I. INTERPRETACION DE LA CINETICA DE LA COAGULACION DE LA SANGRE

Mecanismo de la función que regula la coagulación.

II. DE LA ALTERACION DE LA SANGRE HEMOFILICA

Por el Dr. CARLOS GARCES

Jefe de Laboratorio del Hospital L. Calvo Mackenna. Santiago.

I

A pesar de las extensas investigaciones realizadas con respecto a los factores que intervienen en la gelificación del fibrinógeno por la trombina y de haberse logrado importantes progresos en la purificación y conocimiento de la química de las sustancias que reaccionan para formar esta última, la función que regula el estado disperso del fibrinógeno en la sangre circulante y su coagulación en la sangre extravasada sigue siendo motivo de controversia y de nuevas teorías.

Las posiciones frente a este problema pueden resumirse en la forma siguiente:

La que supone que la activación de la protrombina del plasma está condicionada por la liberación de una sustancia tromboplástica contenida en las plaquetas (3, 32, 49, 67).

La que sostiene que los factores de la coagulación están normalmente en el plasma libre de plaquetas y que las sustancias activadoras de la coagulación entran en juego cuando se producen ciertas alteraciones físicas de la sangre (2, 41a, 44, 45, 57, 59, 60, 61, 76).

Entre estas teorías anteriores se sitúan los que aceptan una intervención parcial de las plaquetas, principalmente en la iniciación del proceso (35).

En el aspecto que contempla la regulación de la función coagulante de la sangre por los elementos que reaccionan para la formación de trombina en la forma ya fijada por Morawitz (54, 55, 56), Howell (41, 82) hace intervenir una antiprotrombina que impide la unión protrombinacálcio. Esta inhibición se rompería por la actividad de la substancia llamada tromboplastina, proveniente de las plaquetas y de los tejidos (5, 28).

Ha preocupado la atención de varios investigadores en que momento del proceso entra a actuar la heparina, o la combinación heparina-albúmina, coincidiendo numerosas experiencias en demostrar que el factor neutralizado es la trombina ya formada y, por lo tanto, no jugaría aquel complejo el papel de estabilizador de la protrombina (63, 68). La función antitrombica de la sangre, como es fácilmente demostrable, se ejercería en un período ya avanzado del proceso.

La participación de heparina en la estabilización de los factores de la coagulación en la sangre circulante podría también suponerse por inactivación de la substancia tromboplástica, de acuerdo con experiencias de Chargaff y asoc. (10), la que podría consistir en su separación de su unión en la molécula de trombina, para unirse a este otro complejo, en el que sufriría una desnaturalización por desplazamiento del constituyente fosfo-lípido.

En la sangre circulante, de acuerdo con consideraciones cinéticas que analizaremos, no aparecen inhibidos los factores potenciales de la coagulación, sino, más bien, es a la reacción misma a la que faltan ciertas condiciones físicas para hacerse aparente.

Son suficientemente conocidas las influencias que sobre la velocidad de coagulación ejercen determinadas superficies. La activación de la función tromboplástica por contactos ha sido interpretada por muchos investigadores como consecuencia de una destrucción de las plaquetas, elementos a los que sería preciso atribuir una fragilidad extraordinaria.

Una concepción más de acuerdo con la física de los fenómenos de superficie ha sido enunciada por Lengenhager (42), quien reconoció la activación de una tromboplastina difundida en el plasma, como ya lo había enunciado Nollf (57).

Son de especial interés las investigaciones de Lozner y Taylor (46) en relación con estos fenómenos. Ellas dejan en claro que distintos materiales de contacto con plasmas, libres de plaquetas, obran en distinto grado como excitadores

de la coagulación. Shütz (75) señaló la influencia de pequeñas corrientes eléctricas en la formación de fibrina en la superficie de láminas metálicas empleadas como electrodos.

El presente trabajo tiene por objeto relatar métodos de estudio de la cinética de la coagulación y tiende a esclarecer el mecanismo que regula la función de la coagulación de la sangre.

Como material de trabajo se empleó plasma normal humano, plasma de hemofílicos y plasma de gallina. Estos plasmas permiten extender el campo de estudio de esta función, por cuanto se reconocen en ellos, a la vez, marcadas diferencias y relaciones.

Antecedentes del orden de las reacciones que determinan la formación de la trombina.

La gelificación del fibrinógeno por la trombina, es la consecuencia de un proceso previo, a saber, la activación de la protrombina. La coagulación misma por la trombina tiene una velocidad suficientemente grande en relación a las de la primera etapa, de modo que, en amplios límites de experiencia, no influye en la apreciación de la velocidad de la reacción trombina-sustancia tromboplástica (ST). En efecto, una concentración suficiente de trombina activa, gelifica el fibrinógeno en pocos segundos.

La activación de la protrombina del plasma por tromboplastina de tejidos o complejo cefalina-proteína es la etapa que aquí interesa especialmente.

La velocidad de la reacción está condicionada por la concentración de ambos factores.

Ha sido demostrado que en plasma, la velocidad de la reacción protrombina-tromboplastina es función directa de la concentración de protrombina, de acuerdo con la experiencia de Quick (62, 64), en forma que la medida de los tiempos de coagulación del plasma, siendo constante la sustancia tromboplástica, constituyen la prueba para medir las variaciones de este factor de la coagulación.

En un sistema en que ambos factores reaccionan libremente, la unión protrombina-tromboplastina no se completa sino en un plazo relativamente largo (22, 50).

Las cantidades de sustancia tromboplástica (extractos de tejidos) necesaria para activar la protrombina, son muy pequeñas (18). Solamente en un corto espacio de la curva de acción las cantidades relativas de estos extractos influyen proporcionalmente sobre las velocidades de coagulación de un

plasma c de una mezcla fibrinógeno-protrombina (30, 53, 66). Más allá las cantidades no aumentan proporcionalmente la velocidad de la reacción.

Mertz y asoc. (53) han comprobado que bajo ciertas condiciones es posible establecer la unión estequiométrica de protrombina y S. tromboplástica.

En las experiencias de Fischer (25), la velocidad de la reacción sigue la proporcionalidad a las concentraciones del factor tromboplástico en un espacio de la curva. Con el aumento de la concentración, ésta toma una forma exponencial que se podría expresar muy aproximadamente por la ecuación

$$\frac{1}{t} = K \cdot \sqrt{C}.$$

Esta ecuación de la velocidad puede esperarse por la parte que aquí tiene la adsorción en sistema heterogéneo, y como tal, la ley de repartición sólo se cumplirá en un restringido espacio.

Gran parte de las dificultades para interpretar la cinética de las reacciones fundamentales de la coagulación derivan, sin duda, del carácter especialmente heterogéneo del sistema reaccionante.

Por otra parte, no es posible, sino a costa de graves alteraciones de su estado físico, privar a este sistema de las sustancias reaccionantes que él mismo posee. El plasma de gallina, que por su estabilidad es usado a menudo como material de experiencia, contiene todos los factores de la coagulación, y solamente difiere de otros en su inercia para desencadenar el proceso, el que, más adelante sigue igual curso que en los plasmas de mamíferos.

