

REVISIONES

Función de la protombina y derivados protombínicos en la coagulación sanguínea. II

J. Aznar *

En la primera parte de este trabajo³ se han estudiado tanto la protombina y sus posibles vías de activación, como los productos intermedios que de la misma resultan. En esta segunda nos vamos a referir, en primer lugar, a los productos finales de la activación protombínica (autoprotombinas C y III y trombina), para posteriormente dar una visión de conjunto de la activación biológica de la protombina, así como una posible teoría que explique la patogenia de algunas diátesis hemorrágicas ubicadas en esta fase de la coagulación sanguínea, a la luz de la teoría hemocoagulativa que nos ocupa.

AUTOPROTOMBINA C. Se denomina autoprotombina C a uno de los productos finales de la activación protombínica [1].

identidad propia y con un papel definido dentro de la reacción protombina-trombina, se ha llevado a cabo recientemente. Fueron primeramente Kowarzik y Marciniak³⁷⁻³⁸⁻³⁹⁻⁵¹ quienes observaron cómo determinadas preparaciones de trombina eran capaces de corregir el consumo de protombina de un plasma hemofílico. Como dicha acción no era constante, pues otras preparaciones obtenidas de una forma similar se mostraban totalmente inefectivas, creyeron que tal corrección no era realizada por la trombina, sino por otra sustancia que impurificaba la preparación. A esta sustancia, por corregir el consumo de protombina, la llamaron autoprotombina C, en recuerdo de la palabra "consumo".

Más tarde Seegers y col. obtenían en su

Protombina → Derivados intermedios → Autoprotombina C [1]
+ Otros derivados

El aislamiento e identificación de la autoprotombina C, como una sustancia con

* Universidad de Navarra. Departamento de Bioquímica.

laboratorio preparaciones de trombina que no mostraban un efecto uniforme en la activación de la protombina⁹²⁻⁹². Una de ellas, conseguida tras la activación de

la protrombina con citrato sódico al 25 % [2], o con Ca^{++} , Ac-Globulina y extractos tisulares [3], presentaba una clara actividad procoagulante, mientras otra generada al sustituir los extractos tisulares por lípidos y cofactor plaquetar I [4], únicamente era activa sobre la reacción fibrinógeno-fibrina.

Protrombina $\xrightarrow{\text{citrato sódico al 25 \%}}$ Trombina (procoagulante) [2]

Protrombina $\xrightarrow{\begin{array}{c} Ca^{++} \\ Ac-Globulina \\ extractos tisulares \end{array}}$ Trombina (procoagulante) [3]

ra actividad procoagulante, mientras otra generada al sustituir los extractos tisulares por lípidos y cofactor plaquetar I [4], únicamente era activa sobre la reacción fibrinógeno-fibrina.

te de la protrombina⁹², pero con un origen probablemente protrombínico⁸⁸.

Origen. Hemos visto con anterioridad, que la autoprotrombina C es uno de los

Protrombina $\xrightarrow{\begin{array}{c} Ca^{++} \\ Ac-Globulina \\ \text{factor plaquetar 3} \\ \text{cofactor plaquetar I} \end{array}}$ Trombina (no procoagulante) [4]

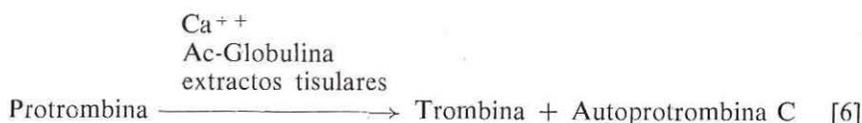
Independientemente de las anteriores experiencias, Milstone⁶¹ aisló, como producto final de la reacción protrombina-trombina, una sustancia distinta de la trombina, que tenía marcada actividad prococoagulante, y a la que denominó tromboquinasa, aunque sin atribuir a la misma un origen protrombínico.

Se ve, por tanto, cómo de forma paralela e independiente, se describen una serie de hechos experimentales, que al parecer abogan por la existencia, como producto final de la activación protrombínica, de una sustancia distinta de la trombina y cuya principal característica es poseer una fuerte actividad procoagulante.

Un año más tarde Marciniak y Seegers⁵⁶ aíslan esta sustancia y estudian algunas de sus propiedades, siendo dicho estudio completado en sucesivas publicaciones de

productos finales de la reacción protrombina-trombina⁵⁶⁻⁸²⁻⁸⁷, y que siendo un derivado protrombínico⁸⁸, su génesis está condicionada al tipo de activador o activadores utilizados en la reacción. De estos activadores, los extractos tisulares son los que juegan el principal papel⁹⁰⁻⁹², aunque también se puede obtener autoprotrombina C en ausencia de los mismos, incubando protrombina con citrato sódico⁴⁷⁻⁵⁶⁻⁸⁷⁻⁹⁰⁻⁹²⁻⁹⁹ [5] o con sulfato amónico²⁸. Por esta vía se obtiene gran cantidad de autoprotrombina C, en relación con la trombina generada, ya que ambos enzimas se encuentran aproximadamente en la proporción de 20 a 1⁸⁷⁻¹⁰⁰. La acción de los extractos tisulares, en cuanto a la génesis de la autoprotrombina C se refiere, se potencia añadiendo al medio de experimentación iones Ca y Ac-Globuli-

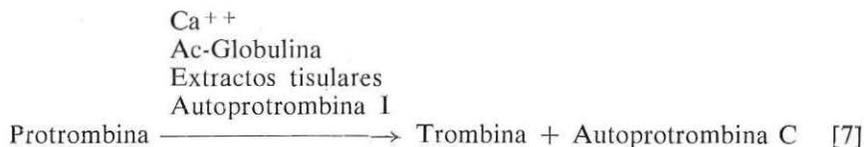
Protrombina $\xrightarrow{\text{citrato sódico al 25 \%}}$ Trombina + Autoprotrombina C [5]



na [6], o también pequeñas cantidades de autoprotrombina I⁹² [7]. Aunque los productos finales son idénticos, la cinética de estas tres reacciones es diferente, ya que en la primera el tiempo necesario para la total transformación de la protrombina en trombina es de 16 horas⁸⁷⁻¹⁰⁰, siendo de 30 minutos en las otras dos⁹². En cambio, la cantidad de autoprotrombina generada es menor en las dos últimas reacciones⁹⁰ [6] y [7].

generar autoprotrombina C, y por tanto de autocatalizar el proceso de coagulación⁵³, por un mecanismo parecido al descrito con anterioridad.

Propiedades físico-químicas. La principal dificultad en la purificación de la autoprotrombina C estriba en obtenerla libre de trombina¹⁵, ya que incluso determinadas preparaciones comerciales de este último enzima se encuentran impurifi-



Por tanto, y en resumen, la génesis biológica de la autoprotrombina C está ligada a la presencia de los extractos tisulares en la mezcla de activación, siendo el principio activo de los mismos una lipoproteína, ya que cuando los lípidos son eliminados por extracción con alcohol éter, la cantidad de autoprotrombina C formada decrece sensiblemente⁹⁰.

Como anteriormente ha sido descrito³, existen algunos enzimas proteolíticos capaces de activar la transformación de la protrombina en trombina²¹. En un intento de explicar cómo se lleva a cabo dicha activación, Seegers⁵³ sustenta la teoría de que estos enzimas favorecen la génesis de la autoprotrombina C (siendo éste, por tanto, otro de sus posibles caminos de formación) y que en consecuencia la acción procoagulante demostrada por los mismos está supeditada a la aparición en el medio de la citada autoprotrombina.

También algunos venenos de serpientes⁵³ y determinadas sustancias procoagulantes existentes en la orina¹³⁻¹⁰⁷, son capaces de

cadadas con autoprotrombina C¹¹⁴. Para solventar este inconveniente, se ha aprovechado la diferente capacidad de adsorción que sobre celulosa DEAE muestran ambos enzimas, ya que la autoprotrombina C se adsorbe fácilmente, siendo en cambio inadsorbible la trombina⁹². Junto a la cromatografía en columna, la sistemática seguida para la purificación de este factor hemocoagulativo es la que habitualmente se utiliza con otros factores de la coagulación⁴³. Tras su obtención más o menos purificada se han podido estudiar alguna de sus propiedades físico-químicas⁹², así como desarrollar un método para su valoración cuantitativa¹⁶. Químicamente es una glicoproteína, en cuya composición entran todos los aminoácidos conocidos⁹². Los hidratos de carbono constituyen aproximadamente el 10,8 % de su peso⁹². Sus aminoácidos más abundantes son el glutámico, el aspártico y la arginina y de los carbohidratos el orcinol y una hexosamina, aunque es posible que existan otros todavía no identificados. Su peso molecular es de

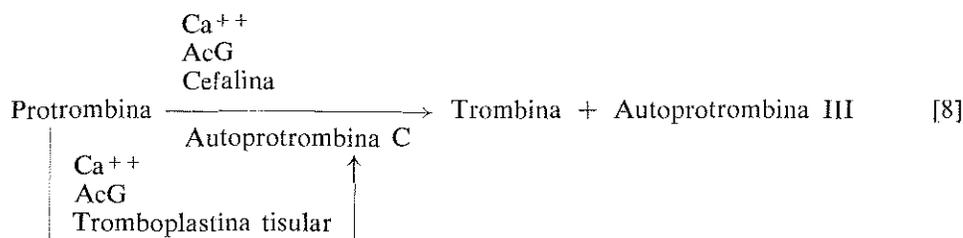
21.500, cuando se determina por métodos físicos, y 27.000 cuando se ha obtenido por el análisis de sus aminoácidos⁹². Su constante de sedimentación es de 2,27 u.u. Sevedberg⁹². Su coeficiente de difusión es de 8,4 por 10^{-7} /cm²/seg⁹² y su volumen específico parcial es de 0,695 ml/gr⁹².

