

Contribución al reconocimiento de la hiperfunción plaquetaria en clínica

Miguel Ingelmo Morin

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DISCUSION

Hemos utilizado la técnica de Breddin (52) para medir la adhesividad en 111 individuos. Creemos que es una técnica sencilla, que no necesita instrumental especial como ocurre con las demás técnicas (51,54): Es valorable realizando la extensión en cámaras para cada individuo a explorar y al menos diez recuentos por cámara con objeto de reducir al mínimo el error.

Se le ha achacado a esta técnica el que los contajes no se pueden efectuar bien por la presencia de aglutinación en las cámaras pero creemos que no incurriendo en defectos de técnica ésto se haría fácilmente despreciando la cámara ó parte de cámara en que esto ocurra.

Wright (85) cree que hay una agregación debida a la solución salina del citrato sódico. Es posible, pero con los métodos actuales no es posible diferenciar las funciones adhesividad-agregación y creemos que desde un punto de vista funcional son también difícilmente separables. Realizamos, comparativamente adhesividad por los métodos de Breddin y Borgmewink (54) método éste "in vivo" y los resultados no eran equiparables. Pensamos con varios autores (18,37), que en este último método se valora el globalmente el primer tiempo de la hemostasia y por tanto es menos selectivo para esta función.

Además con esta técnica hay la ventaja de no efectuar nada más que una manipulación para los dos contajes y no es por contaje diferencial en que sale más el error.

En 32 individuos sanos, hemos obtenido un valor medio de 0,81 con una desviación standart de 0,09. Valores discretamente inferiores a los obtenidos por Breddin (52),

En enfermos arterioscleróticos la media resultó de 0,90 con una desviación standart de 0,17, aplicando el test de Student $t = 2,62$ con $p < 0,02$, estadísticamente significativo. En la literatura, casi todos los autores encuentran aumento (90,92,94,95,96), aunque Eisen y Stomorken (55) no han confirmado estos resultados.

En mujeres jóvenes tratadas con anovulatorios la media fue de 0,99, con extracción realizada el día 14, con desviación estándar de 0,17. Aplicando el test de Student $t=3,36$ con $p < 0,01$ muy significativo. Hay muchos trabajos en este sentido y las opiniones se dividen (118, 119, 120, 121, 136). Creemos que esto es difícil debido a si toman ó no los anovulatorios y el momento de la prueba. Nosotros escogimos el día 14 porque en los alrededores de la menstruación ya hay alteraciones plaquetarias en número y función sólo por este hecho fisiológico (12)

El estudio en 36 diabéticos, nos ha dado una media de 0,84 con desviación estándar de 0,19 y test de Student con $t=0,5$ no significativo. Con las diferentes técnicas y la enfermedad en estadios diferentes hay muchos trabajos y las opiniones no son máximas, pero concuerdan en que sin complicaciones la adhesividad es normal. Hellen (115), encuentra la adhesividad medida en sangre entera normal y aumentada, utilizando FRP en los pacientes que requieren Insulina. Nosotros esta evidencia no la hemos encontrado.

El estudio de la agregación plaquetaria lo realizamos en principio por un método fotométrico sin control de temperatura y sin automatización de la gráfica. Los resultados de los 100 individuos estudiados no los hemos conocido en esta tesis porque no nos parecían pasapaseables a los obtenidos por el agregómetro, usado posteriormente.

Más tarde con el agregómetro suministrado por el Profesor Torr y usando un método fotométrico (56,57), hemos estudiado 129 individuos, 52 normales, 17 diabéticos, 25 arterioescleróticos, 6 con pulmonar crónico, 5 infecciosos y una mielosclerosis con metaplasia mieloide.

Junto a la agregación, estudiamos en los enfermos los parámetros lipídicos por métodos químicos, lipoproteínas por electroforesis en acetato de celulosa y cromatografía en capa fina. (128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 y 135). La determinación de lípidos totales nos parece un parámetro clínico poco valorable; la cromatografía nos ha servido para control de las determinaciones químicas y esperamos sirva para posteriores estudios.

No hemos hecho valoración de lípidos-enfermedad, si no que un enfermo bien por su enfermedad fundamental ó asociada tenía unos valores de lípidos que después hemos contrastado con las funciones plaquetarias asociado a su enfermedad fundamental e independientemente.

La valoración de la agregación nos ha exigido el estudio de un método nuevo. Hemos considerado "a priori" una relación lineal entre densidad óptica-agregación. Con este supuesto hemos valorado las curvas de agregación, por el método con que se valora una curva logística.

Obtuvimos cinco parámetros, de los cuales creemos son valorables tres: máximo de agregación (A) velocidad de agregación (γ) y una interrelación de ambas que además nos sirve de control.

Con objeto de ver al máximo si había ó no hiperagregación plaquetaria, hemos utilizado concentraciones de ADP muy bajas de 1,25 y 0,62 mM.

