

00544

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE QUIMICA

PREVALENCIA Y CAUSAS DE RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA EN
DONADORES DE SANGRE QUE ACUDEN A HOSPITALES DE SALUD PUBLICA
EN MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIZACION EN
BIOQUIMICA CLINICA

(HEMATOLOGIA)

P R E S E N T A

Q.F.B. MARIA GUADALUPE MONTIEL MANZANO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. GABRIELA CESARMAN MAUS

MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO
EN EL DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA
(LABORATORIO DE COAGULACION)
DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"**

ABREVIATURAS

A	adenina
Ala	alanina
AL	anticoagulante lúpico
a β_2 -GPI	anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I
aCL	anticuerpos anticardiolipina
aFL	anticuerpos antifosfolípido
Arg	arginina
Asp	aspartato
β_2 -GPI	β_2 -glicoproteína I
Ca ²⁺	calcio
CL	cardiolipina
CaCL ₂	cloruro de calcio
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
ELISA	ensayo inmunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
FV	factor V
FVIII	factor VIII
FX	factor X
FVa	factor V activado
FVIIIa	factor VIII activado
FIXa	factor IX activado
FvW	factor von Willebrand
FL	fosfolípido
g	aceleración de la gravedad
Gly	glicina
Gln	glutamina
G	guanina
IPC	inhibidor de la proteína C
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
kD	kilodalton
INNSZ	Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán
LEG	lupus eritematoso generalizado
M	concentración molar
Met	metionina
ml	mililitro
mM	milimolar
pb	pares de bases
PBS	amortiguador salino de fosfatos (Phosphate buffer saline)

PC	proteína C
PCA	proteína C activada
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PNP	procedimiento de neutralización plaquetaria
PS	proteína S
RPCA	resistencia a la proteína C activada
rpm	revoluciones por minuto
Ser	serina
SAF	síndrome antifosfolípido
SBF	suero bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate)
TP	tiempo de protrombina
TTPa	tiempo de tromboplastina parcial activada
TVVRDS	tiempo de veneno de víbora de Russell diluido y simplificado
Tyr	tirosina
Th	trombina
Thr	triptofano
TEV	tromboembolismo venoso
TM	trombomodulina
µg	microgramos
µl	microlitros
UA	unidades arbitrarias

INDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Generalidades	2
1.- Introducción	2
2.- Sistema Anticoagulante de la Proteína C	2
A. Proteína C	5
B. Trombomodulina C	5
C. Proteína C activada C	5
D. Cofactores de la Proteína C: proteína S y factor V	5
E. Sustratos de proteína C activada: factor Va y factor VIIIa	6
F. Inhibidores del sistema de la proteína C	9
3.- Alteración en el sistema de la proteína C como causa de trombosis	9
4.- Resistencia a la proteína C activada	10
5.- Mutación Leiden en el gen del factor V como causa de resistencia a la proteína C activada	11
6.- Anticuerpos antifosfolipido como causa de resistencia a la proteína C activada	12
3. Objetivos	13
4. Material y Métodos	13
1.- Criterios de inclusión de donadores	13
2.- Obtención de muestras	13
3.- Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada	14
4.- Determinación de tiempo de protrombina	15
5.- Determinación de resistencia a la proteína C activada basada en TTPa	15
6.- Determinación del tiempo de veneno de víbora de Russell diluido y simplificado	16
7.- Determinación del procedimiento de neutralización plaquetaria	17
8.- Determinación de anticuerpos anticardiolipina IgG e IgM	17
9.- Determinación de anticuerpos contra- β_2 -Glicoproteína I	19
10.- Técnica de extracción de DNA	20
11.- Determinación de la mutación del factor V (R506Q):223 pb por reacción en cadena de la polimerasa	21
5. Resultados	22
6. Conclusiones	29
7. Bibliografía	30

1. RESUMEN

La resistencia a la proteína C activada (RPCA) se asocia a un incremento en el riesgo de tromboembolismo venoso (TEV) de alrededor de 7 veces en heterocigotos y de 70 veces en homocigotos (18). Por lo que la detección de RPCA en personas sanas o con antecedentes de trombosis tiene implicaciones tanto en la profilaxis como en el manejo de eventos tromboembólicos.

La principal causa de RPCA es una mutación puntual en el gen del factor V (G a A en el nucleótido 1691) (10-11), sin embargo anticuerpos antifosfolípido (aFL) dirigidos contra alguno de los componentes del sistema de la proteína C, así como la presencia de niveles elevados de estrógenos pueden también ocasionarla (23-25). La RPCA se detecta en 3-10% de individuos sanos en poblaciones europeas o en países con inmigrantes europeos, mientras que esta prácticamente ausente en las poblaciones indígenas americanas, en poblaciones asiáticas, orientales, negras africanas y algunos otros grupos estudiados hasta el momento (6,26). Debido a que no se conocía la prevalencia de RPCA en la población mestiza Mexicana decidimos estudiarla. En el grupo estudiado encontramos una prevalencia de RPCA de 3.8% y de 2.3% para la mutación del factor V Leiden, de los 5 donadores con resistencia 3 de ellos tenían anticuerpos antifosfolípidos.

2. GENERALIDADES

1.- Introducción

La coagulación sanguínea es cuidadosamente controlada in vivo por diversos mecanismos anticoagulantes, los cuales aseguran la fluidez sanguínea así como la propagación del coágulo en condiciones de daño vascular. El sistema de coagulación sanguínea se activa en respuesta a daño vascular, lo cual induce la expresión localizada de factores procoagulantes. Por otro lado la fluidez sanguínea se mantiene gracias a diversos mecanismos endógenos de regulación de la coagulación (figura 1). Estos mecanismos incluyen la inactivación de enzimas y cofactores y la activación de la fibrinólisis. La alteración en alguno de los sistemas de control de la coagulación produce estados protrombóticos (1).

El sistema de coagulación que con mayor frecuencia se ve afectado en personas con trombofilia es el de la proteína C (PC). Es un sistema anticoagulante natural que regula los procesos de coagulación (2). Este sistema tiene que ver con la expresión de trombomodulina (TM), un receptor intrínseco de membrana que une trombina convirtiéndola de la principal enzima promotora de la coagulación y agregación plaquetaria, en un potente activador de la PC.

2.- Sistema anticoagulante de la proteína C

Consta de una enzima, la PC, dos cofactores llamados proteína S (PS) y factor V (FV) en forma de zimógeno y un receptor de la trombina situado en las superficies endoteliales, la TM. La TM modifica la especificidad de la trombina por sus sustratos, de forma que se inhibe la capacidad de la trombina para activar la coagulación y de forma simultánea la convierte en un potente activador de la PC. La PC una vez activada se disocia del complejo TM/trombina y en presencia de sus cofactores se localiza sobre la superficie plaquetaria o endotelial mediante los residuos ácido gama-carboxiglutámico. La PC localizada sobre las membranas celulares cercanas al sitio de generación del trombo inactiva por proteólisis limitada dos de los cofactores procoagulantes, tanto al factor V activado (FVa) como al factor VIII activado (FVIIIa) con lo cual inhibe la activación de la protrombina y del factor X (FX) respectivamente, y en consecuencia bloquea eficientemente la propagación del trombo (figura 2). La alteración en cualquiera de las proteínas que forman parte de este sistema interfiere con la acción anticoagulante de la proteína C activada (PCA) y se asocia a un aumento en el riesgo de trombosis (2, 3).

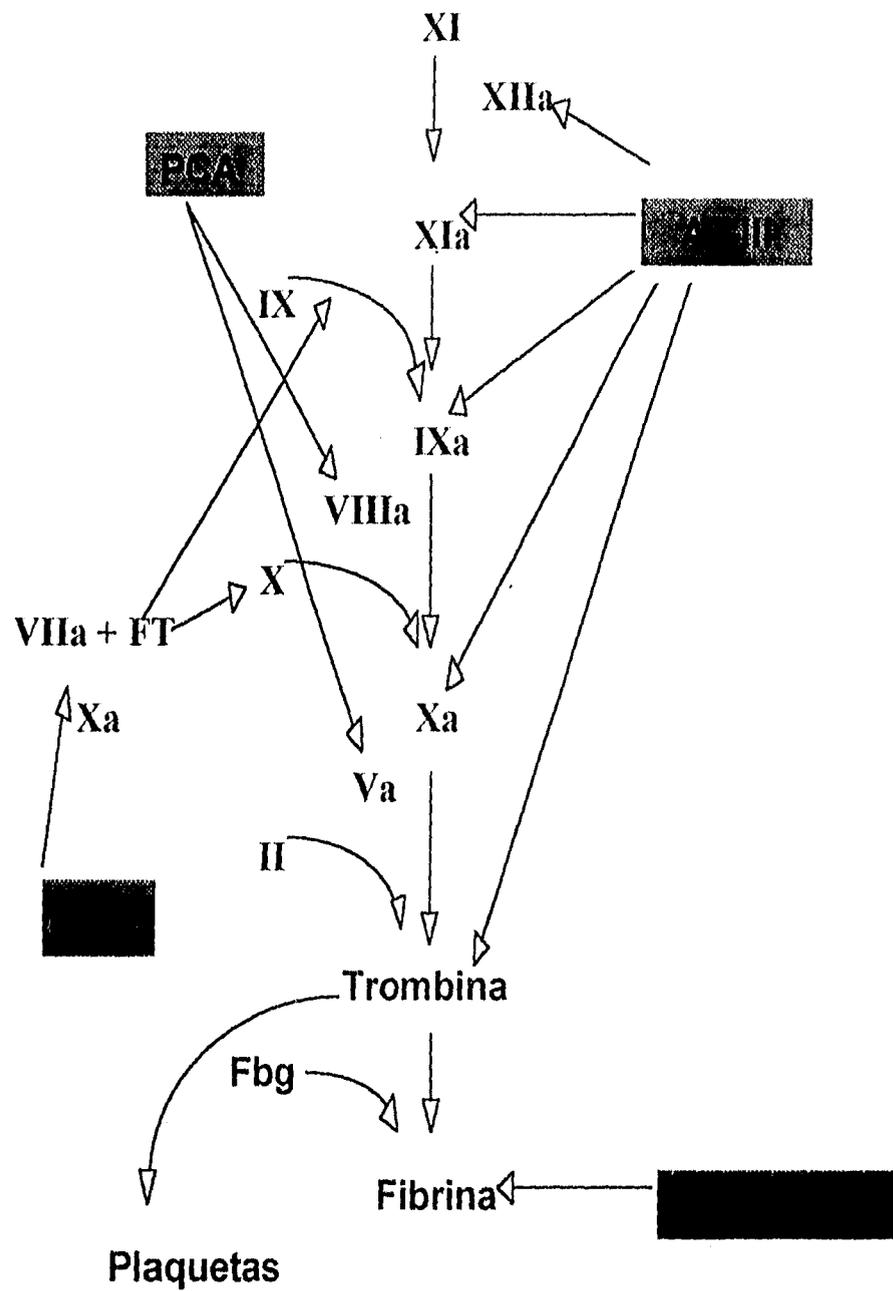


Figura 1. Sistemas de control de la coagulación. Ver texto. PCA=Proteína C activada, AT-III=Antitrombina III, IVFT=Inhibidor de la vía del factor tisular, Fbg=Fibrinógeno

