

## REVISIONES

### **Función de la protombina y derivados protombínicos en la coagulación sanguínea. I.**

*J. Aznar \**

“Lógicamente un fenómeno tan interesante como la coagulación sanguínea es desde tiempos antiguos estímulo adecuado para investigar en el misterio de su origen”. Esta idea esbozada por Morawitz en las primeras líneas de su clásico libro <sup>71</sup>, y que sin duda fue un acicate eficaz en su afán por conocer más a fondo los problemas de la hemostasia, puede asimismo servirnos de estímulo adecuado actualmente, pues si los avances realizados en este campo son en realidad extraordinarios, el mejor conocimiento, del mismo fundamentalmente ha servido para hacer más patente nuestra ignorancia en todo lo que atañe a la formación del tapón hemostático. Por otro lado la oscuridad que sobre esta parte de la hematología existe ha hecho que se multipliquen las publicaciones a su alrededor, de tal forma, que no sólo la investigación experimental, sino incluso el más sencillo ordenamiento de todo lo publicado, resulta en ocasiones dificultoso. Por este motivo hemos creído oportu-

no revisar uno de los problemas de la coagulación que por estar más en controversia puede asimismo estar menos claro dentro de la literatura especializada. Nos referimos a la protrombina y a su papel en el concierto hemocoagulativo general.

#### PROTROMBINA

La trombina, el enzima activo en la transformación del fibrinógeno en fibrina, se genera a partir de una proteína plasmática, la protrombina, por la acción conjunta de una serie de sustancias activadoras presentes en el plasma y en los tejidos. Para explicar esta activación protrombínica generalmente se admiten dos teorías. La primera, que podríamos llamar clásica, tiene su fundamento en el papel activador que sobre la protrombina ejercen una serie de sustancias presentes en el plasma y que no tienen un origen protrombínico <sup>10</sup>. La segunda, que tiene como defensores más caracterizados a Seegers y su escuela, hace de la protrombina el centro de todo el proceso, y admite que la mayoría de las sustancias (factores)

\* Universidad de Navarra. Departamento de Bioquímica.

que intervienen en la reacción, tienen su origen en la propia molécula protrombínica<sup>95</sup>.

En esta segunda teoría vamos a centrar nuestro trabajo, habiéndonos movido a ello el notable esfuerzo realizado por la escuela de Detroit, para dar, por medios fundamentalmente bioquímicos, una solución adecuada a estos intrincados problemas, camino que nos parece el más apropiado para llegar a una total comprensión del fenómeno hemocoagulativo, "ya que los mecanismos de la coagulación son tan complejos, que las reacciones en las que participan varios factores únicamente pueden ser conocidas adecuadamente cuando estos factores son aislados y purificados lo más posible"<sup>100</sup>. Por otra parte, desde el descubrimiento del factor V<sup>23, 24, 76</sup>, se ha dado paso a una serie de nuevos factores, que a la vez que han ampliado conceptos, han hecho generalmente más complicada la comprensión de los ya existentes, hasta tal punto que esta tendencia descubridora ha creado en algunos autores una verdadera "factorfilia" por lo que nos parece que toda simplificación en el número de los mismos, como propugna la teoría de Seegers, debe ser acogida favorablemente.

*Origen.* La protrombina y en consecuencia todos los derivados protrombínicos, se generan en las células parenquimatosas del hígado<sup>8</sup>, siendo en cambio el retículo endotelio incapaz de sintetizar protrombina<sup>7</sup>. Dentro de la célula parenquimatosas, parecen ser los microsomas los encargados de tal génesis, estando las restantes fracciones subcelulares desprovistas de capacidad protrombino-formadora<sup>7, 31</sup>.

En cuanto a la vía de síntesis, una muy reciente teoría defiende la hipótesis de que se forma a partir de una protrombina inactiva, la preprotrombina<sup>30</sup>. En la activación de esta preprotrombina juega un papel decisivo la vitamina K, ya que una disminución de la misma conduce a la

liberación de dicho precursor en la sangre periférica, pudiendo de esta forma actuar competitivamente con la protrombina activa y por tanto inhibir el proceso de coagulación normal<sup>30</sup>. Aunque dicha teoría parece un remozar de los antiguos conceptos sobre las protrombinas A y B de Quick<sup>82, 83, 84, 85, 86</sup>, creemos que debe ser objeto de una ulterior confirmación, y que por ahora lo único que parece totalmente definido es el indudable papel que un nivel adecuado de vitamina K tiene en la síntesis de la protrombina, bien sea que dicha síntesis se lleve a cabo a partir del citado precursor inactivo, bien que tenga como origen la protrombinasa de Quick o la autoprotrombina I de Seegers<sup>6</sup>, o bien que se realice a partir de elementos básicos independientes de la propia protrombina.

*Purificación.* La protrombina, al igual que otras proteínas plasmáticas, tiene la propiedad de adsorberse sobre determinadas sustancias inorgánicas, pudiéndose más tarde separar de las mismas usando los apropiados líquidos de elución. Con fundamento en esta propiedad se han descrito una serie de métodos de purificación en los que únicamente varía la técnica concreta de adsorción y posterior elución, pero sin que la esencia del proceso difiera notablemente de unos a otros.

Únicamente en las primeras tentativas no se usaron técnicas de adsorción, ya que tanto Mellanby<sup>63, 64</sup> como Howel<sup>32</sup> emplearon la precipitación isoelectrónica de la protrombina, técnica que Cekada<sup>16</sup> completó usándola conjuntamente con la precipitación salina. Ya dentro del grupo de las técnicas de adsorción, los primeros intentos fueron llevados a cabo por Bordet y Delange<sup>11</sup> quienes usaron el fosfato tricálcico como material adsorbente. Fuchs<sup>26</sup> más tarde utilizó el hidróxido magnésico, siendo este adsorbente el preferido por Seegers y su grupo, quienes, por otra parte, combinaron la adsorción con la precipitación isoelectri-

ca<sup>111</sup>. Con el tiempo, el método fue sufriendo una serie de modificaciones<sup>50, 92, 101, 106</sup>, hasta que se obtuvieron preparaciones de marcada actividad biológica<sup>106</sup>, pero que presentaban el inconveniente de ser poco estables a la conservación<sup>123, 124</sup>. En un principio se atribuyó dicha inestabilidad a imperfecciones en los métodos de valoración<sup>122</sup> pero más tarde se relacionó ésta, con la presencia de AcG en las preparaciones<sup>122</sup>. La AcG desencadenaría la activación autocatalítica de la protrombina<sup>125</sup> y con ello su transformación en trombina. Para obviar este inconveniente los posteriores intentos fueron encaminados a eliminar las impurezas de la molécula protrombínica, lo que fue conseguido introduciendo ligeras modificaciones<sup>122</sup> en el primitivo método de Seegers<sup>106</sup>, quedando de esta forma establecido como sigue<sup>91, 96</sup>: precipitación isoeléctrica llevando la muestra a un pH de 5,1, adsorción de la misma con hidróxido magnésico, descomposición del hidróxido magnésico con CO<sub>2</sub> a presión, fraccionamiento del producto obtenido con sulfato amónico, redisolución y diálisis del precipitado y finalmente una precipitación ulterior llevando de nuevo el problema a un pH de 5,1.

Paralelamente a estas experiencias de Seegers, otros autores desarrollan sus propios métodos, aunque todos ellos difieren escasamente del expuesto con anterioridad<sup>73, 76, 23, 24, 70, 113, 49, 38, 39, 14, 37, 121, 68, 40, 27</sup> ya que no modifican fundamentalmente la metodología propuesta por el autor norteamericano.

En cambio, una mejora sustancial se introdujo con el uso de la cromatografía en columna<sup>66, 69</sup>, obteniéndose con AMBERLITA IRC-50 (XE-64), preparaciones altamente purificadas<sup>67</sup>. Con métodos parecidos otros autores<sup>99, 115, 116, 27</sup> obtienen resultados similares. Más tarde las resinas de intercambio son sustituidas por sustancias adsorbentes, como la celulosa<sup>95</sup> DEAE pero con ellas se consiguen moléculas de protrombina ligeramente alteradas

en su estructura química, ya que, por ejemplo, tienen serina como aminoácido C-terminal en lugar de tirosina o glicina, como normalmente presenta la protrombina no cromatografiada, o cuando la cromatografía se ha realizado con una resina de intercambio iónico<sup>95</sup>.

Con estas técnicas se han obtenido preparaciones muy purificadas con una actividad biológica de hasta 34.000 unidades por miligramo de tirosina<sup>95</sup>.

Una metodología parecida a la utilizada para la obtención de protrombina bovina ha sido seguida para la purificación de protrombina equina<sup>67</sup> y humana<sup>41, 43</sup> siendo los resultados un tanto discordantes entre las diversas experiencias llevadas a cabo<sup>43</sup>.

