplastin antecedent by purified  $\bar{C}_1$  inactivator. J. Lab. Clin. Med. 76: 809.
- Friedman P. A., Hauschka P. V., Shia M. A., Wallace J. K. (1979). Characteristics of the vitamin K-dependent carboxylating system in human placenta. Biochem. Biophys. Acta 583: 261-265.

- Fujikawa K., Leqaz M. E., Davie E. W. (1972). Bovine factor X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub>. (Stuart Prower). Isolation and characterization. Biochemistry 11: 4882-4891.
  
- Fujukawa K., Thompson A. R., Leqaz M. E., Meyer R. G., Davie E. W. (1973). Isolation and characterization of bovine factor IX (Christmas Factor). Biochemistry 12: 4938-4945.
  
- Fujukawa K., Leqaz M., Kato H., Davie E. (1974)<sub>b</sub> The mechanism of activation of bovine factor IX (Christmas Factor) by bovine factor XI<sub>a</sub> (activated thromboplastin antecedent). Biochemistry 13: 4508-4516.
  
- Fujukawa K., Kurachi K., Davie E. W. (1977). Characteritaton of bovine XII<sub>a</sub> (Activated Hageman factor). Biochemistry 16: 4882-4888 .
  
- Gallimore M. J. (1975).  
Serum inhibitors of fibrinolysis.  
Brit. J. Haemat. 31: 217-231.
  
- Garland B., Hessel B., Marquerie G., Murano G., Blomback B. (1977). Primary structure of human fibrinogen characteriza-  
ction of di-sulfidemcontaning cyanogen bromide fragments.  
European Journal of Biochemistry 77: 595-610.
  
- Gjonnaess H. (1972). I Cold promoted activation of factor VII II. Identification of the activator. Thromb. Diath. Haemorrh. 28: 169-181.
  
- Gomperts E. D., Feesey M., Van der Walt J. D. (1976). Two dimensional immunoelectrophoretic studies in antithrombin III deficiency. Thromb. Res. 8: 713-718.

- Gralnick H. R., Abrell E. Studies of the procoagulant and fibrinolytic activity of promyelocytes in acute promyelocytic leukemia. British J. of Haematol. 24, 89, (1973).
  
- Harpel P. C. and Cooper N. R. (1975). Studies on Human plasma C<sub>1</sub>-inactivator enzymes interactions. I. Mechanisms of interaction with C<sub>1</sub>s, plasmin, and trypsin. J. Clin. Inv. 55: 593-604.
  
- Harpel P. C. (1976 b). Human  $\alpha_2$ -macroglobulin. In Lorand L. ed. Methods in Enzymology. Academic Press, N.Y. Vol 45. pág. 639-652.
  
- Hauschka P. V., Friedman P. A., Traverso H. P., Gallop P.M. (1976). Vitamin K-dependent  $\alpha$ -carboxy glutamic acid formation by kidney microsomes in vitro. B.B.R.C. 71: 1207-1213.
  
- Hawiger J. (1970). Interaction of human fibrinogen with staphylococci: the presence of a binding region on normal and abnormal fibrinogen variants and fibrinogen derivatives. J. Lab. Clin. Med. 75, 93-108.
  
- Heck L. W., Kaplan A. L. (1974). Substrates of Hageman factor. Isolation and characterization of human factor XI (PTA) and inhibition of the activated enzyme by  $\alpha_1$ -antitrypsin. Journal of Experimental Medicine, 140: 1615-1630.
  
- Heimbürger N., Haupt H., and Schwick H. C. T. Florence (1976). On the proteinase inhibitors of human plasma with special reference to antithrombin. First International Symposium on tissue factors in the Haemostasis of the Coagulation, Fibrinolysis System. Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors. Ed. Fritzh and Tscherche H. pág, 1-22. Berlin and New York: Walter de Gruyter.

- Holmer E., Lindahl V., Buckstron G., Thunberg L., Sanberg H., Soderstron G., Andersson L. O. (1980). Anticoagulant Activities and effects on platelets of a heparin fragment with high affinity for antithrombin. *Thromb. Res.* 18: 861-869.
  
- Hook M., Bjork I., Hopwood J., Lindahl U. (1976). Anticoagulant activity of heparin: separation of high- activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin. *FEBS Letters* 66: 90-95.
  
- Hougie C., McPherson R. A., and Aronson L. Passovoy Factor: A hitherto unrecognised factor necessary for haemostasis *Lancet*, 2: 290, 1975.
  
- Howel R. M., Rezvan H. (1977). Circular-dichroic studied of thromboplastin (factor III) from pig brain. *Biochemistry Society Transcripts* 5: 1552-1554.
  