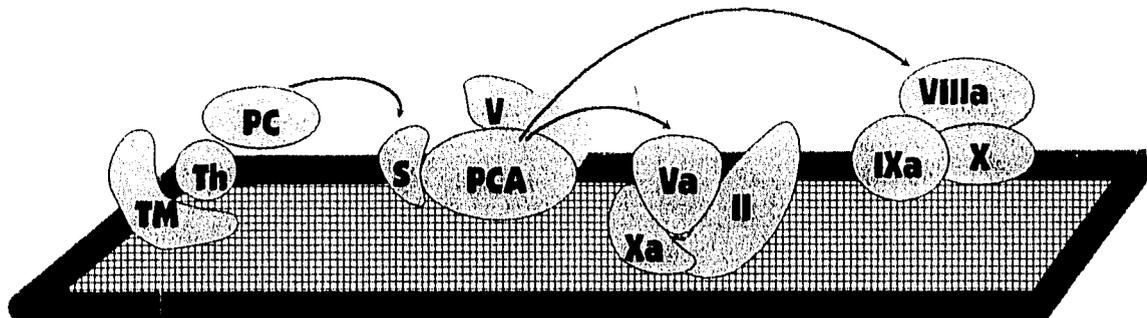


Figura 2. Sistema de la proteína "C". Ver texto. PC=Proteína C, Th=Trombina, TM=Trombomodulina, S=Proteína S, V=Factor V, PCA=Proteína C activada, Va=Factor V activado, Xa=Factor X activado, II=Protrombina, VIIIa=Factor VIII activado, IXa=Factor IX activado, X=Factor X

A. Proteína C

La PC -un potente anticoagulante- fue descubierta por Seegers y colaboradores en 1966, con el nombre de auto-protrombina II-A. En 1976 Stenflo identificó a la PC como una proteína plasmática sintetizada en el hígado y dependiente de vitamina K. Circula a una concentración de 3 a 5 µg/ml con una vida media de 6 a 8 horas. La PC es una serina proteasa multimodular compuesta por 461 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 62 kilodalton (kD). El gen de la PC contiene aproximadamente 11 kilobases, y se localiza en el cromosoma 2 en la posición q14-21 (4,5).

B. Trombomodulina

La TM es una glicoproteína de membrana multimodular de una sola cadena. Esta se expresa en la superficie de células endoteliales inactivas de arterias, venas, capilares y vasos linfáticos promoviendo un estado anticoagulante constitutivo. La trombina al unirse con alta afinidad a la TM, pierde sus propiedades procoagulantes y se convierte en un potente activador de la PC. La TM con 557 aminoácidos, tiene un peso molecular de 75 kD. El gen de la TM se localiza en el cromosoma 20 en la posición p12 (4,5).

C. Proteína C Activada

La PCA constituye uno de los principales sistemas de control de la cascada de coagulación. Es una serina proteasa que circula en plasma a una concentración de 2.3 ng/ml en sujetos sanos. La vida media de la PCA es de 20 minutos en sangre fresca y 22 minutos in vivo. Los factores determinantes para los niveles de PCA circulante son: a) niveles del zimógeno de PC, b) generación de trombina endógena, c) disponibilidad de TM y d) inhibidores circulantes de la PCA. La PC tiene dos cofactores, la PS y el FV en forma de zimógeno y dos sustratos, el FVa y el FVIIIa (6).

D. Cofactores de la proteína C: proteína S y factor V

La PS el principal cofactor de la PCA, es una glicoproteína de cadena única dependiente de vitamina K con 635 aminoácidos y un peso molecular de 71 kD. La PS se sintetiza en los hepatocitos, las células endoteliales, las células de Leydig y en los megacariocitos. En el plasma humano circula en forma libre (40%) o bien unida a C4BP (60%). Solo la PS libre tiene actividad como cofactor para la PCA. La concentración plasmática es de 20 a 25 mg/l (4, 5).

El FV en forma de zimógeno actúa como cofactor de la PCA. Al FV se le ha llamado factor lábil o proacelerina. Es una glicoproteína plasmática con peso molecular de 330 kD, su concentración sanguínea es de 7 mg/l, su vida media en plasma humano es de 12 a 15 horas. La síntesis de FV se lleva a cabo en los hepatocitos y en los megacariocitos. Las plaquetas contienen un 30% del FV incorporado en los gránulos alfa que son excitados durante la secreción plaquetaria en un proceso dependiente de Ca^{2+} , por lo que también ha recibido el nombre de cofactor plaquetario 1. La molécula del FV contiene 3 módulos A, 1 módulo B y 2 módulos C (figura 3). La trombina activa al FV mediante proteólisis limitada de tres enlaces peptídicos Arg 709-Ser 710, Arg 1018-Thr 1019 y Arg 1545-Ser 1546. Quedando un FVa compuesto por una cadena pesada que interactúa con protrombina

(residuos 1-709) y otra ligera que contiene sitios de unión a FL (residuos 1546-2196) (4, 5, 7).

E. Sustratos de la proteína C activada: factor Va y factor VIIIa.

La PCA regula la generación de trombina mediante inactivación de dos de los principales cofactores de la coagulación, el FVa y el FVIIIa (figura 4). La inactivación de estos cofactores se logra mediante degradación peptídica parcial. Los sitios de degradación del FVa son tres Arg 306-Asp 307, Arg 506-Gly 507 y Arg 662-Asp 663. El sitio inicial de ruptura del factor V por la PCA es el que se encuentra en el enlace Arg 506 y Gly 507, lo cual explica porqué una mutación a este nivel puede impedir la inactivación del FV y por lo tanto promover la generación excesiva de trombina, mientras que los sitios de degradación del FVIIIa son Arg 336-Met 337, Arg 562-Gly 563 y Arg 740-Ser 741 (4, 5, 7).

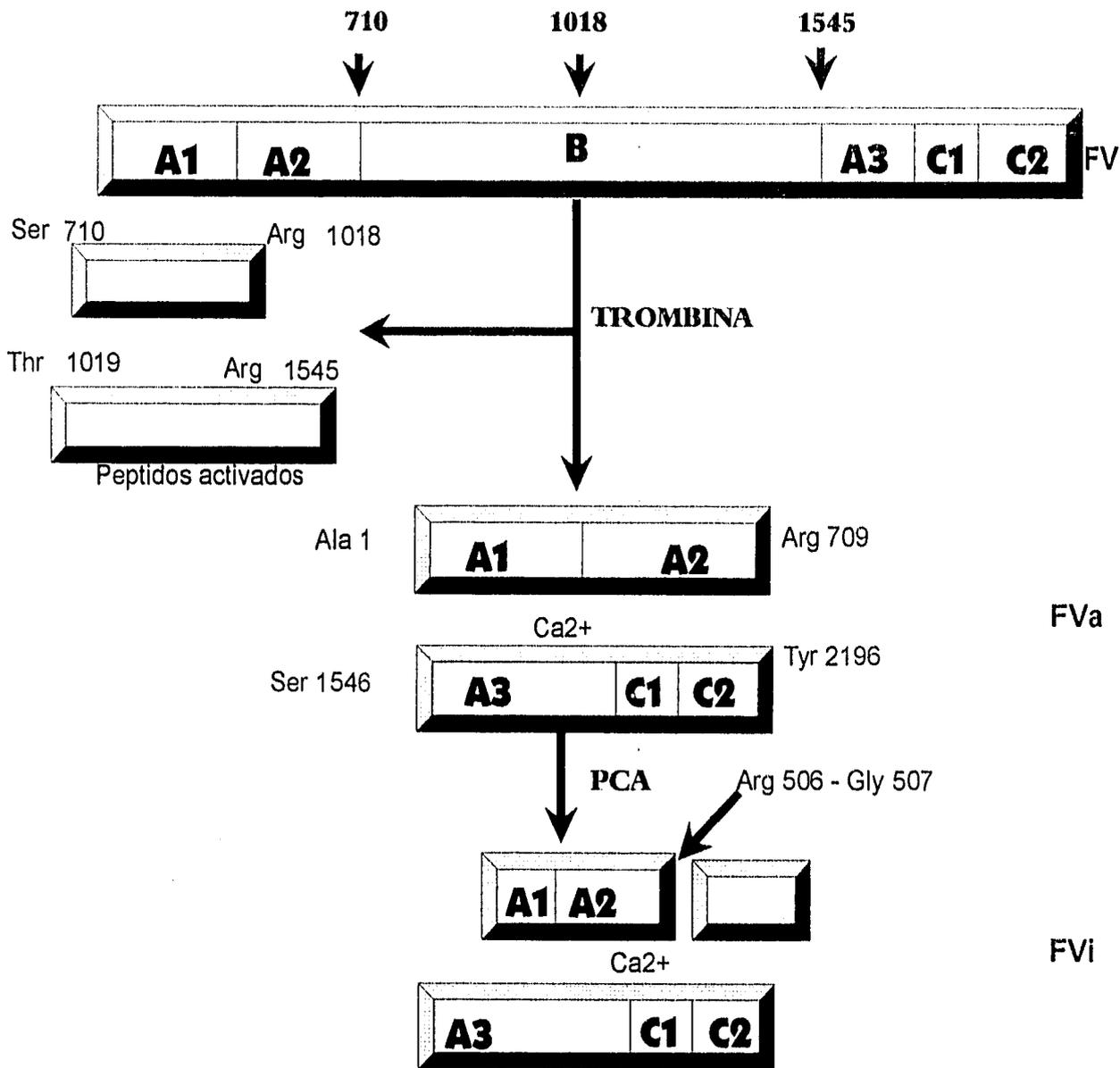


Figura 3. Metabolismo del factor V. Activación del factor V por trombina e inactivación por PCA. Ser=Serina, Arg=Arginina. Thr=Triptofano, Ala=Alanina, Tyr=Tirosina, Gly=Glicina, FV=Factor V, FVa=Factor V activado, FVi=Factor V Inactivo

