



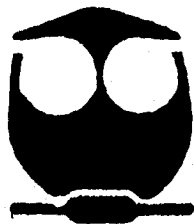
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANTITROMBINA III, PROTEINA-C
Y PROTEINA-S EN EL DIAGNOSTICO
DE ESTADOS PRETROMBOTICOS

TRABAJO ESCRITO VIA
EDUCACION CONTINUA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

Jesús Francisco Muñoz Contreras



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.,

1996



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).

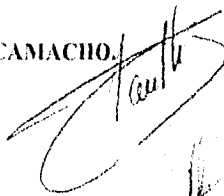
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. GUILLERMO GONZÁLEZ VARGAS.
VOCAL: Prof. RAÚL NIETO CAMACHO
SECRETARIO: Prof. LAURA PENICHE VILLALPANDO
1er. SUPLENTE: Prof. EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS
2do. SUPLENTE: Prof. ROSALINDA VELÁZQUEZ SALGADO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: BIBLIOTECAS DEL
SECTOR SALUD.**

ASESOR DEL TEMA: Q.B.P. RAÚL NIETO CAMACHO.



SUSTENTANTE: JESÚS FRANCISCO MUÑOZ CONTRERAS

INDICE

	PAG.
INTRODUCCIÓN	1
GENERALIDADES	2
I.- MECANISMOS DE CONTROL DE LA HEMOSTASIA	2
a.- ANTITROMBINA III	2
b.- SISTEMA PROTEÍNA -C Y PROTEÍNA-S	4
II.- TROMBOSIS	6
III.- FISIOPATOLOGÍA DE LA TROMBOSIS	8
IV.- CLASIFICACIÓN DE LOS DESORDENES TROMBOEMBÓLICOS	14
a.- ANTITROMBINA III	16
b.- PROTEÍNA -C	19
c.- PROTEÍNA -S	20
d.- RESISTENCIA A LA PROTEÍNA-C ACTIVADA	21
METODOLOGÍA	23
I.- DETERMINACIÓN DE ANTITROMBINA III	23
II.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA- C	25
III.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA- S FUNCIONAL	26
IV.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA -S TOTAL	28
V.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA -S LIBRE	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	42

INTRODUCCIÓN

La hemostasia es el conjunto de mecanismos y procesos que mantienen la integridad vascular y evitan las extravasaciones sanguíneas espontáneas, evitan las hemorragias y mantienen la sangre en circulación líquida y circunscriben el proceso de la coagulación estrictamente al área donde se produjo la lesión del endotelio vascular (1,2).

La hemostasia es un fenómeno complejo en el que participan varios sistemas para mantener o destruir el equilibrio, como son. 1.- la pared vascular, 2.- el sistema hemodinámico, 3.- el sistema de coagulación, 4.- el sistema plaquetario, 5.- el sistema fibrinolítico, 6.- el sistema de activadores e inhibidores, 7.- el sistema de bradiquininas-quininas, 8.- el sistema retículo endotelial, 9.- el sistema de endoperóxidos prostaglandínicos y 10.- el sistema de complemento. La alteración de uno solo de estos sistemas, dará lugar a la ruptura completa de este equilibrio y al desarrollo de hemorragia y/o trombosis (1).

La medicina ha avanzado notablemente en el control y erradicación de las diversas enfermedades que constituyen las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en el hombre. De esta manera se ha conseguido profundar la expectativa de la vida humana, pero la enfermedad vascular oclusiva trombótico-arteriosclerótica se ha convertido en una de las causas más importantes de mortalidad del adulto, y por su morbilidad, es la mayor limitante para que el hombre continúe su vida útil (2).

Muchos pacientes que desarrollaron una trombosis tienen desórdenes en su sistema de activadores e inhibidores de la coagulación sanguínea empujados a un estado de hipercoagulación. La actividad inhibitoria de la Antitrombina III, la Proteína C, y la Proteína S disminuye en estos casos y están muy asociadas con un alto riesgo de trombosis.

GENERALIDADES

I.- MECANISMOS DE CONTROL DE LA HEMOSTASIA

a.- ANTITROMBINA III

Las proenzimas involucradas en el proceso de la coagulación están presentes en grandes cantidades, las concentraciones mínimas de enzimas coagulantes activan grandes cantidades de sus substratos y una vez iniciado se autocataliza la coagulación. Este fenómeno conduce a la amplificación biológica de los procesos de coagulación, una respuesta de igual potencia es necesaria para limitar el coágulo y para neutralizar la actividad de procoagulantes que se encuentran en la circulación general. Estos mecanismos de control funcionan a tres niveles fisiológicos diferentes, localmente en el coágulo hemostático, en la circulación y en varios espacios celulares ubicados en el sistema reticuloendotelial, el hígado y el bazo (3,4).

Las sustancias que actúan como inhibidores de la coagulación *in vitro* se han demostrado en el plasma normal: La Antitrombina III, la Proteína C, y la Proteína S.

La Antitrombina III es una proteína del plasma que inactiva serina proteasas por medio de una reacción irreversible y es conocido como inhibidor progresivo. La Antitrombina III se ha purificado y separado de otras Antitrombinas. Es una alfa-2-glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 58,000 daltons. Consiste de una cadena simple de polipéptidos que carece de disulfuros y contiene 15 por ciento de carbohidratos. La síntesis de Antitrombina III está codificada por un gene en el cromosoma 1q23-q25. La Antitrombina III es producida en el hígado, y se encuentra en el plasma en concentraciones de 1.5 mg/ml al igual que en varios sitios extravasculares. La vida media biológica de una Antitrombina III ha sido determinada en conejos marcándola con un isótopo y se calcula que es aproximadamente de 24 horas.

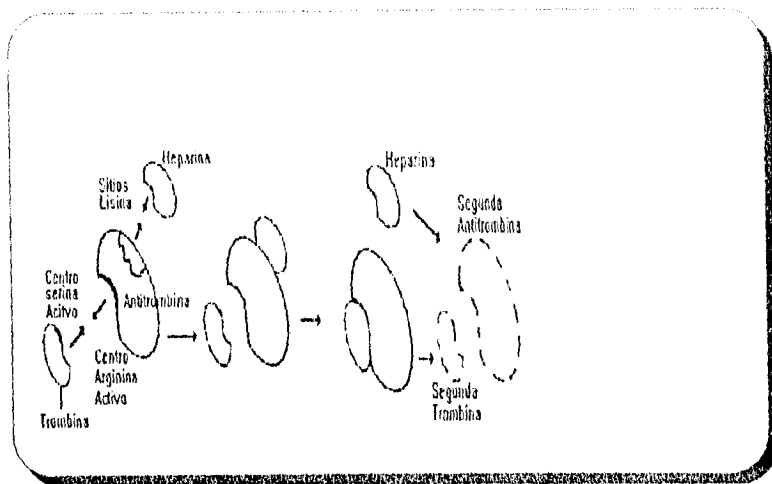


FIG. 1

La reacción entre Antitrombina III y trombina involucra el ataque de un residuo de arginina en la Antitrombina III para la activación del sitio serina de la trombina y se forma un complejo bímolecular que es eliminado rápidamente de la circulación por las células hepáticas. La unión de la heparina al residuo E-lisina en la Antitrombina III acelera la velocidad de formación de complejos enzima-inhibidor sin alterar la estequiometría de la reacción. Fig. 1 . El resultado es un incremento del potencial inhibidor de la Antitrombina III, posiblemente como resultado de un cambio conformacional de los sitios expuestos por la unión enzimática. La Antitrombina III es de esta manera el anticoagulante y la heparina es el cofactor (3,4).

La Antitrombina III tiene también una importante acción inhibidora sobre los factores XIIa, XIa, IXa, Xa y la plasmina.

La importancia de la Antitrombina III en la regulación de la coagulación sanguínea y la fibrinólisis, esta probada por la relación que se observa entre su ausencia o disminución y la aparición de fenómenos trombóticos venosos y arteriales.

b.- SISTEMA PROTEÍNA C- PROTEÍNA S

La Proteína C y sus cofactores e inhibidores fueron descritos en 1966 por Seeger et al. Esta enzima constituye un modulador importante de la coagulación en la interfase sangre-endotelio y tiene un papel poco conocido en la fibrinólisis. La deficiencia de Proteína C o Proteína S están asociadas con serias manifestaciones tromboembólicas.

El precursor de la Proteína C está compuesto por 2 cadenas de péptidos de distinta longitud unidas por un disulfuro simple. La Proteína C humana tiene un peso molecular de 62,000 daltons.

Su biosíntesis depende de vitamina K y su cadena larga de 155 aminoácidos, 21,000 daltons, contiene 10 residuos de ácido gama-carboxil-glutámico. El sitio activo es la serina y el sitio de desdoblamiento en la trombina está en la cadena pesada (260 aminoácidos, 41,000 daltons). La concentración de Proteína C en el plasma normal es de .002 a .006 mg/ml (3,4).

La Proteína S es una cadena simple de polipéptidos de peso molecular 71,000 daltons, que contiene 635 aminoácidos y residuos de 10 ácidos gama-carboxil-glutámico. La secuencia de aminoácidos del péptido N-terminal de la Proteína S es el mismo que del factor X, pero la molécula es diferente a una serina proteasa. La Proteína S es sintetizada en el hígado y está presente en el plasma en forma activa libre y en una forma inactiva unida a la fracción C4b del complemento. Las células endoteliales y los megacariocitos sintetizan pequeñas cantidades de Proteína S. Su concentración promedio es de .022 mg/ml, de los cuales la mitad está completamente unida a la fracción C4b del complemento. La Proteína S aparentemente está inactivada por conversión en una molécula de doble cadena (3,4).

Un cofactor proteínico de la Proteína C ha sido aislado de la superficie de la membrana de las células endoteliales. Esta sustancia es llamada trombomodulina, es un polipéptido de cadena simple con un peso molecular aproximado de 75,000 daltons. Esta forma rápidamente complejos 1:1 con trombina, un proceso que constituye un mecanismo altamente eficiente para remover trazas de trombina de la microcirculación. La trombomodulina también muestra una actividad anticoagulante dependiente de Antitrombina III.

La activación óptima de la Proteína C (fig. 2) requiere de iones calcio, trombina y 2 cofactores, la Proteína S del plasma y la trombomodulina del endotelio. La interacción de estos componentes es complicada y ocurre de una manera secuencial. El paso inicial involucra la formación de complejos entre trombomodulina y trombina. Esta reacción altera la especificidad del sustrato de trombina, de manera que ya no coagula el fibrinógeno o activa el factor V o a las plaquetas, un fenómeno que es antitrombótico. La Proteína C ataca al complejo por medio de puentes de calcio, esta acción está acoplada a la activación de Proteína C. La conversión de Proteína C en Proteína C activada y la exposición del sitio activo de serina es el resultado inmediato del desdoblamiento de un péptido N-terminal de la Proteína C por trombina, y resulta en un incremento de 20,000 veces su actividad. In vivo la activación de Proteína C puede ser demostrada en animales posterior a la infusión de trombosis.

