

RELACION DEL HIGADO
CON LA
COAGULACION DE LA SANGRE ⁽¹⁾

POR
M. DOYON

Extraido del *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*
Núm. 2, 15 Marzo 1912.

I. Condiciones de la incoagulabilidad de la sangre

La sangre circulante puede perder la propiedad de coagularse en dos circunstancias por lo menos, las dos en relación con la actividad del hígado. Estas circunstancias son:

- a) La falta de fibrinógeno del plasma sanguíneo.
- b) La presencia en la sangre de un exceso de secreción interna anticoagulante: la antitrombina.

II. Falta de fibrinógeno

He sido el primero en demostrar que la ablación del hígado ó las lesiones graves de este órgano, determinan la desaparición del fibrinógeno del plasma, y por consecuencia, la incoagulabilidad irremediable de la sangre. He

(1) Este artículo tiene por objeto resumir y coordinar mis investigaciones recientes referentes al hígado y la coagulación de la sangre.

probado que el hígado es necesario para la producción de la fibrina y probablemente segrega el fibrinógeno.

Practicué la ablación del hígado en el perro y en la rana. En el perro, si se practica la ablación del hígado y se hace comunicar la vena porta con la sup-hepática, la sangre vuélvese rápidamente incoagulable de una manera definitiva. La sangre de ranas que han sufrido la extirpación del hígado, queda ya absolutamente líquida, sin rastros de fibrina, ya sin presentar cuerpo, encerrando sin embargo, algunos filamentos; la incoagulabilidad puede aparecer desde el tercer día después de la ablación del hígado.

Si se sangra una rana quitando á su sistema circulatorio toda la sangre que contiene para sustituirla por sangre desfibrinada, se constata que la fibrina es regenerada en algunas horas y que esta regeneración no se produce si el animal ha sido privado de su hígado.

He provocado la necrosis del hígado y la desaparición del fibrinógeno del plasma por el fósforo, un suero hépatotóxico preparado según las indicaciones de Delezeny y el cloroformo.

La acción del cloroformo debe merecer preferente atención de parte de los médicos y cirujanos. Demostré que el cloroformo determina paralelamente la incoagulabilidad de la sangre y la necrosis del hígado. El plasma recojido en estas condiciones no contiene, ó casi no contiene, fibrinógeno. La acción del cloroformo es indirecta; el veneno ejerce una acción electiva sobre el hígado y no provoca la incoagulabilidad de la sangre sino en el caso de ser el hígado lesionado.

Las condiciones experimentales son habitualmente las siguientes: se dá á un perro, todos los días por medio de una sonda estomacal, 2 gr. de cloroformo por kilogramo de animal. Para evitar la acción irritante del cloroformo se mezcla esta sustancia á 3 volúmenes de aceite. Los animales mueren en general en 3 ó 4 días. Poco ó nada de ictericia. Cuando los sujetos presentan una ictericia pronunciada sobreviven en general un tiempo más largo; las modificaciones de la sangre son menos netas; el hígado es menos gravemente atacado. Una sola dosis de cloroformo es suficiente algunas veces para producir la necrosis del hígado y la incoagulabilidad de la sangre.

He constatado que una sola y relativamente corta anestesia clorofórmica por inhalación, puede determinar en un sujeto, en apariencia absolutamente sano, la necrosis del hígado y la incoagulabilidad de la sangre, es decir la icteria grave. Mis investigaciones dan la explicación de los accidentes y de la muerte rápida, observadas por algunos cirujanos después de las operaciones. Estos accidentes y la muerte, son generalmente atribuidos, sea al shock operatorio, sea á productos sépticos. Yo demuestro que el cloroformo es suficiente por sí solo para provocar la icteria grave y la muerte.

DEMOSTRACION.—Perro de talla mediana, 8 á 10 años, parece en buen estado de salud y notablemente alegre. Anestesia por inhalación de cloroformo puro durante 35 minutos. Tres muestras de sangre de 20 gr. c/u se recogen el primer día: la primera inmediatamente antes de la anestesia, la segunda inmediatamente después, la tercera dos horas después de terminada la anestesia. Se toman varias muestras al otro día. La sangre recogida en este momento no coagula, y no contiene más que trazas de fibrina. El perro es sacrificado 28 horas después de la anestesia. El hígado es amarillo y presenta al exámen microscópico necrosis de coagulación muy acusada y generalizada. Los riñones con esclerosis cortical y medular (hecho habitual en los perros viejos). La orina muy coloreada en amarillo naranja, conteniendo albúmina y cantidades considerables de urobilina; reacción de Gmelin neta, pero poco acusada.