Como inhibidor de la agregación "in vitro" hemos utilizado dipiridamol, con dos objetos: a) para ver si podíamos surtir la prueba y b) comprobar si había efectos diferenciales sobre plaquetas en individuos normales y plaquetas en diferentes enfermedades. Hemos utilizado también concentraciones bajas de 0,5 mgs., a tenor de las de ADP. Rossner con esta adición de dipiridamol, pero con mayores concentraciones de ADP, no obtenía inhibición de la agregación (92).

Los valores normales obtenidos para las tres parámetros valorables, son: A: 72,5; γ : 62,5 y β : 244,1.

Hemos demostrado un aumento del máximo de agregación en arterioesclerosis y en diabéticos con arteriopatía. Muy discreto en diabéticos e insignificante para anovulatorios. Disminuye claramente en el cor-pulmonale dato del que no hemos encontrado referencias en la literatura.

La velocidad de agregación aumenta en arterioesclerosis y anovulatorios. Muy poco modificada en el resto de enfermos.

La correlación lípidos-agregación nos ha dado los siguientes resultados: las variaciones lípidos totales no modifica ostensiblemente los resultados. El aumento de las beta lipoproteínas aisladas aumentan la agregación discretamente pero junto con el factor enfermedad no es significativo.

Los aumentos de colesterol aumentan significativamente los parámetros de máximo de agregación y velocidad de agregación.

Los aumentos de triglicéridos disminuyen ambos parámetros de agregación.

Kerr y cols. han podido demostrar la acción estimulante sobre la agregación inducida por ADP de las sales sódicas de los ácidos grasos saturados de larga cadena, así como de los diferentes fosfolípidos (137).

Farbyszewski muestra que las lipoproteínas aumentan la agregación inducida por ADP y trombina (138).

Nuestros resultados están en desacuerdo con otros autores que encuentran una buena correlación entre aumento de triglicéridos y adhesividad-agregación en hiperlipemias (48).

Algunos autores dan mucho valor a la longitud de los ácidos grasos (137).

No es este el momento de establecer correlación fotogenética, pero sí que encajan estos resultados con las complicaciones derivadas de las diferentes

hiperlipemias y que en situaciones fisiológicas como la hipertriglicéridemia del embarazo, esta puede ser una respuesta favorable.

Las relaciones número de plaquetas y agregación, puesto que habíamos fijado previamente su rango de variabilidad, no modifican los parámetros y fue hecho para comprobación. Esto significa también que nuestro rango era correcto.

La adhesividad-agregación tienen una correlación: el aumento de la adhesividad conlleva un aumento del máximo de agregación y de la velocidad de agregación, muy significativos estadísticamente. Ya dijimos que en la adhesividad se implica la agregación y no creemos que en el proceso de la hemostasia sean separables estas dos funciones plaquetarias.

El dipyridamol, hemos demostrado su eficacia como inhibidor "in vitro". Haría de expresividad a la prueba, pero no tiene efectos diferenciales con respecto a las plaquetas normales y patológicas con respecto a la agregación. Creemos que esto abundaría en la hipótesis de su acción a nivel de la desaparición más tardía de la adenosina a nivel de sangre entera ó PRP. Otros autores creen que afectaría los niveles de AMP cíclico por inhibición de la fosfodiesterasa pero esto no está comprobado.

Junto con el Profesor Castillo hicimos un estudio con individuos normales a los cuales se les inyectó 10 mgs. de dipyridamol intramuscular, no obteniendo efectos significativos a las dos horas sobre los parámetros de agregación.

Creemos que los inhibidores de la agregación son un campo a roturar con gran trascendencia clínica y terapéutica. El conseguir inhibidores selectivos sobre la agregación además daría luz sobre su posible mecanismo. El no conocer exactamente este mecanismo hace que todas las hipótesis y pruebas efectuadas no tengan a veces expresividad clínica suficiente y los resultados sean contradictorios.

CONCLUSIONES

Hemos estudiado la adhesividad plaquetaria con la técnica de Breidin, la agregación plaquetaria con la técnica de Born y los parámetros lipídicos por métodos químicos y por cromatografía en capa fina.

La adhesividad se realizó en 111 individuos separados en cuatro grupos:

- A) Individuos normales..... 32
- B) Enfermos con arteriosclerosis.... 34
- C) Enfermos con diabetes..... 36
- D) Mujeres tratadas con anovulato-
rios..... 9

La agregación y los parámetros lipídicos se estudiaron en 129 individuos, agrupados de la siguiente forma:

- 1) Individuos normales..... 52
- 2) Diabéticos con y sin arterio-
patía..... 17
- 3) Arteriosclerosis..... 25
- 4) Mujeres que tomaban anovula-
torios..... 19
- 5) Cor pulmonale crónico..... 6
- 6) Cáncer..... 5
- 7) Enfermedades infecciosas..... 4
- 8) Mieloesclerosis con metaplasia
mieloide..... 1

La valoración de la agregación la hemos realizado considerando que había una relación lineal, densidad óptica-agregación y tratando las gráficas como una curva logística.