La Proteína S es un cofactor necesario para la acción de Proteína C, esta participa en la formación de un complejo que contiene Proteína S, Proteína C activada, el sustrato susceptible (V o VIII) y un fosfolípido de superficie. El factor Va o su cadena ligera pueden también funcionar como cofactor débil de la activación de la Proteína C.

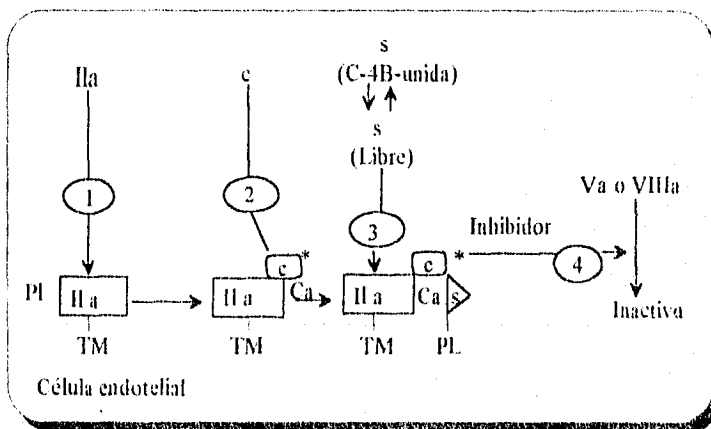


FIG. 2

La Proteína C activada es la enzima efectora de su sistema, degrada proteolíticamente las formas activas de los factores VIIIa y Va sin afectar las formas nativas de estos factores significativamente.

II.- TROMBOSIS

Es la formación de coágulo dentro de un vaso sanguíneo, llamado trombo. La trombosis es causada por el fracaso del mecanismo de la sangre para conservarla fluida. Tal desorden ocurre generalmente en venas en que el flujo de sangre es desacelerado, como por ejemplo en las venas varicosas de la pierna o en las venas de las piernas de una persona que esta postrada en cama por un largo tiempo. en algunos casos la trombosis esta asociada con infección bacteriana en el área afectada o en una inflamación real de la vena tal como en la tromboflebitis. La trombosis puede ocurrir también en arterias angostas a través de las cuales la sangre pasa con dificultad, pero la trombosis arterial es mucho mas rara que la venosa. (Esquema 1, 2) (2,15).

TROMBOSIS	LOCAL	(arterial o venoso)
	GENERALIZADA	(fragmentación metabólica, necrosis tisular, hemólisis)

ESQ. 1

EVENTOS TRÓMBOTICOS MÁS FRECUENTES
1.- TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA
2.- TROMBOSIS PULMONAR
3.- TROMBOSIS ARTERIAL
4.- TROMBOSIS DE ARTERIA CEREBRAL

ESQ. 2

La trombosis causa daño por obstrucción del flujo de sangre dentro y fuera de la parte irrigada por el vaso y como la fuente de fragmentos circulantes de coágulos o émbolos. Una embolia es particularmente peligrosa cuando afecta el pulmón y existe siempre el peligro de muerte súbita.

La trombosis es a menudo la razón de un derrame cerebral, aunque un derrame cerebral causado por trombosis es menos dramático y severo que uno causado por embolia o por hemorragia. Los derrames cerebrales debidos a trombosis tienen una mayor posibilidad de recuperación, pero generalmente persisten algunas incapacidades permanentes.

Un coágulo en una vena principal o en una extremidad produce hinchazón, por ejemplo, un coágulo en la vena principal de la pierna, profundamente en la pantorrilla superior, causara hinchazón del pie y del tobillo y probablemente de la mayor parte de la pierna por debajo de la obstrucción. La extensión del daño depende del área que la arteria irrigue y de si existen o no rutas de alternativa para la sangre. Si no existiese ruta de alternativa todas las células que componen la parte irrigada por el vaso morirán. El efecto es exactamente el mismo que el producido por la embolia o por un bloqueo completo y obliteración de las arterias por endurecimiento progresivo y angostamiento.

La trombosis es tratada con ciertos anticoagulantes, y en algunos casos se emplea cirugía para quitar los coágulos y ayudar a restaurar el flujo de sangre a las partes afectadas. Los anticoagulantes conjuntamente con terapia de masaje y ejercicio apropiado, han sido particularmente efectivos en pacientes con piernas hinchadas debidas a tromboflebitis, cuando la infección no es un cofactor complicante. En algunos casos de venas varicosas el trombo puede cambiarse a tejido fibroso o cicatrizante y el interior del vaso es obliterado. De esta manera se logra a veces una cura natural.

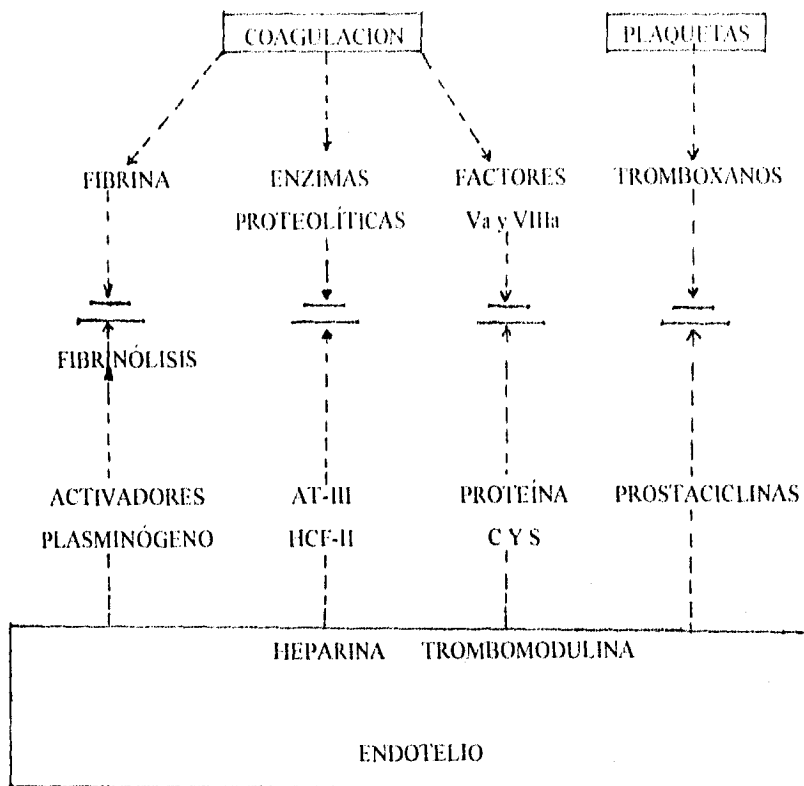
La trombosis coronaria es descrita como oclusión coronaria aguda o bloqueo de la arteria coronaria del corazón, al igual que en las trombosis venosas, es debida generalmente a una reducción de la velocidad de la circulación o a una alteración de las paredes de los vasos o de la sangre. Este proceso puede desarrollarse rápida o lentamente y la enfermedad coronaria puede ser benigna o severa, súbita y fatal. Si se desarrolla lentamente, el miocardio es privado gradualmente de su suministro de sangre y no puede funcionar eficientemente. Se manifiesta como angina pectoris, que se

caracteriza por dolor debajo del esternón producido por esfuerzos y aliviado por descanso.

Si la oclusión se presenta rápidamente, como en la oclusión coronaria aguda, pueden ocurrir dos eventos. Puede resultar en muerte súbita si el bloqueo incluye una arteria mayor u ocurre en el miocardio dañado anteriormente. Si una rama mas pequeña de la arteria coronaria es obstruida las posibilidades de que la persona se recupere son buenas. La trombosis coronaria se presenta en una arteria coronaria que se ha vuelto engrosada y endurecida o esclerosada, es mayormente una enfermedad de la edad madura, siendo relativamente rara en individuos menores de 40 años, y es más común en hombres que en mujeres. Se ha encontrado mas frecuentemente entre trabajadores profesionales que entre trabajadores manuales. En muchos casos las víctimas son gente activa y que trabaja en estado de grandes tensiones. La tensión mental y emocional pueden preceder los ataques y las personas con angina pectoris, alta presión arterial, arteriosclerosis, nefritis o sífilis están particularmente predispuestos a sufrir de trombosis coronaria (26).

III.- FISIOPATOLOGÍA DE LA TROMBOSIS

El sistema hemostático esta intrinsecamente autopropagado y tiene el potencial para obstruir el sistema vascular como una ampliación de su acción fisiológica. Los procesos reguladores actúan para balancear el fenómeno hemostático y la trombosis puede desarrollarse cuando el balance dinámico entre procesos protrombóticos y antitrombóticos se altera Esq. 3. Aunque este concepto incluye varias formas de trombosis asociada con anomalías hematológicas definidas, muchos aspectos de los procesos son desconocidos, y la trombosis puede desarrollarse en la ausencia de anomalías bien definidas de la coagulación sanguínea o plaquetas.



ESQ. 3

Las anomalías de la pared de los vasos, las alteraciones de la circulación sanguínea y los cambios en la composición de la sangre son los principales factores bien reconocidos en la fisiopatología de la trombosis. Los aspectos hematológicos de la trombosis son considerados aquí en términos de estos tres factores, los cuales usualmente son conocidos como la triada de Virchow (2,3,4).