En un planteamiento riguroso no podríamos decir, con plena confianza, que la unión protrombina-sustancia tromboplástica es una reacción bimolecular, sino que deberíamos limitarnos a comprobar que teniendo este aspecto, las velocidades de coagulación en un sistema en que estas sustancias son llevadas a reaccionar, están influenciadas, en un espacio de la curva, por sus concentraciones relativas.

En la sangre existen normalmente los factores capaces de activar la protrombina, los que entran en juego cuando se producen determinadas influencias físicas, que se presentan constantemente cuando la sangre es extravasada. Es aquí donde hay que esclarecer, si la reacción que se produce en la sangre, es la unión de protrombina con una sustancia tromboplástica contenida en los elementos figurados de la sangre

o repartida en el plasma y cual es el mecanismo que regula esta unión.

La sangre de hemofílicos nos proporciona un material de especial importancia para el estudio de este problema. En él falta o está enormemente disminuido el factor que provoca la activación de la protrombina. La agregación a la sangre, o al plasma de hemofílicos de extractos de tejidos, de venenos de víboras y de otras sustancias tromboplásticas, permiten restituir la función coagulante en la forma que lo hace la sangre o el plasma de individuos normales.

El contenido de protrombina en la sangre de estos enfermos, es generalmente normal. En los casos estudiados por nosotros ha sido medido en la forma establecida por Quick (62, 74, 79), revelando la normalidad de este factor.

El estudio comparativo de la cinética en los distintos plasmas humanos en que se han eliminado los elementos figurados, especialmente las plaquetas, y en el plasma de gallina las células, permite deducir la existencia de un factor tromboplástico del plasma como ya lo enunció Nolf (57) y ha sido sostenido después por varios investigadores (2, 41a, 44, 45, 57, 59, 60, 61, 76). Este factor se encuentra en cantidad suficiente para formar una cantidad de trombina mayor que la necesaria para coagular todo el fibrinógeno del plasma.

Este factor plasmático tiene una modalidad de acción sobre la protrombina que le da a la reacción un aspecto muy especial. La reacción misma tiene que vencer en su comienzo una inercia del sistema, lo que ha llevado a considerar en esta reacción un período latente o preparatorio del proceso. De acuerdo con la experimentación, se llega a interpretar el período latente como aquél en que, por condiciones del sistema, las sustancias reaccionantes no alcanzan una concentración que haga apreciable la formación del producto activo, o sea, la trombina.

La velocidad de esta reacción dependerá, en este sistema, de la velocidad de difusión de las sustancias reaccionantes, velocidad que por lo menos para una de ellas, la sustancia tromboplástica del plasma, es muy pequeña.

Fischer (24) comprueba que la liberación de "radicales activados" de la coagulación va en aumento hasta el momento en que el fibrinógeno es coagulado, entonces sufrirían una disminución de actividad. De modo que no existiría propiamente un período latente sino una marcha ascendente de la concentración de los factores de la coagulación hasta el momento crítico que determina el cambio visible del estado físico del plasma. Fischer, que trabajó con plasma de galli-

na, interpreta como "radicales activados" los que entran a formular en el proceso y no los supone formados de antemano. En efecto, en el plasma de estas aves, la unión trombina-fibrinógeno es más estable que en otros y no se revela tan precisamente como en el plasma humano y de mamíferos, que cantidades apreciables de trombina libre aparecen en el sistema poco antes, durante y por un tiempo, después de la coagulación. En el plasma de aves se aprecia, más bien, una alta concentración de substancia tromboplástica libre y débil cantidad de trombina, al final de la coagulación y después de haberse ésta terminado.

En las experiencias siguientes se demuestra cómo durante el período inicial de la coagulación en el plasma se va produciendo una activación, que se manifiesta por la acción excitante que va adquiriendo para coagular la sangre hemofílica. El momento en que hay suficiente trombina libre, lo indica su capacidad de coagular plasma citratado y fibrinógeno, en ausencia de Ca . .

CUADRO N.º 1

Aumento de los cuerpos activos de la coagulación a medida que avanza el proceso.

Sistema I Plasma humano 0,1 en 0,5 de vol. Después del tiempo t, desde que se agrega Ca . . . se agre- gan 0,05 ml. a cada tubo de los otros sistemas minutos	Sistema II Plasma humano citratado (inves- tigación de trom- bina libre). $v = \frac{1}{t} \cdot 1,000$	Sistema III Solución de fi- brinógeno (in- vestigación de trombina libre) $v = \frac{1}{t} \cdot 1,000$	Sistema IV Plasma hemofili- co (investigación de factor trom- boplástico) $v = \frac{1}{t} \cdot 1,000$
0	0	0	0,4
1	0	0	0,66
2	0	0	0,84
3	0	0	3,24
4	12,6	9,5	20,8
5	20	14,2	33,0
6 (coagulac.)	23,8	16,3	43,0
10	25,1	17,2	43,0
15	24,6	17,2	43,0
20	21,4	15,3	35,0
40	9,5	10,4	23,0

Desde los tubos del primer sistema en proceso de coagulación, se traspasan cantidades fijas de plasma o líquido-suero a plasma humano citratado y solución de fibrinógeno. Se observa que el plasma humano contiene ya antes de la coagulación una cantidad apreciable de trombina, porque es activo en el segundo y tercer sistema sin calcio.

La activación de la coagulación para plasma hemofílico (IV) es manifiesta ya desde el segundo minuto y crece mucho en la vecindad de la coagulación del sistema excitante. Para los tres sistemas excitados (II, III y IV) comienza a descender el efecto a los 20 minutos, porque entra en juego la acción antitrombica.

CUADRO N.º 2

Sistema I	Sistema II	Sistema III
Plasma de gallina 0,1 en volumen 0,5 ml. t. en minutos	Plasma de gallina citratado Ca . . y 0,05 ml. de siste- ma I después del tiempo t	Plasma de gallina citratado sin agregación de Ca . . — 0,05 ml. de plasma I después del tiempo t 1
	$v = \frac{1}{t} \cdot 1.000$	$v = \frac{1}{t} \cdot 1.000$
1	1,6	0
2	1,9	0
3	1,8	0
4	1,9	0
5	1,9	0
6	2,1	0
7	2,7	0
8	2,7	0
9	2,9	0
10	3,3	0
12 (coagulación)	4,1	0
32	11,1	1,1 (trombina libre)

Plasma de gallina se hizo coagular por agregación de pequeña cantidad de suero. De tiempo en tiempo se traspasó una pequeña cantidad a tubos que contenían igual cantidad de plasma que los del primer sistema y se midieron sus velocidades de coagulación. Se ve que a medida que avanza el proceso de coagulación en el primer sistema su acción excitante para el segundo va haciéndose mayor. Este efecto es más intenso varios minutos después que coaguló el plasma, debido a que hay trombina libre que se manifiesta, porque gelifica sin calcio el fibrinógeno en el tercer sistema.

Se observa en el cuadro N.º 1 que a medida que avanza el proceso de la fase inicial de la coagulación, el plasma presenta una actividad creciente de los factores que estimulan la coagulación de plasma hemofílico, a los 4 minutos después hay una cantidad apreciable de trombina libre en el sistema deducido de su capacidad de coagular fibrinógeno y plasma citratado sin agregación de Ca.