En otras experiencias, he constatado al otro día de la anestesia, un aumento de la fibrina, aumento debido, como he podido convencerme por experiencias comparativas, á las tomas sucesivas de sangre.

<i>Perros en experiencia</i>		1	2	3
Duración de la anestesia (minutos)		35	45	45
Fibrina (gr.) por 1000 g. de sangre	Antes de la Anestesia	2,3	2,8	1,3
	inmediatamente despues	2,3	2,8	1,3
	2 horas y 1/2 despues	2,3	2,8	1,3
	al otro día (noche)	0,3	3,5	—
	al 2° día (mañana)	—	—	2,1
Tiempo necesario minutos á la toma en mas-a	antes de la anestesia	10 á 15	4 á 8	4 á 9
	inmediatamente despues	35	—	11
	2 horas y 1 1/2 despues	5	15	4 á 5
	al otro día (noche) incoagulable	—	5	—
	al 2° día (mañana)	—	—	13

La necrosis del hígado y la incoagulabilidad de la sangre consecutivas á una sola anestesia son hechos excepcionales. Casi siempre he constatado con A. Policard, que toda anestesia clorofórmica un poco prolongada, ejerce sobre el hígado una acción necrosante que se continúa hasta la cesación de la anestesia. Este hecho ha sido confirmado por Rathery y Sannson y más recientemente por Whipple y Hurwitz.

Whipple y Hurwitz constatan en sus experiencias que toda anestesia clorofórmica un poco prolongada, provoca lesiones hepáticas y un descenso concomitante del tenor en fibrinógeno del plasma. El fibrinógeno puede desaparecer; y reaparece á medida que el hígado separa sus lesiones. Whipple y Hurwitz, afirman que el tenor en fibrinógeno de la sangre, es un excelente índice de la actividad hepática y concluyen nétamente que el fibrinógeno depende íntimamente de la actividad del hígado. Whipple y Hurwitz han dosado paralelamente el fibrinógeno en la sangre y seguido sobre el mismo animal, tomando muestras sucesivas, las lesiones del hígado y la reparación de estas lesiones.

III. Sustancia anticoagulante de origen hepático

La sangre puede volverse incoagulable debido á la presencia de un exceso de una sustancia anticoagulante de origen hepático: la antitrombina.

1^o *Naturaleza y propiedades de la antitrombina hepática.*
—Con A. Morel y A. Policard, he indicado que la antitrombina debe ser aproximada á las sustancias que se extraen de los núcleos celulares. Es precipitada por los ácidos, el alcohol, se disuelve en las soluciones alcalinas débiles. Purificada por precipitaciones y disoluciones sucesivas, dá débilmente la reacción del biuret; contiene carbono, azoe y fósforo (2 á 3 %).

La anti-trombina no es alterada por el vacío. Se ca resiste á +105°. En solución alcalina puede ser calentada

durante más de 2 horas á baño-maría hirviente sin perder su actividad. El hígado puede ser sometido durante 20 minutos á 134° al auto-clave sin inconvenientes.

La antitrombina hepática en solución alcalina, posee la propiedad de impedir, *in vitro*, la coagulación de la sangre.

2° *Preexistencia en el hígado. Extracción del hígado triturado.*—La antitrombina preexiste en el hígado. Se la puede extraer, sea directamente del hígado triturado, sea por una circulación artificial.

Lo antitrombina puede ser extraída del hígado triturado, por medio de una solución débilmente alcalina ó simplemente por medio de una solución de cloruro de sodio al 9 ‰.

La extracción se efectúa, en general, de la manera siguiente: se sacrifica un perro por la sangría después de la sección del bulbo. El hígado es lavado; introduciendo por la vena porta varios litros de una solución de cloruro de sodio al 9 ‰, á 40° bajo una presión de 60 centímetros más ó menos. Para arrojar toda la sangre es conveniente comprimir de tiempo en tiempo el tubo de salida colocado en la vena cava hacia abajo del hígado, con el objeto de distender la glándula; será bueno también comprimir los lobos de tiempo en tiempo. Una pinza debe haberse colocado sobre la vena cava inferior, hacia abajo del hígado, para impedir la vuelta del líquido.

