

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**TROMBOSPONDINA-1 Y ACORTAMIENTO DEL TIEMPO DE  
TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO EN PACIENTES CON CÁNCER**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIZACIÓN EN  
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**PRESENTA:**

**BLC. DIANA MARCELA ZAMORA RANGEL**

**MEXICO D.F.**

**SEPTIEMBRE DE 2006**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y hermanos, por su apoyo y cariño incondicional, sin cuya ayuda no habría llegado a esta meta.

A la Q.C. Fabiola Del Carpio Cano, por su amistad, colaboración, apoyo, confianza y soporte académico, que me ha permitido terminar con éxito esta etapa en mi vida.

Al Dr. Raúl Álvarez De La Cadena, por sus valiosos comentarios y por apoyarme en la realización y culminación de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Cervera Ceballos, por su ayuda constante y sus valiosos aportes.

Al Instituto Nacional de Cancerología el cual diseñó y apoyó el protocolo clínico de investigación, así también a los pacientes que accedieron a participar en éste estudio.

A todo el Personal del Laboratorio del Instituto Nacional de Cancerología, por la colaboración constante e incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad de Temple en Philadelphia, específicamente al Departamento de Fisiología de la Escuela de Medicina, por el aporte financiero para la compra de algunos de los reactivos utilizados para la realización de este proyecto.

A la compañía DICIPA que proporcionó los reactivos para la determinación de dímero D.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>2. ANTECEDENTES</b>	14
2.1 Fases de la hemostasia	14
2.1.1 Fase vascular	14
2.1.1.1 Vasoconstricción	14
2.1.1.2 Endotelio	14
2.1.2 Fase plaquetaria	16
2.1.3 Fase de la coagulación	16
2.1.3.1 Factores de Coagulación	16
2.1.3.1.1 Factores dependientes de Vitamina K	17
2.1.3.1.2 Factores V y VIII	18
2.1.3.1.3 Factores de activación por contacto	19
2.1.3.1.4 Fibrinógeno y Factor XIII	20
2.1.3.2 Inhibidores de la coagulación	22
2.1.3.3 Inhibidores de proteasas plasmáticas	22
2.1.3.4 Fibrinólisis	24
2.2 Función y mecanismos del sistema de la coagulación	25
2.2.1 Vía o Sistema Intrínseco Clásico	25
2.2.2 Vía o Sistema Extrínseco Clásico	26
2.2.3 Vía Clásica Común	27

2.2.4 Sistema Fibrinolítico	28
<b>3. EL MECANISMO DE COAGULACIÓN EN LOS PACIENTES CON CÁNCER</b>	<b>30</b>
3.1 Cáncer y Trombosis	30
3.1.1 Los factores trombogénicos en el cáncer	34
3.1.1.1 Factores de coagulación	34
3.1.1.2 Trombospondina-1	35
3.1.1.3 Selectinas	38
3.2 Cáncer y Fibrina	40
3.2.1 Depósito de fibrina y progresión tumoral	41
<b>4. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE LA COAGULACIÓN</b>	<b>42</b>
4.1 Pruebas de tamizaje	42
4.1.1 El extendido de sangre periférica	42
4.1.2 Tiempo de Protrombina (TP)	43
4.1.3 Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa)	43
4.1.4 Interpretación de los resultados de TP y TTPa	44
4.1.5 Tiempo de Trombina (TT)	44
4.2 Pruebas especiales	44
4.2.1 Dímero D	44
4.2.2 Trombospondina-1	45
4.2.3 L, P, E –Selectina	46

<b>5. HIPOTESIS</b>	47
<b>6. OBJETIVOS</b>	47
6.1 General	47
6.2 Específico	47
<b>7. MATERIALES</b>	48
7.1 Material biológico	48
7.2 Material	48
7.3 Reactivos y soluciones	48
7.3.1 Tiempos de coagulación y dímero D	48
7.3.2 Trombospondina-1	49
7.3.3 sL-Selectina	50
7.3.4 sP-Selectina	50
7.3.5 sE-Selectina	51
7.4 Equipo	51
<b>8. MÉTODOS</b>	52
8.1 Población de estudio y criterios de inclusión	52
8.2 Criterios de Exclusión	52
8.3 Estandarización de la toma de muestras	53
8.4 Obtención y procesamiento de las muestras	53
8.5 Análisis estadístico	54
<b>9. RESULTADOS</b>	55
9.1 Características de la población estudiada	55

9.1.1 Características hematológicas y de la coagulación de los individuos estudiados	55
9.2 Evaluación hematológica	56
9.2.1 Evaluación hematológica por tipo histológico de cáncer	61
<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
10.1 Variables asociadas al acortamiento del TTPa	65
10.1.1 Trombospondina-1	65
10.1.2 sP-Selectina	65
10.1.3 sL-Selectina	66
10.1.4 sE-Selectina	66
10.2 Otras variables relacionadas con el acortamiento del TTPa	67
10.2.1 Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos	67
<b>11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>76</b>
13.1 Equipo CA-1500 SYSMEX	76
13.2 Determinaciones y Reactivos	80
13.2.1 Determinación de Tiempo de Protrombina	80
13.2.2 Determinación de Tiempo de Tromboplastina Parcial activado	81
13.2.3 Determinación de Tiempo de Trombina	82
13.2.4 Determinación de Dímero D	83
13.2.5 CA CLEAN I	84

13.2.6 Dade Ci-Trol Control de la Coagulación Nivel 1	84
13.2.7 Dade Ci-Trol Control de la Coagulación Nivel 2	85
13.2.8 Dade Tampón Veronal de Owren	86
13.2.9 Solución de Cloruro de Calcio	86
13.2.10 Chemikine Human TSP-1 EIA Kit	86
13.2.11 Human sL-Selectin Immunoassay	91
13.2.12 Human sP-Selectin Immunoassay	95
13.2.13 Human sE-Selectin Immunoassay	99
13.3 Establecimiento de intervalos de referencia	103

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Vía o Sistema Intrínseco Clásico.	26
<b>Figura 2.</b> Vía o Sistema Extrínseco Clásico.	27
<b>Figura 3.</b> Vía Clásica Común.	28
<b>Figura 4.</b> Sistema Fibrinolítico.	29
<b>Figura 5.</b> Eventos cíclicos en el proceso maligno y activación de la coagulación y fibrinólisis.	31
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de activación de la coagulación en el paciente con cáncer.	31
<b>Figura 7.</b> Factor Tisular (FT) es el iniciador de la coagulación.	33
<b>Figura 8.</b> Estructura de la Trombospondina-1.	36
<b>Figura 9.</b> Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sE-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto.	58
<b>Figura 10.</b> Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sP-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto.	59
<b>Figura 11.</b> Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sL-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto.	60
<b>Figura 12.</b> Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de Trombospondina-1 (TSP-1) en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto.	60

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Factores de la coagulación – Nomenclatura.	17
<b>Tabla 2.</b> Tipos histológicos de Cáncer discriminados por género con TTPa corto.	55
<b>Tabla 3.</b> Características de los individuos.	56
<b>Tabla 4.</b> Análisis estadístico de los 3 grupos (P).	56
<b>Tabla 5.</b> Análisis estadístico de los 3 grupos para selectinas y TSP-1 (P).	57
<b>Tabla 6.</b> Análisis Estadístico de Selectinas y TSP-1 (P).	61
<b>Tabla 7.</b> Valores de Selectina y TSP-1 (ng/mL) en el grupo Sarcoma.	62
<b>Tabla 8.</b> Valores de Selectina y TSP-1 (ng/mL) en el grupo CaCu.	62
<b>Tabla 9.</b> Valores de Selectina y TSP-1 (ng/mL) en el grupo Ca de mama.	63
<b>Tabla 10.</b> Valores de Selectina y TSP-1(ng/mL) en el grupo Adenocarcinoma.	63
<b>Tabla 11.</b> Valores de Selectina y TSP-1 (ng/mL) en el grupo TGNS.	64
<b>Tabla 12.</b> Análisis Estadístico por tipo histológico de Cáncer (P).	64



## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades infecciosas producen la más alta mortalidad en el hombre.<sup>1</sup> La 58a Asamblea Mundial de la Salud, órgano en el que están representados los Estados Miembros de la OMS, adoptó el 25 de mayo de 2005 en Ginebra una resolución sobre la prevención y el control del cáncer para afrontar la situación de emergencia provocada por el aumento de la incidencia de esta enfermedad. La prevalencia de cáncer es elevada y está aumentando en todo el mundo: afecta a más de 20 millones de personas y cada año se cobra más de siete millones de vidas. La incidencia del cáncer está creciendo en los países desarrollados y en los países en desarrollo al aumentar la exposición a factores de riesgo como el consumo de tabaco, una dieta malsana, la inactividad física y algunas infecciones y agentes carcinógenos. El rápido envejecimiento de la población de algunos países es otro factor que contribuye a esa tendencia.

Las alteraciones en la hemostasia son siempre hacia dos caminos: el exceso (trombosis) ó la carencia coagulativa (hemorragia); trombosis y hemorragia, son causa de gran morbilidad y mortalidad ya sea como procesos primarios (trombofilia primaria, coagulopatías hemorrágicas) o vinculadas a otros procesos mórbidos (diabetes, aterosclerosis, hepatopatía, etc.) Las enfermedades oncológicas guardan estrecha relación con alteraciones en el sistema hemostático y con frecuencia complican el manejo y ensombrecen el pronóstico.<sup>2</sup> Una proporción significativa de pacientes oncológicos sufrirán durante el curso de su enfermedad y tratamiento complicaciones hemostáticas, de ahí que en el presente estudio abordaremos aspectos relativos al fenómeno hemostático y el cáncer.<sup>2</sup>

## RESUMEN

El proceso que induce el fenómeno del acortamiento del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) en los pacientes con cáncer continúa sin explicación en parte debido a la poca información que se tiene acerca de su mecanismo de acción. Este estudio añade conocimientos relacionados a éste proceso y abre una puerta para la investigación de su utilidad clínica. Este fenómeno de laboratorio hasta la fecha no ha mostrado ser una herramienta clínica para el seguimiento o tratamiento de pacientes con cáncer. Además, la evaluación del TTPa, tiene limitaciones técnicas ya que no refleja la cantidad de trombina generada y es una prueba aparentemente insensible para la detección de estados de hipercoagulabilidad. Sin embargo, es de resaltar que la introducción de nuevos instrumentos automatizados para la evaluación del TTPa han permitido la detección sistemática de este fenómeno en el laboratorio y por consiguiente esta prueba continúa reportándose en la literatura médica. El presente trabajo se llevó a cabo para estudiar de una manera controlada y prospectiva este fenómeno, es decir, se estudió un paciente con cáncer con un TTPa corto para evidenciar si este hecho era simplemente un fenómeno de laboratorio en pacientes con cáncer sin implicaciones clínicas o era un fenómeno de utilidad para la práctica clínica. La literatura aunque escasa describe este fenómeno y apoya que este acortamiento se encuentra asociado directamente con la activación del sistema de la coagulación y que niveles elevados de dímero D confirman que hubo generación de trombina y activación del sistema de la fibrinólisis.

Para desarrollar este estudio, inicialmente se estandarizaron las condiciones en las que debían ser tomadas las muestras de los pacientes con cáncer. Luego se procedió a evaluarles los tiempos de coagulación y los valores de plaquetas y neutrófilos y aquellos pacientes que presentaron el TTPa corto fueron incluidos en el estudio, su muestra fue fraccionada y almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de 1 a 3 meses, igualmente se revisaron los expedientes clínicos para conocer su diagnóstico histológico y edad y a continuación se buscaron voluntarios sanos y pacientes control con características similares a los pacientes con TTPa corto y una vez incluidos estos en el estudio, su muestra fue alicuotada y fueron almacenadas de igual manera que las muestras de los pacientes con TTPa corto. Posteriormente fueron descongeladas todas las muestras y se les evaluó la concentración de dímero D, trombospondina-1 y L, P y E selectinas. En total se realizaron 69 ensayos por duplicado.

En conclusión, se pudo establecer una relación entre los niveles elevados de TSP-1 con el acortamiento del TTPa en pacientes con cáncer y obtener una visión general del estado de coagulación y fibrinólisis de los pacientes mediante la evaluación de dímero D, plaquetas, neutrófilos y L, P y E selectinas. Igualmente se pudieron correlacionar estos valores según el diagnóstico histológico que presentaban los pacientes incluidos en el estudio.

## 2. ANTECEDENTES

La relación que existe entre la activación hemostática y el desarrollo neoplásico, fue documentado inicialmente en 1865, cuando el francés Armand Trousseau reportó la asociación de tromboflebitis (una condición de la sangre que predispone a la coagulación espontánea) con malignidades ocultas (Síndrome de Trousseau). Actualmente, con los enormes avances en la detección temprana del cáncer, y el incremento en el cuidado de los pacientes; una trombosis venosa “idiopática” (inexplicable) puede ser la primera manifestación de un cáncer que es comúnmente asintomático. Esto fue comprobado alrededor de 1990, en donde varios estudios clínicos demostraron que la trombosis venosa idiopática está asociada con un elevado riesgo de malignidad.<sup>3</sup>

Las malignidades más comúnmente asociadas con trombosis son derivadas de las glándulas mamarias, colon y pulmón, reflejando con ello la prevalencia de estos tumores en la población en general. Las neoplasias principalmente asociadas con alteraciones de la coagulación son derivadas del páncreas, ovario y cerebro.<sup>1</sup>

Es indudable que la variación individual es infinita por la influencia ejercida por factores asociados al huésped y a la enfermedad neoplásica. La idea de que la activación hemostática puede ser ventajosa para el crecimiento tumoral e invasión fue concebida por Theodor Billroth, quien interpretó la unión patológica de las células tumorales, embebidas en un trombo como evidencia del papel de la trombosis venosa en el proceso metastásico. En años subsecuentes Dvorak propuso que los tumores construyen su propio estroma activando el sistema de reparación inducido por daño en el huésped, el cual incluye al sistema de la coagulación, que conlleva al depósito de fibrina en el sitio del tumor. La fibrina provee de una matriz extracelular que forma de manera provisional, un albergue para las células neoplásicas recién nacidas, para la migración de células inflamatorias y para la formación de nuevos vasos sanguíneos.<sup>1, 4, 5</sup>

En el hombre, dos sistemas tienden a mantener el equilibrio hemostático: 1) el sistema de la coagulación que evita, ante una lesión, la hemorragia excesiva y que está compuesto por distintos zimógenos plasmáticos que circulan en forma inactiva. Estos factores de la coagulación se activan secuencialmente dando lugar a la formación de enzimas activas que culminan con la formación de la trombina, que al actuar sobre el fibrinógeno forma la malla de fibrina; y 2) el sistema fibrinolítico que limita la magnitud del coágulo. Los dos mecanismos son, estructuralmente, muy similares: pueden ser activados por un mecanismo intrínseco y/o extrínseco para producir una enzima activa. Por otra parte, en ambos sistemas, un conjunto de inhibidores condicionan el equilibrio y limitan el proceso.<sup>6</sup>

Los elementos necesarios para el desarrollo de la hemostasia deben estar cuantitativa y cualitativamente normales. En ocasiones los problemas en los

mecanismos hemostáticos se deben no solamente a disminución en la cantidad de algunos de los factores o compuestos mediadores sino también a anomalías en la función, defectos de tipo molecular y a veces por sustancias que inhiben el proceso de la coagulación, especialmente del tipo auto-anticuerpos (inhibidores adquiridos). Por lo tanto para el perfecto funcionamiento del sistema se requiere de elementos tales como la pared vascular, las plaquetas, el proceso de la coagulación del plasma propiamente dicho, cuyo producto final es el coágulo de fibrina, inhibidores naturales de la coagulación y finalmente el sistema fibrinolítico encargado de la remoción de la fibrina, que es parte del sistema inhibidor.<sup>7</sup>

## **2.1 FASES DE LA HEMOSTASIA**

La hemostasia es un proceso controlado y localizado que da lugar a la detención de la hemorragia después de una lesión y puede ser dividida conceptualmente en tres fases principales que se describen a continuación.

### **2.1.1 Fase vascular**

Los vasos sanguíneos deben ser estructuralmente normales, a la vez que funcionalmente adecuados, con el fin de mantener la sangre en su estado líquido y su paso por el lecho vascular sin modificaciones en su estado físico.

#### **2.1.1.1 Vasoconstricción**

Cuando se presenta trauma, rotura real en la continuidad del recubrimiento de los vasos, y cambios en la estructura vascular, inicialmente hay vasoconstricción local. Generalmente el proceso de vasoconstricción compromete también a los vasos que se encuentran en la vecindad, posiblemente por la liberación de serotonina que procede de las plaquetas activadas (agregación primaria). Otro compuesto que contribuye a la vasoconstricción es el tromboxano A<sub>2</sub>. Este ácido graso proveniente de las plaquetas que simultáneamente se encuentran en proceso de activación, produce contracción del músculo liso a bajas concentraciones. La conversión de fibrinógeno a fibrina, libera los fibrinopéptidos A y B. El fibrinopéptido B, causa contracción muscular directa por sinergismos de la acción de la bradiquinina, la cual produce vasoconstricción y contribuye así a la hemostasia por este mecanismo.<sup>8</sup>

#### **2.1.1.2 Endotelio**

Contribuye tanto en el proceso hemostático como en el antitrombótico. Participa activamente en el mantenimiento del carácter no trombogénico de la interfase sangre-tejidos, y al mismo tiempo suministra sustancias hemostáticas y procoagulantes, cuando se presenta la injuria vascular. La viscosidad de la sangre

se hace mayor como consecuencia del aumento de la permeabilidad capilar secundaria a péptidos que se producen por la activación del factor XII de la coagulación y que también suavizan la contracción del músculo liso. Este efecto también se puede obtener por la liberación de sustancias de las plaquetas como serotonina y presencia de histamina o trombina.<sup>8</sup>

La permeabilidad vascular aumentada se ha observado microscópicamente encontrándose contracción de las células endoteliales con ampliación de los espacios entre ellas, lo cual expone los compuestos del subendotelio a los elementos que circulan por la luz del vaso, los cuales son necesarios para iniciar cambios desde el punto de vista hemostático, como son adhesividad plaquetaria o el contacto del factor XII con el colágeno que induce la activación del sistema intrínseco de la coagulación. Las plaquetas se adhieren a los elementos del subendotelio: colágeno, fibronectina, al igual que a la fracción von Willebrand del factor VIII (VIII:vW) que se origina en las células del endotelio vascular y que es cedida al espacio subendotelial.<sup>9</sup> Además del trauma, la célula endotelial, la mayor fuente de VIII:vW, libera este factor después de exposición a fibrina, y también a la administración de vasopresina. Parte de este factor pasa al plasma, el cual se une a la fracción proteica del plasma del factor VIII de la coagulación (VIII:C); ambas fracciones conforman unidas (VIII:C-VIII:vW) el complejo factor VIII de la coagulación del plasma e interviene en las reacciones de la vía intrínseca de la coagulación propiamente dicha.<sup>8</sup>

El endotelio vascular también es rico en actividad trombotrófica que parece ser actúa como el factor hístico (factor III), el cual reacciona con el factor VII y con iones de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), los cuales forman un complejo que actúa sobre los factores de la coagulación de la vía extrínseca y de ahí en adelante hasta terminar con la conversión del fibrinógeno a fibrina. En esta vía se produce trombina, que también es agregante plaquetario. Se observa aquí un efecto propio del endotelio sobre los mecanismos de la coagulación del plasma propiamente dicho. Por otra parte el colágeno que está en el subendotelio es capaz de activar el factor XII y de ahí la vía intrínseca. La célula endotelial también produce un activador del plasminógeno que convierte al plasminógeno en plasmina. A la vez, el endotelio produce un inhibidor del plasminógeno.<sup>8</sup>

Ambos compuestos normalmente se encuentran en un equilibrio moderando la fibrinólisis. Otros elemento esencial para la integridad vascular son las plaquetas mismas; múltiples observaciones tanto clínicas como experimentales demuestran que las plaquetas son esenciales para la integridad vascular, independientemente del efecto que pueden tener por su descenso. La célula endotelial también contiene el dímero de la glicoproteína de membrana similar a la glicoproteína IIb-IIIa de las plaquetas, el factor activador de plaquetas, fibronectina. Además está presente la trombospondina (excepto en el cerebro), un receptor que se une a la trombina y altera su especificidad de sustrato, este complejo trombina-trombospondina es un potente activador de la proteína C. Contiene, además todo el sistema capaz de

producir prostaglandinas cuyo producto final es la prostaciclina, potente vasodilatador con efecto antitrombótico.<sup>8</sup>

### **2.1.2 Fase plaquetaria**

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos sin núcleo, discoides, planas, ligeramente convexas, que circulan en la sangre libremente y se originan en la médula ósea a partir de los megacariocitos. Tiene un diámetro de 2-3 micras, y su vida es de entre 8-10 días. La cantidad normal en la sangre periférica oscila entre 180.000-300.000/mm<sup>3</sup>. Los megacariocitos se encuentran en la médula ósea, los cuales introducen su citoplasma en los sinusoides y se fragmentan progresivamente hasta la liberación de plaquetas que entran a la circulación a través de estos mismos sinusoides. La plaqueta pasa por un envejecimiento progresivo en el cual pierde lentamente muchos de sus elementos esenciales para su propia vida y función y finalmente es retirada por el sistema reticuloendotelial en el bazo y el hígado.<sup>10</sup>

Las plaquetas están implicadas en varios aspectos de la hemostasis. Una de las funciones que desempeñan parece ser la vigilancia pasiva del recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos respecto a posibles brechas y fracturas. Se ha visto que las plaquetas mantienen la continuidad o integridad de los vasos al llenar las brechas pequeñas causadas por la separación de las células endoteliales. Se adhieren a las fibras de colágeno subyacentes del endotelio expuesto y evitan el escape de la sangre. La disminución en el número de plaquetas en la sangre periférica resulta en escapes de sangre a través de estas brechas hacia el interior de los tejidos. Otra función de las plaquetas se da cuando se producen lesiones y hay una rotura real en la continuidad del recubrimiento de los vasos, las plaquetas reaccionan para formar el agregado conocido como tapón de plaquetas hemostático primario. La hemorragia se detiene debido a que las aberturas en los vasos se llenan mecánicamente con la masa de plaquetas. Una tercera función se da después de esta formación de tapón, en la que los fosfolípidos de la membrana de las plaquetas agregadas proporcionan una superficie de reacción para la formación de la fibrina. Ésta estabiliza el tapón de plaquetas inicial, y la masa total de fibrina y plaquetas es el tapón hemostático secundario. Como cuarta función, las secreciones de las plaquetas ayudan a reparar los tejidos lesionados. El factor del crecimiento derivado de las plaquetas, mitógeno almacenado en los gránulos alfa, estimula a las células musculares lisas y posiblemente a los fibroblastos a multiplicarse y sustituir a las células dañadas por la lesión.<sup>10</sup>

### **2.1.3 Fase de coagulación**

#### **2.1.3.1 Factores de la coagulación**

En Basilea, Suiza, en 1954, durante el primer Congreso Internacional de Trombosis y Embolia se decidió crear el Comité Internacional para la Nomenclatura

de los factores de la coagulación del plasma, con el fin de imponer orden en ésta. Algunos años más tarde se recomendó utilizar números romanos con el fin de unificar la nomenclatura y estos números se asignaron a los diferentes factores respectivamente. En la tabla 1 se encuentran los factores con el número romano asignado y además los sinónimos más conocidos de cada uno de ellos. El orden numérico se estableció por el orden de descubrimiento de los respectivos factores. En la actualidad se han reconocido 12 proteínas plasmáticas como factores de coagulación. El calcio en ocasiones se describe como el factor IV y el factor tisular como factor III.<sup>6</sup>

NÚMEROS ROMANOS	NOMBRE DESCRIPTIVO	SINÓNIMOS
I	Fibrinógeno	
II	Protrombina	
III	Tromboplastina tisular	
IV	Calcio (Ca <sup>++</sup> )	
V	Proacelerina	Factor lábil, globulina aceleradora
VII	Proconvertina	Factor estable
VIII	Factor antihemofílico	Globulina antihemofílica, Factor antihemofílico A
IX	Componente tromboplástico del plasma	Factor de Christmas, Factor antihemofílico B
X	Factor de Stuart	Factor de Power, auto protrombina C
XI	Antecedente tromboplástico del plasma	Factor antihemofílico C
XII	Factor de Hageman	Factor de contacto – Factor del vidrio
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	Factor de Laki-Laki-Lorand-Fibrinasa
Precalicroína	Precalicroína	Factor Fletcher
C-APM	Cininógeno de alto peso molecular	Factor Fitzgerald

**Tabla 1. Factores de la coagulación – Nomenclatura**

Los factores de la coagulación pueden subdividirse en las siguientes categorías: los factores dependientes de la vitamina K, los factores V y VIII, los factores de activación por contacto, fibrinógeno y factor XIII.

#### **2.1.3.1.1 Factores dependientes de Vitamina K**

**Protrombina (factor II).** La protrombina es una glucoproteína de cadena simple partir de la cual y por separación de parte de la molécula se genera la trombina activa. La protrombina consiste de una mitad con terminal carboxilo, la parte que forma la trombina en la molécula y la mitad aminoterminal, el llamado fragmento de

protrombina 1-2 (fragmento PT-1-2), el cual es liberado durante la activación del factor Xa. El precursor inmediato de la trombina activa, se llama protrombina. A partir de éste y por separación de parte de la molécula se genera la trombina activa.<sup>6</sup>

**Factor X.** El factor X circula en el plasma como una glicoproteína de dos cadenas polipeptídicas. La cadena pesada del factor X contiene los residuos en los sitios enzimáticos activos. La cadena liviana del factor X es unida covalentemente a la cadena pesada por puentes disulfuro. Después de la activación del factor X, ya sea por factor IXa o por el factor VIIa, se libera un péptido de activación aminoterminal de la cadena pesada del factor X y la cadena liviana no se modifica y permanece unida a la cadena pesada del factor Xa.<sup>11</sup>

**Factor IX.** Es una glicoproteína. Al igual que los otros factores dependientes de vitamina K, es sintetizado en el hígado y es secretado hacia el plasma donde su vida media biológica es de 18-24 horas. La proteína tiene una cadena polipeptídica simple que contiene un número de residuos de ácido glutámico en la región aminoterminal de la molécula. Esta forma de proteína no es funcional en la coagulación hasta que una carboxilasa vitamina K dependiente convierta 12 de los residuos de ácido glutámico aminoterminal en ácido gamma-carboxiglutámico (gla).<sup>12</sup> Estos residuos gla, también característicos de otros factores vitamina K dependientes, participan en uniones fosfolipídicas dependientes de calcio, lo cual es crítico para la formación de un complejo con el factor VIIIa, y para la subsecuente conversión del factor X a factor Xa. Hay una gran homología entre la secuencia de aminoácidos de factor IX y otros factores vitamina K dependientes, incluyendo la protrombina, factores X, VII y las proteínas C y S (del sistema de inhibidores). Todos estos factores tienen residuos gla en la región aminoterminal de la molécula. Además de los residuos gla, otro aminoácido, el ácido beta-hidroxiaspártico, se ha encontrado en el factor IX y alguno de los otros factores vitamina K dependientes.<sup>11</sup>

**Factor VII.** Es una glicoproteína. La región aminoterminal es homóloga a la de los otros factores vitamina K dependientes. El factor VII humano tiene una vida media in vivo de 6 a 8 horas, más corta que los factores IX, X y II (1 a 3 días). Parece ser que el factor VII efectúa alguna actividad enzimática intrínseca en su forma nativa. Por otra parte el factor VII es inactivo en su sustrato proteico fisiológico en ausencia del factor tisular.<sup>13</sup>

#### **2.1.3.1.2 Factores V y VIII**

Los factores V y VIII circulan en el plasma como precursores de cofactores biológicamente inactivos; el factor VIII fracción procoagulante (VIII:C) unido a la fracción von Willebrand del factor VIII (VIII:vW), constituyen el factor VIII completo (VIII:C/VIII:vW). Después de la activación, el factor Va sirve como un co-factor no enzimático para el factor Xa en el complejo protrombínico y el factor VIII como un co-factor en la activación del factor X mediado por el factor IXa.<sup>6</sup>

**Factor V.** Es principalmente sintetizado en el hígado pero también se encuentra en plaquetas, monocitos y células endoteliales. El factor V tiene una susceptibilidad muy alta al ataque proteolítico. Es una molécula glucoproteica sencilla de 330.000 de peso molecular. Este factor es activado a su co-factor por bajas concentraciones de trombina, la cual se divide en 4 uniones peptídicas diferentes, la actividad coagulante del factor V aumenta después de la segunda división. El factor V consiste en una cadena pesada aminoterminal y una cadena liviana carboxiterminal que no son covalentemente unidas en la presencia de  $Ca^{++}$ . Estos fragmentos en medio de procofactor son liberados como péptidos de activación. Los factores V y Va se unen a fosfolípidos o a la membrana plaquetaria vía moléculas de cadenas livianas. El factor Va unido a plaquetas o fosfolípidos, funciona como un receptor del factor Xa; la función del receptor normal requiere  $Ca^{++}$ , y de la interacción mediada por el factor Xa con la superficie del fosfolípido.<sup>14</sup>

**Factor VIII (VIII:C/VIII:vW).** Se encuentra en el plasma en la forma de complejo VIII (VIII:C/VIII:vW) del cual la fracción procoagulante es el VIII:C y la fracción von Willebrand VIII:vW; ha sido posible la separación y caracterización de cada uno. La fracción VIII:vW consiste en una serie de multímeros. Se cree que los multímeros grandes son más eficientes hemostáticamente por su mayor potencial para la interacción con las plaquetas y su gran afinidad para ligarse al subendotelio. Se ha demostrado que aun pequeños multímeros de VIII:vW son efectivos en la promoción de la adhesividad de las plaquetas. Las plaquetas contienen normalmente VIII:vW en sus gránulos, pero también en el citosol y la membrana. Esta fracción ha sido detectada también en las paredes vasculares de arterias, venas y capilares por técnicas de inmunofluorescencia.<sup>6,11</sup> La fracción VIII:C es un cofactor de la activación del factor X. El factor X es una glicoproteína del plasma, la cual es activada por una división en una unión peptídica sencilla, resultando el factor Xa, proteasa del plasma que obra sobre la protrombina para convertirla en trombina por hidrólisis molecular, en una reacción que es acelerada por el factor Va, el fosfolípido 3 y  $Ca^{++}$ . El factor X puede ser activado a través de la vía extrínseca por un complejo del factor VII, factor tisular y  $Ca^{++}$ . El factor IX es una proteasa sérica, la cual divide el factor X en la misma unión peptídico arginilisoleucina sobre la cual obra el factor VII y el factor tisular de la vía extrínseca. La activación del factor VIII:C por pequeñas cantidades de trombina es fundamental para continuar con la activación del complejo protrombínico.<sup>6</sup> El factor Xa por si mismo también activa al factor X.

#### **2.1.3.1.3 Factores de activación por contacto**

Son el factor XII, XI, precalicreína y cininógeno de alto peso molecular (C-APM). Una vez que el plasma se expone a compuestos eléctricamente negativos, tales como vidrio, caolín, dextrán sulfato, celita, ácido elálgico, cristales de urato, etc., se inician las reacciones por contacto. La activación por contacto no solamente inicia la vía intrínseca de la coagulación sino que está unida a otros sistemas proteolíticos del plasma. Por lo tanto la kallikreína plasmática, producto proveniente de la precalicreína, libera cininas vasoactivas de los cininógenos activando así el

plasminógeno convirtiendo pro-renina a renina y produciendo agregación de neutrófilos. El factor  $\beta$  del factor XII activo es capaz de activar la primera fracción del complemento C1.<sup>15</sup>

**Factor XII.** Es una glucoproteína de cadena sencilla. Una división inducida por la calicreína plasmática de una simple unión peptídica resulta en una enzima activa de dos cadenas, la terminación amino de la región de la cadena pesada es responsable de unirse sobre la superficie del factor  $\beta$  del factor XIIa y de la cadena sencilla del factor XII. La cadena liviana con terminal carboxi, unido a la cadena pesada por un puente disulfuro, contiene los residuos del sitio enzimáticamente activo.<sup>6,11</sup>

**Factor XI.** Consiste en dos cadenas polipeptídicas idénticas unidas por puentes disulfuro. Una proteólisis limitada por el factor  $\alpha$  XIIa en una unión sencilla interna arginil-isoleucina en cada una de las cadenas polipeptídicas del factor XI resulta en cadenas pesadas aminoterminales unidas por disulfuro y cadenas livianas carboxiterminal conteniendo el residuo activo de serina. Este factor circula en el plasma no covalentemente asociado con el C-APM.<sup>11</sup>

**Pre-calicreína.** Es una glucoproteína de cadena sencilla. La activación proteolítica por factor  $\beta$  XIIa, lleva a la producción de kallikreína activa, compuesta por una cadena pesada aminoterminal y una cadena liviana carboxiterminal unidas por puentes disulfuro. La calicreína realmente libera bradicinina no peptídica a partir del C-APM, activa al factor XII a factor XIIa y factor  $\beta$  XIIa, y también activa débilmente el factor IX.<sup>6</sup>

**Cininógeno de alto peso molecular (C-APM).** El plasma humano contiene por lo menos dos tipos diferentes de cininógeno, C-APM y cininógeno de bajo peso molecular (C-BPM), y ambos son cadenas de proteínas sencillas que contienen péptidos vasodilatadores altamente activos, las cininas. La parte terminal amino de los dos cininógenos muestra una homología secuencial extensa, pero los de alto peso molecular contienen una estructura carboxiterminal que no está presente en aquellos de bajo peso molecular y es responsable de la activación de contacto del C-APM. El C-BPM es inactivo en la coagulación de activación por contacto.<sup>11</sup>

#### 2.1.3.1.4 Fibrinógeno y Factor XIII

La transformación de fibrinógeno (factor I) a fibrina, se lleva a cabo por la acción enzimática proteolítica de la trombina sobre el fibrinógeno, la cual produce el desprendimiento de dos pequeños fibrinopéptidos (A y B), y los monómeros solubles que corresponden al resto de la molécula. Los monómeros de fibrina se polimerizan espontáneamente en una red de fibrina insoluble, sobre la cual, el factor XIIIa, o estabilizador de la fibrina, ejerce su papel produciendo uniones covalentes por entrecruzamiento de monómeros.<sup>15</sup>

**Fibrinógeno.** Es el único factor plasmático que se encuentra en cantidad suficiente para poder medirlo y expresarlo en términos de miligramos de proteína. El plasma normal contiene de 200 a 400mg/dL. Los otros factores se encuentran en cantidades tales que solamente se pueden expresar en el sentido de actividad biológica. El fibrinógeno es una glucoproteína compleja, con un peso molecular de 340.000, y es sintetizado en el hígado. Está compuesta de tres pares de cadenas polipeptídicas diferentes denominadas cadenas alfa, beta y gamma. Las uniones son de radicales disulfuro. La molécula tiene un área (DOMAIN) central que conecta los terminales amino de las seis cadenas. Las cadenas polipeptídicas se disponen formando dos espirales independientes con sus tres cadenas cada una, y terminan ambas en un área globular (área terminal) que consiste principalmente de los terminales carboxilo, dos tercios de cadenas beta y gamma mientras que la alfa se prolonga sola como un terminal libre que es muy sensible al ataque proteolítico. Los fibrinopéptidos A y B que se liberan por el efecto de la trombina, corresponden a los terminales amino de las cadenas alfa y beta.<sup>6</sup>

**Factor XIII.** Es un tetrámero compuesto por dos cadenas alfa y dos cadenas beta unidas por fuerzas no covalentes ( $\alpha_2\beta_2$ ). La cadena  $\alpha$  contiene un grupo cisteína que es el grupo activo. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  posiblemente son sintetizadas en el hígado, pero la cadena alfa también se ha encontrado en megacariocitos, el citosol de las plaquetas y algunos otros tejidos. El factor XIII en las plaquetas consiste en dos cadenas alfa. El factor XIII debe ser activado (XIIIa) por la trombina en presencia de  $Ca^{++}$ . El factor XIIIa obrará sobre el coágulo o polímero de fibrina no estable otorgándole una estabilización de tipo bioquímico. Esto quiere decir por una parte que microscópicamente no hay diferencia entre el coágulo de fibrina no estabilizado y el coágulo estabilizado. El efecto de estabilización se logra por uniones cruzadas específicas en los dímeros de cadenas gamma-gamma y de polímeros de cadenas alfa. Las reacciones de estabilización cruzada de cadenas alfa contribuyen a estabilizar el crecimiento de los polímeros de fibrina en forma lateral, es decir, por uniones latero-laterales, mientras que la dimerización gamma-gamma estaría obviamente comprometida en la polimerización término-terminal de los monómeros de fibrina. Una de las consecuencias de los entrecruzamientos de las moléculas de fibrina desde el punto de vista de estabilización, es el aumento de la fuerza mecánica del coágulo. Se ha demostrado que la estabilización cruzada de  $\alpha_2$ -antiplasmina a la fibrina, probablemente explica la resistencia relativa de los coágulos formados en el plasma contra la digestión de la plasmina, enzima que produce fibrinólisis. La cadena alfa de fibrina puede ser unida cruzadamente a fibronectina y está por otro lado se ha demostrado se encuentra unida al colágeno por enlaces cruzados, lo cual muestra que el factor XIIIa, además de lo mencionado, puede tener un papel en el anclaje del coágulo de fibrina al tejido conectivo. Más aún, la unión del factor XIIIa a fibronectina y colágeno tendría un efecto importante en el proceso de cicatrización y explicaría porque se encuentra una cicatrización defectuosa en algunos pacientes con deficiencia de este factor.<sup>6,11</sup>

### 2.1.3.2 Inhibidores de la coagulación

Lo descrito hasta ahora es la parte procoagulante de la coagulación plasmática cuyo producto final es la formación del coágulo de fibrina. Una vez que el estímulo inicial se ha efectuado, la coagulación se activa y mecanismos de retro-activación pueden estimular la formación de fibrina en una forma masiva. Por lo tanto son de gran importancia los mecanismos que pueden limitar y localizar el proceso de coagulación con el fin de evitar la tendencia a la trombosis localizada o generalizada en forma caótica y desorganizada.<sup>16</sup> Para cumplir con tal fin, existe el sistema de inhibidores de la coagulación; entre las dos tendencias debe haber un equilibrio.