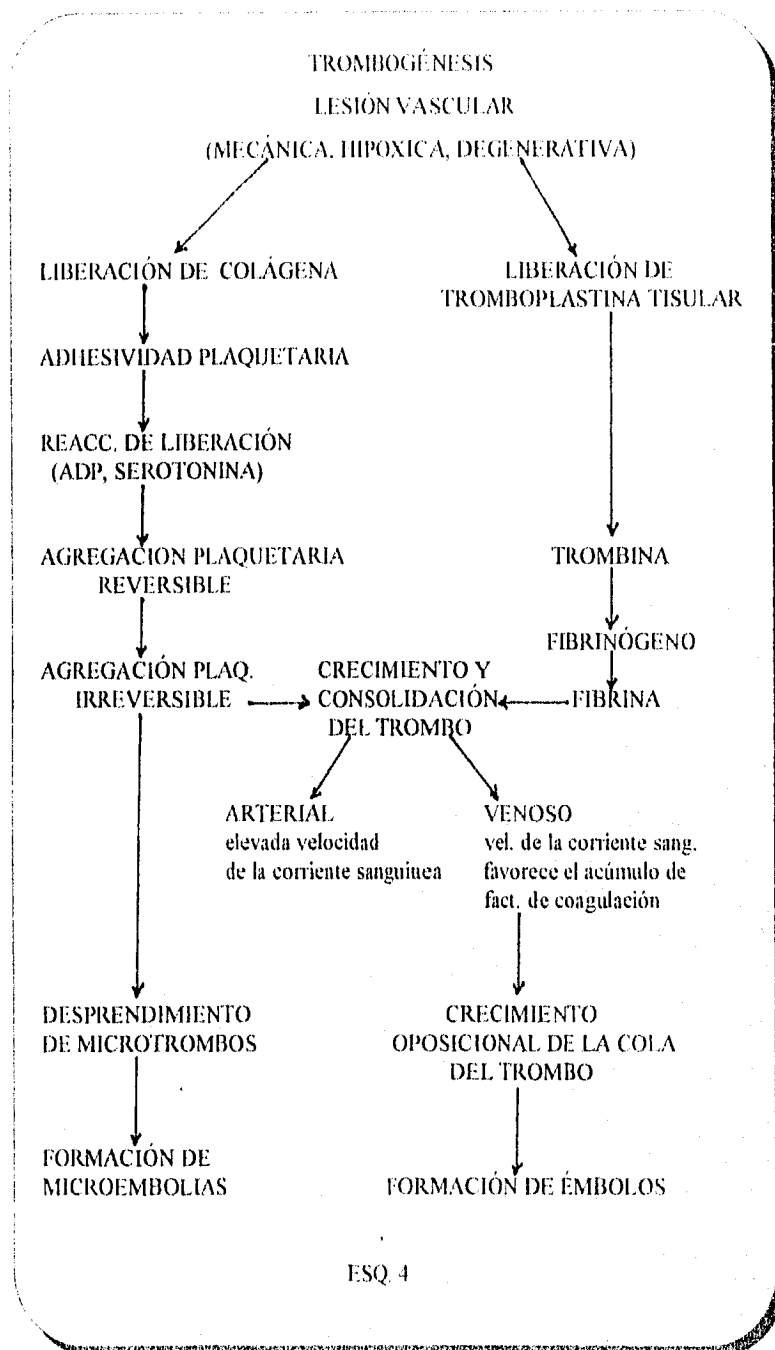
Alteración vascular.- La trombosis arterial frecuentemente es el resultado de un proceso que daña la pared de los vasos. Esto comúnmente posterior a la formación de un acúmulo de plaquetas y fibrina en la superficie vascular. Este proceso es iniciado por ADP o mediadores químicos similares que son liberados por los vasos dañados, o puede ser resultado de la exposición de las fibras de colágeno u otras estructuras subendoteliales

en la pared de los vasos. Ambos eventos inician el proceso de adhesión plaquetaria, agregación y formación del trombo, así como en la formación de un tapon hemostático. La reacción de liberación y la síntesis de tromboxano por las plaquetas y otros agonistas inducen la agregación de más plaquetas y aumento de los trombos. Una reducción generalizada en el tono de las venas puede ser un factor fisiopatológico importante en la trombosis venosa de las mujeres embarazadas y en las que toman anticonceptivos orales.

Alteración en el flujo sanguíneo.- La trombosis arterial ocurre bajo condiciones de rápido flujo sanguíneo, y el trombo arterial presumiblemente no es oclusivo por un tiempo. Estos usualmente están compuestos de masas compactas de plaquetas, las cuales contienen pequeñas cantidades de fibrina y unos cuantos eritrocitos y leucocitos, estos trombos son el clásico trombo blanco. Como el trombo arterial aumenta, progresivamente por el depósito de nuevas placas de plaquetas y fibrina la obstrucción parcial o completa del fluido sanguíneo puede producir una cola de trombos roja.

La hipertensión, flujo sanguíneo turbulento y la hiperviscosidad son factores que contribuyen en ciertas formas de trombosis arterial, la consecuencia más seria de trombosis arterial es la oclusión vascular.

La trombosis venosa se desarrolla bajo condiciones de flujo sanguíneo lento y está aumentada por un mayor retardo y estancamiento del fluido. El trombo venoso está compuesto de grandes cantidades de fibrina conteniendo numerosos eritrocitos. En esta masa floja, fácil de desprender, las plaquetas y los leucocitos están conformados al azar, el trombo usualmente produce obstrucción del fluido sanguíneo y su más seria consecuencia es la embolia. Esq. 4.



Alteración en los componentes de la sangre.- Se conoce desde hace más de cien años que la sangre de pacientes con trombosis activa con varios desordenes asociados con una diátesis tromboembólica pueden coagular a una velocidad anormalmente rápida *in vitro*. Las plaquetas pueden ser hiperactivas en los mismos desordenes, y ciertas anomalías del fenómeno regulatorio hemostático y la fibrinólisis pueden estar asociadas. Los cambios pretrombóticos pueden detectarse en la sangre y estos cambios son patogenéticamente importantes para el desarrollo de trombosis.

Las anomalías de la hemostasia pueden causar hemorragia y/o trombosis. La causa de 90% de aproximadamente 500,000 ataques que ocurren anualmente en los Estados Unidos son isquémicos, anomalías de la hemostasia que predisponen a eventos trombóticos. Estas alteraciones específicas de la coagulación incluyen incremento de la activación plaquetaria (cuenta de plaquetas aumentada), incremento en la formación de trombina (acortamiento de las pruebas de coagulación), elevadas concentraciones en el plasma de los factores V, VII y VIII.

El aumento de uno o varios factores de la coagulación tienen acción trombogénica. El fibrinógeno y los factores V y VIII son reactivos de fase aguda y sus niveles en el plasma pueden ser riesgo de pacientes con algunos desordenes asociados con daño tisular o inflamación, incluyendo la mayoría de los procesos trombóticos. La disminución de los inhibidores naturales de la coagulación AT III, PC y PS, predisponen al organismo principalmente a trombosis venosa. La actividad fibrinolítica se ha encontrado disminuida en diversas situaciones trombogénicas. Niveles bajos de plasminógeno se encuentran en el recién nacido y aún más bajos en el prematuro, esta disminución fibrinolítica desarrolla una tendencia trombótica.

Generalmente los pacientes con problemas trombóticos se presentan en atención médica cuando ocurre un evento de alarma o cuando se someten a un procedimiento quirúrgico, involucrando principalmente al sistema venoso, como la tromboflebitis de venas profundas de la pierna, del brazo y menos común la embolia pulmonar. Existen otros factores que indican trombosis (Esq. 5).

POSIBLES INDICADORES CLINICOS DE TROMBOSIS

HISTORIA FAMILIAR DE TROMBOSIS
 TROMBOSIS ESPONTÁNEA RECURRENTE
 TROMBOSIS EN SITIOS INUSUALES
 TROMBOSIS A UNA EDAD JOVEN
 RESISTENCIA A LA TERAPIA ANTICOAGULANTE
 SINDROME DE NECROSIS CON CUMARINA
 ABORTO ESPONTÁNEO RECURRENTE
 TROMBOSIS DURANTE LA TROMBOSIS
 TROMBOFLEBITIS SUPERFICIAL MIGRATORIA

ESQ. 5

La trombosis produce alteraciones fisiopatológicas muy importantes en un organismo, como describimos anteriormente los niveles plasmáticos de cada uno de los parámetros involucrados se alteran condicionando al organismo a un estado de hipercoagulabilidad y la trombosis en sí tiene una acción limitante y además cobra un gran número de muertes al año, principalmente en países desarrollados (15).

Factores genéticos y adquiridos que predisponen a la trombosis.- Esq. 6.

GENETICOS

-DEFICIENCIA DE AT III
 -DEFICIENCIA DE HEPARINA
 -DEFICIENCIA DE PROTEÍNA C
 -DEFICIENCIA DE PROTEÍNA S
 -RESISTENCIA A LA PROTEÍNA Ca
 -DISFIBRINOGENEMIAS
 -DEFICIENCIA DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO
 -EXCESO DE INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO

ADQUIRIDOS

- ANORMALIDADES DEL ENDOTELIO VASCULAR
ARTERIOESCLEROSIS, DIABETES MELLITUS, VASCULITIS
SUPERFICIES ARTIFICIALES, HOMOCISTINEMIA.
- ANORMALIDADES DEL FLUÍDO SANGUÍNEO
ESTASIS, HIPERVISCOCIDAD.
- ANORMALIDADES DE LAS PLAQUETAS
DESORDENES MIELOPROLIFERATIVOS, TROMBOCITOSIS,
DIABETES MELLITUS, HIPERLIPIDEMIA, HPN.
- ANORMALIDADES DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINOLÍTICAS.
MALIGNIDAD, ANTICONCEPTIVOS ORALES, INFUSIÓN DE
CONCENTRADOS DE FACTORES DE LA COAGULACIÓN
DEPENDIENTES DE VITAMINA K, SINDROME NEFROTICO,
TRAUMA, CIRUGÍA.
- OTRAS ANORMALIDADES COMBINADAS.
EMBARAZO, HEPARINA QUE INDUCE TROMBOCITOPENIA Y
TROMBOSIS, SINDROME INHIBIDOR DE LUPUS, PÚRPURA
TROMBOCITOPENICA TROMBÓTICA, SINDROME UREMICO
HEMOLÍTICO, CID.

ESQ. 6

IV.- CLASIFICACIÓN DE LOS DESORDENES TROMBOEMBÓLICOS

Los desordenes tromboembólicos hereditarios se han definido como estados de hipercoagulación primaria que involucren anomalías sanguíneas específicas, como las proteínas antitrombóticas del plasma o moléculas fibrinolíticas. Los desordenes agudos y crónicos, a menudo se relacionan a estados prepatológicos muy conocidos, factores de riesgo. Esq. 7. (2,3,4,15).

FACTOR DE RIESGO PARA TROMBOSIS ARTERIAL Y VENOSA**- ENFERMEDAD VENOSA**

OBESIDAD, ANTICONCEPTIVOS ORALES, VENAS VARICOSAS, INFECCIÓN, TRAUMA, CIRUGÍA, ANESTESIA GENERAL, EMBARAZO, MALIGNIDAD, INMOVILIDAD, FALLA CARDIACA, SINDROME NEFROTICO, DEFECTOS DE PROTEÍNAS PLASMATICAS.