La glándula es enseguida triturada y luego adicionada de un peso igual de la solución siguiente: agua, 1000; cloruro de sodio, 5; carbonato de soda cristalizado, 4. La mezcla es calentada durante 15 á 20 minutos al baño-maría hirviente, en vaso cerrado, para evitar toda alteración ulterior; luego se la deja reposar durante varias horas. Se calienta de nuevo al baño-maría hirviente durante 15 á 20 minutos. Se le exprime en una prensa y el líquido se centrifuga (1). Se agrega una pequeña cantidad de ácido acético al 50 ‰ y se calienta—se centrifuga. El precipitado es lavado varias veces al agua destilada y disuelto en líquido alcalino. Se prueba la actividad de la disolución agregando á una muestra un volumen igual de sangre normal, derivada directamente de una arteria á un tubo de ensayo. La mezcla permanece líquida durante varios días.

El hígado puede ser calentado durante más de una hora al autoclave á 110° y aún á 134° sin que la antitrombina pierda su actividad. En general, yo someto los hígados de perro ó de buey, antes de triturarlos,

(1) Cuando la cantidad de hígado es muy considerable el líquido obtenido en estas condiciones es inactivo; es necesario entonces, calentar durante 10 á 15 minutos al baño-maría hirviente.

durante tres cuartos de hora al autoclave á 120°, cuando las glándulas provienen del animal sin lavaje previo. El líquido obtenido es muy activo. Es preferible en estas condiciones tratar las glándulas lo más pronto posible después de la muerte.

La maceración es en general prolongada durante varias horas. Sin embargo, el líquido puede ser activo aún cuando la maceración no haya durado más que una media hora.

·3° *Circulaciones artificiales.*—La antitrombina puede ser extraída del hígado triturado y previamente lavado por medio de una circulación artificial, utilizando una solución débilmente alcalina (agua destilada, 1000; cloruro de sodio, 5; carbonato de soda, 4).

El líquido, tal cual sale del hígado, es generalmente dotado de propiedades coagulantes enérgicas, debido indudablemente á la coexistencia con la antitrombina de sustancias designadas bajo el nombre de coagulinas. Para hacer aparecer las propiedades anti coagulantes, será suficiente calentar el líquido á su salida del hígado durante algunos minutos, á la temperatura de ebullición á bañomaría.

La temperatura del laboratorio puede ser suficiente después de haber actuado algunas horas (doce á veinte y cuatro horas), para producir, sobre la solución alcalina que ha atravesado el hígado, los mismos efectos que el bañomaría á 100°.

El calor únicamente actúa bien, en medio alcalino. En efecto, si se hace circular á travez de un hígado una solución fisiológica de cloruro de sodio al 9 ‰, la solución contiene anti-trombina; pero, si esta no es inmediatamente descubierta, las propiedades anti-coagulantes no se manifiestan sino cuando se alcaliniza antes de calentar el líquido que ha atravesado el hígado (1). Este hecho explica el fracaso de todas las tentativas anteriores que

(1) En algunos casos excepcionales, he constatado que el agua salada es, á la salida del hígado, anti-coagulante. Son en estos casos las primeras porciones que poseen el poder anti-coagulante. El agua salada que atraviesa varias veces la glándula posee siempre una acción coagulante enérgica.

tenían como objeto descubrir la anti-trombina en el hígado por medio de circulaciones artificiales.

4° *Extracción por la sangre.*—He constatado que es posible extraer la anti-trombina del hígado, haciendo pasar á travez de la glándula—aún cortada y lavada—sangre arterial normal, derivada directamente de una arteria sin adición de sustancias estrañas.

La sangre derivada puede ser incoagulable y poseer el poder anti-coagulante subitamente á su salida del hígado, en las primeras muestras. En general el líquido recogido más tarde del hígado, no es totalmente incoagulable y netamente anti-coagulante, como cuando se interrumpe la llegada de sangre arterial. El efecto, es muy rápido y se manifiesta aún estando la sangre absolutamente líquida en el tubo de llegada á la glándula. He recogido el líquido que sale del hígado gota á gota, después de la cesación del aflujo arterial, durante doce ó veinte y cuatro horas. Este líquido es generalmente muy activo, sobre todo el que sale último.