### 2.1.3.3 Inhibidores de proteasas plasmáticas

**Antitrombina III (AT III).** Es una glucoproteína de cadena sencilla, con peso molecular de 60kD aproximadamente, con 432 aminoácidos y cuatro cadenas laterales de oligosacáridos. Se sintetiza en el hígado y su vida media plasmática es de 65 horas. También es producida en las células endoteliales y posiblemente en los megacariocitos. Es el inhibidor fisiológico más importante de la trombina y del factor Xa, pero también actúa sobre los factores IXa, XIa y XIIa, calicreína plasmática y plasmina. En razón que la trombina desempeña una función importante en la coagulación, la inhibición de la primera proporciona una regulación significativa de la formación del coágulo. Un residuo de arginina en AT III interactúa con el residuo de serina activo de la trombina. Este enlace entre inhibidor y enzima produce una pérdida de la actividad enzimática de la trombina. La heparina aumenta en forma marcada la reacción de la enzima AT III por la unión de esta a la molécula de la AT III.<sup>11,17</sup>

**Alfa-1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT).** Es una glucoproteína de cadena sencilla. Esta sustancia inhibe la trombina lentamente in vitro, pero parece ser que a pesar de encontrarse en el plasma en altas concentraciones no contribuye en forma importante en la actividad antitrombótica del plasma. Se piensa que su actividad es más importante en el ámbito tisular.<sup>11</sup>

**Inhibidor C1 (inh-C1).** Es una glucoproteína del plasma de cadena sencilla. Este compuesto, además de inhibir la fracción C1 del complemento, también actúa sobre componentes C1s y C1r y plasmina. También neutraliza la calicreína del plasma, el factor  $\alpha$  XIIIa, factor  $\beta$  XIIa y factor XIa.<sup>11</sup>

**$\alpha$ 2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP).** Es una glucoproteína de cadena sencilla. Efectúa una reacción sumamente rápida de proteína a proteína y es el inhibidor más importante de la plasmina.<sup>11</sup>

**$\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M).** Es una glucoproteína grande tetrámerica. Está compuesta por 4 cadenas polipeptídicas idénticas. Se ha demostrado que la  $\alpha$ 2-M es

la responsable de cerca del 35 al 50% de toda la actividad anticalícreina del plasma y cerca del 25% de toda la actividad antitrombina. Cifras elevadas de  $\alpha$ 2-M en jóvenes proveen protección contra la trombosis en la deficiencia hereditaria de AT III, lo cual explicaría por que no ocurren episodios trombóticos en la vida temprana hasta la edad de 10 a 30 años. Es, además, un inhibidor de la plasmina, pero muy lento si se compara con la  $\alpha$ 2-antiplasmina. Es más un mecanismo de reserva al agotarse la  $\alpha$ 2-antiplasmina una vez se satura esta.<sup>11</sup>

**Co-factor-II heparina (C-II-H).** Este es un compuesto de tipo lipoproteína dependiente de heparina, el cual inhibe a la trombina y ha sido aislado del plasma humano. Es diferente a la AT-III y probablemente idéntico al cofactor- A heparina. Este inhibidor también es activado por dermatán sulfato, el cual se encuentra en la piel y varios tejidos conectivos.<sup>11</sup>

**Proteína C (PC).** Es una glucoproteína vitamina K dependiente sintetizada en el hígado, tiene una vida media plasmática de 6 a 8 horas, y una masa molecular de 62 kD. Es un polipéptido de cadena sencilla de 461 aminoácidos, compuesto de una secuencia líder, un sitio de reconocimiento propeptídico para la gamma-carboxilasa vitamina K dependiente, una cadena liviana y una cadena pesada. La PC debe ser activada por la trombina para convertirse en el principio activo proteína C activada (PCA), por ruptura de una unión entre arginina 169 y leucina 170 y liberación del dodecapéptido de activación de la cadena pesada. La activación más rápida es inducida por el complejo formado por la trombina con un receptor endotelial, la trombomodulina. El principal cofactor de la proteína C es la proteína S. La PCA actúa por proteólisis de los factores Va y VIII:Ca.<sup>11</sup>

**Proteína S (PS).** Proteína dependiente de la vitamina K sintetizada en el hígado, localizada también en las células endoteliales, megacariocitos y en las células de Leydig, con una vida media plasmática de 24 horas. Es una glicoproteína de cadena simple con masa molecular de 69 kD. En un sistema purificado la PS acelera la inactivación del factor Va inducida por PCA en la presencia de  $Ca^{++}$  y fosfolípido. Un efecto anticoagulante de la PS es observado en el plasma al cual se le ha añadido PCA. La prolongación del tiempo de coagulación inducida por PCA es casi abolida cuando el plasma ha sido depletado de PS, pero se restaura cuando se le ha añadido de nuevo al plasma la PS. La proteína S es un factor complementario para la proteína C.<sup>11</sup>

**Inhibidor de la vía del factor tisular.** Se une al complejo del factor tisular en presencia de factor Xa, e inhibe la activación del factor X y también de factor IX.<sup>11</sup>

**Factor tisular.** Trabaja como un co-factor para el factor VIIa en la activación proteolítica dependiente de  $Ca^{++}$  y factores X y IX. El factor VII es el único que exhibe alguna actividad intrínseca en su forma nativa y se puede pensar que adquiere baja actividad de coagulación tan pronto como se une al factor tisular convirtiéndose en un complejo con acción proteolítica por retroactivación. El factor tisular parece estar

distribuido en general en varios órganos pero es especialmente alto en concentración en el cerebro, la placenta y los pulmones. También se puede encontrar con cierto grado de actividad en las paredes de los vasos sanguíneos, en las células endoteliales y en los monocitos.<sup>11</sup>

#### **2.1.3.4 Fibrinólisis**

Una vez que se rompe el equilibrio que existe en el proceso hemostático entre aquellas fuerzas que propenden por la producción de un trombo de plaquetas o de fibrina y aquellas otras fuerzas que pretenden inhibir en un mismo grado la formación de estos últimos, se producirá un fenómeno de trombosis o de fibrinólisis dependiendo del estado que predomine.<sup>18</sup>

A medida que continúa el proceso de agregación plaquetaria, el fibrinógeno, tanto plasmático como el proveniente de las plaquetas, se adsorbe a la superficie plaquetaria, y el proceso agregacional plaquetario, permite la activación progresiva del plasma hasta la producción de trombina, la cual tiene un papel importante no solamente en la conversión de fibrinógeno a fibrina, sino también en la inducción de cambios a nivel de la superficie plaquetaria. La producción de coágulos de fibrina entre plaquetas permite que la fibrina se fije sobre la superficie plaquetaria en receptores específicos y se transmita la fuerza de contracción del citoesqueleto a la red de fibrina produciendo así la retracción del coágulo, haciéndose prácticamente impermeable, afirmando progresivamente el trombo hacia la pared vascular y apartándolo lo más posible de la luz vascular con el fin de evitar la oclusión de este.<sup>10</sup>

En esta forma se sella la solución de continuidad de la pared vascular sin obstrucción de la luz vascular. El proceso fibrinolítico se encargará posteriormente de retirar la fibrina que se ha producido una vez que el proceso de cicatrización se hace efectivo. El proceso metabólico de la célula endotelial tiene como finalidad la producción de la prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina: PGI<sub>2</sub>), la cual tiene una capacidad vasodilatadora potente y bloquea la agregación de plaquetas, por lo tanto limita la producción de trombos sobre la superficie endotelial en los traumas vasculares mínimos.<sup>10</sup> Las reacciones en la célula endotelial se inician también en los fosfolípidos de membrana, los cuales son hidrolizados por las lipasas de membrana de la célula endotelial hacia el ácido araquidónico. La ciclo-oxigenasa convierte el ácido araquidónico a los endoperóxidos cíclicos PGG<sub>2</sub> (prostaglandina G<sub>2</sub>) y el endoperóxido cíclico PGH<sub>2</sub> (prostaglandina H<sub>2</sub>) que mediados por la enzima prostaciclina-sintetasa, producirán prostaciclina (PGI<sub>2</sub>).

A partir de las plaquetas, los endoperóxidos cíclicos PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> pueden pasar desde la plaqueta una vez que estas hacen el proceso de adhesión y reacción, hacia las células endoteliales y contribuir dentro de este ciclo metabólico endotelial, a producir mayores cantidades de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), la cual puede entrar liberándose a la luz del vaso y difundir a través de la membrana plaquetaria, ejerciendo un efecto activador o estimulador de la adenil-ciclasa plaquetaria, que

actúa sobre el ATP y desvía la producción de ADP hacia adenosina-monofosfato cíclico (AMPc); el AMPc es un compuesto que directamente tiene un efecto inhibitor sobre la agregación interplaquetaria, y por otra parte reduce la cantidad de liberación de ADP y otros compuestos de los gránulos.<sup>19</sup> Lo anterior sumado al efecto vasodilatador potente que tiene la prostaciclina, va a proteger al lecho vascular del efecto trombótico; y también se presentan modificaciones en el metabolismo del calcio para completar el proceso inhibitorio de la agregación de plaquetas, observándose cómo las plaquetas que han sufrido el proceso de transformación con cambios en la conformación inicial de la membrana, pueden regresar a su estado inicial normal, su forma discoide, si no han pasado a la fase de agregación secundaria irreversible. Estos serían los mecanismos involucrados en la protección que ejerce para sí mismo el lecho vascular en la producción de trombos.<sup>10</sup>

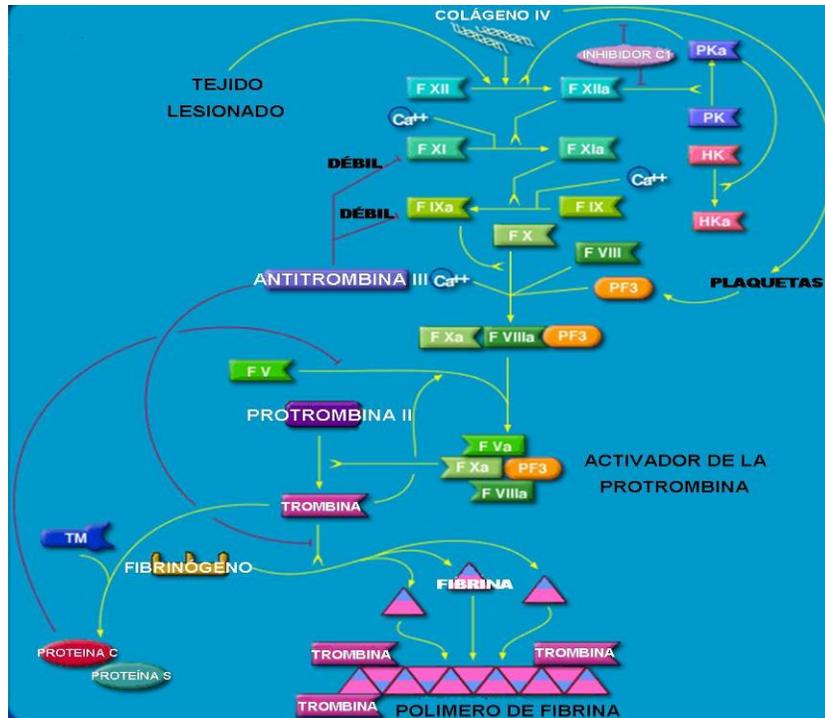
## **2.2 FUNCIÓN Y MECANISMOS DEL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN**

El sistema de coagulación ha sido descrito esquemáticamente a través de los años en forma de “cascada” y se han introducido algunas modificaciones, especialmente en lo relativo a la descripción de nuevos componentes a medida que éstos han sido descubiertos. Básicamente el esquema de la coagulación se ajusta a los postulados de Marowitz, quien en 1905 publicó su histórico documento. Sobre este esquema se trabajó posteriormente hasta que en 1964 Mack Farlane dio a conocer la cascada de la coagulación en la forma como este sistema se ponía en marcha. Algunos pequeños ajustes se han efectuado desde entonces. Es necesario aclarar que el esquema incluye únicamente, aquellos factores que contribuyen a la parte pro-coagulante: en primer lugar la producción de un compuesto que se ha denominado actualmente como complejo protrombinasa. Esta primera fase, que actualmente no se describe aisladamente, está comprendida dentro de la vía intrínseca y de la vía extrínseca del sistema de coagulación. En segundo lugar se efectuará la conversión de protrombina a trombina y en tercer lugar el fibrinógeno se transformará en el coágulo de fibrina.<sup>11</sup>

### **2.2.1 Vía o Sistema Intrínseco Clásico**

Las deficiencias de factores XII, calicreína y cininógeno de alto peso molecular (C-APM), no producen cuadro hemorrágico. Esto hace pensar que la activación del sistema intrínseco, además de la mediación de estos compuestos para su activación, tiene un mecanismo alternativo que funcionaría fisiológicamente en forma correcta. Evidencia experimental sugiere que las plaquetas activadas por el ADP o el colágeno son capaces de inducir la activación proteolítica de los factores XII por la calicreína y el C-AMP y en esta forma el factor XIIa es capaz de activar al factor XI. En la activación del sistema intrínseco, una vez que se presenta el factor XIa, este es capaz de obrar sobre el factor IX en la presencia de  $Ca^{++}$  convirtiéndose en factor IXa, el cual es capaz de catalizar la activación del factor X a factor Xa. Esta última

reacción se lleva a cabo, además, con la presencia del factor VIII, el  $\text{Ca}^{++}$  y el fosfolípido factor 3 (F3) que tiene como origen especialmente la plaqueta, por lo tanto se efectúan sobre la superficie de las plaquetas. Es importante recalcar en este punto que la activación del factor X inicia la vía común del sistema intrínseco: es el factor X donde convergen las vías intrínseca y extrínseca, y de allí en adelante hasta llegar a la conversión de fibrinógeno a fibrina.<sup>20</sup> (Figura 1).

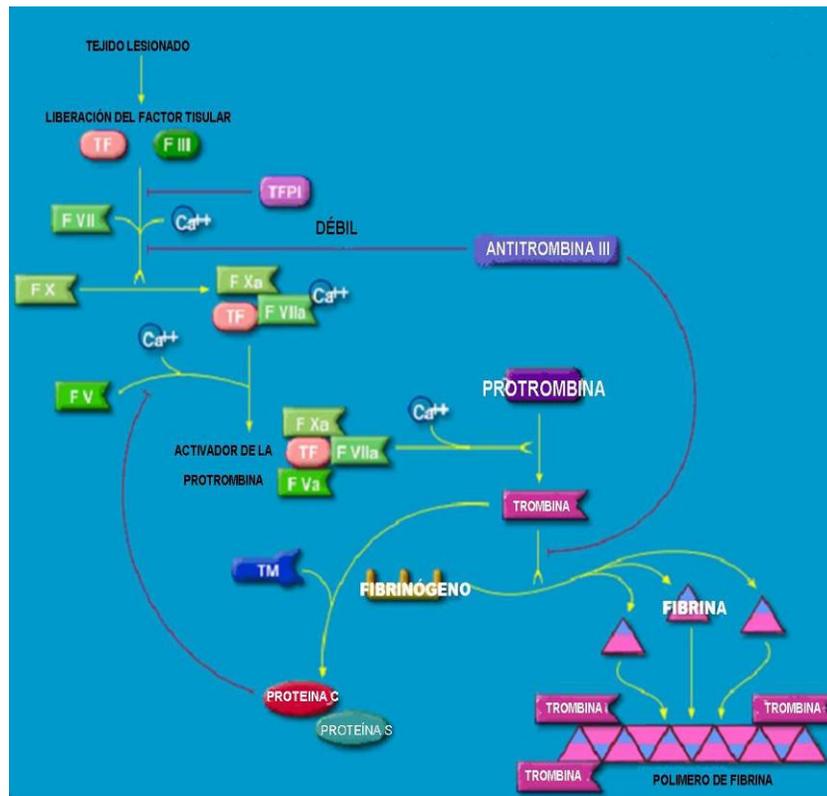


**Figura 1. Vía o Sistema Intrínseco de la Coagulación**

### 2.2.2 Vía o Sistema Extrínseco Clásico

Este sistema contiene el único factor no plasmático de la cascada de la coagulación, el factor tisular, que activa al factor VII, el único factor independiente del sistema extrínseco y que no queda por lo tanto incluido en la vía común. Esta vía activa el factor VII a través del factor tisular en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Luego de la activación del factor VII, este junto con el factor tisular, se unen para activar al factor X de la vía común. La actividad coagulante del factor VII, aun en presencia de factor tisular, es muy baja y aumenta considerablemente al convertirse en factor VIIa.<sup>20</sup> Es probable que algún compuesto o proteasa sea capaz de activar el factor VII in vivo y que no se encuentre en contacto necesariamente con el factor tisular, puesto que la deficiencia de factores de la coagulación exclusivos del sistema intrínseco producen cuadros hemorrágicos severos en ocasiones, al igual que deficiencias de factor VII

también pueden incluir tendencia hemorrágica, lo cual indica que sin lugar a dudas los sistemas clásicos extrínseco e intrínseco solos, no son capaces de ofrecer una hemostasia normal y suficiente en forma independiente.<sup>21</sup> (Figura 2).

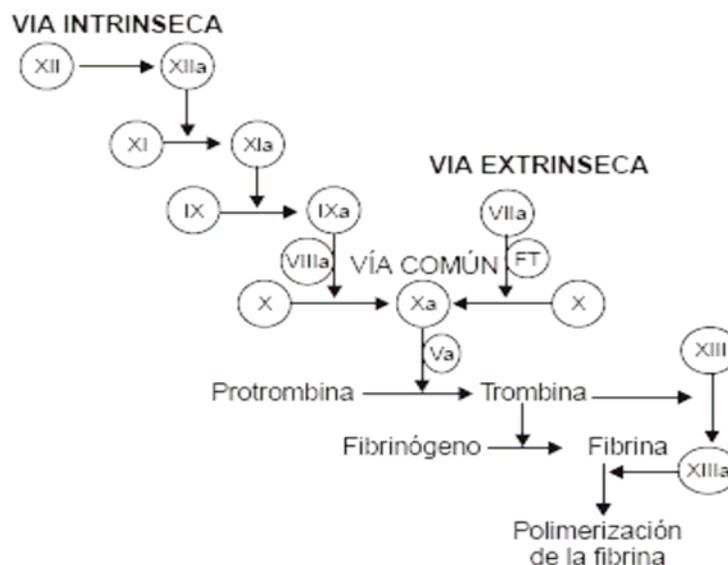


**Figura 2. Vía o Sistema Extrínseco de la Coagulación**

### 2.2.3 Vía Clásica Común

La vía clásica común comprende las últimas dos fases definitivas en la coagulación del plasma: la conversión de la protrombina a trombina y la transformación del fibrinógeno a coágulo de fibrina por acción de la trombina y la estabilización del coágulo por el factor XIIIa (Figura 5). En la vía común el factor Xa se une a la plaqueta aprovechando al factor V, para la activación del factor V este debe ser unido a la plaqueta adsorbiéndose a su superficie, a partir del plasma, para luego ser activado por una proteasa plaquetaria o puede también ser liberado en su forma activada de la misma plaqueta a partir de sus gránulos. Las plaquetas no estimuladas por lo tanto unen factores Va y Xa en la presencia de  $Ca^{++}$  y el factor V puede servir por lo menos en parte como receptor del factor Xa en la superficie plaquetaria. Este complejo formado por los factores Xa y Va en la superficie plaquetaria junto con los fosfolípidos de membrana (F3),  $Ca^{++}$  y protrombina,

constituyen el complejo de la protrombinasa. Se debe recordar que el factor Va también ha pasado a este punto de activación gracias a pequeñas cantidades de trombina, compartiendo con el factor VIII esta cualidad de poder ser activado por este compuesto en pequeñas cantidades, constituyendo el ciclo auto catalítico de la protrombina. El complejo Xa-Va-Ca<sup>++</sup>-F3 y protrombina divide las moléculas de protrombina en dos partes: una que contiene los residuos de ácido carboxiglutámico y que permanecen unidos en forma transitoria a las plaquetas a través de puentes de calcio, y otra parte se libera hacia el plasma como trombina, que es una enzima proteolítica, que tiene unas funciones específicas que cumplir, como agregante plaquetario local, induciendo uniones del complejo de factor VIII a las plaquetas, y además activando la fracción VIII:C a VIII:Ca y V a Va. También activa el factor XIII en presencia de Ca<sup>++</sup> a factor estabilizador de la fibrina (factor XIIIa) y continúa el proceso de coagulación en la conversión del fibrinógeno hacia el coágulo de fibrina. La trombina activa la PC a PCA, y esta acción se hace más intensa sobre el endotelio vascular que contiene trombosmodulina (excepto en el cerebro).<sup>3,11</sup>



**Figura 3. Vía Clásica Común**

### 2.2.4 Sistema Fibrinolítico

La enzima fibrinolítica plasmina, es la forma activa de la sustancia inactiva que circula en el plasma, el plasminógeno. Este último es adsorbido sobre los polímeros del coágulo de fibrina, y a partir de las células endoteliales, entran en circulación enzimas activadoras del plasminógeno (activador del plasminógeno tisular), las cuales se unen a los polímeros de fibrina y transforman el plasminógeno unido a la fibrina, en plasmina. La plasmina que permanece formando un complejo unido a la fibrina, ejerce su acción sobre ésta, degradándola en fragmentos solubles que

continúan en la circulación. También el sistema intrínseco puede, una vez que se produce calicreína después de la activación de esta vía, obrar sobre el plasminógeno unido a la fibrina para convertirlo en plasmina y así, el complejo que continúa formándose entre fibrina y plasmina produce degradación del polímero de fibrina. La uroquinasa es un activador endógeno del plasminógeno producido en los lisosomas del endotelio glomerular del riñón. También hay activadores exógenos como la enzima estreptoquinasa, la cual puede también unirse al plasminógeno circulante formando un complejo y estos activadores exógenos se activan sin producirse lisis protéica.<sup>11</sup> Estos complejos plasminógeno-estreptoquinasa son capaces de hidrolizar otras moléculas de plasminógeno circulante a plasmina. Los productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina tienen propiedades antitrombóticas y los fragmentos D y E forman complejos con los monómeros de fibrina, evitando la polimerización de éstos, lo cual se traduce en un efecto anticoagulante. Además pueden destruir también factores V y factor VIII:C. Con el fin de evitar este efecto destructivo el plasma posee los inhibidores de la plasmina: la  $\alpha_2$ -antiplasmina, la cual se une de inmediato a las moléculas de plasmina que pudiesen encontrarse libres en circulación, formando un complejo inactivo. La  $\alpha_2$ -antiplasmina opera rápidamente.<sup>20</sup> La  $\alpha_2$ -macroglobulina también tiene la capacidad de inhibir la plasmina formando complejo con ésta, pero más lentamente. Tanto el mecanismo protrombótico-procoagulante, como el sistema fibrinolítico, trabajan en forma continuada a un nivel fisiológico adecuado para mantener la sangre, más precisamente el plasma, en su estado fluido. Alteraciones de éstos ocasiona la anomalía en la hemostasia. Estos dos grandes oponentes se encuentran en estado dinámico permanente.<sup>6</sup> (Figura 4).

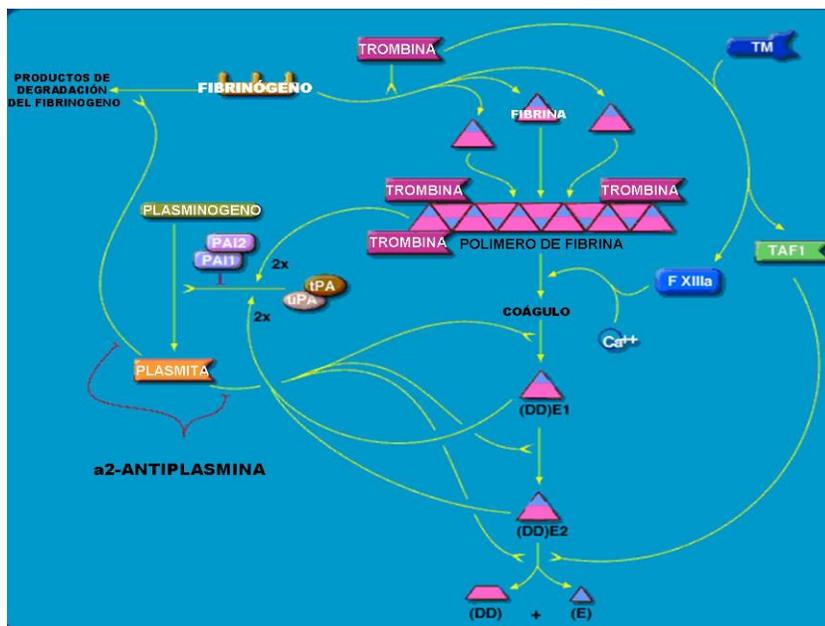


Figura 4. Sistema Fibrinolítico

### 3. EL MECANISMO DE COAGULACIÓN EN LOS PACIENTES CON CÁNCER

#### 3.1 CÁNCER Y TROMBOSIS

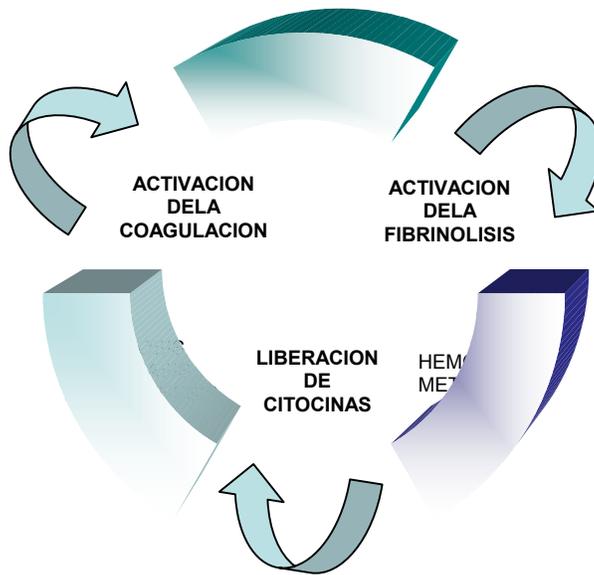
El proceso neoplásico se encuentra asociado a la activación de la coagulación y fibrinólisis así como también a eventos trombóticos.<sup>22</sup> Avances en bioquímica, biología molecular y de manera importante en biología vascular, han contribuido para el mejor entendimiento de las complejas interacciones entre las células tumorales y el sistema de la hemostasia.

Las células tumorales producen y expresan moléculas que pueden activar directa o indirectamente el sistema hemostático debido en parte a la reacción inflamatoria que producen en el huésped. Factores extrínsecos incluyendo la cirugía y quimioterapia contribuyen a su vez al desarrollo de un estado pre-trombótico.<sup>23</sup> Evidencias recientes apuntan a que la activación de la coagulación inducida por células tumorales involucra la angiogénesis, lo cual, favorece al crecimiento tumoral y metástasis y abre una vía importante (el vaso sanguíneo) para la circulación de moléculas inflamatorias, que finalmente estimulan la coagulación y esto a su vez condiciona el desarrollo de un estado pre-trombótico.<sup>24</sup>

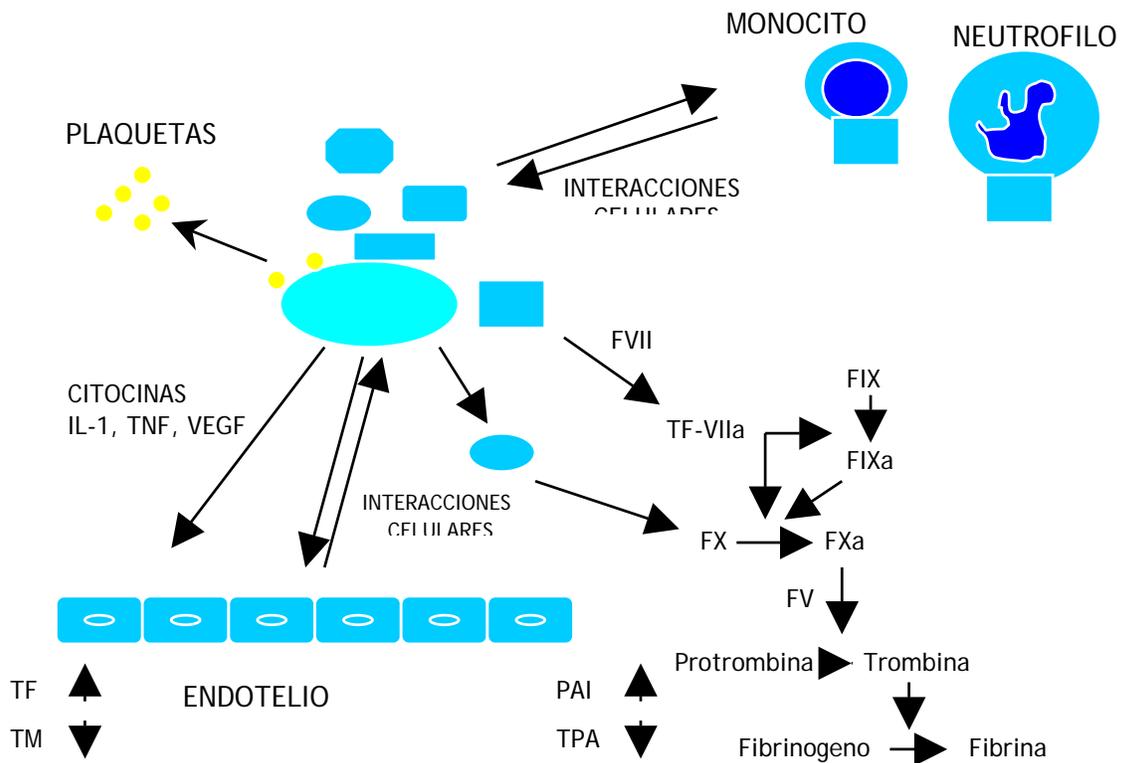
Ciertos tipos de tumores activan la coagulación de una manera anormal, incluyendo entre otros, los tumores de origen pancreático, gastrointestinal, de ovario, de la próstata y pulmonar.<sup>2,25</sup>

Las células tumorales tienen la capacidad de expresar en su membrana celular ligandos (que se utilizan como marcadores) que liberan factores solubles con propiedades trombóticas. En la literatura se han descrito un número significativo de factores con propiedades trombóticas pero dos se han estudiado en particular, el factor tisular (FT) y el factor procoagulante del cáncer (PC).<sup>26</sup> Además, las células tumorales producen citocinas, como el factor de necrosis tumoral, la interleucina-1 y el factor de crecimiento vascular endotelial. La angiogénesis inducida por neoplasia es un requerimiento esencial para el crecimiento tumoral. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular es uno de los factores con un papel importante en la angiogénesis tumoral.

La respuesta inflamatoria al proceso tumoral, también activa citocinas mediadoras del fenómeno trombótico. De las citocinas arriba mencionadas, además de desarrollar una respuesta inflamatoria agresiva, inducen la expresión de factor tisular, disminuyen la activación de la proteína C y activan las plaquetas, estas últimas contienen factores de crecimiento y moléculas adhesivas en sus gránulos-alfa. Todas estas reacciones promueven la génesis del evento trombótico.<sup>27</sup> (Figuras 5 y 6).