- Jackson C. M. (1972). Characterization of two glycoprotein variants of bovine factor X and demonstration that the factor X zymogen contain two polypeptide chain. *Biochemistry* 11: 4873-4882.
  
- Jordan R., Becker D., Rosenberg R. (1979). Fractionation of Low Molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin. *J. Biol. Chem.* 254: 2902-2913.
  
- Juliet Y., Aiach M., Fiessinger J. N., Beuvin J., Vendeville P., Housset E. (1978). Hereditary antithrombin III deficiency in a French family. A study of 48 family members. XVII<sup>th</sup> Congr. Inter. Soc. Hemat. Paris, Abstract. Vol (1), 341.
  
- Kaplan A. P., Meier H. L. and Mandle R. (1976). The hageman factor dependent pathways of coagulation, fibrinolysis and kinin generation.

- Kaplan A. P., Austen K. F. (1971). Prealbumin Activator of prekallikrein II. J. Exp. Med. 133: 696.
- Kato H., Fujikawa K., Legaz M. E. (1974). Isolation and activation of bovine factor XI and its interaction with factor IX. Federation Proceedings 48: 351-358.
- Kisiel W., Davie E. W. (1975). Isolation and characterization of bovine factor VII. Biochemistry 14: 4928.
- Kisiel W., Fujikawa K., Davie E. W. (1977). Anticoagulant properties by factor XII<sub>a</sub> (activated Hageman factor). Biochemistry 16: 4189-4194.
- Kisiel W., Canfield W. M., Ericsson L. H. and Davie E. W. (1977). Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. Biochemistry 16:5824-5839.
- Kisiel W. (1979). Human plasma protein C, isolation, characterization and mechanism of activation by -thrombin. J. Clin. Invest. 64: 761-769.
- Koide I., Kato H., Davie E. W. (1977). Isolation and characterization of bovine factor XI. Biochemistry 16: 2279-2286.
- Kordich L.C., Sasseti B., Lago O. (1978). Modificaciones en los factores de coagulación y antitrombina III por acción de enzimas leucocitarias. Medicina 38 (6): 840.
- Kordich L.C., Sasseti B., Lago O. (1980). Hemostasia en leucemias Agudas no tratadas. Sangre 25 (8): 1022-1033.

- Kordich L.C., Sassetti B., Lago O. (1977). Inhibidores naturales del sistema de coagulación en leucemias agudas. MEDICINA, 37(5-6): 498.
- Kordich L.C., Sánchez Avalos J.C., Sassetti B., Arquello C., Feldman B. (1977). Actividad antiheparínica plasmática. Su estudio mediante pruebas del tiempo de tromboplastina parcial con caolín (PTTK) y del tiempo de trombina (TT). MEDICINA, 37: 498.
- Kordich L.C., Sassetti B., Lago O. (1980). Antithrombin III Immunologic variability in acute leukemia without treatment. Actas del 18° Congress of the International Society of Hematology, Montreal, Canadá.
- Kordich L.C., Sassetti B., Lago O. (1980). Coagulation and Fibrinolysis in acute leukemia without treatment. Actas del 18° Congress of the International Society of Hematology, Montreal, Canadá.
- Kordich L.C., Sassetti B., Lago O. (1980). Natural coagulation inhibitors in acute leukemia before treatment. Actas del 18° Congress of the International Society of Hematology, Montreal, Canadá.
- Kurachi K., Davie E. W. (1977). Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XII<sub>a</sub>. Biochemistry 16: 3831-3839.
- Laake K., Osterud B. (1974). Activation of purified plasma factor VII by human plasmin, plasma kalikrein and activated components of the human blood coagulation system. Thromb. Res. 5: 759.

- Lacombe M. J., Varet B. and Levv J. P. (1975). A hitherto underscribed plasma factor acting at the contact phase of blood coagulation (Flauseac factor): case report and coagulation studies. *Blood*, 46, 761.
- Laki K. (1968). *Fibrinogen*. Marcel Dekker. Inc. New York.
- Lawrence F. K. and Catanese J. J. Identification of the cleavage sites resulting from enzymatic inactivation of human antithrombin III by *Crotalus adamanteus* proteinase II in the presence and absence of heparin. *Biochemistry* 1981, 20, 7482-7438.
- Learned I. A., Bloom W., Hunter M. J. (1976). The anti-thrombin activity of  $\alpha_1$ -protease inhibitor, the antitrypsin activity of antithrombin III. *Thromb. Res.* 8:99-109.
- Laurell C. B., Jeppsson J. O. (1975). Protease inhibitors in plasma. In: Putman F. W. (ed), *The plasma proteins 2<sup>nd</sup> ed.* Academic Press. N. Y. Vol. 1. Ch. 5.
- Lorand L., Urayamat, De Kiewiet J. Nossel H. A. (1969). Diagnostic and genetic studies on fibrin stabilizing factor with a new assay based on amine incorporation. *J. Clin. Invest.* 48: 1054.
- Lutcher C. L. (1976). Reid trait: A new expression of high molecular weight kininogen (H.M.W.-Kininogen) deficiency *Clin. Res.* 24. 47 A.
- Machovich R. (1975). Mechanism of action of heparin through thrombin of blood coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 412: 13-17.