En gran parte la utilidad experimental de las preparaciones de protrombina obtenidas por los métodos anteriormente descritos, depende de que las mismas sean lo suficientemente homogéneas como para que otros factores no vengán a enmascarar los resultados. Dicha homogeneidad es subsidiaria de la técnica empleada, y de la especie de origen<sup>28</sup>, pudiéndose afirmar, en líneas generales, que la protrombina bovina se ha obtenido casi totalmente purificada y por supuesto libre de otros factores hemocoagulativos, como se ha demostrado por medios físicos<sup>38</sup>, electroforéticos<sup>99</sup>, ultracentrifugación<sup>36</sup>, inmunoquímicos<sup>95</sup> e incluso por microscopía electrónica<sup>87</sup>. En cambio, no se puede afirmar lo mismo de la protrombina humana, ya que usando el método de purificación descrito por Lewis y Ware<sup>49</sup> y combinándolo con ultracentrifugación<sup>40</sup> o electroforesis en gel de almidón<sup>40</sup>, se han podido demostrar hasta seis componentes inmunolectroforéticos distintos<sup>41</sup>. Alexander<sup>27</sup>, tampoco consigue preparaciones homogéneas. Pero más recientemente Lanchantin y col.<sup>43</sup>, usando una técnica de purificación propia, que tiene como fundamento la adsorción de la protrombina con dietil-amino-

celulosa, demuestran que entre pH comprendidos entre 7 y 9 las preparaciones obtenidas son homogéneas, comprobando su pureza tanto por ultracentrifugación como por electroforesis. Asimismo, observan que a pH más bajos, la protrombínica puede polimerizarse, dando moléculas de mayor tamaño y velocidad de sedimentación, lo cual puede explicar en parte los discordes resultados obtenidos por otros autores. Como consecuencia de ello se puede afirmar que la homogeneidad de la protrombina humana depende del pH a que se haga la extracción, aunque parece que cualquier conclusión definitiva debe ser objeto de ulterior confirmación<sup>42</sup>.

La protrombina equina se ha obtenido también muy purificada, aunque con menor actividad biológica que la bovina<sup>67</sup> la que por otra parte a su vez es menos activa que la humana<sup>96, 41, 42</sup> ya que ésta última puede llegar a tener el doble de actividad que aquella<sup>43</sup>.

*Propiedades físico-químicas.* La protrombina tiene un peso molecular aproximado de 68.000<sup>39</sup>. Su velocidad de sedimentación a la ultracentrífuga oscila alrededor de las 4.7 u.u. Svedberg, siendo para Alexander<sup>2</sup> de 4.46, para Lamy y Waug<sup>39</sup> de 4.89, para Schwick y Schultz<sup>91</sup> de 4.6 y para Seegers<sup>95</sup> de 5.22. Tiene una viscosidad intrínseca de 0.041<sup>38</sup> y un volumen específico parcial de 0.70<sup>38</sup>. Su densidad es de  $6.17 \times 10^{-7}$  cm.<sup>2</sup>/seg.<sup>38</sup> y su punto isoeléctrico coincide con un pH de 4.2<sup>106</sup>. Tiene una rotación óptica, medida a un pH de 11.2 y fuerza iónica de 0.15, de  $-60^\circ$  C/grms/100 ml dec<sup>38</sup>, aunque la misma varía sensiblemente con las condiciones de experimentación<sup>95</sup>. Tiene forma elipsoidal, siendo su diámetro mayor de 119 Å y el menor de 34 Å<sup>38</sup>. Es termoestable hasta los 53° C, cuando se halla en solución acuosa, pero su estabilidad biológica comienza a disminuir a los 43° C, en solución salina. Electroforéticamente se encuentra entre las albúminas y las globulinas alfa<sub>1</sub>. Su con-

centración plasmática es de 10 a 15 mgrs por 100 ml de plasma, encontrándose en el suero ligeros indicios<sup>78</sup>. Tiene una vida media aproximadamente de cinco días, la más larga —junto a la del fibrinógeno— de todos los factores de la coagulación<sup>114</sup>. Como es natural, tiene una marcada actividad antigénica. La molécula de protrombina bovina en soluciones acuosas muy diluidas, inferiores al 1 %, se disocia fácilmente cuando disminuye el pH del medio; en cambio, la humana, a la citada concentración, sufre un proceso de polimerización, con la consiguiente variación de sus propiedades físico-químicas, como anteriormente ya se ha enunciado.

En cuanto a su composición química, la protrombina es una glicoproteína, con un 13 % aproximadamente de hidratos de carbono<sup>117</sup>. Su componente proteico se halla integrado por todos los aminoácidos conocidos<sup>37</sup> siendo los más abundantes la arginina, leucina, ácido glutámico y ácido aspártico. Su aminoácido N-terminal es la alanina<sup>69</sup> y el C-terminal la glicina o tirosina<sup>112</sup>, aunque variando el método de preparación se pueden obtener moléculas de protrombina con diferentes aminoácidos terminales. Las hexosaminas constituyen su principal hidrato de carbono, pero asimismo entran a formar parte de su molécula hexosas, pentosas y ácido neuramínico<sup>90</sup>. Este último no parece estar ligado a la génesis de la trombina, ya que tratando la preparación con neuraminidasa, no disminuye la actividad biológica de la protrombina<sup>90, 118</sup>, la cual, por otra parte, parece estar ligada a determinadas funciones químicas, como son los grupos disulfuro<sup>13, 14, 15</sup>, los sulfidrilos<sup>35</sup>, las aminas, o los grupos imidazólicos, ya que los inhibidores de éstos, inhiben la actividad biológica de aquella<sup>89</sup>.

#### \* ACTIVACIÓN DE LA PROTROMBINA

El más interesante problema en el estudio de la protrombina es sin duda el proceso

de activación sufrido por la misma hasta su transformación en trombina. Dicha activación se puede llevar a cabo por dos caminos, el experimental y el biológico, tal y como se realiza durante la formación del tapón hemostático *in vivo*.

La activación experimental de la protrombina tiene gran importancia, habiendo su estudio aportado luces decisivas para el mejor conocimiento de la activación biológica. Dentro de la misma se pueden distinguir, la autocatálisis, la coautocatálisis y la activación parcial de la protrombina. Pero, sin duda, es el proceso de la autocatálisis protrombínica o activación aniónica, el más interesante, ya que gracias al mismo se ha podido demostrar de forma fehaciente el origen protrombínico de la trombina, así como el de una serie de compuestos catalogados bajo el nombre genérico de autoprotrombinas.

**AUTOCATALISIS DE LA PROTROMBINA.** Si cierta cantidad de protrombina purificada se disuelve en citrato sódico al 25 % y se deja a temperatura ambiente durante unas cuantas horas, se producen en su molécula una serie de cambios estructurales, que tienen como consecuencia su transformación en trombina<sup>93, 108</sup> y autoprotrombina C<sup>105</sup> [1]. Al igual que ocurre con el citrato sódico, otras disoluciones salinas son también capaces de desencadenar la activación protrombínica<sup>46</sup>, pudiendo ésta ser acelerada si se añaden al medio de experimentación pequeñas cantidades de trombina<sup>62</sup>.

medida que la reacción progresa. A los procoagulantes de origen protrombínico liberados durante el proceso de autocatálisis se les conoce bajo el nombre común de autoprotrombinas, y como más abajo veremos son fundamentalmente tres, las autoprotrombinas: I, II y C.

Como anteriormente ya hemos referido, cuando la protrombina se incuba con citrato sódico al 25 % y se deja a temperatura ambiente, sus estructuras secundaria y terciaria se alteran, llevándose a cabo un proceso de disociación molecular, que se realiza con mayor rapidez en medios moderadamente alcalinos<sup>93, 51</sup>. Normalmente este proceso de disociación se detecta porque parte de su molécula se hace soluble en ácido tricloroacético al 7 %, lo que contrasta marcadamente con su primitiva insolubilidad. Cuando ha transcurrido aproximadamente una hora de incubación, el 40 % del nitrógeno total, y el 60 % de los carbohidratos de de la protrombina, se han hecho solubles en el referido ácido<sup>51</sup>, habiéndose asimismo liberado su contenido en ácido neuramínico<sup>90</sup>. Hasta este momento únicamente se han producido cambios estructurales en la molécula de la protrombina, sin que se haya generado ningún elemento nuevo y, por supuesto, sin que haya aparecido en el medio de experimentación actividad trombínica alguna. Estos cambios estructurales tienen repercusiones químicas y biológicas, que se concretan en una puesta al descubierto de enlaces activos de la protrombina, de for-

Citrato sódico

PROTROMBINA  $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$  TROMBINA + AUTOPROTROMBINA C [1]

Este proceso de activación, que se lleva a cabo sin participación de sustancia procoagulante alguna, se denomina autocatálisis de la protrombina, ya que todos los factores necesarios para el mismo se encuentran contenidos en la propia molécula protrombínica y se van liberando a

ma tal que ésta se hace más asequible al posterior ataque de las sustancias procoagulantes, fundamentalmente de la trombina<sup>95</sup>. El que hasta este momento se mantenga su unidad estructural es la causa de que no hayan aparecido todavía componentes electroforéticos nue-

vos, pero, en cambio, por la pérdida de sus estructuras secundarias y terciarias se lleva a cabo una reestructuración de sus cargas eléctricas que se traduce en una mayor velocidad migratoria en la electroforesis, siendo éste el único cambio físico detectable hasta el momento.