En cada uno de estos individuos, se han realizado cuatro pruebas de agregación:

- a) Con una concentración de ADP de 1,25 mM.
- b) Con una concentración de ADP de 0,62 mM.

- c) Con la concentración de ADP de 1,25 mM y adición e incubación con dipiridamol 0,5 mg.
- d) Con la concentración de ADP de 0,62 mM y adición e incubación con dipiridamol.

De cada gráfica de agregación se obtuvieron cinco parámetros:

- Alfa: tiempo para conseguir el punto de inflexión.
- A: Máximo de agregación.
- Beta: Velocidad de agregación dependiente de máxima agregación.
- C: Agregación obtenida hasta el punto de inflexión.
- Gamma: Velocidad de agregación.

En el estudio de lípidos con métodos químicos, hemos medido lípidos totales, colesteroles, glicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas por electroforesis en acetato de celulosa (método de Colfs y Verheyden) y cromatografía en capa fina.

Con este estudio hemos demostrado:

- I. Hay una correlación adhesividad por el método de Breddin y Agregación por el método de Born. Cuando aumenta la adhesividad aumenta la agregación.
- II. La agregación por el método de Born, tratada como una curva logística, da los siguientes parámetros valorables:
 - A: que corresponde al máximo de agregación obtenido.
 - Gamma: Velocidad máxima de agregación.
 - Beta: Interrelación entre ambas.
- III. El intento de sensibilizar la técnica de Born mediante adición e incubación de dipiridamol "in vitro" para la detección de estados de hiperagregación ha mostrado:
 - a) El dipiridamol a dosis de 0,5 mg/ml. inhibe la agregación de manera constante, a las concentraciones de ADP usadas.
 - b) Esta inhibición no es sin embargo, diferencial con respecto a plaquetas normales y plaquetas en distintas enfermedades.
 - c) No hay interacción con el ADP significativo.
- IV. En los arterioscleróticos aumenta la adhesividad y la agregación plaquetaria, más el máximo de agregación que la velocidad.
- V. En los diabéticos se modifica muy ligeramente los parámetros de la agregación.

VI. En las mujeres que toman anovulatorios, realizada la toma el día 14 aproximadamente del ciclo, aumenta discretamente el máximo de agregación y más la velocidad máxima de agregación. También aumenta la adhesividad significativamente.

VII. En los enfermos con cor pulmonale crónico la agregación en sus dos parámetros está disminuida.

VIII. En los enfermos con enfermedades infecciosas y cáncer no hay variaciones significativas.

IX. En un único enfermo con mieloesclerosis y metaplasia mielocida los parámetros aumentan.

X. El estudio relación enfermedad-lípidos-agregación demuestra que el aumento ó disminución de los parámetros no es solamente echacable a los lípidos.

XI. La interacción lípidos-agregación demuestra:

- a) Los lípidos totales apenas modifican los parámetros.
- b) Las beta lipoproteínas, su aumento provoca un discreto aumento de la agregación.
- c) Los aumentos de la colestерina provocan aumentos de la agregación máxima y de la velocidad de agregación.
- d) Los aumentos de triglicéridos provocan disminuciones tanto de máximo de la agregación como de la velocidad.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- WRIGHT, J.H.: The origin and nature of the blood platelets. Boston Med Surg. J. 154, 463. 1906.
- 2.- THIERY, J.P., BESSIS, M.: Mecanisme de la plaquettogenese: etude in vitro por la microcinematographie. Rev. Hewat. 11, 162. 1956
- 3.- HUMPREY, J.H.: Origin of blood platelets. Nature. 176, 38. 1955.
- 4.- KINOSHITA, R., OHNO, S., BIERMAN, H.R.: Motion picture "thrombogenesis" San Mateo (Calif) City of hope Medical Center (1957).
- 5.- KAUFEMAN, R.M., HIRO, R., POLLAK, S., CROSBY, W.H., DOBERNECK, R.: Ocigin of pulmonary megakaryocytes, Blood, 25, 767. 1965.
- 6.- EBBE, S.: Megakaryocytopoieses and platelet turnover. Ser. Haemat. I. 65. 1968.
- 7.- EBBE, S. and STOHLMAN, F.J.: Megakaryotopoeses inde rat. Blood 26, 20 1965.
- 8.- HERVEVRAL, R. y HERVEVRAL, H.: Celulas cancericases- et insolites du sang circulant Ed. Masson. 1965.
- 9.- BEHNKE, O. and ZELANDER, T.: Filamentons substructura of microtubules of the marginal bundle of mamelian blood-platelets. J. Ultrastructura Resp. 19, 147. 1967.
- 10.- ODELL, FT., JACKSON, C.W., REYER, R.S.: Depresión of the megakaryocyte p platelet system in rats by transfusion of platelets. Acta

Haemat. 38, 34. 1967.