- Marciniak E., Farley C. H. and De Simone P. a. (1974). Familial thrombosis due to antithrombin III deficiency. Blood 43:219-231.
- Matsuo T., Ohki Y., Kondo S., Matsuo O. (1979). Familial anti-trombin III deficiency in a Japanese family. Tromb. Res. 16: 815-831.
- Maynard J. R., Heckman C. A., Pitlick F., Nemerson Y. (1975). Association of tissue factor activity with the surface of culture cells. Journal of Clinical Investigation 55: 814-824.
- Mc Kee P. A., Mattock P. and Hill R. L. (1970). Subunit structure of human fibrinogen, soluble fibrin, and crossed-linked insoluble fibrin. Proc. Natl. Acad. Scie. USA. 66: 738.
- Mendle R. J., Kaplan A. (1977). Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein. Mechanism of activation of Hageman factor and participation in Hageman factor-dependent fibrinolysis. J. Biol. Chem. 252: 6097-6105.
- Mielke Ch., Kaneshiro M., Maker I. A., Weinwr J. M., Rappapor S. I. (1969). The standurized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. Blood, 34: 204.
- Miller-Anderson M., Borg H., Anderson L. O. (1974). Purification of antithrombin III by affinity chromatography. Thromb. Res. 5: 459-462.
- Morawitz P. (1905). Die Chemie der Blutgekinnung Ergebnisse der Physiologic. 4: 307-422.
- Nelsestven G. L., Zylkovicz T. H., Howard J. B. (1974). The mode of action of vitamin K. Identification of  $\delta$ -carboxy-glutamic acid as a component of prothrombin. J. Biol. Chem. 249: 6347-6350.

- Nemerson Y. and Pitkirk F. A. (1972). Synthetic lipids as intrinsic activator. *Prog. Hemost. Thromb.* 1: 1-37.
- Nilsson I.M. (1975). Local fibrinolysis as a mechanism for haemorrhage. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 34, 623.
- Nossel H.L. (1964). The contact phase of blood coagulation. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Ødegård O. R., Lie M., Abildgaard V. (1975). Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb. Res.*, 6:287.
- Ogston D., Ogston C. M., Ratnoff O. D. and Forbes C. D. (1969). Studies of a complex mechanism for the activation of plasminogen by kaolin and by chloroform: the participation of Hageman factor and additional co-factors. *Journal of Clinical Investigation* 48: 1786.
- Ogston D. (1978). Familial thrombosis inherited deficiency of antithrombin III. *Brit. Med. J.* 1: 136.
- Ohlsson K. (1978). Interaction of granulocyte natural proteases with  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_2$ -macroglobulin and  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. In neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemistry, Physiology and Clinical Significance.* Haveman K. and Janoff A. Eds, Urban and Schwarzenberg Baltimore. Munich pág. 167.
- Olson R. E., Suttie J. W. (1978). Vitamin K and  $\alpha$ -carboxy glutamate biosynthesis. *Horm.* 35: 59.
- Osterud B., Miller-Andersson M., Abildgaard U. and Prydz H. (1976). The effect of antithrombin III on the activity of the coagulation factors VII, IX and X. *Thromb. and Haemos.* 35: 295.