Siguiendo el proceso de coagulación con plasma de gallina, sin agregación artificial de sustancia tromboplástica (Cuadro N.º 2) se encuentra menos cantidad de trombina libre que en plasma humano normal, en cambio, la sustancia activadora de la coagulación sigue una curva progresivamente creciente hasta el momento de la precipitación del fibrinógeno y sobrepasa este período.

GRAFICO I

La curva A marca, en función del tiempo, el efecto excitante sobre la velocidad de coagulación del sistema I sobre plasma hemofílico (cuadro 1).

La curva B indica la trombina libre en el sistema I.

La curva C sigue el ascenso de la activación en plasma de gallina (cuadro 2).

La flecha indica el momento en que se produjo la coagulación en uno y otro sistema.

Nótese el descenso de la curva en A y B, después de la coagulación, por efecto de la función antitrombica.

LEY DE LA AUTO-ACTIVACION ILIMITADA

Técnica de la coagulación en serie.

La medida del tiempo que tarda en coagular una porción de plasma o de sangre, no permite una información precisa de los factores que están reaccionando.

La medida directa de la velocidad de coagulación, por muy escrupuloso que sea el método seguido, denuncia las distintas influencias que ha sufrido la sangre extravasada, no siendo indiferente, la forma en que se hizo la extracción, las superficies con que se puso en contacto. Para la velocidad de coagulación del plasma, es preciso también tener en cuenta los anticoagulantes, la cantidad de sal cálcica que se agrega, etc. Cualquiera manipulación o la simple dilución han alterado, de antemano, el sistema reaccionante.

Por otra parte, la coagulación no es un proceso continuo, sino que él se cumple en diferentes etapas que pueden iniciarse y proseguirse, con distintas velocidades en varios focos de la masa del sistema. Es así como sucede que la gelificación se inicia en ciertas zonas de las superficies límites y se propaga de ahí hacia la masa. Si la velocidad no adquiere un rápido progreso, es posible la intervención de la función antitrombica, produciendo un mayor retardo ya no dependiente de un defecto de los factores de la coagulación.

La apreciación de la marcha progresiva del proceso no puede alcanzarse por la simple medición del tiempo que tarda en precipitar el fibrinógeno en condiciones arbitrarias de experiencia. Es preciso analizar si se cumplen o no las etapas normales, lo que se obtiene mediante la técnica de coagulación en serie.

Esta técnica se funda en los hechos ya expuestos de que el plasma, a medida que progresa el proceso de la coagulación, va siendo más activo para excitar la velocidad de coagulación en nuevas porciones de plasma o de sangre. Para demostrar esta activación de la velocidad se traspasa a una porción siempre fija de plasma una cantidad determinada de líquido-suero formado inmediatamente después de la formación de fibrina. Estos trasposos pueden hacerse en línea ilimitada, comprobándose que en el plasma normal se al-

canza después del primer traspaso una velocidad máxima que se mantiene indefinidamente en los pasos sucesivos.

No sólo nos interesa establecer la actividad actual de la reacción, sino también, que desde que se desencadena la reacción entran a ser activadas constantemente, por un mecanismo autónomo, nuevas cantidades de protrombina con mayor velocidad que al comienzo.

La técnica de la coagulación en serie nos informa, de inmediato, acerca de la integridad del sistema, indicándonos si se cumple la Ley de la auto-activación ilimitada que rige la marcha normal del proceso.

Sangre humana se extrae por punción venosa, con jeringa vaselinada y se vierte en tubo de centrifuga recubierto de parafina. Se mezcla con solución de citrato de sodio a 3,8 %, es proporción de un ml. de la solución por 4 de sangre. Inmediatamente la sangre es centrifugada a 3.500 r. p. m. durante 10 minutos. Se retira el plasma con pipeta recubierta de parafina o de colodión para colocarlo en otro tubo de centrifuga, en iguales condiciones que el primero. Nueva centrifugación por 15 minutos, para eliminar, en lo posible, las plaquetas. Se retiran ahora los 4/5 superiores del plasma, evitando la porción inferior que contiene la gran parte de las plaquetas.

Se disponen, en línea, tubos de reacción de vidrio neutro de 8 mm. de diámetro en un baño de agua a 38° C.

La sangre de gallina se puede extraer del corazón o de la carótida, pero es necesario eliminar la primera porción de sangre extraída y cambiar la jeringa, a fin de evitar la substancia tromboplástica que pudo haberse mezclado con la primera porción.

Muestras de sangre de gallina se mezclan con citrato y otras se dejan sin anti-coagulantes. La extracción del plasma se hace en la misma forma ya dicha, cuidando de eliminar completamente los elementos figurados de la sangre. En el primer tubo de la serie se miden 0.2 ml. de plasma; 0.2 ml. de sol. salina 0.85 por ciento y 0.1 de una solución de Ca^{++} que se ha titulado para fijar cuál es la concentración que frente a un plasma estimula la coagulación en el menor tiempo. Esta concentración se encuentra, a menudo, entre 0.06-0.075 M, y se ajusta partiendo de una sol. 0.1 M.

La coagulación del plasma humano recalcificado tarda, de 6-8 minutos, en superficie de vidrio, cuando no ha sido alterado por contactos anteriores con superficies activas. El plasma de gallina obtenido de sangre citratada y recalcificado, lo hace en tiempos semejantes. El plasma de gallina obtenido sin anticoagulantes, presenta, en cambio, gran estabilidad, manteniéndose sin coagular durante horas.

Una vez terminada la coagulación del fibrinógeno, se procede a extraer del primer tubo de la serie la cantidad de 0.05 ml. de suero exprimido y a traspasarlo al segundo tubo, en el que se colocan inmediatamente las mismas

cantidades de plasma y de Ca^{++} como en el 1.º. El tiempo que tarda el plasma humano en gelificar su fibrinógeno por esta agregación de suero, producido en el primer tubo, es de 30 a 50 segundos. El suero formado es, a su vez, traspasado a un 3.º, en iguales condiciones de experiencia y así, sucesivamente, hasta comprobar que se establece una velocidad uniforme de la coagulación, en serie ininterrumpida.

CUADRO N.º 3

Coagulación en serie con plasma normal:

Plasma normal	I	II	III	IV	V	VI
Plasma diluido 1 x 1 ..	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ca 0,06 M.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Suero del sistema inmediatamente anterior ..	—	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Tiempo de coagulación en segundos	820	35	38	37	43	32

En plasma humano citratado se provoca la coagulación por agregación de Ca^{++} . El primer tubo coagula en 820 segundos. Se exprime el coágulo recientemente formado y se recogen 0,05 ml que se pasan al segundo, recalcificando inmediatamente este sistema. Se procede en igual forma, desde el segundo al tercero, del tercero al cuarto, etc.

Se observa que desde el primer traspaso los tiempos de coagulación son aproximadamente iguales y muy cortos.

En este mismo tipo de experiencia se demuestra fácilmente que la ausencia de calcio en el sistema no influye sobre la precipitación del fibrinógeno por la trombina, pero que la presencia de este cuerpo es indispensable en la reacción protrombina-sustancia tromboplastica, por cuanto, si se priva al sistema de Ca^{++} , la serie se interrumpe.

