

I

V. DUCCESCHI

INVESTIGACIONES SOBRE
EL PROCESO DE LA COAGULACIÓN DE LA SANGRE
ROL DE LAS PLAQUETAS

Uno de los motivos por los que el fenómeno de la coagulación de la sangre quedó por largo tiempo oscuro y conserva todavía algunas incógnitas, es el no haberse tenido bastante en cuenta el hecho de que aquel no constituye un proceso único y simple, sino que en él intervienen una serie sucesiva de fases de naturaleza completamente distinta, a través de cuyo recorrido la sangre llega a cumplir con esta especial función defensiva. Una de las menos conocidas entre ellas, es la que inicia la transformación característica de la sangre que tendrá por resultado el cambio de su estado físico. La circunstancia de ser este momento funcional talvez el más rápido y de relacionarse probablemente con la función de las plaquetas o hematoblastos, elementos cuya génesis y actividad son aún poco conocidas, ha hecho difícil la determinación exacta de su desarrollo (1).

La primera modificación que puede constatarse en la sangre substraída a sus condiciones normales, es la aglutinación de las plaquetas, descrita en su aspecto microscópico por *Bizzózero* en 1882, aglutinación que se acompaña de importantes alteraciones de tales elementos, como hinchazón, fragmentación y fusión más o menos completa. Nos falta saber, ahora, cual es la causa de esas alteraciones y qué relación existe entre la aglutinación de

las plaquetas y las fases sucesivas de la coagulación. Hay, sin duda, una serie importante de hechos que enumeraremos rápidamente, que hablan en favor de una participación activa de las plaquetas, aunque no pueden ser considerados todos ellos como argumentos definitivos en apoyo de la tesis que atribuye a dichos elementos un rol preponderante en el proceso coagulativo de la sangre.

Dejaremos establecido, en primer lugar, que la aglutinación de determinados elementos de la sangre es un fenómeno constante, sea en los vertebrados como en los invertebrados, y genéticamente resulta anterior a la participación de la fibrina; así *Loeb* ha observado en el *Limulus*, que todo el fenómeno de la coagulación consiste en la simple aglutinación de los elementos blancos de la sangre, mientras que en otros invertebrados aparece una sustancia análoga a la fibrina. Los elementos de la sangre que, en la serie animal, toman parte, aglutinándose, en el fenómeno de la coagulación, no son iguales morfológicamente, aunque sean homólogos en su aspecto funcional, como los amebocitos de la hemolinfa, las células en huso (*Spindelzellen*) de los vertebrados inferiores, claramente nucleadas, y las plaquetas de los mamíferos; algunos autores (por ejemplo *Dekhuysen*) homologan todos estos elementos bajo la denominación de *trombocitos*.

Sabemos que si se subtrae a la sangre las plaquetas, por medio de un suero citolítico específico, por ejemplo, como lo han hecho *Sacerdotti*, *Le Sourd* y *Pagniez*, este líquido se vuelve casi completamente o completamente incoagulable. Si se somete a la centrifugación la sangre tratada con oxalatos, que impiden, como es sabido, la coagulación, el líquido se divide en dos porciones, de las cuales la superior contiene casi todas las plaquetas, que por ser muy livianas ascienden a la superficie. Ahora bien, si separadas las dos porciones de sangre se las pone en condiciones de coagularse por la adición de cloruro de cal, se formará el coágulo tan solo en la parte que contiene las plaquetas. Igualmente, si a la sangre desfibrinada, a la linfa o a ciertos exudados

se añaden plaquetas separadas de la sangre, estos líquidos coagularán rápidamente (*Bizzozero, Schneider, Vinci*).

Cierto número de condiciones que impiden las alteraciones características de las plaquetas en la sangre extraída de los vasos, evitan también la coagulación de la sangre, como ser las bajas temperaturas, su recolección en recipientes parafinados o en agar, la adición de fosfato sódico o potásico, de sulfato de magnesio, de carbonato de soda, etc, mientras las condiciones que favorecen la destrucción de las plaquetas, como las altas temperaturas, aceleran al mismo tiempo la coagulación (*Bürker*). Existiría también cierta relación cuantitativa entre el número de las plaquetas y la abundancia de fibrina en un líquido coagulable (*Mosen, Bürker*).

Las plaquetas forman el elemento principal del trombo blanco (*Eberth y Schimmelbusch*), mientras que en la sangre conservada sin coagularse en un vaso normal entre dos ligaduras, las plaquetas quedan inalteradas (*Baumgarten, Böttger, Hauser*).

Sobre la base, principalmente, de estos hechos, se llegó por algunos autores a la conclusión de que las plaquetas contienen un fermento, la trombokinasa, que, al alterarse estos elementos, pasaría a la sangre, transformando el trombógeno contenido en el plasma en trombina o fermento activo (*Fuld, Spiro, Morawitz, Nolf*). Otros observadores admiten, más simplemente, que las plaquetas contienen trombina.