Por el contrario, los cambios biológicos son más marcados. Aunque la actividad trombínica no ha aparecido todavía, se detecta una marcada capacidad procoagulante en el medio de incubación, que a su vez activa el proceso autocatalítico<sup>5</sup>. Junto a esto, la molécula primitiva se hace resistente a sus activadores habituales, perdiendo momentáneamente la posibilidad de transformarse en trombina<sup>103</sup>.

Este estado refractario de la molécula de protrombina dura unos 30 minutos, transcurridos los cuales vuelve a sufrir un nuevo cambio biológico haciéndose de nuevo transformable en trombina<sup>95</sup>.

A esta molécula de protrombina alterada que tiene como características fundamentales el no ser trombina, tener actividad procoagulante, ser refractaria a la acción de poderosos activadores, y por tanto no transformable en trombina, y que físicamente se caracteriza por su menor velocidad migratoria, como consecuencia de cambios en las cargas eléctricas de su molécula, y químicamente por la pérdida de sus estructuras secundarias y terciarias, se la denomina Derivado I de la Protrombina<sup>97</sup>. Este es un concepto bastante amplio, que comprende, dentro del mismo, como más abajo veremos, a las autoprotrombinas I y II. Cuando el proceso de activación de la protrombina ha finalizado, y la génesis de la trombina se ha llevado a cabo, el Derivado I de la Protrombina ha desaparecido del medio de incubación<sup>57</sup>, lo que presupone su total consunción durante el proceso hemocoagulativo o bien su transformación en otro producto distinto.

Si el proceso de autocatálisis continúa, el

derivado protrombínico adquiere de nuevo la propiedad de poder ser transformado en trombina, en presencia de sus activadores específicos, manteniendo a la vez su actividad procoagulante. A éste nuevo producto se le ha denominado Derivado II de la Protrombina. Químicamente se caracteriza por estar su molécula más disociada, aunque electroforéticamente se puede comprobar que en el medio de experimentación no ha aparecido todavía ningún elemento nuevo, lo que refleja el mantenimiento de su primitiva unidad estructural<sup>97</sup>.

Cuando el proceso de autocatálisis finaliza, lo cual requiere aproximadamente unas cuatro horas, aparece la actividad trombínica en el medio de incubación<sup>55</sup>, se generan nuevos elementos electroforéticos, y junto a la actividad procoagulante, propia de la trombina, se desarrolla otra de tipo esterásico, que como luego veremos corresponde a la denominada trombina E<sup>45</sup>.

El que hayan aparecido elementos electroforéticos nuevos, aboga en favor de una rotura en las uniones peptídicas de la molécula protrombínica con liberación de restos proteicos y pérdida de su primitiva estructura. Este proceso de rotura molecular se puede seguir asimismo, estudiando las constantes de sedimentación durante el proceso de autocatálisis y observando la aparición de elementos con distinta constante de la que tenía la primitiva molécula protrombínica<sup>39</sup>.

Como productos finales de la activación autocatalítica de la protrombina se genera, en primer lugar trombina con actividad esterásica, denominada trombina E, poco después aparece la trombina C, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, y finalmente la autoprotrombina C, que como más tarde veremos es un poderoso procoagulante que juega un papel decisivo dentro del denominado sistema intrínseco en la literatura clásica<sup>107</sup>.

Todo el proceso anteriormente referido tiene su fundamento, como ya hemos vis-



## DERIVADOS DE LA PROTROMBINA

Al estudiar el proceso de la coautocatálisis de la protrombina, vamos primero a abordar el estudio de los factores procoagulantes, para en una etapa posterior dar una visión de conjunto, que permita comprender mejor el normal desarrollo de la reacción protrombina-trombina. De estos factores procoagulantes solamente nos ocuparemos del grupo catalogado como derivados protrombónicos, ya que ellos constituyen el núcleo de la teoría propuesta por Seegers y su escuela. Finalmente, de los factores primitivamente independientes de la protrombina nos referiremos al factor V, pues el mismo es sustancial para la total comprensión del proceso fisiológico hemocoagulativo.

DERIVADOS PROTROMBÓNICOS INTERMEDIOS. Las primeras experiencias que llevaron a la identificación de un derivado protrombónico tuvieron como base la observación experimental de que, bajo diversas circunstancias, la protrombina se puede transformar en un derivado, que por presentar propiedades químicas y biológicas características, tiene identidad propia y distinta de su molécula protrombónica de origen. Este derivado puede generarse por diferentes caminos, de los cuales el primeramente descrito tenía como fundamento la activación de la protrombina con trombina<sup>65</sup>, lo cual venía corroborado porque eliminando la trombina del medio de incubación, destruyéndola con anti-trombina III<sup>123</sup>, se dificultaba la activación protrombónica, lo que parecía



Figura 2.—Derivados de la Protrombina

Los derivados protrombónicos pueden clasificarse en dos grupos (fig. 2), uno formado por aquellos productos que aparecen en el medio de incubación antes de que la trombina sea generada, y cuya función consiste en catalizar o inhibir la formación de la propia trombina, denominados derivados intermedios, y otro constituidos por los productos finales de la reacción e integrado por la trombina y las autoprotrombinas III y C.

En primer lugar vamos a estudiar el primero de aquellos grupos formado por las autoprotrombinas I-II y II-A.

confirmar el papel ejercido por la trombina en la activación de su zimógeno. Aunque dicha activación no pudo ser demostrada por Ferguson<sup>25</sup> y sólo parcialmente por Owren<sup>76</sup>, es verdad que este tipo de fenómeno no constituye un caso aislado dentro de la enzimología, pues es sabido que la tripsina puede activar al tripsinógeno, transformándolo en un derivado inactivo<sup>36</sup>, proceso, como se ve, similar al que tiene lugar entre protrombina y trombina. También se puede obtener un derivado protrombónico desecando una solución acuosa de

protrombina altamente purificada y dejándola en congelación; al cabo de cuatro meses, se comprueba que aproximadamente el 50 % de la protrombina ha perdido sus características propias, y se ha transformado en un derivado protrombínico diferente<sup>61</sup>. Igualmente por incubación de la protrombina con citrato sódico al 25 %, como ya vimos al estudiar el proceso de autocatálisis, se consigue idéntica transformación, pudiéndose asimismo activar el proceso añadiendo al medio de incubación pequeñas cantidades de 3, 4, 4-triamino-difenil-sulfona como catalizador de la reacción<sup>93, 103</sup>. De la misma manera, conservando una solución acuosa de protrombina a  $-10^{\circ}$  C, sufre un proceso de activación perdiendo sus propiedades biológicas características, a la vez que, paralelamente se va generando en el medio de experimentación un derivado protrombínico fácilmente reconocible, como más abajo veremos, por sus propiedades bien diferentes a las de la molécula protrombínica de la que procede<sup>62</sup>.

Hemos visto por tanto que a partir de la

capacidad para acelerar la reacción protrombina-trombina<sup>62</sup>. Dicha actividad procoagulante va apareciendo durante la génesis del derivado protrombínico, paralelamente a la desaparición de la actividad protrombínica del medio de incubación<sup>62</sup> y desapareciendo a su vez también de una forma paralela a medida que se va generando la trombina<sup>102</sup>. Electroforéticamente presenta menor velocidad migratoria que la protrombina<sup>100</sup>, siendo ésta la única diferencia física encontrada con respecto a su molécula de origen.

El que este derivado protrombínico se genere directamente a partir de la protrombina, y que asimismo sea capaz de transformarse en trombina, tras su sola incubación con citrato sódico al 25 %, demuestra de forma fehaciente su origen protrombínico, así como el mismo origen para la trombina.

A la luz de los anteriores hechos se puede establecer un primer esquema [2] de la reacción protrombina-trombina, que, aunque ya descrito por Seegers y McCloughry en 1949<sup>100</sup>, prácticamente sigue, en su esencia, inmodificado<sup>54</sup>.

PROTROMBINA (sensible al  $Ca^{++}$ , AcG y tromboplastina)  $\longrightarrow$  DERIVADO I (insensible y procoagulante)  $\longrightarrow$  DERIVADO II (sensible y procoagulante)  $\longrightarrow$  TROMBINA Y OTROS PRODUCTOS.

[2]

protrombina, y por cuatro diferentes vías de activación, se puede generar un derivado protrombínico, que presenta como características biológicas propias el no ser afectado por los activadores normales de la protrombina (AcG, tromboplastina tisular y  $Ca^{++}$ <sup>103</sup>) y como consecuencia de esto no transformable en trombina<sup>100</sup>, aunque, en cambio, dicha transformación se lleva a cabo normalmente cuando el derivado protrombínico se incuba con citrato sódico al 25 %, y se deja en estas condiciones a temperatura ambiente<sup>61</sup>. Presenta asimismo una marcada actividad procoagulante que se manifiesta por su

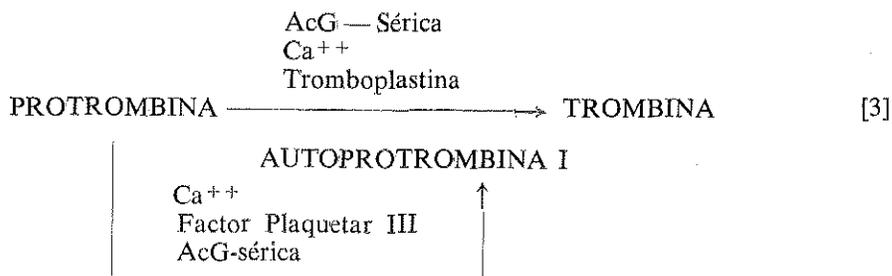
Este concepto de formación espontánea o autocatalítica del derivado protrombínico es ampliado más tarde cuando se demuestra una aceleración de su génesis tras la adición a la mezcla generatriz del factor plaquetar III y calcio iónico<sup>102</sup>, así como pequeñas cantidades de AcG. El producto obtenido presentaba muy parecidas propiedades físicas al conseguido tras la transformación espontánea o autocatalítica de la protrombina pero tenía propiedades biológicas diferentes, por lo que se le atribuyó una personalidad propia. Por otra parte, el que otros factores intervinieran en su génesis hizo pensar que el

derivado protrombínico no era únicamente una variante en las estructuras secundarias y terciarias de la molécula de protrombina, sino que realmente constituía un nuevo factor hemocoagulativo al que se denominó autoprotrrombina<sup>102</sup>.