Propiedades biológicas. La autoprotrombina C es bastante estable a la conservación, manteniendo su actividad biológica durante unos dos meses aproximadamente, cuando la experiencia se realiza a temperatura ambiente⁵⁶⁻⁹². Tiene una actividad específica de 2.400 a 4.300 u. u. por mg de tirosina, aunque en ocasiones se ha llegado a obtener preparaciones de hasta 17.000 u. u.⁹². La autoprotrombina C, a diferencia de la trombina, se adsorbe con dificultad sobre la fibrina, aunque en cambio sí lo hace fácilmente sobre determinadas sustancias inorgánicas, activándose como consecuencia de esta adsorción¹⁰⁸. Sobre la protrombina desarrolla una acción de tipo enzimático, ya que es inhibida por el TAME, seguramente porque este último ejerce un efecto competitivo con la protrombina cuando ambas sustancias actúan como sustratos de la autoprotrombina C¹⁰⁰.

Acción. En general, se puede decir que la autoprotrombina C es un poderoso procoagulante que acelera la reacción protrombina-trombina⁵⁶, no desempeñando en cambio papel alguno en la transformación del fibrinógeno en fibrina⁹⁸. Los productos resultantes después de su actuación sobre la protrombina son diferentes según el tipo de coactivadores empleados en la misma. Cuando actúa sobre la pro-

trombina muy purificada se genera autoprotrombina I⁸⁸. Para que por su actuación se forme trombina debe de actuar conjuntamente con otros activadores, de los que el más importante es la AcG⁸⁸. En esta reacción, además de la trombina, se genera también un derivado protrombínico inactivo⁵⁶⁻⁹¹, que más tarde, al ser mejor conocido, ha sido denominado autoprotrombina III⁹⁰⁻⁹² [8].

Siguiendo la terminología clásica, se puede decir que la autoprotrombina C es un procoagulante, que actuando dentro del sistema intrínseco, no necesita ser potenciado por los extractos tisulares para desarrollar su acción⁵⁶. Dentro del sistema intrínseco es el más poderoso procoagulante conocido⁵⁶, siendo capaz de transformar toda la protrombina de un sistema en trombina en sólo dos o tres minutos, cuando se dan las condiciones adecuadas para ello⁹². Dada esa rapidez de acción, cuando a un medio experimental de coagulación se añade autoprotrombina C, la fase lenta no se desarrolla, llevándose a cabo el proceso hemocoagulativo en una especie de explosión trombótica⁵⁵⁻⁹²⁻⁹⁹. Ya que, en la transformación intrínseca de la protrombina, la autoprotrombina C juega el principal papel, su acción ha sido comparada a la del activador intrínseco, y por tanto, según la escuela de Seegers, lo que realmente valoramos en el test de generación de tromboplastina, son los productos finales de la activación protrombínica (autoprotrombina C y trombina), y no el, para ellos hipotético, producto denominado activador intrínseco de la tromboplastina⁹². Además de equipararse con la tromboplastina intrínseca, puede



hacerlo asimismo con la tromboquinasa de Milstone⁶¹, por lo que se piensa que ambas sustancias son un único factor hemocoagulativo⁹², e igualmente con el factor X activado y el producto intermedio I de Bersaegel¹⁰¹.

Al igual que para otros factores de la coagulación, para la autoprotrombina C existe asimismo un sistema inhibidor⁵¹⁻⁵⁷⁻⁸⁵⁻⁹³⁻⁹²⁻⁹³⁻⁹⁹, el cual tiende a evitar la trombosis masiva que como consecuencia de su actuación se podría producir. A pesar de esta acción inhibidora, siempre queda autoprotrombina C⁹⁰ después de terminado el proceso de coagulación.

Un trastorno en la génesis, y por tanto una deficiencia de autoprotrombina C, ocasiona una diátesis hemorrágica con características clínicas y de laboratorio muy parecidas a las que se dan en la enfermedad Stuart de la terminología clásica⁹. Como esta enfermedad cursa con una carencia de factor X, es fácil pensar que ambas sustancias son un único factor hemocoagulativo⁹², ya que incluso la autoprotrombina C puede corregir el defecto de coagulación de un plasma carente de factor Stuart²⁷. Sin embargo, en contra del anterior criterio, está el hecho de que las propiedades físicas de ambos factores son diferentes¹⁸, aunque estas diferencias pueden ser achacadas a errores técnicos⁹², lo que parece ha sido confirmado por Spaet y Cintrom¹⁰¹, quienes comparando las propiedades físico-químicas de la autoprotrombina C, el producto intermedio I de Bersaegel y el factor X activado con Stypen, llegan a la conclusión de que son sustancias, si no idénticas, por lo menos muy similares.

A la luz de la teoría hemocoagulativa que nos ocupa, la enfermedad de Stuart, más que a la carencia de un factor plasmático, puede ser relacionada con una alteración funcional en la molécula de la protrombina. En efecto, cuando a un plasma Stuart se le añaden autoprotrombina C o protrombina procedente de un sujeto sano, se normalizan tanto su tiempo de

tromboplastina parcial como su consumo de protrombina⁹⁸. Esto no ocurre en cambio cuando la protrombina añadida es del propio enfermo, o cuando ésta previamente ha sido cromatografiada con celulosa DEAE, ya que, como se sabe³, tras la cromatografía, la protrombina sufre algunas modificaciones en su estructura química⁵⁴, que la inhabilitan para formar autoprotrombina C. Pero en cambio, tanto la protrombina del enfermo como la cromatografiada, producen trombina, cuando son activadas con autoprotrombina C⁹⁸.

Los anteriores hechos parecen indicar que la enfermedad Stuart no se debe a la carencia de un factor plasmático, sino más bien a un trastorno funcional de la protrombina, en el sentido de que ésta es incapaz de generar autoprotrombina C (fig. 1). En cambio, sí que puede generar trombina cuando es activada con un procoagulante poderoso, como lo es la autoprotrombina C⁹⁸, o cuando se añade protrombina normal al medio de experimentación, lo que parece indicar que los activadores de la protrombina del enfermo Stuart son normales, por lo que activan a la protrombina añadida y generan autoprotrombina C, la cual a su vez activa el proceso, pero no pueden activar su propia protrombina por ser anómala.

Algo parecido a lo que ocurre en la enfermedad Stuart debe de darse en la deficiencia de autoprotrombina I y II, aunque en las mismas, más que un trastorno funcional de la protrombina, lo que existe es una anomalía en la génesis de los referidos factores. En consecuencia, y a la luz de la teoría de Seegers, las diátesis hemorrágicas de origen plasmático pueden ser clasificadas como sigue:

1. Anormalidades de la molécula de protrombina.
2. Trastornos relacionados con la génesis de los derivados protrombínicos.
3. Carencia de algún factor necesario para que los derivados protrombínicos desarrollen su función.

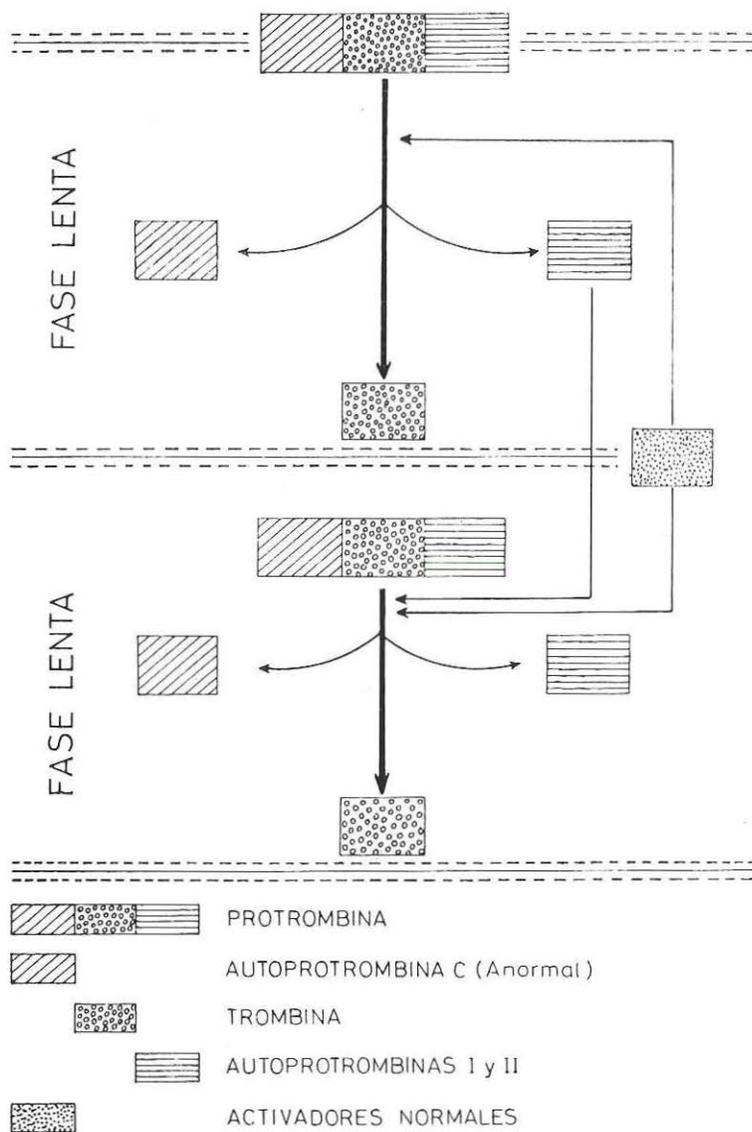


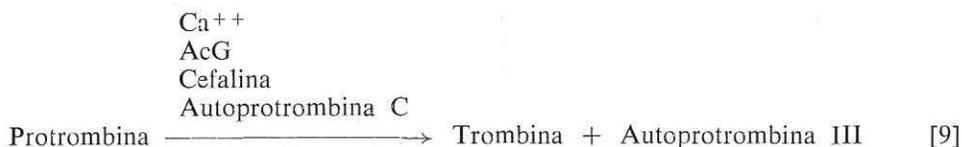
Fig. 1.—Esquema muy simplificado de la enfermedad Stuart. Tras la activación normal de la protombina se generan las autoprotombinas I, II y C, las cuales actúan en una fase posterior, acelerando la reacción, transformando en rápida la fase lenta de la coagulación sanguínea. En la enfermedad Stuart, la molécula de protombina es anormal y en consecuencia se genera autoprotombina C, asimismo anómala e incapaz, por tanto, de activar el proceso, por lo que éste se desarrolla según la cinética de la fase lenta.