- ENFERMEDAD ARTERIAL

ARTERIOESCLEROSIS, SEXO MASCULINO, TABAQUISMO, HIPERTENSIÓN, DIABETES MELLITUS, COLESTEROL (LDL), TRIGLICÉRIDOS, HISTORIA FAMILIAR, POLICITEMIA, HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA, ANTICONCEPTIVOS ORALES Y ESTRÓGENOS, LIPOPROTEÍNA A, DEFECTOS DE PROTEÍNAS PLASMATICAS.

ESQ. 7

La etiología de los desordenes trombóticos adquiridos a menudo son multifactoriales, su fisiopatología es mal entendida, y las anomalías específicas de importancia etiológica son rara vez demostradas por estudios de laboratorio, estos son llamados estados de hipercoagulación secundaria, para su diagnóstico se recurre a exámenes de gabinete.

Esq. 8. (1).

ESTUDIOS DE GABINETE PARA EL DIAGNÓSTICO DE TROMBOSIS

- ULTRASONOGRAFÍA POR EFECTO DOPPLER
- PLETISMOGRAFÍA POR IMPEDANCIA
- TERMOGRAFÍA
- FLEBOGRAFÍA
- FIBRINÓGENO MARCADO CON RADIONÚCLIDOS
- VENOGAMMAGRAFÍA DINÁMICA Y ESTÁTICA
- RADIOANGIOGRAFÍA SIMPLE DE TÓRAX
- ELECTROCARDIOGRAMA
- CENTELLEOGRAFÍA PULMONAR PERFUSORIA

ESQ. 8

En el estudio de las trombosis se ha identificado disminución de la actividad inhibitoria de la Antitrombina III, de la Proteína C, Proteína S y resistencia a la Proteína C activada. Si bien las deficiencias en la síntesis de estas proteínas estan lo suficientemente estudiadas, presentan también la disfunción proteica, en las primeras se presenta el defecto por disminución o ausencia de síntesis, en las segundas el defecto es funcional, en esta la producida esta bien representada en cantidad pero no en cuanto a la secuencia de aminoácidos.

a.- ANTTROMBINA III

La primera deficiencia reconocida de Antitrombina III por Egeberg en 1965 es un desorden relativamente común que es heredado como una característica autosómica dominante, la mayoría de los pacientes son heterocigotos quienes en el plasma tienen presente la molécula de Antitrombina III normal y la de Antitrombina III anormal. También existen homocigotos en pacientes consanguíneos.

El inmunoensayo de Antitrombina III produce valores que son proporcionales a los ensayos funcionales en la mayoría de los pacientes con deficiencia de Antitrombina III, pero en formas variantes del desorden, los niveles en plasma del antígeno de Antitrombina III son normales pero funcionalmente la actividad está disminuida.

Un producto de la degradación de la protrombina en el fragmento 1.2, las concentraciones en plasma del fragmento 1.2 de activación de protrombina está elevada significativamente en pacientes con deficiencia de Antitrombina III, una observación sugiere activación de la coagulación in vivo. Este incremento aparentemente desarrollado es el resultado de la neutralización deficiente de trazas de factor Xa o trombina. Las mediciones de la proporción de producción del fragmento 1.2 puede auxiliar en la identificación de niños con deficiencia de Antitrombina III antes de que aparezcan síntomas.

La deficiencia de Antitrombina III se manifiesta por trombosis recurrente involucrando principalmente el sistema venoso. La trombosis de las venas de la pierna son comunes, y al mismo tiempo ocurre embolia pulmonar durante el curso de los desordenes en la mayoría de los pacientes afectados. Las manifestaciones trombóticas inusuales tales como oclusión mesentérica venosa y la trombosis de venas del brazo también se han reportado.

Las trombosis son poco frecuentes en niños, en mujeres estas se desarrollan durante el embarazo o después del uso de anticonceptivos orales. En hombres, las heridas o un procedimiento quirúrgico frecuentemente inician la trombosis, la cual entonces se vuelve recurrente y a menudo intratable en muchos pacientes. En otros, son característicos largos periodos asintomáticos, a pesar de la evidencia en el laboratorio de alto grado de hipercoagulabilidad.

Las pruebas de coagulación usuales producen resultados normales en pacientes con deficiencia de Antitrombina III, aunque los niveles de productos de degradación de fibrina (PDF) pueden estar aumentados significativamente. Los métodos de ensayo para Antitrombina III funcional implican la determinación del índice de neutralización para plasma del paciente, o trombina, o factor X y el incremento de su efecto con heparina.

Las manifestaciones trombóticas en pacientes con deficiencia de Antitrombina III responden pobremente a la heparina. Los anticoagulantes cumarínicos son el apoyo del

tratamiento y debido a la tendencia de que vuelva a ocurrir una trombosis su administración debe ser por largos períodos en la mayoría de los pacientes. Los concentrados de Antitrombina III están disponibles y al parecer son efectivos en el tratamiento de varias manifestaciones de la trombosis. El nivel terapéutico de la Antitrombina III es aproximadamente del 70 % del valor normal, evaluado por las mediciones de la producción del fragmento 1.2 en pacientes afectados. En mujeres embarazadas, las infusiones de Antitrombina III junto con heparina han prevenido de trombosis durante la gestación. Pero existen muchos trabajos para intentar probar la eficacia de los concentrados de Antitrombina III. Sin embargo, a pesar de 15 años de experiencia con los concentrados, la evaluación de su utilidad clínica es difícil ya que la mayoría de los reportes refieren el tratamiento de pacientes individuales o pequeños grupos de pacientes.

En el tiempo en que se han utilizado los concentrados de Antitrombina III diferentes conceptos de tratamiento han sido aplicados.

- * Administración de Antitrombina III solo una dosis para alcanzar y mantener los niveles normales para prevenir o tratar la trombosis o la coagulación intravascular diseminada (CID).
- * Administración de Antitrombina III a pacientes que requieren heparina para alcanzar y mantener los niveles normales y para vencer la resistencia a la heparina.
- * Administración de muy altas dosis de Antitrombina III para alcanzar y mantener los niveles sobre lo normal para protección de los pacientes contra fuertes estímulos trombogénicos (septicemia).

La necesidad de tratamiento con éxito a menudo está basado en mejoras en los resultados de laboratorio, pero no en un beneficio clínico relevante para el paciente.

De ligeras a moderadas deficiencias de la Antitrombina III se han demostrado en mujeres que toman anticonceptivos orales, en pacientes con diferentes tipos de trombosis, enfermedad hepática, eclampsia, obesidad masiva, enfermedad renal crónica y en niños prematuros (2,3,4,15).

b.- PROTEÍNA C

La Proteína C es un componente proteico del plasma que proteolíticamente inactiva los factores Va y VIII y aumenta la fibrinólisis en la interfase endotelio-plasma.

La deficiencia heredada de Proteína C fue descrita por primera vez por Griffin en 1981 y esta asociada con una diátesis tromboembólica de por vida.

La deficiencia de Proteína C es heredada como una característica autosómica dominante de dos tipos distintos, tipo I, en la cual la Proteína C es identificable inmunológicamente y la Proteína C funcional esta disminuida proporcionalmente, y el tipo II, en la cual están presentes cantidades normales del antígeno de Proteína C, pero la molécula esta defectuosa y no es funcional. La mayoría de los casos reportados son heterocigotos de los desordenes tipo I, los cuales se manifiestan por niveles de Proteína C aproximadamente de 50% de lo normal. Los homocigotos y doble heterocigotos tienen enfermedad trombótica aguda y poca o no detectable Proteína C en el plasma.

Los síntomas de deficiencia de Proteína C se parecen a los de la deficiencia de Antitrombina III. Así, la trombosis es rara en niños, y en mujeres, y en estas puede desarrollarse en asociación con el embarazo. La deficiencia de Proteína C usualmente se manifiesta por trombosis venosa, pero unos cuantos casos de trombosis arterial se han reportado. La tromboflebitis de venas profundas de la pierna y la tromboflebitis superficial son las manifestaciones más comunes, la embolia pulmonar no es común. Los niveles en plasma de Proteína C abajo de 65% de lo normal están asociadas con riesgo de complicaciones trombóticas. Muchos pacientes con niveles de Proteína C por debajo de 50% de lo normal están no obstante asintomáticos.

Lo grave es que las formas homocigotas de los desordenes están asociadas con una diátesis tromboembólica aguda devastante en la infancia. Las trombosis de venas renales, venas mesentéricas y las venas duras de los senos son comunes. El cuadro clínico a menudo se complica con una forma de púrpura fulminante neonatal y generalizada.

La Proteína C es una proteína dependiente de vitamina K y su síntesis varía dependiendo de numerosos factores adquiridos, por ejemplo, la dieta, función hepática, ingestión de drogas y particularmente, la administración de anticoagulantes cumarínicos.

Se han desarrollado varias pruebas exactas de Proteína C funcional, incluyendo métodos fotocromogénicos y técnicas totalmente automatizadas, incluyendo técnicas inmunológicas, método de ELISA y anticuerpos monoclonales que proporcionan mediciones precisas del antígeno de Proteína C.

Las lesiones trombóticas que se desarrollan en pacientes con deficiencia de Proteína C son tratadas con heparina, incluyendo preparaciones de bajo peso molecular, que usualmente es más efectiva. La prevención de trombosis recurrente durante largos períodos es más difícil. El uso de anticoagulantes cumarínicos ha tenido éxito terapéuticamente, aunque estas drogas reducen los niveles de Proteína C, el único riesgo es que se ha encontrado necrosis por cumarina a los pocos días de iniciado el tratamiento. Los andrógenos aumentan los niveles de Proteína C de manera importante y han sido efectivos en algunos casos. La terapia de reemplazo con un concentrado de Proteína C-S ha sido efectiva (2,3,4,15).

c.- PROTEÍNA S

La Proteína S es una proteína polipeptídica que normalmente está presente en el plasma y en los gránulos alfa de las plaquetas, su función es como un cofactor de la acción de la Proteína C, la deficiencia de Proteína S es heredada como una característica autosómica dominante y está asociada con una diátesis tromboembólica de por vida.

La Proteína S existe en el plasma en forma libre que está en equilibrio con una forma no funcional unida al componente C4b del complemento.

La trombosis está asociada con reducción de la Proteína S en forma libre o funcional y los ensayos de estas formas son así requeridos para el diagnóstico o las mediciones de C4b, antígeno total de Proteína S y complejos de C4b-Proteína S que proporcionan información adicional. Los resultados de todas las mediciones son afectados importantemente por las drogas cumarínicas. Las pruebas de coagulación tradicionales producen resultados normales.