A pesar de lo numerosas e importantes que son las observaciones que acabo de citar en pro de la teoría de la participación activa de las plaquetas en la coagulación de la sangre, no faltan autores, que apoyándose en hechos, sin duda, menos numerosos y evidentes, atribuyen a los leucocitos el rol que parece ser propio de las plaquetas (*Delezenne, Pratt, Dastre*), mientras que otros invocan la actuación de los glóbulos rojos (*Landois, Mosso, Petrone y Jatta*); no me detengo para ser conciso sobre este tópico. Se ha hecho notar también, que la linfa, sin contener plaquetas, puede coagular espontáneamente (*Fano, Vinci*); pero

no debe, sin embargo, eliminarse la posibilidad de que se hallen en tal caso en la linfa productos de destrucción de las plaquetas.

A estos últimos elementos se debe atribuir, igualmente, según los experimentos de *Le Sourd* y *Pagniez*, el fenómeno de la retracción del coágulo.

Si las plaquetas toman parte en el proceso de la coagulación, no hay duda de que su participación debe verificarse en la primera fase del fenómeno, considerando, por el momento, como secundaria la parte que puedan tener en la retracción del coágulo. Mis investigaciones se refieren, precisamente, al primer período de la coagulación, cuando la sangre es todavía líquida, y que podría llamarse *fase pre-coagulativa*.

Mis observaciones toman su punto de partida del hecho de que la cocaína, agregada en cierta concentración a la sangre *in vitro*, retiene o retarda su coagulación. Este fenómeno fué descubierto por mí en la sangre de invertebrados marinos y publicado ya en 1902 (2). Si a la sangre o hemolinfa de grandes equinodermos y crustáceos marinos se añade una solución de clorhidrato de cocaína hasta conseguir una concentración total de 1 a 1.5 por ciento, falta del todo el fenómeno de la coagulación. El hecho es tanto más notable, cuanto que en algunas de estas especies animales la coagulación es muy rápida y se acompaña con alteraciones características de los elementos blancos de la sangre (*amebocitos*), alteraciones muy evidentes al microscopio por faltar en la hemolinfa los glóbulos rojos. La sangre tratada con cocaína, en lugar de transformarse a los pocos segundos después de su salida de los vasos en una masa gelatinosa bastante compacta, queda líquida y los numerosos elementos blancos descienden al fondo del recipiente, donde forman un precipitado pulverulento. Si en la sangre no tratada con cocaína se sigue al microscopio el proceso de la coagulación, se ve que este consiste en que los amebocitos se aglutinan y emiten numerosas pro-

longaciones o pseudopodios, que se fusionan entre sí formando redes más o menos regulares, entre cuyas mallas aparecen luego filamentos con el aspecto propio de la fibrina de los animales superiores. En la sangre cocaínizada los amebocitos no se aglutinan, no forman la red que constituye el coágulo y conservan la misma estructura que en el interior del organismo. Yo atribuí el mecanismo inhibitor de la cocaína en la coagulación, a la acción general paralizante que este veneno ejerce sobre el protoplasma vivo, y llegaba en mi trabajo a la conclusión de que "una de las primeras fases del proceso de la coagulación está constituida por un fenómeno activo, por una reacción funcional específica de determinados elementos morfológicos de la sangre; si se produce la muerte de estos elementos antes de que se verifique aquella reacción, entonces el coágulo característico no se forma."

Estudiando, en el mismo año, las primeras fases de la coagulación en los vertebrados, he descripto (3) un fenómeno que demuestra macroscópicamente el proceso de la aglutinación de las plaquetas. Si del pulpejo del dedo de un individuo normal se hacen caer en un vidrio de reloj tres o cuatro gotas de sangre, e inclinando el vidrio se hace correr la sangre de un lado a otro lentamente varias veces, se ve aparecer en el fondo del vidrio, en el espacio de cuarenta a cincuenta segundos hasta uno o dos minutos, una gran cantidad de gránulos muy finos, blancos o hialinos, que aumentan en número y en dimensiones si se sigue agitando la sangre, hasta alcanzar el diámetro de medio milímetro. Este fenómeno se observa constantemente además de en la sangre humana normal, también en la del perro, conejo, cobayo, pollo, tortuga, rana, es decir, en todas las especies estudiadas. Examinando al microscopio la sangre así tratada, con los métodos comunes de fijación y coloración, se reconoce fácilmente que los gránulos están formados por una cantidad muy grande de plaquetas aglutinadas, más o menos alteradas y fusionadas, a las cuales se añade a menudo, pero no siempre, un número variable de leucocitos.

El fenómeno que acabo de describir es simplemente la expresión macroscópica del fenómeno de la aglutinación de las plaquetas, que se produce cuando la sangre está todavía líquida, constituyendo, así, una manifestación que precede a la coagulación.

La aglutinación visible falta en cierto número de circunstancias, en las cuales la sangre no coagula, como en la tratada con oxalatos o en la extraída después de inyección intravenosa de albumosas.