- Owen W. G., Esmon C. T., Jackson C. M. (1974). The conversion of prothrombin to Thrombin I. Characterization of the reaction products formed during the activation of bovine prothrombin. Journal of Biological Chemistry. 249: 594-605.
- Owen C.A., Bowie E. J. W., and Thompson J. H. (1975). The diagnosis of bleeding disorders. 2<sup>nd</sup>. Ed. Little, Brown and Co. Boston. Biochim Biophys. Acta 405: 380-387.
- Pepper D. S., Bánhegyi D., Cash J. D. (1977). The different forms of antithrombin III in serum. Thrombos. Haemostas. 38: 494-503.
- Prentice C. R. (1973). Drug-induced interference with blood coagulation. Clinics. Haematol. 2, 149.
- Prowse C. P., Esnouf M. P. (1977). The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. Biochem. Soc. Trans. 5: 255.
- Plow E. F., Edgington T.E. (1975). An alternative pathway for fibrinolysis I. The cleavage of fibrinogen by leucocyte proteases at physiologic pH. J. clin. Invest. 56, 30.
- Proctor R. and Rapaport S. (1961). The partial thromboplastin time with kaolin. The Am. Jour. of Clinical Pathology Vol. 36, 212-219.
- Quick A. J. (1952). "Fisiología y patología de la Hemostasia". Editorial El Ateneo.
- Radcliffe R., Nemerson Y. (1975). Activation and control of factor VII by activated factor X and thrombin isolation and characterization of a single chain form of factor V. Journal of Biological Chemistry 250: 388-396.

- Ratnoff D., Colopy J. E. (1955). Familial hemorrhagic trait associated with deficiency of clot-promoting fraction of plasms. J. Clin. Invest. 34: 602.
- Ratnoff O.D., Saito H. (1976). Evidence that Fitzgerald factor counter. Acts inhibition by kaolin or ellagic acid of the amidolytic properties of a plasma kallikrein. Blood, 47, 243.
- Remmert L. F., Cohen P. P. Caseinolytic assay for plasminogen determination, J. Biol. Chem., 181-431, 1949.
- Revak S. D., Cochrane C. G. et al. (1974). Structural changes accompanying enzymatic activation of human Hageman factor. J. Clin. Invest. 54: 619.
- Revak S. D. and Cochrane C. G. (1976). Hageman factor Its. structure and modes of activation. Thromb. Haemost. 35:570.
- Revak S. D., Cochrane C., Griffin J. (1977). The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. J. Clin. Invest. 59: 1167-1175.
- Rickles F. R., Hardin J. A., Pitlick F. A., Hoyer L. W., Conrad M. E. (1973). Tissue factor activity in lymphocyte cultures from normal individuals and patients with hemophilia A. Journal of Clinical Investigation 52: 1427-1434.
- Robinson J. A. et al (1975). Endotoxin, prekallikrein, complement and systemic vascular resistance. American Journal of Medicine. 59: 61-67.

- Rosenberg R. D. and Damus P. S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 248: 6490.
- Rosenberg R. D. (1975). Action and interactions of antithrombin and heparin. *N. Eng. J. Med.* 292: 146.
- Rosenberg J. S., Mc Kenna P. and Rosenberg R. D. (1975). Inhibition of human factor X<sub>a</sub> by human antithrombin. Heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 250: 8883.
- Rosenberg R. D. (1978). Heparin, antithrombin and abnormal clotting. *Annual Review by Medicine.* 29: 367-378.
- Rosenberg R. D., Jordan R. E., Faureau L. V., Lau L. H. (1979). Highly active heparin species with multiple binding sites for antitrombin. *B.B.R.C.* 86: 1319-1324.
- Rosenthal R. L., Dreskin O. H., and Rosenthal N. (1953). New hemophilia-like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, :171.
- Saito H., Ratnoff O. D. (1975). Alteration of factor VII activity by activated Fletcher factor (a plasma kalikrein): a potential link between the intrinsic and extrinsic blood clotting system. *J. Lab. Clin. Med.* 85: 405.
- Sakuragawa N., Takahashi K., Hoshiyama M., Dimbo C., Matsuoka M., Onishi Y. (1976). Pathologic cells as procoagulant substance of disseminated intravascular coagulation syndrome in acute promycocytic leukemia. *Thromb. Res.* 8:263.

- Sánchez Avalos J. C., Nicastro M. A. (1977). Estudio de la discrepancia entre los valores del tiempo de Quick y de los factores protrombínicos. Medicina, 37: 497.
- Sánchez Avalos J. C. Hemorragia y Trombosis. Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis. Pág. 17-56. Ed. S. Dorantes, J. Pizzuto.
- Sas G., Blasko G., Bánhegyi J., Jáko J. and Pálos A. (1974). Abnormal antithrombin III (Antithrombin "Budapest"). As a cause of familiar thrombophilia. Thromb. Diath. Haemorrh. 32: 105.
- Sas G., Pepper D. S., Cash J. D. (1975). Investigation on antithrombin III in normal plasma and serum. Brit. J. Haemat. 30: 265.
- Sas G., Pepper D. S., Cash J. d. (1975). Further investigations on antithrombin III in the plasma of patients with the abnormality of antithrombin III "Budapest". Thromb. Diatnes. Haemorrh. 33: 572.
- Sas G., Peto I., Banhegy D., Blasko G. and Domjan G. (1980). Heterogeneity of the classical antithrombin III. Thromb. Haemostas. (Stuttgart) 43 (2): 1.
- Sasseti B., Kordich L. C., Lago O. (1980). Determinación de antitrombina III por inmunoelectroforesis bidimensional sobre acetato de celulosa gelificado. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 14 (3): 479-482.