- 11.- SCHULLMAN, I., ABILGARD, C.F., CORNET, J., SIMONE, J.V., CORRIMBOY, Z.:
Studies on thrombopoietic activity. J. Pediat. 66, 604. 1965
- 12.- WINTROBE: Tratado de Hematologia. 1970.
- 13.- KARPAKIN, S.: Heterogeneity of human Platelets I y II: Journal of C
clinical Invest. 48, 1073. 1969.
- 14.- NACHMAN, R.L. and MARCUS, A.J.: Immunological studies of proteins asso
ciatic with subcellular fractions of normal human platelets
J. Lab. Clin. Med. 69, 551. 1967.
- 15.- HOVIG, T.: The ultrastructure of blood platelets in normal and ab-
normal states. Ser. Haemat. Vol. I, 2. 1968.
- 15bis. SIEGEL, A. and LEYSCHER, E.F.: Non identity of the alfa granules of hu
man blood platelets with typical lisosomes. Nature 271.
745. 1967.
- 16.- ZUCKER, M.B. and FRANKLIN, D.: Ultrastructural analysis of transport
and storage by a platelet membran-system. Abstr. XII, Cong
Int. Soc. Haemat. 205, New York 1968.
- 16bis. SIXMA, J.J. and MOLENAR, I.: Microtubules and microfibrils in human
platelets. Trombos. Diathes. haemoh. (Stug) 16, 153. 1966.
- 17.- MAUPIN, B.: BLOOD PLATELETS in a man and animals. T.I.yII. Pergamon
1969.
- 18.- CAEN, J., JOSSO, F., SULTAN, Y., MEYER, D., ALLAIN, J.P.: L'Hemostase:
L'expansion. 1970.
- 19.- WARSHAW, A.L., LASTER, L., SCHULLMAN, N.R.: The estimation by trombin
of glucose oxidation in human platelets. J. Clin. Invest.
45, 1963. 1966.

- 20.- BETTEX-GALLAND, M., and IUSCHER, E. F.: Extraccion of an actomyosin-like protein from human trombocytes. *Nature* 184, 276. 1959.
- 21.- BETTEX-GALLAND, M., IUSCHER, E. F. and WEIBEL, E. R.: Thromboasthenin electromicroscopical studies on its localisation in human blood platelets and some of its properties of its subunits. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 22, 431. 1969.
- 22.- JONES, P. C. T.: A contractin protein model for cell adhesion. *Nature* 212, 365. 1966.
- 23.- BOOYSE, I. M. and RAFFELSON, M. E. Jr.: Stable messenger RNA in the synthesis of contractable protein in human platelets. *Acta Biochim Biophys.* 30, 1. 1967.
- 24.- WHITE, J. G. and KRIVIT, W.: An estructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. *Blood*, 30, 625. 1967.
- 25.- TANAKA, G., KUHUMA, I. and KURAMOTO, A.: Histochemical demonstration of 5-hydroxytryptamina in platelets and megacaryocytes. *Blood* 30, 54. 1967.
- 26.- IATRIDIS, P. G. and FERGUSON, J. H.: The plasmatic atmosphere of blood platelets. Evidence that activatec Hageman factor are present in the of platelets. *Trombos. Diathes. haemorrh.* 13, 114. 1965.
- 27.- DEUTSCHE: Differentiation of certain platelet factors in relation to coagulation. *Rev. Haemat.* 9, 483. 1954.
- 28.- HJORT, P. F., RAPAPORT, S. J. and OWREN, P. A.: Evidence that platelet accelerator (platelet factor 1) is absorbed plasma proaccelerin. *Blood* 10, 1139. 1955.
- 29.- WOLF, P.: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Brit. J. Haemat.* 13, 269. 1967.

- 30.- YOUSSEF, A. and BARKHAN, P.: Release of platelet factor 4 by adenosina diphosphate and other platelet agregating agents. Brit. Med. J.I. 746, 1968.
- 31.- BIGGS, R.; DENSON, K. W. E.; RIESENBERG, D. and McINTYRE, C.: The coagulant activity of platelets. Brit. J. Haemat. 15, 283, 1968.
- 32.- MARCUS, A. J.: Platelet function. New Engl. J. Med. 280/22. 1213. 1969.
- 33.- MARCUS, A. J.: Recent advances in platelet lipid metabolism, conference on platelets and their role in hemostasis. New York 1971.
- 34.- SALZMAN, E.: Cyclic AMP and platelet function: New England. II. 358. 1972
- 35.- EDITORIAL: Prostaglandines y metabolismo cellulaire. Nonv. Press. Med I, 961. 1972.
- 36.- ROBISON, G., COLE, B., ARNOLD, A. y HARTMANN, R.: Effect of prostaglandins on function and cyclic AMP levels of human blood platelets Annals. New York. Academy of Sciences. 1972.
- 37.- CAEN, J.: Platelet aggregation. Ed. Masson. 1971.
- 37bis. SALZMAN, E. M.: Role of cyclic AMP in platelet function. Conference on platelets and their role in hemostasis. New York. 1971.
- 38.- INGELMO, M.: Las plaquetas. Práctica internista. Julio. 1972.
- 39.- CAEN, J.: Abnormalities in the platelet collagen reaction conference on platelets and their role in hemostasis. New York, 1971,
- 40.- RODMAN, N. F., MASON, G. R., McDEVITT, N. B. and BRINKHOUS, K. M.: Morphological alterations of human blood platelets during early phases of clotting. Electronmicroscopic observations of thin sections. Amer. J. Path. 40, 271. 1962.
- 41.- LUSCHER, E. F.: Thrombosthenin structure and function conference on platelets and their role in hemostasis. New York. 1971.