**Figura 5. Eventos cíclicos en el proceso maligno y activación de la coagulación y fibrinólisis.** Del Carpio F, DeLa Cadena R, Cervera E. Alteraciones Hemostáticas en el paciente con cáncer. Archivos Mexicanos de Laboratorio LABORAT-acta. (Trimestral) 2005.<sup>28</sup>



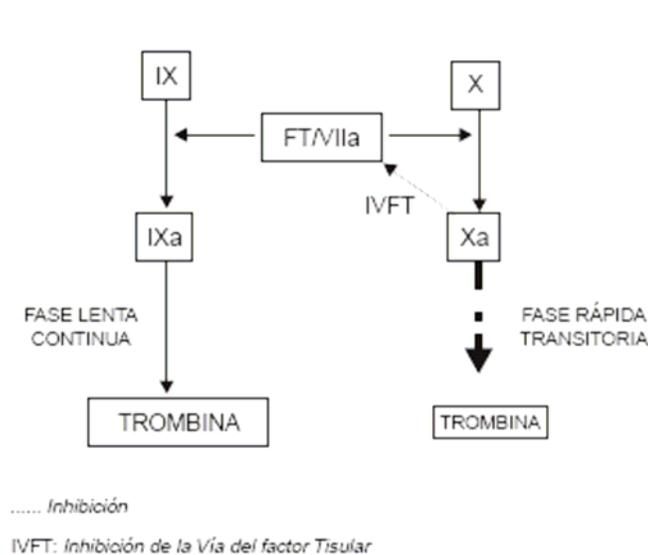
**Figura 6. Mecanismos de activación de la coagulación en el paciente con cáncer.** Del Carpio F, DeLa Cadena R, Cervera E. Alteraciones Hemostáticas en el paciente con cáncer. Archivos Mexicanos de Laboratorio LABORAT-acta. (Trimestral) 2005.<sup>28</sup>

Los factores predisponentes de mayor importancia para el desarrollo de los fenómenos tromboticos de mayor importancia en pacientes con cáncer son:

- El reposo prolongado.
- Estásis por efecto compresivo de la masa tumoral sobre las estructuras vasculares, que hace más lento el flujo sanguíneo, especialmente a nivel del sistema venoso determinando lesión endotelial, liberación de sustancias procoagulantes del endotelio (factor tisular) y activación del mecanismo extrínseco de la coagulación y de las plaquetas.<sup>29</sup>
- Liberación de sustancias tumorales: el material tisular liberado por el tumor es capaz de activar directamente la cascada de la coagulación. Se han descrito factores dependientes de tumores colónicos, gástricos, renales y pulmonares, por citar algunos, que activan el factor X de la coagulación. En un principio, los productos con actividad procoagulante eran denominados genéricamente como tromboplastino-símiles. Más recientemente se han caracterizado dos sustancias principalmente responsables de activar los mecanismos de la coagulación: el factor tisular (FT) y el llamado factor procoagulante del cáncer.<sup>29</sup> Como es conocido, el FT se encuentra en varios tejidos incluyendo el cerebro, el pulmón y la placenta donde su concentración es mayor. El daño sobre el tejido produce la liberación del FT y se desencadena el mecanismo extrínseco de la coagulación. El FT es una proteína contenida en la membrana celular y sirve de ligando para el factor VII, y lo activa a factor VII activado (FVIIa) formando, en condiciones normales, un complejo FT / FVIIa constituyéndose en el activador del sistema extrínseco de la coagulación. El FT fue hallado en extractos tumorales, en cultivos de células tumorales y en el suero y orina de pacientes con cáncer. También los granulocitos, en la leucemia granulocítica crónica, son capaces de liberar sustancias procoagulantes. Muchos tumores tienen infiltrados de macrófagos que contribuyen a aumentar la activación del FT. Finalmente, el FT puede ser liberado por los monocitos activados por las células tumorales.<sup>29,30</sup> (Figura 7).

El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) es un regulador importante de la coagulación extrínseca pero su papel potencial en la trombosis, en caso de encontrarse funcional o cuantitativamente descendido, es aún discutido.<sup>30</sup> El TFPI se une al factor X activado e inhibe la actividad procoagulante del complejo FT / FVIIa. Su concentración se halló en niveles variables en pacientes con cáncer.<sup>31</sup> El TFPI es esencialmente una proteína intravascular y esta presente en tres compartimentos separados: a) en las plaquetas (8 ng/mL) de las que puede ser liberado cuando estas son activadas por la trombina y ello determina que su concentración se eleve en los sitios de agregación plaquetaria; b) asociado a las lipoproteínas del plasma (54 - 142 ng/mL) y c) el liberado por la inyección de heparina de donde proviene (120 a 800 ng/mL).<sup>32</sup> La disminución de TFPI puede favorecer la acción procoagulante del sistema extrínseco en la medida que no se encuentre inhibida la formación del complejo FT / FVIIa (Figura 7).

El Factor Procoagulante del Cáncer es una sustancia de 68.000 daltons de peso molecular que activa la vía común de la coagulación por acción directa sobre el factor X y lo transforma en factor X activado (FXa). Es una enzima encontrada en ciertos extractos de células neoplásicas pero no ha podido ser aislada en los cultivos de líneas celulares homólogas a las de "in vivo". Se debe tener presente que las observaciones realizadas en una clase o localización tumoral y en ciertas condiciones experimentales, no pueden ser extrapoladas a otra enfermedad maligna, lo cual complica enormemente la interpretación de muchos de los datos experimentales disponibles.<sup>29</sup>



**Figura 7. El Factor Tisular (FT) es el iniciador de la coagulación.** Al formar el complejo FT/VIIa actúa sobre el factor X y el factor IX. La activación del factor X genera la fase rápida de la formación de trombina sin embargo es transitoria por la presencia del IVFT que bloquea la activación y la generación de mayores dosis de trombina. Por lo que se requiere de una vía alterna que se genera sobre la superficie de las plaquetas, fase lenta pero continua y en esta vía alterna se producen grandes cantidades de trombina, suficientes para producir el coágulo de fibrina.

- Activación plaquetaria: la agregación plaquetaria más potente es la que se produce por la trombina, que activa a la fosfolipasa C por un mecanismo dependiente de la guanosina trifosfato, dando lugar a la formación de 2 segundos mensajeros: el inositol 1, 4, 5 trifosfato que actúa como ionóforo de calcio liberando este catión del sistema tubular denso, aumentando así su concentración en el citosol y el diacilglicerol que junto al calcio activa a la proteincinasa C. Otro mecanismo de aumento de la adhesividad y agregación plaquetaria se produce por la liberación a partir de las células tumorales, de ADP y tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>33,34,35</sup> Las plaquetas activadas participan en la formación del trombo y también en el crecimiento de las células tumorales probablemente a través de la liberación de factores de crecimiento celular derivado de las plaquetas (PDGF).

- Disminución de inhibidores: se produce un descenso en la concentración plasmática de los inhibidores de la coagulación que favorece el mecanismo de trombosis, ya sea como producto del consumo por la trombina formada o de una disminución real de su producción. La antitrombina III neutraliza el factor X activado y a la trombina formando con esta última un complejo equimolar sin actividad biológica, detectable en el plasma como complejo trombina-antitrombina III y cuya concentración nos da idea de la cantidad de trombina que se hubiera formado. La formación de este complejo determina la disminución en la concentración plasmática de la antitrombina III y puede contribuir a la tendencia trombótica. La proteína C y su cofactor, la proteína S, son proteínas Vitamina K dependientes. Contrariamente a los otros factores Vitamina K dependientes procoagulantes II, VII, IX y X; la proteína C actúa como un regulador de la coagulación al neutralizar a los cofactores V y VIII activados y al estimular la fibrinólisis por su capacidad de bloquear al inhibidor del activador tisular del plasminógeno. La activación de la proteína C se realiza a través de la trombomodulina activada a su vez por la trombina. Tanto las proteínas C y S como la trombomodulina pueden estar disminuidas en los pacientes con cáncer lo que constituye un factor trombogénico adicional. Ya se ha indicado la posibilidad de una disminución del TFPi como otro factor contributivo para el desarrollo de trombosis en los pacientes con patología maligna.<sup>36</sup>

- Infiltración tumoral a estructuras vasculares
- Cirugía abdominal
- Hiperviscosidad sanguínea.

Otros factores predisponentes descritos son la colocación de catéteres intravenosos, la deshidratación secundaria a los efectos colaterales de la quimioterapia como la emesis y la diarrea y la presencia de niveles elevados de fibrinógeno y de otros factores de coagulación como los factores I, V, VIII, IX, XI; que no significan por sí mismos un estado trombofílico pero que sin embargo, tan pronto aparecen tiempos de coagulación alargados o cortos, asociados con una disminución en los niveles de antitrombina III y un aumento de los productos de degradación del fibrinógeno y/o dímero D en un paciente asintomático, con historia actual o pasada de cáncer, debe alertar sobre la presencia de un proceso trombótico.

### **3.1.1 Los factores trombogénicos en el cáncer**

#### **3.1.1.1 Factores de la coagulación**

El significado del estado de activación de la coagulación de los pacientes con cáncer tiene una importancia biológica trascendente por que puede contribuir a la progresión de la enfermedad. Cuando se valora el mecanismo de hemostasia en las neoplasias, se puede establecer claramente que existe un estado de activación.<sup>37</sup> Es

así que Van-Wersch y col.<sup>38</sup> estudiaron 48 pacientes con diagnóstico reciente de carcinoma pulmonar (40 hombres, 8 mujeres) en relación a sus valores del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), del tiempo de protrombina (TP), de la concentración del fibrinógeno plasmático, de la concentración del factor VIII de la coagulación, de los monómeros de fibrina (MF), del complejo trombina/antitrombina III (TAT), de los productos de degradación de la fibrina estabilizada (dímero D) y del recuento plaquetario. 38 pacientes tuvieron el tiempo de tromboplastina parcial activado normal y 37 pacientes tiempo de protrombina normal. Ninguno de los pacientes tenía indicadores clínicos o de laboratorio de hemorragia grave o trombosis. Encontraron en cambio, valores elevados de fibrinógeno y de la concentración del factor VIII, considerados factores protrombóticos. También un alto porcentaje tenían elevación de monómeros de fibrina, complejo trombina/antitrombina III y dímero D, fuertemente indicativos de activación de coagulación de bajo grado y fibrinólisis reactiva, a pesar de lo cual los pacientes mantenían su función hemostática normal. El desbalance de este equilibrio puede explicar las complicaciones trombóticas que describen estos pacientes. Ese desbalance puede producirse por factores orgánicos recurrentes o por la misma terapéutica antineoplásica. La tríada en que se basa el mecanismo trombogénico descrita por Virchow hace más de 100 años, mantiene aún todo su valor etiológico. Si bien el aumento de los factores de la coagulación no es determinante de por sí de trombosis, es un predisponente trombogénico y al producirse la activación de estos factores inclina la homeostasis hemostática hacia la trombosis.<sup>39</sup>

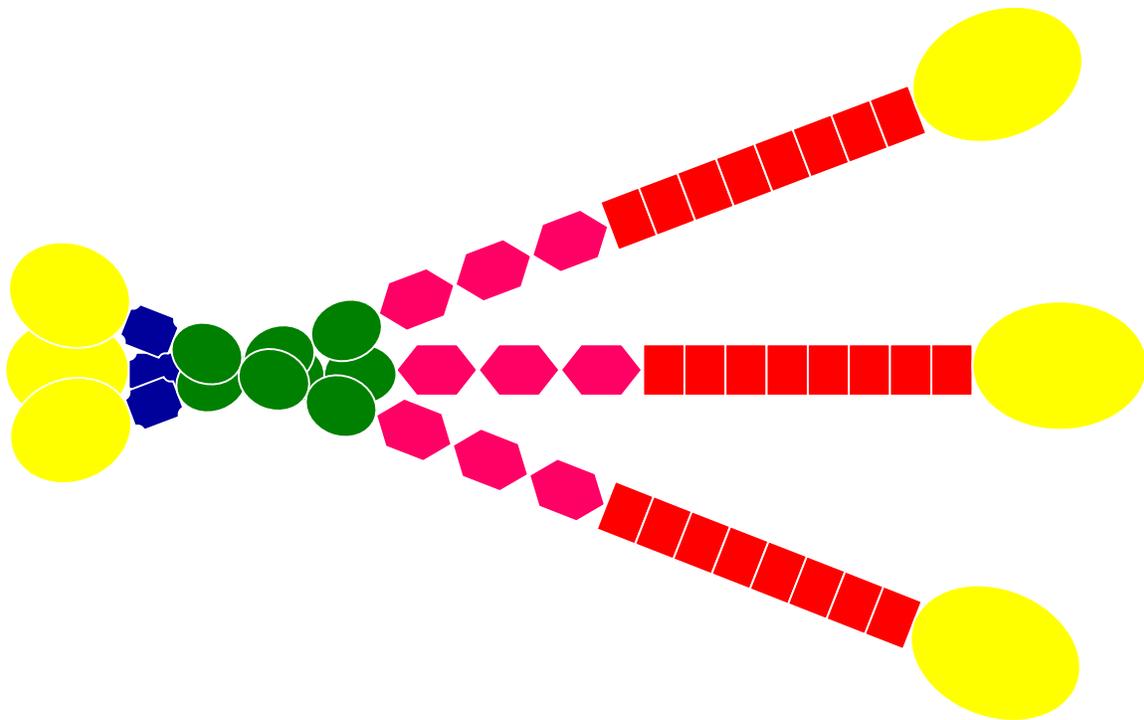
### **3.1.1.2 Trombospondina-1**

Aunque la trombosis es la principal complicación de los tumores sólidos, la hemorragia también puede representar un serio problema en este grupo de enfermos. La coagulación intravascular diseminada (CID) presente en muchos pacientes con cáncer tiene varias expresiones clínicas: trombosis local, trombosis difusa, tromboembolismo, hemorragia menor, hemorragia difusa o cualquier combinación de las mismas. La mayoría de los pacientes con neoplasia sólida diseminada tienen alguna evidencia clínica o de laboratorio de CID, la cual es iniciada por la liberación de material procoagulante semejante a Tromboplastina o enzimas provenientes de células tumorales necróticas, lo cual puede iniciarse o acelerarse con la administración del tratamiento antineoplásico.<sup>32,40,41</sup>

Estas alteraciones pueden verse en la mayoría de los tumores sólidos, principalmente en carcinoma de pulmón, vejiga, estómago, colon, mama, ovario, melanoma maligno y en especial carcinoma de páncreas y próstata, así como en linfomas. En los adenocarcinomas de cualquier sitio primario, el ácido siálico de la mucina secretada activa de forma no enzimática al factor X, lo cual dispara la producción sistémica de trombina y posteriormente el inicio de una CID subaguda o fulminante.<sup>27,42</sup> La liberación sistémica de tejido tumoral necrótico o enzimas con actividad procoagulante o semejante a fosfolipoproteínas, puede activar las fases tempranas de la coagulación y de la liberación plaquetaria. Además, varios tumores

que presentan neovascularización pueden potencialmente producir células endoteliales anormales, lo cual puede causar liberación plaquetaria o generación de factores XIIIa y XIa con la consiguiente activación procoagulante y el desarrollo de CID fulminante, subclínica o compensada.<sup>12,13,43</sup>

Debido a este estado procoagulante y de liberación plaquetaria se encuentran circulando en sangre diferentes sustancias como la trombospondina-1 (TSP-1), que es la glucoproteína más grande secretada por los gránulos alfa de las plaquetas y que se une parcialmente a la membrana plaquetaria cuando las plaquetas se agregan en respuesta a la trombina.<sup>44</sup> La TSP-1 es una proteína filamentosa de 165 kD que tiene 7 x 65nm de dimensión, tiene un punto isoeléctrico de 4.7 y esta compuesta de 3 grandes subunidades de unión disulfídica.<sup>45,46</sup> (Figura 8).



**Figura 8. Estructura de la Trombospondina-1.** Isordia-Salas I, Manns JM, Sainz I, Parekh H, DeLa Cadena RA. Thrombospondin-1 binds to the heavy chain of elastase activated coagulation factor V (FVaHNE) and enhances thrombin generation on the surface of a promyelocytic cell line. *Thromb Res.* 2005;116:533-43.<sup>47</sup>

Durante el proceso de agregación, las plaquetas estimuladas por la trombina desarrollan una actividad de lectina unida a membrana que se origina de los gránulos alfa y juega un papel importante en la mediación de la agregación plaquetaria por unión a receptores específicos en otras plaquetas.<sup>2</sup>

Así mismo, se ha visto por décadas que la activación de la coagulación está invariablemente ligada a la respuesta inmuno-inflamatoria in vivo y que la inflamación

sistémica es un potente estímulo pretrombótico.<sup>21,42</sup> La elastasa humana del neutrófilo (HNE) es una enzima normalmente restringida a los gránulos azurófilos primarios de los neutrófilos,<sup>48</sup> y es liberada al fagosoma y al medio extracelular por la activación del neutrófilo. La HNE ha sido implicada en la patogénesis de desórdenes inflamatorios como enfisema pulmonar,<sup>49</sup> fibrosis cística,<sup>50</sup> glomerulonefritis,<sup>51</sup> artritis reumatoide<sup>52</sup> y en algunos tipos de leucemias incluyendo la leucemia promielocítica aguda. La TSP-1 es una proteína de matriz extracelular multifuncional sintetizada y secretada por células normales y transformadas en cultivo incluyendo fibroblastos,<sup>53</sup> células endoteliales,<sup>12</sup> células del músculo liso<sup>54</sup> y plaquetas.<sup>55</sup> En estudios preliminares<sup>47</sup> se ha demostrado la habilidad de la TSP-1 de unirse al factor V humano de la coagulación (FV); otros estudios han indicado que la TSP-1 es capaz de interactuar con otros ligandos incluyendo el plasminógeno, el fibrinógeno y la fibronectina.<sup>56</sup>

Se ha demostrado también que la activación de la coagulación está ligada a la respuesta inflamatoria. Los neutrófilos y monocitos representan la primera línea de defensa durante la respuesta inflamatoria. Recientemente se ha delineado una región dentro de las repeticiones tipo 3 de la TSP-1 que tiene la habilidad de interactuar con neutrófilos humanos.<sup>46,57</sup> Esta región es contigua a la región que tiene la habilidad de inhibir la elastasa humana de los neutrófilos.<sup>58,59</sup> Se ha demostrado que la HNE ancla al factor V al factor FVHNE, proveyendo al FV con actividad de cofactor (FVHNE) y por ende promoviendo la generación de trombina del complejo protrombinasa en la presencia de vesículas de fosfolípidos.<sup>60</sup> La protrombinasa comprende el complejo de factores Xa (FX), Va, superficie de membrana y iones de  $Ca^{++}$ . El papel funcional del complejo protrombinasa es catalizar la conversión de protrombina (FII) en trombina. El complejo protrombinasa lleva a la generación de factor X activado (FXa) y trombina, llevando potencialmente a la activación celular al igual que a la proliferación celular.<sup>61</sup> La trombina tiene una variedad de actividades sobre las células que resultan en el aumento de la respuesta inflamatoria.<sup>62</sup>

Se ha demostrado que el complejo protrombinasa está ensamblado sobre la superficie de muchas células incluyendo las plaquetas y los monocitos;<sup>63,64</sup> y que la TSP-1 juega un papel importante. La formación del complejo protrombinasa en la superficie de los neutrófilos y monocitos es de relevancia en las neoplasias ya que llevara a la generación de factor X activado y la trombina, llevando potencialmente a la activación de células endoteliales y formación de fibrina (estado procoagulante). Hay evidencia que la TSP-1 se une al inhibidor de la vía del factor tisular,<sup>65</sup> un evento que ha sido asociado in vitro con una disminución en la habilidad del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) de inhibir al FXa por ende causando alteraciones en la regulación de la trombina lo cual resulta en un exceso en la generación de trombina.

### 3.1.1.3 Selectinas

De igual manera para el entendimiento del estado procoagulante que está presentando el paciente es útil estudiar a las selectinas. Las selectinas median el primer paso en la adhesión de los leucocitos en los sitios de inflamación o de injuria; facilitan el rodamiento de los leucocitos sobre la superficie endotelial de las plaquetas o de otros leucocitos. En consecuencia, los leucocitos circulantes se unen a las selectinas expresadas en las vénulas del endotelio activado y si bien esta unión es relativamente baja, es suficiente para funcionar como un freno biológico que desacelera y facilita el rodamiento de los leucocitos sobre la célula endotelial; las selectinas interactúan con ligandos de carbohidratos en los leucocitos y en las células endoteliales. Se han identificado tres moléculas diferentes: L- (marcador de activación del leucocito), E- (marcador de activación del endotelio) y P- (marcador de activación de las plaquetas) selectinas, las cuales participan en los sistemas vascular y hematopoyético.<sup>20</sup>

La L-Selectina es una glucoproteína expresada constitutivamente en una variedad de leucocitos. Miembro de la familia de las selectinas sobre las moléculas de superficie, la L-Selectina consiste de una lectina aminoterminal por medio de la cual se unen a sus ligandos naturales tipo carbohidratos o glucopéptidos no proteínas; estructuralmente contienen un dominio tipo EGF, 2 a 9 dominios tipo proteínas reguladoras del complemento y una cola citoplasmática corta. Se han reportado dos formas de L-selectina, debidas a aparentemente a modificaciones post-transicionales. La forma linfocítica tiene un aparente peso molecular de 74 kDa, mientras que la forma del neutrófilo tiene un peso de 95-100 kDa.<sup>11</sup>

La L-Selectina juega un papel importante en la migración de los linfocitos hacia los nódulos linfáticos y sitios de inflamación crónica y de los neutrófilos hacia los sitios de inflamación aguda. Actuando en cooperación con la P-Selectina, la L-Selectina media la interacción inicial de los leucocitos circulantes con las células endoteliales que produce el característico “rodamiento” de leucocitos sobre el endotelio. Esta interacción inicial es seguida por una interacción más fuerte, que involucra probablemente a la E-Selectina, que conduce eventualmente a extravasación a través de la pared de los vasos sanguíneos a los tejidos linfoides y a los sitios de inflamación. Se han identificado tres ligandos de la L-Selectina sobre las células endoteliales, todos contienen mucina O-glicosilada o dominios semejantes a mucina. El primer ligando, el GlyCAM-1, se expresa casi exclusivamente en nódulos linfáticos periféricos y mesentéricos de vénulas endoteliales altas. El segundo ligando de la L-Selectina, se conoce como CD34. Esta glucoproteína similar a las sialomucinas muestra expresión vascular en una variedad de tejidos no linfoides, al igual que en nódulos linfáticos periféricos de capilares. El tercer ligando es el MAdCAM-1, una glucoproteína semejante a la mucina que se encuentra sobre nódulos linfáticos mucosos de vénulas endoteliales altas.<sup>11</sup>

La L-Selectina es liberada por clivaje proteolítico de la superficie de linfocitos y neutrófilos in vitro seguida de la activación de una variedad de agentes como forbol ésteres, lipopolisacáridos y f-met-leu-phe. In vivo, la L-Selectina es liberada de los neutrófilos durante la inflamación y se ha sugerido que la pérdida de L-Selectina de superficie puede ser necesaria para permitir que los leucocitos migren a través del endotelio. La L-Selectina soluble (sL-Selectina) derivada de los linfocitos es de alrededor de 62 kDa, mientras que el fragmento derivado de los neutrófilos es de 75 - 100 kDa. La sL-Selectina retiene bioactividad y a altas concentraciones puede inhibir la unión de los linfocitos al endotelio, sugiriendo un posible papel en la modulación de esta unión in vivo. Se han encontrado altos niveles de sL-Selectina en muestras tomadas de individuos aparentemente normales. Un número de estudios han reportado que los niveles de sL-Selectina en fluidos biológicos pueden estar elevados o disminuidos en individuos con una variedad de condiciones patológicas.<sup>20</sup>

La P-Selectina es una glicoproteína de superficie que juega un papel crítico en la migración de los linfocitos a los tejidos. La P-Selectina se encuentra constitutivamente en un estado pre-formado en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas. Esta P-Selectina almacenada es movilizada a la superficie celular en minutos en respuesta a una variedad de agentes inflamatorios o trombogénicos. La P-Selectina movilizada aparentemente permanece presente sobre la superficie celular solo unos minutos después y es reciclada en los compartimentos celulares. Evidencia adicional indica que la transcripción del mRNA de la P-Selectina puede ser activada en el endotelio por tratamiento con mediadores inflamatorios. La P-Selectina, es un miembro de la familia de Selectinas de moléculas de superficie celular y consiste de una lectina aminoterminal por medio de la cual se unen a sus ligandos naturales tipo carbohidratos o glicopéptidos no proteínas; estructuralmente contienen un dominio tipo EGF, 2 a 9 dominios tipo proteínas reguladoras del complemento y una cola citoplasmática corta. El peso molecular para el cDNA de la P-Selectina es de aproximadamente 86,000. El peso molecular observado por SDS-PAGE reducido, sin embargo, es de 140,000.<sup>20</sup>

Numerosas evidencias indican que la P-Selectina está involucrada en la adhesión de células mieloides, al igual que de células B y un subtipo de células T, para activar el endotelio. También esta involucrada en la adhesión de plaquetas a monocitos y neutrófilos, jugando un papel central en la acumulación de neutrófilos dentro del trombo. La adhesión de leucocitos y neutrófilos al endotelio es iniciada por interacciones débiles que producen un movimiento característico de “rodamiento” de los leucocitos y neutrófilos sobre la superficie endotelial. La P-Selectina actuando en cooperación con la L-Selectina, está implicada en la mediación de estas reacciones iniciales. Interacciones más fuertes, que involucran probablemente a la E-Selectina, siguen a las reacciones iniciales, llevando inicialmente a la extravasación a través de las paredes de los vasos sanguíneos a los tejidos linfoides y a los sitios de inflamación. El tetrasacárido siálico Lewis ha sido identificado como un ligando tanto

para la P-Selectina como para la E-Selectina, pero tanto P, E y L selectinas pueden todas unir al tetrasacárido siálico Lewis bajo condiciones apropiadas. La P-Selectina también puede unir una glicoproteína sobre células mieloides humanas, neutrófilos, monocitos y linfocitos, esta glicoproteína se denomina Ligando-1 de la glicoproteína de la P-Selectina (PSGL-1) y este ligando también puede unir a la E-Selectina. La P-Selectina se encuentra en el plasma de individuos normales en concentraciones de ng/mL.<sup>20</sup>

La E-Selectina es un glicoproteína transmembranal tipo-I de 115KDa, expresada solamente sobre la superficie de las células endoteliales y solamente después de la activación de citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) o endotoxinas. La expresión es transitoria, alcanzando su máximo dentro de las 6 horas después de la estimulación y declina posteriormente. La E-Selectina de superficie celular es un mediador del rodamiento de unión de los leucocitos al endotelio, un paso esencial en la extravasación de leucocitos al sitio de inflamación y por ende juega un papel clave en la respuesta inflamatoria local. Se cree que la E-Selectina es particularmente importante en la respuesta inflamatoria local.<sup>11</sup>

La parte extracelular de la E-Selectina incluye un dominio tipo C-2 lectina dependiente de calcio, un dominio de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y seis secuencias repetitivas similares a proteínas-reguladoras-del complemento. La E-Selectina se une al ácido siálico Lewis-X que es su ligando.<sup>20</sup>

La E-Selectina soluble se encuentra en la sangre de individuos sanos, probablemente surge del clivaje proteolítico de las moléculas de superficie expresadas. Se han reportado niveles elevados en suero de E-Selectina en una variedad de condiciones patológicas. Aunque se puede inferir que la sE-Selectina suprime la migración de leucocitos por competir con la E-Selectina asociada de superficie, esta puede activar a los neutrófilos y actuar como un agente pro-inflamatorio.<sup>20</sup>

### **3.2 CÁNCER Y FIBRINA**

Un aspecto importante de analizar en la patología tumoral es que en muchos tumores se deposita fibrina “in situ”, es decir, en el mismo tejido tumoral. El significado de estos depósitos es objeto de controversia tanto como respecto a su comprobación como a su importancia. Para algunos autores la activación de la coagulación y el consecuente depósito de fibrina es un fenómeno sin significación patológica mientras que, para otros, puede contribuir al progreso de la enfermedad maligna.<sup>66</sup> Esta interpretación esta fundamentada en datos extraídos de la experimentación, de la clínica y de los resultados obtenidos luego de la utilización de drogas antitrombóticas (anticoagulantes e inhibidores de la función plaquetaria) que,

en algunos casos, han sido capaces de retardar la evolución de la enfermedad tumoral.<sup>67</sup> La patogenia del depósito de fibrina en los tumores esta en relación directa con los mecanismos que regulan la permeabilidad microvascular, la coagulación extravascular y la fibrinólisis. Estudios experimentales han demostrado que la acumulación de fibrinógeno en el tejido tumoral es el resultado de un mayor aflujo de esta proteína y de un retardo de su retorno al sistema intravascular. El aflujo de fibrinógeno se ha calculado en 0.4 mg por gramo, por hora, lo cual es cinco veces mayor a lo que ocurre en el tejido normal. El aumento de aflujo de fibrinógeno, como el de otras proteínas de alto peso molecular que normalmente no pueden atravesar la barrera endotelial, estaría en relación con la producción de un factor de permeabilidad vascular (VPF) por parte de las células, que ha sido parcialmente purificado e identificado como un péptido que tiene un peso molecular de entre 34.000 a 42.000 daltons.<sup>68</sup> En las neoplasias su concentración es particularmente alta en el líquido ascítico. El hecho que el FT y otros factores de la coagulación se localicen en los macrófagos junto con la fibrina, indicaría que éstas células son responsables de la producción de trombina.

### **3.2.1 Depósito de fibrina y progresión tumoral**

El depósito de fibrina en el tejido tumoral puede ser capaz de influenciar la progresión del tumor por diversos mecanismos. Por una parte la fibrina que se interpone entre las células tumorales y el tejido inflamatorio del huésped, actúa como una barrera e impide que las células inflamatorias puedan invadir el tumor y destruirlo.<sup>69</sup> También la fibrina podría proteger a las células tumorales de la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (NK) o por las células asesinas activadas por linfocinas (LAK)<sup>70</sup> y podría facilitar la angiogénesis tumoral.<sup>71</sup>

La trombina por sí misma podría ejercer también una influencia directa sobre la progresión tumoral. Se ha demostrado que la trombina estimula la secreción celular permitiendo la expresión del FT y del proto-oncógen cMyc,<sup>72</sup> lo que contribuiría a promover la migración celular y estimula la producción del inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) preservando a la fibrina formada de una eventual degradación por fibrinólisis. Si aceptamos que la trombina estimula al FT de las células tumorales y que, a su vez, este último pone en marcha la formación de trombina a partir de la protrombina que se halla en las células huéspedes. Estaríamos en presencia de un mecanismo de autoperpetuación del tumor.

## **4. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE LA COAGULACIÓN**

En las alteraciones hemorrágicas, las pruebas de laboratorio darán una respuesta sobre alguna alteración en los mecanismos hemostáticos. Estas pruebas están consideradas en dos grupos especialmente, el primero de ellos relacionado con las pruebas de tamizaje, en los cuales se obtendrá una confirmación en sentido amplio de una alteración en los mecanismos hemostáticos. La segunda está relacionada con las pruebas más especializadas, etapa en la cual se entrará dependiendo de los hallazgos en las pruebas de tamizaje y en la cual se busca precisar el diagnóstico. Antes de describir las pruebas más importantes en este tipo de estudio, es indispensable insistir en la necesidad de tener una historia clínica detallada. El laboratorio en los fenómenos de la hemostasia, puede suministrar información muy útil, no solamente para confirmar la sospecha clínica de un problema hemorrágico con base en una alteración de sus mecanismos, sino que también es posible establecer el diagnóstico con exactitud lo más cercanamente posible a la deficiencia que se encuentre. Algunas situaciones son sumamente raras, y requieren estudios muy especializados, que no se encuentran al alcance de los laboratorios corrientes.<sup>73</sup> La presencia de pruebas de laboratorio normales en una persona, no necesariamente descarta la posibilidad de anormalidades en el mecanismo de la hemostasia, por lo cual se insiste mucho en el cuadro clínico con base en la historia, puesto que en ocasiones hay deficiencias muy discretas pero importantes en algunos de los mecanismos hemostáticos y pueden no mostrar necesariamente una alteración en las pruebas corrientes de laboratorio. En este último caso, el cuadro clínico es de mayor importancia y es necesario profundizar un poco si fuera posible en los estudios, incluyendo familiares de pacientes con el fin de encontrar la deficiencia específica. Ante la sospecha por historia de un problema de hemostasia, deben practicarse algunas pruebas de laboratorio que se han considerado de tamizaje antes de proceder a las más especializadas. Estas primeras en general revelarán si existe alguna anormalidad en sentido amplio, en algunos de los puntos del sistema descrito.<sup>74</sup>

### **4.1 PRUEBAS DE TAMIZAJE**

#### **4.1.1 El extendido de sangre periférica**

La trombocitopenia (disminución del número de plaquetas) es una de las causas más comunes de hemorragia y se puede obtener información inmediata sobre la cantidad de plaquetas, con la observación cuidadosa del extendido de sangre periférica. El extendido de sangre periférica será útil también en cuadros hemorrágicos inexplicables, como es el caso de la coagulación intravascular diseminada.<sup>74</sup>

#### **4.1.2 Tiempo de Protrombina (TP)**

La prueba fue descrita por primera vez por el doctor Armand Quick en 1935 como “el tiempo de protrombina”. Es una de las pruebas de coagulación más populares y más usadas, quizá equivocadamente, por lo que a esta prueba se le atribuyen falsas propiedades de total normalidad del sistema de coagulación cuando está restringido solamente a algunos factores. La prueba no se refiere exclusivamente tampoco a la protrombina, pues es capaz de detectar y con mayor sensibilidad deficiencias de factores V, VII y X. También puede ser afectada por bajos niveles de fibrinógeno o por niveles altos de heparina o anticoagulantes patológicos adquiridos. La prueba se basa en una recalcificación del plasma con la adición de la tromboplastina tisular y la medición del tiempo que toma en la aparición del coágulo de fibrina. El TP se requiere para el estudio de coagulopatías y para el monitoreo de la anticoagulación con cumarínicos. El INR da una información más precisa de la relación paciente/control normal, pues se ha tenido en cuenta no sólo la diferente sensibilidad de tromboplastinas que usualmente hay entre especies distintas (tromboplastina de origen humano o de conejo), sino la diferencia que hay de uno a otro individuo o de uno a otro animal. En general es ampliamente reconocido que el tiempo de protrombina detecta deficiencias de factores V, VII, X y II, cuando el nivel de alguna de esas sustancias cae por debajo de 0.10 unidades por ml y una deficiencia de fibrinógeno si es inferior a 100 mg% (valores plasmáticos normales 150 a 350 mg%). La prueba es afectada en presencia de heparina y otros anticoagulantes circulantes, incluyendo los productos de degradación del fibrinógeno (PDF).<sup>73</sup>

#### **4.1.3 Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa)**

La prueba se lleva a cabo en el plasma al cual se le ha retirado el  $\text{Ca}^{++}$  con un compuesto que reacciona con este inhibiéndolo y mide los factores del sistema intrínseco en su totalidad. El plasma a trabajar debe ser totalmente libre de plaquetas, pues el reactivo que será usado es un extracto crudo de fosfolípido denominado tromboplastina parcial, de ahí el nombre de la prueba. Este fosfolípido tiene las mismas cualidades fisicoquímicas del fosfolípido plaquetario.<sup>3</sup> El plasma expuesto a este compuesto en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y con un material eléctricamente negativo que sea capaz de iniciar las fases de contacto, de coagulación, constituyen los elementos necesarios para el TTPa. Generalmente el material que se usa para suministrar una superficie eléctricamente negativa es de variado origen: celita, caolín, bentonita, ácido elágico. El compuesto más comúnmente utilizado en la práctica para la prueba activada es el caolín. El TTPa es capaz de estudiar todos los factores de coagulación incluidos en el sistema intrínseco desde el factor XII hacia adelante hasta el fibrinógeno, por lo tanto se exceptúa el factor VII que está comprendido en el sistema extrínseco. Es capaz de detectar deficiencias de precalicreína y C-AMP.<sup>73</sup>

#### **4.1.4 Interpretación de los resultados del TP y TTPa**

Es necesario insistir en que la interpretación de las dos pruebas de fondo y de tamizaje del sistema de coagulación del plasma, el TTPa y el TP, son necesarias la una para la otra en el caso que alguna de las dos resultase prolongada. Usualmente una prolongación del TTPa con un TP normal, sugiere una deficiencia del factor o factores XII, XI, IX, VIII, precalicreína y/o C-AMP. Si se trata de un TTPa normal y un TP prolongado, sugiere una deficiencia congénita del factor VII. En caso de encontrarse ambas pruebas prolongadas, como es obvio, la situación diagnóstica es más complicada y se debe asumir un estudio de historia clínica completa y en detalle. Sin embargo, y a pesar de ser más frecuentes los problemas de tipo adquirido, la prolongación de ambas pruebas puede estar señalando la deficiencia de alguno o varios de aquellos factores que son comunes para ambas pruebas que constituyen los factores de la vía común.<sup>13</sup> Un TTPa prolongado con un TP normal sugiere, una de las hemofilias o algunas de las deficiencias de los factores de contacto, ya sea por deficiencia de los factores mencionados o también, un inhibidor de la coagulación, generalmente un auto anticuerpo dirigido contra uno de los factores, especialmente el factor VIII o el anticuerpo antifosfolípido (anticoagulante lúpico). Las neoplasias activas se han asociado con TTPa cortos.<sup>73,74</sup>

#### **4.1.5 Tiempo de Trombina (TT)**

Esta prueba se utiliza únicamente para investigar la última parte del sistema de coagulación en su fase procoagulante y dará una información bastante rápida tanto de la cantidad como de la calidad del fibrinógeno y para detectar la presencia de heparina o los productos de degradación del fibrinógeno (PDF). La presencia de cualquiera de estas alteraciones se manifiesta por un tiempo prolongado.<sup>74</sup>

En caso de anomalías en una o varias de las pruebas mencionada, será necesario pasar a un análisis más detallado con pruebas más especializadas.