En el primer grupo se puede encuadrar la enfermedad Stuart, en el segundo la hemofilia B y la deficiencia de factor VII, y en el tercero la parahemofilia de Owren.

AUTOPROTROMBINA III. Hemos visto anteriormente que tras el proceso de activación de la protrombina se forman una serie de productos, cuya génesis está condicionada al tipo de activador o activadores utilizados en la reacción. Cuando en dicha activación se emplean extractos tisulares, AcG y Ca^{++} , se obtienen trombina y autoprotrombina C⁹², lo que igualmente ocurre tras la autocatálisis protrombínica con citrato sódico⁵⁶. Pero si los extractos tisulares se sustituyen por lípidos, se generan trombina y un resto proteico diferente de la autoprotrombina C al que se ha denominado autoprotrombina III⁸⁷⁻⁹¹ [9]. Ahora bien, para poder afirmar co-

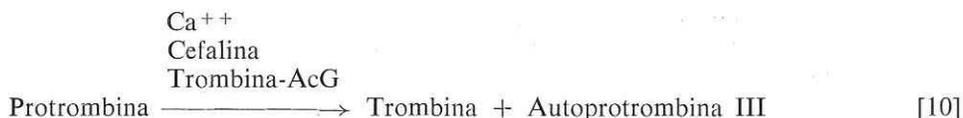
protrombina III, no contuviese autoprotrombina C, lo que fue conseguido utilizando trombina —AcG, cefalina y Ca^{++} , ya que de esta forma se genera autoprotrombina III libre de autoprotrombina C, aunque mezclada con trombina⁸⁸⁻⁹¹ [10].

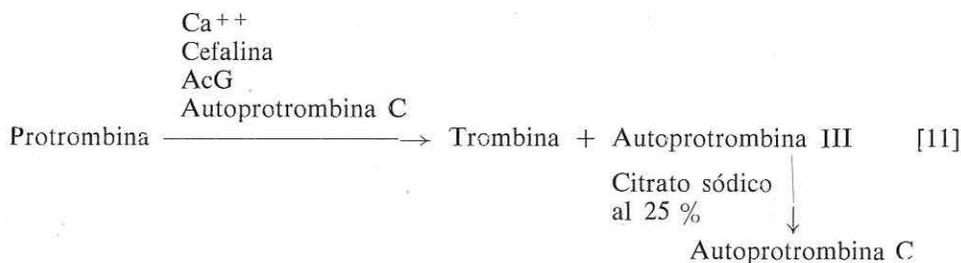
En una segunda fase de este proceso de purificación, la trombina se separa de la autoprotrombina III por un procedimiento semejante al seguido en la obtención de la autoprotrombina C⁹², y que fundamentalmente consiste en precipitarla con acetona, adsorberla posteriormente con celulosa DEAE, y finalmente, eluirla con un tampón de fosfatos de pH 7.2. De esta forma se puede obtener un compuesto proteico biológicamente distinto de la autoprotrombina C, ya que carece de actividad procoagulante, pero con propiedades físico-químicas muy parecidas a las



mo segura la existencia de la autoprotrombina III, era preciso aislarla, para de esta forma evidenciar que no se trataba de autoprotrombina C, sino de un factor nuevo e independiente de ella. La separación de estos dos factores es dificultosa⁸⁹, ya que en la mezcla activadora empleada para la génesis de la primera se utiliza autoprotrombina C y por tanto esta última puede enmascarar los resultados, dificultad que todavía se hace mayor si se tiene en cuenta la parecida composición química y tamaño molecular de ambos factores hemocoagulativos⁹². Para obviar este inconveniente se buscó un activador de la protrombina, que generando auto-

de aquella, teniendo, por ejemplo, similar peso molecular⁸⁷ e iguales constantes de sedimentación⁹⁰. Dicha similitud viene corroborada por el hecho experimental de que la autoprotrombina III se puede transformar en autoprotrombina C incubándola con citrato sódico al 25 %⁵², generándose por este camino la misma cantidad de autoprotrombina C que se obtendría si desde un principio el proceso se hubiera llevado a cabo por su vía de activación habitual. Todo lo anterior hace suponer que la autoprotrombina III constituye un estado inactivo previo, una especie de precursor, de la autoprotrombina C⁵²⁻⁹² [11].





Por tanto, y en resumen, la autoprotrombina III, se genera siempre que en la activación de la protrombina se sustituyen los extractos tisulares por lípidos, es decir, siempre que la activación se lleva a cabo por la vía intrínseca, formándose en cambio autoprotrombina C cuando la vía empleada es la extrínseca. El enzima activo tras dicha reacción es la trombina, quedando la autoprotrombina III como un resto protrombínico inactivo después del proceso ⁹⁰.

TROMBINA E. De todos los productos resultantes de la activación protrombínica, es la trombina el más importante, ya que junto con la protrombina y fibrinógeno constituye el eje de todo el sistema de coagulación sanguínea.

El estudio de la trombina, como enzima procoagulante ⁸³ y por tanto con un papel primordial en las reacciones fibrinógeno-fibrina y protrombina-trombina ¹⁰¹, cae fuera de los límites de este trabajo. Aquí vamos a referirnos únicamente a la trombina E ⁴⁰, o, lo que es igual, a la función esterásica de la trombina biológica ⁷⁸.

Es sabido que un mismo enzima puede actuar sobre diferentes sustratos, y que de entre ellos, uno es su sustrato natural. Dentro de esta línea general de acción, diversos enzimas plasmáticos, que fundamentalmente desempeñan algún papel dentro del sistema de procoagulación sanguínea, pueden asimismo actuar como fibrinolíticos, cuando reaccionan con un sustrato que no es el suyo habitual. Inversamente, otros enzimas típicamente fibrinolíticos pueden en ocasiones actuar co-

mo procoagulantes cuando se ponen en contacto con su sustrato adecuado. Esta correlación entre coagulación y fibrinólisis ya fue descrita por Nolf ⁶⁵, quien pudo demostrar que la trombina presenta, junto a su poder procoagulante normal, actividad fibrinolítica manifiesta. Más recientemente, algo similar ha sido descrito con respecto al factor Hageman, el cual, aunque fundamentalmente actúa en la fase de contacto ²⁵⁻²⁶⁻⁶⁶⁻⁷⁵⁻⁷⁷, juega también un papel definido dentro del sistema fibrinolítico ⁴⁻³⁰⁻³⁴⁻⁶⁴. Por el contrario, la tripsina ²⁰ y la plasmina ⁶³, sustancias primordialmente fibrinolíticas, pueden desempeñar un papel acelerante en la reacción protrombina-trombina.

Estos hechos indujeron a revisar el problema de la actividad lítica de la trombina siendo Guest y Ware ²⁴, y posteriormente otros autores ¹¹⁻³⁶⁻⁴⁰⁻¹⁰², quienes, con preparaciones muy purificadas, conseguían demostrar el carácter proteolítico de aquel enzima, pensando que ambas funciones, procoagulante y fibrinolítica, eran manifestaciones diferentes de una misma actividad enzimática ⁷⁸, ya que tanto sobre el fibrinógeno (acción procoagulante), como sobre la fibrina (acción fibrinolítica), la trombina actúa como una proteasa (endopeptidasa), hidrolizando cadenas proteicas, que en el primer caso vuelven a polimerizarse para formar la red de fibrina, y en el segundo se pierden como restos peptídicos inactivos.

Junto a esta acción hidrolizante sobre sustratos biológicos, se pudo demostrar asimismo su actividad enzimática sobre el TAME, al cual hidroliza rompiendo las

uniones ésteres que en el mismo existen¹⁰²⁻¹⁰³. Este nuevo tipo de acción enzimática desarrollada por la trombina cae también dentro del grupo general de las hidrolasas, con la única diferencia de que sobre el TAME hidroliza ésteres carboxílicos, y sobre el fibrinógeno o la fibrina rompe uniones peptídicas (fig. 2). Asimismo

protrombina, se desarrollan sus funciones procoagulante y esterásica¹⁰², lo cual induce a pensar que en realidad no son dos trombinas diferentes las generadas, sino más bien dos manifestaciones distintas de una misma molécula trombínica⁷⁸. Ahora bien, cuando una preparación de trombina con las características propias de

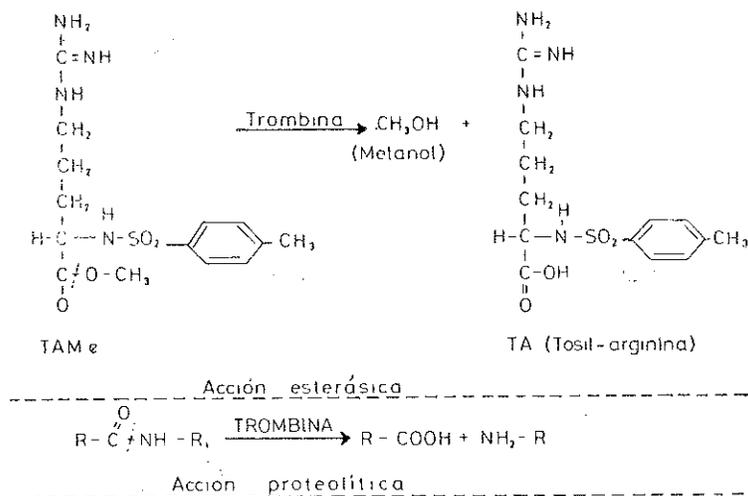


Fig. 2.—Esquema de la acción hidrolizante de la trombina sobre las uniones éster y péptica, del TAME y de un péptido, respectivamente

mo puede actuar sobre determinadas grasas neutras, habiéndose demostrado su poder hidrolizante sobre las uniones éster de la tributirina⁴⁰.