El más común de los desordenes se manifiesta moderadamente con una reducción total del antígeno de Proteína S, o a la vez con deficiencia de Proteína S funcional y antígeno de Proteína S libre. En una variante, la deficiencia de dos moléculas de Proteína S diferentes se reportó, una de las cuales anormalmente pequeña pero funcionalmente normal y una segunda variante fue asociada con deficiencia severa de ambas formas de Proteína S la unida y la libre.

Los cambios en el equilibrio de Proteína S libre y unida se han descrito en neonatos, como el resultado de niveles bajos de C4b y en algunos familiares con deficiencia de Proteína S.

Las manifestaciones clínicas de deficiencia de Proteína S son idénticas a las de la deficiencia de Proteína C. El tratamiento con heparina para procesos trombóticos agudos es el elegido, manteniendo la administración de drogas cumarínicas para la prevención de trombosis recurrente.

Estas dos proteínas son dependientes de vitamina K, los niveles sanguíneos están disminuidos en algunos desordenes con deficiencia de vitamina K, enfermedad del hígado y ante la administración de drogas cumarínicas. Los niveles de Proteína C se incrementan y los de Proteína S disminuyen durante el embarazo normal, los cambios se incrementan en mujeres con preclamsia y en las que toman anticonceptivos orales. Las deficiencias de Proteína C y Proteína S han sido reportadas en asociación con coagulación intravascular diseminada (CID) y en enfermedad renal crónica. La deficiencia de Proteína S y la necrosis cumarínica fueron asociadas con un inhibidor de lupus en un caso, con lo que las anomalías de Proteína S pueden ser importantes en las trombosis de pacientes con lupus (2,3,4,15).

d.- RESISTENCIA A LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA C ACTIVADA

Los avances en el entendimiento de los estados de hipercoagulabilidad se han sucedido uno tras otro, ya que recientemente se han encontrado niveles normales tanto antigénica como funcional de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S, en pacientes con trombofilia, pero que presentan resistencia del factor Va a la proteína C activada.

Hasta hace poco los estudios de laboratorio en pacientes con trombofilia familiar permitían esclarecer la causa sólo en el 5% de los casos, en los que se identifican deficiencias de Proteína C, Proteína S y Antitrombina III. La reciente identificación de la resistencia a la Proteína C activada ha modificado el criterio con respecto a estas anomalías.

En 1993 Dahlbäck y col describieron un paciente trombofílico en el que la Proteína C_a era incapaz de prolongar *in vitro* el valor de su tiempo de tromboplastina parcial activado, es decir, su plasma era resistente a la acción de la Proteína C_a. Este trastorno se encontró en otros miembros de la familia y en otros pacientes trombofílicos no relacionados con este paciente.

El 50% de los pacientes con trombofilia familiar tienen un defecto en el factor V que involucra la mutación de Arg 506 por Gln 506 que es la causa más frecuente de r-PCa. Este es el sitio en el cual la PCa se une al factor Va, y esta alteración en la secuencia de aminoácidos hace a la molécula de factor Va bioquímicamente resistente a la inactivación por PCa.

La mutación genética del gen del Factor V, es identificable por medio de biología molecular empleando reacción en cadena de la polimerasa, en tanto que la anomalía de la prueba *in vitro*, que mide el alargamiento del TTPa en presencia de PCa, corresponde al fenotipo de la r-PCa. Este estudio junto con las investigaciones de las actividades antigénicas y funcionales de las PC, PS y AT III, permiten esclarecer la causa de la trombofilia familiar en 60 a 70 % de los casos (3,4,25).

METODOLOGÍA

1.- DETERMINACIÓN DE ANTITROMBINA III

Ensayo colorimétrico para la determinación cuantitativa de Antitrombina III por el método del sustrato cromogénico sintético (5).

Fundamento.-

La Antitrombina III tiene una fuerte y rápida actividad antitrombínica en la presencia de heparina. Los análisis sugieren efectuarla en 2 pasos.

1.- Incubación del plasma con un exceso conocido de trombina, en la presencia de heparina.

2.- La cantidad residual de trombina es determinada por su actividad anidrolítica en el sustrato cromogénico sintético (pNA libre medido a una Abs de 405 nm). La cantidad de trombina que fue neutralizada en el primer paso de la reacción es proporcional a la cantidad de Antitrombina III presente en la muestra problema. Así, la cantidad residual de trombina (medida por la pNA libre) es inversamente proporcional a la cantidad de Antitrombina III de la muestra problema.

Prueba.-

Preparar las muestras de los pacientes y controles a una dilución 1:40 usando amortiguador de pH 8.7, I=0.30, y 3 UI de heparina.

En un tubo de ensayo a 37°C se realiza la prueba adicionar:

- Muestra problema (estándar o pacientes)----- 200 ul
- Incubar -----2-4 min
- Trombina (28nKat)----- 200 ul
- Mezclar e incubar (exactamente)----- 1 min
- Sustrato cromogénico (paranitroanilina 1.Sumol)---200 ul
- Mezclar e incubar (exactamente)----- 30 seg
- Ácido acético glacial (diluido 1:2)----- 200 ul
- Mezclar; adicionar agua----- 200 ul

· Mezclar

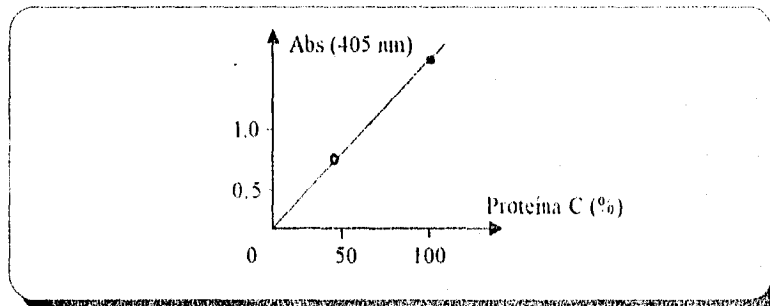
El color remanente es estable por varias horas.

Transferir a una semi-microcubeta 1 ml y leer a una D.O. de 405 nm contra un blanco obtenido de la siguiente manera.

- Ácido acético glacial (diluído 1:2)----- 200 ul
- Muestra problema (estándar o pacientes)----- 200 ul
- Trombina (28 nKat)----- 200 ul
- Mezclar
- Sustrato cromogénico(PNA 1.8umol)----- 200 ul
- Agua destilada

Calibración.-

Con un pool de plasmas humanos normales colectados de la misma manera que el plasma problema en citrato trisódico como anticoagulante, se preparan los estándares



de la siguiente forma.

Usar el amortiguador para preparar en tubos de ensayo diluciones 1:40 y 1:80 del pool de plasmas normal.

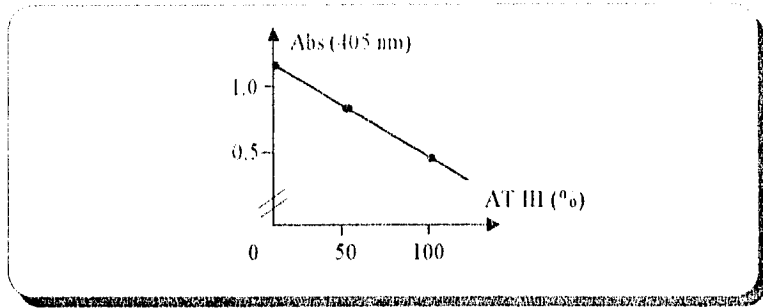
-la dilución 1:40 corresponde al punto de 100 % de AT III

-la dilución 1:80 corresponde al punto de 50 % de AT III

-el amortiguador usado corresponde al punto de 0 % de AT III.

Elaborar una gráfica con estos puntos de calibración y extrapolar los valores de Abs de las muestras problema para obtener el porcentaje de Antitrombina III, colocar en las ordenadas la Abs y en las abscisas el % de AT III.

Los valores esperados son entre 80 % - 120 % de AT III.



II.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA C

Ensayo colorimétrico para la determinación de Proteína C.

Fundamento.-

La Proteína C esta activada por el activador específico derivado del veneno de Agkistrodon c. contortrix (Reactivo 1). La cantidad de enzima de esta manera formada es medida por su actividad amidasica sobre el sustrato cromogénico sintético, paranitroanilina (Reactivo 2) y se lee a 405 nm. (5)

Prueba.-

Preparar las muestras de las pacientes y controles colectada en 9 vol sangre + 1 vol de anticoagulante citrato trisódico al 3.2 %.

En un tubo de ensayo de plástico a 37°C adicionar:

- Plasma (estándar o pacientes)----- 50 ul
- Reactivo 1 (ext. de veneno purificado)----- 200 ul
- Mezclar e incubar exactamente ----- 5 min
- Reactivo 2 (pNA 9.3 umol)----- -500 ul
- Mezclar e incubar exactamente ----- 5 min
- Ácido acético (al 50%)----- 200 ul
- Mezclar

Transferir a una semi-micro cubeta 1 ml y leer a una D.O. de 405 nm contra un blanco obtenido de la siguiente manera:

- Ácido acético(al 50%)----- 200 ul
- Reactivo 1 ----- 200 ul

- Mezclar
- Reactivo 2 ----- 500 ul
- Mezclar
- Plasma (estándar o pacientes) ----- 50 ul
- Mezclar

Como la mezcla ensayada contiene una muy alta proporción de plasma, es necesario que cada muestra sea medida contra su blanco.

Calibración.-

Con un pool de plasmas humanos normales colectados de la misma manera que los plasmas en estudio, en citrato trisódico como anticoagulante, se preparan los estándares de la siguiente forma.

Usar solución salina isotónica para preparar una dilución 1:2 del pool de plasmas normales.

- el plasma sin diluir corresponde al punto de 100 % de actividad de Proteína C
- la dilución 1:2 corresponde al punto de 50 % de actividad de Proteína C
- la solución salina isotónica usada corresponde al punto de 0 % de actividad de Proteína C
- los plasmas de los pacientes y de los controles son usados sin diluir.

Elaborar una gráfica con estos puntos de calibración y extrapolar los valores de Abs de las muestras problema para obtener el porcentaje de actividad de la Proteína C, en las ordenadas colocar la Abs y en las abscisas el % de PC.

Los valores esperados están entre 70 % y 140 % de actividad de la Proteína C.

III.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA S FUNCIONAL

Determinación cuantitativa de la Proteína S funcional basada en la inhibición del factor Va.

Fundamento.-

El principio de la prueba esta basado en la actividad de la Proteína S que actúa como cofactor e incrementa la acción anticoagulante de la Proteína C activada. Este

incremento se refleja por la prolongación del tiempo de coagulación de un sistema enriquecido con factor Va el cual es un sustrato fisiológico de la Proteína C activada.

Prueba.-

Colectar en anticoagulante de citrato trisódico al 3.2 % 1 vol + 9 vol sangre.