CUADRO N.º 4

Coagulación en serie, sin agregación de Ca^{++} desde el 2.º tubo:

	I	II	III	IV
Plasma diluido	0,3	0,3	0,3	0,3
Ca 0,06 M.	0,1	—	—	—
Suero del sistema inmediatamente anterior ..	—	0,05	0,05	0,05
Tiempo de coagulación en segundos	1410	46	1630	∞

Se observa que el Ca ... es indispensable para la activación en serie de la protrombina.

El defecto de coagulación del plasma de hemofílico se manifiesta por su incapacidad de autoactivarse en la coagulación en serie (cuadro 5.º).

CUADRO N.º 5

Coagulación en serie con plasma de hemofílico:

Plasma hemofílico	I	II	III
Plasma diluido 1 x 1	0,3	0,3	0,3
Ca 0,07 M.	0,1	0,1	0,1
Suero del sistema inmediatamente anterior	—	0,1	0,1
Tiempo en segundos	6460	5240	5970

Se observa que no hay activación apreciable.

La agregación al plasma hemofílico de substancia tromboplastica aumenta la velocidad de coagulación en la serie, hasta donde esta substancia es agregada al sistema (cuadro N.º 6).

CUADRO N.º 6

Plasma de hemofílico con agregación de tromboplastina en el primer tubo de la serie y pasajes de suero sucesivamente a los demás sin agregación de tromboplastina. Se observa que la trombina no se regenera por falta de factor tromboplástico en el sistema:

	I	II	III	IV
Plasma diluido	0,3	0,3	0,3	0,3
Ca 0,06 M.	0,1	0,1	0,1	0,1
Tromboplastina (de cerebro de conejo)	0,05	—	—	—
Tiempo de coagulación en segundos	45	34	1150	+ de 1
Suero del sistema inmediatamente anterior	—	0,1	0,1	0,1
				hora

En el primer tubo hay rápida coagulación por efecto de la tromboplastina agregada a él. En el segundo, el tiempo de coagulación es también muy corto debido a la trombina formada en el primero y que pasó al segundo.

En el paso del II al III y los siguientes, la coagulación se muestra muy prolongada, porque se interrumpe la activación de protrombina por haberse agotado la tromboplastina agregada y no existir en el plasma hemofílico cantidad suficiente que pueda liberarse.

El plasma de gallina, que tiene una notable estabilidad en el medio exterior, se comporta en la coagulación en serie en la misma forma que el plasma normal de hombre y de mamíferos (cuadro 7).

CUADRO N.º 7

Auto-activación del plasma de gallina:

	I	II	III	IV
Plasma citratado diluido				
1 x 1	0,3	0,3	0,3	0,3
Ca . . 0,05 M.	0,1	0,1	0,1	0,1
Suero del sistema inmediatamente anterior	—	0,05	0,05	0,05
Tiempo de coagulación en segundos	540	78	63	65

Se ve aquí que una vez iniciada la coagulación en el plasma de gallina, se puede seguir una serie continua de activación de la protrombina por un mecanismo autónomo de liberación de S. T.

De modo que la diferencia entre el plasma de estas aves y el de los mamíferos no está en los factores de la coagulación, sino en una diferente sensibilidad a las influencias físicas que modifican, en unos más que en otros, la estabilidad del sistema.

El análisis de las experiencias referidas en estos plasmas lleva a sentar, como un hecho fundamental, que una substancia tromboplástica existe en el plasma normal independientemente de las plaquetas y demás células de la sangre. Que esta substancia está frenada para reaccionar con la protrombina mientras se mantiene la integridad del sistema plasma; pero éste se altera profundamente a medida que la reacción avanza y llega a su máximo, cuando el fibrinógeno pierde su estado de dispersión. En otras palabras, los cambios físicos que va experimentando el plasma determinan que esta reacción varíe su velocidad.

Este método de experiencia revela, simplemente, que el estado físico de las albúminas, funciona como un protector

del estado en que se encuentra la substancia tromboplástica de la sangre. Además, nos da la clave de una función reguladora de la formación de trombina por liberaciones sucesivas de S. T.

Teniendo presente esta modalidad de la cinética de la coagulación, deducimos que en las condiciones en que se hace posible proseguir indefinidamente el proceso, las concentraciones de S. T. tienden a hacerse constantes.

La velocidad de la reacción depende de la velocidad de difusión de la substancia tromboplástica y como ésta llega a hacerse constante, la marcha de la reacción toma una forma semejante a una reacción autocatalítica.

De estas consideraciones cinéticas, debe esperarse que la curva de velocidad de la coagulación debe tener una etapa inicial muy lenta, durante la que se efectúan o se completan los fenómenos que rompen la estabilidad del sistema heterogéneo, luego una segunda en que se forman los focos de coagulación y por fin, aquélla en que, progresivamente, a medida que avanza la precipitación del fibrinógeno, la S. T. va difundiendo, hasta completarse el proceso en toda la masa de sangre o plasma.

De la etapa inicial de la coagulación y de los fenómenos de superficie. Papel que desempeñarían las plaquetas.

La sangre, como el plasma humano y de mamíferos, presentan, como es sabido, una sensibilidad muy marcada al efecto de determinadas superficies como excitantes de la coagulación. Estos efectos son menos marcados en las aves.

En las experiencias de Lozner, Taylor y Mac Donald (46), queda mejor esclarecida que en otras que el simple contacto del plasma con diferentes materiales determina diferencias notables en los tiempos en que éste coagula, aunque la coagulación se provoque después en condiciones uniformes frente a superficies poco activas, como son las de "lusteroid". El vidrio es uno de los materiales que acorta en forma más pronunciada los tiempos de coagulación de la sangre o del plasma. Es, asimismo, de interés la comprobación de estos investigadores de que la fracción euglobulina de plasma normal que promueve la coagulación de plasma de hemofílicos, sería también activada por efecto de las mismas superficies.

El esclarecimiento de estos fenómenos es del mayor interés en la explicación del mecanismo físico que desencadena las reacciones o aceleran su velocidad. Las experiencias, que

aquí se relatan, concuerdan, en sus líneas generales, con las ya conocidas. Sin embargo, es necesario ahondar en nuevas comprobaciones para lograr una explicación más completa de estas influencias físicas.

Para examinar la naturaleza del efecto excitante para la velocidad de coagulación que producen algunas sustancias de contacto, se empleó vidrio molido finamente, carbón animal pulverizado y tierra silícica. Estos materiales revelan tener muy bajo poder de adsorción para los factores de la coagulación, frente a plasmas descalcificados por anticoagulantes o por diálisis. En cambio, cuando el plasma es recalcificado, se produce una rápida adsorción en su superficie, lo que se demuestra porque estos substratos, después de lavados, aumentan notablemente las velocidades de coagulación en nuevos sistemas de plasma a los que se agregan y también coagulan fibrinógeno, cuando en el plasma adsorbido se ha alcanzado a la formación de trombina.