En resumen, existen, por tanto, dos tipos de trombina, una con actividad coagulante y esterásica, que se denomina biotrombina³⁰, que se obtiene tras la activación biológica de la protrombina⁸², y otra que, careciendo de acción procoagulante, muestra en cambio una marcada actividad esterásica, y a la que se ha denominado trombina E⁴⁰⁻⁹⁷. Ambas trombinas tienen en común su actividad fibrinolítica manifiesta⁴⁰⁻⁹⁶, y el poder ser inactivadas por la antitrombina plasmática⁴⁰⁻⁹⁶.

Origen. Cuando la trombina se genera tras la normal activación biológica de la

la biotrombina, se deja en conservación, su actividad procoagulante disminuye progresivamente, permaneciendo en cambio prácticamente invariable la esterásica⁴⁰, por lo que transcurrido cierto tiempo únicamente existe esta última en el medio de experimentación. Sin embargo, la génesis de la trombina E no está exclusivamente condicionada a su mayor estabilidad a la conservación, sino que también puede ser obtenida por activación directa de la protrombina, cuando se usan los medios adecuados para ello. Así, por ejemplo, incubando protrombina con factor III plaquetar y Ca^{++} , antes de que se desarrolle la actividad procoagulante aparece la esterásica, la cual junto a su mayor rapidez genética, muestra, como ya sabemos, una mayor estabilidad a la con-

servación⁴². Idéntico efecto se consigue tras la activación trombínica de la protrombina⁴¹, y también cuando se disuelve protrombina muy purificada en solución salina, si se añaden al medio de experimentación pequeñas cantidades de cloruro cálcico 0,05M. Las anteriores reacciones pueden a su vez ser activadas catalizándolas con ninhydrina⁹⁶, o por acetilación de los grupos aminos de la trombina⁹², lo cual favorece también la obtención por separado de los dos tipos de trombina a que nos estamos refiriendo⁹⁶.

Ya vimos anteriormente³ que cuando una solución de protrombina se hace pasar a través de una columna de cromatografía formada por IRC-50, la estructura química de la protrombina sufre ligeras modificaciones, que pueden dar como consecuencia la alteración de alguna de sus propiedades biológicas³. Pues bien, cuando una preparación de protrombina cromatografiada se incuba con citrato sódico al 25 %, la actividad esterásica aparece en el medio de experimentación mucho antes que la procoagulante, e incluso con mayor potencia funcional⁴², aunque también es verdad que dicha actividad desaparece asimismo muy rápidamente si se añade al medio citrato sódico al 25 % o sulfato de protamina⁴¹. Como consecuencia de todo lo anterior se puede considerar a la protrombina como una molécula con diversas potencialidades, capaz de desarrollar funciones también diversas cuando se dan las condiciones adecuadas para ello⁹⁶, obteniéndose de esta forma biotrombina y trombina E, las cuales, como se sabe, tienen distinta función e incluso distinta estructura.

Acción. La única función de la trombina E es su actividad esterásica, que se puede ejercer tanto sobre un sustrato artificial como sobre un coágulo ya constituido, actuando, en este último caso, como un fibrinolítico directo¹¹⁻⁹⁷. Por otra parte, carece de acción sobre las reacciones protrombina-trombina y fibrinógeno-fibrina, aunque esto último debe ser re-

visado después de las recientes experiencias de Goldstein, quien, al parecer, ha demostrado que junto a una escasa actividad lítica tiene un papel, todavía no bien determinado, en la reacción fibrinógeno-fibrina²². Asimismo actúa sobre los factores V y VIII, ya que cuando se incuba con ellos en un medio adecuado, ambos factores disminuyen sensiblemente²². En mucha menor proporción también afecta a los factores II, VII y X²².

Teniendo como base la probable actividad fibrinolítica de la trombina E, Seegers ha recomendado su utilización en la terapéutica fibrinolítica⁹⁷; pero a la luz de las recientes experiencias llevadas a cabo por Goldstein²² esta pretendida utilidad deberá ser sometida a un más minucioso examen, ya que si la fibrina constituye un sustrato adecuado para su ataque, lo son también algunos factores procoagulantes, por lo que, junto al efecto lítico desarrollado por la trombina E, puede paralelamente dar lugar a un estado de hipocoagulabilidad plasmática, por hipofibrinogenemia y disminución de los factores V y VIII, con el consiguiente peligro de hemorragia.

AC-GLOBULINA

Como al iniciar este estudio se indicó, entre los factores de la coagulación no derivados de la protrombina vamos a referirnos únicamente a la Ac-Globulina (factor V), ya que un exacto conocimiento de sus propiedades y función biológica es indispensable para la mejor comprensión del proceso hemocoagulativo.

El primitivo esquema de la coagulación sanguínea propuesto por Morawitz⁶² se mantuvo prácticamente inmodificado hasta que en 1943 Quick observó⁷⁴ que un plasma normal tenía un tiempo de protrombina alargado cuando la determinación se practica cierto tiempo después de obtenida la muestra, siendo el alargamiento proporcional al tiempo transcurrido. Por ello sospechó que en el plasma exis-

tía un factor poco estable a la conservación, ya que añadiendo pequeñas cantidades de plasma reciente al medio de experimentación, se normalizaban los tiempos de protrombina. Por ser la principal característica de este factor su poca estabilidad a la conservación, se le denominó factor lábil⁷⁴. Tres años más tarde Fantl y Nance¹⁹ confirmaban las experiencias de Quick.

Por la misma época Owren estudió un enfermo con una diátesis hemorrágica desconocida⁷⁰, que años después fue atribuida a la carencia de un factor plasmático, que actuaba acelerando la transformación de la protrombina en trombina⁶⁷. A este factor se le denominó factor V y posteriormente proacelerina⁶⁷⁻⁶⁹, y a la diátesis hemorrágica que su falta ocasiona parahemofilia de Owren⁶⁸.

Basándose en las anteriores experiencias Ware, Guest y Seegers¹¹⁰ comprobaron la existencia de la proacelerina y la denominaron Ac-Globulina. Ese mismo año obtuvieron una fracción plasmática rica en AcG¹⁰⁹ y un poco más tarde establecían su papel dentro del sistema hemocoagulativo, así como sus propiedades físico-químicas y también un método para su parcial purificación y determinación cuantitativa⁴⁴⁻¹¹²⁻¹¹³.

En consecuencia, la AcG es uno de los pocos factores hemocoagulativos, no derivado de la molécula protrombínica y que interviniendo en la reacción protrombina-trombina la acelera. Existe en el plasma y en las plaquetas³⁵ antes de que comience el proceso de coagulación, pudiéndose por ello clasificar como un coautocatalizador de la protrombina⁴³, ya que como hemos dicho potencia la acción procoagulante de otros derivados protrombínicos. Su papel es muy importante en la trombinogénesis y se puede afirmar que fundamental en la formación de las primeras trazas de trombina.

Propiedades físico-químicas y biológicas. Recientemente, la AcG se ha obtenido

muy purificada², por lo que tanto sus propiedades físico-químicas como su actuación biológica han podido ser estudiadas detalladamente.

La Ac-Globulina es una glicoproteína, en cuya constitución entran 18 aminoácidos diferentes, así como una proporción pequeña de hexoamina. Su secuencia es distinta a la de la protrombina, ya que posee proporcionalmente mayor cantidad de metionina y fenilalanina². Tiene un peso molecular aproximado de 98.000, aunque estos datos deben ser sometidos a posterior revisión. El plasma de algunos animales es más rico que el humano en AcG⁷², pudiendo establecerse una graduación de la riqueza de este factor en diversas especies animales como sigue: pollo, hombre, conejillo de indias, ratón, gato, toro, perro⁸².

Su principal característica biológica es la poca estabilidad que presenta a la conservación, siendo las mejores condiciones para evitar su destrucción las siguientes: pH 7, disolución en glicerol al 50 % y adición al medio de cloruro cálcico 0,1M. De esta manera se puede mantener a temperatura ambiente durante 6 ó 7 horas sin que disminuya su actividad biológica. A 4° C se conserva durante 24 horas y a -60° C, hasta un mes².

Acción. Como ya se ha indicado la AcG actúa como un coautocatalizador protrombínico, potenciando la acción de otros factores hemocoagulativos y acelerando como consecuencia de ello la reacción protrombina-trombina.

El punto más oscuro de la activación protrombínica, y en general de toda la coagulación sanguínea, es sin duda el relacionado con la formación de las primeras trazas de trombina y autoprotrombina C, ya que, una vez generados estos enzimas, el proceso puede desarrollarse autocatalíticamente. La teoría más generalizada para explicar dicho proceso admite que se inicia por la actuación conjunta de los extractos tisulares, liberados

en el lugar de la herida, y la AcG plasmática⁶⁷ (fig. 3). Cuando la activación se lleva a cabo en estas condiciones, se genera gran cantidad de trombina, siendo la cantidad formada proporcional a la tromboplastina utilizada.