- 42.- BOOYSE, F.M.: Regulation and mechanism of platelet aggregation and attachment to the vessel wall conference on platelets and their role in hemostasis. New York. 1971.
- 42bis. GAETANO, G., DE VERMYCEN, J. et VERSTRAETE, M.: Platelet aggregation by a specific human immunoglobulin preparation. *Thromb. Diath. haemorrh.* 24, 419. 1970.
- 43.- GAETANO, G., DE VERMYLEN, J. et VERSPRAET, M.: L'inhibition de l'aggregation plaquettaire: donnees experimentales et perspectives cliniques. *Nouv. Rev. Fr. Haemat.* 11, 339. 1971.
- 44.- HOLMSEN, H., DAY, H.J. y STORMORKEN, H.: The blood platelet release reaction *Scand. J. Haemat. suppl.* 8, 1969.
- 44bis. HELLEN, A.J. and STORMORKEN, H.: Platelet adhesion. Aggregation reaction and its clinical significance. *Scand. J. Haemat.* Vol. I, 2 1968.
- 45.- WEISS, H.J.: Abnormalities in platelet function due to defects in the release reaction. Conference on platelets and their role in hemostasis. New York. 1971.
- 46.- HOGUES, J.: Plaquettes sanguines et structure du vaisseau. *Nouv. Rev. Fr. D'hemat.* 9, 35. 1969.
- 47.- BORN, G.V.R.: Present ideas on the mechanism of platelet aggregation in vitro in vivo. Conference on platelets and their role in hemostasis. New York. 1971.
- 48.- WILNER, G.O., NOSSE, L.H.L. and LE ROY, E.G.: Activation of Hageman factor by collagen. *J. Clin. Invest.* 47, 2608. 1968.
- 49.- HOVIG, T.: Interaction platelets vessel wall. (incluido en 37).
- 50.- LEGRAND, Y.: Plaquettes et structures du vaisseau. *La Press. Med.* 15, 721. 1970.

- 51.- CAEN, J., LARRIEU, M. J., SAMANA, M.: L'hémostase. L'expansion 1968.
- 52.- BREDDIN, K.: Experimental and clinical investigations on the adhesion and aggregation of human platelets. *Exp. Biol. Med.* 3, 14 1968.
- 53.- BORCHGREVINK, C. F.: A method for measuring platelet adhesiveness in vivo. *Acta med. Scand.* 168, 157. 1960.
- 54.- GARCIA SAN MIGUEL: Tesis Doctoral. Barcelona, 1967.
- 55.- STORMORKEN, H., LUND-RIISE, A. and NORVIK, T. O.: Platelet counting. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 7, suppl. 84, 183. 1965.
- 56.- BORN, G. V. R.: Aggregation of blood platelets by ADP and its reversal. *Nature.* 194, 927. 1962.
- 57.- BORN, G. V. R.: Quantitative investigations into aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 162, 67. 1962.
- 58.- O'BRIEN, J. R.: Platelet aggregation II, some results from a new method of study. *J. Clin. Path.* 15, 452. 1962.
- 59.- HELLEM, A. J.: The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand J. Clin. Invest.* 12, 117. 1960.
- 60.- MAC MILLAN: Role of cyclic AMP in platelet function conference on platelets and their role in hemostasis. New York. 1971.
- 61.- BOLTON, CH. and EMMONS, P. R.: Adenosine diphosphate breakdown by the plasma of different species and by human whole blood and white cells. *Trombos. Diathes. haemorrh.* 18, 779. 1967.