Después de la publicación de la nota relativa a los hechos ahora brevemente expuestos, en la Clínica Médica de Roma, dirigida por el profesor Baccelli, los doctores *A. Zeri* y *M. Almagia* (4) estudiaron el fenómeno de la aglutinación visible en las enfermedades febriles y constataron que puede faltar completamente en la fiebre palúdica, en la que, como es sabido, el número de las plaquetas disminuye en proporción considerable.

A pesar de los años transcurridos y de los trabajos que se han acumulado alrededor del origen y del destino funcional de las plaquetas, queda todavía planteado el problema de la participación que estos elementos toman en el proceso coagulativo de la sangre. Las investigaciones que forman el objeto de la presente nota, están dirigidas, precisamente, a esclarecer, utilizando la acción de la cocaína, algunas de las cuestiones a que hemos hecho referencia. Hemos estudiado el fenómeno de la aglutinación visible, las modificaciones de las plaquetas y la retracción del coágulo, empleando como material de examen el perro, el pollo y la rana.

ACCIÓN DE LA COCAÍNA SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN DE LA SANGRE Y SOBRE LA RETRACCIÓN DEL COÁGULO

Por tiempo de coagulación de la sangre se entiende la duración del intervalo que sucede entre el momento de su salida del vaso y su transformación en una masa compacta. Para su deter-

minación hay varios procedimientos; mas, como nos interesaba poder seguir el proceso de la coagulación desde la primera fase de la aglutinación visible, hemos adoptado el método de recoger la sangre en vidrios de reloj y sólo en algunos casos especiales en pequeños tubos de vidrio. El tiempo necesario para la aglutinación completa se establecía con la ayuda de un cronómetro.

En nuestros experimentos, la sangre se extrajo siempre de una vena en el pollo y en el perro y de la aorta en la rana, usando una jeringa Lüer esterilizada y parafinada (aceite de parafina Merk). Cuando se obtiene la sangre por medio de una puntura de la piel o de las mucosas, el contacto con los tejidos modifica de manera muy variable el tiempo de coagulación. Es sabido que los tejidos poseen sustancias, tales como las *coagulinas* (Loeb) o la *trombokinasa* (Morawitz), que aceleran muchísimo la coagulación, hasta el punto de que, por ejemplo en la aves, si la sangre no se pone en contacto con los tejidos, puede tardar algunas horas en coagular. En nuestro estudio, cuando tuvimos que hacer intervenir este factor, hemos agregado a la sangre algunos fragmentos de tejido. Los vidrios de reloj eran esterilizados a la llama y recubiertos de una capa muy delgada de parafina sólida o de vaselina; estas sustancias constituyen, con la pared normal de los vasos vivos, las superficies cuyo contacto favorece en menor grado la coagulación. Así podíamos separar hasta cierto punto los factores mecánicos y químicos del proceso coagulativo. La cocaína se usó bajo forma de clorhidrato, preparándose para las diluciones necesarias, una solución madre al 5 % en suero fisiológico al 7 por mil; resultando a menudo la solución de cocaína ligeramente ácida, se acostumbraba neutralizarla con algunas gotas de carbonato sódico al 1 %. La cantidad de cocaína necesaria se colocaba de antemano en el vidrio de reloj y después de agregada la sangre (de 0.5 a 1 c.c.), se agitaba durante un minuto. Varias de las pruebas se hicieron a la temperatura ambiente y otras en el termostato a 38°. Hay que tener muy en cuenta el factor temperatura, que influye notablemente sobre el tiempo de

coagulación. Huelga decir que, por cada prueba con cocaína, se efectuó, con la misma sangre, una o más de contralor.

Rana (*Leptodactylus ocellatus*). La sangre se extrajo de la aorta, cerrándola lo más lejos posible del corazón con una pequeña pinza y dirigiendo la punta de la aguja hacia el bulbo aórtico; de una rana de gran tamaño se consigue alrededor de 2 c.c. de sangre, si el corazón funciona con bastante energía.

El tiempo de coagulación, en la rana, es muy variable según los ejemplares, pudiendo tardar hasta una hora y más en el vidrio parafinado; si a la sangre se le agrega un pedacito de músculo de la misma rana, la sangre coagula en 10 a 20 minutos, raramente más tarde. (5). Mezclando la sangre con la solución de cocaína, hasta conseguir una concentración superior a 1.5 gramos %, la coagulación no se presenta ni aún después de pasadas 24 horas. Si la prueba se ejecuta en un tubo, el plasma se separa superiormente a los hematíes. En concentraciones de cocaína inferiores a 1.50 grs. %, llegando hasta 0.30 grs %, la coagulación se hace dentro de las 24 horas, con un retardo proporcional al contenido en cocaína. En todas las investigaciones se hicieron pruebas de contralor, agregando a la sangre cantidades de suero fisiológico iguales a las de la solución de cocaína. Comparándolo con la sangre no tratada, se constató que el suero fisiológico no ejerció acción apreciable sobre el tiempo de coagulación.