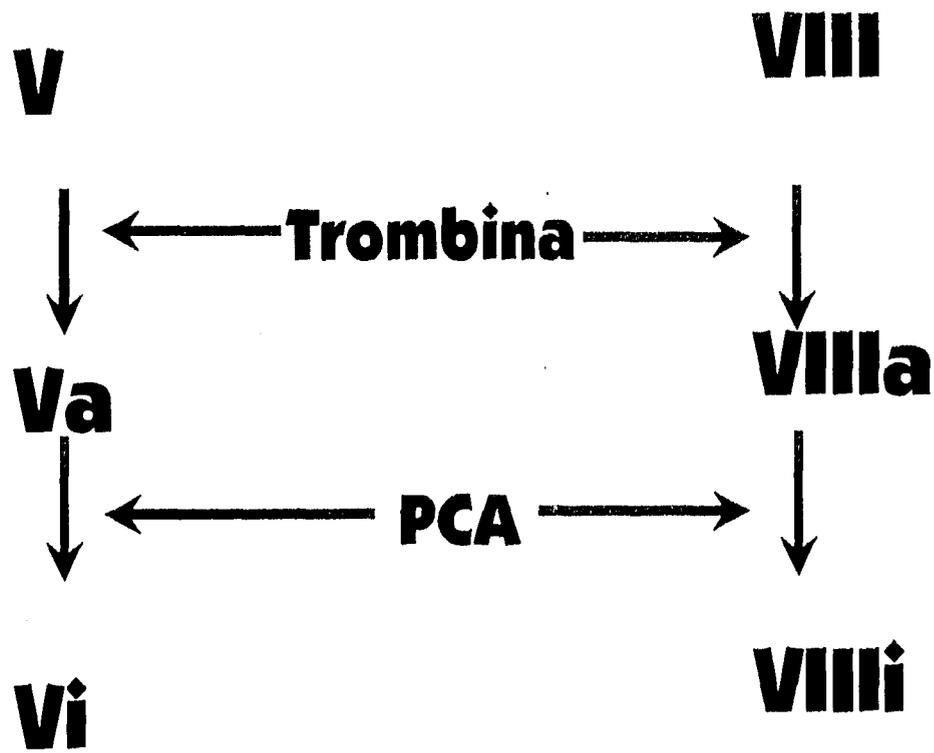


Figura 4. Metabolismo de los cofactores V y VIII. V=Factor V, Va=Factor V activado, Vi=Factor V Inactivo, VIII=Factor VIII, VIIIa=Factor VIII activado, VIIIi=Factor VIII Inactivo, PCA=Proteína C activada

F. Inhibidores del sistema de la proteína C

La PCA es neutralizada en plasma principalmente por dos serpinas, el inhibidor de la PC (IPC) y la α_1 -antitripsina. Por lo que la vida media de la PCA es únicamente de 15 a 20 minutos. Interesantemente recientemente se demostró inhibición de la PCA por una tercera enzima, la α_2 -macroglobulina, un inhibidor de múltiples proteasas séricas (4). La inhibición de la PCA por IPC es estimulada por heparina, mientras que la inhibición de α_1 -antitripsina no depende de heparina.

3.- Alteración en el sistema de la proteína C como causa de trombosis

La trombosis venosa es una enfermedad frecuente que afecta aproximadamente a 1:1000 personas anualmente (8). Los principales factores de riesgo adquiridos para trombosis venosa son; la cirugía, la inmovilización prolongada, algunas enfermedades malignas y el síndrome antifosfolípido (SAF). Existen también factores de riesgo heredados (9). La trombofilia en individuos jóvenes muchos de ellos con historia familiar de trombosis, se ha atribuido a defectos moleculares en factores reguladores de la coagulación. El sistema anticoagulante de la PC in vivo es de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis. La alteración en cualquiera de sus componentes se ha relacionado con enfermedades tromboembólicas. Aunque existen reportes esporádicos de mutaciones en TM que explican la predisposición a trombosis en un pequeño grupo de individuos, las proteínas frecuentemente afectadas son la PS y la PC. Recientemente se detectó la mutación en el FV como el principal factor asociado a trombosis venosas profundas de miembros inferiores (10, 11).

En personas con historia personal de trombosis, la prevalencia de deficiencia heterocigota de PC es de 2 a 5 %. En cuanto a la deficiencia de PC y PS, estas se heredan en forma autosómica dominante. En pacientes homocigotos conduce a púrpura fulminante con trombosis fatal durante el periodo neonatal si no se inicia sustitución inmediata. En pacientes con trombosis la prevalencia de deficiencia de PS es similar a la deficiencia de PC. La deficiencia de PS en adultos aumenta el riesgo de trombosis tanto venosas como arteriales. La prevalencia en donadores heterocigotos en países europeos es de 1 en 250 a 300 donadores (4, 9). La deficiencia de PC y la PS en la población general en México se desconoce.

Finalmente la mutación tipo Leiden en el FV, la cual se detecta mediante resistencia a la PCA in vitro es la etiología de trombosis con mayor prevalencia a nivel mundial y se discute más adelante (10, 11, 12).

4.- Resistencia a la proteína C activada

En teoría una pobre respuesta in vivo a la actividad anticoagulante de la PCA podría causar un estado protrombótico. Con esto en mente, en 1993 Dahlbäck y colaboradores crearon una modificación al ensayo de el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) para medir la respuesta al efecto anticoagulante de la PCA (12, 13, 14). Es un método sencillo, el resultado se reporta como el cociente entre el TTPa en presencia de PCA y el TTPa en ausencia de PCA. Efectivamente al estudiar a un hombre con historia de múltiples episodios de trombosis encontraron resistencia casi por completo a la actividad anticoagulante de la PCA. Por otra parte varios de los familiares del paciente tenían historia de trombosis venosa, en todos estos se demostró resistencia in vitro a la PCA (12). Los cocientes que se consideran diagnósticos de RPCA varían en las diferentes publicaciones pero son en su mayor parte cocientes alrededor de 2 (15). En estudios subsecuentes se confirmó el patrón de herencia autosómico dominante (10, 11). En un 21% de pacientes no seleccionados con trombosis única, y sin factores de riesgo predisponentes conocidos, se detectó RPCA (13). Dahlbäck y colaboradores describieron la RPCA y su asociación con trombosis venosa en un 50% de pacientes seleccionados con historia personal de una o más trombosis venosa con o sin historia familiar de trombosis (10, 16, 17, 18).

En la población sana (caucásicos) se ha encontrado una prevalencia de 7% para la RPCA por lo que se ha podido determinar que la RPCA como causa de trombosis es 10 veces más frecuente que los otros defectos genéticos antes conocidos (18).

En un principio se postularon algunas hipótesis para explicar la pobre respuesta a la PCA, las cuales se fueron descartando adecuadamente, estas hipótesis fueron: 1) La presencia de un auto-anticuerpo contra PC, la cual era poco probable debido a que parecía tratarse de un defecto genético heredado y no un evento adquirido. Por otra parte, la depleción de anticuerpo del plasma problema no eliminaba la resistencia. 2) La existencia de una proteasa no conocida que inhibiera en forma más rápida a la PC, sin embargo se demostró que la PCA era inhibida dentro de un rango de tiempo normal en el plasma problema. 3) La deficiencia funcional de PS se descartó mediante agregación de PS con actividad normal, sin que se lograra corregir la resistencia. 4) La posibilidad más viable era la presencia de mutaciones en los factores V y VIII, ambos sustratos de PCA. Mientras que el grupo de Dahlbäck procedió a secuenciar el gen del FVIII, descartando la presencia de mutaciones. El grupo de Investigación de Trombosis y Hemostasia de Leiden procedió a determinar si se trataba de una alteración en el factor V.

La primera evidencia de que una alteración en el FV era efectivamente la causa de RPCA provino de estudios con plasmas deficientes de factores (10, 12). Al mezclarlos con el plasma de un paciente con RPCA, todos los plasmas corregían el defecto de la coagulación excepto el plasma deficiente del FV (10).

5.- Mutación Leiden en el gen del factor V como causa de resistencia a la proteína C activada

En 1994 el Grupo de Investigación de Trombosis y Hemostasia de Leiden describió la presencia de una mutación en el FV de la coagulación como la principal causa de RPCA (10, 11). Utilizando análisis de restricción para polimorfismos en microsatélites cercanos al gen del factor V(D1S61), localizado en el cromosoma 1 (1q21-25), se encontró franca segregación del fenotipo de trombosis con el gen del factor V ($Z_{\max} 7.27$ en $\theta = 0.00$) (10). Al amplificar las regiones conocidas previamente como los sitios de interacción entre la PCA y el FV (exon 10) (10, 11, 12, 18), Bertina y colaboradores detectaron una mutación puntual en el gen que codifica para el FV. Esta consiste en una transición de guanina (G) a adenina (A) en el nucleótido 1691 lo que resulta en sustitución en la proteína del aminoácido arginina (Arg) en el residuo 506 por una glutamina (Gln) (FV Q506 ó FV Leiden) (10, 11). Esta mutación confiere resistencia a la inactivación del cofactor procoagulante Va por la PCA, lo que explica la incapacidad de esta última para prolongar el tiempo de coagulación *in vitro* y para reducir la generación de trombina *in vivo* (12, 13). En la población general sana principalmente caucásica, sin historia de trombosis se ha encontrado una prevalencia de RPCA de 3 a 10% (19). La causa de la mayor parte del fenotipo de resistencia en éstos, es la mutación heterocigota tipo Leiden en el FV (20). El riesgo de trombosis asociada a RPCA en heterocigotos es de 5 a 10 veces mayor que en la población general y en homocigotos es de 50 a 100 veces mayor (20, 21, 22). Sin embargo existen otras causas de RPCA además de la mutación del FV (mutación Leiden), como son la presencia de niveles elevados de estrógenos y la presencia de aFL ya sea anticoagulante lúpico (AL), anticuerpos anticardiolipina (aCL) o bien anticuerpos contra β_2 -glicoproteína I ($\alpha\beta_2$ -GPI) (23, 24, 25).