## **4.2 PRUEBAS ESPECIALES**

### **4.2.1 Dímero D**

El dímero D es un marcador específico de la fibrinólisis que implica la degradación por la plasmina de la fibrina. El dímero D es un producto de la degradación de la fibrina que contiene la porción de fibrina enlazada de manera cruzada con el factor XIIIa. Esta presencia de dímero D indica la degradación de la fibrina enlazada de manera cruzada por la plasmina y es un marcador excelente de la CID con fibrinólisis secundaria. El dímero D también se encuentra en la embolia pulmonar, la trombosis venosa profunda, la tromboembolia pulmonar.<sup>75</sup>

Se mezclan partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales dirigidos al dímero D con una dilución del plasma del paciente y si hay dímero D se produce aglutinación de las partículas de látex. La mayor parte de los procedimientos incluyen una muestra no diluida y una diluida (1:2), lo cual permite realizar una graduación de los resultados. La aglutinación macroscópica en cualquiera de las diluciones corresponde a un valor de Dímero D inferior a 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Si la aglutinación macroscópica se presentan en el plasma no diluido, pero no en la dilución 1:2, los resultados corresponden a un valor de Dímero D de 0.5 a 1.0  $\mu\text{g/mL}$ . La observación de aglutinación macroscópica en ambas muestras corresponde a un valor de dímero D superior a 1.0  $\mu\text{g/mL}$ . Las personas normales tienen menos de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>76</sup>

#### 4.2.2 Trombospondina-1

La TSP-1 es una glucoproteína de 165 kDa con tres subunidades disulfídicas idénticas. La TSP-1 está presente en altas concentraciones en los gránulos alfa de las plaquetas y puede ser eficientemente secretada después de la activación plaquetaria. La expresión de TSP-1 es altamente regulada por diferentes hormonas y citocinas y es ampliamente controlada. Altos niveles de TSP-1 son expresados en el desarrollo del corazón, músculo, hueso y cerebro en el embrión. La TSP-1 tiene una distribución limitada en los tejidos normales de adultos y es expresada altamente en respuesta a lesión y procesos inflamatorios. La TSP-1 tiene propiedades antiangiogénicas y esto puede ser debido a la inhibición de la proteólisis pericelular requerida para la migración celular y la proliferación de células endoteliales.<sup>47</sup>

El complejo de GPII<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> cambia de forma dejando al descubierto el lugar de fijación que interacciona con proteínas adhesivas, en especial el fibrinógeno que se encuentran en la atmósfera periplaquetaria propiciando puentes de unión interplaquetarios, lo que da lugar al fenómeno físico de la agregación plaquetaria. El calcio sostiene a estos receptores unidos y es necesario en la unión del fibrinógeno al receptor. Las plaquetas se van uniendo unas a otras utilizando la molécula de fibrinógeno como cemento intercelular al unirse por el receptor plaquetario, la glicoproteína II<sub>b</sub>-III<sub>a</sub>. La TSP-1 está involucrada con la unión del fibrinógeno al complejo glicoproteico.<sup>47</sup>

La TSP-1 es medida mediante el sistema de ensayo ChemiKine, en el que los anticuerpos anti-conejo pegados de antemano sobre los pozos de la microplaca de carnero son utilizados para capturar un complejo específico de TSP-1 en cada muestra; conteniendo el anticuerpo TSP-1, TSP-1 biotinilada, y muestra/estándar. El conjugado de TSP-1 biotinilada (ligando competitivo) y la muestra o el estándar compiten por los sitios específicos de unión de anticuerpos de la TSP-1. Así, a medida que la concentración de TSP-1 aumenta en la muestra, la cantidad de TSP-1 biotinilada capturada por el anticuerpo disminuye. El ensayo se visualiza utilizando un conjugado de fosfatasa alcalina - estreptavidina y una subsiguiente reacción

cromogénica de sustrato. La cantidad de TSP-1 detectada en cada muestra es comparada con la curva estándar de TSP-1 la cual demuestra una relación inversamente proporcional entre la densidad óptica (O.D) y la concentración de TSP-1: por ejemplo, a mayor densidad óptica menor concentración de TSP-1 en la muestra.<sup>76</sup>

#### 4.2.3 L, P, E -Selectina

Hay tres miembros de la familia selectina de glucoproteínas de membrana: L-Selectina, E-Selectina y P-Selectina. La L-Selectina está presente en altas concentraciones en los neutrófilos circulantes en reposo, en linfocitos y en monocitos. Es posible que el contrarreceptor de células endoteliales para L-Selectina sea la E-Selectina (ELAM-1). Esto significa que la L-Selectina desempeña una función en la extravasación de leucocitos en los sitios de lesión. Tanto la E-Selectina como la P-Selectina están presentes en las células endoteliales activadas. La primera promueve la adhesión de neutrófilos, monocitos y un subgrupo de linfocitos T de memoria a la célula endotelial, con lo cual ayuda a regular la migración de estas células a las áreas tisulares de la inflamación. La E-Selectina se sintetiza de manera transitoria por las células endoteliales de 2 a 8 horas después de la estimulación por el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (FNT- $\alpha$ ), IL-1 o liposacárido (LPS). La P-Selectina, situada en los gránulos secretorios de la célula endotelial, se trasloca con rapidez a la membrana celular después de la estimulación con histamina o complejo de complemento 5b-9, peróxidos o trombina. Su expresión en la membrana es transitoria y va en paralelo a la adhesión de neutrófilos y monocitos activados en los sitios de lesión celular.<sup>76</sup>

Las selectinas son cuantificadas mediante el análisis inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La prueba de ELISA usa un anticuerpo (o un antígeno) enlazado a enzimas para medir la concentración de antígenos (o anticuerpos). La especificidad del análisis aumenta con el uso de anticuerpos monoclonales. Este método también es sensible y detecta concentraciones plasmáticas a concentraciones de ng/mL. En estos análisis se hace reaccionar al plasma con un anticuerpo específico inmovilizado sobre una superficie sólida como los pozos de una placa de microtitulación. Después de la incubación se lava el sistema de prueba. A continuación, los complejos antígeno/anticuerpo en los pozos se incuban con un exceso de anticuerpo marcado por una enzima que se enlaza al antígeno fijo al anticuerpo. Después del lavado se agrega un sustrato enzimático el cual puede detectarse por punto final fotométrico, fluorescente o luminiscente. La concentración del producto de la enzima es directamente proporcional a la concentración del material analizado en la muestra.<sup>77</sup>

## **5. HIPOTESIS**

El nivel de Trombospondina 1 y selectinas guarda relación con el acortamiento del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) en los pacientes con cáncer.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer la correlación de la concentración de trombospondina-1 con el tiempo de tromboplastina parcial activado y además evaluar la activación del sistema de coagulación y fibrinólisis empleando la medición de L, P y E selectinas y dímeros D en pacientes con cáncer.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Comparar los niveles de Trombospondina-1 en pacientes con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado corto con los de voluntarios sanos y pacientes con cáncer con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado normal.

Comparar los niveles de selectinas L, P y E en pacientes con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado corto con los de voluntarios sanos y pacientes con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado corto.

Analizar si esta diferencia en el nivel de Trombospondina-1 y selectinas es estadísticamente significativa y así poder afirmar que el nivel de Trombospondina 1 y Selectinas guardan relación con el acortamiento del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) en los pacientes con cáncer.

### **3. EL MECANISMO DE COAGULACIÓN EN LOS PACIENTES CON CÁNCER**

#### **3.1 CÁNCER Y TROMBOSIS**

El proceso neoplásico se encuentra asociado a la activación de la coagulación y fibrinólisis así como también a eventos trombóticos.<sup>22</sup> Avances en bioquímica, biología molecular y de manera importante en biología vascular, han contribuido para el mejor entendimiento de las complejas interacciones entre las células tumorales y el sistema de la hemostasia.

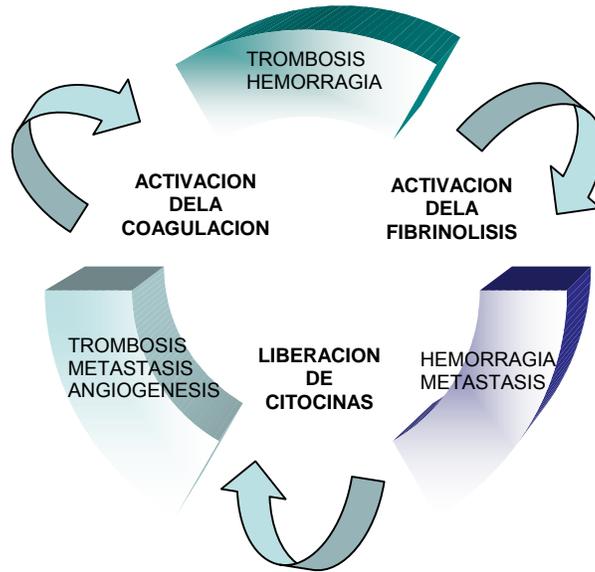
Las células tumorales producen y expresan moléculas que pueden activar directa o indirectamente el sistema hemostático debido en parte a la reacción inflamatoria que producen en el huésped. Factores extrínsecos incluyendo la cirugía y quimioterapia contribuyen a su vez al desarrollo de un estado pre-trombótico.<sup>23</sup> Evidencias recientes apuntan a que la activación de la coagulación inducida por células tumorales involucra la angiogénesis, lo cual, favorece al crecimiento tumoral y metástasis y abre una vía importante (el vaso sanguíneo) para la circulación de moléculas inflamatorias, que finalmente estimulan la coagulación y esto a su vez condiciona el desarrollo de un estado pre-trombótico.<sup>24</sup>

Ciertos tipos de tumores activan la coagulación de una manera anormal, incluyendo entre otros, los tumores de origen pancreático, gastrointestinal, de ovario, de la próstata y pulmonar.<sup>2,25</sup>

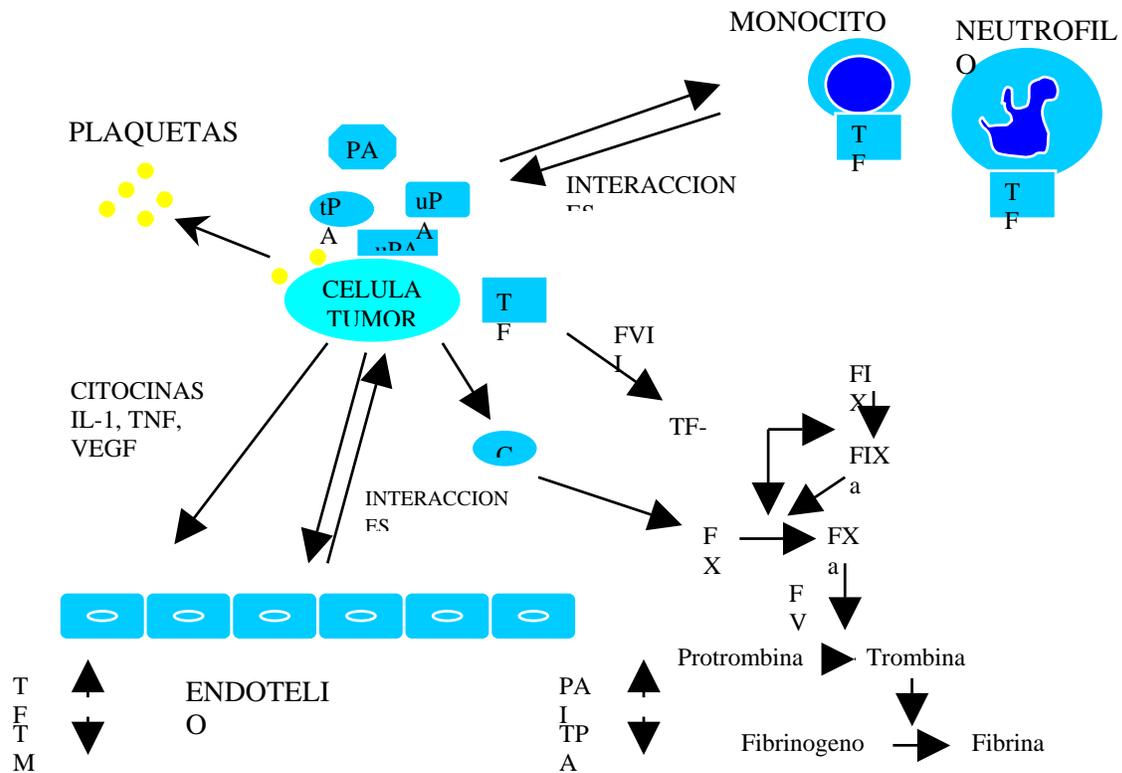
Las células tumorales tienen la capacidad de expresar en su membrana celular ligandos (que se utilizan como marcadores) que liberan factores solubles con propiedades trombóticas. En la literatura se han descrito un número significativo de factores con propiedades trombóticas pero dos se han estudiado en particular, el factor tisular (FT) y el factor procoagulante del cáncer (PC).<sup>26</sup> Además, las células tumorales producen citocinas, como el factor de necrosis tumoral, la interleucina-1 y el factor de crecimiento vascular endotelial. La angiogénesis inducida por neoplasia es un requerimiento esencial para el crecimiento tumoral. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular es uno de los factores con un papel importante en la angiogénesis tumoral.

La respuesta inflamatoria al proceso tumoral, también activa citocinas mediadoras del fenómeno trombótico. De las citocinas arriba mencionadas, además de desarrollar una respuesta inflamatoria agresiva, inducen la expresión de factor tisular, disminuyen la activación de la proteína C y activan las plaquetas, estas últimas contienen factores de crecimiento y moléculas adhesivas en sus

gránulos-alfa. Todas estas reacciones promueven la génesis del evento trombótico.<sup>27</sup> (Figuras 5 y 6).



**Figura 5. Eventos cíclicos en el proceso maligno y activación de la coagulación y fibrinólisis.** Del Carpio F, DeLa Cadena R, Cervera E. Alteraciones Hemostáticas en el paciente con cáncer. Archivos Mexicanos de Laboratorio LABORAT-acta. (Trimestral) 2005.<sup>28</sup>



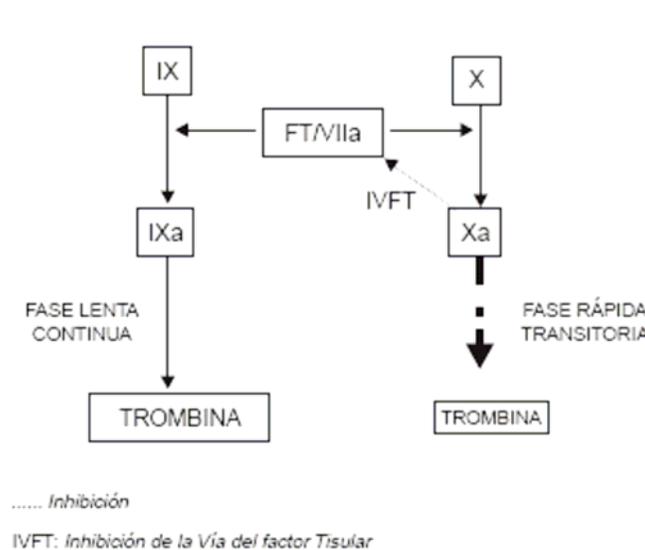
**Figura 6. Mecanismos de activación de la coagulación en el paciente con cáncer.** Del Carpio F, DeLa Cadena R, Cervera E. Alteraciones Hemostáticas en el paciente con cáncer. Archivos Mexicanos de Laboratorio LABORAT-acta. (Trimestral) 2005.<sup>28</sup>

Los factores predisponentes de mayor importancia para el desarrollo de los fenómenos trombóticos de mayor importancia en pacientes con cáncer son:

- El reposo prolongado.
- Estásis por efecto compresivo de la masa tumoral sobre las estructuras vasculares, que hace más lento el flujo sanguíneo, especialmente a nivel del sistema venoso determinando lesión endotelial, liberación de sustancias procoagulantes del endotelio (factor tisular) y activación del mecanismo extrínseco de la coagulación y de las plaquetas.<sup>29</sup>
- Liberación de sustancias tumorales: el material tisular liberado por el tumor es capaz de activar directamente la cascada de la coagulación. Se han descrito factores dependientes de tumores colónicos, gástricos, renales y pulmonares, por citar algunos, que activan el factor X de la coagulación. En un principio, los productos con actividad procoagulante eran denominados genéricamente como tromboplastino-símiles. Más recientemente se han caracterizado dos sustancias principalmente responsables de activar los mecanismos de la coagulación: el factor tisular (FT) y el llamado factor procoagulante del cáncer.<sup>29</sup> Como es conocido, el FT se encuentra en varios tejidos incluyendo el cerebro, el pulmón y la placenta donde su concentración es mayor. El daño sobre el tejido produce la liberación del FT y se desencadena el mecanismo extrínseco de la coagulación. El FT es una proteína contenida en la membrana celular y sirve de ligando para el factor VII, y lo activa a factor VII activado (FVIIa) formando, en condiciones normales, un complejo FT / FVIIa constituyéndose en el activador del sistema extrínseco de la coagulación. El FT fue hallado en extractos tumorales, en cultivos de células tumorales y en el suero y orina de pacientes con cáncer. También los granulocitos, en la leucemia granulocítica crónica, son capaces de liberar sustancias procoagulantes. Muchos tumores tienen infiltrados de macrófagos que contribuyen a aumentar la activación del FT. Finalmente, el FT puede ser liberado por los monocitos activados por las células tumorales.<sup>29,30</sup> (Figura 7).

El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) es un regulador importante de la coagulación extrínseca pero su papel potencial en la trombosis, en caso de encontrarse funcional o cuantitativamente descendido, es aún discutido.<sup>30</sup> El TFPI se une al factor X activado e inhibe la actividad procoagulante del complejo FT / FVIIa. Su concentración se halló en niveles variables en pacientes con cáncer.<sup>31</sup> El TFPI es esencialmente una proteína intravascular y esta presente en tres compartimentos separados: a) en las plaquetas (8 ng/mL) de las que puede ser liberado cuando estas son activadas por la trombina y ello determina que su concentración se eleve en los sitios de agregación plaquetaria; b) asociado a las lipoproteínas del plasma (54 - 142 ng/mL) y c) el liberado por la inyección de heparina de donde proviene (120 a 800 ng/mL).<sup>32</sup> La disminución de TFPI puede favorecer la acción procoagulante del sistema extrínseco en la medida que no se encuentre inhibida la formación del complejo FT / FVIIa (Figura 7).

El Factor Procoagulante del Cáncer es una sustancia de 68.000 daltons de peso molecular que activa la vía común de la coagulación por acción directa sobre el factor X y lo transforma en factor X activado (FXa). Es una enzima encontrada en ciertos extractos de células neoplásicas pero no ha podido ser aislada en los cultivos de líneas celulares homólogas a las de "in vivo". Se debe tener presente que las observaciones realizadas en una clase o localización tumoral y en ciertas condiciones experimentales, no pueden ser extrapoladas a otra enfermedad maligna, lo cual complica enormemente la interpretación de muchos de los datos experimentales disponibles.<sup>29</sup>



**Figura 7. El Factor Tisular (FT) es el iniciador de la coagulación.** Al formar el complejo FT/VIIa actúa sobre el factor X y el factor IX. La activación del factor X genera la fase rápida de la formación de trombina sin embargo es transitoria por la presencia del IVFT que bloquea la activación y la generación de mayores dosis de trombina. Por lo que se requiere de una vía alterna que se genera sobre la superficie de las plaquetas, fase lenta pero continua y en esta vía alterna se producen grandes cantidades de trombina, suficientes para producir el coágulo de fibrina.

- Activación plaquetaria: la agregación plaquetaria más potente es la que se produce por la trombina, que activa a la fosfolipasa C por un mecanismo dependiente de la guanosina trifosfato, dando lugar a la formación de 2 segundos mensajeros: el inositol 1, 4, 5 trifosfato que actúa como ionóforo de calcio liberando este catión del sistema tubular denso, aumentando así su concentración en el citosol y el diacilglicerol que junto al calcio activa a la proteincinasa C. Otro mecanismo de aumento de la adhesividad y agregación plaquetaria se produce por la liberación a partir de las células tumorales, de ADP y tromboxano A2.<sup>33,34,35</sup> Las plaquetas activadas participan en la formación del trombo y también en el crecimiento de las células tumorales probablemente a través de la liberación de factores de crecimiento celular derivado de las plaquetas (PDGF).
- Disminución de inhibidores: se produce un descenso en la concentración plasmática de los inhibidores de la coagulación que favorece el mecanismo de

trombosis, ya sea como producto del consumo por la trombina formada o de una disminución real de su producción. La antitrombina III neutraliza el factor X activado y a la trombina formando con esta última un complejo equimolar sin actividad biológica, detectable en el plasma como complejo trombina-antitrombina III y cuya concentración nos da idea de la cantidad de trombina que se hubiera formado. La formación de este complejo determina la disminución en la concentración plasmática de la antitrombina III y puede contribuir a la tendencia trombótica. La proteína C y su cofactor, la proteína S, son proteínas Vitamina K dependientes. Contrariamente a los otros factores Vitamina K dependientes procoagulantes II, VII, IX y X; la proteína C actúa como un regulador de la coagulación al neutralizar a los cofactores V y VIII activados y al estimular la fibrinólisis por su capacidad de bloquear al inhibidor del activador tisular del plasminógeno. La activación de la proteína C se realiza a través de la trombomodulina activada a su vez por la trombina. Tanto las proteínas C y S como la trombomodulina pueden estar disminuidas en los pacientes con cáncer lo que constituye un factor trombogénico adicional. Ya se ha indicado la posibilidad de una disminución del TFPI como otro factor contributivo para el desarrollo de trombosis en los pacientes con patología maligna.<sup>36</sup>

- Infiltración tumoral a estructuras vasculares
- Cirugía abdominal
- Hiperviscosidad sanguínea.

Otros factores predisponentes descritos son la colocación de catéteres intravenosos, la deshidratación secundaria a los efectos colaterales de la quimioterapia como la emesis y la diarrea y la presencia de niveles elevados de fibrinógeno y de otros factores de coagulación como los factores I, V, VIII, IX, XI; que no significan por sí mismos un estado trombofílico pero que sin embargo, tan pronto aparecen tiempos de coagulación alargados o cortos, asociados con una disminución en los niveles de antitrombina III y un aumento de los productos de degradación del fibrinógeno y/o dímero D en un paciente asintomático, con historia actual o pasada de cáncer, debe alertar sobre la presencia de un proceso trombótico.

### **3.1.1 Los factores trombogénicos en el cáncer**

#### **3.1.1.1 Factores de la coagulación**

El significado del estado de activación de la coagulación de los pacientes con cáncer tiene una importancia biológica trascendente por que puede contribuir a la progresión de la enfermedad. Cuando se valora el mecanismo de hemostasia en las neoplasias, se puede establecer claramente que existe un estado de activación.<sup>37</sup> Es así que Van-Wersch y col.<sup>38</sup> estudiaron 48 pacientes con diagnóstico reciente de carcinoma pulmonar (40 hombres, 8 mujeres) en relación a sus valores del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), del tiempo de

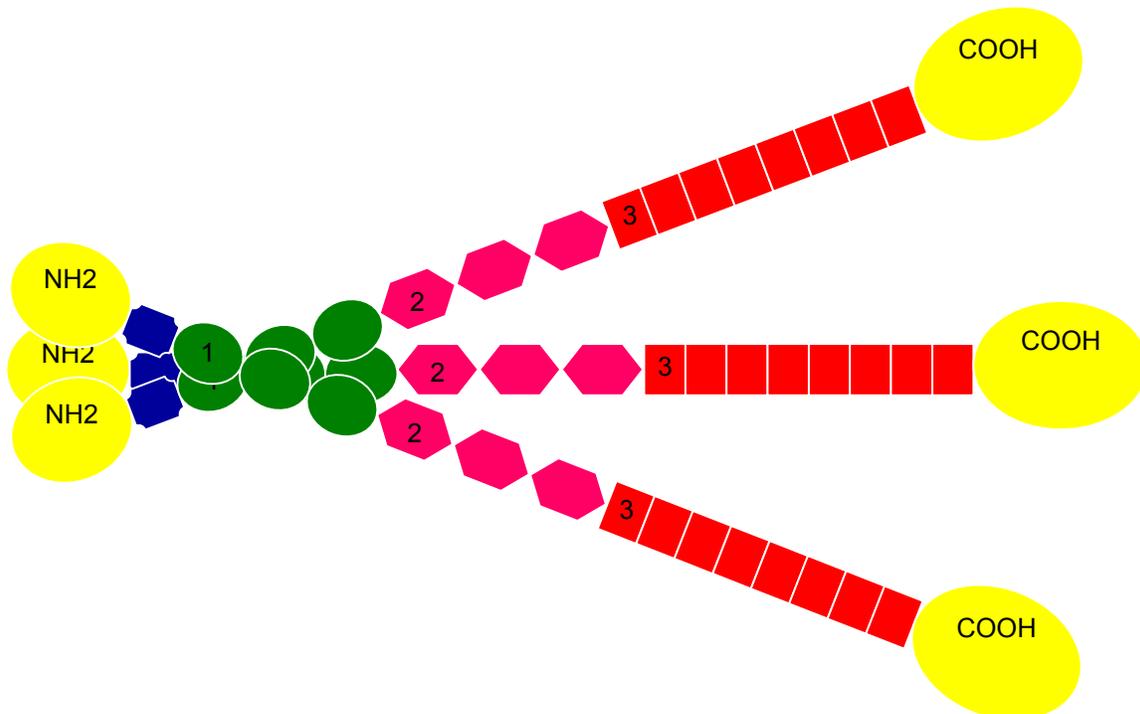
protrombina (TP), de la concentración del fibrinógeno plasmático, de la concentración del factor VIII de la coagulación, de los monómeros de fibrina (MF), del complejo trombina/antitrombina III (TAT), de los productos de degradación de la fibrina estabilizada (dímero D) y del recuento plaquetario. 38 pacientes tuvieron el tiempo de tromboplastina parcial activado normal y 37 pacientes tiempo de protrombina normal. Ninguno de los pacientes tenía indicadores clínicos o de laboratorio de hemorragia grave o trombosis. Encontraron en cambio, valores elevados de fibrinógeno y de la concentración del factor VIII, considerados factores protrombóticos. También un alto porcentaje tenían elevación de monómeros de fibrina, complejo trombina/antitrombina III y dímero D, fuertemente indicativos de activación de coagulación de bajo grado y fibrinólisis reactiva, a pesar de lo cual los pacientes mantenían su función hemostática normal. El desbalance de este equilibrio puede explicar las complicaciones trombóticas que describen estos pacientes. Ese desbalance puede producirse por factores orgánicos recurrentes o por la misma terapéutica antineoplásica. La tríada en que se basa el mecanismo trombogénico descrita por Virchow hace más de 100 años, mantiene aún todo su valor etiológico. Si bien el aumento de los factores de la coagulación no es determinante de por sí de trombosis, es un predisponente trombogénico y al producirse la activación de estos factores inclina la homeostasis hemostática hacia la trombosis.<sup>39</sup>

### 3.1.1.2 Trombospondina-1

Aunque la trombosis es la principal complicación de los tumores sólidos, la hemorragia también puede representar un serio problema en este grupo de enfermos. La coagulación intravascular diseminada (CID) presente en muchos pacientes con cáncer tiene varias expresiones clínicas: trombosis local, trombosis difusa, tromboembolismo, hemorragia menor, hemorragia difusa o cualquier combinación de las mismas. La mayoría de los pacientes con neoplasia sólida diseminada tienen alguna evidencia clínica o de laboratorio de CID, la cual es iniciada por la liberación de material procoagulante semejante a Tromboplastina o enzimas provenientes de células tumorales necróticas, lo cual puede iniciarse o acelerarse con la administración del tratamiento antineoplásico.<sup>32,40,41</sup>

Estas alteraciones pueden verse en la mayoría de los tumores sólidos, principalmente en carcinoma de pulmón, vejiga, estómago, colon, mama, ovario, melanoma maligno y en especial carcinoma de páncreas y próstata, así como en linfomas. En los adenocarcinomas de cualquier sitio primario, el ácido siálico de la mucina secretada activa de forma no enzimática al factor X, lo cual dispara la producción sistémica de trombina y posteriormente el inicio de una CID subaguda o fulminante.<sup>27,42</sup> La liberación sistémica de tejido tumoral necrótico o enzimas con actividad procoagulante o semejante a fosfolipoproteínas, puede activar las fases tempranas de la coagulación y de la liberación plaquetaria. Además, varios tumores que presentan neovascularización pueden potencialmente producir células endoteliales anormales, lo cual puede causar liberación plaquetaria o generación de factores XIIa y XIa con la consiguiente activación procoagulante y el desarrollo de CID fulminante, subclínica o compensada.<sup>12,13,43</sup>

Debido a este estado procoagulante y de liberación plaquetaria se encuentran circulando en sangre diferentes sustancias como la trombospondina-1 (TSP-1), que es la glucoproteína más grande secretada por los gránulos alfa de las plaquetas y que se une parcialmente a la membrana plaquetaria cuando las plaquetas se agregan en respuesta a la trombina.<sup>44</sup> La TSP-1 es una proteína filamentosa de 165 kD que tiene 7 x 65nm de dimensión, tiene un punto isoeléctrico de 4.7 y esta compuesta de 3 grandes subunidades de unión disulfídica.<sup>45,46</sup> (Figura 8).



**Figura 8. Estructura de la Trombospondina-1.** Isordia-Salas I, Manns JM, Sainz I, Parekh H, DeLa Cadena RA. Thrombospondin-1 binds to the heavy chain of elastase activated coagulation factor V (FVaHNE) and enhances thrombin generation on the surface of a promyelocytic cell line. *Thromb Res.* 2005;116:533-43.<sup>47</sup>

Durante el proceso de agregación, las plaquetas estimuladas por la trombina desarrollan una actividad de lectina unida a membrana que se origina de los gránulos alfa y juega un papel importante en la mediación de la agregación plaquetaria por unión a receptores específicos en otras plaquetas.<sup>2</sup>

Así mismo, se ha visto por décadas que la activación de la coagulación está invariablemente ligada a la respuesta inmuno-inflamatoria in vivo y que la inflamación sistémica es un potente estímulo pretrombótico.<sup>21,42</sup> La elastasa humana del neutrófilo (HNE) es una enzima normalmente restringida a los gránulos azurófilos primarios de los neutrófilos,<sup>48</sup> y es liberada al fagosoma y al medio extracelular por la activación del neutrófilo. La HNE ha sido implicada en la patogénesis de desórdenes inflamatorios como enfisema pulmonar,<sup>49</sup> fibrosis

cística,<sup>50</sup> glomerulonefritis,<sup>51</sup> artritis reumatoide<sup>52</sup> y en algunos tipos de leucemias incluyendo la leucemia promielocítica aguda. La TSP-1 es una proteína de matriz extracelular multifuncional sintetizada y secretada por células normales y transformadas en cultivo incluyendo fibroblastos,<sup>53</sup> células endoteliales,<sup>12</sup> células del músculo liso<sup>54</sup> y plaquetas.<sup>55</sup> En estudios preliminares<sup>47</sup> se ha demostrado la habilidad de la TSP-1 de unirse al factor V humano de la coagulación (FV); otros estudios han indicado que la TSP-1 es capaz de interactuar con otros ligandos incluyendo el plasminógeno, el fibrinógeno y la fibronectina.<sup>56</sup>

Se ha demostrado también que la activación de la coagulación está ligada a la respuesta inflamatoria. Los neutrófilos y monocitos representan la primera línea de defensa durante la respuesta inflamatoria. Recientemente se ha delineado una región dentro de las repeticiones tipo 3 de la TSP-1 que tiene la habilidad de interactuar con neutrófilos humanos.<sup>46,57</sup> Esta región es contigua a la región que tiene la habilidad de inhibir la elastasa humana de los neutrófilos.<sup>58,59</sup> Se ha demostrado que la HNE ancla al factor V al factor FVHNE, proveyendo al FV con actividad de cofactor (FVHNE) y por ende promoviendo la generación de trombina del complejo protrombinasa en la presencia de vesículas de fosfolípidos.<sup>60</sup> La protrombinasa comprende el complejo de factores Xa (FX), Va, superficie de membrana y iones de Ca<sup>++</sup>. El papel funcional del complejo protrombinasa es catalizar la conversión de protrombina (FII) en trombina. El complejo protrombinasa lleva a la generación de factor X activado (FXa) y trombina, llevando potencialmente a la activación celular al igual que a la proliferación celular.<sup>61</sup> La trombina tiene una variedad de actividades sobre las células que resultan en el aumento de la respuesta inflamatoria.<sup>62</sup>

Se ha demostrado que el complejo protrombinasa está ensamblado sobre la superficie de muchas células incluyendo las plaquetas y los monocitos,<sup>63,64</sup> y que la TSP-1 juega un papel importante. La formación del complejo protrombinasa en la superficie de los neutrófilos y monocitos es de relevancia en las neoplasias ya que llevara a la generación de factor X activado y la trombina, llevando potencialmente a la activación de células endoteliales y formación de fibrina (estado procoagulante). Hay evidencia que la TSP-1 se une al inhibidor de la vía del factor tisular,<sup>65</sup> un evento que ha sido asociado in vitro con una disminución en la habilidad del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) de inhibir al FXa por ende causando alteraciones en la regulación de la trombina lo cual resulta en un exceso en la generación de trombina.