EJEMPLO.—Perro de 18 kilogramos, 3 á 4 años, en ayunas desde tres dias. Sección del bulbo y sangría. Durante la sangría y mientras el corazón late, se hace pasar por la vena porta la sangre arterial de un segundo perro de 18 klg. (edad mediana, habiendo comido el dia anterior), tomada de la carótida por medio de un tubo lo más corto posible. Se recibe la sangre á la salida del hígado por intermedio de una cánula colocada en la vena cava inferior muestras de 25 c. c. cada una. A partir de la tercera muestra, se intercalan 5 á 8 segundos de interrupción entre cada toma, para provocar una éxtasis en el hígado que se distiende notablemente. Las seis primeras muestras, coagulan en algunos minutos; la séptima al otro dia; la octava, al segundo dia; la novena, al tercer dia; la décima es adicionada con un volúmen igual de sangre de un tercer perro: la mezcla coagula 48 horas después.

EJEMPLO.—Se practica la sangria carotidiana en un animal joven (perro de 12 klg. más ó menos). Desde el principio de la sangría se sacrifica el animal por la sección del bulbo; se aísla rápidamente el hígado; se coloca una pinza sobre la vena cava inferior debajo del hígado después se introducen dos cánulas, una en la vena porta, la otra en la vena cava inferior hacia afuera del hígado.

Mientras la sangre sale aún por la carótida, se hacen pasar rápidamente á travéz del hígado 10 á 12 litros de una solución de cloruro de sodio al 9 %₀₀, á 40-41°; procurando comprimir ligeramente, de tiempo

en tiempo, los lobos hepáticos con el objeto de arrojar la sangre; se colocan enseguida dos pinzas á la entrada y á la salida del hígado, que se abandona muy ligeramente distendido, á la temperatura del laboratorio.

Treinta y cinco minutos después del lavaje, se hace pasar directamente á travéz del hígado así preparado, la sangre carotidiana de un segundo perro. La sangre es recibida á la salida del hígado en tubos de ensayo por muestras de 20 á 30 c. c.; entre cada toma se comprime el tubo de salida durante algunos segundos, procurando provocar una corta éxtasis de sangre en el hígado. Los dos primeros tubos no contienen sinó, casi unicamente, agua salada.

Todas las muestras quedan líquidas el primer día. Al otro día, por la mañana, las muestras 4, 5, 6, 7, están completamente coaguladas; las muestras 8, 9, 10 y 11 presentan algunos coágulos blandos; á la noche la muestra 8 es coagulada. La muestra 9 es coagulada al segundo día por la mañana.

He mezclado á volúmenes iguales, sangre normal y sangre proveniente de los tubos 9 y 10.

La mezcla no ha coagulado totalmente sino al otro día. El efecto anti-coagulante no es debido á la simple mezcla de sangre incoagulable ó sangre normal, porque si se mezcla sangre disfibrinada (4 volúmenes) á sangre normal (1 volúmen), la coagulación completa es instantánea, ó por lo menos muy rápida. La acción anti-coagulante no es tampoco ejercida por el agua salada. Si se mezcla, en efecto, 1 volúmen de sangre normal á 1 volúmen de una solución de cloruro de sodio al 9 ‰, la coagulación de la mezcla es más rápida que la coagulación de la sangre normal sola. Por otra parte, he constatado que la sangre de las muestras 8 y 9 contenían casi 6.000.000 de glóbulos rojos por milímetro cúbico, y por lo tanto no era diluida. La sangre carotidiana del segundo perro, tomada arriba del hígado lavado se había coagulado en 2 minutos. Desde la 11ª toma, hasta el momento de terminar la experiencia, no existió ningún coagulo en las cánulas ni en los tubos de comunicación. Las tomas 10 y 11 fueron hechas cuando ya una pinza había sido colocada sobre la carótida para interrumpir la circulación.

La inyección de peptona, de atropina, de agua destilada, de cloroformo, en el tubo que reúne la carótida á la vena porta del hígado aislado, favorece la aparición de la sustancia anti-coagulante. Yo recuerdo que *in vitro* el cloroformo provoca, por así decir, instantáneamente la coagulación en masa de la sangre.