De esta forma, a la vez que se aclara la génesis de la autoprotrrombina se aportan nuevas luces para la mejor comprensión de su posterior actuación biológica, comprobándose que, para que la misma desarrolle normalmente su actividad procoagulante, se necesita que en el medio de incubación existan tanto tromboplastina tisular como AcG sérica [3].

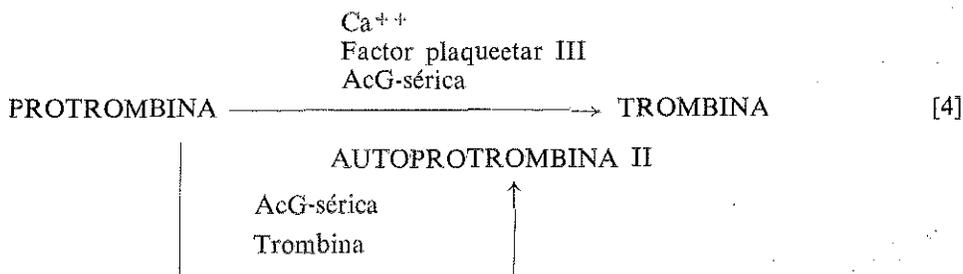
siendo la primera de ellas parcialmente soluble, expresión clara de su disociación molecular, e insoluble en cambio la segunda<sup>5</sup>. Sobre la base de esta desigual solubilidad, se pudo llegar a la identificación de dos derivados protrombínicos distintos que diferían tanto en su génesis como en su función<sup>97</sup>, y que fueron denominados autoprotrrombinas I y II.

La autoprotrrombina I necesita para su génesis de la presencia del factor plaquetar III y del calcio iónico en el medio de experimentación, siendo acelerado el proceso si se añaden pequeñas cantidades de AcG sérica<sup>102, 79</sup>, así como posteriormente debe actuar conjuntamente con



Se han descrito dos caminos de obtención de la autoprotrrombina, uno autocatalítico, por conservación o incubación de la protrombina con citrato sódico al 25 %, y otro en el que la reacción es activada con factor plaquetar III. Aunque en apariencia estas dos autoprotrrombinas parecían idénticas, tanto en su función como en su origen, tenían sin embargo, distinta solubilidad en ácido tricloroacético al 7 %.

la tromboplastina tisular para desarrollar su función procoagulante<sup>97, 102</sup> [3]. La autoprotrrombina II se genera incubando la protrombina con trombina<sup>33</sup> y para que desarrolle su función debe de actuar conjuntamente con el factor plaquetar III, acción que debe ser complementada añadiendo al medio de experimentación pequeñas cantidades de AcG sérica<sup>79</sup> [4].



Paralelamente a las experiencias que llevaron a la identificación de ambas autoprotrombinas, se había descrito un nuevo factor hemocoagulativo, que teniendo propiedades aceleradoras de la reacción protrombina-trombina, necesitaba para desarrollarlas actuar conjuntamente con los fosfolípidos plaquetares, razón por la que se denominó cofactor plaquetar II<sup>33</sup>. Posteriormente dicho factor fue identificado con la autoprotrombina II<sup>97</sup>.

En resumen, por tanto, se tiene que a partir de la protrombina se obtienen dos derivados distintos, las autoprotrombinas I y II. Ambas presentan propiedades comunes, como son el mismo origen, ser inertes a los activadores normales de la protrombina, tener actividad procoagulante y, finalmente, capacidad para ser transformados en trombina con sólo incubarlos en citrato sódico al 25 % y dejarlos a temperatura ambiente durante varios días, y cuyas diferencias estriban en los distintos activadores necesarios para su génesis y en los coactivadores, asimismo diferentes, indispensables para su posterior actuación.

**A. AUTOPROTROMBINA I.** Como anteriormente hemos visto la autoprotrombina I es un derivado protrombínico, que una vez generado presenta una marcada actividad procoagulante, favoreciendo la transformación de la protrombina en trombina. Dicho factor puede identificarse, como más abajo veremos, como el factor VII de la nomenclatura clásica<sup>126</sup>.

*Origen.* El que la autoprotrombina I se origine a partir de la protrombina parece probable<sup>102</sup>, siendo varios los procedimientos de génesis, y estando éstos condicionados a las distintas sustancias procoagulantes que intervienen en la reacción.

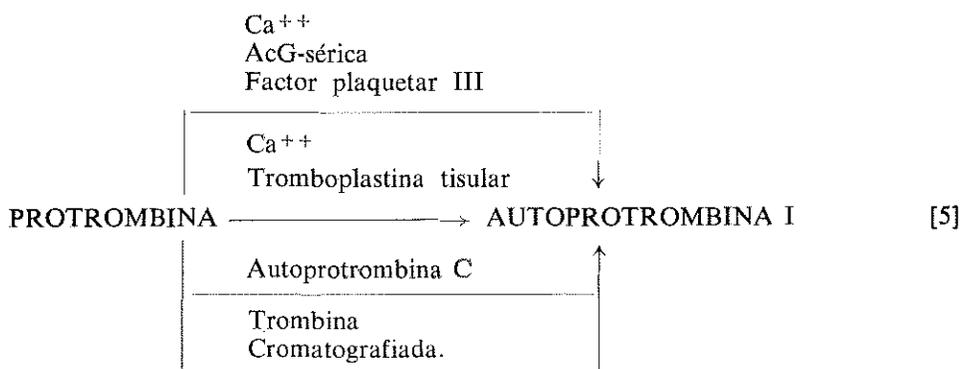
1. El camino de génesis habitual, es el ya referido de activación de la protrom-

bina, en presencia de calcio iónico, factor plaquetar III y AcG sérica, en el que éste último factor participa únicamente como acelerador del proceso.

2. Como se sabe, la actividad procoagulante del factor plaquetar III [5] depende de su contenido lipoproteico<sup>120, 74, 58</sup>, por lo que cabe esperar que otras lipoproteínas presentes en el medio sanguíneo puedan desempeñar el mismo papel que aquel factor plaquetar en la formación de la autoprotrombina I. Asimismo es conocida la composición lipoproteica de la tromboplastina tisular<sup>17, 19, 20</sup>, pudiendo por ello ésta suplir a las plaquetas en la génesis de la autoprotrombina I<sup>80</sup>. Para que la reacción se lleve a cabo no se necesita la presencia de AcG en el medio de incubación [5].

3. Como más abajo estudiaremos uno de los productos finales de la activación de la protrombina es la autoprotrombina C<sup>105</sup>. Dicha sustancia juega un papel acelerante en la reacción protrombina-trombina, activando la génesis de esta última. Pues bien, incubando en un medio experimental protrombina y autoprotrombina C se obtiene autoprotrombina I<sup>105</sup> [5].

4. Un último procedimiento de obtención, también experimental, consiste en activar con trombina una molécula de protrombina que previamente ha sido sometida a cromatografía con dietil-amino-celulosa o con IRC-50<sup>54</sup>. Cuando la protrombina es cromatografiada, sufre variaciones en su estructura química, cambiando con ello algunas de sus propiedades biológicas, y dando tras su activación con trombina productos distintos a los que genera habitualmente, ya que en circunstancias normales produce autoprotrombina II y tras la cromatografía el producto obtenido es la autoprotrombina I<sup>54</sup> [5].



Ahora bien, el origen protrombínico de la autoprotrombina I no es admitido por todos los autores, y, así, las teorías clásicas de coagulación sustentan la independencia de origen del factor VII con respecto a la protrombina. Los defensores del origen protrombínico de la autoprotrombina I propugnan la tesis de que la autoprotrombina presente en el plasma, que al parecer es un factor hemocoagulativo independiente de la protrombina, tanto en su origen como en su función, habría sido generada a partir de la protrombina circulante en el proceso continuo de coagulación y anticoagulación que normalmente se está desarrollando en nuestro organismo. Debido a la continuidad de dicho proceso hemocoagulativo es difícil fijar el momento en que

la autoprotrombina I es liberada, y si en realidad ésta tiene un origen protrombínico.