### **3.1.1.3 Selectinas**

De igual manera para el entendimiento del estado procoagulante que está presentando el paciente es útil estudiar a las selectinas. Las selectinas median el primer paso en la adhesión de los leucocitos en los sitios de inflamación o de

injurias; facilitan el rodamiento de los leucocitos sobre la superficie endotelial de las plaquetas o de otros leucocitos. En consecuencia, los leucocitos circulantes se unen a las selectinas expresadas en las vénulas del endotelio activado y si bien esta unión es relativamente baja, es suficiente para funcionar como un freno biológico que desacelera y facilita el rodamiento de los leucocitos sobre la célula endotelial; las selectinas interactúan con ligandos de carbohidratos en los leucocitos y en las células endoteliales. Se han identificado tres moléculas diferentes: L- (marcador de activación del leucocito), E- (marcador de activación del endotelio) y P- (marcador de activación de las plaquetas) selectinas, las cuales participan en los sistemas vascular y hematopoyético.<sup>20</sup>

La L-Selectina es una glucoproteína expresada constitutivamente en una variedad de leucocitos. Miembro de la familia de las selectinas sobre las moléculas de superficie, la L-Selectina consiste de una lectina aminoterminal por medio de la cual se unen a sus ligandos naturales tipo carbohidratos o glucopéptidos no proteínas; estructuralmente contienen un dominio tipo EGF, 2 a 9 dominios tipo proteínas reguladoras del complemento y una cola citoplasmática corta. Se han reportado dos formas de L-selectina, debidas a aparentemente a modificaciones post-transcripcionales. La forma linfocítica tiene un aparente peso molecular de 74 kDa, mientras que la forma del neutrófilo tiene un peso de 95-100 kDa.<sup>11</sup>

La L-Selectina juega un papel importante en la migración de los linfocitos hacia los nódulos linfáticos y sitios de inflamación crónica y de los neutrófilos hacia los sitios de inflamación aguda. Actuando en cooperación con la P-Selectina, la L-Selectina media la interacción inicial de los leucocitos circulantes con las células endoteliales que produce el característico "rodamiento" de leucocitos sobre el endotelio. Esta interacción inicial es seguida por una interacción más fuerte, que involucra probablemente a la E-Selectina, que conduce eventualmente a extravasación a través de la pared de los vasos sanguíneos a los tejidos linfoides y a los sitios de inflamación. Se han identificado tres ligandos de la L-Selectina sobre las células endoteliales, todos contienen mucina O-glicosilada o dominios semejantes a mucina. El primer ligando, el GlyCAM-1, se expresa casi exclusivamente en nódulos linfáticos periféricos y mesentéricos de vénulas endoteliales altas. El segundo ligando de la L-Selectina, se conoce como CD34. Esta glucoproteína similar a las sialomucinas muestra expresión vascular en una variedad de tejidos no linfoides, al igual que en nódulos linfáticos periféricos de capilares. El tercer ligando es el MAdCAM-1, una glucoproteína semejante a la mucina que se encuentra sobre nódulos linfáticos mucosos de vénulas endoteliales altas.<sup>11</sup>

La L-Selectina es liberada por clivaje proteolítico de la superficie de linfocitos y neutrófilos in vitro seguida de la activación de una variedad de agentes como forbol ésteres, lipopolisacáridos y f-met-leu-phe. In vivo, la L-Selectina es liberada de los neutrófilos durante la inflamación y se ha sugerido que la pérdida de L-Selectina de superficie puede ser necesaria para permitir que los leucocitos migren a través del endotelio. La L-Selectina soluble (sL-Selectina) derivada de los

linfocitos es de alrededor de 62 kDa, mientras que el fragmento derivado de los neutrófilos es de 75 - 100 kDa. La sL-Selectina retiene bioactividad y a altas concentraciones puede inhibir la unión de los linfocitos al endotelio, sugiriendo un posible papel en la modulación de esta unión in vivo. Se han encontrado altos niveles de sL-Selectina en muestras tomadas de individuos aparentemente normales. Un número de estudios han reportado que los niveles de sL-Selectina en fluidos biológicos pueden estar elevados o disminuidos en individuos con una variedad de condiciones patológicas.<sup>20</sup>

La P-Selectina es una glicoproteína de superficie que juega un papel crítico en la migración de los linfocitos a los tejidos. La P-Selectina se encuentra constitutivamente en un estado pre-formado en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas. Esta P-Selectina almacenada es movilizada a la superficie celular en minutos en respuesta a una variedad de agentes inflamatorios o trombogénicos. La P-Selectina movilizada aparentemente permanece presente sobre la superficie celular solo unos minutos después y es reciclada en los compartimentos celulares. Evidencia adicional indica que la transcripción del mRNA de la P-Selectina puede ser activada en el endotelio por tratamiento con mediadores inflamatorios. La P-Selectina, es un miembro de la familia de Selectinas de moléculas de superficie celular y consiste de una lectina aminoterminal por medio de la cual se unen a sus ligandos naturales tipo carbohidratos o glicopéptidos no proteínas; estructuralmente contienen un dominio tipo EGF, 2 a 9 dominios tipo proteínas reguladoras del complemento y una cola citoplasmática corta. El peso molecular para el cDNA de la P-Selectina es de aproximadamente 86,000. El peso molecular observado por SDS-PAGE reducido, sin embargo, es de 140,000.<sup>20</sup>

Numerosas evidencias indican que la P-Selectina está involucrada en la adhesión de células mieloides, al igual que de células B y un subtipo de células T, para activar el endotelio. También esta involucrada en la adhesión de plaquetas a monocitos y neutrófilos, jugando un papel central en la acumulación de neutrófilos dentro del trombo. La adhesión de leucocitos y neutrófilos al endotelio es iniciada por interacciones débiles que producen un movimiento característico de "rodamiento" de los leucocitos y neutrófilos sobre la superficie endotelial. La P-Selectina actuando en cooperación con la L-Selectina, está implicada en la mediación de estas reacciones iniciales. Interacciones más fuertes, que involucran probablemente a la E-Selectina, siguen a las reacciones iniciales, llevando inicialmente a la extravasación a través de las paredes de los vasos sanguíneos a los tejidos linfoides y a los sitios de inflamación. El tetrasacárido siálico Lewis ha sido identificado como un ligando tanto para la P-Selectina como para la E-Selectina, pero tanto P, E y L selectinas pueden todas unir al tetrasacárido siálico Lewis bajo condiciones apropiadas. La P-Selectina también puede unir una glucoproteína sobre células mieloides humanas, neutrófilos, monocitos y linfocitos, esta glicoproteína se denomina Ligando-1 de la glucoproteína de la P-Selectina (PSGL-1) y este ligando también puede unir a la E-Selectina. La P-Selectina se encuentra en el plasma de individuos normales en concentraciones de ng/mL.<sup>20</sup>

La E-Selectina es un glucoproteína transmembranal tipo-I de 115KDa, expresada solamente sobre la superficie de las células endoteliales y solamente después de la activación de citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) o endotoxinas. La expresión es transitoria, alcanzando su máximo dentro de las 6 horas después de la estimulación y declina posteriormente. La E-Selectina de superficie celular es un mediador del rodamiento de unión de los leucocitos al endotelio, un paso esencial en la extravasación de leucocitos al sitio de inflamación y por ende juega un papel clave en la respuesta inflamatoria local. Se cree que la E-Selectina es particularmente importante en la respuesta inflamatoria local.<sup>11</sup>

La parte extracelular de la E-Selectina incluye un dominio tipo C-2 lectina dependiente de calcio, un dominio de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y seis secuencias repetitivas similares a proteínas-reguladoras-del complemento. La E-Selectina se une al ácido siálico Lewis-X que es su ligando.<sup>20</sup>

La E-Selectina soluble se encuentra en la sangre de individuos sanos, probablemente surge del clivaje proteolítico de las moléculas de superficie expresadas. Se han reportado niveles elevados en suero de E-Selectina en una variedad de condiciones patológicas. Aunque se puede inferir que la sE-Selectina suprime la migración de leucocitos por competir con la E-Selectina asociada de superficie, esta puede activar a los neutrófilos y actuar como un agente pro-inflamatorio.<sup>20</sup>

### **3.2 CÁNCER Y FIBRINA**

Un aspecto importante de analizar en la patología tumoral es que en muchos tumores se deposita fibrina “in situ”, es decir, en el mismo tejido tumoral. El significado de estos depósitos es objeto de controversia tanto como respecto a su comprobación como a su importancia. Para algunos autores la activación de la coagulación y el consecuente depósito de fibrina es un fenómeno sin significación patológica mientras que, para otros, puede contribuir al progreso de la enfermedad maligna.<sup>66</sup> Esta interpretación está fundamentada en datos extraídos de la experimentación, de la clínica y de los resultados obtenidos luego de la utilización de drogas antitrombóticas (anticoagulantes e inhibidores de la función plaquetaria) que, en algunos casos, han sido capaces de retardar la evolución de la enfermedad tumoral.<sup>67</sup> La patogenia del depósito de fibrina en los tumores está en relación directa con los mecanismos que regulan la permeabilidad microvascular, la coagulación extravascular y la fibrinólisis. Estudios experimentales han demostrado que la acumulación de fibrinógeno en el tejido tumoral es el resultado de un mayor flujo de esta proteína y de un retardo de su retorno al sistema intravascular. El flujo de fibrinógeno se ha calculado en 0.4 mg por gramo, por hora, lo cual es cinco veces mayor a lo que ocurre en el tejido normal. El aumento de flujo de fibrinógeno, como el de otras proteínas de alto peso molecular que normalmente no pueden atravesar la barrera endotelial, estaría en relación con la producción de un factor de permeabilidad vascular (VPF) por parte de las células,

que ha sido parcialmente purificado e identificado como un péptido que tiene un peso molecular de entre 34.000 a 42.000 daltons.<sup>68</sup> En las neoplasias su concentración es particularmente alta en el líquido ascítico. El hecho que el FT y otros factores de la coagulación se localicen en los macrófagos junto con la fibrina, indicaría que estas células son responsables de la producción de trombina.

### **3.2.1 Depósito de fibrina y progresión tumoral**

El depósito de fibrina en el tejido tumoral puede ser capaz de influenciar la progresión del tumor por diversos mecanismos. Por una parte la fibrina que se interpone entre las células tumorales y el tejido inflamatorio del huésped, actúa como una barrera e impide que las células inflamatorias puedan invadir el tumor y destruirlo.<sup>69</sup> También la fibrina podría proteger a las células tumorales de la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (NK) o por las células asesinas activadas por linfocinas (LAK)<sup>70</sup> y podría facilitar la angiogénesis tumoral.<sup>71</sup>

La trombina por sí misma podría ejercer también una influencia directa sobre la progresión tumoral. Se ha demostrado que la trombina estimula la secreción celular permitiendo la expresión del FT y del proto-oncogen cMyc,<sup>72</sup> lo que contribuiría a promover la migración celular y estimula la producción del inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) preservando a la fibrina formada de una eventual degradación por fibrinólisis. Si aceptamos que la trombina estimula al FT de las células tumorales y que, a su vez, este último pone en marcha la formación de trombina a partir de la protrombina que se halla en las células huéspedes. Estaríamos en presencia de un mecanismo de autopropagación del tumor.

## **4. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE LA COAGULACIÓN**

En las alteraciones hemorrágicas, las pruebas de laboratorio darán una respuesta sobre alguna alteración en los mecanismos hemostáticos. Estas pruebas están consideradas en dos grupos especialmente, el primero de ellos relacionado con las pruebas de tamizaje, en los cuales se obtendrá una confirmación en sentido amplio de una alteración en los mecanismos hemostáticos. La segunda está relacionada con las pruebas más especializadas, etapa en la cual se entrará dependiendo de los hallazgos en las pruebas de tamizaje y en la cual se busca precisar el diagnóstico. Antes de describir las pruebas más importantes en este tipo de estudio, es indispensable insistir en la necesidad de tener una historia clínica detallada. El laboratorio en los fenómenos de la hemostasia, puede suministrar información muy útil, no solamente para confirmar la sospecha clínica de un problema hemorrágico con base en una alteración de sus mecanismos, sino que también es posible establecer el diagnóstico con exactitud lo más cercanamente posible a la deficiencia que se encuentre. Algunas situaciones son sumamente raras, y requieren estudios muy especializados, que no se encuentran al alcance de los laboratorios corrientes.<sup>73</sup> La presencia de pruebas de laboratorio normales en una persona, no necesariamente descarta la posibilidad de anomalías en el mecanismo de la hemostasia, por lo cual se insiste mucho en el cuadro clínico con base en la historia, puesto que en ocasiones hay deficiencias muy discretas pero importantes en algunos de los mecanismos hemostáticos y pueden no mostrar necesariamente una alteración en las pruebas corrientes de laboratorio. En este último caso, el cuadro clínico es de mayor importancia y es necesario profundizar un poco si fuera posible en los estudios, incluyendo familiares de pacientes con el fin de encontrar la deficiencia específica. Ante la sospecha por historia de un problema de hemostasia, deben practicarse algunas pruebas de laboratorio que se han considerado de tamizaje antes de proceder a las más especializadas. Estas primeras en general revelarán si existe alguna anomalía en sentido amplio, en algunos de los puntos del sistema descrito.<sup>74</sup>

### **4.1 PRUEBAS DE TAMIZAJE**

#### **4.1.1 El extendido de sangre periférica**

La trombocitopenia (disminución del número de plaquetas) es una de las causas más comunes de hemorragia y se puede obtener información inmediata sobre la cantidad de plaquetas, con la observación cuidadosa del extendido de sangre periférica. El extendido de sangre periférica será útil también en cuadros hemorrágicos inexplicables, como es el caso de la coagulación intravascular diseminada.<sup>74</sup>

#### **4.1.2 Tiempo de Protrombina (TP)**

La prueba fue descrita por primera vez por el doctor Armand Quick en 1935 como “el tiempo de protrombina”. Es una de las pruebas de coagulación más populares y más usadas, quizá equivocadamente, por lo que a esta prueba se le atribuyen falsas propiedades de total normalidad del sistema de coagulación cuando está restringido solamente a algunos factores. La prueba no se refiere exclusivamente tampoco a la protrombina, pues es capaz de detectar y con mayor sensibilidad deficiencias de factores V, VII y X. También puede ser afectada por bajos niveles de fibrinógeno o por niveles altos de heparina o anticoagulantes patológicos adquiridos. La prueba se basa en una recalcificación del plasma con la adición de la tromboplastina tisular y la medición del tiempo que toma en la aparición del coágulo de fibrina. El TP se requiere para el estudio de coagulopatías y para el monitoreo de la anticoagulación con cumarínicos. El INR da una información más precisa de la relación paciente/control normal, pues se ha tenido en cuenta no sólo la diferente sensibilidad de tromboplastinas que usualmente hay entre especies distintas (tromboplastina de origen humano o de conejo), sino la diferencia que hay de uno a otro individuo o de uno a otro animal. En general es ampliamente reconocido que el tiempo de protrombina detecta deficiencias de factores V, VII, X y II, cuando el nivel de alguna de esas sustancias cae por debajo de 0.10 unidades por ml y una deficiencia de fibrinógeno si es inferior a 100 mg% (valores plasmáticos normales 150 a 350 mg%). La prueba es afectada en presencia de heparina y otros anticoagulantes circulantes, incluyendo los productos de degradación del fibrinógeno (PDF).<sup>73</sup>

#### **4.1.3 Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa)**

La prueba se lleva a cabo en el plasma al cual se le ha retirado el  $\text{Ca}^{++}$  con un compuesto que reacciona con este inhibiéndolo y mide los factores del sistema intrínseco en su totalidad. El plasma a trabajar debe ser totalmente libre de plaquetas, pues el reactivo que será usado es un extracto crudo de fosfolípido denominado tromboplastina parcial, de ahí el nombre de la prueba. Este fosfolípido tiene las mismas cualidades fisicoquímicas del fosfolípido plaquetario. El plasma expuesto a este compuesto en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y con un material eléctricamente negativo que sea capaz de iniciar las fases de contacto, de coagulación, constituyen los elementos necesarios para el TTPa. Generalmente el material que se usa para suministrar una superficie eléctricamente negativa es de variado origen: celita, caolín, bentonita, ácido elágico. El compuesto más comúnmente utilizado en la práctica para la prueba activada es el caolín. El TTPa es capaz de estudiar todos los factores de coagulación incluidos en el sistema intrínseco desde el factor XII hacia adelante hasta el fibrinógeno, por lo tanto se exceptúa el factor VII que está comprendido en el sistema extrínseco. Es capaz de detectar deficiencias de precalicreína y C-AMP.<sup>73</sup>

#### **4.1.4 Interpretación de los resultados del TP y TTPa**

Es necesario insistir en que la interpretación de las dos pruebas de fondo y de tamizaje del sistema de coagulación del plasma, el TTPa y el TP, son necesarias la una para la otra en el caso que alguna de las dos resultase prolongada. Usualmente una prolongación del TTPa con un TP normal, sugiere una deficiencia del factor o factores XII, XI, IX, VIII, precalicreína y/o C-AMP. Si se trata de un TTPa normal y un TP prolongado, sugiere una deficiencia congénita del factor VII. En caso de encontrarse ambas pruebas prolongadas, como es obvio, la situación diagnóstica es más complicada y se debe asumir un estudio de historia clínica completa y en detalle. Sin embargo, y a pesar de ser más frecuentes los problemas de tipo adquirido, la prolongación de ambas pruebas puede estar señalando la deficiencia de alguno o varios de aquellos factores que son comunes para ambas pruebas que constituyen los factores de la vía común.<sup>13</sup> Un TTPa prolongado con un TP normal sugiere, una de las hemofilias o algunas de las deficiencias de los factores de contacto, ya sea por deficiencia de los factores mencionados o también, un inhibidor de la coagulación, generalmente un auto anticuerpo dirigido contra uno de los factores, especialmente el factor VIII o el anticuerpo antifosfolípido (anticoagulante lúpico). Las neoplasias activas se han asociado con TTPa cortos.<sup>73,74</sup>

#### **4.1.5 Tiempo de Trombina (TT)**

Esta prueba se utiliza únicamente para investigar la última parte del sistema de coagulación en su fase procoagulante y dará una información bastante rápida tanto de la cantidad como de la calidad del fibrinógeno y para detectar la presencia de heparina o los productos de degradación del fibrinógeno (PDF). La presencia de cualquiera de estas alteraciones se manifiesta por un tiempo prolongado.<sup>74</sup>

En caso de anormalidades en una o varias de las pruebas mencionada, será necesario pasar a un análisis más detallado con pruebas mas especializadas.

### **4.2 PRUEBAS ESPECIALES**

#### **4.2.1 Dímero D**

El dímero D es un marcador específico de la fibrinólisis que implica la degradación por la plasmina de la fibrina. El dímero D es un producto de la degradación de la fibrina que contiene la porción de fibrina enlazada de manera cruzada con el factor XIIIa. Esta presencia de dímero D indica la degradación de la fibrina enlazada de manera cruzada por la plasmina y es un marcador excelente de la CID con fibrinólisis secundaria. El dímero D también se encuentra en la embolia pulmonar, la trombosis venosa profunda, la tromboembolia pulmonar.<sup>75</sup>

Se mezclan partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales dirigidos al dímero D con una dilución del plasma del paciente y si hay dímero D

se produce aglutinación de las partículas de látex. La mayor parte de los procedimientos incluyen una muestra no diluida y una diluida (1:2), lo cual permite realizar una graduación de los resultados. La aglutinación macroscópica en cualquiera de las diluciones corresponde a un valor de Dímero D inferior a 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Si la aglutinación macroscópica se presentan en el plasma no diluido, pero no en la dilución 1:2, los resultados corresponden a un valor de Dímero D de 0.5 a 1.0  $\mu\text{g/mL}$ . La observación de aglutinación macroscópica en ambas muestras corresponde a un valor de dímero D superior a 1.0  $\mu\text{g/mL}$ . Las personas normales tienen menos de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>76</sup>

#### **4.2.2 Trombospondina-1**

La TSP-1 es una glucoproteína de 165 kDa con tres subunidades disulfídicas idénticas. La TSP-1 está presente en altas concentraciones en los gránulos alfa de las plaquetas y puede ser eficientemente secretada después de la activación plaquetaria. La expresión de TSP-1 es altamente regulada por diferentes hormonas y citocinas y es ampliamente controlada. Altos niveles de TSP-1 son expresados en el desarrollo del corazón, músculo, hueso y cerebro en el embrión. La TSP-1 tiene una distribución limitada en los tejidos normales de adultos y es expresada altamente en respuesta a lesión y procesos inflamatorios. La TSP-1 tiene propiedades antiangiogénicas y esto puede ser debido a la inhibición de la proteólisis pericelular requerida para la migración celular y la proliferación de células endoteliales.<sup>47</sup>

El complejo de GPII<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> cambia de forma dejando al descubierto el lugar de fijación que interacciona con proteínas adhesivas, en especial el fibrinógeno que se encuentran en la atmósfera periplaquetaria propiciando puentes de unión interplaquetarios, lo que da lugar al fenómeno físico de la agregación plaquetaria. El calcio sostiene a estos receptores unidos y es necesario en la unión del fibrinógeno al receptor. Las plaquetas se van uniendo unas a otras utilizando la molécula de fibrinógeno como cemento intercelular al unirse por el receptor plaquetario, la glicoproteína II<sub>b</sub>-III<sub>a</sub>. La TSP-1 está involucrada con la unión del fibrinógeno al complejo glicoproteico.<sup>47</sup>

La TSP-1 es medida mediante el sistema de ensayo ChemiKine, en el que los anticuerpos anti-conejo pegados de antemano sobre los pozos de la microplaca de carnero son utilizados para capturar un complejo específico de TSP-1 en cada muestra; conteniendo el anticuerpo TSP-1, TSP-1 biotinilada, y muestra/estándar. El conjugado de TSP-1 biotinilada (ligando competitivo) y la muestra o el estándar compiten por los sitios específicos de unión de anticuerpos de la TSP-1. Así, a medida que la concentración de TSP-1 aumenta en la muestra, la cantidad de TSP-1 biotinilada capturada por el anticuerpo disminuye. El ensayo se visualiza utilizando un conjugado de fosfatasa alcalina - estreptavidina y una subsiguiente reacción cromogénica de substrato. La cantidad de TSP-1 detectada en cada muestra es comparada con la curva estándar de TSP-1 la cual demuestra una relación inversamente proporcional entre la densidad óptica (O.D) y la

concentración de TSP-1: por ejemplo, a mayor densidad óptica menor concentración de TSP-1 en la muestra.<sup>76</sup>

#### 4.2.3 L, P, E -Selectina

Hay tres miembros de la familia selectina de glucoproteínas de membrana: L-Selectina, E-Selectina y P-Selectina. La L-Selectina está presente en altas concentraciones en los neutrófilos circulantes en reposo, en linfocitos y en monocitos. Es posible que el contrarreceptor de células endoteliales para L-Selectina sea la E-Selectina (ELAM-1). Esto significa que la L-Selectina desempeña una función en la extravasación de leucocitos en los sitios de lesión. Tanto la E-Selectina como la P-Selectina están presentes en las células endoteliales activadas. La primera promueve la adhesión de neutrófilos, monocitos y un subgrupo de linfocitos T de memoria a la célula endotelial, con lo cual ayuda a regular la migración de estas células a las áreas tisulares de la inflamación. La E-Selectina se sintetiza de manera transitoria por las células endoteliales de 2 a 8 horas después de la estimulación por el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (FNT- $\alpha$ ), IL-1 o liposacárido (LPS). La P-Selectina, situada en los gránulos secretorios de la célula endotelial, se trasloca con rapidez a la membrana celular después de la estimulación con histamina o complejo de complemento 5b-9, peróxidos o trombina. Su expresión en la membrana es transitoria y va en paralelo a la adhesión de neutrófilos y monocitos activados en los sitios de lesión celular.<sup>76</sup>

Las selectinas son cuantificadas mediante el análisis inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La prueba de ELISA usa un anticuerpo (o un antígeno) enlazado a enzimas para medir la concentración de antígenos (o anticuerpos). La especificidad del análisis aumenta con el uso de anticuerpos monoclonales. Este método también es sensible y detecta concentraciones plasmáticas a concentraciones de ng/mL. En estos análisis se hace reaccionar al plasma con un anticuerpo específico inmovilizado sobre una superficie sólida como los pozos de una placa de microtitulación. Después de la incubación se lava el sistema de prueba. A continuación, los complejos antígeno/anticuerpo en los pozos se incuban con un exceso de anticuerpo marcado por una enzima que se enlaza al antígeno fijo al anticuerpo. Después del lavado se agrega un sustrato enzimático el cual puede detectarse por punto final fotométrico, fluorescente o luminiscente. La concentración del producto de la enzima es directamente proporcional a la concentración del material analizado en la muestra.<sup>77</sup>

## **5. HIPOTESIS**

El nivel de Trombospondina 1 y selectinas guarda relación con el acortamiento del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) en los pacientes con cáncer.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer la correlación de la concentración de trombospondina-1 con el tiempo de tromboplastina parcial activado y además evaluar la activación del sistema de coagulación y fibrinólisis empleando la medición de L, P y E selectinas y dímeros D en pacientes con cáncer.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Comparar los niveles de Trombospondina-1 en pacientes con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado corto con los de voluntarios sanos y pacientes con cáncer con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado normal.

Comparar los niveles de selectinas L, P y E en pacientes con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado corto con los de voluntarios sanos y pacientes con Tiempo de Tromboplastina Parcial activado corto.

Analizar si esta diferencia en el nivel de Trombospondina-1 y selectinas es estadísticamente significativa y así poder afirmar que el nivel de Trombospondina 1 y Selectinas guardan relación con el acortamiento del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) en los pacientes con cáncer.

## **7. MATERIALES**

### **7.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

Muestras de plasma de pacientes con el Tiempo de Tromboplastina Parcial corto, de pacientes con el Tiempo de Tromboplastina Parcial normal y de voluntarios sanos.

### **7.2 MATERIAL**

Agua inyectable Baxter. Envase de 500mL.

Agujas vacutainer 21G x 38mm marca Becton Dickinson.

Copillas de 2mL.

Gasas.

Micropipetas de 10-100 $\mu$ L, de 100-1000 $\mu$ L.

Micropipeta multicanal (8 canales) de 25-350 $\mu$ L.

Puntas amarillas y azules para micropipetas.

Tubos eppendorff.

Tubo vacutainer de 4.5mL tapón azul con citrato de sodio de concentración 1.129M, en una proporción de 9:1.

Tubo vacutainer de 5mL tapón lila con EDTA como anticoagulante.

### **7.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES**

#### **7.3.1 Tiempos de Coagulación y Dímero D**

Acelerador para Dímero D.

Actin Reactivo de cefaloplastina activada: Cefalina (extracto obtenido de cerebro de conejo deshidratado).

CA CLEAN I.

Dade Ci-Trol Control de la coagulación Nivel 1.

Dade Ci-Trol Control de la coagulación Nivel 2.

Dade Tampón Veronal de Owren.

Medio de reconstitución líquido para Dímero D.

Reactivo D-Dimer PLUS.

Reactivo Test de trombina.

Reactivo Thromborel S.

Solución de Cloruro de Calcio.

Solución tampón para el Reactivo Test de trombina.

Nota: Todos los reactivos y soluciones aquí especificadas son de la marca Dade Behring para ser utilizados en el Equipo Sysmex CA-1500.

### **7.3.2 Trombospondina-1**

Anticuerpo TSP-1.

Buffer de lavado.

Conjugado TSP-1.

Diluyente # 2.

Estándar de TSP-1.

Fosfatasa alcalina-estreptavidina.

Reactivo de color A.

Reactivo de color B.

Sellantes de placa de acetato.

Solución de parada.

Placa de 96 pozos pre-cubierta.

Nota: Todos los reactivos y materiales mencionados son de la marca Chemicon International.

### **7.3.3 sL-Selectina**

Concentrado de buffer de lavado.

Conjugado de sL-Selectina.

Control de sL-Selectina.

Diluyente de muestra.

Estándares de sL-Selectina.

Microplaca de sL-Selectina: microplaca de 96 pozos con anticuerpos monoclonales de ratón de sL-Selectina humana pegados.

Sellantes de placa.

Solución de parada.

Substrato.

Nota: Todos los reactivos y materiales mencionados son de la marca R&D SYSTEMS

### **7.3.4 sP-Selectina**

Concentrado de buffer de lavado.

Conjugado de sP-Selectina concentrado.

Control de sP-Selectina.

Diluyente del concentrado.

Diluyente de muestra.

Estándares de sP-Selectina.

Microplaca de sP-Selectina: microplaca de 96 pozos con anticuerpos monoclonales de ratón de sP-Selectina humana pegados.

Sellantes de placa.  
Solución de parada.

Substrato.

Nota: Todos los reactivos y materiales mencionados son de la marca R&D SYSTEMS

### **7.3.5 sE-Selectina**

Concentrado de buffer de lavado.

Conjugado de sE-Selectina concentrado.

Control de sE-Selectina.

Diluyente del concentrado.

Diluyente de muestra.

Estándares de sE-Selectina.

Microplaca de sE-Selectina: microplaca de 96 pozos con anticuerpos monoclonales de ratón de sE-Selectina humana pegados.

Sellantes de placa.

Solución de parada.

Substrato.

Nota: Todos los reactivos y materiales mencionados son de la marca R&D SYSTEMS

## **7.4 EQUIPO**

Centrifuga Sorvall Legend RT.

Equipo Lavador de placas de ELISA Pasteur.

Equipo Lector de placas de ELISA, Sanofi Diagnostics Pasteur PR2100.

Equipo Sysmex CA-1500 A3950.

Refrigerador a -70 °C.

## **8. MÉTODOS**

### **8.1 Población de estudio y criterios de inclusión**

- Se incluyeron en el estudio 23 pacientes de la consulta externa que presentaron el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) corto. El diagnóstico histológico de los pacientes fue: 4 con sarcoma, 6 con carcinoma cervico-uterino, 9 con carcinoma de mama, 3 con adenocarcinoma y 1 paciente con tumor germinal no seminomatoso.

- El grupo control estuvo conformado por 23 pacientes de la consulta externa con el TTPa dentro de los intervalos de referencia. El diagnóstico histológico de los pacientes control fue: 4 con sarcoma, 6 con carcinoma cervico-uterino, 9 con carcinoma de mama, 3 con adenocarcinoma y 1 paciente con tumor germinal no seminomatoso.

- El grupo de voluntarios sanos estuvo conformado por 23 voluntarios sanos que presentaron tiempos de coagulación normales, que tenían características similares de edad y género a las de los pacientes del grupo con TTPa corto y al de pacientes control.

Se definió TTPa corto como aquellos valores por debajo de los intervalos de referencia establecidos en el laboratorio siguiendo la normatividad de la NCCLS para el establecimiento de intervalos de referencia para el equipo automatizado CA-1500 Sysmex y que en este caso es de 24.2 segundos. Este valor no es aplicable a otros equipos ni a otra población de estudio.

### **8.2 Criterios de exclusión**

1) Muestras que no fueron tomadas de las venas Radial, Media o Cubital del antebrazo.

2) Muestras que fueron mal tomadas ya sea por: un tiempo de toma lento, torniquete colocado por mas de 1 minuto, muestra obtenida de venas lesionadas, muestras tomadas con jeringa, tubos mal llenados en los que no se cumple la proporción 9:1 de sangre:anticoagulante o muestras mal rotuladas.

3) Muestras en las que se haya mezclado incorrectamente el tubo: esto debe hacerse por inversión.

4) Muestras que no fueron procesadas antes de 2 horas después de tomada la muestra.

5) Muestras que fueron centrifugadas a más de 4000 rpm por más de 10 minutos.

- 6) Plasmas hemolizados.
- 7) Plasmas lipémicos.
- 8) Plasmas con presencia de fibrina visible.
- 9) Plasmas de pacientes que se encuentran en terapia anticoagulante.

### **8.3 Estandarización de la toma de muestras**

El fenómeno de acortamiento del TTPa es un fenómeno que se presentó de manera consistente en 2 equipos automatizados diferentes: ACL- 7000 (Cia. IL-Diagnostics) y en el equipo Stago (Cia. Roche). Y posteriormente se observó este mismo fenómeno en el equipo CA-1500. Lo cual llamó nuestra atención y por eso se decidió realizar este estudio. Primero fue necesario estandarizar la toma de muestra, es decir eliminar la posibilidad de que el acortamiento del TTPa fuera debido a errores en la fase preanalítica. Para esto la toma de las muestras fue realizada por una sola persona y esta realizó las siguientes pruebas: primero le tomó la muestra al paciente con torniquete y lo dejó colocado por un tiempo no mayor a un minuto; luego tomó la muestra dejando el torniquete por un tiempo superior a un minuto y finalmente tomó la muestra sin torniquete y se observó que no había diferencia en los resultados; el acortamiento del TTPa persistía. Posteriormente se procedió a tomar la muestra de diferentes venas, de las venas de la mano y del antebrazo (venas radial, media y cubital) y de la parte anterior del pie y tampoco se observó una diferencia en los resultados obtenidos. De esta manera se descartó que el acortamiento del TTPa fuera debido a errores en la fase preanalítica.