Se recomienda que todas las pruebas (muestras de pacientes y estándar) se realicen en una sola serie de pruebas. Cuando esto no es posible, el ensayo de muestras debe ser inmediatamente después de la prueba de calibración y realizarla en las mismas condiciones (secuencia de pipeteo, tiempos de incubación, mezclar después de la adición de reactivos, etc.).

En un tubo de ensayo de plástico a 37°C adicionar:

- Muestra prueba (estándar o pacientes)----- 0.1 ml
- Reactivo 1 (plasma deficiente en Proteína S)----- 0.1 ml
- Reactivo 2 (proteína C activa) ----- 0.1 ml
- Reactivo 3 (factor V activado) ----- 0.1 ml
- Mezclar e incubar a 37°C exactamente ----- 120 seg
- Cronometrar, al adicionar CaCl₂ 0.025 M precalentado a 37°C ----- 0.1 ml
- Mezclar y anotar el tiempo de coagulación.

Calibración.-

Usar un pool de plasmas humanos normales colectado en citrato trisódico como anticoagulante al 3.2 %.

para la preparación de estándares, de siguiente la siguiente forma:

Con amortiguador preparar en tubos de ensayo diluciones 1:10, 3:40, 1:20 y 1:40 del pool de plasmas normales.

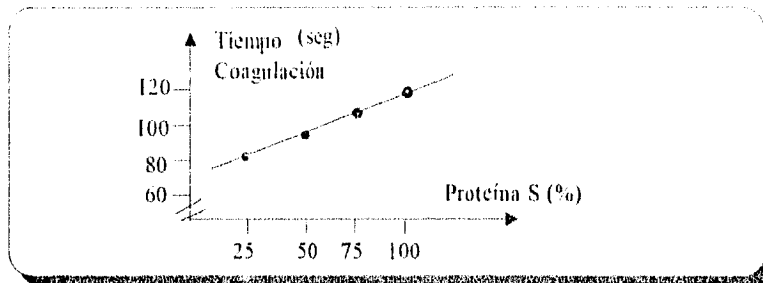
- la dilución 1:10 corresponde al punto de 100 % de Proteína S
- la dilución 3:40 corresponde al punto de 75 % de Proteína S
- la dilución 1:20 corresponde al punto de 50 % de Proteína S
- la dilución 1:40 corresponde al punto de 25 % de Proteína S

La preparación de las muestras problema y los controles se hace con amortiguador a una dilución 1:10, para su uso.

Elaborar una gráfica con estos puntos de calibración y extrapolar el tiempo de coagulación obtenido para cada uno de los problemas, para obtener el porcentaje de

actividad de la Proteína S, en las ordenadas colocar el tiempo de coagulación y en las abscisas el % de PS.

Los valores esperados están entre 65 % y 140 % de actividad de la Proteína S.



IV.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA S TOTAL

Inmunoensayo para la determinación de Proteína S mediado por partículas de microlátex. (5)

Determinación cuantitativa de la concentración de Proteína S total por la medición de absorbancia de luz producida por una suspensión de partículas de microlátex cubiertas con un anticuerpo específico.

Fundamento.-

Cuando un rayo de luz monocromático atraviesa una suspensión de partículas de microlátex las cuales han sido cubiertas con anticuerpos específicos por enlaces covalentes, y si la longitud de la luz es mucho más grande que el diámetro de las partículas de látex, esta puede pasar a través de la suspensión de látex no absorbida. Sin embargo, en la presencia del antígeno problema, las partículas de látex cubiertas de anticuerpo aglutinan para formar agregados de mayor diámetro que la longitud de onda de la luz, la última es absorbida. Hay una relación directa entre el valor de la absorbancia observado y la concentración del antígeno.

Prueba -

Colectar 9 vol de sangre + 1 vol de anticoagulante citrato trisodico al 3.2% las muestras problema y controles.

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (18-25°C). La absorbancia del medio de reaccion es medido después de 20 min.

Asegurar que el reactivo este a temperatura ambiente.

En una cubeta para espectrofotometro desechable adicionar:

plasma (estándar o pacientes)----- 50 ul

arrancar el cronometro al adicionar el Reactivo 1 (suspension de partículas de microlátex cubiertas con anticuerpos específicos)

diluida con el Reactivo 2 (mortiguador)----- 500 ul

mezclar y dejar incubando exactamente----- 20 min

medir la absorbancia a 590 nm.

Calibración.-

La calibracion se hace con un pool de plasmas humanos normales usando NaCl 0.15 M (solucion salina al 0.9 %) para preparar diluciones 2:3 y 1:3 de este pool.

-el pool sin diluir corresponde al punto de 100 % de Proteina S total

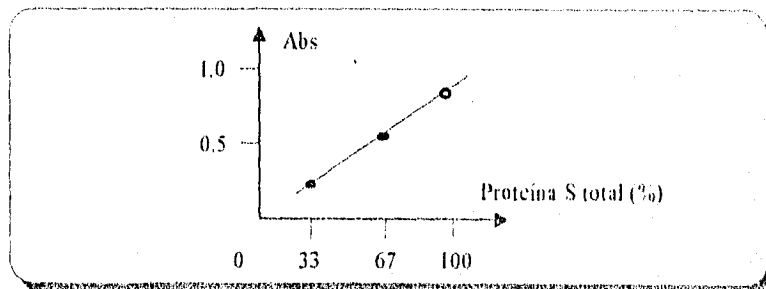
-la dilucion 2:3 corresponde al punto de 67 % de Proteina S total

-la dilucion 1:3 corresponde al punto de 33 % de Proteina S total

Las muestras de los pacientes se usan sin diluir.

Elaborar una gráfica con estos puntos de calibracion y extrapolar los valores de Abs en las ordenadas de las muestras problema para obtener el porcentaje de Proteina S total en las abscisas.

Los valores esperados de Proteina S total están entre 70% y 140%.



V.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS LIBRE

Fundamento.-

La modificación hecha al inmunoensayo para la determinación de Proteína S mediada por partículas de microlátex, para medir la Proteína S libre, utiliza el tratamiento de la muestra problema con polietilenglicol (PEG), que precipita la Proteína S unida al componente C4b del complemento, mientras que la Proteína S libre queda en el plasma sobrenadante en el cual puede ser medido. (5)

Prueba.-

- colocar 300 ul de plasma citratado en un tubo de ensayo
- adicionar 50 ul de PEG al 25 %
- mezclar bien en un vortéx (3 min)
- sumergir el tubo en un baño de agua fría 30 min.
- centrifugar el tubo por 10 min a 3000 rpm

En una cubeta para espectrofotometro desechable adicionar:

- plasma sobrenadante (estándar o pacientes)----- 100 ul
- NaCl 0.15 M----- 100 ul
- arrancar el cronometro al adicionar Reactivo 1
(suspensión de partículas de microlátex cubiertas con anticuerpos específicos)
diluido con reactivo 2----- 400 ul
- mezclar y dejar incubando exactamente----- 20 min
- medir la absorbancia a 590 nm

Calibración.-

En este caso, el pool de plasmas usado para la calibración debe ser tratado con PEG también, para que este contenga solo Proteína S libre. Preparar diluciones 2:3 y 1:3 con el pool y NaCl 0.15M

- el pool sin diluir corresponde al punto de 100 %
- la dilución 2:3 corresponde al punto de 67 %
- la dilución 1:3 corresponde al punto de 33 %

Las muestras de los pacientes se usan sin diluir.

Elaborar una gráfica con estos puntos de calibración y extrapolar los valores de Abs en las ordenadas de las muestras problema para obtener el porcentaje de la Proteína S libre en las abscisas.

El rango de los valores de trabajo son: Para Proteína S total entre 25-110 % y para la Proteína S libre entre 25-250 %.

DISCUSIÓN

Levy et al, (6) en estudio de 49 pacientes con trombosis arterial y venosa espontánea identificaron 27 pacientes con estado de hipercoagulación, 13 con trombosis venosa y 8 con trombosis arterial. los 27 con menos de 42 años de edad. 22 tuvieron deficiencia de anticoagulantes naturales específicos o fibrinolítico, 9 pacientes de Antitrombina III, 8 pacientes de Proteína C, 3 pacientes de Proteína S, 2 del cofactor II heparina y 1 paciente del activador tisular para la liberación del Plasminógeno y otro con mezcla de deficiencia de Antitrombina III y Proteína S, los 5 pacientes restantes tuvieron eventos trombóticos recurrentes asociados con resistencia a la anticoagulación con heparina, pero no fue establecida por el diagnóstico de laboratorio.

Los 22 pacientes restantes entre 46 y 63 años, 12 con trombosis venosa y 10 con trombosis arterial no tuvieron evidencia de hipercoagulabilidad y ninguno tuvo oclusiones vasculares recurrentes.

Todos los pacientes fueron tratados con éxito por terapia convencional sin que presentaran algún evento trombótico adicional durante el período que estuvo en observación.

Estos investigadores concluyen, que los adultos jóvenes con eventos trombóticos espontáneos deben ser protegidos de posibles estados de hipercoagulación, mediante evaluación y tratamiento de factores de riesgo cardiovasculares.

Lefrancois C; et al. (7) en 18 pacientes con trombosis aguda de la vena esplénica encontraron un incremento de la coagulación relacionada con un defecto congénito o adquirido de la hemostasia.

9 pacientes femeninos y 9 masculinos entre 19 y 81 años con trombosis venosa mesentérica, en 7 de las mujeres se detecto coagulopatía relacionada con anticonceptivos orales, deficiencia congénita de Proteína C o Antitrombina III, deficiencia adquirida de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S, policitemia en el período postparto y desorden mieloproliferativo primario.

Estos investigadores sugieren una evaluación apropiada para la elección del tratamiento anticoagulante o quirúrgico, ya que, las pruebas de laboratorio actuales y de gabinete permiten seguir y chequear el efecto de la anticoagulación.

Para Lopaciuk S, (8) la incidencia de trombofilia heredada en la población general es de 1 en 2,500, y que es más alta que la de hemofilia y los desordenes de sangrado relacionados. Las causas de trombofilia bien establecidos incluyen deficiencias de los inhibidores naturales de la coagulación, Antitrombina III, Proteína C y Proteína S.

Karm RM; et al, (9) reportaron a un hombre joven con una historia clínica de 11 años con trombosis venosa profunda y se presentó con embolia pulmonar aguda siendo tratado con heparina intravenosa en su clínica y 5 días después tuvo otro ataque masivo de embolia pulmonar causándole hipotensión, la angiografía pulmonar confirmo la presencia de trombo en ambas arterias pulmonares, con obstrucción completa de la arteria pulmonar izquierda, presento shock y se resucitó con embolectomía pulmonar. Las investigaciones sanguíneas posteriores confirmaron el diagnóstico de deficiencia de Proteína S y fue tratado con terapia de warfarina de por vida.