Pero, sin duda, las más interesantes experiencias en defensa del origen protrombínico de la autoprotrombina I son las realizadas por Aljkaersig y Seegers<sup>6</sup> basadas en una idea original de Lasch y Roka. Estos autores<sup>47, 48</sup> incubando mitocondrias hepáticas y factor VII en un medio bien oxigenado y a un pH de 7,9, demuestran la formación en el mismo de actividad protrombínica. Sustituyendo el factor VII por autoprotrombina I<sup>6</sup> se desarrolla el mismo tipo de actividad, la cual puede ser atribuida a la aparición de protrombina en el medio de incubación (figura 3).

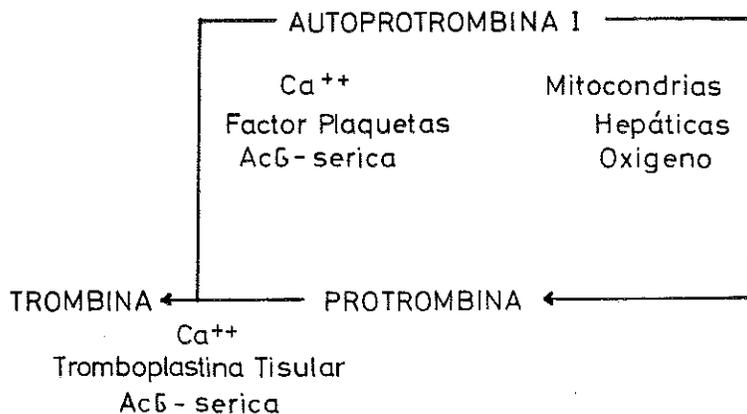


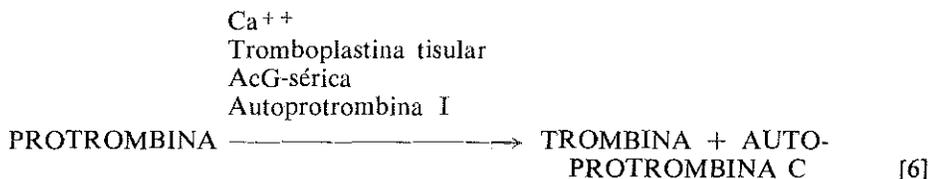
Figura 3.—Síntesis hepática de la Protrombina a partir de la Autoprotrombina I

El haber sido demostrado, por otra parte, que en el suero existe autoprotrombina I<sup>59</sup> viene a corroborar la teoría de la formación y utilización continua de la autoprotrombina, proceso que por otra parte sería el regulador de la cantidad que de la misma existe en sangre periférica<sup>6</sup>.

*Propiedades físico-químicas.* Teniendo como base la purificación parcial que de la autoprotrombina I se ha conseguido<sup>54</sup>, se han podido estudiar algunas de sus propiedades físico-químicas, lo que ha contribuido marcadamente al mejor conocimiento de este derivado protombínico. Su estructura química es proteica, teniendo valina, glicina o alanina como aminoácidos terminales, dependiendo ello del proceso de activación seguido para su obtención. Parece ser que tiene más grupos-COOH libres que la protrombina, ya que durante su génesis el pH del medio de incubación va disminuyendo progresivamente. Su constante de centrifugación en

amónico, que la que se obtiene activando la prorombina con autoprotrombina C<sup>105</sup>. Asimismo ésta última es más sensible al calor y a los estados de acidez y alcalinidad. Todo ello hace pensar que sus grupos activos, con función aceleradora, son los mismos en ambas autoprotrombinas I, siendo en cambio algo diferente el resto de la molécula, lo que por otra parte no es un hecho infrecuente en enzimología, en donde un enzima puede ser reducido a varios tamaños moleculares, conservando en todos ellos su propia función biológica, pero pudiendo modificar alguna de sus propiedades físico-químicas.

*Acción.* La autoprotrombina I es un factor procoagulante que acelera la transformación de la protrombina en trombina<sup>102, 104</sup>. Para desarrollar su actividad necesita actuar en presencia de tromboplastina tisular, Ca<sup>++</sup>, y AcG-sérica [6], siendo los productos finales de la reacción trombina y autoprotrombina C<sup>104</sup>



la ultracentrífuga es de 3.8 unidades Svedberg. Es bastante estable a la conservación, siendo la desecación y congelación a un pH de 8.0 las condiciones ideales para conseguirlo. Precipita con sulfato amónico al 70 %. La actividad procoagulante se desarrolla de forma idónea a un pH de 9.7, disminuyendo aquélla cuando el medio de experimentación se acidifica. Los iones calcio inhiben su acción biológica. Está contenida en el suero<sup>60</sup>. Finalmente un hecho curioso lo constituye su desigual solubilidad en sulfato amónico, ya que la autoprotrombina I obtenida con una mezcla generatriz formada por Ca<sup>++</sup>, AcG y factor plaquetar III es más soluble en solución de sulfato

Cuando los extractos tisulares y la AcG-sérica se encuentran poco concentrados, pueden ser sustituidos añadiendo mayor cantidad de autoprotrombina I, la cual potencia la reacción hasta que ésta se desarrolla según su habitual cinética.

*Relación entre autoprotrombina I y factor VII.* A partir de 1948 fueron descritas una serie de sustancias (factor estable<sup>75</sup>, SPAC<sup>3</sup> co-tromboplastina<sup>55</sup>, convertina<sup>77</sup> y factor VII<sup>31</sup>), con actividad acelerante en la génesis de la trombina. Todas ellas presentaban muy parecidas propiedades físico-químicas y biológicas, por lo que fueron agrupadas bajo la común denominación de factor VII<sup>126</sup>. El

factor VII presenta asimismo propiedades biológicas y físicas muy similares a las de la autoprotrombina I, por lo que se ha pensado que ambas denominaciones corresponden al mismo factor hemocoagulativo<sup>195, 101</sup>, ya que incluso esta última corrige «in vitro» el defecto de un plasma carente de factor VII<sup>128</sup>.

En relación con el factor VII existe la teoría de que se halla en el plasma en forma de un precursor inactivo, proconvertina, que durante el proceso de coagulación se transforma en un factor activo, convertina<sup>77</sup> que acelera la tromboplastinogénesis extrínseca [7].

Según la teoría que nos ocupa, la proconvertina puede ser eliminada de la numerosa lista de los factores de la coagulación, ya que sin duda ésta última es equiparable a la protrombina que, como se sabe, puede activarse generando autoprotrombina I<sup>104</sup> [8].

na, por lo que se le denominó cofactor plaquetar II<sup>33</sup>.

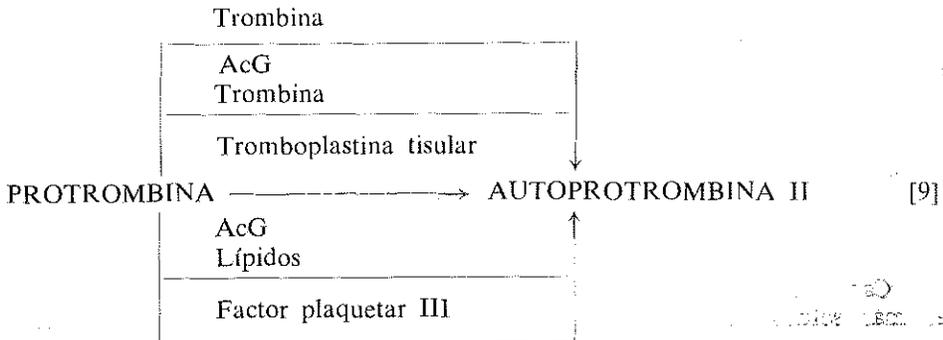
Junto a esta característica de co-factor de las plaquetas, tiene otra peculiaridad y es su origen protrombínico: de aquí que pueda ser encuadrado en el grupo de las autoprotrombinas, y que cronológicamente le corresponda ser la autoprotrombina II, estando por tanto en su origen y en su función basada la dualidad nominal de este factor plasmático, que por otra parte corresponde asimismo al factor IX de la nomenclatura clásica.

*Origen.* 1. Al igual que ocurre con la autoprotrombina I, la autoprotrombina II puede generarse por diferentes caminos. El principal de ellos tiene como fundamento la activación directa de la protrombina con trombina a un pH de 8.2<sup>119</sup>, dándose las condiciones ideales para esta activación cuando 2.000 unidades de pro-



B. AUTOPROTROMBINA II. Uno de los derivados protrombínicos que nos ocupan, para desarrollar su actividad procoagulante, necesita actuar en presencia de plaquetas, por lo que se supuso que funcionaría únicamente potenciando la acción plaquetar, y que no tendría una misión propia en la activación de la protrombi-

trombina se activan con 40 unidades de trombina<sup>51</sup>. La reacción se acelera añadiendo pequeñas cantidades de AcG-sérica al medio de experimentación<sup>102, 97</sup>, no necesitando calcio para desarrollarse normalmente<sup>119</sup>, pudiendo por otra parte pequeñas cantidades de este ion inhibir el proceso<sup>79, 80</sup> [9].