### **8.4 Obtención y procesamiento de las muestras**

El procedimiento realizado para la obtención de las muestras fue el siguiente: las muestras fueron tomadas únicamente por una persona, la muestra se tomó de las venas Radial, Media o Cubital del antebrazo utilizando agujas vacutainer 21G x 38mm y tubos Vacutainer con tapón lila y azul de la marca Beckton Dickinson (tomados directamente de las venas antes mencionadas). Posteriormente estas muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos y es importante mencionar que esta velocidad fue establecida después de estandarizar este proceso, (con 3000 rpm la concentración de plaquetas en el plasma era mayor a 5000 plaquetas/mm<sup>3</sup>). Se determinaron los tiempos de coagulación dentro de las 2 horas siguientes a la toma de la muestra y aquellos pacientes que acortaron el TTPa y que cumplían con los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión y que además habían firmado el formato de consentimiento, se incluyeron en el estudio y la muestra fue fraccionada e inmediatamente se almacenaron a -70 °C. Así mismo se analizaron los

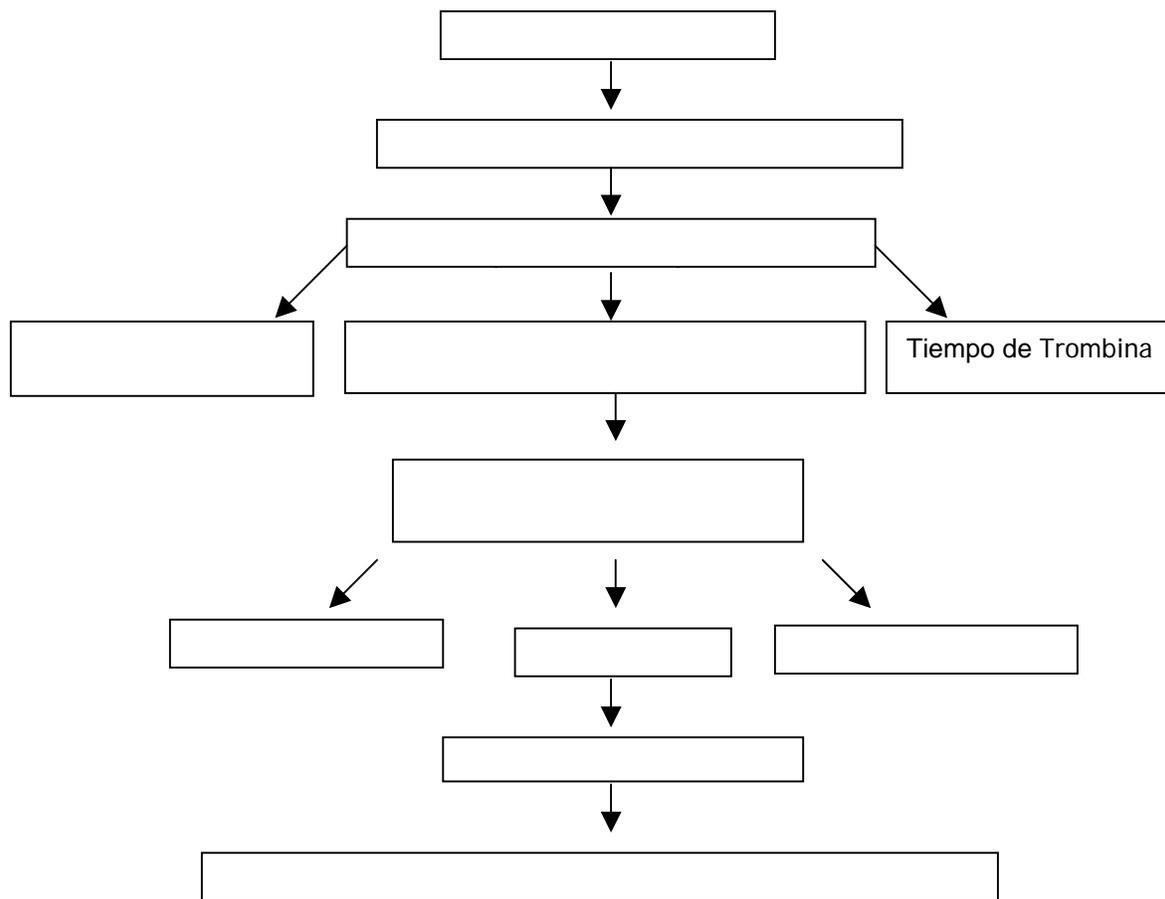
expedientes clínicos de los pacientes incluidos en el estudio para revisar la edad, sexo y diagnóstico histológico del cáncer que padecían.

Las muestras tomadas permanecieron almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de 1 a 3 meses. Posteriormente se descongelaron y se realizaron las mediciones de Dímero D en el equipo CA-1500 y se realizaron pruebas de ELISA para evaluar las concentraciones de TSP-1, y sP, sL y sE-Selectinas siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (ver el procedimiento en sección de anexos).

### 8.5 Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas se calculó el promedio, mediana, desviación estándar y rangos intercuartiles. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis para las variables dímero D (ng/mL), Plaquetas ( $10^3$  u/L) y Neutrófilos (%). Se realizó prueba de Kruskal Wallis y prueba de Wilcoxon sign-ranked para el análisis de los resultados de TSP-1, Selectina E, P y L.

El plan de procesamiento y el análisis estadístico se pueden resumir de la siguiente manera:



## 9. RESULTADOS

### 9.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En total se reclutaron 69 individuos distribuidos así: 23 pacientes con TTPa corto; 23 pacientes control (sin TTPa corto); y 23 voluntarios sanos ambos grupos con características similares respecto a edad y género de los pacientes con TTPa corto. La mayoría de los pacientes con TTPa corto fueron mujeres (82.6 %) y la media de edad fue de 48.5 años. La media de edad de los pacientes control fue de 48.3 años y la de los voluntarios sanos fue de 47 años.

4 pacientes fueron previamente diagnosticados histológicamente con Sarcoma (17.4 %), 6 con Carcinoma cervico-uterino (26.1 %), 9 con Carcinoma de mama (39.1 %), 3 con Adenocarcinoma (13.1 %) y 1 con Tumor Germinal No Seminomatoso (4.3 %) (Tabla 2).

**Tabla 2**  
**Tipos de Cáncer discriminados por género con TTPa\* corto**

Tipo de Cáncer	Hombres	Mujeres	Número de pacientes
Sarcoma	3	1	4
CaCu**		6	6
Ca*** de Mama		9	9
Adenocarcinoma		3	3
TGNS****	1		1
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>19</b>	<b>23</b>

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*CaCu: Carcinoma de cuello uterino

\*\*\*Ca: Carcinoma

\*\*\*\*TGNS: Tumor Germinal No Seminomatoso

#### 9.1.1 Características hematológicas y de la coagulación de los individuos estudiados

A los individuos incluidos en el estudio se les evaluaron los siguientes parámetros: TTPa, Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos. Para los pacientes con TTPa corto se obtuvieron las siguientes medias: 23 segundos, 204.6 ng/mL,  $284.3 \times 10^3$  u/L, y 58 % respectivamente (Tabla 3).

Para los pacientes control se obtuvieron las siguientes medias de TTPa, Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos: 28.2 segundos, 147.2 ng/mL,  $228.8 \times 10^3$  u/L, y 57.8 % respectivamente (Tabla 3).

Los voluntarios sanos presentaron las siguientes medias de TTPa, Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos: 29.3 segundos, 134.7 ng/mL, 281.0 x 10<sup>3</sup> u/L, y 56.5 % respectivamente (Tabla 3).

Al comparar los valores de TTPa corto con los de los voluntarios sanos y los pacientes control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P= 0.0001, prueba de Kruskal Wallis).

**Tabla 3**  
**Características de los individuos**

	Voluntarios Sanos				Pacientes Control				Pacientes con TTPa corto			
	Media	DE*	Mediana	RIQ**	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
TTPa***	29.3	2.7	28.6	26.6-31.9	28.2	2.3	27.8	26.6-29.6	23.0	0.97	23.4	22.5-23.9
Dímero D (ng/mL)	134.7	104	96	62.0-178.0	147.2	173	93	68.0-130.0	204.6	218.9	127	61.0-244.0
Plaquetas (10 <sup>3</sup> u/L)	281	47.3	275	243.0-323.0	228.8	83.5	217	182.0-267.0	284.3	85.9	291	198.0-395.0
Neutrófilos (%)	55.5	5.3	56.1	51.5-59.8	57.8	13.4	58.8	51.5-66.1	58	13.7	59.7	54.3-63.9

\*DE: Desviación estándar

\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

Al comparar los valores de dímero D de los voluntarios sanos con los pacientes control y con los pacientes con TTPa corto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

El análisis estadístico para las plaquetas mostró diferencias significativas al comparar el grupo de voluntarios sanos con el grupo control y con el grupo de pacientes con TTPa corto (Tabla 4).

El análisis estadístico para los neutrófilos no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados (Tabla 4).

**Tabla 4**  
**Análisis estadístico de los 3 grupos (P)\*\***

	Dímero D	Plaquetas	Neutrófilos
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.7108	0.0080	0.2463

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

## 9.2 EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA

Se realizaron 69 ensayos por duplicado y a cada grupo se le evaluaron los siguientes parámetros: sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1.

El análisis estadístico de los diferentes tipos de Selectinas y la TSP-1 en los tres grupos evaluados, mostró diferencias significativas en sus valores para la sP-Selectina (P= 0.001), para la sL-Selectina (P= 0.023) y para la TSP-1 (P= <0.001). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la sE-Selectina (P= 0.718) (Tabla 5).

**Tabla 5**  
**Análisis estadístico de los 3 grupos para selectinas y TSP-1 (P)\*\*\***

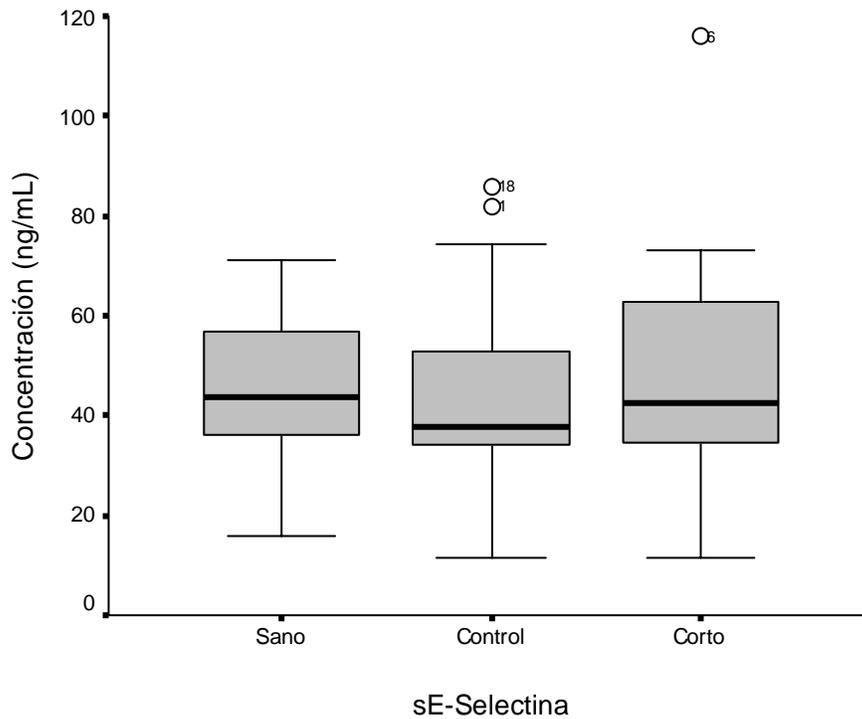
	sE-Selectina	sP-Selectina	sL-Selectina	TSP-1
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.718	0.001	0.023	< 0.001

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

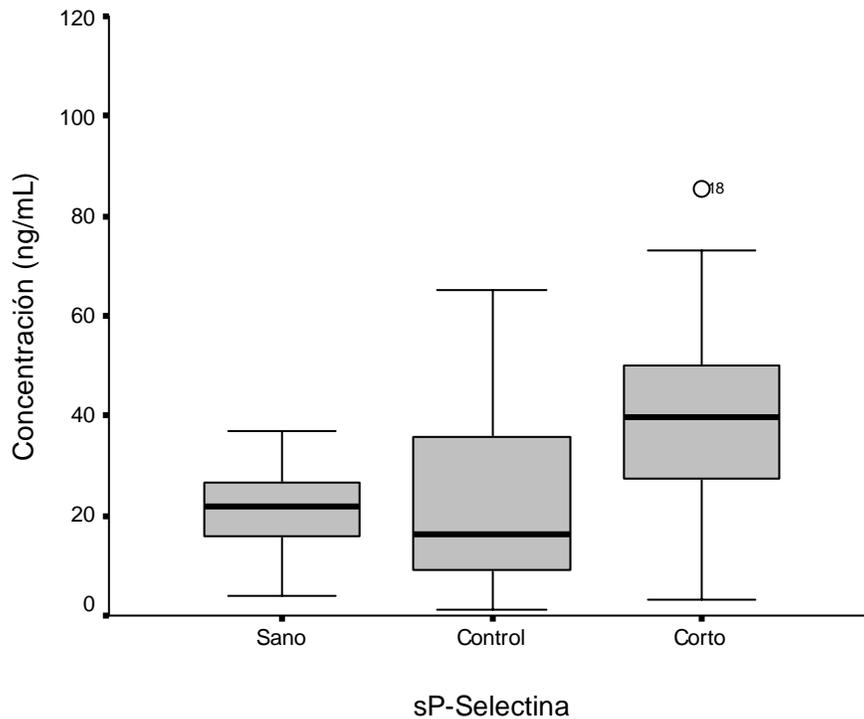
\*\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

En los voluntarios sanos la media de sE- Selectina fue de 45.4 ng/mL, en los pacientes control fue de 43.4 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto la media de sE- Selectina fue de 48.0 ng/mL (Figura 9). Al comparar los valores de sE-Selectina de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto no se encontraron diferencias significativas (P= 0.749 y P= 0.543, respectivamente) (Tabla 6).



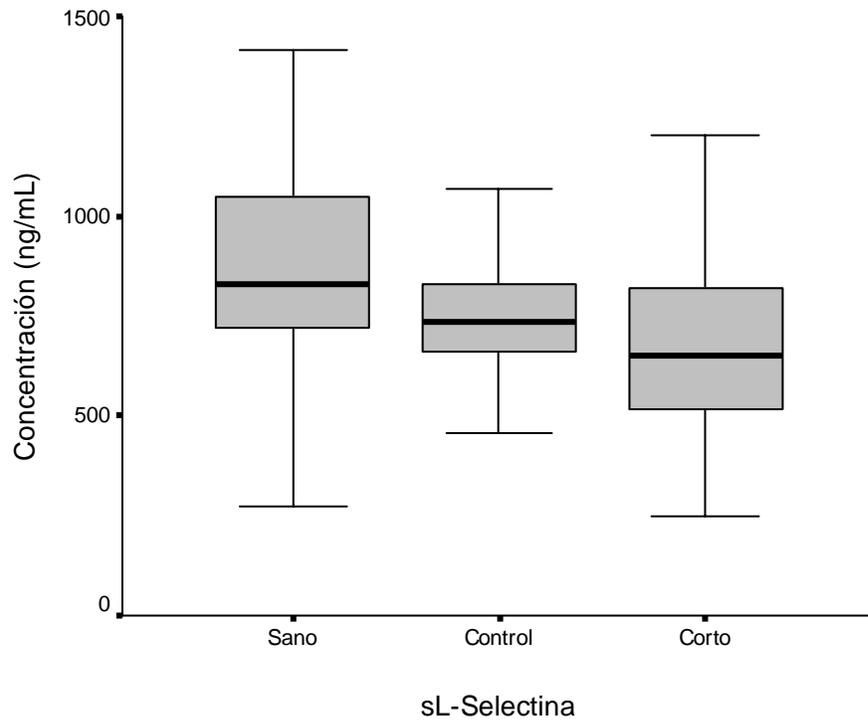
**Figura 9.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sE-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana. Los datos extremos se representan por fuera de los rangos intercuartiles.

Para la sP-Selectina la media en los voluntarios sanos fue de 21 ng/mL, en los pacientes control fue de 23.9 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto fue de 40 ng/mL (Figura 10). Al comparar los valores de sP-Selectina de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P= 0.001$  y  $P= 0.029$ , respectivamente) (Tabla 6).



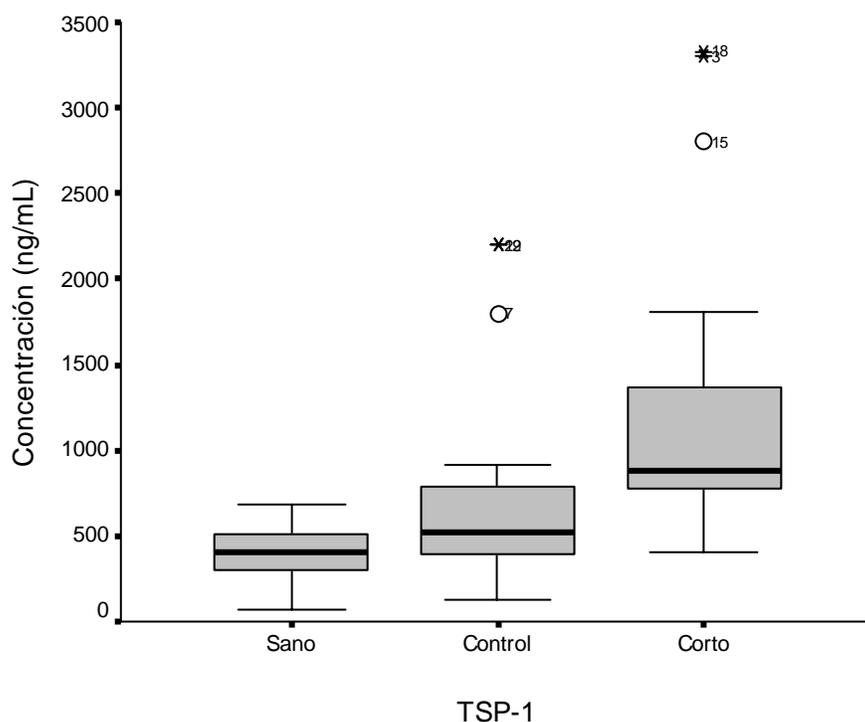
**Figura 10.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sP-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana. Los datos extremos se representan por fuera de los rangos intercuartiles.

Para la sL-Selectina la media en los voluntarios sanos fue de 867.2 ng/mL, en los pacientes control fue de 744.5 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto fue de 676.6 ng/mL (Figura 11). Al comparar los valores de sL-Selectina de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con TTPa corto comparado con los voluntarios sanos ( $P= 0.007$ ), sin encontrar diferencias significativas entre los pacientes con TTPa corto comparado con los pacientes control ( $P= 0.330$ ) (Tabla 6).



**Figura 11.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sL-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana.

Para la TSP-1 la media en los voluntarios sanos fue de 382.2 ng/mL, en los pacientes control fue de 704.8 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto fue de 1210.4 ng/mL (Figura 12). Al comparar los valores de TSP-1 de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$  y  $P = 0.014$ , respectivamente) (Tabla 6).



**Figura 12.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de Trombospondina-1 (TSP-1) en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana. Los datos extremos se representan por fuera de los rangos intercuartiles.

**Tabla 6**  
**Análisis estadístico de Selectinas y TSP-1 (P)\*\*\***

	sE-Selectina	sP-Selectina	sL-Selectina	TSP-1**
Sanos vs TTPa* corto	0.749	0.001	0.007	< 0.001
Control vs TTPa* corto	0.543	0.029	0.330	0.014

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

### 9.2.1 Evaluación hematológica por tipo histológico de Cáncer

Posteriormente se analizaron los valores de las Selectinas y de la TSP-1, discriminándolos por tipo histológico de cáncer.

En el grupo Sarcoma en los voluntarios sanos se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 56.6 ng/mL, 26.9 ng/mL, 694.3 ng/mL y 325 ng/mL respectivamente. En el grupo de pacientes control

los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 55.6 ng/mL, de 37.4 ng/mL para sP-Selectina, de 865.5 ng/mL para sL-Selectina y de 1025 ng/mL para la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 60.5 ng/mL; de sP-Selectina de 49.2 ng/mL; de sL-Selectina de 696.3 ng/mL y de TSP-1 de 1440 ng/mL (Tabla 7).

**Tabla 7**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo Sarcoma**

	Voluntarios Sanos				Pacientes control				Pacientes con TTPa**** corto			
	Media	DE**	Mediana	RIQ***	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
sE-Selectina	56.6	12.0	57.0	48.8-64.5	55.6	21.1	60.7	40.2-71.0	60.5	10.0	59.4	52.0-69.0
sP-Selectina	26.9	5.4	26.4	22.2-31.5	37.4	22.6	37.2	22.2-52.5	49.2	24.6	39.7	35.0-63.3
sL-Selectina	694.3	150.6	658.5	576-812.5	865.5	175.5	870.0	736.0-995.0	696.3	344.1	573.5	481.5-911.0
TSP-1	325.0	253.2	260.0	150.0-500.0	1025.0	841.5	850.0	510.0-1540.0	1440.0	1261.9	855.0	770.0-2110.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

En el grupo Carcinoma cervico-uterino en los voluntarios sanos se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 50.7 ng/ml, 25.9 ng/mL, 910.3 ng/mL y 401.7 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 38 ng/mL, de 19.2 ng/mL para sP-Selectina, de 634.2 ng/mL para sL-Selectina y de 495 ng/mL para la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 47.3 ng/mL; de sP-Selectina de 36.1 ng/mL; de sL-Selectina de 670.8 ng/mL y de TSP-1 de 1548 ng/mL (Tabla 8).

**Tabla 8**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo CaCu\*\***

	Voluntarios Sanos				Pacientes control				Pacientes con TTPa**** corto			
	Media	DE***	Mediana	RIQ****	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
sE-Selectina	50.7	12.1	47.0	43.6-58.4	38.0	24.0	36.25	23.0-39.0	47.3	16.9	41.7	34.5-64.4
sP-Selectina	25.9	8.8	27.5	16.4-32.0	19.2	11.7	19.9	9.4-28.0	36.1	14.2	39.6	25.0-42.0
sL-Selectina	910.3	341.1	841.5	568.0-1418.0	634.2	152.5	608.5	458.0-850.0	670.8	173.9	623.5	580.0-752.0
TSP-1	401.7	166.9	440.0	300.0-500.0	495.0	224.3	445.0	320.0-520.0	1548.3	938.5	1205.0	890.0-1810.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*CaCu: Carcinoma cervico-uterino

\*\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

En el grupo Carcinoma de mama en los voluntarios sanos se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 39.7 ng/ml,

16.8 ng/mL, 990.6 ng/mL y 413.7 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 41.8 ng/mL, de 17.6 ng/mL para sP-Selectina, de 756.2 ng/mL para sL-Selectina y de 458.9 ng/mL para la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 39.1 ng/mL; de sP-Selectina de 32.5 ng/mL; de sL-Selectina de 611 ng/mL y de TSP-1 de 926.4 ng/mL (Tabla 9).

**Tabla 9**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo Ca\*\* de mama**

	Voluntarios Sanos				Pacientes control				Pacientes con TTPa***** corto			
	Media	DE***	Mediana	RIQ****	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
sE-Selectina	39.7	14.6	34.4	32.0-52.0	41.8	19.8	36.8	34.6-48.0	39.1	20.7	34.6	22.0-57.9
sP-Selectina	16.8	6.3	18.0	16.0-22.1	17.6	19.9	14.8	3.6-16.4	32.5	23.1	30.2	19.7-48.0
sL-Selectina	990.6	195.9	940.0	820.0-1185.0	756.2	107.8	720.0	700.0-811.0	611.0	218.7	569.0	459.0-790.0
TSP-1	413.7	107.6	370.0	320.0-520.0	458.9	201.6	480.0	380.0-570.0	926.4	755.8	740.0	510.0-830.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*Ca: Carcinoma

\*\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

En el grupo Adenocarcinoma en los voluntarios sanos para la sE-Selectina se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 30.4 ng/ml, 23.3 ng/mL, 839 ng/mL y 390 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 46 ng/mL, de 27.5 ng/mL para sP-Selectina, de 787.6 ng/mL para sL-Selectina y de 1506.6 ng/mL para la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 58.2 ng/mL; de sP-Selectina de 58.3 ng/mL; de sL-Selectina de 844.6 ng/mL y de TSP-1 de 1070 ng/mL (Tabla 10).

**Tabla 10**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo Adenocarcinoma**

	Voluntarios Sanos			Pacientes control			Pacientes con TTPa*** corto		
	Media	DE**	Mediana	Media	DE	Mediana	Media	DE	Mediana
sE-Selectina	30.4	12.5	37.6	46.0	8.4	43.0	58.2	51.8	42.6
sP-Selectina	23.3	6.4	24.6	27.5	16.4	37.0	58.3	18.4	65.4
sL-Selectina	839.0	149.3	812.0	787.6	53.0	785.0	844.6	169.7	910.0
TSP-1	390.0	253.6	500.0	1506.6	877.6	1800.0	1070.0	356.8	900.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

Finalmente en el grupo de TGNS, en el grupo de voluntarios sanos para la sE-Selectina se obtuvo una media de 55.6 ng/ml; para la sP-Selectina de 8 ng/mL; para

la sL-Selectina de 275 ng/mL y para la TSP-1 de 70 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 33.6 ng/mL, de 44 ng/mL para sP-Selectina, de 688 ng/mL para sL-Selectina y de 490 ng/mL para la TSP-1. Así mismo para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 51.8 ng/mL; de sP-Selectina de 40.6 ng/mL; de sL-Selectina de 718 ng/mL y de TSP-1 de 730 ng/mL (Tabla 11).

**Tabla 11**  
**Valores de Selectina y TSP-1\*\* (ng/mL) en el grupo TGNS\*\*\***

	Voluntarios Sanos	Pacientes control	Pacientes con TTPa corto
sE-Selectina	55.6	33.6	51.8
sP-Selectina	8.0	44.0	40.6
sL-Selectina	275.0	688.0	718.0
TSP-1	70.0	490.0	730.0

\*Solo hay un individuo para cada una de las evaluaciones en este grupo

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*\*TGNS:Tumor Germinal No Seminomatoso

\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

Debido al número tan pequeño de individuos por grupo, se les realizó la prueba de Kruskal Wallis únicamente a los grupos de pacientes con Carcinoma de cervico-uterino y Carcinoma de mama.

El análisis estadístico de los diferentes tipos de Selectinas y la TSP-1 en los tres grupos evaluados, mostró para el Carcinoma cervico-uterino diferencias significativas en sus valores para la TSP-1 ( $P= 0.006$ ). No se encontró diferencias para la sE-Selectina ( $P= 0.203$ ), sP-Selectina ( $P= 0.078$ ), y sL-Selectina ( $P = 0.182$ ) (Tabla 12).

En el grupo de Carcinoma de mama se encontraron diferencias significativas para los valores de sL-Selectina ( $P= 0.003$ ) y para TSP-1 ( $P= 0.045$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la sE-Selectina ( $P= 0.898$ ) ni para la sP-Selectina ( $P= 0.123$ ) (Tabla 12).

**Tabla 12**  
**Análisis estadístico por tipo histológico de cáncer (P)\*\*\***

	sE-Selectina	sP-Selectina	sL-Selectina	TSP-1**
<b>Carcinoma de cuello uterino</b>				
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.182	0.078	0.023	0.006
<b>Carcinoma de mama</b>				
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.898	0.123	0.003	0.045

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

## 10. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que los niveles de TSP-1 se encuentran significativamente elevados en los pacientes con cáncer con el TTPa corto en comparación con los niveles obtenidos para voluntarios sanos y pacientes control, por lo que se puede decir que sí existe una relación entre estos niveles y el acortamiento del TTPa en los pacientes con cáncer evaluados.

### 10.1 VARIABLES ASOCIADAS AL ACORTAMIENTO DEL TTPa

#### 10.1.1 Trombospondina-1

Al comparar los valores de TSP-1 de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ). La TSP-1 es producida y secretada por varias líneas celulares incluyendo el neutrófilo, la plaqueta y la célula endotelial, sin embargo los niveles de TSP-1 se encuentran bajos en condiciones fisiológicas. Por lo tanto aunque la TSP-1 puede ser considerada como un marcador durante la respuesta inflamatoria no puede asegurarse que es un marcador específico de activación celular a diferencia de lo que puede afirmarse sobre las L, P y E Selectinas. Algunos investigadores han demostrado que la TSP-1 promueve la generación de trombina en la superficie de neutrófilos y monocitos durante un proceso inflamatorio crónico como lo es el neoplásico. La plaqueta como el neutrófilo y la célula endotelial son capaces de sintetizar y liberar TSP-1 en el plasma. Además mostraron que existe evidencia de que la TSP-1 se une al factor V de la coagulación. El factor V de la coagulación, es un cofactor no enzimático que promueve la generación de trombina por medio del complejo de la protrombinasa.<sup>47</sup>

#### 10.1.2 sP- Selectina

En este estudio los niveles de sP- Selectina se encontraron elevados y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de los pacientes con TTPa corto en comparación con los niveles de los voluntarios sanos y pacientes control ( $P < 0.001$ ). Este hallazgo implica secreción de sP-Selectina por activación plaquetaria y esto no fue evidente en el grupo de pacientes con cáncer con TTPa normal. Además basandonos en nuestros hallazgos, este resultado no se debe a una diferencia en la cuenta plaquetaria, la cual se encontró disminuida en los dos grupos de pacientes con cáncer (con y sin acortamiento del TTPa) y la cual es la fuente de sP-Selectina. El ligando-1 de la sP-Selectina en humanos, es una glucoproteína parecida a las mucinas que se encuentra en la membrana de los neutrófilos. Elevaciones de sP-Selectina (de las plaquetas) en modelos animales de

trombosis experimental,<sup>78</sup> han sido correlacionados con un estado pretrombótico mediado por la interacción del ligando-1 de la sL-Selectina (neutrófilos) y la sP-Selectina (plaquetas). La TSP-1 es una molécula adhesiva que se secreta y es expresada en la superficie del neutrófilo. Esta expresión en la superficie del neutrófilo fomenta la generación de trombina y promueve la interacción de plaquetas con neutrófilos. Este estudio sugiere una asociación similar (pero en humanos) entre la expresión de sP-Selectina (plaquetas) y TSP-1 la cual pudiese facilitar la formación de trombina (en plasma) y la interacción de las plaquetas con los neutrófilos aunque estudios en el futuro tendrán que explorar esta posibilidad.<sup>78</sup>

### **10.1.3 sL-Selectina**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos de sL-Selectina en los pacientes con cáncer en general en comparación con los valores obtenidos para los voluntarios sanos, y estos fueron más bajos en los pacientes con cáncer. Esta diferencia no se obtuvo al comparar los valores para los pacientes con TTPa corto con los pacientes control. Por lo tanto en general los valores de la sL-Selectina no se encontraron elevados. Es de resaltar que a diferencia de lo anteriormente mencionado, se observó una tendencia inversamente proporcional entre los niveles de sL-Selectina con los niveles de TSP-1 y sP-Selectina. Un análisis más detallado por grupo y tipo de cáncer de nuestro estudio demostró que los niveles de sL-Selectina presentan una tendencia a elevarse en el grupo de pacientes con TTPa corto con diagnóstico de carcinoma cervico-uterino y carcinoma de mama. Estudios previos en la literatura médica han reportado niveles elevados de sL-Selectina en casos de leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda.<sup>27</sup> Sin embargo, nuestra serie de casos no incluye pacientes afectados con Leucemia, por lo tanto estudios en el futuro con un número mayor de casos, podrán determinar el papel de esta selectina y su asociación con los tiempos cortos de coagulación.

### **10.1.4 sE-Selectina**

En el caso de la sE-Selectina no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos de sE-Selectina en los pacientes con TTPa corto en comparación con los valores obtenidos para los pacientes control y los voluntarios sanos. Estudios previos han reportado niveles elevados de sE-Selectina en casos de melanoma y de otros tumores epiteliales, especialmente en carcinomas colorectal.<sup>79</sup> A diferencia de esos estudios nuestros resultados muestran que los niveles de sE-Selectina no se encuentran elevados en el grupo de pacientes con TTPa corto con diagnóstico de carcinoma de mama, de carcinoma de cuello uterino ni de adenocarcinoma.

## 10.2 OTRAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ACORTAMIENTO DEL TTPA

### 10.2.1 Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores para dímero D. Se encontró una tendencia de valores más altos de dímero D en los pacientes con TTPa corto. Otros estudios han mostrado que la presencia de niveles elevados de dímero D puede indicar la existencia de alguna forma de cáncer oculta, especialmente en pacientes menores de 60 años.<sup>80</sup> Igualmente los altos niveles de dímero D confirman que se generó trombina y que se activó el sistema de la fibrinólisis.<sup>38</sup>

Al comparar el grupo de voluntarios sanos con el grupo control, al igual que el grupo de voluntarios sanos con el grupo de pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de plaquetas.

La cuenta (%) de neutrófilos tuvo una tendencia a ser mayor en los grupos con cáncer en comparación con los valores obtenidos para el grupo de voluntarios sanos. Aunque al compararlos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Es de resaltar la poca información que existe sobre el fenómeno de acortamiento del TTPa en relación con los niveles de TSP-1 y el papel que juegan las selectinas para apoyar este hecho, esto en parte puede ser explicado, por la creencia que los tiempos de coagulación cortos son debidos a una toma de muestras inadecuada o al concepto que se tiene que ese resultado no es de importancia. En este sentido, este trabajo contribuye al conocimiento sobre la existencia de TTPa corto en pacientes con cáncer y proporcionando evidencia de un nuevo mecanismo que pudiese explicar la relación entre el acortamiento del TTPa y el proceso maligno. El TTPa es un estudio de coagulación realizado de rutina en la práctica clínica, el cual se efectúa por medio de equipos automatizados en los diferentes centros médicos. Por lo tanto el poder correlacionar este fenómeno en el paciente con cáncer con un aspecto clínico es de importancia vital. La asociación entre el cáncer y la activación de la coagulación con el evento trombótico subsiguiente debe llamar la atención científica y médica sobre este fenómeno. En el futuro el seguimiento de los pacientes con cáncer incluidos en este estudio es fundamental para determinar prospectivamente la asociación de un evento trombótico con los datos obtenidos por medio de este trabajo.

## **8. MÉTODOS**

### **8.1 Población de estudio y criterios de inclusión**

- Se incluyeron en el estudio 23 pacientes de la consulta externa que presentaron el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) corto. El diagnóstico histológico de los pacientes fue: 4 con sarcoma, 6 con carcinoma cervico-uterino, 9 con carcinoma de mama, 3 con adenocarcinoma y 1 paciente con tumor germinal no seminomatoso.

- El grupo control estuvo conformado por 23 pacientes de la consulta externa con el TTPa dentro de los intervalos de referencia. El diagnóstico histológico de los pacientes control fue: 4 con sarcoma, 6 con carcinoma cervico-uterino, 9 con carcinoma de mama, 3 con adenocarcinoma y 1 paciente con tumor germinal no seminomatoso.

- El grupo de voluntarios sanos estuvo conformado por 23 voluntarios sanos que presentaron tiempos de coagulación normales, que tenían características similares de edad y género a las de los pacientes del grupo con TTPa corto y al de pacientes control.

Se definió TTPa corto como aquellos valores por debajo de los intervalos de referencia establecidos en el laboratorio siguiendo la normatividad de la NCCLS para el establecimiento de intervalos de referencia para el equipo automatizado CA-1500 Sysmex y que en este caso es de 24.2 segundos. Este valor no es aplicable a otros equipos ni a otra población de estudio.