La RPCA secundaria a la mutación heterocigota del FV Leiden se ha encontrado de 2 a 8.5% con una incidencia de 4.5% en la población de Estados Unidos (6), mientras que está prácticamente ausente en las poblaciones indígenas americanas (mzatecos), poblaciones asiáticas, orientales y negras africanas estudiadas hasta el momento (6,26).

6.- Anticuerpos antifosfolípido como causa de resistencia a la proteína C activada

Los aFL son un grupo heterogéneo de auto-anticuerpos íntimamente relacionados, que reconocen determinantes antigénicos similares. Se fijan con gran afinidad a FL aniónicos como fosfatidil-serina, fosfatidil-etanolamina, cardiolipinas (CL) fosfatidil-inositol y ácido fosfatídico y con menor afinidad a FL neutros (28). Los aFL son inmunoglobulinas que pueden interferir *in vitro* con las pruebas de coagulación dependientes de FL. La presencia de aFL en suero se correlacionan con diversas manifestaciones clínicas como trombosis venosa, trombocitopenia, anemia hemolítica, pérdida fetal recurrente y livedo reticularis. Los aFL pueden ser detectados como AL, aCL y/o β_2 -GPI en un mismo individuo (29). La capacidad de un subgrupo de los aFL para prolongar los tiempos de coagulación fue descrita en 1950 por Conley y Hartman mientras que fueron Feinstein y Rappaport quienes por primera vez les llamaron anticoagulantes lúpicos. El AL provoca una prolongación en el TTPa y ocasionalmente en el TP mediante inhibición de la formación del complejo protrombinasa. Se desconoce el mecanismo de acción pero se cree que interactúa de alguna manera con la porción fosfolípida del complejo. Lo que caracteriza al AL, es que la capacidad de prolongar las pruebas de coagulación es dependiente de FL (30, 31). Los aCL fueron reportados por primera vez en 1906. Existen varios métodos para identificar los aCL basados principalmente en el ensayo inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida descrito por Harris y colaboradores en 1983, en el cual principalmente se emplean FL aniónicos (32). Los aCL requieren de la β_2 -glicoproteína I (β_2 -GPI) para ser detectados en el ELISA y pausiblemente para afectar la coagulación *in vivo*. Esto es cierto tanto para los aCL presentes en el suero de los pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) como para aquellos en el suero de los pacientes con síndrome de antifosfolípido (SAF), lo que sugiere que el requerimiento de la β_2 -GPI puede ser un marcador de patogenicidad de los aCL. Algunos sueros pueden tener aCL detectables en ausencia del cofactor y con la adición de β_2 -GPI la detección del anticuerpo puede incrementarse (33). De esta manera, en la mezcla policlonal de aFL presentes en un suero, pueden existir tres tipos de anticuerpos, aquellos que requieren del cofactor para reconocer a los FL aniónicos, aquellos que requieren de la presencia del cofactor para ser detectados y aquellos que no requieren del cofactor. La β_2 -GPI es una proteína sérica conocida también como apolipoproteína H, la cual forma complejos con FL aniónicos (34). La formación del complejo β_2 -GPI/FL aniónico parece ser necesaria para que los anticuerpos contra FL de carga negativa reconozcan al FL, cuando menos en sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes (35, 36). El cofactor tienen afinidad por compuestos de carga negativa por lo tanto no se une a FL neutros, este se comporta como acarreador proteico de compuestos de carga negativa incluyendo los FL. El papel fisiológico que se ha atribuido a la β_2 -GPI de acuerdo al trabajo reportado por Schousboe en 1985, es de anticoagulante natural (37), por lo tanto, la existencia de un anticuerpo que pueda reconocerla cuando se encuentra unida a FL podría teóricamente dar lugar a eventos trombóticos (38).

3. OBJETIVOS

- 1.- Determinar la prevalencia de la resistencia a la proteína C activada en la población que acude a hospitales de salud pública en nuestro país, e identificar sus causas: mutación tipo Leiden, anticuerpos antifosfolípido (anticoagulante lúpico, anticardiolipinas y anti- β_2 GPI).
- 2.- Determinar la prevalencia de la mutación del factor V en la población con fenotipo de resistencia a la proteína C activada.
- 3.- Estandarizar la técnica de resistencia a PCA basada en TTPa (Chromogenix) y establecer los valores de referencia para este método con el equipo coagulométrico ST4 de Stago en nuestro laboratorio.

4. MATERIAL Y METODOS

1.- Criterios de inclusión de donadores

Se incluyeron 130 donadores que acudieron al banco de sangre del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ), durante los meses de octubre a diciembre de 1995. Los criterios de exclusión fueron los establecidos por la Norma Oficial Mexicana de 1993. Se excluyeron además personas con antecedentes familiares de TEV, enfermedades de la colágena, abortos espontáneos y uso de estrógenos para evitar el sesgo de los resultados debido a que el Instituto es un centro de referencia para pacientes con trombosis.

2.- Obtención de muestras

Previo consentimiento, se obtuvieron 30 ml de sangre de cada individuo conservandolos a 4°C en hielo. Se recolectaron 4.5 ml de sangre en tubos con 0.5 ml de citrato de sodio al 3.8%, posteriormente se centrifugaron a 2500 g por 15 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Beckman). Se separó el plasma citratado en 2 alícuotas, una se utilizó para determinar TTPa con CK Prest (Stago), tiempo de protrombina (TP) con Neoplastine CI plus (Stago) y la otra alícuota se utilizó para determinar la RPCA de Chromogenix (Coatest APC A.B.), esta última se almaceno a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Se recolectaron 4.5 ml de sangre de la manera antes mencionada centrifugando a 5000 g durante 10 minutos con el fin de depletar de plaquetas el plasma, para evitar la interferencia con los FL. La determinación de AL se llevo acabo usando el tiempo de de veneno de víbora de Russell diluido y simplificado (TVVRDS de American Diagnostica) y como prueba confirmatoria por el procedimiento de neutralización plaquetaria (PNP) (Bio/Data Corporation) en el equipo coagulométrico Stago ST4.

Otros 5 ml de sangre se recolectaron para la obtención de suero, para determinar (aCL) IgG e IgM (SIGMA) y anti- β_2 -GPI por el método de (ELISA), estos se centrifugaron durante 15 minutos a 2500 g a 20°C. Posteriormente se congelaron a -70°C.

Los últimos 15 ml de sangre fueron recolectados para la extracción de DNA, en tubos Falcon con 150 µl de EDTA al 15% pH 8 (estéril), inmediatamente fueron congelados a -70°C en un ultracongelador (Forma Scientific) .

Control de calidad

Para generar el pool de plasmas normales, seleccionamos 10 donadores de sangre con los criterios de exclusión antes mencionados, se tomaron 5 ml de sangre en tubos con citrato de sodio al 3.8%, se centrifugo a 2500 g por 15 minutos a 4°C para verificar y descartar alteraciones gruesas del sistema de coagulación. En cada uno de ellos se determino TP y TTPa los cuales estuvieron dentro de los valores de referencia de cada método. Posteriormente se hizo un pool con la mezcla de todos los plasmas, el cual se centrifugo a 2500 g por 15 minutos, posteriormente se filtro el plasma con papel Watman No. 42 y se hicieron alicuotas de 1 ml en tubos Eppendorf congeladas a -70 °C y utilizadas para el control de calidad de TP, TTPa, RPCA y AL.

3.- Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

Principio

El TTPa se basa en la recalcificación de plasma en presencia de cefalina, un sustituto plaquetario y de un activador del factor XII (caolín). La estandarización de la activación por contacto y la optimización de la concentración de FL semejante a plaquetas, disminuye las variables de la prueba. El TTPa es una prueba la cual explora la vía intrínseca y común de la coagulación (factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II y fibrinógeno).

Técnica

A 50 µl de plasma de pacientes o controles se adicionan 50 µl de cefalina y caolín y se incuban a 37°C por 3 minutos, se agregan 50 µl de CaCl₂ 0.025M precalentado a 37°C y se registra el tiempo de formación del coágulo. Si el TTPa esta prolongado se lleva a cabo una corrección con el pool de plasmas.

Valores de referencia

Los valores de referencia establecidos por el laboratorio de coagulación del INNSZ para la prueba de TTPa son de 31 a 39 segundos.

Interpretación

Si el TTPa se encuentra prolongado puede deberse a deficiencias congénitas o adquiridas de factores o a la presencia de anticoagulantes circulantes ya sea específicos contra alguno de los factores o bien inespecífico como el AL.

4.- Determinación de tiempo de protrombina (TP)

Principio

El TP es una prueba de coagulación que utiliza tromboplastina y calcio. La prueba mide la actividad de los factores de la vía extrínseca y común de la coagulación (Factor II, V, VII y X).

Técnica

El plasma de pacientes o controles (50 µl) se incuban a 37°C por 2 minutos y se adicionan 100 µl de tromboplastina y calcio y registran el tiempo de formación del coágulo.

Valores de referencia

Los valores de referencia establecidos por el laboratorio de coagulación del INNSZ para la prueba de TP es de 11 a 15 segundos.

5.- Determinación de resistencia a la proteína C activada basada en TTPa (RPCA)..