Pollo. La sangre extraída de una vena del ala y recogida en el vidrio de reloj parafinado, coagula, por término medio, en ocho o diez minutos en la estufa a 38°; a la temperatura ambiente los tiempos de coagulación se duplican o triplican; en el vidrio sin parafinar se reduce, por lo general, a la mitad. Si a la sangre se agrega un fragmento de piel o de músculo del mismo animal, se consigue la coagulación en dos a cuatro minutos, casi desapareciendo la influencia de la temperatura y del recipiente.

El efecto máximo de la cocaína se advierte cuando su concentración llega a 2.50 grs. %, retardando la coagulación hasta 16 a 24 horas, pero a menudo tan sólo durante 2 ó 5 horas; si se

practica el ensayo en un pequeño tubo de vidrio, después de algunas horas el plasma amarillento se separa por completo, y en la porción intermedia entre la superficie del plasma y los hematíes, se nota una capa constituida por los elementos blancos de la sangre. En el pollo, la solución fisiológica de cloruro de sodio tampoco ejerce influencia apreciable. El efecto de la cocaína sobre el tiempo de la coagulación es proporcionalmente menor cuando disminuye su porcentaje en la sangre, llegando a ser nulo cuando esta última contiene menos de 0.40 grs. %.

Si a la sangre tratada con cocaína se añade después de diez minutos un fragmento de piel o de músculo, el efecto del alcaloide queda neutralizado en forma tal, que el retardo que era de esperarse se reduce, más o menos, a la mitad.

Perro. La sangre fué extraída de la vena yugular externa. La dosis mínima eficaz de cocaína resultó ser la de 1 %, capaz de determinar un retardo de 10 a 20 minutos, respecto de las pruebas de contralor no tratadas o que contenían suero fisiológico. El efecto máximo se consigue con una contracción del 2 %, observándose un retardo que puede variar de una a dos horas y media. En este caso, como para la sangre de los animales de las demás especies, el coágulo que se consigue de las pruebas tratadas con cocaína a menudo es blando y, por lo general, no adhiere al fondo del vidrio. El tratamiento con un pedacito de piel del perro mismo, de la sangre envenenada acelera notablemente el tiempo de coagulación.

He utilizado esta especie animal para verificar si, agregando la cocaína cuando ya se ha iniciado el proceso de la coagulación, esta substancia conserva su poder de inhibición. Con tal objeto, se preparaba una serie de pruebas con 0.50 cc. de sangre y se esperaba que en el fondo del vidrio se formaran pequeños coágulos; si, en este momento, se agrega a la sangre las cantidades correspondientes de la solución de cocaína hasta alcanzar la concentración del 3 %, no se nota una influencia evidente sobre el tiempo total de coagulación, con respecto a las pruebas de contralor.

ACCIÓN DE LA COCAÍNA SOBRE LA RETRACCIÓN DEL COÁGULO

He efectuado esta serie de investigaciones haciendo coagular la sangre en tubos de vidrio de 7 mm. de diámetro y usando 2 c.c. de sangre en cada prueba; en los casos del pollo y del perro, los tubos se colocaban en la estufa a 38° C. Para conseguir una coagulación rápida y completa, se agregaba a cada prueba un pedacito de músculo del mismo animal y, después de coagularse la sangre, se destacaban con un alambre de platino esterilizado los bordes superiores del coágulo, para que la retracción fuera uniforme. Cada dos horas, se medía, en milímetros, la capa de suero que se había separado, para relacionarla, después de 24 horas, con el largo de la columna inicial de la sangre. Puede afirmarse, en general, que en la rana y en el pollo, con una concentración de cocaína desde 0.50 grs. % en adelante el coágulo, si alcanza a formarse, no se retrae; para el perro, la dosis mínima es de 1.5 gr. %; en las pruebas de contralor, a las 24 horas la capa de suero alcanzaba una proporción de 30 a 50 % sobre la columna de sangre. Si la cantidad de cocaína es suficiente para impedir la coagulación durante una o dos horas, entonces el plasma con los elementos blancos de la sangre constituye una capa superior que puede coagular aparte; en algunos casos, al cabo de 48 horas puede separarse una porción del suero superiormente al plasma coagulado.

COCAÍNA Y AGLUTINACIÓN DE LAS PLAQUETAS

Ya indiqué en otro lugar, cómo se pone en evidencia, a simple vista, el fenómeno de la aglutinación de las plaquetas. Para las investigaciones actuales he usado siempre sangre venosa, ex-

traída por medio de jeringa y depositada en un vidrio de reloj en cantidades de 0.1 a 0.3 c.c. Conviene usar el vidrio sin parafinar, en este caso, para seguir más fácilmente el proceso de la formación de los pequeños gránulos hialinos.