### **8.2 Criterios de exclusión**

1) Muestras que no fueron tomadas de las venas Radial, Media o Cubital del antebrazo.

2) Muestras que fueron mal tomadas ya sea por: un tiempo de toma lento, torniquete colocado por mas de 1 minuto, muestra obtenida de venas lesionadas, muestras tomadas con jeringa, tubos mal llenados en los que no se cumple la proporción 9:1 de sangre:anticoagulante o muestras mal rotuladas.

3) Muestras en las que se haya mezclado incorrectamente el tubo: esto debe hacerse por inversión.

4) Muestras que no fueron procesadas antes de 2 horas después de tomada la muestra.

5) Muestras que fueron centrifugadas a más de 4000 rpm por más de 10 minutos.

6) Plasmas hemolizados.

- 7) Plasmas lipémicos.
- 8) Plasmas con presencia de fibrina visible.
- 9) Plasmas de pacientes que se encuentran en terapia anticoagulante.

### **8.3 Estandarización de la toma de muestras**

El fenómeno de acortamiento del TTPa es un fenómeno que se presentó de manera consistente en 2 equipos automatizados diferentes: ACL- 7000 (Cia. IL-Diagnostics) y en el equipo Stago (Cia. Roche). Y posteriormente se observó este mismo fenómeno en el equipo CA-1500. Lo cual llamó nuestra atención y por eso se decidió realizar este estudio. Primero fue necesario estandarizar la toma de muestra, es decir eliminar la posibilidad de que el acortamiento del TTPa fuera debido a errores en la fase preanalítica. Para esto la toma de las muestras fue realizada por una sola persona y esta realizó las siguientes pruebas: primero le tomo la muestra al paciente con torniquete y lo dejó colocado por un tiempo no mayor a un minuto; luego tomo la muestra dejando el torniquete por un tiempo superior a un minuto y finalmente tomo la muestra sin torniquete y se observó que no había diferencia en los resultados; el acortamiento del TTPa persistía. Posteriormente se procedió a tomar la muestra de diferentes venas, de las venas de la mano y del antebrazo (venas radial, media y cubital) y de la parte anterior del pie y tampoco se observó una diferencia en los resultados obtenidos. De esta manera se descartó que el acortamiento del TTPa fuera debido a errores en la fase preanalítica.

### **8.4 Obtención y procesamiento de las muestras**

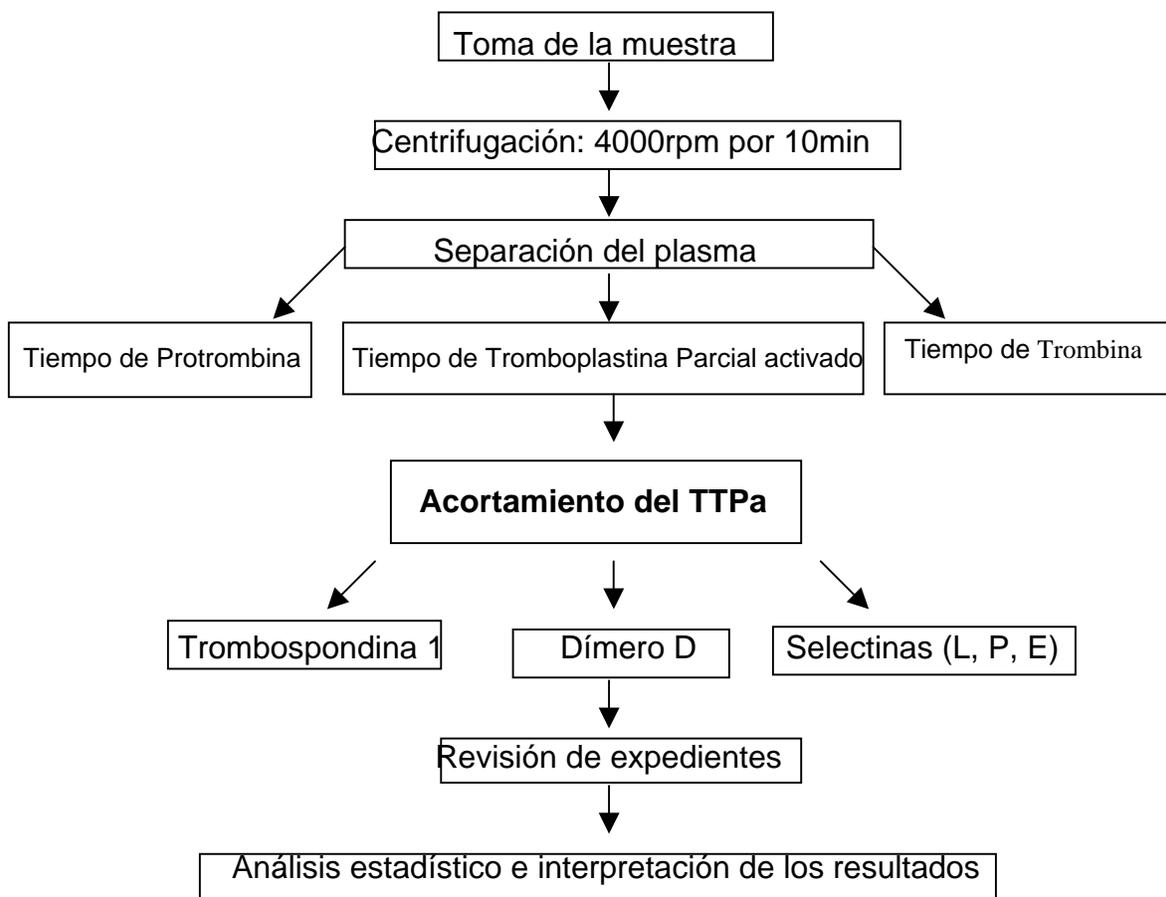
El procedimiento realizado para la obtención de las muestras fue el siguiente: las muestras fueron tomadas únicamente por una persona, la muestra se tomó de las venas Radial, Media o Cubital del antebrazo utilizando agujas vacutainer 21G x 38mm y tubos Vacutainer con tapón lila y azul de la marca Beckton Dickinson (tomados directamente de las venas antes mencionadas). Posteriormente estas muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos y es importante mencionar que esta velocidad fue establecida después de estandarizar este proceso, (con 3000 rpm la concentración de plaquetas en el plasma era mayor a 5000 plaquetas/mm<sup>3</sup>). Se determinaron los tiempos de coagulación dentro de las 2 horas siguientes a la toma de la muestra y aquellos pacientes que acortaron el TTPa y que cumplían con los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión y que además habían firmado el formato de consentimiento, se incluyeron en el estudio y la muestra fue fraccionada e inmediatamente se almacenaron a -70 °C. Así mismo se analizaron los expedientes clínicos de los pacientes incluidos en el estudio para revisar la edad, sexo y diagnóstico histológico del cáncer que padecían.

Las muestras tomadas permanecieron almacenadas a -70 °C por un tiempo de 1 a 3 meses. Posteriormente se descongelaron y se realizaron las mediciones de Dímero D en el equipo CA-1500 y se realizaron pruebas de ELISA para evaluar las concentraciones de TSP-1, y sP, sL y sE-Selectinas siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (ver el procedimiento en sección de anexos).

## 8.5 Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas se calculó el promedio, mediana, desviación estándar y rangos intercuartiles. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis para las variables dímero D (ng/mL), Plaquetas ( $10^3$  u/L) y Neutrófilos (%). Se realizó prueba de Kruskal Wallis y prueba de Wilcoxon sign-ranked para el análisis de los resultados de TSP-1, Selectina E, P y L.

El plan de procesamiento y el análisis estadístico se pueden resumir de la siguiente manera:



## 9. RESULTADOS

### 9.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En total se reclutaron 69 individuos distribuidos así: 23 pacientes con TTPa corto; 23 pacientes control (sin TTPa corto); y 23 voluntarios sanos ambos grupos con características similares respecto a edad y género de los pacientes con TTPa corto. La mayoría de los pacientes con TTPa corto fueron mujeres (82.6 %) y la media de edad fue de 48.5 años. La media de edad de los pacientes control fue de 48.3 años y la de los voluntarios sanos fue de 47 años.

4 pacientes fueron previamente diagnosticados histológicamente con Sarcoma (17.4 %), 6 con Carcinoma cervico-uterino (26.1 %), 9 con Carcinoma de mama (39.1 %), 3 con Adenocarcinoma (13.1 %) y 1 con Tumor Germinal No Seminomatoso (4.3 %) (Tabla 2).

**Tabla 2**  
**Tipos de Cáncer discriminados por género con TTPa\* corto**

Tipo de Cáncer	Hombres	Mujeres	Número de pacientes
Sarcoma	3	1	4
CaCu**		6	6
Ca*** de Mama		9	9
Adenocarcinoma		3	3
TGNS****	1		1
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>19</b>	<b>23</b>

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*CaCu: Carcinoma de cuello uterino

\*\*\*Ca: Carcinoma

\*\*\*\*TGNS: Tumor Germinal No Seminomatoso

#### 9.1.1 Características hematológicas y de la coagulación de los individuos estudiados

A los individuos incluidos en el estudio se les evaluaron los siguientes parámetros: TTPa, Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos. Para los pacientes con TTPa corto se obtuvieron las siguientes medias: 23 segundos, 204.6 ng/mL, 284.3 x 10<sup>3</sup> u/L, y 58 % respectivamente (Tabla 3).

Para los pacientes control se obtuvieron las siguientes medias de TTPa, Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos: 28.2 segundos, 147.2 ng/mL, 228.8 x 10<sup>3</sup> u/L, y 57.8 % respectivamente (Tabla 3).

Los voluntarios sanos presentaron las siguientes medias de TTPa, Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos: 29.3 segundos, 134.7 ng/mL, 281.0 x 10<sup>3</sup> u/L, y 56.5 % respectivamente (Tabla 3).

Al comparar los valores de TTPa corto con los de los voluntarios sanos y los pacientes control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.0001$ , prueba de Kruskal Wallis).

**Tabla 3**  
**Características de los individuos**

	Voluntarios Sanos				Pacientes Control				Pacientes con TTPa corto			
	Media	DE*	Mediana	RIQ**	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
TTPa***	29.3	2.7	28.6	26.6-31.9	28.2	2.3	27.8	26.6-29.6	23.0	0.97	23.4	22.5-23.9
Dímero D (ng/mL)	134.7	104	96	62.0-178.0	147.2	173	93	68.0-130.0	204.6	218.9	127	61.0-244.0
Plaquetas (103u/L)	281	47.3	275	243.0-323.0	228.8	83.5	217	182.0-267.0	284.3	85.9	291	198.0-395.0
Neutrófilos (%)	55.5	5.3	56.1	51.5-59.8	57.8	13.4	58.8	51.5-66.1	58	13.7	59.7	54.3-63.9

\*DE: Desviación estándar

\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

Al comparar los valores de dímero D de los voluntarios sanos con los pacientes control y con los pacientes con TTPa corto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

El análisis estadístico para las plaquetas mostró diferencias significativas al comparar el grupo de voluntarios sanos con el grupo de control y con el grupo de pacientes con TTPa corto (Tabla 4).

El análisis estadístico para los neutrófilos no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados (Tabla 4).

**Tabla 4**  
**Análisis estadístico de los 3 grupos (P)\*\***

	Dímero D	Plaquetas	Neutrófilos
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.7108	0.0080	0.2463

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

## 9.2 EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA

Se realizaron 69 ensayos por duplicado y a cada grupo se le evaluaron los siguientes parámetros: sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1.

El análisis estadístico de los diferentes tipos de Selectinas y la TSP-1 en los tres grupos evaluados, mostró diferencias significativas en sus valores para la sP-Selectina ( $P=0.001$ ), para la sL-Selectina ( $P=0.023$ ) y para la TSP-1 ( $P<0.001$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la sE-Selectina ( $P=0.718$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5**  
**Análisis estadístico de los 3 grupos para selectinas y TSP-1 (P)\*\*\***

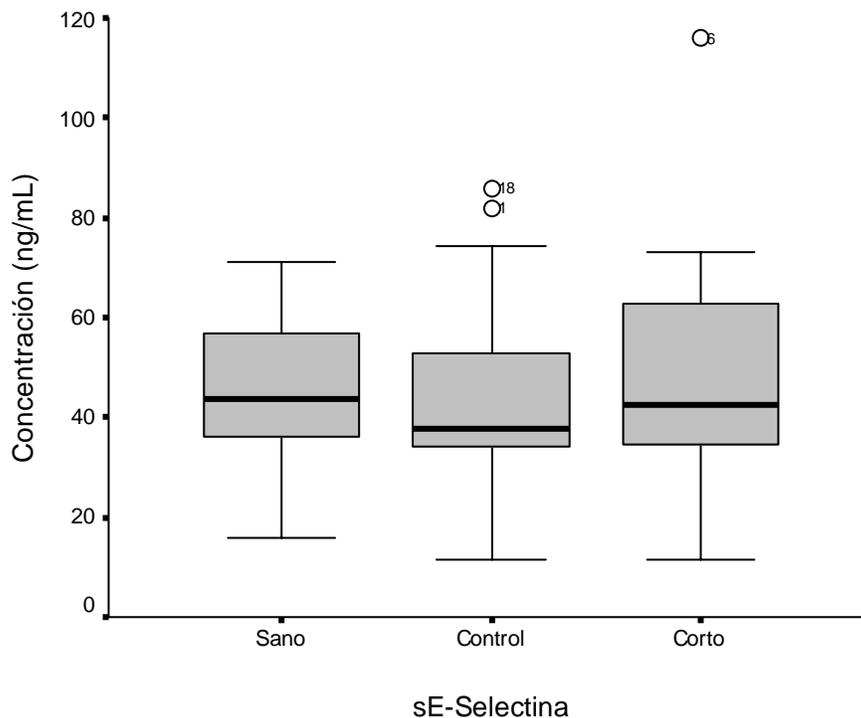
	sE-Selectina	sP-Selectina	sL-Selectina	TSP-1
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.718	0.001	0.023	< 0.001

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

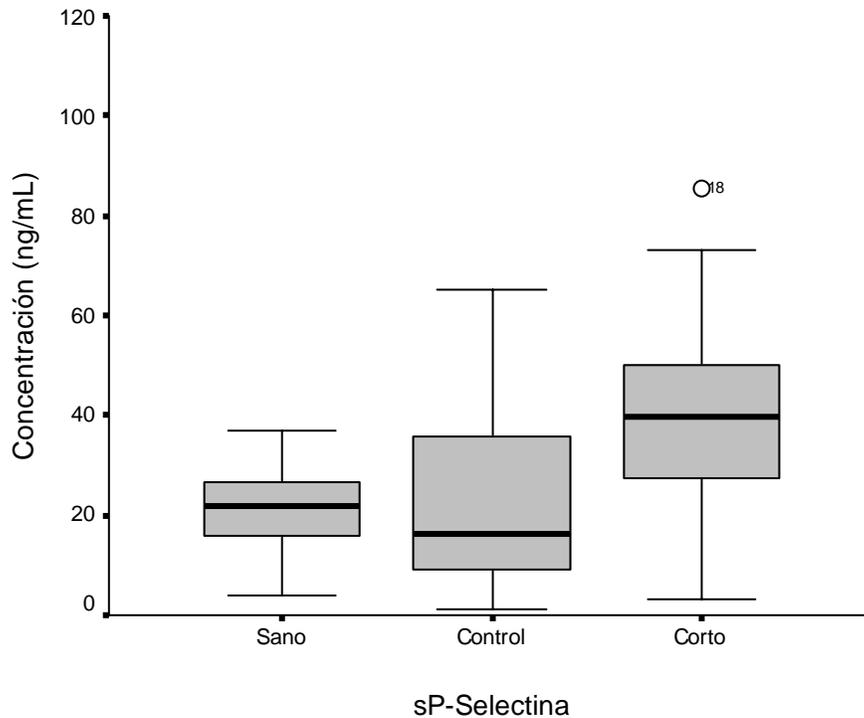
\*\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

En los voluntarios sanos la media de sE- Selectina fue de 45.4 ng/mL, en los pacientes control fue de 43.4 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto la media de sE- Selectina fue de 48.0 ng/mL (Figura 9). Al comparar los valores de sE- Selectina de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto no se encontraron diferencias significativas (P= 0.749 y P= 0.543, respectivamente) (Tabla 6).



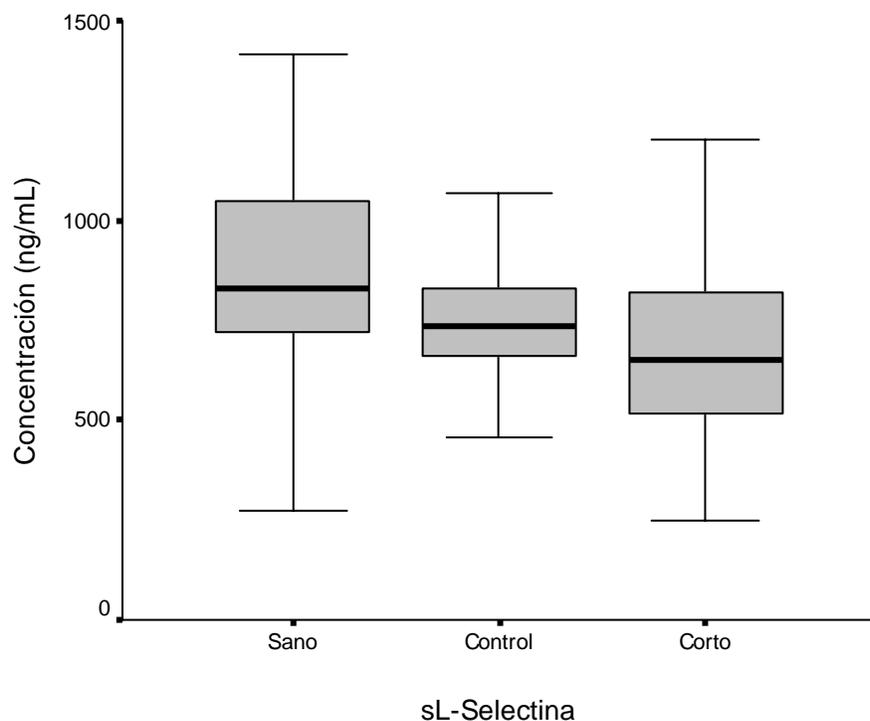
**Figura 9.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sE-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana. Los datos extremos se representan por fuera de los rangos intercuartiles.

Para la sP-Selectina la media en los voluntarios sanos fue de 21 ng/mL, en los pacientes control fue de 23.9 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto fue de 40 ng/mL (Figura 10). Al comparar los valores de sP-Selectina de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P= 0.001$  y  $P= 0.029$ , respectivamente) (Tabla 6).



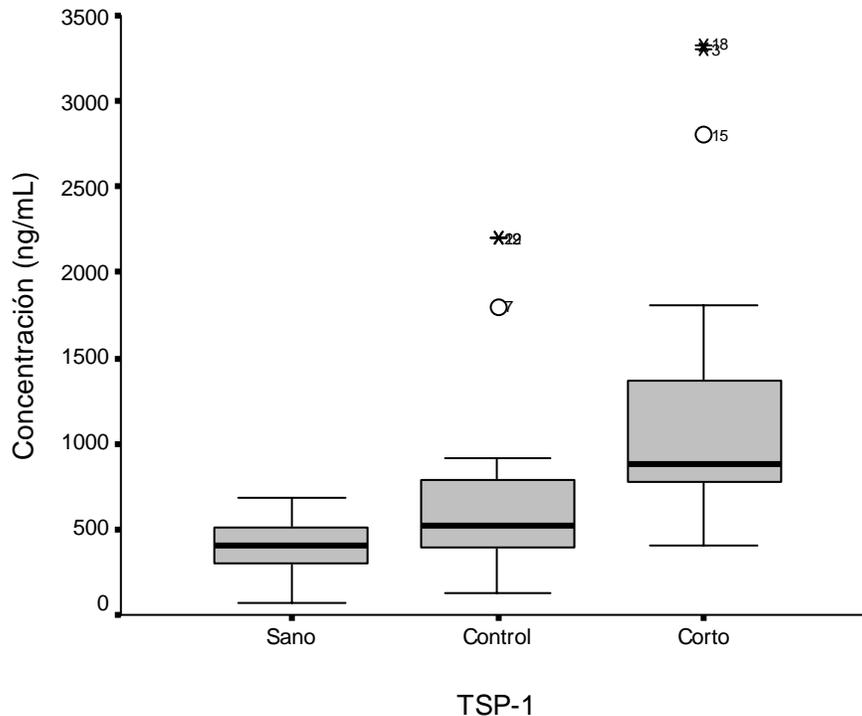
**Figura 10.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sP-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana. Los datos extremos se representan por fuera de los rangos intercuartiles.

Para la sL-Selectina la media en los voluntarios sanos fue de 867.2 ng/mL, en los pacientes control fue de 744.5 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto fue de 676.6 ng/mL (Figura 11). Al comparar los valores de sL-Selectina de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con TTPa corto comparado con los voluntarios sanos ( $P= 0.007$ ), sin encontrar diferencias significativas entre los pacientes con TTPa corto comparado con los pacientes control ( $P= 0.330$ ) (Tabla 6).



**Figura 11.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de sL-Selectina en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana.

Para la TSP-1 la media en los voluntarios sanos fue de 382.2 ng/mL, en los pacientes control fue de 704.8 ng/mL, y en los pacientes con TTPa corto fue de 1210.4 ng/mL (Figura 12). Al comparar los valores de TSP-1 de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$  y  $P = 0.014$ , respectivamente) (Tabla 6).



**Figura 12.** Diagrama de cajas que representa la concentración en ng/mL de Trombospondina-1 (TSP-1) en los 3 grupos evaluados, los voluntarios sanos, los pacientes control y los pacientes con TTPa corto. La línea central es la mediana. Los datos extremos se representan por fuera de los rangos intercuartiles.

**Tabla 6**  
**Análisis estadístico de Selectinas y TSP-1 (P)\*\*\***

	sE-Selectina	sP-Selectina	sL-Selectina	TSP-1**
Sanos vs TTPa* corto	0.749	0.001	0.007	< 0.001
Control vs TTPa* corto	0.543	0.029	0.330	0.014

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

### 9.2.1 Evaluación hematológica por tipo histológico de Cáncer

Posteriormente se analizaron los valores de las Selectinas y de la TSP-1, discriminándolos por tipo histológico de cáncer.

En el grupo Sarcoma en los voluntarios sanos se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 56.6 ng/mL, 26.9 ng/mL, 694.3 ng/mL y 325 ng/mL respectivamente. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 55.6 ng/mL, de 37.4 ng/mL para sP-Selectina, de 865.5 ng/mL para sL-Selectina y de 1025 ng/mL para

la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 60.5 ng/mL; de sP-Selectina de 49.2 ng/mL; de sL-Selectina de 696.3 ng/mL y de TSP-1 de 1440 ng/mL (Tabla 7).

**Tabla 7**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo Sarcoma**

	Voluntarios Sanos				Pacientes control				Pacientes con TTPa**** corto			
	Media	DE**	Mediana	RIQ***	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
sE-Selectina	56.6	12.0	57.0	48.8-64.5	55.6	21.1	60.7	40.2-71.0	60.5	10.0	59.4	52.0-69.0
sP-Selectina	26.9	5.4	26.4	22.2-31.5	37.4	22.6	37.2	22.2-52.5	49.2	24.6	39.7	35.0-63.3
sL-Selectina	694.3	150.6	658.5	576-812.5	865.5	175.5	870.0	736.0-995.0	696.3	344.1	573.5	481.5-911.0
TSP-1	325.0	253.2	260.0	150.0-500.0	1025.0	841.5	850.0	510.0-1540.0	1440.0	1261.9	855.0	770.0-2110.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

En el grupo Carcinoma cervico-uterino en los voluntarios sanos se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 50.7 ng/ml, 25.9 ng/mL, 910.3 ng/mL y 401.7 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 38 ng/mL, de 19.2 ng/mL para sP-Selectina, de 634.2 ng/mL para sL-Selectina y de 495 ng/mL para la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 47.3 ng/mL; de sP-Selectina de 36.1 ng/mL; de sL-Selectina de 670.8 ng/mL y de TSP-1 de 1548 ng/mL (Tabla 8).

**Tabla 8**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo CaCu\*\***

	Voluntarios Sanos				Pacientes control				Pacientes con TTPa**** corto			
	Media	DE***	Mediana	RIQ****	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
sE-Selectina	50.7	12.1	47.0	43.6-58.4	38.0	24.0	36.25	23.0-39.0	47.3	16.9	41.7	34.5-64.4
sP-Selectina	25.9	8.8	27.5	16.4-32.0	19.2	11.7	19.9	9.4-28.0	36.1	14.2	39.6	25.0-42.0
sL-Selectina	910.3	341.1	841.5	568.0-1418.0	634.2	152.5	608.5	458.0-850.0	670.8	173.9	623.5	580.0-752.0
TSP-1	401.7	166.9	440.0	300.0-500.0	495.0	224.3	445.0	320.0-520.0	1548.3	938.5	1205.0	890.0-1810.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*CaCu: Carcinoma cervico-uterino

\*\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

En el grupo Carcinoma de mama en los voluntarios sanos se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 39.7 ng/ml, 16.8 ng/mL, 990.6 ng/mL y 413.7 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 41.8 ng/mL, de 17.6 ng/mL para sP-Selectina, de 756.2 ng/mL para sL-Selectina y de 458.9 ng/mL para la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una

media de sE-Selectina de 39.1 ng/mL; de sP-Selectina de 32.5 ng/mL; de sL-Selectina de 611 ng/mL y de TSP-1 de 926.4 ng/mL (Tabla 9).

**Tabla 9**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo Ca\*\* de mama**

	Voluntarios Sanos				Pacientes control				Pacientes con TTPa**** corto			
	Media	DE***	Mediana	RIQ****	Media	DE	Mediana	RIQ	Media	DE	Mediana	RIQ
sE-Selectina	39.7	14.6	34.4	32.0-52.0	41.8	19.8	36.8	34.6-48.0	39.1	20.7	34.6	22.0-57.9
sP-Selectina	16.8	6.3	18.0	16.0-22.1	17.6	19.9	14.8	3.6-16.4	32.5	23.1	30.2	19.7-48.0
sL-Selectina	990.6	195.9	940.0	820.0-1185.0	756.2	107.8	720.0	700.0-811.0	611.0	218.7	569.0	459.0-790.0
TSP-1	413.7	107.6	370.0	320.0-520.0	458.9	201.6	480.0	380.0-570.0	926.4	755.8	740.0	510.0-830.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*Ca: Carcinoma

\*\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*\*RIQ: Rango intercuartil

\*\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

En el grupo Adenocarcinoma en los voluntarios sanos para la sE-Selectina se obtuvieron las siguientes medias para sE-Selectina, sP-Selectina, sL-Selectina y TSP-1: 30.4 ng/ml, 23.3 ng/mL, 839 ng/mL y 390 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 46 ng/mL, de 27.5 ng/mL para sP-Selectina, de 787.6 ng/mL para sL-Selectina y de 1506.6 ng/mL para la TSP-1. Finalmente para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 58.2 ng/mL; de sP-Selectina de 58.3 ng/mL; de sL-Selectina de 844.6 ng/mL y de TSP-1 de 1070 ng/mL (Tabla 10).

**Tabla 10**  
**Valores de Selectina y TSP-1\* (ng/mL) en el grupo Adenocarcinoma**

	Voluntarios Sanos			Pacientes control			Pacientes con TTPa*** corto		
	Media	DE**	Mediana	Media	DE	Mediana	Media	DE	Mediana
sE-Selectina	30.4	12.5	37.6	46.0	8.4	43.0	58.2	51.8	42.6
sP-Selectina	23.3	6.4	24.6	27.5	16.4	37.0	58.3	18.4	65.4
sL-Selectina	839.0	149.3	812.0	787.6	53.0	785.0	844.6	169.7	910.0
TSP-1	390.0	253.6	500.0	1506.6	877.6	1800.0	1070.0	356.8	900.0

\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*DE: Desviación estándar

\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

Finalmente en el grupo de TGNS, en el grupo de voluntarios sanos para la sE-Selectina se obtuvo una media de 55.6 ng/ml; para la sP-Selectina de 8 ng/mL; para la sL-Selectina de 275 ng/mL y para la TSP-1 de 70 ng/mL. En el grupo de pacientes control los resultados fueron: una media para sE-Selectina de 33.6 ng/mL, de 44 ng/mL para sP-Selectina, de 688 ng/mL para sL-Selectina y de 490 ng/mL para la TSP-1. Así mismo para el grupo de pacientes con TTPa corto se obtuvo una media de sE-Selectina de 51.8 ng/mL; de sP-Selectina de 40.6 ng/mL; de sL-Selectina de 718 ng/mL y de TSP-1 de 730 ng/mL (Tabla 11).

**Tabla 11**  
**Valores de Selectina y TSP-1\*\* (ng/mL) en el grupo TGNS\*\*\***

	Voluntarios Sanos	Pacientes control	Pacientes con TTPa corto
sE-Selectina	55.6	33.6	51.8
sP-Selectina	8.0	44.0	40.6
sL-Selectina	275.0	688.0	718.0
TSP-1	70.0	490.0	730.0

\*Solo hay un individuo para cada una de las evaluaciones en este grupo

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*\*TGNS: Tumor Germinal No Seminomatoso

\*\*\*\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

Debido al número tan pequeño de individuos por grupo, se les realizó la prueba de Kruskal Wallis únicamente a los grupos de pacientes con Carcinoma de cervico-uterino y Carcinoma de mama.

El análisis estadístico de los diferentes tipos de Selectinas y la TSP-1 en los tres grupos evaluados, mostró para el Carcinoma cervico-uterino diferencias significativas en sus valores para la TSP-1 (P= 0.006). No se encontró diferencias para la sE-Selectina (P= 0.203), sP-Selectina (P= 0.078), y sL-Selectina (P = 0.182) (Tabla 12).

En el grupo de Carcinoma de mama se encontraron diferencias significativas para los valores de sL-Selectina (P= 0.003) y para TSP-1 (P= 0.045). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la sE-Selectina (P= 0.898) ni para la sP-Selectina (P= 0.123) (Tabla 12).

**Tabla 12**  
**Análisis estadístico por tipo histológico de cáncer (P)\*\*\***

	sE-Selectina	sP-Selectina	sL-Selectina	TSP-1**
<b>Carcinoma de cuello uterino</b>				
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.182	0.078	0.023	0.006
<b>Carcinoma de mama</b>				
Sanos vs Control vs TTPa* corto	0.898	0.123	0.003	0.045

\*TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado

\*\*TSP-1: Trombospondina-1

\*\*\*P: el valor de p fue determinado por la prueba de Kruskal Wallis

## 10. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que los niveles de TSP-1 se encuentran significativamente elevados en los pacientes con cáncer con el TTPa corto en comparación con los niveles obtenidos para voluntarios sanos y pacientes control, por lo que se puede decir que sí existe una relación entre estos niveles y el acortamiento del TTPa en los pacientes con cáncer evaluados.

### 10.1 VARIABLES ASOCIADAS AL ACORTAMIENTO DEL TTPa

#### 10.1.1 Trombospondina-1

Al comparar los valores de TSP-1 de los voluntarios sanos y de los pacientes control, con los pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ). La TSP-1 es producida y secretada por varias líneas celulares incluyendo el neutrófilo, la plaqueta y la célula endotelial, sin embargo los niveles de TSP-1 se encuentran bajos en condiciones fisiológicas. Por lo tanto aunque la TSP-1 puede ser considerada como un marcador durante la respuesta inflamatoria no puede asegurarse que es un marcador específico de activación celular a diferencia de lo que puede afirmarse sobre las L, P y E Selectinas. Algunos investigadores han demostrado que la TSP-1 promueve la generación de trombina en la superficie de neutrófilos y monocitos durante un proceso inflamatorio crónico como lo es el neoplásico. La plaqueta como el neutrófilo y la célula endotelial son capaces de sintetizar y liberar TSP-1 en el plasma. Además mostraron que existe evidencia de que la TSP-1 se une al factor V de la coagulación. El factor V de la coagulación, es un cofactor no enzimático que promueve la generación de trombina por medio del complejo de la protrombinasa.<sup>47</sup>

#### 10.1.2 sP- Selectina

En este estudio los niveles de sP- Selectina se encontraron elevados y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de los pacientes con TTPa corto en comparación con los niveles de los voluntarios sanos y pacientes control ( $P < 0.001$ ). Este hallazgo implica secreción de sP-Selectina por activación plaquetaria y esto no fue evidente en el grupo de pacientes con cáncer con TTPa normal. Además basandonos en nuestros hallazgos, este resultado no se debe a una diferencia en la cuenta plaquetaria, la cual se encontró disminuida en los dos grupos de pacientes con cáncer (con y sin acortamiento del TTPa) y la cual es la fuente de sP-Selectina. El ligando-1 de la sP-Selectina en humanos, es una glucoproteína parecida a las mucinas que se encuentra en la membrana de los neutrófilos. Elevaciones de sP-Selectina (de las plaquetas) en modelos animales de

trombosis experimental,<sup>78</sup> han sido correlacionados con un estado pretrombótico mediado por la interacción del ligando-1 de la sL-Selectina (neutrófilos) y la sP-Selectina (plaquetas). La TSP-1 es una molécula adhesiva que se secreta y es expresada en la superficie del neutrófilo. Esta expresión en la superficie del neutrófilo fomenta la generación de trombina y promueve la interacción de plaquetas con neutrófilos. Este estudio sugiere una asociación similar (pero en humanos) entre la expresión de sP-Selectina (plaquetas) y TSP-1 la cual pudiese facilitar la formación de trombina (en plasma) y la interacción de las plaquetas con los neutrófilos aunque estudios en el futuro tendrán que explorar esta posibilidad.<sup>78</sup>

### **10.1.3 sL-Selectina**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores obtenidos de sL-Selectina en los pacientes con cáncer en general en comparación con los valores obtenidos para los voluntarios sanos, y estos fueron más bajos en los pacientes con cáncer. Esta diferencia no se obtuvo al comparar los valores para los pacientes con TTPa corto con los pacientes control. Por lo tanto en general los valores de la sL-Selectina no se encontraron elevados. Es de resaltar que a diferencia de lo anteriormente mencionado, se observó una tendencia inversamente proporcional entre los niveles de sL-Selectina con los niveles de TSP-1 y sP-Selectina. Un análisis más detallado por grupo y tipo de cáncer de nuestro estudio demostró que los niveles de sL-Selectina presentan una tendencia a elevarse en el grupo de pacientes con TTPa corto con diagnóstico de carcinoma cervico-uterino y carcinoma de mama. Estudios previos en la literatura médica han reportado niveles elevados de sL-Selectina en casos de leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda.<sup>27</sup> Sin embargo, nuestra serie de casos no incluye pacientes afectados con Leucemia, por lo tanto estudios en el futuro con un número mayor de casos, podrán determinar el papel de esta selectina y su asociación con los tiempos cortos de coagulación.