Principio

La resistencia a la PCA se determina midiendo la prolongación de TTPa en plasma en respuesta a la PCA. El TTPa del paciente se determina en presencia y ausencia de PCA . El resultado se expresa como el cociente entre los dos tiempos de coagulación. En pacientes con RPCA, la prolongación de el tiempo de coagulación no es tan pronunciada como en individuos sanos resultando un cociente bajo. El reactivo de TTPa para determinar RPCA (Chromogenix) a diferencia del TTPa de Stago contiene FL y silica como activadores.

La estabilidad del reactivo PCA/CaCl₂ una vez reconstituido es de 2 horas a 37°C y de 8 horas a temperatura ambiente o bien de 5 días entre 2 a 8°C.

Control de Calidad

Se utilizan las alícuotas del pool de plasmas como control normal. El control patológico (Chromogenix) que se utiliza es un heterocigoto conocido para la mutación del FV el cual se reconstituye con 0.5 ml de agua estéril. También como control se utilizó un grupo de 10 donadores en los que se realizó RPCA en plasma fresco y plasma congelado durante un mes para determinar si el proceso de congelación induce variaciones del cociente de RPCA.

Técnica

Todos los reactivos se llevan a temperatura ambiente antes de su uso. Los plasmas se descongelaron a 37°C durante 5 minutos para evitar pérdida de la actividad de los factores. El reactivo de PCA/CaCl₂ se reconstituye con 2.0 ml de agua estéril 20 minutos antes de la prueba. 50 µl de plasma (problema y control) se mezclan con 50 µl del reactivo de TTPa (Chromogenix), se incuban a 37°C durante 5 minutos, adicionar 50 µl de CaCl₂, registrar el tiempo de formación del coágulo. Repetir el TTPa sustituyendo CaCl₂ por PCA/CaCl₂ y registrar el tiempo de formación del coágulo.

Resultado

Tanto para controles como para plasmas problemas, se calcula el cociente entre el TTPa en presencia de PCA sobre el TTPa en ausencia de esta.

$$\text{Cociente} = \frac{\text{TTPa} + \text{PCA}/\text{CaCl}_2}{\text{TTPa} + \text{CaCl}_2}$$

Valores de referencia

El cociente varía para los diferentes laboratorios entre 1.8 y 2.5.

Interpretación

El TTPa se prolonga al adicionar PCA en plasma normal, en contraste con el plasma de pacientes con resistencia a PCA en los cuales el TTPa es menos prolongado. Por lo que el valor del cociente es menor en individuos con la resistencia a la PCA que en individuos sin la resistencia.

6.- Determinación del tiempo de veneno de víbora de Russell diluido y simplificado (TVVRDS)

Principio

El veneno de víbora de Russell activa directamente al FX. En presencia de FL y calcio se lleva a cabo la conversión final de fibrinógeno a fibrina con formación del coágulo en el plasma. Esta activación es directa saltándose la fase de contacto y la vía intrínseca de la cascada de coagulación, de esta manera excluye las interferencias de deficiencias de factores VIII, IX, XI, XII y sus inhibidores respectivos. La prueba de TVVRDS es realizada en muestras en las que no se ha podido determinar la presencia de AL (basados en TTPa). La baja concentración y el tipo de FL contenido en este reactivo incrementa la sensibilidad y especificidad de la prueba a el AL.

Técnica

Se reconstituye el reactivo con 2.0 ml de agua estéril 20 minutos antes de iniciar la prueba. Se incuban 100 µl de plasma problema y control por un lapso de 3 minutos a 37°C, posteriormente se adicionan 100 µl de reactivo TVVRDS y se registra el tiempo de formación del coágulo.

Resultado

$$\text{Cociente} = \frac{\text{TVVRDS del paciente}}{\text{TVVRDS de el pool de plasmas}}$$

Valores de referencia de el equipo comercial.

TVVRDS de 28 a 48 segundos con un cociente de 0.76 a 1.23

Interpretación

Si el resultado de la prueba esta dentro de los valores de referencia se reporta negativo para AL. Si el resultado es mayor de lo establecido se sospecha de AL o deficiencia de factores II, V, o X, por lo que se procede a hacer corrección con mezcla del plasma del paciente con un pool de plasmas 1:2. Si corrige se confirma la deficiencia de factores y si no corrige se sospecha AL, el cual se confirma mediante la demostración de dependencia de FL por el método de PNP o por DVV confirm (American Diagnostica). El TVVRDS corrige en presencia de AL pero no de inhibidores específicos o de heparina.

7.- Determinación de AL por el procedimiento de neutralización plaquetaria (PNP).

Principio

Esta prueba se utiliza para determinar la dependencia de FL de anticoagulantes circulantes inespecificos en plasma. Esta prueba se basa en la capacidad de los FL para acortar un TTPa prolongado por la presencia de AL.

Técnica

Se reconstituye el reactivo con extracto plaquetario con 1.0 ml de agua estéril, adicionando 50 µl del reactivo de TTPa con 50 µl de plasma del paciente y 50 µl de solución salina isotónica (SSI). Se mezcla e incuba 5 minutos a 37°C y adicionar 50 µl de CaCl₂ 0.025M y se mide el tiempo de formación del coágulo. Se repite este procedimiento remplazando 50 µl de SSI por 50 µl de el reactivo extracto plaquetario y se mide el tiempo de formación del coágulo.

Interpretación

El tiempo de coagulación con extracto plaquetario se compara con el tiempo de coagulación con SSI. Una corrección del TTPa mayor de 5 segundos con extracto plaquetario se considera positivo para AL.

8.- Determinación de anticuerpos anticardiolipina IgG e IgM.

Principio

El método que se utilizó para detectar los anticuerpos aCL de la clase IgG e IgM fue el ELISA descrito por Loizou, modificado por Gharavi y Delezé (39). Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc Inc, Danemark 97F 4-39454) con 2.5 µg/pozo de CL (SIGMA Chemical Co, St Louis MO.), a una concentración de 50 µg/ml, disuelta en alcohol etílico (J.T.Baker). Se evaporó el etanol con gas nitrógeno durante 30 minutos, cambiando de posición la placa para que exista una exposición directa de cada uno de los pozos al nitrógeno. Una vez secada la placa, se bloquearon los sitios inespecificos con 350 µl de una solución al 10% suero bovino fetal (SBF, SIGMA) en PBS (NaCl 0.15M, Na₂HPO₄ 0.01M, KH₂PO₄ 0.01M pH 7.4) 2 horas a temperatura ambiente, se utilizó SBF como fuente de β₂-GPI como cofactor de los anticuerpos aCL. Posteriormente, se lavaron las placas 3 veces con PBS, se secaron mediante golpeteo ligero contra una superficie absorbente y se guardaron toda la noche a 4°C.

Los sueros fueron diluidos 1:50 con PBS y se congelaron a -20°C toda la noche. A la mañana siguiente se incubaron a 37°C para descongelarlos y las placas se pusieron a temperatura ambiente por lo menos 15 minutos. Se agregaron 200 µl de cada muestra por duplicado. La aplicación de las muestras debe hacerse en el menor tiempo posible ya que la incubación empieza al aplicar la primera muestra. Se incubaron las placas por una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 3 veces con PBS, con incubaciones de 3 minutos y se secaron mediante golpeteo.

Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de conejo anti-humano marcado con la enzima fosfatasa alcalina, específico contra cadenas gamma y mu (SIGMA). Se utilizó a una dilución 1:10000 en SBF al 10%/PBS. En cada pozo se adicionaron 200 µl de este anticuerpo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 3 minutos cada uno y se secaron las placas como se menciona anteriormente.

Como sustrato de la enzima se utilizó el p-nitrofenilfosfato (SIGMA), disuelto en solución amortiguadora de glicina (Glicina 0.1M, MgCl₂ 0.001M, ZnCl₂ 0.001M pH 9.8) a una concentración de 1 mg/ml. Se adicionaron 200 µl del sustrato de la enzima en cada pozo y se incubaron las placas a 37°C una hora en la oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de micro-ELISA (Titertek Multiskan, Organon Teknika, Helsinki Finlandia) y los resultados se expresan en Unidades Arbitrarias (UA).

Control de calidad

Se aplican en 3 puntos diferentes de la placa (al principio, en medio y al final) 200 µl de la mezcla de sueros normales (pool) diluidos 1:50 en PBS/SBF al 10% por duplicado, que tienen como finalidad disminuir las variaciones del ensayo. Cada placa lleva una serie de 6 blanco en 3 puntos diferentes de la placa los cuales dan la densidad óptica (DO) de la cardiolipina y todo el proceso pero sin el suero problema. Se incluye un control positivo de anticuerpos aCL diluido 1:50, 1:100 y 1:200 en PBS/SBF al 10% por duplicado en 3 puntos diferentes de la placa.

Formula para calcular las unidades arbitrarias (UA)

$$UA = \frac{x \text{ muestra} - x \text{ blanco}}{x \text{ pool} - x \text{ blanco}}$$

x = al promedio de resultados de densidades ópticas.

Valores de referencia obtenidos en el Laboratorio de Inmunología del INNSZ (40), tomando en cuenta el promedio mas dos desviaciones estándar de 100 donadores sanos son:

aCL IgG mayor de 1.9 UA se considera positivo.

aCL IgM mayor de 2.4 UA se considera positivo.

9.- Determinación de anticuerpos contra β_2 -glicoproteína I (β_2 -GPI)

Método

Se utilizó ELISA para la determinación de anticuerpos anti- β_2 -GPI. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (placas Nunc Inc cat. 4-39454). La β_2 -GPI (obtenida a partir de un lote purificado de plasma humano de acuerdo a la técnica descrita por Polz y modificada por Cabiedes y colaboradores (41)). Se añadió a los pozos 50 μ l de β_2 -GPI a una concentración de 25 μ g/ml en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6. Se incubó toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente la placa se lavó 3 veces con PBS/Tween 20 al 0.05%, entre cada uno de los lavados se reposaron las placas por 3 minutos. Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS/ASB al 1.5%, con 300 μ l por pozo durante 2 horas. Después del bloqueo se lavaron las placas una vez más como se mencionó. Posteriormente se aplicaron 200 μ l de los sueros problemas, control o buffer solo 1:10, incubando 1 hora a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las placas 3 veces.