Asimismo, cuando en un proceso de activación protrombínica experimental, alguno de los dos procoagulantes a que nos estamos refiriendo (AcG o extractos tisulares) se halla poco concentrado, la reacción puede desarrollarse normalmente

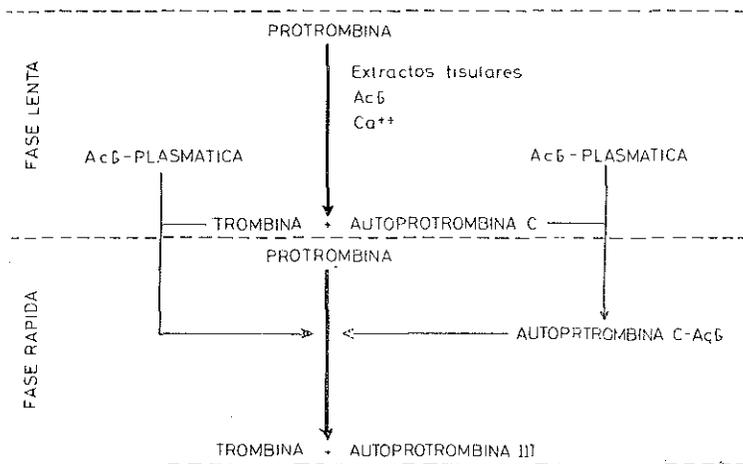
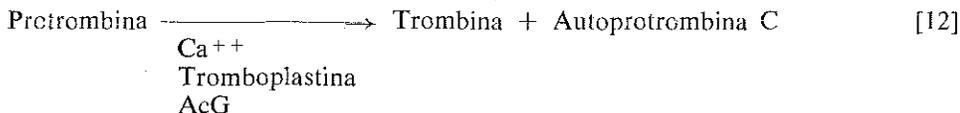
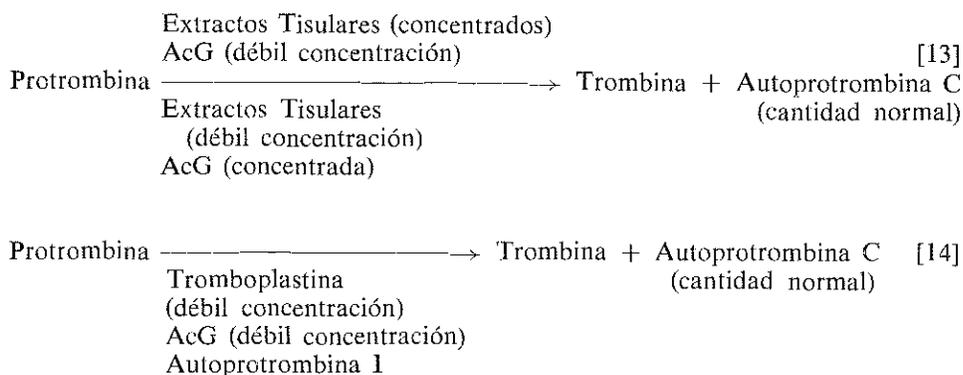


Fig. 3.—Esquema muy simplificado de la activación de la protrombina. En el mismo se hace notar el papel que la AcG desempeña en la transformación de la fase lenta de la coagulación, en rápida, ya que esta última fundamentalmente depende de la reacción de la AcG con la trombina y la autoprotrombina C

Estas circunstancias de activación se dan precisamente en el test de Quick, ya que en el mismo el proceso hemocoagulativo se lleva a cabo en presencia de un exceso de tromboplastina tisular, por lo que la génesis trombínica se consigue en 12 segundos aproximadamente⁷³. Pero también cuando la protrombina se activa únicamente con extractos tisulares en la proporción habitual, se generan trazas de trombina¹¹¹, acelerándose la reacción si se añade al medio de experimentación AcG en la cantidad adecuada^{1, 59, 60, 88, 109, 110, 111} [12].

usando mayor cantidad del otro, lo cual indica que no solamente pueden potenciarse en sus acciones respectivas cuando actúan juntos, sino que también pueden suplirse mutuamente, con objeto de obtener una activación protrombínica normal⁸⁸. Para que esto se realice, el que se halla más concentrado debe de estar en mayor proporción de la que habitualmente se encuentra en un proceso de coagulación *in vivo*^{88, 90} [13]. Cuando ambos procoagulantes se hallan poco concentrados, aun usándolos conjuntamente, la trombina se genera en mínima cantidad, norma-





lizándose la reacción, cuando se añade autoprotrombina I al medio de experimentación⁸⁸ [14].

Como resultado de la activación protrombínica en presencia de tromboplastina tisular y AcG, se generan trombina y autoprotrombina C⁹².

Junto a su papel en la activación de la tromboplastina tisular, y por tanto dentro del sistema extrínseco de la literatura clásica, la AcG actúa asimismo en el intrínseco, potenciando la acción procoagulante de la trombina⁴⁵ y de la autoprotrombina C⁸⁸.

Como ya vimos anteriormente, cuando la protrombina se activa únicamente con autoprotrombina C, no se obtiene trombina como producto de la reacción²⁻⁹⁹; pero si se añade AcG, la trombina se genera rápidamente³⁹⁻⁹⁴. Ahora bien, en esta reacción la AcG no actúa exclusivamente potenciando la acción procoagulante de la autoprotrombina C, como hace con la tromboplastina tisular, sino que más bien reacciona con ella, ocasionando cambios en su estructura molecular y modificando incluso su acción biológica.

Tras la reacción, lo que realmente ha ocurrido es que se ha constituido un nuevo enzima al que se ha denominado autoprotrombina C-AcG⁸⁸, cuya actividad es proporcional a la cantidad de Ac-globulina añadida. Tan pronto como dicho enzima se ha formado, desarrolla toda su poten-

cialidad enzimática, que permanece en el medio de experimentación después de terminarse el proceso hemocoagulativo, a diferencia de la trombina-AcG, que, como más abajo veremos, no se encuentra en el suero una vez finalizado el proceso de coagulación⁸⁸, lo que se cree es debido a su neutralización por un inhibidor específico³³.

Como se ve, la AcG es indispensable para que la autoprotrombina C desarrolle su acción procoagulante y, por tanto, para la puesta en marcha de la más importante vía intrínseca de coagulación.

Al igual que la autoprotrombina C, la trombina reacciona con la AcG plasmática activándose tras la reacción^{29, 33, 45}. Como consecuencia de la misma se forma un enzima nuevo, la trombina-AcG, de características fisicoquímicas y biológicas propias²⁹ y cuya función primordial es acelerar la reacción protrombina-trombina. La trombina-AcG es equiparable al factor V activo⁷¹, de la literatura clásica, o a la acelerina de Owren⁶⁷.

Ya anteriormente se ha descrito que un proceso normal de coagulación se lleva a cabo en dos etapas (fig. 3), una inicial lenta, en la que se generan las primeras trazas de trombina, y una segunda rápida en la que por un proceso de autocatalisis se llegaría a una coagulación masiva, si no existiera un mecanismo de anticoagulación⁵⁸ que equilibrara el sistema

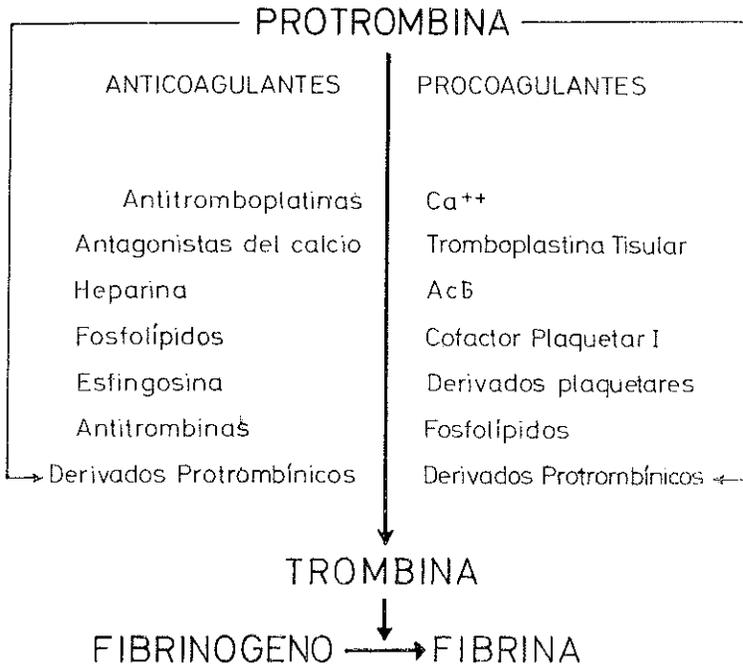


Fig. 4.—La activación de la protrombina está regulada por dos sistemas antagónicos, uno procoagulante y otro anticoagulante. De un equilibrio entre ambos depende que la génesis trombínica y por tanto la formación del coágulo sea normal