- 62.- BORN, G. V. R. and CROSS, M. J. Inhibition of the aggregation of blood platelets by substances related to adenosine diphosphate. *J. Physiol.* 166,29 . 1.963.
- 63.- MITCHELL J.R.A. and SHARP, A.A. Platelet clumping in vitro. *Brit. J. Haemat.* 10, 78 (1.964)
- 64.- GAARDER, A. and LALAND, S. Hypothesis for the aggregation of platelets by nucleotides. *Nature* 202,909 (1.964)
- 65.- BOOYSE, F.M. and RAFELSON, M.E. JR. Studies of human platelets. III. A contractile protein model for platelet aggregation. *Blood* 33,100. (1969)
- 66.- NOSSELL, H.L., WILNER, G.D. and LE ROY, E.C. Importance of polar groups for initiating blood coagulation and aggregating platelets. *Nature* 211,75. (1969)
- 67.- ZUCKER-FRANKLIN, D. Ultrastructural analysis of transport and storage by a platelet membrane system. *Abstr. XII. Congr. Int. Soc. Haemat.*, 205. (1968)
- 68.- HAMPTON, J.R. and MITCHELL, J.R.A. Effects of aggregating agents on platelet electrophoretic behaviour. *Brit. Med. J.* 1, 1074. (1966).
- 69.- ABRAMSON, H.A. The electrophoresis of the blood platelets of the horse with reference to their origin and to thrombus formation. *J. exp. Med.* 47,677. (1.928)
- 70.- BANGHAM, A.D., FLEMANS, R., HEARD, D.R. and SEAMAN, G.V.F. An apparatus for microelectrophoresis of small particles. *Nature* 182,642. (1958)

- 71.- BIGGS, R. and DOUGLAS, A.S. Thromboplastin generation test. J. clin. Path. 6,23 (1953).
- 72.- FANTL, P. and WARD, H.A. The thromboplastin component of intact blood platelets is present in masked form. Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.,36,499 - 1958.
- 73.- HOROWITZ, H.I. and PAPAYOANOU, M.F. Activation of platelet factor 3 by adenosine 5'diphosphate. Thrombos. Diathes. haemorrh. 19,18 - 1.968.
- 74.- YOUSSEF A. y BARKHAN P. : Release of platelet factor 4 by adenosine diphosphate and other platelet aggregating agents. Brit. Med. J. 1,746. - 1968.
- 75.- DOMINGO ALBOS, A. Tesis Doctoral. Acción del cetoglutarato de de imidazol sobre el funcionalismo plaquetario: estudios experimentales y perspectivas clínicas. 1.972.
- 76.- WESSLER, S. Stasis hypercoagulability and thrombosis. Fed. Proc. 22,1366 - 1.963.
- 77.- HAMPTON, J.R. Plaquetas y trombosis. British Journal of Hospital Medicine. 38 - Abril 1.971.
- 78.- ROZMAN, C.,GARCIA SAN MIGUEL, J.,CASTILLO, R. y DOMINGO-ALBOS, A. Les purpures trombocitopatiques. Monographies Mediques.1971
- 79.- HONOUR, A.J. and MITCHELL, J.R.A. Platelet clumping in injured vessels. Brit. J. Exp. Path.,45,75 - 1.964.
- 80.- FRENCH, J.E.,MACFARLANE, R.G. and SAUNDERS, A.G. The structure of haemostatic plugs and experimental thrombi in small arteries. Brit. J. Exp. Pathol.,45,467.- 1.964.

- 81.- LUSCHER, E.F. Platelets in haemostasis and thrombosis. Brit. J. Haemat.,13,1 - 1.967.
- 82.- SAWYER, P.N.,PATE, J.W. and WELDON, C.S. Relations of abnormal and injury electrical potential differences to intravascular thrombosis. Amer. J. Physiol.,175,108 - 1.953.
- 83.- ARFORS, K-E., DHALL, D.P., ENGESET, J., HINT, H.C., MATHESON, N.A. and TANGEN, O. Bio-laser endothelial trauma as a means of quantifying platelet activity in vivo. Nature. 218,887. 1.968.
- 84.- STANFORD WESSLER y E. THYE YIN., Sobre el mecanismo de las trombosis.
- 85.- WRIGHT, H.D. The sources of blood platelets and their adhesiveness in experimental thrombocytosis. J. Path. Bact. X. 151-159 - 1.944.
- 86.- HELLEM, A.J.,BORCHGREVINK, C.F. and AMES, S.B., The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. Brit. J. Haemat., 7,42 - 1.961.
- 87.- NEGUS, D., PINTO, D.J. and BROWN, N. Platelet adhesiveness in post-operative deepvein thrombosis. Lancet, 1,220.-1.969.
- 88.- HIRSH, J. and MCBRIDE, J.A. Increased platelet adhesiveness in recurrent venous thrombosis and pulmonary embolism. Brit. med. J., 2,797. - 1.965.
- 89.- HUME, M. Postoperative platelet adhesiveness. Lancet, 1,525.- 1.969.
- 90.- BEBOUX, J.M.,POMETTA, D., SCHERRER, J.R., ROSNER, J.P., NOUVIER,