Se adicionaron 200 μ l de anticuerpo de cabra anti-humano (SIGMA), marcado con fosfatasa alcalina fué diluido 1:10000 en PBS/SBF. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente la placa se lavo 3 veces. Como sustrato se utilizó p-nitrofenilfosfato (SIGMA 104-105), disuelto en amortiguador de dietanolamina pH 9.8. Se adicionaron 200 μ l del sustrato en cada pozo y se incubó 1 hora a 37°C bajo oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de micro-ELISA (Titertek Multiskan, Organon Teknika, Helsinki Finlandia).

Control de calidad

La mitad de la placa se sensibilizo con β_2 -GPI (48 pozos) a la otra mitad de la placa se le adiciono amortiguador solo. En cada lado de la placa se agregaron 200 μ l de las muestras problema diluidas 1:10 con PBS/ASB al 1.5% por duplicado.

Calculo de resultados

$$a\beta_2\text{-GPI} = x \text{ DO de la muestra con } \beta_2\text{-GPI} - x \text{ DO de la muestra sin } \beta_2\text{-GPI}$$

Valores de referencia

Los valores de referencia utilizados para anti- β_2 -GPI, son los determinados por el laboratorio de Inmunología del INNSZ con los cuales una DO mayor a 0.05 se considera positiva.

10.- Técnica de extracción de DNA.

Digestión de DNA

Se realizó lisis térmica de los eritrocitos mediante descongelación de las muestras de sangre 3 veces a temperatura ambiente (6 a 8 horas). Posteriormente se realizó lisis hipotónica, agregando a cada tubo buffer Tris/EDTA (GIBCO) 10:10M hasta un volumen de 50 ml, manteniendo los tubos en hielo durante 15 minutos. Se centrifugaron las muestras 10 minutos a 3000 rpm 4°C, decantando posteriormente el sobrenadante que contiene eritrocitos lisados con mucho cuidado sin perder el botón de leucocitos. Se repitió la lisis hipotónica por lo menos tres veces hasta que el sobrenadante se tornó claro.

Se procedió a digerir con proteinasa K (SIGMA). Adicionando 2 ml de Buffer Tris/EDTA 10:5 M (resuspender con el vortex), y 100 µl de proteinasa K, 100 µl de SDS (SIGMA), agitando. Se dejó una noche a temperatura de 65°C (las muestras se pueden guardar después de este paso hasta 1 año a 4°C).

Extracción con fenol

A la muestra obtenida se adicionó el mismo volumen de fenol (J.T. Baker), aproximadamente 2.5 ml. Dejando en agitación vigorosa de 3 a 4 horas en un rotor a 260 rpm a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3000 rpm 1 hora a 4°C, recuperando en otro tubo la fase superior que contiene DNA y separándola de la fase intermedia que contiene las proteínas y la fase inferior con fenol. Posteriormente se adicionó la misma cantidad de fenol al DNA extraído y se dejó en agitación toda la noche a 260 rpm a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3000 rpm 1 hora a 4°C. Se recuperó nuevamente la fase superior con DNA. Se agregó la misma cantidad de la mezcla cloroformo alcohol isoamílico (Reproquifin) (preparado 24 horas antes y se agita antes de usar), mezclando por inversión. Se centrifugó a 3000 rpm 30 minutos a 4°C. Una vez más se recuperó el DNA.

Precipitación del DNA

Se adicionó acetato de sodio 3M (250 µl), en un volumen correspondiente a la décima parte del volumen de la muestra (J.T. Baker) Se agitó con vortex unos segundos hasta ver la formación del DNA. Se adicionaron 2½ veces del volumen obtenido de DNA (3 ml) de etanol absoluto frío. Se centrifugaron las muestras por 30 minutos a 3000 rpm a 4°C. Al terminar se aspiró el alcohol con pipeta Pasteur. Se agregaron 2 ml de alcohol etílico (Omnichem) al 70% agitando. Se volvieron a centrifugar los tubos durante 30 minutos a 3000 rpm a 4°C, aspirando una vez más el alcohol. Se secó el DNA dejándolo 15 minutos en la campana de flujo laminar. Finalmente se resuspendió el DNA, adicionando 1 ml de Buffer Tris/EDTA 10:0.01M, dejándolo 2 días a 4°C antes de utilizarlo. La medición de la pureza de DNA extraído se realizó con un espectrofotómetro (Beckman) a 260 y 280 nm.

11.- Determinación de la mutación del FV (R506Q):223 pb por reacción en cadena de la polimerasa.

Amplificación mediante PCR

Utilizamos un termociclador PTC-100 de MJ Research. Utilizamos 25 µl de mezcla de reacción por muestra conteniendo 2.5 µl de buffer 10X (a una concentración de 10 mM Tris pH=9.0; 2 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.1% de triton X-100), 4 µl de la mezcla de dNTP's (200 µM), 1 µl de ambas secuencias iniciadoras (primers), 0.25 µl de Taq DNA polimerasa (0.05% U) (Promega), 2.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 a 4 µl de muestra de DNA y 9.75 µl de agua estéril para llegar a un volumen final de 25 µl.

Las secuencias iniciadoras utilizadas son:

5' ACCCACAGAAAATGATGCCAG (600 nM) (T_m = 61.05°C)

3' TGCCCCATTATTTAGCCAGGAG (600 nM) (T_m = 61.05°C)

Para la amplificación, se llevaron a cabo 20 ciclos usando el siguiente programa:

- Temperatura inicial (5 min)	94°C	60 seg
- Desnaturalización	92°C	15 seg
- Alineamiento	66°C	20 seg
- Extensión	72°C	30 seg

Posteriormente 10 ciclos

- Desnaturalización	92°C	10 seg
- Alineamiento	50°C	20 seg
- Extensión	72°C	30 seg

Finalmente 10 ciclos

- Extensión final	72°C	300 seg
-------------------	------	---------

Restricción con MNL-1

Se utilizaron 5 a 10 µl de las muestras amplificadas para restricción con MNL-1, dejando el resto sin restricción. Las muestras se incubaron por 6 a 12 horas con 0.5 U de la enzima MNL-1 (Biolabs) en 2.5 µl de buffer diluido a 3X.

Interpretación

Las muestras amplificadas (pre y post-digestión) y los controles de agua y de un paciente heterocigoto conocido se corrieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3.0% con bromuro de etidio. En individuos normales se observan 3 bandas: de 37, 82 y 104 pb. La mutación produce la pérdida de uno de los dos sitios de restricción. Por lo que en individuos homocigotos solo se observan 2 bandas de 82 y 141 pb, mientras que en heterocigotos se observan las 4 bandas de 37, 82, 104 y 141 pb.

5. RESULTADOS

Se incluyeron 84 (65%) hombres y 46 (35%) mujeres con edad promedio de 32 años (rango 18 a 63), 83 (64%) de ellos originarios del D.F. En cuanto a estudios de coagulación, en todos los donadores se llevaron a cabo TP, TTPa y RPCA. Las primeras dos pruebas se encontraron dentro de rangos normales establecidos en el laboratorio de coagulación en el 100% de las muestras. En cuanto a RPCA el cociente diagnóstico utilizando la media menos dos desviaciones estándar, fue significativamente menor en mujeres que en hombres, 2.0 contra 2.6 ($p < 0.000009$ por U Mann-Whitney) (figura 5) la media en mujeres es de 2.93 y la media en hombres fue de 3.34 (tabla 1). No detectamos diferencias al analizar el cociente contra edad ni por lugar de origen. Dado que existen pacientes con la mutación heterocigota tipo Leiden en el factor V sin resistencia a la PCA in vitro, pero con riesgo elevado de trombosis, decidimos estudiar a todos los donadores con cocientes menores a 2.7 (tabla 2) (15 donadores, 13 mujeres y 2 hombres), para así poder detectar a todos aquellos donadores que a pesar de tener cocientes de RPCA aparentemente normales pudieran ser portadores de la mutación y determinar en base a esto el cociente para nuestros donadores. Para detectar otras causas de RPCA, se buscaron AL, aCl-IgG e IgM y $\alpha\beta_2$ -GPI (tabla 2). En estos donadores se realizó extracción de DNA (tabla 3) posteriormente se realizó PCR y polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (figura 6).

Todos los individuos con la mutación tuvieron cocientes de RPCA menores o iguales a 2.3. Encontramos 5 donadores utilizando éste último cociente como punto de corte; 1 sin causa aparente de RPCA, 3 heterocigotas (todas mujeres) para la mutación en el gen del FV (figura 7). En una asociado con aCL tipo IgM: 2.6 UA y en otra con $\alpha\beta_2$ -GPI de 0.13 DO. En la última detectamos la presencia de AL mediante el TVVRDS, el cual fue confirmado mediante corrección con extracto plaquetario.

Con estos datos, la prevalencia de RPCA in vitro en el grupo estudiado es de 3.8%, mientras que la prevalencia de la mutación es de 2.3%. Llama la atención la alta frecuencia de más de un factor que explica la RPCA en los individuos sanos estudiados. Es interesante que en estos individuos portadores de la mutación más la presencia de AFL, el cociente de RPCA (media 2.1), es menor al de la paciente que tiene únicamente la mutación (2.3). Aunque evidentemente son pocos pacientes, sugiere que esta sea la causa que explique la ausencia de RPCA in vitro en algunos acarreadores de la mutación.