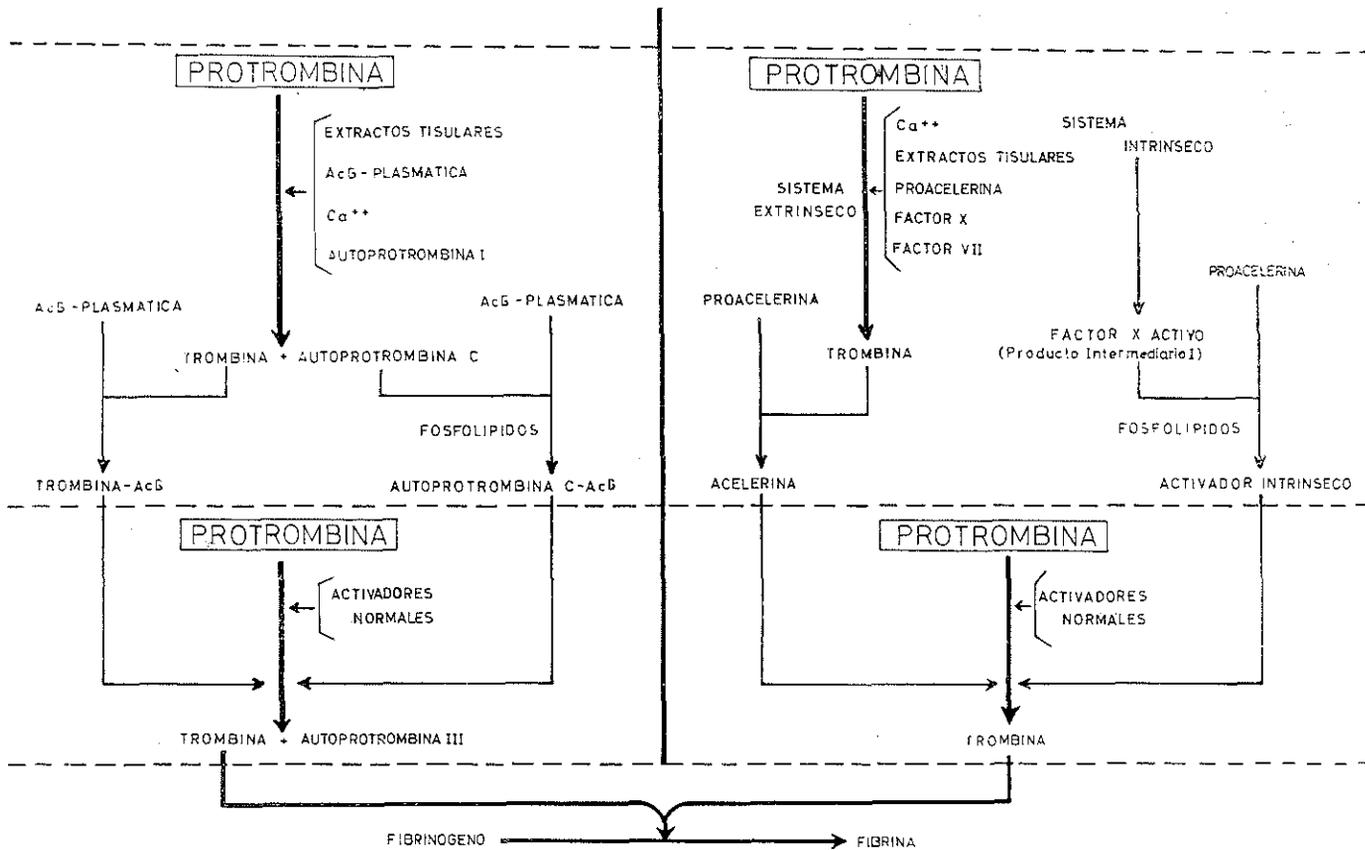
(fig. 4). Asimismo se ha estudiado que en la fase lenta tras la activación inicial de la protrombina, se generan pequeñas cantidades de trombina y autoprotrombina C, y que en una fase posterior estos enzimas reaccionan con la AcG formando trombina-AcG y autoprotrombina C-AcG, que como se sabe son los enzimas activos en la formación de la protrombina. Se ve, por tanto, que ninguno de los anteriores enzimas por separado (trombina, autoprotrombina C o AcG) es capaz de desencadenar la fase rápida y como consecuencia de ello, la presencia de AcG en el medio de experimentación es absolutamente necesaria para que el proceso normal de coagulación se lleve a cabo.

Estableciendo un cuadro comparativo entre el sistema clásico de coagulación y el que defienden Seegers y su escuela (fig. 5),

se puede observar la existencia de un marcado paralelismo entre el factor V y la AcG. Dentro del sistema intrínseco, el factor V reacciona con el producto intermediario II de Bergsægel^{5, 6, 7}, o lo que es igual, con el factor X activado^{12, 17, 61}, generando como consecuencia de esta reacción la tromboplastina intrínseca^{8, 31, 32}.

Ya se ha descrito la identidad del factor X con la autoprotrombina C, y como consecuencia de ello el papel de la AcG al reaccionar con la autoprotrombina C sería idéntico al que tiene el factor V cuando reacciona con el factor X activado, o con el producto intermediario II. En resumen, tanto en uno como en otro sistema la trombogénesis se acelera cuando se añade al medio de experimentación la cantidad adecuada de AcG.

Fig. 5.—Cuadro comparativo de la génesis trombínica según las teorías clásica y de Seegers



ACTIVACIÓN BIOLÓGICA DE LA PROTOMBINA

Hasta el momento se han estudiado por separado aspectos parciales de la activación protrombínica, lo que si bien ha permitido profundizar con mayor intensidad en cada uno de ellos, ha hecho más difícil la comprensión global del proceso hemocoagulativo. Por esto vamos a realizar un estudio de conjunto de todo el sistema de coagulación, a fin de encuadrar dentro del mismo aquellos aspectos parciales de la activación protrombínica a los que anteriormente hacíamos referencia.

La autocatalisis o activación aniónica de la protrombina, aunque de extraordinaria importancia desde un punto de vista experimental, no es adecuada para resolver el problema de la trombinoformación biológica, ya que en nuestro organismo no se dan las circunstancias que para su normal desarrollo se requieren. Algo parecido ocurre con las activaciones parciales anteriormente aludidas (fig. 6) ya que si

bien éstas permiten conocer más profundamente los diversos caminos que existen para la activación de la protrombina, no pueden llevarse a cabo habitualmente *in vivo*, por razones parecidas a las que acabamos de aducir para la activación aniónica.

El sistema hemático es como un medio experimental en el que se hallan presentes todos los factores necesarios para la formación de un trombo. Algunos se encuentran en el plasma como proteínas independientes de la protrombina (fig. 7), y otros como derivados protrombínicos que una vez generados se liberan en el torrente circulatorio para ser utilizados en el momento oportuno⁸¹. Gracias a la interacción de estos factores hemocoagulativos, nuestro medio interno se mantiene en un equilibrio dinámico que es la base para una normal homeostasis sanguínea, ya que cuando éste se desplaza hacia derecha o izquierda [15] se tiende hacia estados de trombofilina o hipocoagulabili-

Protrombina	AcG	Tromboplastina	Trombina	Factor Pláquetar II	Cofactor Pláquetar I	Autoprotrombina I	Autoprotrombina II	Autoprotrombina C	Aloanas	Ca ⁺⁺	Enzimas Protolíticas	Autoprotrombina III	PRODUCTOS
●	●			⊗	⊗					●			Trombina
●										●			Trombina + Autoprotrombina C
●	●	●								●			Trombina + Autoprotrombina C
●	●	●				●				●			Trombina + Autoprotrombina C
●			●		⊗					●			Trombina
●	●			●						●			Trombina + Autoprotrombina C
●			●							●			Trombina
●	●		●							●			Trombina
●				⊗						●			Autoprotrombina I
●		●								●			Autoprotrombina I
●			●(II)							●			Autoprotrombina I
●			●							●			Autoprotrombina II
●	●		●										Autoprotrombina II
●				●									Autoprotrombina II
●	●	●											Autoprotrombina II
●		●			●								Autoprotrombina II
●			●(II)										Autoprotrombina II-A
●	●			⊗				●		●			Trombina + Autoprotrombina III
●	●	●	●	●						⊗			Trombina + Autoprotrombina III
●									●			●	Autoprotrombina C
●			●						●				Trombina + Autoprotrombina C
●							●		●				Trombina
●							●				●		Trombina + Autoprotrombina C

Fig. 6.—Cuadro sinóptico de las diferentes vías de activación de la protrombina

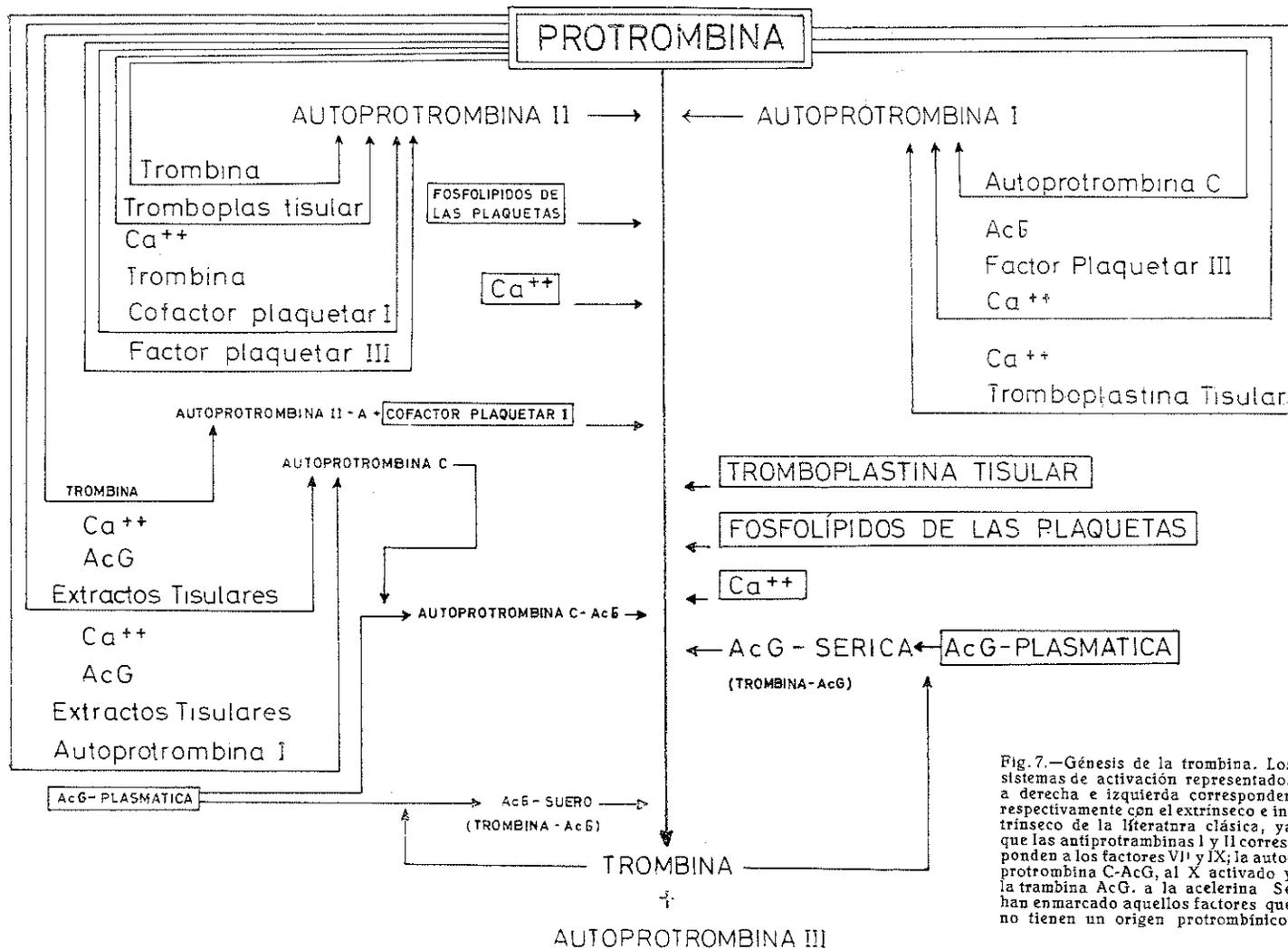
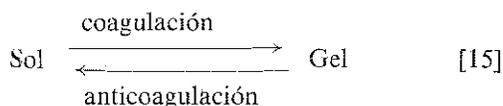