CUADRO N.º 8

Adsorbente	Tiempo de contacto con el plasma desde que se agrega Ca. (segd.)	Sistemas a los que se agrega carbón y tierra silícica lavados después de la adsorción		
		A	B	C
		Plasma humano	Plasma de 62 días	Solución de fibrinógeno (investigación de trombina)
		Tiempo de coagulación en segundos		
Carbón animal	0	320	890	—
	60	205	220	—
	98	160	195	320 pequeño coágulo
	185	145	175	240
Tierra silícica	0	560	870	—
	65	170	490	—
	130	58	110	420 coágulo completo

Se aprecia en esta experiencia que desde la agregación de iones Ca. . . a un plasma humano que se mezcla, respectivamente, con carbón y tierra silícica, se va produciendo una adsorción creciente en estas sustancias de los factores de la coa-

gulación, lo que se manifiesta porque ellas provocan un acortamiento de los tiempos en que coagulan los plasmas a los que se agregan estos substratos, después de lavados. La adsorción de trombina activa se manifiesta por la capacidad del carbón y de la tierra silícica de coagular fibrinógeno.

CUADRO N.º 9

Activación por adsorción.

Sustancias con que se trata el plasma en proceso de coagulación	Acción del sustrato lavado sobre la velocidad de coagulación $v = \frac{1}{r} \cdot 1.000$		
	Plasma humano fresco	Plasma humano de 62 días	Solución de fibrinógeno
Vidrio molido	12,5	7,4	1,1
Polvo de carbón	20,8	13,2	2,3
Tierra de infusorios	16,6	9,1	2,2
Control no activado	2,6	1,06	0

Las sustancias con que se adsorbieron los factores activos de la coagulación se lavaron dos veces con Solución Ringer y se agregaron a plasma humano en igual proporción que tenían en el que fué adsorbido. Tanto el plasma fresco, como el que había sido conservado por dos meses, aumentaron considerablemente sus velocidades de coagulación. Frente a fibrinógeno produjeron un pequeño coágulo en la proximidad de la sustancia agregada, demostrando que se había formado trombina en su superficie.

El efecto acelerador de la velocidad de la coagulación de estas sustancias se pone de manifiesto cuando el plasma se agita un momento con una pequeña cantidad de ellas.

CUADRO N.º 10

Comparación del tiempo de coagulación de un plasma agitado con diferentes sustancias y del mismo en reposo y en tubo cubierto con parafina:

Con polvo de carbón	292"
Con vidrio molido	204"
Con tierra de infusorios	126"
Control	440"

Cuando al plasma humano en proceso de coagulación se le agregó una pequeña cantidad de carbón, vidrio molido

o tierra silícica, la coagulación ocurrió en un tiempo más corto que el control no tratado.

No pueden quedar dudas, al revisar experimentalmente este problema de la influencia de superficies sobre la velocidad de gelificación del fibrinógeno, que ellas introducen una fase de adsorción en el sistema reaccionante, realizando el conocido efecto catalítico por esta clase de influencia física.

El hecho que los potenciales de adsorción de estos sistemas examinados se elevan desde el momento en que se introducen aquellos cationes, para los que los factores de la coagulación tienen una afinidad casi específica, indica que la diferencia de carga es suministrada por ellos y que debe ser distinta a la que las sustancias reaccionantes tenían en el estado de reposo de la reacción.

Este concepto está también de acuerdo con la degradación del sustrato proteínico que permite la auto-activación de la reacción por liberación consiguiente de la sustancia tromboplástica, inhibida en el equilibrio normal del plasma.

El cambio de potencial, que sería la esencia de la activación de las sustancias de la coagulación, determina una inversión de las fases.

No está fuera de lugar suponer que las plaquetas llegan a constituir superficies naturales de contacto, desempeñando el mismo papel que el de las partículas extrañas que se introducen en la sangre o en el plasma.

Función del calcio.

No ha sido menos discutido que para los otros factores el papel que desempeña el calcio en la coagulación.

En la molécula de trombina no parece tener este cuerpo una proporción definida (16). Otro aspecto de interés acerca del posible papel que desempeña es que su concentración presente un óptimo para la reacción protrombina-sustancia tromboplástica, alejado de este óptimo, la velocidad disminuye hasta anularse.

Algunos investigadores han supuesto que el calcio participa en una reacción intermedia, antes de la formación de trombina (27, 73), Dickerhoff (16) piensa que su acción es la de liberar a la trombina de inhibidores que la mantienen inactiva, función que tendría también la tromboplastina.

En el análisis de las reacciones que se producen en el plasma y que llevan a la formación de trombina se imponen a la consideración las múltiples fases que intervienen en esta

sistema heterogéneo, inclusive las que pueden llegar a ejercer acción catalítica de superficie.

Estos procesos están condicionados por los potenciales de las fases que intervienen en la adsorción. Esta diferencia de potenciales puede producirse en el curso de la reacción a consecuencia de la adsorción de cationes como en este caso. En la adsorción que se encuentra para las sustancias de la coagulación por ciertas sustancias, como el vidrio, tierra de infusorios y carbón, hemos visto que la presencia de iones de calcio la elevan en forma considerable.

De la intervención de estos cationes, resulta también la activación de la protrombina a trombina. De modo que esta adquisición de cargas positivas se demuestra esencial, tanto en la formación de trombina, como en la acción catalítica de las superficies. Debe también suponerse que la trombina misma reacciona con el fibrinógeno merced a esta diferenciación de su potencial. En este sentido, Del Baere (12) ha demostrado, por experiencias de cataforesis, la adquisición de una carga positiva por la trombina, que la diferencia de la protrombina, como de las albúminas del plasma, que son negativas.

La o las sustancias tromboplásticas serían, según esto, aquéllas capaces de formar estas afinidades físicas para ciertos cationes.

Es así como la acción de la trombina sobre el fibrinógeno no tiene el carácter de una unión química sino la de condensar el coloide en la forma estructurada que representa el gel, gracias a la orientación que imprime su carga.

El cambio de agrupación del coloide fibrinógeno libre, como es sabido, a la trombina.

De modo que al final de la reacción trombina-fibrinógeno hay una reversión de una de las sustancias reaccionantes y no una acción catalítica de ésta, como han supuesto algunos investigadores, por cuanto la trombina actúa sobre el fibrinógeno cuantitativamente.

II

El defecto de coagulación en hemofilia se ha atribuido a los diferentes factores, ya sea deficientes o alterados. Se pensó que pudiera consistir en una mala calidad de la protrombina (1). La falta de un factor tromboplástico en la sangre de estos enfermos ha quedado bien establecido por los trabajos de Quick (64, 67), Patek y Taylor (61); Howell (41a); Evans y Howell (20a) y otros.

Lozner, Kark y Taylor (43) habrían obtenido del plasma normal el factor en defecto en hemofílicos, libre de fibrinógeno y protrombina; este factor no sería de naturaleza protéica. Para Bendien y van Creveld (2) faltaría en hemofílicos una globulina de coagulación que ellos habrían separado del plasma por adsorción.

La substancia que provoca la activación de la protrombina en el plasma ha sido señalada en una euglobulina del plasma (45) por Lozner y Taylor, Legenhager (42), la habrían extraído por adsorción con caolín.