Tabla 1

Donadores	No.	Media	DE	Media -2 DE	Cociente de RPCA
Mujeres	46	2.93	0.45	2.0	2.0
Hombres	84	3.34	0.44	2.6	2.6
Total	130				

Valores de RPCA tomando en cuenta la media -2 DE, ($p < 0.000009$)

Tabla 2

No de donador	Sexo	Edad	Cociente de RPCA	TVVRDS	aCLIgG	aCLIgM	aβ2-GPI	Mutación FV
1	F	37	2.5	36.2/0.92	0.2	0.2	0.0	negativo
2	M	37	2.5	46.8/1.19	0.5	1.1	0.03	negativo
3	M	28	2.6	33.3/0.84	0.3	0.9	0.0	negativo
4	F	21	2.6	40.9/1.04	0.1	0.5	0.0	negativo
5	F	27	2.3	38.4/0.97	0.3	0.5	0.0	heterocigoto
6	F	38	1.8	100/1.49	0.6	0.4	0.0	negativo
7	F	25	2.6	39.3/1.0	0.3	1.0	0.0	negativo
8	F	39	2.6	35.8/0.91	0.2	2.0	0.0	negativo
9	F	36	2.4	34.0/0.86	0.2	2.3	0.0	negativo
10	F	32	2.0	37.7/0.94	0.1	2.6	0.0	heterocigoto
11	F	53	2.4	32.9/0.83	0.2	1.0	0.0	negativo
12	F	44	2.6	37.0/0.94	0.3	1.9	0.0	negativo
13	F	30	2.2	36.9/0.93	0.3	0.1	0.13	heterocigoto
14	F	35	2.3	35.6/0.90	0.4	2.4	0.0	negativo
15	F	47	2.5	39.1/0.99	0.4	1.3	0.0	negativo

Valores de referencia

TVVRDS 28-48 segundos/Cociente 0.76-1.23

aCLIgG > 1.9 UA positivo

aCLIgM > 2.4 UA positivo

aβ2-GPI > 0.05 DO positivo

Tabla 3

No de donadores	Cociente de RPCA	260nm	280nm	Cociente de DNA 260/280nm	ng/μl
1	2.5	0.0317	0.0144	2.206	158
2	2.5	0.0431	0.0219	1.967	215
3	2.6	0.0684	0.0354	1.933	342
4	2.6	0.0401	0.0180	2.226	200
5	2.3	0.0350	0.0202	1.736	175
6	1.8	0.0328	0.0130	2.56	164
7	2.6	0.0395	0.0190	2.077	197
8	2.6	0.0586	0.0290	2.023	293
9	2.4	0.0226	0.0100	2.260	113
10	2.0	0.0492	0.0244	2.016	246
11	2.4	0.0336	0.0120	2.803	168
12	2.6	0.0380	0.0162	2.345	190
13	2.2	0.0448	0.0218	2.060	224
14	2.3	0.0380	0.0180	2.115	190
15	2.5	0.0264	0.0100	2.629	132

Pureza de Dna extraido (El cociente de 260nm/280nm debe ser mayor de 1.75)

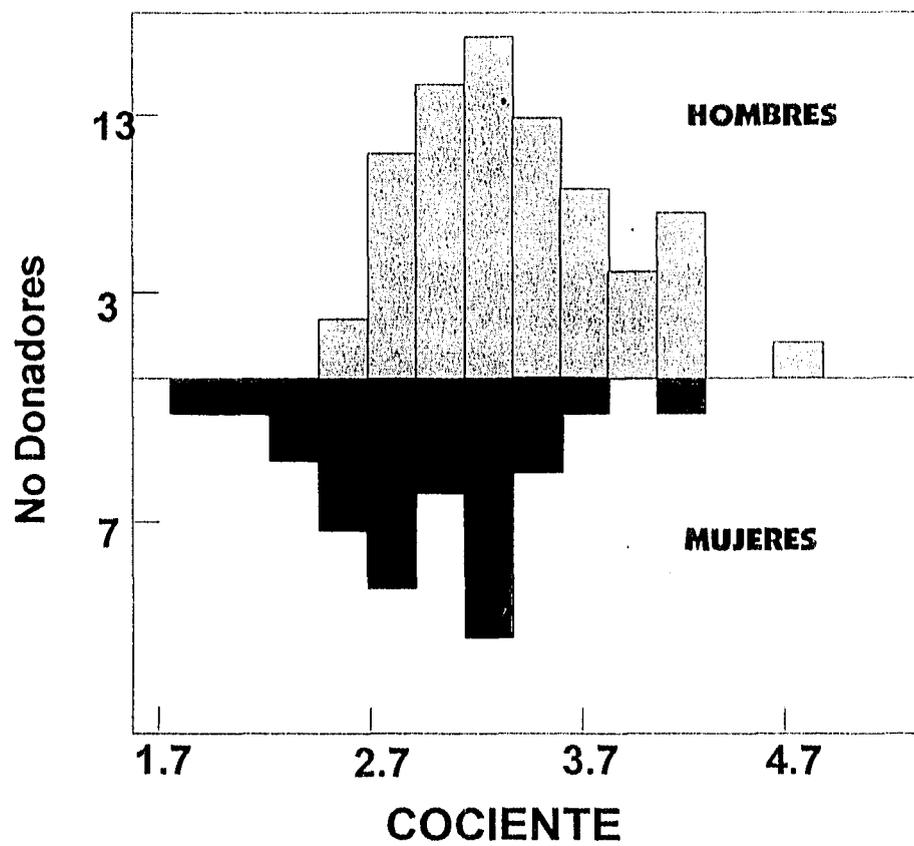


Figura 5. Histograma de distribución de cocientes de RPCA. El cociente de RPCA en mujeres es menor que en hombres. Se encontrarón diferencias significativas al analizar el cociente de RPCA contra sexo

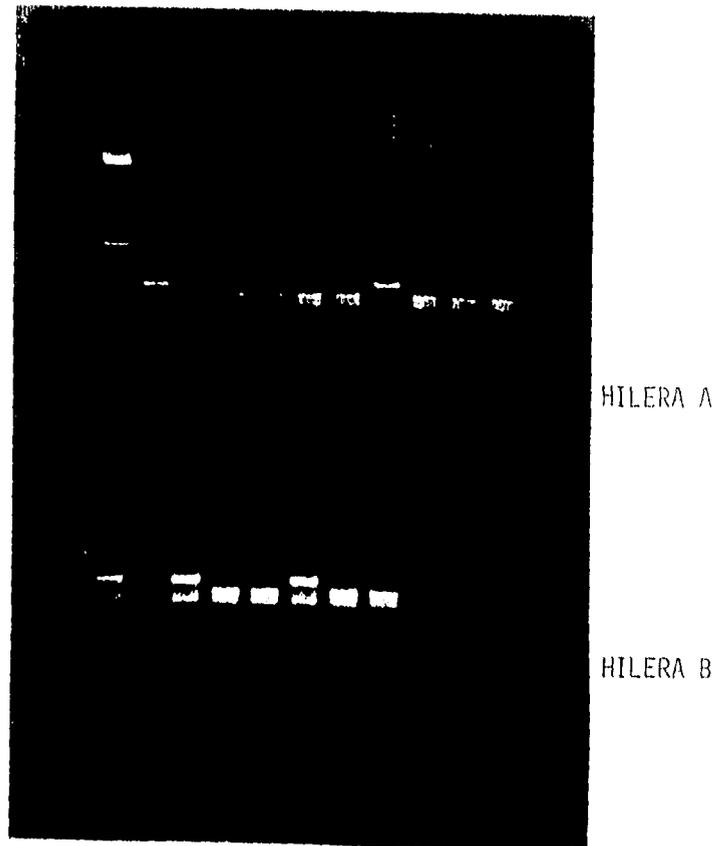


Figura 6. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 3% del DNA amplificado y digerido con la enzima de restricción MNL-1. carril1=escalera de DNA, carril 2A y 1B heterocigotos conocidos (control positivo), carril 3A y 2B agua (control negativo). En el carril 8A, 3B y 6B son los 3 donadores heterocigotos