La reacción del hígado bajo la influencia de sangre arterial, adicionada ó no de sustancias estrañas, puede obtenerse varias semanas después de la separación y

EXPERIENCIAS	MUESTRAS ADICIONADAS DE UN VOLUMEN IGUAL DE SANGRE NORMAL	TIEMPO NECESARIO PARA LA COAGULACION	
I. Perro de 14 Klg. en ayunas, 4 á 5 años, hígado lavado, después congelado y descongelado 3 veces sucesivamente en 24 horas.	Solución Na Cl.	4 minutos 15 minutos 19 minutos Líquido aun después de varios días.	
	Solución alcalina	10 Solución habiendo atravesado 3 veces la glándula hipática	
		20 La misma solución después de 24 horas de estar á la temperatura del laboratorio	
		30 La misma al salir del hígado pero antes calentada	
	Solución Na Cl.	10 La misma adicionada antes de calentada con carbonato de soda (5 0.00)	
		20 Solución habiendo atravesado 3 veces la glándula laboratorio	5 minutos Líquido aun después de varios días.
		30 La misma calentada al salir del hígado	Id. id.
	Solución alcalina	10 Solución habiendo atravesado 3 veces la glándula.	6 minutos 20 minutos
		20 La misma antes calentada	Líquido aun después de varios días.
		30 La misma adicionada de carbonato de soda (5 0.00) después en nada	
Solución alcalina	10 Solución habiendo atravesado 3 veces la glándula.	3 minutos Líquido aun después de varios días.	
	20 La misma antes calentada		
	30 Solución fisiológica de cloruro de sodio adicionada de carbonato de soda (5 0.00) pero no habiendo pasado por el hígado		
Muestras testigos	10 Sangre normal sola	14 Minutos 5 minutos	
	20 Sangre normal sola		
III. Perro de 2 años más ó menos, hígado lavado, después congelado y descongelado una vez.	Solución alcalina	2 minutos Líquido aun después de varios días.	
	Muestras testigos	Líquido de circulación habiendo atravesado 12 veces la glándula	
		El mismo líquido hervido durante 5 minutos	
	Solución de la sustancia activa aislada y purificada	15 minutos 12 minutos	

(Doyon, A. Morcl, A. Policard)

lavaje de la glándula en los casos en que ésta haya sido conservada á 8°-10°.

5° *Influencia de la congelación.*—He observado que la congelación del hígado seguida de descongelación, favorece netamente la salidad de la anti-trombina.

Para congelar el hígado utilicé el ácido carbónico líquido. El órgano previamente lavado, es suspendido en una caja cerrada, forrada con un paño en el interior. Por una abertura practicada en la tapa, se hace llegar el chorro de una bomba á ácido carbónico líquido, hasta que la caja esté completamente llena de nieve bien espesa. El hígado es mantenido en la caja en contacto con la nieve durante varias horas. El mercurio colocado en el centro de una bola es perfectamente congelado en estas condiciones. La glándula es enseguida retirada y abandonada durante un día á la temperatura del laboratorio. La operación puede ser repetida varias veces.

El hígado es luego sometido al pasaje sea de una solución salina, sea de sangre directamente derivada de la arteria de un perro nuevo; ó sucesivamente, de los dos líquidos. El agua salada que ha atravesado el hígado varias veces carece de acción sobre la sangre normal *in vitro* no impidiendo la coagulación. La sangre carotidiana que ha atravesado el hígado, no coagula ó coagula lenta é incompletamente; el hecho es constante en estas condiciones. Además, esta sangre impide *in vitro* á la sangre normal coagularse. (El suero fresco puede, á dosis elevadas, determina la coagulación de la sangre que ha atravesado el hígado; el suero viejo carece de acción á la misma dosis).

He comparado así con A. Morel y A. Policard el poder anti-coagulante de las dos mitades de un hígado, habiendo una sola sido congelada y luego deshelada.

NOTA—La separación de la núcleo-albúmina anti-coagulante (anti-trombina) bajo la influencia de la congelación seguida de la descongelación, coincide con profundas modificaciones de los núcleos celulares y la salida en abundancia, fuera de las células, de sustancias protoplasmáticas. Los núcleos son extremadamente plegados, arrugados, condensados; la cromatina impregna á veces, de una manera difusa, todo el núcleo. Esta alteración es muy visible y particularmente constante en las glándulas congeladas por lo menos dos veces. (Doyon y A. Policard).

6° *Dialisis clorofórmica. Acción del cloroformo.*—La dialisis clorofórmica, es un procedimiento de obtención de las sustancias solubles, más ó menos mezcladas, al contenido celular. Draste ha conseguido extraer del hígado, por este procedimiento, el fermento hepático capaz de transformar la glicosa en azúcar.

Yo, por mi parte, he constatado que el líquido exudado del hígado prolongado en una atmósfera de cloroformo impide á la sangre coagularse *in vitro*.