Rana. En la sangre de este anfibio la aglutinación aparece después de 8 a 10 minutos y en algunos ejemplares bastante más tarde; con motivo de esta variabilidad, la sangre de la rana no constituye un material cómodo para la simple demostración del fenómeno. Empezando con una concentración de cocaína igual a 0.30 grs. %, se observa un retardo notable en el tiempo de aglutinación, siendo esta completamente nula con una dosis de 1.50 grs. %. A veces, la proporción de la cocaína no es bastante para inhibir la coagulación, pero sí la aglutinación, notándose al cabo de algunas horas en el fondo del vidrio de reloj algunos coágulos blancos o rojos.

En la sangre no cocainizada, el contacto con un pedacito de músculo o de otro tejido del mismo animal acelera de dos a tres veces el tiempo de aglutinación; lo mismo pasa con la sangre del pollo y del perro. Evidentemente, los tejidos contienen sustancias que estimulan normalmente la reacción de las plaquetas; talvez, esta reacción se debe a la misma trombokinasa. En la sangre tratada con cocaína la acción de los tejidos sobre la aglutinación es mucho menos evidente; con las dosis medias del alcaloide puede observarse la coagulación no precedida por la formación de los acúmulos de plaquetas.

Pollo. En la sangre de esta especie, el fenómeno se presenta con gran claridad y rapidez a la temperatura de 38°; ordinariamente, en menos de un minuto el fondo del vidrio se encuentra lleno de gránulos blanquecinos. En el vidrio parafinado la aglutinación puede retardar de tres a cinco minutos, pero es casi instantánea si se le agrega un fragmento de piel. La sangre fué extraída de una vena del ala por medio de jeringa. La cocaína actúa pues sobre este fenómeno, en la misma forma y en la misma dosis que para la coagulación, es decir, inhibiéndolo completa-

amente en la concentración de 2 grs. %; las dosis menores del alcaloide pueden impedir la producción de los gránulos característicos, apareciendo después de algunas horas coágulos más o menos voluminosos, blancos o rojos, en el fondo del recipiente. El contacto con la sangre de fragmentos de piel o de músculo, neutraliza, en gran parte, la acción de la cocaína.

Perro. La aglutinación macroscópica aparece en la sangre del perro en un espacio de tiempo que oscila entre pocos segundos y un minuto y medio, si el vidrio está a una temperatura de 38° C. Una capa de parafina o el encontrarse el vidrio a la temperatura ambiente, pueden retardar de algunos minutos el fenómeno, que, por otra parte, es casi instantáneo si se agrega a la sangre un fragmento de algún tejido del mismo animal.

La presencia en la sangre, de cocaína en la concentración de dos grs. por ciento, impide la aglutinación o la retarda mucho; en el primer caso, puede verificarse la coagulación sin que preceda una aglutinación visible. Proporciones inferiores de cocaína ocasionan retardos más o menos notables en el tiempo de aglutinación. Cuando a la sangre se le agrega pedacitos de piel o de músculo, la coagulación puede acontecer sin que preceda la formación de los gránulos característicos.

FENÓMENOS MICROSCÓPICOS

Era muy interesante, para nosotros, seguir al microscopio la acción de la cocaína sobre las plaquetas, para penetrar algo más en su determinismo. Ya desde las primeras observaciones hemos podido constatar que, en los casos en que el veneno impide la aglutinación macroscópica, no se nota tampoco formación de acúmulos microscópicos de plaquetas y éstas conservan su

aspecto normal durante todo el tiempo en que también los demás elementos morfológicos de la sangre guardan su forma fuera del organismo.

Si se recoge la sangre cocaínizada de rana o de pollo en un tubo, se separa, después de algunas horas, una capa superior de plasma, que, junto con los glóbulos blancos, contiene gran número de trombocitos. El mismo resultado se consigue dejando caer tres o cuatro gotas de sangre cocaínizada sobre un vidrio porta-objetos; después de media hora, los glóbulos rojos ocupan la parte inferior de la gota, y si se toca con un cubre-objetos el extremo superior de ella, se consigue un material que tratado por el método de Giemsa, aparece constituido, en su mayor parte, por plaquetas. Con este procedimiento se consiguen muy buenas preparaciones y también con la sangre del perro, con la condición de prolongar el contacto con el colorante tres o cuatro veces más que de ordinario.

Los hechos de que la cocaína impide la aglutinación de las plaquetas y la alteración y destrucción de estos elementos tan frágiles, están muy bien de acuerdo con la acción anti-coagulante de la cocaína. Es sabido que en las preparaciones que se obtienen por medio de la puntura del dedo, se encuentra un número extremadamente reducido de plaquetas, de las que la mitad disgregadas, mientras que en la sangre circulante existen alrededor de 30 por un leucocito; las plaquetas se adhieren a las márgenes de la herida, a la superficie de la piel, a las paredes del tubo si se recolectó la sangre con una pipeta, o a la varilla de vidrio que se usó para extender la sangre en el porta-objetos, y otra parte se destruye mientras se efectúa la preparación. Si en la sangre cocaínizada las plaquetas se observan en gran cantidad por conservarse íntegras, no podemos dejar de relacionar este hecho con la falta de coagulación de la misma sangre, y debemos suponer que sea precisamente el no reaccionar las plaquetas con la aglutinación y demás transformaciones a las causas que en circunstancias normales dan lugar a la producción del coágulo, lo que ex-

plica, al menos en gran parte, la acción de la cocaína. En la sangre envenenada, en que falta la aglutinación macroscópica, se ve al microscopio pequeños acúmulos de plaquetas, a los cuales no se puede atribuir el valor de un verdadero fenómeno de aglutinación.