Muchos investigadores invocan como causa de la falta de substancia tromboplástica en la sangre hemofilia a un defecto que estaría en las plaquetas, según el concepto que estos elementos serían los portadores normales. La causa más importante sería una deficiente desintegración de estos elementos (4, 29, 32, 49, 67). Quick (67) aporta la prueba de coagulación de plasma hemofílico obtenido de sangre centrifugada a alta y baja velocidad. En el primer caso, la coagulación se prolonga mucho más que en la otra en que quedan plaquetas después de la centrifugación. Brinkhous (4) encuentra que hay una lenta desintegración de plaquetas. Eagle (18), como varios investigadores, no han comprobado anormalidad de las plaquetas en hemofilia.

En el estudio que hemos expuesto de la cinética de la coagulación en plasma normal y hemofílico, hemos señalado la diferencia fundamental que hay entre ambos. En el plasma hemofílico, centrifugado a alta o a baja velocidad, no se cumple la ley de la autoactivación ilimitada que caracteriza la coagulación de todo plasma normal. Este defecto no puede ser atribuido a otra causa que a la ausencia o gran disminución de una substancia tromboplástica del plasma (S. T.). Esta substancia, que comanda la activación de la protrombina, está inhibida durante el equilibrio físico-químico normal de la sangre. Pero basta que se rompa éste, en cualquier punto, para que su difusión aumente gradualmente y propague su liberación, en forma ilimitada, a toda porción de plasma con que se ponga en contacto. En el plasma normal, la única limitación de esta marcha creciente es la función antitrombica, la que manifiesta tener una velocidad mucho menor que la que alcanza la primera fase de la coagulación y, por lo tanto, en las condiciones normales, no es capaz de inhibirla.

Ha sido suficientemente demostrado que la agregación de tromboplastina a sangre hemofílica provoca rápida coagulación.

La simple explicación patogénica de la hemofilia por la ausencia de un factor tan difundido en el organismo animal, no parecería ser suficiente y hace pensar que en el plasma falta alguna otra condición que existe en la sangre normal.

Uno de estos hechos es la gran cantidad de un factor tromboplástico presente en la saliva de estos enfermos. La saliva de estos enfermos es activa en la coagulación de sangre hemofílica, según algunas de nuestras experiencias en proporción de 1 x 200, actividad que no suele alcanzar la saliva de individuos normales.

La extracción y purificación de esta S. T. de la saliva es del mayor interés, por cuanto está contenida en un material muy pobre en albúmina. Experiencias hemos hecho para extraerla con hidróxido de Mg. y elución con anhídrido carbónico, según la técnica de Seegers para obtener protrombina (69). También, con tierra silícica y caolín.

Con la primera técnica hemos obtenido una pequeña parte de la substancia activa en saliva bruta, alrededor de un quinto. En una de estas experiencias, después de dialisis y desecación a vacío, quedó un residuo de 2,6 mgrs.

Su actividad para restituir la coagulación en plasma hemofílico alcanzó a 1 x 50,000.

CUADRO N.º 11.

Se agrega substancia tromboplástica a un tubo de las series.

Experiencia	I	II
Plasma hemofílico diluido 1 x 1	0,3	0,3
Ca 0,075 M.	0,1	0,1
Sol. de sustancia tromboplástica de saliva	—	0,1
Tiempo de coagulación	+ de 1 hora	6 mín.

La substancia tromboplástica extraída de saliva del mismo enfermo, produce un acortamiento marcado en el segundo tubo que la recibe.

Cuando el plasma hemofílico se mezcló con la solución de este extracto, se comportó en la prueba de coagulación en serie, en forma indistinguible de un plasma normal.

CUADRO N.º 12

	I	II	III	IV	V
Plasma hemofílico mezcla alícuota con soluc. de substancia tromboplásti- ca extraída de saliva	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ca 0,075 M.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Suero del sistema inmedia- tamente anterior	—	0,05	0,05	0,05	0,05
Tiempo de coagulación en segundos	370	46	44	53	39

La substancia tromboplástica de la saliva restituye en el plasma hemofílico la función de coagulación en serie a una velocidad uniforme.

20 ml. de saliva de hemofílico se diluyeron a 50 ml. en agua destilada y se filtró por papel. En seguida se centrifugó a alta velocidad para eliminar todo residuo grueso.

El líquido claro se llevó a pH 5,6 con ácido acético y se calentó a 48° C. durante ½ hora. Se procedió a enfriarlo, en seguida, a 0°, manteniéndose a esta temperatura durante 2 horas.

Se elevó su temperatura a 5° y se filtró por pequeño filtro Seitz.

El filtrado claro dió 32 ml. El líquido se agitó durante ½ hora con 3 ml. de suspensión de hidróxido de magnesio. Fué después centrifugado y el sedimento se suspendió en 80 ml. de agua. Se hizo la elución durante 20 horas con anhídrido carbónico, en que el precipitado se agotó. Se dializó por 30 horas, hasta eliminación del carbonato de magnesio. La pequeña turbidez se eliminó por filtración a través del filtro Seitz. El líquido se desecó a vacío. El residuo pesó 2,6 mgrs.

El precipitado se disolvió en 5,2 ml. de solución salina tamponada a pH 7,2. Una muestra de esta dilución no dió ningún precipitado con ácido tricloroacético.

La actividad tromboplástica obtenida, referida a la que tenía la saliva, fué aproximadamente de un quinto, por lo que se deduce que hubo una gran pérdida por este método de extracción. El calentamiento a 60° no produjo inactivación apreciable a los 10 minutos. No se inactivó por ebullición durante un minuto.

Otro hecho interesante y que confirmaría lo encontrado por Gremke y Koletzko (36) es la actividad tromboplástica variable que se encuentra en orina.

En orina hemofílica no hemos encontrado diferencia apreciable con la de individuos normales. Una pequeña activi-

dad tromboplástica se revela en orina en diluciones hasta de 1 x 5 para el plasma de hemofílico.

Estas comprobaciones podrían dar luz sobre un posible ciclo de la substancia tromboplástica. La cantidad elevada de este factor que secretan las glándulas salivales sugiere que su elaboración pudiera estar en ellas y, posiblemente también, en otras glándulas. La excreción urinaria del factor correspondería, en esta suposición, a una función reguladora de su concentración en la sangre.

Bajo todos los aspectos, la substancia tromboplástica del plasma no es ella misma una proteína, pero una proteína debe ser el sostén normal. La marcha que sigue normalmente el proceso indica que este sostén va perdiendo su afinidad para la S. T., a medida que se activan los factores de la coagulación, lo que es lo mismo, cuando éstos cambian su potencial por adsorción de cationes como el Ca . .

Summary.

The highly controverted problem of the function which regulates the spontaneous gelification of fibrinogen in blood is tackled in this paper.

The experiments described here were carried out in human plasma of both normal and hemophilic persons, and in chicken plasma centrifuged at high speed as a means to eliminate the figured elements.

The hemophilic blood is particularly useful for the study of the kinetics of the process, as the thromboplastic substance (T. S.) of the plasma is very low in it.

The measure of the spontaneous clotting time or of that brought about by aggregation of tissue extracts foreign to blood is not suitable to establish the order of the reactions that are taking place, if each one of the stages of the process is not analysed.