2. Ya hemos referido anteriormente que determinadas sustancias lipoproteicas de nuestro organismo pueden ejercer en la reacción protrombina-trombina un efecto acelerador manifiesto. De ellas son fundamentalmente tres las que tienen interés biológico. Dos contenidas en pulmones y cerebro, y denominadas tromboplastinas, y la tercera —el factor plaquetar III— presenta en el estroma de los trombocitos. Incubando protrombina purificada con tromboplastina tisular, en presencia de iones calcio, se genera autoprotrombina I; pero si el calcio iónico se suprime de la reacción, se obtiene autoprotrombina II<sup>80, 119</sup> [9].

Al igual que con la tromboplastina tisular, la reacción se desarrolla normalmente sustituyendo ésta por el factor plaquetar III [9].

3. Asimismo se genera autoprotrombina II cuando actúa únicamente el componente lipoideo de la lipoproteina, aunque en este caso hay que sustituir o mejor compensar el efecto acelerante de la parte proteica, adicionando al medio pequeñas cantidades de AcG<sup>80</sup>. Al igual que ocurre en la activación trombínica, el calcio iónico, añadido al medio de experimentación, detiene el proceso<sup>80</sup> [9].

Parece pues como si el ion calcio ejerciera una función directriz en la reacción, orientándola en el sentido conveniente y generando de esta forma autoprotrombina I o II, según las necesidades del momento:

Lo anteriormente expuesto induce a pensar que la autoprotrombina II tiene un origen protrombínico, ya que se genera incubando protrombina y trombina muy purificadas en un medio de experimentación aislado, lo cual también se corrobora observando el equilibrio existente entre ambos factores en el medio de experimentación, ya que cuando la actividad protrombínica decrece, aumenta paralelamente la actividad biológica de la autoprotrombina II<sup>54</sup>, así como también por su composición química, ya que todos los aminoácidos de la trombina están contenidos en la autoprotrombina II, y todos los de ésta última se hallan presentes en la molécula protrombínica<sup>95</sup>.

El origen protrombínico de la autoprotrombina II no excluye, por otra parte, el camino inverso en la reacción protrombina-autoprotrombina II, es decir, que la génesis hepática de la protrombina, pueda tener su base en la propia autoprotrombina II, utilizándose así este metabolito protrombínico como material

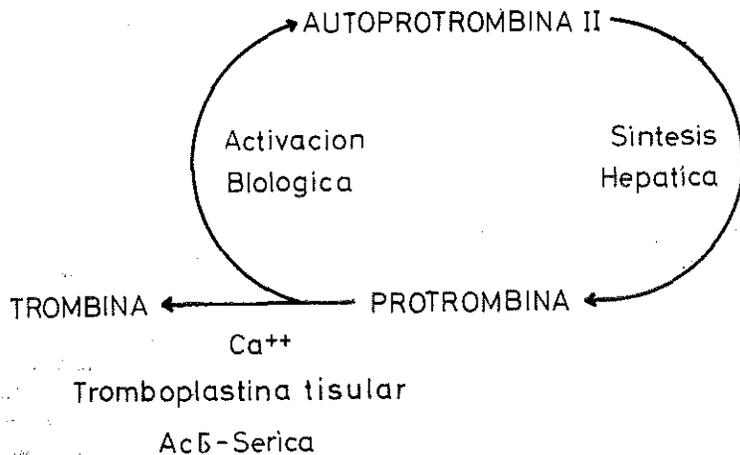


Figura 4.—Síntesis hepática de la Protrombina a partir de la Autoprotrombina II.

básico para la síntesis hepática de la protrombina<sup>95</sup> (fig. 4), al igual que ocurría con la autoprotrombina I.

*Propiedades físico-químicas.* La autoprotrombina II es una glicoproteína que contiene, aproximadamente, un 19 % de hidratos de carbono<sup>29</sup>. Su estructura pro-

trombina II necesita actuar conjuntamente con calcio iónico, factor plaquetar III y AcG. En tales condiciones genera trombina. Recientemente se ha comprobado que, junto a la trombina, aparece también un resto proteico distinto de la autoprotrombina C, al que se ha denominado autoprotrombina III<sup>105, 109, 110</sup> [10].

Ca<sup>++</sup>  
AcG  
Factor plaquetar III  
Autoprotrombina II

PROTROMBINA ————— → TROMBINA + AUTO-  
PROTROMBINA III [10]

teica está integrada por 18 diferentes aminoácidos<sup>95</sup> siendo su aminoácido N-terminal más frecuente la prolina<sup>54</sup>, aunque también pueden serlo la glicina y el ac. aspártico, siendo en cambio el aminoácido C-terminal la tirosina<sup>95</sup>. Su peso molecular calculado por medios físicos es aproximadamente de 49.400<sup>95</sup> o 49.900<sup>29</sup> y por medios químicos, análisis de aminoácidos, de 57.000<sup>29</sup>. Su tamaño molecular oscila alrededor de los 35 Å de diámetro y 93 Å de longitud, presentando por tanto una forma oblonga. Precipita con sulfato amónico al 50 %<sup>54, 119</sup>. Su constante de sedimentación a la ultracentrífuga es de 4.33 u.u. Svedberg<sup>29</sup>. Su coeficiente de difusión es de 7.45 por 10<sup>-7</sup> cms.<sup>2</sup> por segundo<sup>29</sup>.

Tiene un volumen específico parcial de 0,708 ml por gr<sup>29</sup> y una viscosidad de 0,042 ml por gr<sup>29</sup>. Se encuentra presente en el suero después de la coagulación<sup>33</sup>. Su actividad biológica se conserva en congelación, aproximadamente durante cuatro meses. Puede ser eliminado del plasma adsorbiendo éste con bentonita<sup>119</sup>; así como destruir su actividad biológica agitándolo con éter<sup>119</sup>.

*Acción.* Como la autoprotrombina I tiene una marcada actividad precoagulante. Para ejercer su acción, la autopro-

*Relación entre autoprotrombina II y factor IX.* En 1952 fue descrito un nuevo trastorno de la coagulación<sup>1</sup> que se debía a la falta de un factor plasmático, y que clínicamente cursaba con un cuadro de hemofilia clásica. Poco más tarde Biggs y col.<sup>9</sup> describían la enfermedad de Christmas, como otro síndrome hemofílico con características clínicas muy similares al anterior y que posteriormente fue identificado con aquél, habiéndose podido demostrar que ambos trastornos son producidos por la falta de un factor plasmático, el factor IX.

Por sus propiedades físicoquímicas, así como por el cuadro clínico que ocasiona su ausencia, dicho factor puede ser identificado con la autoprotrombina II, lo que asimismo se apoya en el hecho experimental de que ésta corrige el defecto hemocoagulativo de un plasma hemofílico B.

En la teoría clásica de la coagulación, el factor IX se genera a partir de un precursor inerte hasta convertirse en un enzima activo [11], siguiendo la atrayente teoría de la «cascada enzimática» (figura 5) propuesta por MacFarlane y apoyada por otros autores<sup>21, 52</sup>. Para Seegers y col., el precursor inactivo del factor IX es la propia protrombina, realizándose el proceso de activación de forma parecida

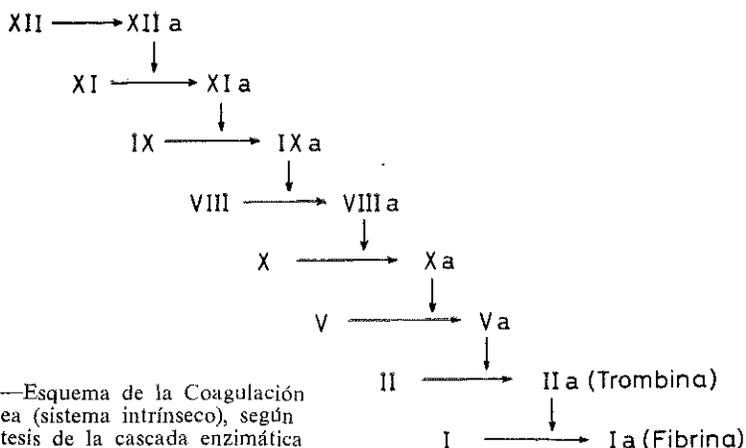


Figura 5.—Esquema de la Coagulación sanguínea (sistema intrínseco), según la hipótesis de la cascada enzimática propuesta por MacFarlane

a como se vio para el factor VII [12], pudiéndose por tanto eliminar el factor IX inactivo de la ya numerosa lista de factores de coagulación,

purificado, por medio de precipitación salina, usando sulfato amónico al 50 %, antes de que aparezca la actividad pre-coagulante, se obtiene un precipitado con



C. AUTOPROTROMBINA II-A. Junto a los derivados protrombónicos con actividad procoagulante, se forma otro cuya característica principal es la de inhibir la actividad biológica de la protrombina<sup>119</sup>. A esta autoprotrombina con poder anticoagulante se la ha denominado autoprotrombina II-A<sup>51</sup>, y es diferente del inhibidor encontrado por Seegers y Landaburu<sup>98</sup> en el plasma y en el suero, que actúa neutralizando la transformación de la protrombina en trombina, cuando aquella se diluye en citrato sódico al 25 %, ya que la autoprotrombina II-A no se encuentra en el suero, seguramente porque se ha neutralizado durante la coagulación al reaccionar con el cofactor plaquetar I<sup>119</sup>.