He mencionado hace poco el fenómeno de la viscosidad tan notable de las plaquetas, debido a lo cual estos elementos se adhieren fácilmente a las superficies que no sean las del endotelio vivo cardio-vascular. Es fácil reconocer esta propiedad de las plaquetas cuando se efectúa la prueba de la aglutinación; si en el momento en que se ha formado un regular número de gránulos se coloca el vidrio porta-objetos verticalmente, hasta que casi toda la sangre se escurra, se deja secar y se trata por el Giemsa, se ve que la preparación contiene un gran número de pequeños acúmulos de plaquetas que han quedado adheridas al vidrio. En la sangre cocaínizada no se observa nada parecido porque estos elementos, además de no aglutinarse, tampoco adhieren, como antes, al vidrio. Este hecho explica por qué si la sangre cocaínizada llega a coagularse, el coágulo no adhiere al vidrio de reloj, como lo hace constantemente el coágulo normal; ahora bien, en el primer caso, las plaquetas no se han adherido al vidrio. Este hecho tendría una escasa importancia, a no ser que se relacione estrechamente con el fin próximo de la coagulación. Ya *Bizzozero* había reconocido que las plaquetas constituyen el punto de origen o si se quiere, la encrucijada de los filamentos de fibrina; ahora bien, es claro que si las plaquetas en contacto con la superficie en que se forma el coágulo están adheridas a ella, lo estarán también los filamentos de fibrina y el coágulo mismo. Se comprende que solo con la condición de estar bien adherido como un tapón al borde de los vasos lesionados y a los tejidos circunstantes, puede el coágulo resistir a la presión de la sangre. La propiedad de las plaquetas de pegarse a las superficies no endoteliales, puede ser un fenómeno puramente físico, o constituir el exponente de un hecho vital análogo a la aglutinación; debe recordarse, a este pro-

pósito que *Eberth* y *Schimmelbusch* invocaron, para el caso del trombo, una *metamórfosis viscosa* de aquellos elementos.

Es verdaderamente notable la capacidad que posee un coágulo de adherirse, por ejemplo, a las paredes de vidrio del recipiente y la resistencia que encuentra a veces para retraerse; de aquí la necesidad de destacar la parte superior del coágulo del tubo donde se encuentra la sangre, para conseguir el suero. En el caso de la coagulación a nivel de las superficies de los vasos y del endocardio alterados, la adhesión del coágulo, en grado tal que pueda resistir a la corriente de la sangre, es una condición indispensable para que el trombo pueda formarse y evolucionar; ahora bien, la superficie de ataque del trombo está constituida casi en su totalidad por plaquetas. A estos elementos debe atribuirse pues, un rol importante en el proceso de la coagulación en general, y de la trombosis en especial, además de la participación que ya se le atribuye, en cuanto determinan la adherencia del coágulo a la superficie en que éste se forma.

ACCIÓN DE LA COCAÍNA EN EL PROCESO DE LA COAGULACIÓN

De las investigaciones que anteceden se deduce que la cocaína ejerce una acción muy evidente sobre el proceso coagulativo de la sangre, retardándolo hasta inhibirlo, según las dosis y las especies animales y modificando, al mismo tiempo, el fenómeno de la aglutinación de las plaquetas y las capacidades de retracción y de adhesión del coágulo.

Numerosas substancias actúan sobre la coagulación, lo más a menudo; obstaculizándola (substancias anticoagulantes). Es bien sabido que algunas de ellas ejercen su actividad cuando se mezclan directamente a la sangre, y otras tan solo cuando se inyectan en una vena, determinando la producción de un cuerpo

anticoagulante, un antifermento (la antiplasma de *Camus* y *Gley*), que, probablemente, se origina en el hígado (*Gley*, *Pachon*, *Delezenne*); es este el caso de las albumosas, de algunas toxinas animales, extractos de órganos, etc. Distintamente de estos últimos, o *anticoagulantes indirectos*, obran los *directos*, para los cuales basta agregar a la sangre *in vitro* oxalatos, citratos, sales neutras concentradas, etc; algunos de estos actúan inmovilizando las sales de cal necesarias para la coagulación, otros por condiciones puramente físicas de su concentración. Sin entrar en mayores detalles sobre el tema tan estudiado de los anticoagulantes, diré que la cocaína debe ser clasificada en el segundo grupo, por actuar directamente sobre la sangre. He efectuado algunos ensayos para ver si este alcaloide, introducido en la circulación, modifica la coagulabilidad de la sangre; mas, en las dosis en que es compatible con la vida de los animales, no se nota una influencia apreciable sobre los fenómenos que son objeto de nuestro estudio.