- Schapiro S. S., Anderson D. B. (1977). Thrombin inhibition in normal plasma. IN: Lundblad R. L., Fenton J. W., Mann K. G. (eds.). Chemistry and Biology of thrombin. Ann. Arbor. Michigan pág. 361-374.
- Schiffman S., Lee P. (1974). Preparations, characterizations and activation of a highly purified factor XI. Evidence that a hitherto unrecognized plasma activity participates in the interaction of factors XI and XII. Brit.J. Haematol.27:101-114.
- Shapiro S. S., Prager D., Martinez J. (1973). Inherited anti-thrombin III deficiency associated with multiple thromboembolic phenomena. Blood 42: 1001 (Abstr.).
- Silverberg S.A., Nemerson Y., Zur M. (1977). Kinetics of the activation of bovine coagulation factor X by components of the extrinsic pathway kinetic behaviour of two chain factor VIII in the presence and absence of tissue factor. J. Biol. Chem. 246: 5851-5854.
- Sterud N., Kaplan A. P. and Rosenberg R. D. (1976). Inhibition of activated factor XII by antithrombin. Heparin cofactor. J. Biol. Chem. 251: 6481.
- Stenflo J., Fernlund P., Egan W., Roepstorff P. (1974). vitamin K-dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 2730-2733.
- Stenflo J. A. (1976). A new vitamin K-dependent protein purification from bovine plasma and preliminary characterization. J. Biol. Chem. 251: 355-363.

- Tager - Nillson A. C., Friberg P., Gyzander E. (1977). Determination of a new rapid plasmin inhibitor in human blood by means of a plasmin specific tripeptide substrate: Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 37: 403-409.
- Thompson R. I., Mandle R. J. y Kaplan A. P. (1977). Interaction of factor XI and kalikrein with high molecular weight kininogen. Abstracts VI Int. Congress Thromb. Haemost. pág. 13.
- Traverso H. P., Hauschka P. V., Callop P. M. (1980). Vitamin K dependent  $\gamma$ -carboxyglutamic acid formation by mouse renal adenocarcinoma cells (RAG). Calcif. Tissue Int. 30:73-76.
- Travis D., Jhonson D., Pannell R. (1974). Properties of Human  $\alpha_1$ -antitrypsin, in Fritz H., Tschesche L., Greenq U. J., Truscheit E. (eds.). Proteinase Inhibitors, Heidelberg, Springer, pág. 31.
- Van Der Meer J., Stoepman-Van Dalen E. A. and Jansen J. M.S. (1973). Antitrombin III deficiency in Dutch family, In: IV<sup>th</sup> International Congress on thrombosis and Haemostasis, Vienna, Abstracts pág. 226.
- Vennerod A. M., Laake K. (1975). Inhibition of purified plasma kallikrein by antithrombin III and heparin. Thromb. Res. 7: 223-226.
- Vennerod A. M., Laake K. (1976). Prekalikrein and plasminogen proactivator. Absence of plasminogen proactivator in Fletcher factor-deficient plasma. Thromb. Res. 8:519-522.



- Wiman B., Collen D. (1979). On the role of  $\alpha_2$ -antiplasmin in the regulation of fibrinolysis. In: Collen D., Wiman B., Verstracte M. (eds.). The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis. Elsevier/North Holland. Amsterdam pág. 177-185.
- Wolf M., Lavergne J. M., Larrieu M. J. (1979). A new variant of antihrombin III. Study of three related cases. Thromb. Haemostas. 42: 186 (Abstr.).
- Wuepper K. D. (1972). In: Lepow I. H. and Ward P. A. (eds.). Inflammation: mechanisms and control pág. 93-117. Academic Press, New York and London.
- Wvepper K. D., Cochrane C. G. (1972). Plasma prekallikrein isolation, characterization and mechanism of action. J. Exp. Med. 135: 1-20.
- Wvepper K. D. (1973). Prekallikrein deficiency in Man. J. Exp. Med. 138: 1345-1355.
- Wycoff (1956). Micro assay for fibrinogen. J. Lab. Clin. Med. 47, 4.
- Yin E. T. (1974). Effect of heparin on the neutralization of factor  $X_a$  and thrombin by plasma  $\alpha_2$ -globulin inhibitor. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica 33: 43-50,