En pacientes jóvenes con tromboembolismo venoso recurrente en la ausencia de factores de predisposición, es importante excluir la deficiencia de proteínas del plasma como la Proteína S, Proteína C, Antitrombina III, Plasminógeno y Fibrinógeno.

Pabinger I; et al, (10) evaluaron el riesgo trombótico de mujeres con deficiencia de Antitrombina III , Proteína C y Proteína S y que toman anticonceptivos orales. Este estudio se llevo a cabo en 8 laboratorios de coagulación y trombosis en Austria, Alemania y Suiza.

El estudio se realizó en 48 mujeres con deficiencia heterocigota para Antitrombina III (15), Proteína C (16) y Proteína S (17), y se comparó con un grupo de 48 mujeres deficientes que nunca tomaron anticonceptivos orales (controles). Las pacientes con deficiencia de Antitrombina III quienes tomaron anticonceptivos orales su probabilidad de desarrollar trombosis fue mucho más alta que para las pacientes que no tomaron anticonceptivos orales.

Melissari E; et al, (11) durante un periodo de 3 años estudiaron a 393 pacientes adultos con una historia clínica de tromboembolismo venoso agudo. Encontrando un estado de deficiencia congénito que predispone a la trombosis en un 27.2 %. De estos, la mayoría fueron debidos a la deficiencia de Proteína C (9.2 %), Proteína S (7.6 %) y Antitrombina III (5 %), o al incremento de PAI-1 (3.1 %), los cuales, en ausencia de algún factor conocido predispone a la trombosis. Hay una característica entre los pacientes, la edad promedio de inicio de la trombosis fue 34 años y una deficiencia individual. La trombosis apareció espontáneamente en 73 % de los casos con una recurrencia en 80 %. En contraste con el resto de los pacientes 138 (35.1 %) con tromboembolismo secundario que ocurrió a una edad promedio de 43 años, y en los otros 140 (35.6 %) con tromboembolia espontáneo a mayor edad promedio 55 años, en estos no hubo estados de deficiencia de proteína permanente o alteración en la actividad fibrinolítica y la recurrencia de trombosis fue mucho más baja 53.6 % y 20.7 % respectivamente.

Demarmels B.F.; et al, (12) manifiestan una incidencia por año de trombosis venosa profunda de alrededor de 1 en 1000, pero puede ser mucho más alto en la presencia de ciertos factores de riesgo clínico, tales como la edad avanzada, inmovilización, procedimientos quirúrgicos, embarazo, puerperio, uso de anticonceptivos orales y malignidad. Además, hemocistinuria, síndrome nefrótico, lupus eritematoso sistémico y en desordenes hematológicos como la hemoglobiuria paroxística nocturna o síndromes mieloproliferativos que predisponen a la enfermedad trombótica. La evaluación de los pacientes con tromboembolismo debe incluir historia y examen clínico detallados y la investigación de laboratorio para excluir estados trombofílicos secundarios. La trombofilia primaria o heredada se sospecha principalmente en pacientes que sufrieron de tromboembolismo venoso a una edad joven de menos de 45 años, especialmente si esta presente una trombosis recurrente y/o familiar. La trombofilia puede deberse a deficiencia de Antitrombina III, Proteína C, Proteína S ó Plasminógeno. Estos defectos moleculares reconocidos como pretrombóticos primarios se establecen en un 10 a 30 % de los pacientes con tromboembolismo idiopático. En la mayoría de los casos restantes la causa de trombosis es desconocida.

Demers C; et al, (13) reportan que la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar ocurren con relativa frecuencia en el embarazo y el periodo postparto. El diagnóstico de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar requieren de pruebas precisas y objetivas debido a que el diagnóstico clínico es poco seguro. La heparina es el anticoagulante de elección durante el embarazo y es usado para ambos el tratamiento y prevención de trombosis venosa y embolia pulmonar. Los pacientes con deficiencia de Antitrombina III, Proteína C o Proteína S, así como los pacientes con anticuerpos antifosfolípidos tienen un riesgo incrementado de complicaciones trombóticas y requieren vigilancia particular durante el embarazo.

Coniglio M; et al, (14) investigaron el estado clínico de 418 pacientes trombóticos consecutivos y se estudiaron las deficiencias de las proteínas involucradas en la modulación de la coagulación sanguínea y la fibrinólisis. Los pacientes fueron divididos en 2 grupos de acuerdo a la edad en que presentaron el primer evento trombótico: grupo 1 jóvenes de menos de 45 años y grupo 2 mayores de 45 años.

Las deficiencias fueron significativamente más frecuentes en la población trombótica juvenil, en estos pacientes la prevalencia de deficiencias simples fue de, Proteína S (6.9 %), Proteína C (4.9 %), Antitrombina III (3 %), Plasminógeno (0.5 %) y Disfibrinogenemia (0.3 %). Se diagnosticaron 41 deficiencias adicionales entre los pacientes de los pacientes estudiados. Los pacientes experimentaron su primer episodio mucho antes que los pacientes no deficientes y tuvieron un más alto número de recurrencias y episodios de embolia pulmonar.

Bick RL; et al, (15) resumen en su artículo las alteraciones congénitas y adquiridas de la hemostasia encabezada por trombosis. Las disminuciones en los inhibidores de la coagulación incluyen Antitrombina III, heparina cofactor II, Proteína C y Proteína S, son los de mayor importancia en el ensayo de pacientes con estados hipercoagulables o pacientes con trombosis espontánea.

Para estos autores la descripción de un evento trombótico es de obvia importancia para planificar una terapia profiláctica de largo tiempo y para diagnosticar y asesorar miembros de familias que sufrieron de trombosis. De esta manera, recientemente se

estableció que los pacientes pueden ser tratados profilácticamente antes de que ocurra invariablemente morbilidad o mortalidad.

Pabinger I; et al. (16) dirigió un estudio prospectivo en 680 pacientes consecutivos con una historia de trombosis venosa para determinar la prevalencia de deficiencia hereditaria de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S. La edad promedio de los pacientes fue de 44.3 +/- 15.4 años, los cuales en el primer evento tuvieron una edad de 38.5 +/- 14.8 años. El total de incidencia de estados con deficiencia de inhibidor fue de 7.1 %. Con deficiencia de Antitrombina III 19 (2.8 %), Proteína C 17 (2.5 %), Proteína S 9 (1.3 %) y 3 (0.4 %) con una deficiencia combinada.

En 37/48 pacientes con deficiencia se hizo un estudio familiar y en 19 casos se estableció su característica hereditaria 2.8 % del total de pacientes. Además se logró identificar 46 individuos más con deficiencia heredada entre los familiares de estos 19 pacientes.

La edad promedio para el primer evento trombótico fue muy bajo en pacientes con deficiencia heredada (26.8 años) comparado con los grupos sin deficiencia y los pacientes deficientes no congénitos y antes de los 45 años en todos los demás.

Alving BM; et al. (17) importantes avances se han logrado en la definición de los mecanismos regulatorios que controlan la coagulación sanguínea. Este trabajo pone especial atención a las funciones de los inhibidores naturales Antitrombina III, Proteína C y Proteína S. Las deficiencias congénitas de estos inhibidores, también las anomalías adquiridas como la fibrinólisis, y su papel en la promoción de trombosis son también estudiadas, como son complicaciones trombóticas de embarazo. La disminución en el embarazo de los niveles de Proteína S de 40 % a 50 % de los niveles normales, ocurre durante el embarazo y persiste en el periodo postparto, parece ser más bien hormonal que un efecto por dilución. Nosotros no sabemos si el riesgo trombótico asociado con embarazo se incrementa en mujeres con deficiencia congénita de Proteína S. Los anticonceptivos orales disminuyen los niveles de Proteína S alrededor del 20 %. Las mujeres con una historia personal o familiar de trombosis deben ser evaluadas de condiciones predisponibles antes de establecer una terapia con anticonceptivos orales.

Simioni P; et al, (18) indican que la deficiencia heredada de Proteína C, Proteína S y Antitrombina III, ha sido asociada con un incremento de la incidencia de trombosis venosa o embolia pulmonar.

Ellos estudiaron la ocurrencia de trombosis en 92 pacientes sintomáticos pertenecientes a un grupo de 160 con un diagnóstico confirmado de deficiencia heredada de uno de los inhibidores fisiológicos de la coagulación. 70 de estos experimentaron por lo menos un evento trombótico. Esto indica que alrededor de 1 de 5 pacientes sintomáticos experimentaron trombosis. El grupo control de 92 pacientes del mismo sexo y edad (\pm 5 años) sin deficiencias de coagulación quienes experimentaron en el mismo período al menos un episodio de trombosis venosa profunda o embolia pulmonar. Solo uno de estos desarrolló trombosis arterial. El número de eventos de trombosis venosa en los 92 pacientes sintomáticos de este estudio fue mucho más alto que el de trombosis arterial, con una proporción de 24 a 1. El uso de terapias anticoagulantes por largo tiempo en nuestro grupo de pacientes parece ser capaz de prevenir recurrencia de trombosis venosa y trombosis arterial.

Bissuel F; et al, (19) encontró deficiencia de Proteína S libre en el plasma de 41 de 63 pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), una importante disminución en los niveles de Proteína S libre en plasma se observó en estos pacientes en promedio 56.5 ± 23.3 % comparado con los sujetos control de 105.3 ± 18 %. Estos resultados sugieren que la deficiencia de Proteína S puede coincidir con el desarrollo de SIDA. Esto contribuye a la hipercogulabilidad y en algunos casos, complicaciones tromboembólicas se presentan en pacientes con SIDA.

Coull BM; et al, (20) explican que a pesar de la importancia de nuevos diagnósticos de laboratorio y la alta tecnología, la causa de infarto cerebral queda sin explicación en 20 a 40 % de los sujetos.

La mayoría de los pacientes con ataque no requieren de evaluaciones amplias de coagulación, pero la hipercogulabilidad puede explicar una proporción importante de ataques espontáneos. Las anomalías de la hemostasia asociadas con ataque puede ser clasificada en general como familiar o adquirida. La principal entre las coagulopatías

trombóticas familiares son deficiencia en la concentración o funcionalidad de la Proteína C, Proteína S y Antitrombina III. Mejorando el conocimiento de estos factores debe conducir a un diagnóstico más preciso y al adecuado tratamiento de personas con riesgo de infarto.