The so-called latent stage of clotting is simply that in which important changes in the phases of an heterogeneous system are happening. This fact determines the increase of the velocity of reaction of the different factors concerned. The velocity of this reaction is very low at the beginning, and almost null in plasma that has not been altered in its physico-chemical equilibrium. But it increases constantly and in function of the increase of the concentration of the T. S. which is being liberated as a consequence of the fall in the potential of adsorption of the proteinic support.

The concentration of the active substances reaches its maximum in the neighbourhood of the gelification of the fibrinogen, as Fischer had already observed.

A larger amount of active T. S. than free thrombine seems to occur in chicken plasma when the physical state of fibrinogen is changing. In human plasma an earlier formation of free thrombine is evidenced.

The experiment which support these conclusions consists in activating new portions of plasma and fibrinogen with small amounts of a plasma which is in course of accomplishing the different stages of coagulation. The fact that the new systems fulfill a course which becomes shorter as the exciting system nears the critical point of coagulation is thus clearly seen.

After the fibrinogen has been gelified, a certain amount of thrombine is added to the squeezed diluted serum. The curve that shows the concentration of the free active substances begins to decline slowly after it has reached its highest point as a consequence of the antithrombic power of serum. Thus we see that this latter antagonistic reaction becomes apparent after the formation of thrombine and does not modify the ascending part of the curve in the first stage of the process.

The auto-activation of the reaction in plasma is due to the increase of the diffusion velocity of the T. S. and not to a catalytic action of the product of the reaction because it is shown that thrombine is not apt to influence the activation of prothrombine when the T. S. is absent.

An interaction between the progress of the reaction and the degradation of the proteinic support for the T. S. must be accepted as the only explanation of the auto-activation.

The electro-kinetic equilibrium which inhibits the T. S. is rapidly altered together with the physiological conditions which maintain it in the circulating blood. This equilibrium is on the point of being broken from the moment in which blood is isolated from the mechanism that regulates its physical constants.

The law of autoactivation dominates the kinetics of the process of plasma clotting. This law is revealed by the technique of the coagulation in series which consists in transferring a small fixed portion of the diluted serum recently formed from a first system to a new portion of plasma, from this second one to a third one, and so on. In normal

plasma we observe that after the first transfer the reaction acquires a maximum velocity which is maintained *ad infinitum* and the latent phase disappears. This form of kinetics shows that the clotting factors break the equilibrium existing in the rest state.

Both the plasma of mammals and of chickens follow this law. In the hemophilic plasma, as a consequence of the deficit of T. S., the law of autoactivation is not fulfilled. Thus, the fact of transferring hemophilic plasma in process of coagulation or diluted serum formed after geification, does not produce a sensible excitation in the new systems. If tissue extract is added to a tube of the series of hemophilic plasma, clotting occurs rapidly, thrombin formed by this aggregation is able to activate even the second tube of the series, but in the transferring of the second to the third one the exciting effect has already become exhausted because there is no sufficient T. S. that may be liberated.

We have examined the well-known effect on clotting time of some surfaces with which blood and plasma are brought into contact. We have examined the use of ground glass, charcoal, infusorial silica and we have found that this substrata raise their adsorption constants considerably for the factors of coagulation when an optimal amount of Ca ions concentration is added to the system. These results concur to explain the effect of the foreign surfaces as a catalytic action by adsorption. The competition of this surfaces with the normal phases of the heterogeneous system represented by the plasma leads to a displacement of the phases of the system. The effect of the surfaces, as is shown by the experiments of Leczner and assoc. is decisive on the velocity of the reaction in plasmas devoid of platelets.

It is necessary to infer that the displacement of the phases and the catalysis are brought about as a consequence of the charge that the reacting molecules acquire by adsorption of bivalent cations.

The fall in potential which occurs rapidly in shed blood explains the agglutination of the platelets in the mammals. The platelets might possibly represent the same role played by the particles artificially added to the system, forming a new phase in which the catalytic process of adsorption would follow.

As to the mechanism of gelification of the fibrinogen by the thrombin, it is very likely due to a temporal physical union in which the coloidal-crystalline structuration that characterises gel is produced. This union lasts until the

protein is degraded; after this they separate. We probably are not concerned with an enzymatic action as such, but rather with a partially reversible reaction.

An active thromboplastic substance is always present in normal saliva and saliva of hemophiliacs. 2.6 mgrs. of desiccated material from 20 ml. of saliva of a patient were extracted by adsorption in one of these experiments. This substance, still impure, does not seem to be a protein. The T. S. has shown to withstand heating for one minute to the boiling point. It induces clotting of hemophilic plasma in 4 to 6 minutes in the proportion of 1 x 50,000.

The urinary action in plasma clotting was found both in normal and hemophilic cases. These facts raise the problem of the existence of a cycle of the T. S.

In hemophilic patients this cycle would presumably be altered by the lack of a blood substratum apt to concentrate it.

Referencias.

- 1.—Addis, T. — J. Path. and Bact. 15, 427. 1911.
- 2.—BENDIEN, W.; VAN CREVELD, S. — Acta Med. Scandinava. 99, 12. 1939.
- 3.—BORDET, J.; DELANGE, L. — Ann. de l'Inst. Pasteur. 26, 657, 737. 1912; *ibid* 27, 341. 1913.
- 4.—BRINKHOUS, K. M. — Am. J. Med. Sc. 198, 509. 1939.
- 5.—BRINKHOUS, K. M.; SMITH, H. P.; WARNER, E. D.; SEEGER, W. H. — Am. J. Physiol 125, 683. 1939.
- 6.—BRINKHOUS, K. M.; SMITH, H. P.; WARNER, E. D. — Am. J. Med. Sc. 193, 475. 1937.
- 7.—CLARK, J. H. — Am. J. Physiol. 133, 240. 1941.
- 8.—COPLEY, A. L. — Am. J. Physiol 137, 178. 1942.
- 9.—CORONA, L. — Tratado de química de la sangre, 3.a Ed. Santiago, 1942.
- 10.—CHARGAFF, E.; ZIFF, M.; COHEN, S. — J. Biol. Chem. 136, 257. 1940.
- 11.—COHEN, S.; CHARGAFF, E. — J. Biol. Chem. 136, 243. 1940.
- 12.—DEL BAELE, L. J. — Bioch. Zeitschr. 246, 38. 1932.
- 13.—DOUGLAS, S. R.; COLEBROOK, L. — Lancet 2, 180. 1916.
- 14.—DYCKERHOFF, H. — Bioch. Ztschr. 305, 181. 1940.
- 15.—DYCKERHOFF, H.; KURTEN, H. F. — Bioch. Ztschr. 284, 111. 1936.
- 16.—DYCKERHOFF, H.; STEINER, R.; MIEHLER, H. — Bioch. Ztschr. 297, 1. 1938.