Fig. 7.—Génesis de la trombina. Los sistemas de activación representados a derecha e izquierda corresponden respectivamente con el extrínseco e intrínseco de la literatura clásica, ya que las antiprotrombinas I y II corresponden a los factores VII y IX; la autoprotrombina C-AcG, al X activado y la trombina AcG, a la acelerina. Se han enmarcado aquellos factores que no tienen un origen protrombínico.



dad respectivamente. El hacer hincapié en este equilibrio dinámico, que como resultado de un proceso de coagulación y anticoagulación se está desarrollando permanentemente en nuestro organismo, nos parece importante, pues viene a sustituir a la teoría estática de la coagulación, según la cual los factores hemocoagulativos se hallan inactivos hasta el momento de producirse una lesión en el árbol vascular, instante en el que se pone en marcha el mecanismo de coagulación. Ahora bien, este sistema dinámico de coagulación y anticoagulación debe de ponerse en funcionamiento en un momento determinado, y parece ser que ello podría ocurrir cuando las primeras trazas de tromboplastina tisular fueran liberadas en el torrente circulatorio, ya que entonces éstas podrían reaccionar con la AcG y el Ca^{++} plasmáticos, generándose como consecuencia de ello trombinas y autoprotrombina C.

Estos enzimas, aunque formados en escasa cantidad, están lo suficientemente concentrados como para poner en marcha la activación coautocalítica de la protrombina. A partir de este momento los factores derivados de la protrombina se generan y destruyen de forma continua, lo que unido a la presencia en el plasma de cofactor plaquetar I y AcG, y en las plaquetas de fosfolípidos activos, da lugar a que la coagulación y anticoagulación intravascular se lleve a cabo ininterrumpidamente. Ahora bien, la forma como se destruye este equilibrio dinámico, cuando tras un traumatismo se requiere la formación de un tapón hemostático eficiente, así como el mecanismo que frena la reacción en cadena que tiene lugar una vez que el proceso de coagulación ha comenzado, no está todavía bien esclarecido. Parece lo más probable que la tromboplastina tisular liberada en el lugar de la herida, actuando conjuntamente con la

AcG y el calcio iónico, genera los primeros indicios de trombina. Esta posteriormente activa a la AcG plasmática y la transforma en trombina-AcG. Al igual que con la trombina, la AcG plasmática puede reaccionar con la autoprotrombina C⁸⁰ (factor intermediario II de Bergsaegel) dando lugar a la formación de la autoprotrombina C-AcG, equivalente, como se sabe, al activador intrínseco del sistema clásico (fig. 5). Pero para que la activación protrombínica se lleve a cabo con normalidad debe de coadyuvar en estas reacciones la autoprotrombina II, el cofactor plaquetar I y los fosfolípidos plaquetares (fig. 7), pudiéndose en consecuencia comparar todo este sistema de activación al sistema intrínseco clásico.

Por otra parte, la autoprotrombina I²⁷⁻⁹⁵ necesita actuar en presencia de tromboplastina tisular, AcG, fosfolípidos y calcio iónico, para desarrollar una activación protrombínica eficiente (fig. 7), por lo que esta vía de activación es en todo comparable a la extrínseca del sistema clásico (fig. 5), con la única diferencia de que en ésta el factor X juega un papel activo¹⁰⁶, mientras que en la teoría de Seegers, la autoprotrombina C no es necesaria para que la activación protrombínica pueda llevarse a cabo normalmente. Se ve, por tanto, que, aunque entre ambas teorías se dan indudables puntos de conexión, existen asimismo marcadas diferencias⁸⁶, que pueden resumirse de la siguiente manera:

1. Para Seegers y su escuela el activador intrínseco de la protrombina⁸² no es un factor de coagulación con una personalidad fisicoquímica definida¹⁰⁰, sino más bien una función plasmática consecuencia de la activación de la autoprotrombina C por la AcG; lo que al parecer está en oposición con

- las recientes experiencias de Cole¹⁵, quien afirma haber aislado la tromboplastina intrínseca.
2. Asimismo, ignoran la fase de contacto⁶⁵ y por tanto niegan la existencia de los factores XI y XII, oponiéndose esto a las experiencias de otros autores que al parecer los han obtenido purificados, habiendo incluso estudiado su composición química¹⁰⁵. Pero, por otra parte, sí que existe paralelismo entre esta teoría y la escasa o nula sintomatología clínica que la carencia de los factores XI y XII ocasiona⁷⁶.
 3. Para ellos, la fase de contacto se puede sustituir por los extractos tisulares, lo que asimismo ha sido demostrado por Biggs y Nossel, quienes al estudiar el posible papel activador de estos extractos sobre el factor XII, únicamente consiguieron poner de manifiesto su capacidad de sustituir al "factor contacto" en la génesis del activador intrínseco de la protrombina, cuando las experiencias se llevaron a cabo con material siliconado¹⁰.
 4. Las autoprotrombinas I, II, III y C⁸⁸, son consideradas como derivados de la protrombina⁸⁴.
 5. Los únicos factores plasmáticos con actividad procoagulante no derivados de la protrombina son la AcG, el cofactor plaquetar I, el fibrinógeno y el factor XIII.
 6. Junto a los derivados protrombónicos con actividad procoagulante existe asimismo un anticoagulante, la autoprotrombina II-A⁴³.
 7. El cofactor plaquetar I desarrolla su acción procoagulante por un mecanismo de tipo indirecto, ya que se lleva a cabo tras neutralizar la actividad anticoagulante de la autoprotrombina II-A o bien la de un inhibidor plasmático (ISM)⁸⁰ de carácter lipídico⁵⁰⁻⁸², que según Mammen⁴⁹ no tiene origen protrombónico, y que desaparece durante el proceso hemocoagulativo²³, por lo que no se encuentra en el suero⁴⁸.
- Pero, sin duda, las más interesantes aportaciones de la escuela de Detroit son, por una parte, el haber demostrado el origen protrombónico de la trombina⁸² y, por otra, el haber iniciado una investigación de carácter bioquímico, que, a buen seguro, ha de abrir caminos nuevos que nos lleven hacia el esclarecimiento del todavía oscuro campo de la coagulación sanguínea.
- Así como al inicio de este trabajo³ hicimos nuestras las palabras con que Morawitz⁶² comienza su clásico libro de coagulación, nos parece igualmente oportuno finalizar con sus mismas ideas ya que, a pesar de haber sido expuestas en 1905, continúan teniendo plena vigencia. Pues, como él dice, "si bien es mucho lo que se ha avanzado dentro de la coagulación sanguínea, también es cierto que es todavía más lo que aún queda por esclarecer".

BIBLIOGRAFÍA

1. ALKJAERSIG, N., T. AEE, S. A. JOHNSON y W. SEEGERS. *Amer. J. Physiol.* 181: 304, 1955.
2. AOKI, N., C. R. HARMISON y W. H. SEEGERS. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 41: 2409, 1963.
3. AZNAR, J. *Rev. Med. Univ. Navarra.* 9: 15, 1965.
4. AZNAR, J. y A. LÓPEZ-BORRASCAS. *Lancet.* 1: 437, 1965.
5. BERSAGEL, D. E. *Brit. J. Haemat.* 1: 199, 1955.
6. BERSAGEL, D. E. *Brit. J. Haemat.* 2: 130, 1956.
7. BERSAGEL, D. E. y C. HOUGIE. *Brit. J. Haemat.* 2: 113, 1956.