*Origen.* Cuando se activa la protrombina con trombina se genera autoprotrombina II<sup>51</sup>. Ahora bien, si en una etapa posterior el producto resultante quiere ser

manifiestas propiedades inhibitoras de la reacción protrombina-trombina<sup>51</sup>. Dicha actividad inhibitora abarca no sólo a la reacción protrombina-trombina en su forma más general, sino también a la autoprotrombina II en particular, cuando ambas sustancias se incuban juntas y la reacción se activa con los pre-coagulantes adecuados<sup>51</sup>.

2. Asimismo se obtiene autoprotrombina II-A cuando se ponen los medios adecuados para la génesis de la autoprotrombina II, pero usando protrombina humana como sustrato de la reacción; en estas circunstancias antes de que aparezca la actividad procoagulante en el medio de incubación, puede ser detectada una objetiva actividad anticoagulante, correspondiente a la aparición en el mismo de la autoprotrombina II-A<sup>119</sup>.

3. Igualmente cuando una solución acuosa de autoprotrombina II se lleva a

un pH de 5,4 se obtiene un precipitado proteico. En el mismo existen dos fracciones diferentes, una que tiene arginina<sup>119</sup> como aminoácido N-terminal y en la que el C-terminal es tirosina, fracción que por otra parte presenta propiedades aceleradoras de la reacción protrombina-trombina, y por otra que tiene como aminoácido N-terminal la prolina siendo el C-terminal distinto al de la autoprotrombina II, pero todavía no bien indentificado. Dicha fracción presenta propiedades inhibitoras en la activación de la protrombina<sup>119</sup>. De lo que puede deducirse que a partir de la primitiva molécula de autoprotrombina II, tras su precipitación selectiva, se obtienen dos fracciones con actividad biológica diferente, una precoagulante, la autoprotrombina II, y otra anticoagulante, la autoprotrombina II-A (fig. 6).

*Propiedades fisicoquímicas.* Como anteriormente ya se ha referido, la autoprotrombina II-A es una proteína que tiene prolina como aminoácido N-terminal<sup>54, 95</sup>, estando todavía el C-terminal sin identificar<sup>95</sup>. Usando Amberlite IRC<sup>50</sup> bajo las debidas condiciones de experimentación, la autoprotrombina II-A se adsorbe fácilmente<sup>95</sup>, lo cual se ha utilizado para su aislamiento y purificación. Es bastante estable al calor<sup>95</sup>, y tiene un punto isoeléctrico de 5,6<sup>95</sup>.

*Acción.* Como veremos más abajo, la acción del cofactor plaquetar I dentro del sistema intrínseco parece se ejerce porque adsorbe sobre su superficie a un inhibidor plasmático que se halla en circulación. Dicho inhibidor se ha identificado como la autoprotrombina II-A, siendo su receptor y neutralizante por tanto el co-

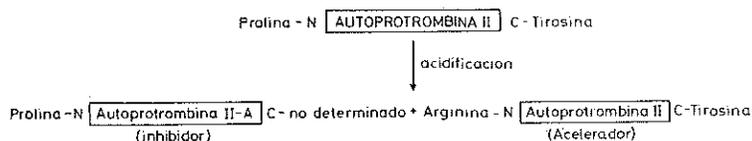


Figura 6.—Formación de la Autoprotrombina II — A partir en la Autoptrombina II

4. Asimismo cuando autoprotrombina II de origen bovino se conserva desecada y congelada, se genera cierta actividad anticoagulante a la vez que disminuye la actividad precoagulante que en principio existía. Dicha actividad anticoagulante se debe a la aparición en el medio de experimentación de autoprotrombina II-A<sup>95</sup>. Usando plasma humano, en el mismo tipo de experiencia, no se genera autoprotrombina II-A, lo que hace pensar que existen diferencias de especie todavía no bien determinadas<sup>95</sup>.

factor plaquetar I<sup>95</sup>. De esta reacción de neutralización depende el que dicho factor desaparezca tras la coagulación y que por tanto no está contenido en el suero<sup>119</sup>. Un exceso de este anticoagulante circulante o un defecto de su inhibidor, provocaría un desequilibrio hacia la hipocoagulabilidad sanguínea, dando un síndrome hemorrágico equiparable a la hemofilia A clásica\*.

\* En el próximo número de esta Revista aparecerá la II parte de este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

AGGELER, P. M., S. G. WHITE, M. B. GLENDENING, E. W. PAGE, T. B. LEAKE

y G. BATES. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 79: 692, 1952.

2. ALEXANDER, B. *New England J. Med.* 260: 1218, 1959.
3. ALEXANDER, B., R. GLODSTEIN y G. LANWEHR. *J. Clin. Invest.* 29: 881, 1950.
4. ALEXANDER, B., L. PECHET y A. KLIMAN. *Circulation.* 26: 596, 1962.
5. ALJAERSIG, N., T. ABE, S. A. JHONSON y W. H. SEEGER. *Am. J. Physiol.* 182: 443, 1955.
6. ALJAERSIG, N. y W. H. SEEGER. *Am. J. Physiol.* 183: 111, 1955.
7. ANDERSON, G. F. y M. I. BARNHART. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 116: 1, 1964.
8. BARNHART, M. I. *Am. J. Physiol.* 199: 360, 1960.
9. BIGGS, R., A. S. DOUGLAS, R. G. MACFARLANE, J. V. DACIE, W. R. PITNEY y J. R. O'BRIEN. *Brit. Med. J.* 2: 1378, 1952.
10. BIGGS, R. y R. G. MACFARLANE. *Human Blood Coagulation.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1962.
11. BORET, J. y L. DELANGE. *Ann. Soc. Sci. Med. Nat. Brux.* 72: 87, 1914.
12. CALDWELL, M., K. VON KAULLA y W. H. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 9: 12, 1963.
13. CARTER, J. R. y E. D. WARNER. *Am. J. Physiol.* 173: 109, 1953.
14. CARTER, J. R. y E. D. WARNER. *Am. J. Physiol.* 179: 549, 1954.
15. CARTER, J. R. *Science.* 120: 895, 1954.
16. CEKADA, E. B. *Am. J. Physiol.* 78: 512, 1926.
17. CHARGAFF, E., A. BENDICH y S. S. COHEN. *J. Biol. Chem.* 156: 161, 1944.
18. CHO, H. H. y W. H. SEEGER. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 97: 642, 1958.
19. COHEN, S. S. y E. CHARGAFF. *J. Biol. Chem.* 139: 741, 1941.
20. COHEN, S. S. y E. CHARGAFF. *J. Biol. Chem.* 140: 689, 1941.
21. DAVIE, E. W. y O. D. RATNOFF. *Science.* 145: 1310, 1964.
22. EAGLE, H. *Medicine.* 16: 95, 1937.
23. FANTL, P. y M. H. NANCE. *Nature (Lond.)*, 158: 708, 1946.
24. FANTL, P. y M. H. NANCE. *Med. J. Australian.* 1: 128, 1948.
25. FERGUSON, J. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, 51: 373, 1942.
26. FUCHS, H. J. *Z. Immun. Forch.* 62: 107, 1929.
27. GOLDSTEIN, R., A. LEBOLLOCH, B. ALEXANDER y E. ZONDERMAN. *J. Biol. Chem.* 234: 2857, 1959.
28. GOLDSTEIN, R. *Proc. Xth. Congress Inter. Hemat.* Estocolmo, 1964.
29. HARMISON, Ch. R. y W. H. SEEGER. *J. Biol. Chem.* 237: 3074, 1962.
30. HEMKER, H. C. *Nature (Lon.)*, 200: 589, 1963.
31. HILL, R. B., S. GAETANI y B. JHONSON. *Fed. Proc.* 22: 620, 1963.
32. HOWELL, W. H. *Am. J. Physiol.* 35: 474, 1914.
33. JONHSON, S. A., J. RUTZKY, C. L. SCHNEIDER y W. H. SEEGER. *Proc. Inter. Soc. Hemat. 4th Congress.* 1952.
34. KOLLER, F., A. LOELIGER y F. DUCKERT. *Acta Haemat.* 6: 1, 1951.
35. KOPPEL, J. L., D. MUELLER y J. H. OLWIN. *Am. J. Physiol.* 187: 113, 1956.
36. KUNITZ, M. *J. Gen. Physiol.* 22: 293, 1939.
37. LAKI, K., D. R. KOMIZ, P. SYMONDS, L. LORAND y W. H. SEEGER. *Arch. Biochem. Biophys.* 49: 276, 1954.
38. LAMY, F. y D. F. WAUGH. *J. Biol. Chem.* 203: 489, 1953.
39. LAMY, F. y D. F. WAUGH. *Thromb. Diath. Haem.* 2: 12, 1958.
40. LANCHANTIN, G. F. *Am. J. Physiol.* 194: 7, 1958.
41. LANCHANTIN, G. F. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 114: 584, 1963.
42. LANCHANTIN, G. F. *Vox Sanguinis.* 9: 228, 1964.
43. LANCHANTIN, G. F., J. FRIEDMAN, J. DE GROOT y J. MEHL. *J. Biol. Chem.* 238: 238, 1963.
44. LANCHANTIN, G. F., J. FRIEDMAN y J. MEHL. *Fed. Proc.* 21: 62, 1962.
45. LANDABURU, R. H. y W. H. SEEGER. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 94: 708, 1957.
46. LANDABURU, R. H. y W. H. SEEGER. *Am. J. Physiol.* 193: 169, 1958.
47. LASCH, H. G. y L. ROKA. *Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem.* 294: 30, 1953.
48. LASCH, H. G. y L. ROKA. *Klin. Wochenschr.* 32: 460, 1954.
49. LEWIS, M. L. y A. G. WARE. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 84: 636, 1953.
50. LOOMIS, E. C. y W. H. SEEGER. *Arch. Biochem.* 5: 265, 1944.
51. LORAND, L., N. ALKJAERSIG y W. H. SEEGER. 1953.
52. MACFARLANE, R. G. *Nature.* 202: 498, 1964.
53. MAGNUSSON, S. *Acta Chem. Scandinav.* 12: 355, 1958.
54. MAMMEN, E. F., W. R. THOMAS y W. H. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 5: 218, 1960.
55. MANN, F. D. *Amer. J. Clin. Pathol.* 19: 861, 1949.
56. MARCINIAK, E., E. COLE y W. H. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 8: 425, 1962.
57. MARCINIAK, E. y W. H. SEEGER. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 40: 597, 1962.
58. MAUPIN, B. *Hemostase.* 1: 29, 1961.