Referente al mecanismo de acción de la cocaína, no podríamos reducirla simplemente a una influencia físico-química, análoga a la debida a las sales neutras concentradas. El alcaloide se lo usó en solución de cloruro sódico al 7 por mil para evitar los efectos hipotónicos de la solución de cocaína al 5 %; efectivamente, una solución que contenga alrededor de 5 % de cocaína sin cloruro de sodio, tiene, según dos determinaciones que he practicado, un punto de congelación de: $\Delta = 0,310$. C. teniendo la solución de cloruro sódico al 1 % un punto de congelación igual a $\Delta = 0,613$. C.; además algunas investigaciones hechas con soluciones de la misma sal, de concentración variable entre 0.6 y 2.5 %, nos han mostrado que no modifican en forma apreciable los fenómenos de la aglutinación y de la coagulación.

Tampoco podría atribuirse a la cocaína una acción decalcificante; en los animales inferiores, por ejemplo, este alcaloide es muy activo aún en dosis mínimas, mientras que los oxalatos ejercen su acción a una concentración muy alta. Por otra parte, no

resulta que la cocaína se combina con las sales de cal, en las condiciones en que actúa sobre la sangre.

Debemos atribuir, pues, la acción de la substancia que ha sido objeto de nuestro estudio, a su acción anestésica y paralizante sobre los elementos celulares en general, que ya *Aducco* (1889) ha visto producirse sobre los movimientos amebóides de las células linfáticas y que *Albertoni* (1890) observó sobre los amebocitos de los crustáceos. Ya he referido, en otra parte, que según mis investigaciones en la hemolinfa de los invertebrados, en los cuales la coagulación es, en gran parte, un fenómeno activo de los elementos blancos de la sangre, la cocaína ejerce su acción anticoagulante impidiendo las alteraciones características de los amebocitos y su fusión. Hemos visto en el transcurso de este trabajo, que la misma substancia actúa inhibiendo la aglutinación de las plaquetas y su rápida destrucción al salir de los vasos sanguíneos; paraliza, así, la cocaína las reacciones que sufren las plaquetas en contacto con cuerpos distintos del endotelio normal cardio-vascular o frente al estímulo químico (trombokinas, coagulinas) de los tejidos. El efecto sobre la retracción del coágulo es, con toda probabilidad, una consecuencia de la parálisis de las plaquetas, sin que se pueda, por el momento, indicar más exactamente en qué consiste esta relación.

La acción de la cocaína sobre la sangre resulta, luego, análoga en todo al efecto paralizante que ejerce sobre los protoplasmas vivos en general. El hecho ofrece, para nosotros, un interés particular en cuanto que demuestra la existencia en el proceso coagulativo de la sangre, considerado hasta ahora como un fenómeno de naturaleza fundamentalmente química, de una fase activa, vital, debida a la participación funcional de elementos especiales de la sangre y que se nos manifiesta por el acto de la aglutinación.

Queda por explicar por qué en los mamíferos superiores la cocaína sólo retarda y no impide del todo la coagulación; es posible que en este caso, debido a su mayor fragilidad, una parte

de las plaquetas paralizadas se deshagan, librándose así el fermento (trombina, trombokinasa) que probablemente contienen.

El hecho de que, si a la sangre cocaínizada se le agregan fragmentos de tejidos, se observa la coagulación sin que a veces preceda la aglutinación de las plaquetas, puede explicarse por la acción directa de la trombokinasa de los tejidos sobre el fibrinógeno. Cuando las plaquetas no están envenenadas por la cocaína, el contacto con los tejidos acelera su aglutinación; tan rápida es, en condiciones normales, la coagulación por la acción coadyuvante que ejercen los tejidos mismos.

El coágulo que se forma con la sangre cocaínizada no se adhiere, por lo general, al recipiente que lo contiene, porque las plaquetas no se han pegado a las paredes. Estudiando el origen de este fenómeno, hemos visto que una de las funciones de dichos elementos consiste en determinar la adherencia del coágulo al medio extravascular en que se forma (tejidos, bordes de los vasos cortados) o a las paredes de los vasos o del corazón alterados, en el caso de la coagulación vascular (trombosis).

CONCLUSIONES

El conjunto de los hechos hasta ahora considerados constituye una nueva demostración de que el fenómeno de la coagulación de la sangre es un acto complejo, que puede dividirse en fases bien distintas por su naturaleza y función. Los numerosos estudios que se han sucedido acerca del mecanismo de este fenómeno, han tenido como objeto, especialmente, la fase fermentativa que conduce a la precipitación filamentososa del fibrinógeno, es decir, al cambio de estado físico de la sangre, que, por otra parte, corresponde al hecho y a los fines de la coagulación. Esta fase, indudablemente la más aparente e importante, es prece-

vida por cambios menos visibles de la sangre, que constituyen, sin embargo, sobre todo en ciertas especies animales, una condición necesaria para que la coagulación tenga lugar; estos cambios consisten en la aglutinación de las plaquetas, acompañada de ciertas modificaciones morfológicas.