EJEMPLO.—Perro de 12 klg. de 2 á 3 años, en ayunas desde el día anterior. El animal es sangrado después de la sección del bulbo. Durante la sangría, se lava el hígado con varios litros de agua salada al 9 ‰. Inmediatamente después, se corta la glándula en rebanadas muy finas, se secan groseramente con un trapo y se colocan en un recipiente bajo una campana, sobre un depósito, conteniendo cloroformo. Se hace el vacío en la campana. Una parte del hígado no ha sido expuesto á los vapores del cloroformo y se conserva en esas condiciones.

48 horas más tarde: *a)* se recoje el líquido exudado. Se le agrega una pequeña cantidad de solución alcalina débil (agua 100, cloruro de sodio 5 gr., carbonato de sodio 4 gr.), habiendo servido para lavar el recipiente en el cual estaban colocadas las rebanadas de hígado. La mezcla es aereada, luego centrifugada; *b)* se trituran las rebanadas de hígado y se hace macerar la papilla así obtenida durante 4 horas con un peso igual de solución alcalina débil; la mezcla se prensa, el líquido centrifugado; *c)* los fragmentos del hígado no expuestos á los vapores de cloroformo son sometidos al mismo tratamiento. Se agrega á cada muestra un volúmen igual de sangre normal derivada directamente de la carótida de un perro nuevo.

**Muestras adicionadas
de un volúmen igual de sangre**

Líquido exudado del hígado sometido á la dialisis.

Líquido proveniente de hígado sometido á la dialisis previa maceración.

Líquido proveniente de hígado no sometido á la dialisis previa de la maceración.

Momento de la coagulación

Líquido aún después de varios días.

Coagulación en algunos minutos.

Coagulación en algunos minutos.

He dicho más arriba que si se hace circular varias veces á través de un hígado de perro, una solución de cloruro de sodio al 9 ‰, el líquido es casi siempre dotado de propiedades coagulantes enérgicas. Para hacer aparecer las propiedades anti-coagulantes es necesario alcalinizar y después calentar el líquido que ha atravesado la glándula. He constatado que si se agrega cloroformo á la solución fisiológica de cloruro de sodio destinada á pasar á través del hígado, el líquido posee á su salida de la glándula, propiedades anti-coagulantes enérgicas.

gicas. Es necesario solamente eliminar el cloroformo, que determina la coagulación en masa inmediata de la sangre agregada.

EJEMPLO.—Perro de 15 á 16 klgr., 6 á 8 años, en ayunas desde 24 horas (1). Lavaje del hígado durante la sangría, previa sección del bulbo. Terminado el lavaje se hace pasar rápidamente, seis veces continuas á travéz del hígado una mezcla constituida por: 800 c. c. de agua salada al 9 ‰ y 100 c. c. de cloroformo anestésico, teniendo la precaución de provocar de tiempo en tiempo la distensión de la glándula. El cloroformo es enseguida eliminado por decantación y barlotajes de aire.

a) Se toma una primera muestra de líquido y se le adiciona un volumen igual de sangre normal, derivada directamente de la carótida de un perro. La mezcla permanece incoagulable durante varios días.

b) El sobrante de líquido (600 c. c. más ó menos) es calentado al baño-maria hirviente, durante seis minutos; el coágulo es eliminado por centrifugación; el líquido es adicionado de 10 c. c. de una solución de ácido acético al 50 %, después ligeramente calentado. El precipitado, formado, es lavado y redisolto en agua débilmente alcalina. La solución es adicionada de un volumen igual de sangre normal de perro derivada directamente de una arteria; la mezcla permanece líquida durante varios días.

7° *Condiciones particulares á ciertas especies.*—La anti-trombina parece existir en el hígado de todos los animales. Nosotros la extraemos habitualmente del perro y del buey:

La operación presenta en ciertas especies dificultades especiales. No se obtiene anti-trombina sometiendo el hígado del conejo á la simple maceración seguida del calentamiento. La congelación prévia aún repetida no dá resultados. La dialisis clorofórmica, la adición de cloroformo al líquido en circulación dá resultados sencillamente menos eficaces que en el perro.

Para obtener anti-trombina, la glándula debe ser previamente llevada al autoclave á 120°. (Doyon y A. Policard).

Repito con este motivo, que la peptona y la atropina carecen de acción sobre la coagulabilidad de la sangre en el conejo.

8° *Pasaje de la antitrombina hepática en la sangre del animal vivo.*—Se conoce un cierto número de sustancias

(1) Para evitar que el líquido en circulación esté muy cargado de glicógeno.

capaces, cuando ellas son inyectadas en los vasos, de provocar indirectamente, por intermedio del hígado, la coagulabilidad de la sangre. La peptona es la más antigua de las conocidas.