- C.A., Etude des variations de l'adhésivité plaquettaire au verre, des lipides, de l'acide urique et de la tolérance aux hydrates de carbone durant le premier mois de l'évolution de l'infarctus du myocarde. Vol.3- n° 3, Coagulation. 231. 1.970.
- 91.- ZAHAVI, J., and DREYFUS, F. An abnormal pattern of adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in acute myocardial infarction. *Thromb. Diathes. haemorrh.* 21,76. - 1.969.
- 92.- SJOGREN, A., BOTTIGER, L.B., BJORRE, G., WANLBERG, P. and CARLSON L.A. Adenosine diphosphate-induced platelet adhesiveness in patients with ischaemic heart disease. *Acta med. scand.* 187, 89. - 1.970.
- 93.- ROSNER, P. Adhésivité plaquettaire et thrombose. Extrait de la revue médicale de la suisse romande. 11, 787. - 1.968.
- 94.- HOOLTEN, S.E., JENNING, P.B. and SOLDNER, A. Dietary fat and platelet adhesiveness in arteriosclerosis and diabetes. *Amer. J. Cardiol.*, 11,290. - 1.963.
- 95.- HORLICK, L. Platelet adhesiveness in normal persons and subjects with atherosclerosis. Effect of high fat meals and anticoagulants on the adhesive index. *Amer. J. Cardiol.*, 8,459. 1.961.
- 96.- MURPHY, E.A. and MUSTARD, J.F. Coagulation test and platelet economy in atherosclerotic and control subjects. *Circulation.* 25,114. - 1962.
- 97.- RAELENE, J., KINLOCH RATHBONE, MARIANN A. PAKHAM and J. FRASER MUSTARD. The effect of glucose on adenosine diphosphate induced platelet aggregation. 75,5, 780 - 1.970.

- 97.- POPLAWSKI, A., SKORULSKA, M. and NIEWIAROWSKI, S. Increased platelet adhesiveness in hypertensive cardiovascular disease. *J. Atheroscler. Res.*, 8, 721 - 1.968.
- 98.- DANTA, G. Second phase platelet aggregation induced by adenosine diphosphate in patients with cerebral vascular disease and in control subjects. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 23, 159 - 1.970.
- 99.- SANCHEZ AVALOS, C. Cáncer, hipercoagulabilidad y trombosis. *Sangre* 2, 151 - 1.971.
- 100.- FACAL, J.L., TORRES, J.A., URBAN, A. y AGUIRRE, M. Tromboflebitis migratoria esclerosante paraneoplásica. *Revista clínica española*, 108, 5, 391 - 1.968.
- 101.- LESNEGRE, J., BRUX, J. (de), HIMBERT, J. et BEAUMONT, J.L. Avant-projet d'un rapport sur l'athéromatose. *Rev. Atheroscler.*, 3, 11. - 1.959.
- 102.- DUGUID, J.B. Mural thrombosis in arteries. *Brit. Med. Bull.*, 36, 28 1.955.
- 103.- MUSTARD, J.F., ROWSELL, H.C. and MURPHY, E.A. Platelet economy (platelet survival and turnover.) *Brit. J. Haemat.*, 12, 1. 1.966.
- 104.- McDONALD, L. and EDGILL, M. Dietary restriction and coagulability of the blood in ischaemic heart disease. *Lancet* 996, 998 1.958.
- 105.- SILVER, M.D. y STEHNS, W.E. The behaviour of platelets in vivo. *Quart. J. Exper. Physiol.* 50: 241 - 1.965.

- 106.- JAN, F., BEAUMONT, J.L. Athérosclérose. Encyclopedie Medico-Chirurgicale. 11315 B -1.971.
- 107.- RENAUD (S.) KINLOUGH (R.L.) and MUSTARD.-Relationship between platelet aggregation, and the thrombotic tendency in rats fed hyperlipemic diets. Lab. Invest., 22, 339. 1970.
- 108.- NISHIZAWA (E.E.), HOVIG (T.), LOTZ (F), ROWSELL (H.C.) and MUSTARD (J.F.) Effect of a natural.... Brit. J. Haem. 16, 487. 1969.
- 109.- RYSGAARD FARDISZANSKI, ARZYBIECOW WAPCOWSKI and JACOBUS SEMIOTKOWSKI Changes of hemostatic function of blood platelets in rabbits after cholesterol diet feeding. Acta Physiologica Polonica. Vol. XX no 5.- 1.969.
- 110.- HAMPTON, J.R. and MITCHELL, J.R.A. A transferable factor causing abnormal platelet behaviour in vascular disease. Lancet 2, 764 - 1.966.
- 111.- BOLTON, C.H., HAMPTON, J.R. and MITCHELL, J.R.A. Nature of the transferable factor which causes abnormal platelet behaviour in vascular disease. Lancet, 2, 1101 - 1.967.
- 112.- TURPIE, A.G.G., MONICOL, C.P. and DOUGLAS, S. Platelets: haemostasis and thrombosis. Recent advances in haematology. Edited by A. Goldberg and R.C. Brain. Churchill Livingstone. 1.971.
- 113.- JØRGENSEN, L., ROWSELL, R.C., HOVING, T., CLYNN, M.F and MUSTARD, J.F. Adenosine diphosphate induced platelet aggregation and myocardial infarction in swine. Lab. Invest. 17: 616, 644 1.967.
- 114.- BAILEY, J.M. and BUTLER, J. Influence of anti-inflammatory agents on experimental atherosclerosis. Nature 212: 731, 732 - 1.966.