- 17.—DYCKERHOFF, H.; STEINER, R.; MIEHLER, H. — *Bioch. Zeitschr.* 297, 342, 1938.
- 18.—EAGLE, H. — *J. Gen. Physiol.* 18, 531, 1935.
- 19.—EAGLE, H.; HARRIS, T. N. — *J. Gen. Physiol.* 20, 543, 1937.
- 20.—EAGLE, H.; HARRIS, T. N. — *J. Exp. Med.* 65, 613, 1937.
- 20a.—EVANS, A.; HOWELL, W. H. — *Am. J. Physiol.* 98, 131, 1931.
- 21.—FISCHER, A. — *Bioch. Ztschr.* 270, 250, 1934.
- 22.—FISCHER, A. — *Bioch. Ztschr.* 270, 261, 1934.
- 23.—FISCHER, A. — *Bioch. Ztschr.* 278, 334, 1935.
- 24.—FISCHER, A. — *Bioch. Ztschr.* 279, 109, 1935.
- 25.—FISCHER, A. — *Bioch. Ztschr.* 278, 320, 1935.
- 26.—FISCHER, A.; ASTRUP, T. — *Bioch. Ztschr.* 278, 326, 1935.
- 27.—FERGUSON, J. H. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 34, 797, 1936.
- 28.—FERGUSON, J. H. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 37, 23, 1937.
- 29.—FERGUSON, J. H. — *Am. J. Physiol.* 119, 755, 1937.
- 30.—FERGUSON, J. H. — *Am. J. Physiol.* 123, 341, 1938.
- 31.—FERGUSON, J. H.; ERIKSON, B. N. — *Am. J. Physiol.* 126, 661, 1939.
- 32.—FONNIO, A. — *Ztschr. f. klin. Med.* 89, 12, 1920.
- 33.—FONNIO, A. — *Schweiz Med. Wchschr.* 69, 952, 1939.
- 33a.—FULLERTON, H. W. — *Lancet* 2, 195, 1940.
- 34.—GLASKO, A. J. — Greenberg, D. M. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 42, 177, 1939.
- 35.—GRATIA, A. — *J. Physiol. Path. Gen.* 17, 772, 1917.
- 36.—GREMKE, W.; KOLETZKO, J. — *Ztschr. ges. exp. Med.* 105, 46, 1939.
- 37.—GORTNER, R. A.; BRIGGS, D. R. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 25, 820, 1928.
- 38.—GROB, D.; J. GEN CHYSID. — *Gen. Physiol.* 26, 423, 1943.
- 39.—HERBERT, F. K. — *Bioch. J.* 34, 1554, 1940.
- 40.—HOBSON, F. C. G.; WITTS, L. J. — *British Med. J.* 2, 862, 1940.
- 41.—HOWELL, W. H.; HOLT, E. A. — *Am. J. Physiol.* 47, 328, 1918.
- 41a.—HOWELL, W. H.; HOLT, E. A. — *Bull. N. Y. Acad. Med.* 15, 3, 26, 1939.
- 41b.—HOWELL, W. H. — *Am. J. Physiol.* 29, 187, 1911.
- 42.—LENGENHAGER, K. — *Klin. Wchschr.* 15, 1835, 1936.
- 43.—LOZNER, E. L.; KARK, R. J.; TAYLOR, F. H. L. — *J. Clin. Invest.* 18, 603, 1939.
- 44.—LOZNER, E. L.; TAYLOR, F. H. L. — *J. Clin. Invest.* 18, 821, 1939.
- 45.—LOZNER, E. L.; TAYLOR, F. H. L. — *J. Clin. Invest.* 16, 113, 1937.
- 46.—LOZNER, E. L.; TAYLOR, F. H. L.; MAC DONALD, H. — *J. Clin. Invest.* 21, 241, 1942.
- 47.—MELLAMBY, J. — *Proc. Roy. Soc. B* 107, 271, 1930.
- 48.—MELLAMBY, J. — *Proc. Roy. Soc. B* 113, 93, 1933.
- 49.—MELLAMBY, J. — *Proc. Roy. Soc. B* 116, 1, 1934.

- 50.—MELLAMBY, J. — *J. of Physiol.* 51, 396. 1917.
- 51.—MELLAMBY, J.; PRATT, C. L. G. — *Proc. Roy. Soc. B.* 125, 204. 1938.
- 52.—MELLAMBY, J.; PRATT, C. L. G. — *Proc. Roy. Soc. B.* 128, 201. 1940.
- 53.—MERTZ, E. T.; SEEGERS, W. H.; SMITH, H. P. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 42, 604. 1939.
- 54.—MORAWITZ, P. — *Bioch. Ztschr.* 5, 138. 1904.
- 55.—MORAWITZ, P. — *Bioch. Ztschr.* 18, 30. 1908.
- 56.—MORAWITZ, P. — *Beitr. chem. Physiol. u. Path.* 5, 133. 1904.
- 57.—NOLF, P. — *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 59, 275. 1912.
- 58.—PAGE, R. C.; RUSSEL, H. K. — *Lab. Clin. Med.* 26, 1366. 1941.
- 59.—PARFENTJEV, F. A. — *Am. J. Med. Sc.* 202, 578. 1941.
- 60.—PATEK, A. J.; STETSON, R. P. — *J. Clin. Invest.* 15, 531. 1936.
- 61.—PATEK, A. J.; TAYLOR, F. H. L. — *J. Clin. Invest.* 16, 113. 1937.
- 62.—QUICK, A. J. — *J. Imm.* 29, 87. 1935.
- 63.—QUICK, A. J. — *J. Biol. Chem.* 119, 1. 1937.
- 64.—QUICK, A. J. — *J. Am. Med. Ass.* 112, 255. 1939.
- 65.—QUICK, A. J. — *Am. J. Physiol.* 123, 712. 1938.
- 66.—QUICK, A. J. — *Am. J. Physiol.* 131, 455. 1940.
- 67.—QUICK, A. J. — *Am. J. Med. Sc.* 201, 469. 1941.
- 68.—QUICK, A. J. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 35, 291. 1936.
- 69.—SEEGERS, W. H. — *J. Biol. Chem.* 136. 1940.
- 70.—SEEGERS, W. H.; MC. GINTY, D. — *J. Biol. Chem.* 146, 511. 1942.
- 71.—SHAFIROFF, B. G. P.; DOUBILET, H.; SIFFERT, R. — *Am. J. Physiol.* 138, 753. 1943.
- 72.—STEWART, J. D.; ROURKE, C. M. — *J. Clin. Invest.* 19, 695. 1940.
- 73.—SCHEURING, H. — *Bioch. Ztschr.* 283, 1. 1935.
- 74.—SCHÜTZ, F. — *J. Physiol.* 100, 5P. 1941.
- 75.—SCHÜTZ, F. — *J. Physiol.* 101, 27. 1942.
- 76.—TAYLOR, F. H. L.; LOZNER, E. L.; ADAMS, M. A. — *Am. J. Med. Sc.* 202, 585. 1941.
- 78.—TYSON, T. L.; WEST, R. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 36, 494. 1937.
- 79.—WARNER, E. D.; BRINKHOUS, K. M.; SMITH, H. P. — *Am. J. Physiol.* 144, 667. 1936.
- 80.—WOHLISCH, E.; JOHLING, L. — *Bioch. Ztschr.* 297, 353. 1938.
- 81.—ZIFF, M.; CHARGAFF, E. — *J. Biol. Chem.* 136, 689. 1940.
- 82.—BEST, C. H.; TAYLOR, N. B. — *The Physiological Basis of Med. Practice*, Baltimore, 1939.
- 83.—STARLING, E. H. — *Princ. of Human Physiol.* Editada por Evans, C. L., Hartridge, H. London, 1936.