Se sabe que la peptona determina por intermedio del hígado, la aparición de un agente anti-coagulante directo; hasta ahora no se sabe nada ó casi nada referente á la naturaleza y propiedades de este agente. Las condiciones de transformación de la antitrombina son también muy oscuras. Delezene ha demostrado que para dar un líquido activo, la peptona debe circular mezclada á la sangre. Todas las tentativas han fracasado cuando se ha procurado obtener un líquido activo; sea haciendo circular á travéz del hígado agua salada adicionada ó no de peptona y sangre. Delezene, sin embargo, ha constatado que la antitrombina puede aparecer si se inyecta en el hígado sangre desfibrinada ó suero. Nolf, Camus y Fley habían observado hechos análogos. Finalmente, se ignora que parte de la sangre ó del hígado interviene en la aparición de la antitrombina. Howneffer, en una tesis reciente (Genova 1908), constata estas incertidumbres y concluye por sus experiencias que, para dar un líquido activo, la peptona debe ser mezclada á la sangre lo más fresca posible; dependiendo el resultado principalmente de la vitalidad del hígado.

He demostrado con A. Morel y A. Policard, que la sustancia anti-coagulante que aparece en la sangre bajo la influencia de la peptona es idéntica á la antitrombina que preexiste en el hígado.

DEMOSTRACION.—La sangre incoagulable de un perro peptonizada, es centrifugada. Se separa el plasma. Para constatar las propiedades anti-coagulantes de este plasma, se le agrega igual cantidad de sangre arterial de un perro sano, notándose que no hay coagulación apreciable.

El plasma en esas condiciones, ligeramente alcalino por consecuencia, es calentado á 100° al baño-maria durante 10 minutos. El líquido separado del precipitado por centrifugación, es fuertemente anti-coagulante. Estos hechos confirman las constataciones anteriores de Delezene sobre el plasma peptonizado hepático. El precipitado no contiene antitrombina, pues su disolución en un líquido alcalino (agua 1000 cloruro de sodio

6 gr.; carbonato de soda cristalizado 4 gr.), no confiere á este propiedades coagulantes.

El plasma calentado á 100° y separado del precipitado por centrifugación, es acidulado ligeramente con ácido acético y calentado 10 minutos á 100°. La antitrombina es arrastrada por el nuevo precipitado producido en estas condiciones. En efecto, el líquido que sobrenada, vuelto á la alcalinidad primitiva del plasma, resulta inactivo.

La antitrombina en estas condiciones, precipitada, puede ser redisuelta por una solución débilmente alcalina, coagulada nuevamente en ácido y así disuelta y recoagulada cuatro veces consecutivas no pierde sus propiedades anti-coagulantes *in vitro*. Esta presenta las propiedades de la antitrombina hepática. (Doyon, A. Morel y A. Policard).

Otras sustancias actúan como las peptonas. He hecho conocer algunas de estas sustancias químicamente definidas: atropina, bilis, sales biliares, crepitina, extracto de Gui.

Demosté que ciertas sustancias (atropina, bilis, sales biliares) no provocan en el animal vivo la formación de la antitrombina sino cuando ellas penetran por la vena porta ó el canal excretor del hígado. Estas sustancias son entonces inactivas, no únicamente *in vitro*, sino cuando ellas penetran en el organismo viviente por una vena de la circulación general. He probado además, que las sustancias que actúan, cualquiera sea el vaso por el que ellas penetren (peptona, crepitina), actúan á dosis infinitamente mínimas, si la inyección se efectúa en la vena porta ó en el canal colédoco, y con menor intensidad en los casos en los cuales la inyección es hecha en una vena de la circulación general.

La atropina (sulfato neutro) determina la incoagulabilidad á la dosis de un centígramo en el perro, si la inyección es hecha en una mesarática. (Doyon y Kareff). El resultado es constante cuando se inyecta en el colédoco á la dosis de uno á dos centigramos por Kilgr; las dosis iguales inyectadas en la yugular ó la safena son inactivas; dosis iguales y mucho más considerables son inactivas *in vitro*. En una vena de la circulación general, es necesario pasar la dosis de 6 centigramos por Kilgr para provocar la incoagulabilidad. La dosis mortal está próxima á esa cifra. Sin embargo, he observado un caso de sobrevida después de la inyección de 8 centigramos por kilogramo en la safena. Ningún perro sobrevive á la inyección de 1 decígramo por kilogramo en las venas.