Reiter W; et al (21) investigaron en 22 pacientes con trombosis venosa los inhibidores de la coagulación Antitrombina III, Proteína C y Proteína S, durante los primeros 8 a 12 días después de la admisión al hospital y por varios meses después de terminar el tratamiento anticoagulante.

Concluyen que los pacientes con trombosis venosa tienen desordenes en su sistema de coagulación sanguínea eminente a un estado de hipercoagulación. La actividad inhibitoria de estas proteínas disminuye y está claramente asociada con un alto riesgo de trombosis. Los pacientes quienes desarrollaron una trombosis venosa necesitan de un rápido diagnóstico de tales desordenes, así, como una profilaxis prolongada para evitar mayores desordenes.

Finazzi G; et al, (22) con un estudio de 81 pacientes con trombosis venosa comparó la deficiencia heredada de los anticoagulantes naturales, Antitrombina III (9), Proteína C (36) y Proteína S (36), encontrando que los pacientes con deficiencia de Antitrombina III tienen una mayor incidencia de trombosis que los pacientes con deficiencia de Proteína C y Proteína S (12 % vs 2.8 % vs 3.3 %).

Yoshinobu Seki; et al, (23) evaluaron el grado de activación del sistema de hemostasis en 28 pacientes con trombosis cerebral aguda y en 36 con trombosis cerebral crónica, 6 voluntarios con hemorragia cerebral fase crónica y 37 voluntarios sanos de la misma edad. En ambas fases de la trombosis cerebral los niveles en plasma de Antitrombina III y Proteína C tuvieron resultados más bajos que los del grupo control. No se establecieron diferencias importantes en estas variables entre los pacientes con trombosis cerebral aguda y crónica. Estos hechos indican que se presenta una activación sostenida de la coagulación en la trombosis cerebral que contribuye en su patogénesis.

Koster T; et al. (24) entre 474 pacientes consecutivos de edad menor a los 70 años, con un primer episodio diagnosticado de trombosis venosa y sin malignidad aparente, encontraron que la deficiencia de Proteína C funcional fue la más frecuente deficiencia de inhibidores de la coagulación y que confiere un riesgo relativamente alto de unas 3 a 7 veces de trombosis.

Los resultados de Antitrombina III son aproximadamente similares a los de Proteína C, los niveles de Proteína S bajos no fueron asociados con un incremento del riesgo trombotico. Hasta la fecha los estudios entre donadores de sangre sanos y entre grupos de pacientes altamente seleccionados han proporcionado estimaciones de la prevalencia en poblaciones particulares. Sin embargo, estas son insuficientes para cuantificar la relación entre una deficiencia y un riesgo trombotico.

Henkens CMA; et al. (25), informan que recientemente se descubrió que muchos pacientes con trombosis venosa inexplicable tienen una pobre respuesta anticoagulante a la Proteína C activada la cual fue detectada mediante una prueba de tiempo de tromboplastina parcial, este síndrome ha sido identificado en 20 % a 50 % de los pacientes con trombosis venosa inexplicable y parece ser 5 a 10 veces más común que la deficiencia de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S. La resistencia a la Proteína C activada tiene una característica hereditaria autosómica dominante.

ESTUDIO COMPARATIVO

Bibliografía	11	14	16	22
Pacientes	393	418	680	81
DEF. PC (%)	9.2	4.9	2.5	44.4
DEF. PS (%)	7.6	6.9	1.3	44.4
DEF. AT III (%)	5.0	3.0	2.8	11.1

CONCLUSIONES

Debido a lo complejo de la fisiopatología de los estados de hipercoagulabilidad aún existen muchos conceptos desconocidos. La mayoría de los investigadores proporcionan una gran diversidad de estudios y datos que reflejan una gran controversia. Ya que, las variables genéticas de población y enfermedades o síndromes adquiridos, son tan numerosos que es muy difícil que los problemas trombóticos y hemorrágicos puedan ser aclarados con el defecto de un solo componente de la hemostasia.

En la actualidad como en todo tiempo los cambios de criterio son comunes, por los avances profundos en el campo de la coagulación, últimamente observamos como se modificaron aspectos desde hace mucho tiempo conocidos de la cascada de la coagulación.

Aún, cuando se han establecido bases concretas en el estudio de los inhibidores naturales de la coagulación, creo que todavía no podemos afirmar que estas deficiencias de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S, son los factores más importantes de alto riesgo en el desarrollo de trombosis. Ya que, en las más recientes investigaciones sobre la resistencia a la Proteína C activada, se le atribuye una incidencia de hasta 50% en los casos de trombosis comparado al 5% de deficiencias de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S en conjunto.

Sin embargo, todos los investigadores coinciden que cuando en la evaluación de un paciente se presume un desorden, se deben realizar una serie de pruebas para detectar anomalías en la que pueden estar involucrados ciertos factores de la coagulación y si se detectan anomalías continuar con estudios más específicos en los cuales hacen hincapié de las determinaciones del antígeno y funcionales de la Antitrombina III, Proteína C y Proteína S. Así, como de la r-PCa que en conjunto detectan aproximadamente el 70 % de los casos de trombofilia.

Más aún, en nuestro país no existen datos que nos permitan constatar la importancia de estas deficiencias y mucho menos se han establecido estas pruebas en los laboratorios debido principalmente a su alto costo. Es necesario tener una referencia de investigación con respecto a estas deficiencias de nuestra población, debido a la alta morbilidad y mortalidad que representan las hemorragias y trombosis en el país.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pizzuto J, Dorantes S. Hemorragia y trombosis. Grupo Cooperativo Latinoamericano 1981;17-36.
- 2.- Morris R, Dixon MR, Daniel B, Brubaker DB, Blumback B. New Advances in Hemostasis for Transfusion Medicine. American Association of Blood Banks. 1990; 1-25.
- 3.- G. Richard Lee, Thomas C. Bithell, John Foerster, John W. Athens, John N. Lukens. Hematology LEA & FEBIGER. Philadelphia. London. 1993; 589-91, 1521-23.
- 4.- Ernest Beutler, Marshall A. Lichtman, Barry S. Coller, Thomas J. Kipps. Williams Hematology. Fifth Edition. Mc. Graw-Hill, Inc. 1993 ;1531-50.
- 5.- DIAGNOSTICA STAGO. 92600 Asnieres-Sur-Seine (France) . Aug 1992; 402-22-30-35.
- 6.- Levy PJ, González FM, Rush-DS, Haynes JL. Hypercoagulable states as an evolving risk for spontaneous venous and arterial thrombosis. J Am Coll Surg. 1994 Mar; 178(3): 266-70.
- 7.- Lefrancois C, Derlon A, Le Querrec A, Justum AM, Gautier P, Maurel J, Leroux J, Lochu T, Sillard B, Deshayes JP, et al. Mesentric venous thrombosis. Risk factors, treatment and outcome. An analysis of 18 cases. Ann Fr Anesth Reanim. 1994; 13 (2): 182-94.

- 8.- Lopaciuk S. Inherited thrombophilia. *Acta Haematol Pol.* 1994; 25 (2 Suppl 2): 41-54.
- 9.- Kam RM, Tan AT, Chee TS, Wong J. Massive acute pulmonary embolism in protein S deficiency---a case report. *Ann Acad Med Singapore.* 1994 May; 23(3): 396-9.
- 10.- Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk of women with hereditary antithrombin III, protein C and protein S- deficiency taking oral contraceptive medication. The GTH Study Group on Natural Inhibitors. *Thromb Haemost.* 1994 May; 71 (5): 548-52.
- 11.- Melissari E, Monte G, Lindo VS, Pemberton KD, Wilson NV, Edmondson R, Das S, Kakkar VV. Congenital thrombophilia among patients with venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1992 Dec; 3 (6): 749-58.
- 12.- Demarmels Biasutti F, Lammle B. Evaluating the origin of thrombophilia: indications and implementation. *Ther Umsch.* 1992 Dec; 49 (12): 850-8.
- 13.- Demers C, Ginsberg JS. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in pregnancy. *Clin Chest Med.* 1992 Dec; 13 (4): 645-56.
- 14.- Coniglio M, Arcieri P, Iacopino G, Lasagni RP, Mariani G. Clinical and biological aspects of juvenile thrombophilia. *Int J Clin Lab Res.* 1992; 22(4): 243-6.
- 15.- Bick RL, Ucar K. Hypercoagulability and thrombosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992 Dec; 6(6): 1421-31.
- 16.- Pabinger I, Brueker S, Kyrle PA, Schneider B, Kominger HC, Niessner H, Lechner K. Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S:

- prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1992 Oct; 3(5): 547-53.
- 17.- Alvin BM, Comp PC. Recent advances in understanding clotting and evaluating patients with recurrent thrombosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1992 Oct; 167 (4 pt 2): 1184-91.
- 18.- Simioni P, Zanardi S, Saracino A, Girolami A. Occurrence of arterial thrombosis in cohort of patients with hereditary deficiency of clotting inhibitors. *J Med*. 1992; 23(1): 61-74.
- 19.- Bissuel F, Bertuyer M, Causse X, Dechavanne M, Treppe C. Acquired protein S deficiency: correlation with advanced disease in HIV-1 infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1992; 5(5): 484-9.
- 20.- Coull BM, Clark WM. Abnormalities of hemostasis in ischemic stroke. *Med Clin North Am*. 1993 Jan; 77 (1): 77-94.
- 21.- Reiter W, Ehrensberger H, Steinbriikner B, Keller F. Parameters of Haemostasis during Acute Venous Thrombosis. *Thromb Haemost*. 1995; 74 (2): 596-601.
- 22.- Finazzi G, Barbui T. Different incidence of Venous Thrombosis in Patients with Inherited Deficiencies of Antithrombin III, Protein C and Protein S. *Thromb Haemost*. 1994; 71(1) 15-18.
- 23.- Yoshinobu Seki, Hoyu Takahashi, Ken Wada, Akira Shibata. Sustained Activation of Blood Coagulation in Patients With Cerebral Thrombosis. *Am J of Hematol*. 1995; 50: 155-160.

- 24.- Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJM, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR. Protein C Deficiency in a Controlled Series of Unselected Outpatients: An Infrequent But Clear Risk Factor for Venous Thrombosis. *Blood*. 1995 May 15; 85 (10): 2756-2761.
- 25.- Henkens CMA, Bom VJJ, Seinen AJ, van der Meer J. Sensitivity to Activated Protein C; Influence of Oral Contraceptives and Sex. *Thromb Haemost*. 1995; 73 (3): 402-4
- 26.- Morris F, M.D. *Enciclopedia Familiar de la Medicina y la Salud*. H.S. Stuttman. co., inc., Editores, New York. Tomo II, 1990; 741-44.