- 115.- HELLEM, A.J., ODEGAARD, A.E. and SKALHEGG, B.A. Investigations in adenósine diphosphate induced platelet adhesiveness in vitro. 1. The ADP-platelet reaction in various experimental conditions. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 10, 61 1.963.
- 116.- REYNA, M.P. y Pizzuto, J. Efecto de la glucosa en la actividad coagulante de las plaquetas. *Sangre* 13:431, 442 -1.968.
- 117.- BENNETT, P.N. Effect of glucose on platelet adhesiveness. *Journal of Atherosclerosis Research.* 7, 53 -1.967.
- 118.- CLAVO, A. y CARRASCOSA, B.A. Efectos secundarios de los contraceptivos orales. *Rev. Med. Univ. Navarra* XI;117-1.967.
- 119.- GENNES, J.L. Trombosis de la carótida interna derecha bajo tratamiento contraceptivo continuo por acetato de chormalidona en una mujer de 28 años. *La Press Med.* 355-1.971.
- 120.- ZUCK, T.F. y colaboradores. Platelet adhesiveness in symptomatic women taking oral contraceptives. *Trombos and Diath. Haem.* 1.970.
- 121.- NIH CONFERENCE. Problems in contraception. *Annals of internal Medicine* 74: 251, 263 - 1.971.
- 122.- JICK et al. *Lancet* I, 539 - 1.969.
- 123.- CASTILLO, R. Terapéutica anticoagulante. Tratamientos actuales en medicina interna. Toray.- 1.971.
- 124.- DUCKERT, F. y STREULI, F. Role of coagulation in thrombosis. En *Pathogenesis and Treatment of Thromboembolic Diseases.* *Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl.* 21:185 - 1.966.
- 125.- FARRERAS, P. en *Patología y Clínica Médica.* PEDRO-PONS, A. V, 686 - 1.958.
- 126.- DAVENPORT, H.W.: *Fisiología de la digestión.* Seg. Edición. Ed. Interamericana. 1.968.
- 127.- FREDERICKSON, D.S., LEVYR, LESS, R.S. Fat transport in lipoproteins An integrated approach to mechanisms and disorders. *New Engl. Journ. of Med.* 276, 32-34, 94-103, 184-2226, 273-281 1.967.

- 128.- COROMINAS VILARDELL, A.: Contribución al estudio bioquímico de los lípidos. *Lipidurias*. 1969. Institut d'estudis Catalans. Annuari de la secció de ciències. XLIII. 1970.
- 129.- COROMINAS VILARDELL, A.: Aplicación de las técnicas cromatográficas al estudio bioquímico de los lípidos. 1970.
- 130.- COROMINAS VILARDELL, A.: Lipobioquímica. Aplicación clínica: Apuntes de los cursos realizados en el Laboratorio Central de Bioquímica en Noviembre de 1970. (I) y en Junio de 1971. (II).
- 131.- COROMINAS VILARDELL, A.: Lipobioquímica comparada. Estudio de lípidos y lipoproteínas en diversas especies animales. *Anales de Medicina y Cirugía*. 220- 1972.
- 132.- PASCUAL, C. y COROMINAS, A.: Glicéridos de suero. I. Métodos de valoración. *Anales Medicina y Cirugía*. 221, 369. 1970.
- 133.- PASCUAL, C. y COROMINAS, A.: Glicéridos de suero. II Estudio de valores normales por el método enzimático de Eggstein. *Rev. Clin. Esp.* 1971.
- 134.- LIPIDS AND LIPIDOSES: Edited by Schettler. 1967.
- 135.- BALCELLS, A.: La clínica y el Laboratorio. *Ed. Marín*. 1972.
- 136.- BOLTON, C.H., HAMPTON, J.R. and MITCHELL, J.R.: Effect of oral contraceptive agents on platelets and plasma-phospholipids. *Lancet*. 1, 1336. 1968.
- 137.- KERR, J.W., MAC AULY, J., PIRRIE, R. y BRONTE, S., STEWART, B.: Platelet aggregation by phospholipids and free fatty acids. *Lancet* 1. 1296. 1965.
- 138.- FARBISZEWSKI, R., SKYZYDLEWSKI, Z. et WOROWSKI, K.: The effect of lipoprotein fractions on adhesiveness and aggregation of blood platelet. *Thromb. Diath. haemorrh.* 21, 89. 1969.
- 139.- DAVEY, M.G., et IUSCHER, E.F.: Actions of some coagulant snake venoms on blood platelets. *Nature*, 207, 730. 1965.
- 140.- CUCULIANU, M.P., NISHIZAWA, E. E. and MUSTARD, J.F.: Effect of pyrimido-pyrimidine compounds on platelet function. *J. Lab. Clin. Med.* (in press. 1971.