Nuestros experimentos han mostrado que la cocaína actúa sobre la sangre impidiendo la aglutinación de las plaquetas, al mismo tiempo que inhibe la coagulación en ciertos casos y la retarda en otros. La fase fermentativa debe considerarse pues como secundaria a la actividad funcional de las plaquetas, como aparece también por el resultado de otras investigaciones citadas en la primera parte de esta nota.

La cocaína actúa, con mucha probabilidad, paralizando las plaquetas e impidiendo su reacción activa a los estímulos mecánicos o químicos que determinan la coagulación de la sangre. El hecho resulta bien claro para los invertebrados, en los cuales la ausencia de glóbulos rojos permite seguir fácilmente la acción de la cocaína sobre los trombocitos. La primera fase del proceso de la coagulación estaría constituida, así, por la reacción de las plaquetas a ciertos estímulos mecánicos y químicos, representados, los primeros, por el contacto con todo objeto o tejido que no sea el endotelio cardio-vascular vivo y, los segundos, ordinariamente, por sustancias contenidas en los elementos de los tejidos, estímulos a los cuales sigue la aglutinación de las mismas plaquetas, su adherencia al medio anormal y ciertas modificaciones morfológicas que puede suponerse sean el efecto de la secreción de una substancia (trombina, trombokinasa) que da lugar a la transformación del fibrinógeno contenido en el plasma. La sangre reacciona, pues, a determinados estímulos mecánicos y químicos con la coagulación, como los demás tejidos responden con su función específica, así el músculo contrayéndose y la glándula produciendo su secreción; en la sangre, tejido provisto de varias funciones, la irritabilidad de las plaquetas juega un rol especial para la función coagulativa y se manifiesta con una reacción

característica (la aglutinación y la probable emisión de un fermento), comparable a la de los leucocitos en la diapedéisis y en la fagocitosis. Cualquiera que sea la relación existente entre la aglutinación de elementos blancos especiales de la sangre y el cambio de estado físico de la última, queda establecido el hecho de que esta función de los trombocitos precede a la coagulación verdadera y propia de la sangre en toda la serie animal, desde los invertebrados inferiores hasta el hombre.

Como corolario de estas conclusiones, me parece que estamos autorizados para distinguir en el proceso de la coagulación de la sangre:

a) Una *fase precoagulativa*, constituida por la aglutinación de las plaquetas y las alteraciones morfológicas que le acompañan, con las cuales es contemporánea, probablemente, la excreción de un fermento (trombina, trombokinasa).

b) Una *fase coagulativa*, representada por la transformación fermentativa del fibrinógeno y el cambio en el estado físico de la sangre.

c) Una *fase postcoagulativa*, dada por la retracción del coágulo y la separación del suero de la sangre.

En la *trombosis cardio-vascular*, proceso homólogo a la coagulación extravasal, existe evidentemente una prevalencia de la fase precoagulativa, por estar el trombo constituido en su mayor parte por plaquetas aglutinadas, y de la fase postcoagulativa, representada en este caso por la organización del trombo o sus transformaciones sucesivas (reblandecimiento, organización, etc).

NOTAS

(1) Referente a la morfología y génesis de las plaquetas, véase: *Ferrata, Morfología del sangue normale e patológico*, Milano, 1912, pág. 198, donde se encuentra la indicación bibliográfica de 150 trabajos, que tratan también de la función de estos elementos.

La participación de las plaquetas en la trombosis se encuentra estudiada ampliamente en *R. Hauser: Zur Frage der Trombose (Virchow's Archiv, 215 Bd., 1915, p. 65).*

(2) *V. Ducceschi: Untersuchungen über die Blutgerinnung bei wirbellosen Tieren (Beiträge z. chemischen Physiologie, Bd. III, s. 578, 1902).*

(3) *V. Ducceschi: Di una modificazione macroscopica del sangue che precede la coagulazione (R. Accademia dei Lincei. Seduta del 1.º Febr. 1903. Rend. Vol. XII, pag. 94, 1905).*

(4) *A. Zeri e M. Almagià: Sull' agglutinazione delle piastrine nelle malattie febbrili (Policlinico. Sez. Prat. 1915).*

(5) La sangre de la rana constituye un material muy oportuno para demostrar en clase la influencia de los tejidos en el proceso de la coagulación. Distribúyase la sangre de una rana, extraída con una jeringa parafinada, entre dos vidrios de reloj esterilizados y parafinados; se deja caer en un vidrio dos o tres fragmentos de músculo del mismo animal y se agita. La diferencia en el tiempo de coagulación entre la sangre de los dos vidrios es ordinariamente de más de una hora.