8. BERSAGEL, D. E. y R. NOCKOLDS. *Brit. J. Haemat.* 11: 395, 1965.
9. BIGGS, R. M. y R. G. MACFARLANE. Blackwell. Scientific. Publications. Oxford. 1962.
10. BIGGS, R. M. y H. L. NOSSEL. *Thromb. Diath. Haem.* 6: 1, 1961.
11. BRAKMAN, P. *Thromb. Diath. Haem.* 11: 230, 1964.
12. BRECKENRIDGE, R. T. y O. D. RATNOFF. *J. Clin. Invest.* 44: 302, 1965.
13. CALDWELL, M., K. von KAULLA, E. von KAULLA y W. H. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 9: 229, 1963.
14. COLE, E. R., J. L. KOPPEL y J. H. OLWIN. *Nature* 202: 301, 1964.
15. COLE, E. R., J. L. KOPPEL y J. H. OLWIN. *50th Ann. Symp. Blood. Thromb. Diath. Haem.* 13: 579, 1965.
16. COLE, E. R., E. MARCINIAK y W. H. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 8: 434, 1962.
17. DAVIE, E. W. y O. D. RANOFF. *Science* 145: 1310, 1964.
18. ESNOUF, P. *Wiesbaden Conference on the Coagulation Balance.* Septiembre, 1961.
19. FANTL, P. y M. H. NANCE. *Nature.* 158: 708, 1946.
20. FERGUSON, J. H. y B. N. ERIKSON. *Amer. J. Physiol.* 126: 661, 1939.
21. FERGUSON, J. H., E. GRAY y W. ENNIS. *Thromb. Diath. Haem.* 9: 62, 1963.
22. GOLDSTEIN, C., A. ENGEL y L. PECHET. *Xth. Congress. Inter. Soc. Haem. Estocolmo.* Agosto, 1964.
23. GRAHAM, J. B., G. D. PENICK y K. M. BRINKHOUS. *Amer. J. Physiol.* 164: 710, 1965.
24. GUEST, M. M. y A. G. WARE. *Science* 112: 21, 1950.
25. HAANEN, C. y J. G. G. SCHOENMAKERS. *Thromb. Diath. Haem.* 9: 557, 1963.
26. HARDISTY, R. M. y J. MARGOLIS. *Brit. J. Haemat.* 5: 203, 1959.
27. HARMISON, Ch. R., H. SCHRÖER y W. H. SEEGER. *50th Ann. Symp. Thromb. Diath. Haem.* 13: 587, 1965.
28. HEENE, D. L. y W. H. SEEGER. *30th Ann. Symp. Blood. Thromb. Diath. Haem.* 13: 581, 1965.
29. HIORT, P. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 9: supp. 27, 1957.
30. HOLEMANS, R. y H. R. ROBERTS. *J. Lab. Clin. Med.* 64: 778, 1964.
31. HÖRDER, M. H. y G. SOKAL. *Acta Haemat.* 14: 294, 1955.
32. HOUGIE, C. J. *Lab. Clin. Med.* 50: 61, 1957.
33. HUSSAIN, Q. Z. y T. F. NEWCOMB. *Ann. Biochem. Exp. Med.* 23: 569, 1963.
34. IATRIDIS, S. G. y J. H. FERGUSON. *Thromb. Diath. Haem.* 6: 411, 1961.
35. IATRIDIS, P. G. y J. H. FERGUSON. *Thromb. Diath. Haem.* 13: 114, 1965.
36. KOWARZYK, H. *Nature.* 719: 614, 1952.
37. KOWARZYK, H. y E. MARCINIAK. *Proceedings VIIIth. Cong. Eur. Soc. Tema.* Viena, 1961.
38. KOWARZYK, H. y E. MARCINIAK. *Pol. Tyg. Lek.* 16: 1641, 1961.
39. KOWARZYK, H., E. MARCINIAK y B. CZERWINSKA. *Arch. Immun. i Terapii Dosw.* 9: 719, 1961.
40. LANDABURU, R. H., y W. H. SEEGER. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 708, 1957.
41. LANDAEURU, R. H. y W. H. SEEGER. *Amer. J. Physiol.* 193: 169, 1958.
42. LANDABURU, R. H. y W. H. SEEGER. *Amer. J. Physiol.* 197: 1178, 1959.
43. LEWIS, J. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116: 120, 1964.
44. LEWIS, M. L. y A. G. WARE. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84: 635, 1953.
45. LEWIS, M. L. y A. G. WARE. *Blood.* 9: 520, 1954.
46. MACFARLANE, R. G. *Nature.* 202: 498, 1964.
47. MALHORTA, O. P. y J. R. CARTER. *30th Ann. Symp. Blood. Thromb. Diath. Haem.* 13: 581, 1965.
48. MAMMEN, E. F. *Thromb. Diath. Haem.* 11: 127, 1964.
49. MAMMEN, E. F. *30th Ann. Symp. Blood. Thromb. Diath. Haem.* 13: 582, 1965.
50. MAMMEN, E. F., W. R. YOSHINARI y W. H. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 5: 38, 1960.
51. MARCINIAK, E. *Bull. Acad. Polon. Sci.* 9: 381, 1961.
52. MARCINIAK, E. *30th Ann. Symp. Blood. Thromb. Diath. Haem.* 13: 578, 1965.
53. MARCINIAK, E., E. COLE y W. SEEGER. *Thromb. Diath. Haem.* 8: 425, 1962.
54. MARCINIAK, E., E. COLE y W. SEEGER. *Nature.* 195: 1305, 1962.
55. MARCINIAK, E., F. RODRÍGUEZ-ERDMANN y W. H. SEEGER. *Science* 157: 421, 1962.
56. MARCINIAK, E. y W. H. SEEGER. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 40: 597, 1962.
57. MARKWARDT, F., A. HOFFMANN y H. LANDMANN. *Thromb. Diath. Haem.* 11: 230, 1964.
58. MASURE, R. *Les inhibiteurs normaux et Pathologiques de la coagulation sanguine.* Éditions Arscia, S. A. Masson. Paris, 1960.
59. MCCLAUGHRY, R. E. y W. H. SEEGER. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80: 372, 1952.
60. MERTZ, E. T., W. H. SEEGER y T. H. SMITH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 41: 657, 1939.
61. MILSTONE, J. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103: 361, 1960.

62. MORAWITZ, P. *Ergbn. Physiol.* 4: 307, 1905.
63. NIEWIAROSWSKI, S. y Z. LATALLO. *Bull. Acad. Polon. Sci.* 5: 7, 1957.
64. NIEWIAROSWSKI, S. y O. PROU-WARTELE. *Thromb. Diath. Haem.* 3: 593, 1959.
65. NOLF, P. *Arch. Intern. Physiol.* 6: 306, 1908.
66. NOSSEL, H. L. Blackwell Scientific Publications. 1.^a Edit. Oxford, 1964.
67. OWREN, P. A. *Act. Med. Scandinav.* Suppl. 194, 1947.
68. OWREN, P. A. *Lancet.* 1: 446, 1947.
69. OWREN, P. A. *3rd. Inter. Congress. Inter. Soc. Hemat.* Grune and Stratton, pág. 379, New York, 1950.
70. OWREN, P. A. *Northwest. Med.* 56: 31, 1957.
71. PAPAHAJIOPOULOS, D., C. HOUGIE y D. J. HANAHAN. *Biochemistry.* 3: 264, 1964.
72. PITNEY, W. R. *Nature* 22: 1234, 1964.
73. QUICK, A. J. *J. Biol. Chem.* 109: 73, 1935.
74. QUICK, A. J. *Amer. J. Physiol.* 140: 212, 1943.
75. RATNOFF, O. D., E. W. DAVIE y D. L. MALLET. *J. Clinic. Invest.* 40: 803, 1961.
76. RATNOFF, O. D. y A. MARGOLIUS. *Transac. Assoc. Amer. Physiol.* 69: 149, 1955.
77. RATNOFF, O. D. y J. M. ROSENBLUM. *Amer. J. Med.* 25: 160, 1958.
78. RONWIN, E. *Acta Haemat.* 23: 129, 1960.
79. ROSKAM, J. *Thromb. Diath. Haem.* 12: 546, 1965.
80. SEEGER, W. H. *Schweiz. Med. Wschr.* 84: 781, 1954.
81. SEEGER, W. H. *Thromb. Diath. Haem.* 6: suppl. 1, 101, 1961.
82. SEEGER, W. H. *Prothrombin.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1962.
83. SEEGER, W. H. *New Istanbul Contr. Clin. Science.* 5: 3, 1963.
84. SEEGER, W. H. *Texas State J. Med.* 59: 1068, 1963.
85. SEEGER, W. H. *Canad. J. Biochem.* 42: 359, 1964.
86. SEEGER, W. H. *30th. Ann. Symp. Blood Thromb. Diath. Haem.* 13: 575, 1965.
87. SEEGER, W. H., N. AOKI y E. MARCINIAK. *New Istanbul Contr. Clin. Science* 5: 170, 1962.
88. SEEGER, W. H., E. R. COLE y N. AOKI. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 41: 2441, 1963.
89. SEEGER, W. H., E. COLE y N. AOKI. *Canad. J. Biochem.* 42: 229, 1964.
90. SEEGER, W. H., E. COLE, N. AOKI y Ch. R. HARMISON. *Canad. J. Biochem.* 42: 229, 1964.
91. SEEGER, W. H., E. COLE, N. AOKI y A. OLIVEIRA. *Nature* 200: 114, 1963.
92. SEEGER, W. H., E. COLE, Ch. R. HARMISON y E. MARCINIAK. *Canad. J. Biochem.* 41: 1047, 1963.
93. SEEGER, W. H., E. COLE, Ch. R. HARMISON y F. C. MONKHOUSE. *Canad. J. Biochem.* 42: 359, 1964.
94. SEEGER, W. H., E. COLE y E. MARCINIAK. *Thromb. Diath. Haem.* 7: 239, 1962.
95. SEEGER, W. H. y KAGAMI. *Canad. J. Biochem.* 42: 1249, 1964.
96. SEEGER, W. H. y R. H. LANDABURU. *Amer. J. Physiol.* 191: 167, 1957.
97. SEEGER, W. H., R. H. LANDABURU y J. F. JOHNSON. *Science* 131: 726, 1960.
98. SEEGER, W. H. y E. MARCINIAK. *Thromb. Diath. Haem.* 8: 1, 1962.
99. SEEGER, W. H. y E. MARCINIAK. *Nature* 193: 1188, 1962.
100. SEEGER, W. H., E. MARCINIAK y E. COLE. *Amer. J. Physiol.* 203: 397, 1962.
101. SEEGER, W. H., H. SCHROER y D. HEENE. *Thromb. Diath. Haem.* 14: 471, 1964.
102. SHERRY, S. y W. TROLL. *J. Biol. Chem.* 208: 95, 1954.
103. SHERRY, S., W. TROLL y H. GLUEK. *Physiol. Rev.* 34: 736, 1954.
104. SPAET, T. H. y J. CINTRON. *Blood.* 21: 745, 1963.
105. SPEER, R. J., H. RIDGWAY y J. H. HILL. *Xth. Congress. Inter. Soc. Haemat.* Estocolmo, 1964.
106. STRAUB, W. y F. DUCKERT. *Thromb. Diath. Haem.* 4: 402, 1961.
107. VON KAULA, K. N. y N. AOKI. *30th. Ann. Symp. Blood. Thromb. Haem.* 13: 583, 1965.
108. VROMAN, L. *30th. Ann. Symp. Blood. Thromb. Diath. Haem.* 13: 577, 1965.
109. WARE, A. G., M. M. GUEST y W. H. SEEGER. *J. Biol. Chem.* 169: 231, 1947.
110. WARE, A. G., M. M. GUEST y W. H. SEEGER. *Science* 106: 41, 1947.
111. WARE, A. G. y W. H. SEEGER. *J. Biol. Chem.* 172: 699, 1948.
112. WARE, A. G. y W. H. SEEGER. *Amer. J. Physiol.* 152: 567, 1948.
113. WARE, A. G. y W. H. SEEGER. *J. Biol. Chem.* 174: 565, 1948. colmo, 1964.