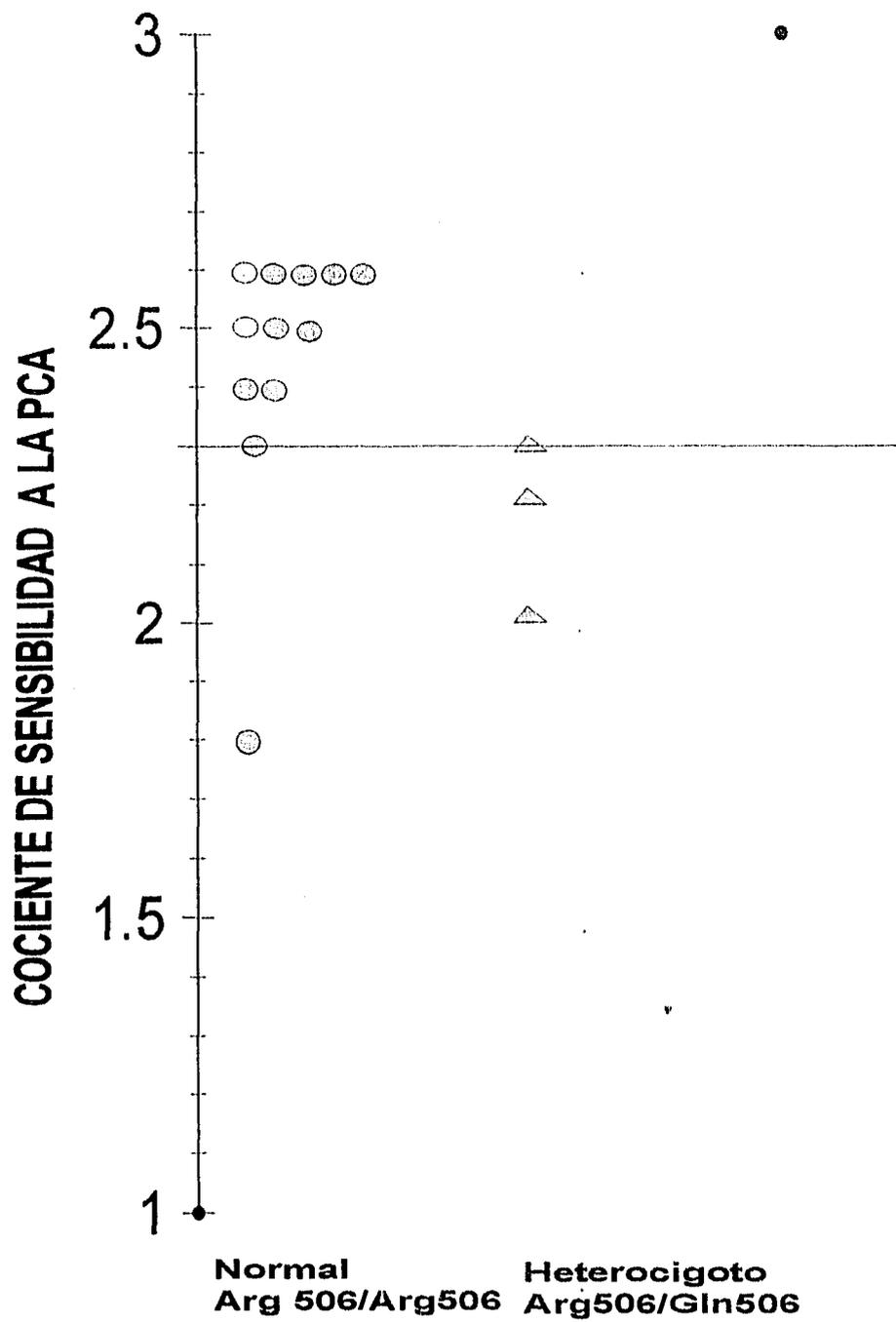


Figura 7. Frecuencia de mutación del Factor V Leiden en donadores de sangre

6. CONCLUSIONES

La prevalencia de RPCA de 3.8% y de mutación de 2.3% en nuestro estudio, es similar a la reportada en Estados Unidos y países europeos (6, 19). Sin embargo, la prevalencia de la mutación en el gen del FV Leiden en dos poblaciones indígenas Mazatecas en México es de 0% (26). Lo anterior indica que la mutación fue importada probablemente durante la invasión del continente americano por los Españoles. En relativamente pocos años la mezcla de poblaciones ha llevado a una prevalencia de RPCA similar a la de caucásicos.

Las diferencias encontradas al analizar el cociente de RPCA entre mujeres y hombres son esperables ya que se ha demostrado que la elevación de estrógenos ya sea natural, patológica (por hepatopatía) o bien proveniente de fuentes exógenas, es causa de disminución de la respuesta a la PCA. Creemos por lo tanto que esta información debe de tomarse en cuenta al analizar los resultados de los cocientes en los pacientes.

Es evidente que la técnica para RPCA y los resultados deben de ser estandarizados en cada laboratorio. El cociente de corte por debajo del cual se considera RPCA en la mayor parte de los trabajos publicados se ha determinado, utilizando la quinta percentila de donadores sanos o bien basados en la utilización de la media del cociente menos dos desviaciones estándar. Sin embargo si hubieramos utilizado estos criterios, tendríamos un cociente en mujeres de 2.0 y en hombres 2.6, con lo cual los falsos negativos para la mutación serían 2 de 3 (66%). Mientras que utilizando un valor menor o igual a 2.3 como positivo para RPCA, no detectamos falsos negativos. Obviamente pueden haber individuos heterocigotos, sobre todo en hombres con cocientes mayores. Por otro lado existen individuos con un cociente bajo sin que se detecte una explicación conocida. Es importante saber si estos individuos tienen o no un riesgo elevado de trombosis y si es así será necesario investigar las causas de este fenotipo.

Finalmente, aun en personas heterocigotas para el FV Leiden, se deben de buscar otras causas asociadas a un cociente bajo de RPCA ya que estos individuos pueden tener un mayor riesgo de trombosis. Esto último tendría que ser confirmado mediante un estudio con un mayor grupo de individuos con una o ambas alteraciones. Esto sería similar a lo que se observa en individuos con RPCA asociada a deficiencia de otros factores de coagulación como de proteína C o S en los cuales el riesgo de trombosis al tener ambas, se incrementa en forma evidente (22).

7. BIBLIOGRAFIA

1. Cesarman M.G. Actualidades en los sistemas fibrinolítico y de proteína C y S. Revista de Investigación Clínica del INNSZ. 1995;47:16-19.
2. España F., Vicente V. Alteraciones del sistema de la proteína C. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología Tomo III . 1992; Capítulo 206:616-626.
3. Gómez GE., Alberca SI. Fisiopatología general del mecanismo de la coagulación y sus inhibidores. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología Tomo III. 1992; Capítulo 160:165-168
4. Dahlbäck B., Stenflo J. The protein C anticoagulant system, in Stamatoyannopoulos G., Nienhuis AW., Majerus PW., Varmus H (ed). The Molecular Basis of Blood Diseases. Philadelphia, PA, Saunders, 1994; Chapter 17:599-627
5. Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: Resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. Blood 1995; 85:607-614
6. Griffin JH., Seligsohn U., Rapaport SI. Coagulation abnormalities in thrombosis. Education Program American Society of Hematology. Seattle, Washington 1995:51-58.
7. Mann KG., Gaffney D., Bovill EG. Molecular biology, biochemistry, and lifespan of plasma coagulation factors. Beutler E., Lichtman MA., Coller BS., Kipps TJ (ed). Williams Hematology fifth edition. 1995;Chapter 121:1206-1226
8. Dahlbäck B. Physiological anticoagulation. J Clin Invest 1994;94:903-927
9. Salzman E., Hirsh J.: Epidemiology, pathogenesis and natural history of venous thrombosis. In Hemostasis and Thrombosis. 3rd ed. Colman RW et al (eds), 1994
10. Bertina RM., Koeleman B., Koster T., Rosendaal FR., Dirven R.J., Ronde H., Van der Velden PA., Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994;369:64-67
11. Heeb MJ., Kojima Y., Greengard JS., Griffin JH. Activated protein C resistance: Molecular mechanisms based on studies using purified Gln506-factor V. Blood 1995;85:3405-3411
12. Dahlbäck B., Carlsson M., Svensson PJ. Familial Thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1993;90:1004-1008.

13. Koster T., Rosendaal FR., Ronde H., Briët E., Vandenbroucke JP., Bertina RM. Venous Thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993;342:1503-1506
14. Griffin JH., Evatt B., Wideman C., Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993;82:1989-1993
15. Ronde H., Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-Resistance: A Critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thrombosis and haemostasis*. 1994;72:880-886
16. Svensson PJ., Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 1994;330:517-524
17. Cadroy Y., Sié P., Boneu B. Frequency of a defective response to activated protein C in patients with a history of venous thrombosis. *Lancet* 1994;2008-2009
18. Zöller B., Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994;343:1536-1538
19. Beauchamp NJ., Daly ME., Hampton KK., Cooper PC., Preston E., Peake IR. High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *British Journal of Hematology* 1994;88:219-222
20. Rosendaal FR., Koster T., Vandenbroucke JP., Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995;85:1504-1508
21. Beuße S., Borg JY., Vasse M., Charbonnier F., Moreau V., Monconduit M., Frebourg T. Co-segregation of thrombosis with the factor V Q506 mutation in an extended family with resistance to activated protein C. *British Journal of Hematology* 1995;89:659-662
22. Sun Xi., Evatt B., Griffin JH. Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilic. *Blood* 1994;83:3120-3125
23. Vandenbroucke JP., Koster T., Briët E., Reitsma PH., Bertina RM., Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994;344:1453-1457
24. Pötzsch B., Kawamura H., Preissner KT., Schmidt M., Seelig C., Müller-Berghaus G. Acquired protein C dysfunction but not decreased activity of thrombomodulin is a possible marker of thrombophilia in patients with lupus anticoagulant. *J Lab Clin Med.* 1995;125:56-65.

25. Matsuuda J., Gotoh M., Gohchi K., Kawasugi K., Tsukamoto M., Saitoh N. Resistance to activated protein C activity of an anti- β_2 -glycoprotein I antibody in the presence of β_2 -glycoprotein I. *British Journal of Haematology*. 1995;90:204-206
26. Cesarman MG., Villazón S., Zuñiga J., Rosillo C., Vahedian M., Stopeck A., Granados J. Ausencia de mutación Leiden en el gen del FV en Mazatecos: un polimorfismo de importación reciente. XXXVI Jornada anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología 1996.
27. Rauch J., Tannenbaum M., Tannenbaum H., Ramelson H., Cullis FR., Tilcock CPS., Hope MJ., Janoff AS. Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid system. *J Biol Chem*. 1986;261:9672-9677
28. Roubey R. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: A new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* 1994;84:2854-2867
29. Ginsberg JS., Wells PS., Brill-Edwards P., Donovan D., Moffatt K., Johnston M., Stevens P., Hirsh J. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995;10:3685-3691
30. Galli M., Bevers EM. Inhibition of phospholipid-dependent coagulation reactions by "antiphospholipid antibodies": possible modes of action. *Lupus* 1994;3:223-228
31. Velkamp JJ., Kerkhoven P., Loeliger EA. Circulating anticoagulant in disseminated lupus erythematosus: propose mode of action. *Haemostasis*. 1974;2:253-259
32. Harris EN., Gharavi AE., Boey ML. Anticardiolipina antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;3:1211-1214
33. Cabral Ar., Cabiedes J., Alarcón-Segovia D., Sánchez-Guerrero J. Phospholipid specificity and requirement of β_2 -glycoprotein-I for reactivity of antibodies from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity*.
34. McNeil PH., Simpson RJ., Chesterman CN. Antiphospholipid antibodies are directed against complex antigen that include a lipid binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:4120-4124
35. Kandiah D., Krilis SA. β_2 -Glycoprotein I. *Lupus* 1994;3:207-212
36. Matsuura E., Igarashi Y., Fujimoto M., Ichikawa K., Koike T. Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*. 1990;336:177-178

37. Schousboe I. β_2 -glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985;66:1086-1091
38. Martinuzzo ME, Forastero RR, Carreras LA. Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *British Journal of Haematology*. 1995;89:397-402
39. Delezé M, Oriá CV, Alarcón-Segovia D. Occurrence of both hemolytic anemia and thrombocytopenic purpura (Evan's syndrome) in systemic lupus erythematosus. Relationship to anticardiolipin antibodies. *J Rheumatol*. 1988;15:612-615
40. Cabiedes J. Estudio inmunogenético de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y pacientes con LEG. Tesis de licenciatura UNAM 1989.
41. Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with Systemic Lupus Erythematosus. Associate more strongly with anti β_2 -Glycoprotein-I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995 ;22:1899-1906