59. McCLAUGHRY, R. I. *Mich. State Med.* 54: 480, 1955.
60. McCLAUGHRY, R. I. *Amer. J. Physiol.* 186: 335, 1956.
61. McCLAUGHRY, R. I., E. B. ANDREWS y W. H. SEEGER. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 75: 252, 1950.
62. McCLAUGHRY, R. I. y W. H. SEEGER. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 80: 372, 1952.
63. MELLANBY, J. *J. Physiol.* 38: 28, 1909.
64. MELLANBY, J. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 113: 93, 1930.
65. MERTZ, E. T., W. H. SEEGER y H. P. SMITH. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 41: 657, 1939.
66. MILLER, K. D. *J. Biol. Chem.* 231: 987, 1958.
67. MILLER, K. D. y J. MCGARRAHAN. *Abstr. 135th Ann. Meet. Amer. Chem. Soc.* 1959.
68. MILLER, K. D. y W. H. SEEGER. *Arch. Biochem. Biophys.* 60: 398, 1956.
69. MILLER, K. D. y VAN VANUKIS. *Abstr. núm. 198. División Biochem. Chem. Amer. Chem. Soc.* Washington. 1957.
70. MILSTONE, J. H. *J. Gen. Physiol.* 31: 301, 1948.
71. MORAWITZ, P. *The Chemistry of Blood Coagulation*. C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1958. Original muestra publicado como *Die Chemie der Blutgerinnung*, en *Ergebnisse der Physiologie*. 4: 307, 1905.
72. NIEWIAROWSKI, S. y Z. LATALLO. *Bull. Acad. Pol. Sc.* 5: 219, 1957.
73. NOLF, P. *Arch. Inter. Phar. Thera.* 70: 5, 1945.
74. O'BRIEN, J. R. *J. Clin. Path.* 9: 47, 1956.
75. OWEN, C. A. y J. L. BOLLMAN. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 67: 231, 1948.
76. OWREN, P. A. *Acta Med. Scand. Suppl.* 194, 1947.
77. OWREN, P. A. *Rev. Hemat.* 7: 147, 1952.
78. PENNER, J. A. *Thromb. Diath. Haem.* 10: 332, 1964.
79. PENNER, J. A. y W. H. SEEGER. *Amer. J. Physiol.* 186: 343, 1956.
80. PENNER, J. A., F. DUCKERT, S. A. JOHNSON y W. H. SEEGER. *Canad. J. Biochem. & Physiol.* 34: 1199, 1956.
81. PURCELL, G. M. *Biochem. Biophys. Acta.* 78: 800, 1963.
82. QUICK, A. J. *Amer. J. Physiol.* 140: 212, 1943.
83. QUICK, A. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 62: 249, 1946.
84. QUICK, A. J. *Amer. J. Physiol.* 151: 63, 1947.
85. QUICK, A. J. y M. STEFANNINI. *J. Lab. Clin. Med.* 34: 973, 1949.
86. QUICK, A. J. y M. STEFANNINI. *J. Lab. Clin. Med.* 34: 1203, 1949.
87. RIDDLE, J. M., M. BERSTEIN y W. H. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 9: 12, 1963.
88. RONWIN, E. *Canad. J. Biochem. & Physiol.* 35: 743, 1957.
89. RAY, G. y S. C. ROY. *Enzymologica.* 26: 187, 1963.
90. SCHWICK, G. y H. E. SCHULTZE. *Clin. Chim. Acta.* 4: 26, 1959.
91. SCHWICK, G. y H. E. SCHULTZE. *Proced. 6th Colloquim Prot. Biol. Fluids.* Princeton, 1959.
92. SEEGER, W. H. *J. Biol. Chem.* 136, 103, 1940.
93. SEEGER, W. H. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 72: 677, 1949.
94. SEEGER, W. H. *Rec. Chem. Progress.* 13: 143, 1952.
95. SEEGER, W. H. *Prothrombin*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts-1962.
96. SEEGER, W. H. y N. ALKJAERSIG. *Am. J. Physiol.* 172: 731, 1953.
97. SEEGER, W. H. y S. A. JOHNSON. *Amer. J. Physiol.* 184: 259, 1956.
98. SEEGER, W. H. y R. H. LANDABURU. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 95: 710, 1957.
99. SEEGER, W. H. y R. H. LANDABURU. *Canad. J. Biochem.* 38: 1405, 1960.
100. SEEGER, W. H. y R. I. McCLAUGHRY. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 72: 247, 1949.
101. SEEGER, W. H. y H. P. SMITH. *J. Biol. Chem.* 140: 677, 1941.
102. SEEGER, W. H., N. ALKJAERSIG y S. A. JOHNSON. *Amer. J. Physiol.* 181: 589, 1955.
103. SEEGER, W. H., E. B. ANDREWS y R. I. McCLAUGHRY. *Amer. J. Physiol.* 164: 722, 1951.
104. SEEGER, W. H., E. R. COLE y N. AOKI. *Canad. J. Biochem.* 41: 2441, 1963.
105. SEEGER, W. H., E. R. COLE y E. MARCINIAK. *Thromb. Diath. Haem.* 7: 239, 1962.
106. SEEGER, W. H., E. C. LEMOIS y J. M. VANDENBELT. *Arch. Biochem.* 6: 85, 1945.
107. SEEGER, W. H., E. MARCINIAK y E. R. COLE. *Amer. J. Physiol.* 203: 397, 1962.
108. SEEGER, W. H., R. I. McCLAUGHRY y J. L. FAHEY. *Blood.* 5: 421, 1950.
109. SEEGER, W. H., E. R. COLE, N. AOKI y CH. R. HARMISON. *Canad. J. Biochem.* 42: 229, 1964.
110. SEEGER, W. H., E. COLE, CH. R. HARMISON y MARCINIAK. *Canad. J. Biochem & Physiol.* 41: 1047, 1963.
111. SEEGER, W. H., H. P. SMITH, E. D. WARNER y K. M. BRINKHOUS. *J. Biol. Chem.* 123: 751, 1938.

112. SEEGER, W. H., W. R. THOMAS, R. H. LANDABURU y E. F. MAMMEN. *Rec. Chem. Progres.* 21: 1, 1960.
113. SURGENOR, D. M., B. ALEXANDER, R. GOLDSTEIN y K. SCHIMD. *J. Physiol. Colloid. Chem.* 55: 1446, 1951.
114. SOULIER, J. P., O. PROU-WARTELLE y F. JOSSO. *Proc. 9th. Congr. int. Soc. Blood. Transf.*, México, 1962, pp. 156 (1964).
115. STREULLI, F. *Thromb. Diath. Haem.* 3: 194, 1959.
116. THOMAS, W. R. y W. H. SEEGER. *Biochim. Biophys. Acta.* 42: 556, 1960.
117. TISHKOFF, G. H. *Thromb. Diath. Haem.* 10: 390, 1964.
118. TISHKOFF, G. H., L. PECHET y B. ALEXANDER. *Blood.* 15: 778, 1960.
119. ULUTIN, O. N., J. F. JOHNSON y W. H. SEEGER. *Am. J. Physiol.* 201: 660, 1961.
120. VAN CREVELD, S. y M. M. PAULSEN. *Lancet.* 1: 23, 1952.
121. WARE, A. G. y G. F. LANCHANTIN. *Physiol. Rev.* 34: 714, 1954.
122. WARE, A. G. y W. H. SEEGER. *J. Biol. Chem.* 174: 565, 1948.
123. WARE, A. G., M. M. GUEST y W. H. SEEGER. *Am. J. Physiol.* 150: 58, 1947.
124. WARE, A. G., GUEST, M. M. y W. H. SEEGER. *J. Biol. Chem.* 169: 231, 1947.
125. WARE, A. G., M. M. GUEST y W. H. SEEGER. *Science.* 106: 41, 1947.
126. WRIGHT, I. S. *Canad. Med. Assoc. J.* 86: 373, 1962.