La experiencia siguiente realizada con A. Morel y A. Policard, demuestra que el núcleo proteido hepático anticoagulante no pasa en la sangre, solo que la inyección de atropina se efectúe en el colédoco ó la vena porta.

La demostración es evidenciada en dos robustos perros aproximativamente del mismo peso y edad. Se retira de cada sujeto 200 c.c. de sangre; después se practica la inyección, en uno de los perros en el colédoco en el otro en la safena, una igual cantidad de solución de atropina al 1 % (1). Se espera 15 minutos y previa constatación de los efectos sobre la sangre, se recogen nuevamente de cada animal 200 gramos de sangre.

Todas las muestras de sangre han sido recogidas sobre oxalato para impedir y evitar la coagulación y para igualar las condiciones en los casos de tomas incoagulables.

El plasma es separado de los glóbulos por centrifugación; después calentado durante 20 minutos á baño-maría hirviente. El nucleo-proteido es buscado en el líquido separado del coágulo, purificado dos veces y evacuado según su tenor en fósforo al estado de fosfomolibdato de amoniaco.

<i>Lugar de inyección</i>	<i>Cantidad de fosfomolibdato obtenida referida á 1000 gr. de sangre.</i>
Colédoco: antes de la inyección	menos de 0 gr. 005
después "	— 0 gr. 085
Safena: antes "	menos de 0 gr. 005
después "	— 0 gr. 005

En los dos casos, la acción de la atropina es la misma sobre la sangre, y en particular sobre los glóbulos. Sólo la acción del hígado es evidente. El núcleo-proteido que aparece en la sangre después de la inyección en el colédoco no puede proceder sinó del hígado. (Doyon, Morel y Policard).

9º *Existencia general y repartición de la antitrombina en el organismo.*—He extraído con Policard una sustancia que parece idéntica á la antitrombina de otros órganos y notablemente del pancreas y del bazo.

El órgano es sometido durante 40 minutos, más ó menos, al autoclave á 120° después, triturado y calentado durante 15 minutos á baño-maría hirviente en vaso cerrado con un peso igual de solución alcalina débil. Se deja macerar durante algunas horas. Se calienta nuevamente á baño-maría durante 15 minutos, se exprime y se prensa. El líquido centrifugado es anticoagulante. El ácido acético

(1) 40 á 45 c. c. á perros de 21 á 23 kilógr.

precipita una sustancia fosforada muy activa que parece idéntica á la antitrombina.

La digestión pancreática aséptica y la putrefacción, hacen aparecer en algunas horas, en ciertos órganos, una sustancia anticoagulante que, resiste á 120° y que se identifica con la antitrombina hepática y con una sustancia anticoagulante que Conradi obtiene solamente después de una autólisis aséptica de varias semanas.

La distribución de la antitrombina en el organismo parece entónces calcada sobre sustancias como el glicógeno y notablemente el fibrinógeno. La antitrombina existe no solamente en el hígado sino en otros órganos, posiblemente en todos. El hígado no contiene sino una reserva fácilmente movilizable por el organismo. La antitrombina del hígado parece poder pasar fácilmente á la sangre bajo ciertas influencias, por ejemplo: experimentalmente bajo la influencia de la peptona y la atropina. Este pasaje es más ó menos parcial á determinar según las especies animales; la peptona y la atropina, eficaces en el perro, carecen de acción en el conejo.

10. *Parentesco con la Hirudina.*—El agente anticoagulante de la sanguijuela se asemeja á la antitrombina hepática por el tenor en fósforo característico de los nucleos-proteidos. (Doyon A. Morel y A. Policard).

a) El extracto de cabezas de sanguijuelas preparado por nosotros fué adicionado de ácido acético; el coágulo separado del líquido. Se sabe desde los estudios de Franz y Jacobi que la hirudina no precipita por el ácido acético. De hecho el líquido solo es anticoagulante y contiene una cantidad considerable de fósforo. El coágulo inactivo no contiene sino trasas infinitesimales de fósforo. El poder anticoagulante es entonces parecido al de los cuerpos fosforados.

b) La hirudina, agente anticoagulante del extracto de cabezas de sanguijuelas, preparado y purificado por Sacchse en Dresde, representa la forma más pura que se conoce de estos agentes. Doyon, Morel y Policard han investigado la presencia de fósforo en cantidad considerable en las muestras utilizadas para verificar la actividad (1.70 % de hirudina seca).

G. P.