### **10.1.4 sE-Selectina**

En el caso de la sE-Selectina no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos de sE-Selectina en los pacientes con TTPa corto en comparación con los valores obtenidos para los pacientes control y los voluntarios sanos. Estudios previos han reportado niveles elevados de sE-Selectina en casos de melanoma y de otros tumores epiteliales, especialmente en carcinomas colorectal.<sup>79</sup> A diferencia de esos estudios nuestros resultados muestran que los niveles de sE-Selectina no se encuentran elevados en el grupo de pacientes con TTPa corto con diagnóstico de carcinoma de mama, de carcinoma de cuello uterino ni de adenocarcinoma.

## 10.2 OTRAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ACORTAMIENTO DEL TTPA

### 10.2.1 Dímero D, Plaquetas y Neutrófilos

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores para dímero D. Se encontró una tendencia de valores más altos de dímero D en los pacientes con TTPa corto. Otros estudios han mostrado que la presencia de niveles elevados de dímero D puede indicar la existencia de alguna forma de cáncer oculta, especialmente en pacientes menores de 60 años.<sup>80</sup> Igualmente los altos niveles de dímero D confirman que se generó trombina y que se activó el sistema de la fibrinólisis.<sup>38</sup>

Al comparar el grupo de voluntarios sanos con el grupo control, al igual que el grupo de voluntarios sanos con el grupo de pacientes con TTPa corto se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de plaquetas.

La cuenta (%) de neutrófilos tuvo una tendencia a ser mayor en los grupos con cáncer en comparación con los valores obtenidos para el grupo de voluntarios sanos. Aunque al compararlos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Es de resaltar la poca información que existe sobre el fenómeno de acortamiento del TTPa en relación con los niveles de TSP-1 y el papel que juegan las selectinas para apoyar este hecho, esto en parte puede ser explicado, por la creencia que los tiempos de coagulación cortos son debidos a una toma de muestras inadecuada o al concepto que se tiene que ese resultado no es de importancia. En este sentido, este trabajo contribuye al conocimiento sobre la existencia de TTPa corto en pacientes con cáncer y proporcionando evidencia de un nuevo mecanismo que pudiese explicar la relación entre el acortamiento del TTPa y el proceso maligno. El TTPa es un estudio de coagulación realizado de rutina en la práctica clínica, el cual se efectúa por medio de equipos automatizados en los diferentes centros médicos. Por lo tanto el poder correlacionar este fenómeno en el paciente con cáncer con un aspecto clínico es de importancia vital. La asociación entre el cáncer y la activación de la coagulación con el evento trombótico subsiguiente debe llamar la atención científica y médica sobre este fenómeno. En el futuro el seguimiento de los pacientes con cáncer incluidos en este estudio es fundamental para determinar prospectivamente la asociación de un evento trombótico con los datos obtenidos por medio de este trabajo.

## 11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los hallazgos de este estudio han permitido contribuir a la literatura médica con la siguiente información: a) Descartar que el acortamiento del TTPa este asociado a una inadecuada toma de muestras o al procesamiento de la misma, b) señalar que existe una relación entre los niveles de TSP-1 con el acortamiento del TTPa en los pacientes con cáncer evaluados y c) tener una imagen del panorama del fenómeno de la coagulación en estos pacientes con cáncer mediante la evaluación de P, L y E Selectinas al igual que dímero D, plaquetas y neutrófilos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permitirán el desarrollo de nuevos estudios en pacientes con características similares a los aquí evaluados y al seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio.

Igualmente en un estudio de 182 casos se evidenció la asociación del fenómeno de Trousseau con adenocarcinomas capaces de producir mucina. Las mucinas son glucoproteínas que se encuentran sobreexpresadas en células carcinomatosas. Estas moléculas (mucinas) pueden servir como ligandos para la familia de selectinas. Las selectinas L, P y E son parte de una familia de moléculas de adhesión con la propiedad de unirse a carbohidratos. En nuestro estudio solo contamos con 3 casos de pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma por lo que sería interesante evaluar la interacción de las mucinas con las selectinas y demostrar que pueden jugar un papel importante en el evento trombótico en el paciente con cáncer.<sup>81</sup>

Adicionalmente sería importante medir los niveles de Fragmento 1+2 de la Protrombina y complejos Trombina-Antitrombina-III para demostrar la formación de trombina y la subsecuente activación del sistema fibrinolítico. Porque la evaluación del TTPa en el laboratorio tiene limitaciones ya que no refleja la cantidad de trombina generada.<sup>82</sup>

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colman RW, Rubin RN. Disseminated intravascular coagulation due to malignancy. *Seminars in oncology* 1990;17:172.
2. Green K.B., Silverstein R.L. Hypercoagulability in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996, 10:499-530.
3. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. En *Clinique medicale de l'Hotel de Paris* 1985 ;3:654-656.
4. Hirsh J, Hoak J. Management of Deep Vein thrombosis and pulmonary embolism. *Circulation* 1996;93:2212.
5. Levine M, Hirsh J. The diagnosis and treatment of thrombosis in the cancer patient. *Seminars in oncology* 1990;17:160.
6. Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW. *Hemostasis and Thrombosis*. Philadelphia: J.B. Lippincott Co. 1982.
7. Bithell TC. The physiology of primary hemostasis. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9<sup>th</sup> Ed. Edited by Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, and Lukens JN. Philadelphia,1993.
8. Jaffe EA. Vascular function in hemostasis. In *hematology*. 4<sup>th</sup> Ed. Edited by Williams WJ, Beutler E, Erlesv AJ, and Lichtman MA. New York: McGraw-Hill, Inc., 1990.
9. Kefalides NA. Biochemical aspects of the vessel wall. In *hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 2<sup>nd</sup> Ed. Edited by Coleman RW, Hirsch J, Marder VJ, and Salzman EW. Philadelphia: J.B. Lippincott Co. 1987.
10. Brass IF. Molecular basis for platelet activation. In *Hematology: Basic Principles and Practice*. 2<sup>nd</sup> Ed. Edited by Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Fuerie B, Cohen HJ and Silberstein LE. New York: Churchill Livingstone, 1995.
11. Flier J.S., Underhill L.H. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl.J.Med*, 1992. 326:p. 800.
12. Mosher DF, Doyle MJ, Jaffe EA. Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982;93:343-8.
13. Nemerson Y. Regulation of the initiation of coagulation by factor VII: *Haemostasis* 1983;13:150.

14. Esmon C.T., Owen W.G., Duiguid D.L., Jackson C.M. The action of thrombin on blood clotting factor V: conversion of factor V to a prothrombin-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973. 310 (1): p. 289-94.
15. De Stefano V, Finazzi G, and Mannucci PM. Inherited Thrombophilia: Pathogenesis, Clinical Syndromes, and management. *Blood* 1996;87:3531.
16. Esmon C.T. Inflammation and thrombosis. *J. Thromb Haemost*, 2003. 1 (7): p. 1343-8.
17. Hathaway W.E. Clinical aspects of antithrombin III deficiency. *Semin Hematol*. 1991;28:19-23.
18. Rapaport SI. Blood coagulation and its alterations in hemorrhagic and thrombotic disorders. *West. J. med* 1993;158:153.
19. Kitchens CS. Approach to the Bleeding Patient. *Haematology/Oncology. Clinics of North America* 1992;6:983.
20. Hemker HC, Kessels H. Feedback mechanisms in coagulation. *Haemost*, 1991;21:189.
21. Ey F.S., Goodnight S.H. Bleeding disorders in cancer seminars in oncology, 1990. 17: p. 187.
22. Falanga A., Marchetti M., Vignoli A., Balducci D. Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2003 Nov;1(11):673-8.
23. Kakkar AK, DeRuvo N, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Williamson RC. Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor. *Lancet* 1995;346:1004-5.
24. Marchetti M, Falanga A, Giovanelli S, Oldani E, Barbui T. All-trans-retinoic acid increases adhesion to endothelium of the human promyelocytic leukaemia cell line NB4. *Br J Haematol* 1996;93:360-6.
25. Billroth T. *Lectures on Surgical Pathology and Therapeutics: a Handbook for Students and Practitioners*. London, The New Sydenham Society 8th ed. 1877.
26. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995. Jan:1 (1): 27-31.
27. Kapelko-Słowik K, Jazwiec B, Mirosław S, Wolowiec D, Urbaniak-Kujda D, Tomaszewska-Toporska B, Potoczek S, Ciszak L, Kuliczkowski K. *Plasma*

concentration of the shed form of L-selectin (sL-selectin) in patients with acute myeloblastic leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) and its relation to the clinical course. *Pol Arch Med Wewn* 2004;112:1283-8.

28. Del Carpio F, DeLa Cadena R, Cervera E. Alteraciones Hemostáticas en el paciente con cáncer. *Archivos Mexicanos de Laboratorio LABORAT-acta*. (Trimestral) 2005.

29. Gordon S.G. Cancer cell procoagulants and their role in malignant disease. *Semin Thrombos Haemost*, 1992. 18: p. 424-433.

30. Rapaport SI. The extrinsic pathway inhibitor: A regulator of tissue factor-dependent blood coagulation. *Thrombos Haemost* 1991;66:6-15.

31. Carson SD, Haire WD, Broze GJ, Novotny WF y col. Lipoprotein associated coagulation inhibitor, factor VII, Antithrombin III, and monocytes tissue factor following surgery. *Thrombos haemost* 1991;66:534-539.

32. Novotny WF. Tissue factor pathway inhibitor. *Sem Thrombos Hemostas* 1994;20:101-108.

33. Bastida E, Ordinas A, Jamieson GA. Differing platelet aggregating effects by two cell lines: absence of a role for platelet-derived ADP. *Am J Hematol* 1981;11:367-378.

34. Cavanagh PG, Sloane BF, Bajkowski AS, Taylor JD, Honn KV. Purification and characterization of platelet aggregating activity from tumor cells: copurification with procoagulant activity. *Thromb Res* 1985;37:309-326.

35. Honn KV, Busse WD, Sloane BF. Prostacyclin and thromboxane. Implications for their role in tumor cell metastases. *Biochem Pharmacol* 1983;32:1-11.

36. Gore I. Thrombosis and pancreatic cancer. *Am J Pathol*, 1953. 29: p.1093.

37. Del Carpio Cano F, De La Peña A, Alvarez De La Cadena R, Martinez Palma A, Baz Gutierrez P, Cervera Ceballos E. Las neoplasias activas se asocian con tiempos de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) "cortos" determinado por método nefelométrico. *Revista Mexicana de Hematología* 2005;6:S28-S29.

38. Van-Wersch JW, Tjwa MK. Coagulation/fibrinolysis balance and lung cancer. *Haemostasis* 1991;21:117-123.

39. Lindhal AK, Abildgaard U, Stokke G. Release of extrinsic pathway inhibitor after heparin injection: Increased response on cancer patients. *Thrombos Res* 1990;59:651-656.

40. Mansfield PJ, Boxer LA, Suchard SJ. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1994;153:4219-29.
41. Nachmann RL, Silverstein R. Hypercoagulable States. *Ann Intern Med* 1993;119:819.
42. Marcus AJ. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions. *Semin Hematol* 1994;31:261-9.
43. Mansfield PJ, Boxer LA, Suchard SJ. Thrombospondin stimulates motility of human neutrophils. *J Cell Biol* 1990;111:3077-86.
44. McLaughlin MA, Chesebro J, Fuster V. Hypercoagulable States and Cardiovascular Disease. *ACC CURRENT JOURNAL REVIEW*. 1996;28-35.
45. Hayashido Yasutaka, Nakashima Mashairo, Urabe Kazuhiko, Yoshioka Hideo, Yoshioka Yukio, Haman Tomoaki, Kitano Hisataka, Koizumi Khichi, Okamoto Tesuji: Role of stromal thrombospondin-1 in motility and proteolytic activity of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2003;12:447-52.
46. Majluf-Cruz A, Manns JM, Uknis AB, Yang X, Colman RW, Harris RB, Frazier W, Lawler J, DeLa Cadena RA. Residues F16-G33 and A784-N823 within platelet thrombospondin-1 play a major role in binding human neutrophils: evaluation by two novel binding assays. *J Lab Clin Med* 2000;136:292-302.
47. Isordia-Salas I, Manns JM, Sainz I, Parekh H, De La Cadena RA. Thrombospondin-1 binds to the heavy chain of elastase activated coagulation factor V (FVaHNE) and enhances thrombin generation on the surface of a promyelocytic cell line. *Thromb Res*. 2005;116:533-43.
48. Vender RL. Therapeutic potential of neutrophil-elastase inhibition in pulmonary disease. *J Investig Med* 1996;44:531-9.
49. Snider GL, Ciccolella DE, Morris SM, Stone PJ, Lucey EC. Putative role of neutrophil elastase in the pathogenesis of emphysema. *Ann N Y Acad Sci* 1991;624:45-59.
50. Rees DD, Brain JD. Effects of cystic fibrosis airway secretions on rat lung: role of neutrophil elastase. *Am J Physiol* 1995;269:195-202.
51. Oda T, et al. Involvement of neutrophil elastase in crescentic glomerulonephritis. *Hum Pathol* 1997;28:720-8.

52. Momohara S, Kashiwazaki S, Inoue K, Saito S, Nakagawa T. Elastase from polymorphonuclear leukocyte in articular cartilage and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1997;16:133-40.
53. Jaffe EA, Ruggiero JT, Leung LK, Doyle MJ, McKeown-Longo PJ, Mosher DF. Cultured human fibroblast synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:998-1002.
54. Majack RA, Cook SC, Bornstein P. Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1985;101:059-70.
55. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. Isolation and properties of a thrombin-sensitive protein of human platelets. *J Biol Chem* 1972;247:2723-31.
56. Adams JC. Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:861-5.
57. Mansfield PJ, Boxer LA, Suchard SJ. Thrombospondin promotes both chemotaxis and haptotaxis in neutrophil-like HI-60 cells. *J Immunol* 1993;150:1959-70.
58. Hogg PJ, Jiménez BM, Chesterman CN. Identification of possible inhibitory reactive centers in thrombospondin 1 that may bind cathepsin G and neutrophil elastase. *Biochemistry* 1994; 33:6531-7.
59. Hogg PJ, Owensby DA, Mosher DF, Misenheimer TM, Chesterman CN. Thrombospondin is a tight-binding competitive inhibitor of neutrophil elastase. *J Biol Chem* 1993;268:7139-46. Barton PG, Yin ET, Wessler S. Wessler. Reactions of activated factor X-phosphatide mixtures in vitro and in vivo. *Journal of lipid research* 1970;11:87-95.
60. Samis JA, Garrett M, Manuel RP, Nesheim ME, Giles AR. Human neutrophil elastase activates human factor V but inactivates thrombin-activated human factor V. *Blood* 1997;90:1065-74.
61. Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LV. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275:14632-41.
62. Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE, Laurent GJ. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 2000; 275:35584-91.
63. Barton PG, Yin ET, Wessler S. Reactions of activated factor X-phosphatide mixtures in vitro and in vivo. *Journal of lipid research* 1970;11:87-95.

64. Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW. Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *Journal of Biological Chemistry* 1978;253:6908-16.
65. Mast AE, Stadanlick JE, Lockett JM, Dietzen DJ, Hasty KA, Hall CL. Tissue factor pathway inhibitor binds to platelet thrombospondin-1. *J Biol Chem* 2000; 275:31715-21.
66. Zacharski LR, Constantini V, Wojtukiewicz MZ, Ornstein DL. Clotting factors in tumor tissue: Implications for cancer therapy. *Blood Coag Fibrinol* 1990;1:71-78.
67. Zacharski LR, Constantini V, Wojtukiewicz MZ, Memoli VA, Kudryk BJ. Anticoagulant as cancer therapy. *Semin Oncol* 1990;17:217.
68. Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ, Wiberg L, Churchill WH. Fibrin-gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs: Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1979.
69. Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM. Fibrin as a component of the tumor stroma: original and biological significance. *Cancer Metast Rev* 1983;2:41-73.
70. Gunji Y., Gorelik E. Role of fibrin coagulation in protection of murine tumor cells from destruction by immune cells. *Cancer Res*, 1988. 48: p. 5216-5221.
71. Olander JV, Bremer ME, Marasa JC, Feder J. Fibrin enhanced endothelial cell organization. *J Cell Physiol* 1985;125:1-9.
72. Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC, Oaris S, L'Allemain G, Pouyssegur J. Alpha-thrombin induced early mitogenic signaling external stimulation. *EMBO J.*, 1985;4:2927-2932.
73. Corriveau DM, Fristma GA. *Hemostasis and Thrombosis in the Clinical Laboratory*. Philadelphia: J.B. Lippincott Co. 1988.
74. Brown BA. *Hematology: Principles and Procedures*, 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
75. Madzhuga AV, Somonova OV, Elizarova AL, Sviridova SP, Zubrikhin GN. The clinical value of D-dimer in the diagnosis and treatment of thromboembolic complications and DIC syndrome in cancer patients. *Anesteziol Reanimatol* 2005; Sep-Oct: 55-7.
76. Sirridge MS, Shannon R. *Laboratory Evaluation of Hemostasis and Thrombosis*, 3<sup>rd</sup> Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.

77. Jensen R, Ens GE. ELISA application in hemostasis. Clin. Hemost Rev 1993; 7:1.
78. Xu J, Lasry JB, Svaren J, Wagner B, Darien BJ. Identification of equine P-selectin glycoprotein ligand-1 (CD162). Mamm Genome 2005;16:66-71.
79. Uner A, Akcali Z, Unsal D. Serum levels of soluble E-selectin in colorectal cancer. Neoplasma. 2004;51:269-74.
80. Schutgens RE., Beckers MM, Haas FJ, Biesma DH. The predictive value of D-dimer measurement for cancer in patients with deep vein thrombosis. Haematologica 2005;90:214-9.
81. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. J Clin Invest 2003;112:853-62.
82. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. Thromb Haemost 1995;74:1388.

## 13. ANEXOS

### 13.1 EQUIPO CA-1500 SYSMEX

El equipo CA-1500 es un analizador de coagulación completamente automatizado para su utilización en el diagnóstico “in vitro”, que tiene la capacidad de analizar rápidamente una gran cantidad de muestras con un elevado índice de precisión. El equipo CA-1500 puede analizar muestras mediante los métodos de coagulación, cromogénico y de ensayo inmunológico. Los datos analizados pueden almacenarse, visualizarse e imprimirse.

#### Mecanismo de análisis

El equipo CA-1500 emplea unidades de los sistemas mecánico, hidráulico y eléctrico y realiza análisis de acuerdo con el procedimiento que se describe a continuación:

1. Las muestras que se colocan en gradillas se llevan a la posición de aspiración mediante una operación del muestreador.
2. La sonda de muestras aspira la cantidad de plasma necesario de la gradilla (que para la prueba de TTPa es de 50 $\mu$ L).
3. El plasma de la muestra aspirado se dispensa en las cubetas de reacción.
4. La muestra contenida en las cubetas de reacción se incuban durante un período de tiempo determinado (para la prueba de TTPa, la muestra se incuba por 1 minuto).
5. La sonda de reactivos aspira una determinada cantidad del reactivo prescrito del frasco que se encuentra en las bandejas de reactivos. Se calienta el reactivo dentro de la sonda de reactivos la cual tiene una temperatura de  $37 \pm 1$  grados centígrados por espacio de unos segundos.
6. El captador lleva la muestra calentada en la incubadora hasta la posición de dispensado del reactivo y se añade el reactivo de la sonda.
7. El captador agita entonces el tubo de muestra en el que se ha añadido el reactivo y lo lleva hasta el bloque del detector, donde comienza simultáneamente la detección del análisis.
8. En el bloque del detector, la reacción de coagulación se detecta a partir del cambio en la luz dispersada o transmitida. La reacción de ensayo inmunológico se detecta a

partir del cambio en la absorción de la luz producida por la reacción de los anticuerpos con el antígeno, es decir por el cambio de luz transmitida.

9. El captador transporta las cubetas de reacción de las muestras ya analizadas hasta la caja de desechos de cubetas para su eliminación.

### **Principios de detección para el método de coagulación**

Una vez calentada una cierta cantidad de plasma sanguíneo durante un período de tiempo determinado, se agrega el reactivo. A continuación, la muestra a la que se le ha añadido el reactivo se expone a una fuente de luz con una longitud de onda de 660nm; la turbidez de la muestra sanguínea se detecta durante el proceso de coagulación (transformación del fibrinógeno en fibrina) como un cambio en la intensidad de la luz dispersada. A partir de este cambio de intensidad, se define una curva de coagulación mediante el método de detección del porcentaje.

### **Método de detección del punto de coagulación (detección del porcentaje)**

El método de detección del porcentaje se emplea para detectar el tiempo de coagulación. El nivel de intensidad de luz dispersada, justo después de añadir el reactivo de coagulación, pero antes de haber comenzado la coagulación, se define como el 0%. El nivel de intensidad de luz dispersada una vez finalizada la coagulación se define como el 100%. El tiempo que tarda el nivel de intensidad de luz dispersada en alcanzar el porcentaje de detección predefinido se calcula a partir de la curva de coagulación, y esto es lo que se denomina tiempo de coagulación. Con este método se puede detectar el tiempo de coagulación aunque se produzcan pequeños cambios en la intensidad de la luz dispersada. Por lo tanto, se puede detectar el tiempo de coagulación de muestras que presenten cambios pequeños en la intensidad de la luz dispersada (muestras bajas en fibrinógeno) e incluso de muestras cuya velocidad de cambio sea lenta (muestras con un tiempo de coagulación prolongado).

### **Curva de calibración del método de coagulación**

Por lo que se refiere a los parámetros cuyo principio de detección es el método de coagulación, existe una relación lineal entre el tiempo de coagulación y el porcentaje de actividad (o concentración) cuando se muestran en una gráfica de coordenadas logarítmicas. El equipo CA-1500 puede utilizar esta relación para definir curvas de calibración. Estas se crean uniendo pares consecutivos de porcentajes de actividad (o concentración) con líneas rectas. Los dos extremos de las curvas de calibración se determinan prolongando la línea descrita por el par de puntos de porcentaje de actividad (o concentración) más cercana al extremo.

## **Método de detección óptica (detección de luz dispersa)**

El equipo CA-1500 utiliza el método de detección óptica. De este modo detecta el cambio en la turbidez de la muestra sanguínea durante el proceso de coagulación como un cambio en la intensidad de la luz dispersada. La luz que emite desde una fuente de luz alcanza la muestra. Un fotodiodo recibe la luz dispersada y la convierte en señales eléctricas. Estas señales se almacenan y calculan en un microprocesador con el fin de establecer el tiempo de coagulación.

## **Coagulación de la sangre e intensidad de la luz dispersada**

Paso 1: Se añade reactivo caliente al plasma también calentado previamente durante un período de tiempo determinado.

Paso 2: Inmediatamente después de añadir el reactivo, la luz dispersada es débil y apenas se producen cambios en la muestra.

Paso 3-4: A medida que va avanzando el proceso de reacción, comienzan a formarse los coágulos de fibrina. Al mismo tiempo la muestra comienza a enturbiarse y se detecta un aumento apreciable en la intensidad de la luz dispersada.

Paso 5: Una vez finalizada la coagulación, la intensidad de la luz dispersada deja de incrementar y se estabiliza en un nivel de dispersión determinado.

Según se ha descrito, el equipo CA-1500 puede registrar el proceso de coagulación de la sangre como un cambio en la intensidad de la luz dispersada y extraer después la curva de coagulación.

## **Proceso de análisis**

### **Proceso de análisis de TP**

A una copilla de reacción el equipo agrega:

Volumen de muestra → 50µL → incuba por 3 minutos  
(plasma)

→ agrega 100µL de reactivo de TP

→ Detección (Tiempo máximo: 120 segundos)

### **Proceso de análisis de TTPa**

A una copilla de reacción el equipo agrega:

Volumen de muestra → 50 $\mu$ L → incuba por 1 minuto  
(plasma)

→ agrega 50 $\mu$ L de reactivo de TTPa

→ incuba por 3 minutos → agrega 50 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub>

→ Detección (Tiempo máximo: 180 segundos)

### **Proceso de análisis de TT**

A una copilla de reacción el equipo agrega:

Volumen de muestra → 50 $\mu$ L → incuba por 3 minutos  
(plasma)

→ agrega 100 $\mu$ L de reactivo de TT

→ Detección (Tiempo máximo: 150 segundos)

### **Principios de detección para el método de ensayo inmunológico**

Una vez calentada una cierta cantidad de muestra durante un período de tiempo determinado, se puede añadir el reactivo de estabilización y el reactivo sensible a los anticuerpos. La muestra se expone a continuación a una luz con longitud de onda definida y se detecta el cambio en la absorción de la luz producido por la reacción de los anticuerpos con el antígeno como un cambio de luz transmitida.

### **Método de detección de luz transmitida**

La luz de la fuente luminosa se separa mediante uno de los 3 filtros en componentes de 405nm, 575nm y 800nm. La luz filtrada pasa a través de la muestra y alcanza el fotodiodo donde la intensidad de la luz transmitida se convierte en señales eléctricas. El cambio en la cantidad de luz transmitida se almacena y calcula en el microprocesador y se determina el cambio de absorción por minuto ( $\Delta$ OD/min) y el porcentaje de actividad (o concentración) cuando ambos parámetros se

muestran en una gráfica de números reales. El equipo CA-1500 puede utilizar esta relación para definir curvas de calibración. Estas se crean uniendo pares consecutivos de porcentaje de actividad (o concentración) con líneas rectas. Los dos extremos de las curvas de calibración se determinan prolongando la línea descrita por el par de puntos de porcentaje de actividad (o concentración) más cercana al extremo.

NOTA: En aquellos casos en los que la concentración de antígeno es demasiado alta, es posible observar el fenómeno de prozona. Por lo tanto, los incrementos de la concentración de antígenos vienen acompañados de una disminución de la absorción de la luz. Cuando se produce el fenómeno de prozona, la concentración de anticuerpos indicada será menor que el valor real. Cuando suceda esto, hay que diluir la muestra y volver a realizar el análisis.

### **Proceso de análisis de Dímero D**

A una copilla de reacción el equipo agrega:

Volumen de muestra (plasma) → 50 $\mu$ L + 25 $\mu$ L de acelerador → incuba por 20 segundos

→ agrega 150 $\mu$ L de reactivo de látex

→ Detección (Rango de análisis: 200 segundos)

## **13.2 DETERMINACIONES Y REACTIVOS (MARCA DADE BEHRING)**

### **13.2.1 Determinación de Tiempo de Protrombina (TP)**

El reactivo Thromborel S se utiliza para la determinación del tiempo de protrombina (TP) según Quick y junto con los correspondientes plasmas deficitarios, para la determinación de los factores de coagulación II, V, VII y X.

#### **Principio del método**

El proceso de coagulación se desencadena mediante la incubación del plasma con cantidades óptimas de tromboplastina y calcio; se mide el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo de fibrina.

## Reactivo

**Reactivo Thromborel S.** Tromboplastina obtenida de placenta humana, liofilizada, cloruro de calcio, estabilizadores. Agente de conservación: Gentamicin (0.1g/L), 5-cloro-2-metil-isotiazol-3-ona y el 2-metil-4-isotiazol-3-ona (máximo 20mg/L).

## Procedimiento

Volumen de muestra (plasma) → 50 $\mu$ L → incuba por 3 minutos → agrega 100 $\mu$ L de reactivo de TP  
→ Detección (Tiempo máximo: 120 segundos)

## Valores de referencia

10.8 – 13.7 segundos.

### 13.2.2 Determinación de Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa)

Suspensión de cefalina de cerebro de conejo con activador plasmático para la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y para los test de coagulación basados en este.

## Fundamento

La determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) es un test de chequeo global, el cual se utiliza primordialmente para la evaluación del sistema intrínseco de la coagulación, pero igualmente indica una deficiencia funcional grave de los factores II, V, X o del fibrinógeno. Es un test con grandes posibilidades de uso para el diagnóstico de alteraciones de la coagulación y para el control de las terapias de pacientes con tendencia a las hemorragias o a la trombosis.

## Principio del método

La incubación del plasma con una cantidad óptima de fosfolípidos y un activador de superficie conducen a la activación de los factores del sistema intrínseco de la coagulación. Al añadir los iones de calcio se desencadena el proceso de coagulación. Se mide el tiempo gastado hasta la formación del coágulo.

## Reactivo

Actin Reactivo de cefaloplastina activada: Cefalina (extracto obtenido de cerebro de conejo deshidratado) en  $1.0 \times 10^{-4}$ M de ácido elágico, con tampón, estabilizadores y agentes de conservación. No existen valores estándar disponibles para la actividad de la cefalina de cerebro de conejo.

## Procedimiento

Volumen de muestra (plasma) → 50 $\mu$ L → incuba por 1 minuto → agrega 50 $\mu$ L de reactivo de TTPa  
→ incuba por 3 minutos → agrega 50 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub>  
→ Detección (Tiempo máximo: 180 segundos).

## Valores de referencia

24.2 – 35.3 segundos.

### 13.2.3 Determinación de Tiempo de Trombina (TT)

Determinación del tiempo de trombina en plasmas humanos.

## Fundamento

La determinación del tiempo de trombina con el Reactivo Test de trombina es apropiada: para el control de la terapéutica fibrinolítica, como test de búsqueda de anomalías en la formación de fibrina o cuando existe la sospecha de estados graves de deficiencia de fibrinógeno y para distinguir entre una prolongación del tiempo de trombina debido a la heparina y trastornos en la formación de fibrina.

## Principio del método

La trombina transforma el fibrinógeno existente en la muestra de plasma en fibrina originando así la formación del coágulo. Se mide el tiempo necesario para la formación de éste.

## Reactivos

Reactivo Test de trombina: liofilizado, cantidades estandarizadas de trombina bovina, albúmina bovina.

Solución tampón para el Reactivo Test de trombina: HEPES (25mmol/L), pH 7,4. Agentes de conservación; 5-cloro-2-metil-isotiazol-3-ona (6mg/l) y el 2-metil-4-isotiazol-3-ona (2mg/L).

## PROCEDIMIENTO

Volumen de muestra (plasma) → 50 $\mu$ L → incuba por 3 minutos → agrega 100 $\mu$ L de reactivo de TT

→ Detección (Tiempo máximo: 150 segundos)

## VALORES DE REFERENCIA

15.8 – 18.6 segundos

### 13.2.4 Determinación de Dímero D (D-DIMER PLUS)

El D-Dimer PLUS es un test turbidimétrico con partículas intensificadoras de látex, para la determinación cuantitativa de los productos de degradación de la malla de fibrina (dímeros D) en el plasma humano.

#### Fundamento

Las partículas de poliestireno a las que se les ha unido de forma covalente un anticuerpo monoclonal (DD5) contra las zonas entrecruzadas de los productos de degradación de la fibrina entrecruzados (dímeros D), se aglutinan cuando se mezclan con muestras que contienen dímeros D. La región de entrecruzamiento tiene una estructura con una simetría de espejo (simetría radial), esto quiere decir, con un epítotope para el anticuerpo monoclonal existe dos veces. Por lo tanto, se necesita solamente un anticuerpo para lograr la reacción de aglutinación, la cual se puede determinar turbidimetricamente mediante el aumento de turbidez.

## Reactivos

El reactivo D-Dimer PLUS, liofilizado, contiene partículas de poliestireno, anticuerpos monoclonales de ratón, albúmina sérica humana, glicina (0.02mol/L), sacarosa (máximo 50g/L). El agente de conservación es la ázida sódica (<1g/L).

El acelerador esta fabricado a partir de una mezcla de plasmas de donantes sanos seleccionados, mediante la adición de una preparación de Dímeros D , estabilizado con una solución tampón Hepes (12g/L) y liofilizado. Los agentes de conservación son: 5-cloro-2-metil-isotiazol-3-ona y el 2-metil-4-isotiazol-3-ona (máximo 10mg/L).

El medio de reconstitución líquido: es una solución salina fisiológica tamponada. El agente de conservación es la ázida sódica (<1g/L).

### **Procedimiento**

Volumen de muestra (plasma) —▶ 50μL + 25μL de acelerador —▶ incuba por 20 segundos

—▶ agrega 150μL de reactivo de látex

—▶ Detección (Rango de análisis: 200 segundos)

### **Valores de referencia**

53 – 274 μg/mL.

### **13.2.5 CA CLEAN I**

Detergente para analizador de coagulación de sangre totalmente automáticos. El producto sirve para limpiar las probetas utilizadas en los analizadores de coagulación de sangre totalmente automáticos. Esta compuesto de Hipoclorito de sodio al 1.0%.

### **13.2.6 Dade Ci-Trol Control de la Coagulación Nivel 1**

#### **Principio**

El uso de controles en los laboratorios es un proceso establecido. El Dade Ci-Trol Control de la coagulación Nivel 1 se recomienda como control normal para la determinación del Tiempo de Protrombina, Tiempo de Tromboplastina Parcial activada y Tiempo de Trombina.

## **Reactivo**

Dade Ci-Trol Control de la coagulación Nivel 1: una preparación liofilizada de plasmas humanos, estabilizadores y soluciones tampón.

## **Procedimiento**

Después de reconstituir el Dade Ci-Trol Control Nivel 1 usarlo de la misma manera y bajo el mismo procedimiento que un suero citratado recién tomado del paciente.

## **Valores de referencia**

Los valores se mueven dentro de los intervalos de referencia de las pruebas que se miden.

### **13.2.7 Dade Ci-Trol Control de la Coagulación Nivel 2**

#### **Principio**

El uso de controles en los laboratorios es un proceso establecido. El Dade Ci-Trol Control de la coagulación Nivel 2 se recomienda como control anormal para la determinación del Tiempo de Protrombina, Tiempo de Tromboplastina Parcial activada y Tiempo de Trombina con plasmas citratados de pacientes.

#### **Reactivo**

Dade Ci-Trol Control de la coagulación Nivel 2: una preparación liofilizada de plasmas humanos, estabilizadores y soluciones tampón.

#### **Procedimiento**

Después de reconstituir el Dade Ci-Trol Control Nivel 2 usarlo de la misma manera y bajo el mismo procedimiento que un suero citratado recién tomado del paciente.

#### **Valores de referencia**

Los valores se mueven dentro de los intervalos de referencia de las pruebas que se miden.

### **13.2.8 Dade Tampón Veronal de Owren**

#### **Principio**

El tampón veronal de Owren fue desarrollado especialmente para las investigaciones de la coagulación, pero además, puede ser utilizado en todas partes donde se necesite un tampón barbital isotónico con  $\text{pH } 7.35 \pm 0.1$ .

#### **Reactivo**

Tampón veronal de Owren: sal de sodio del ácido dietilbarbitúrico  $2.84 \times 10^{-2}$  M en solución de cloruro de sodio,  $1.25 \times 10^{-1}$ M,  $\text{pH } 7.35 \pm 0.1$ .

### **13.2.9 Solución de Cloruro de Calcio**

Solución de cloruro de concentración 0.025 mol/L lista para usar, para la prueba de Tiempo de Tromboplastina Parcial activada.

### **13.2.10 Chemikine Human TSP-1 EIA Kit (CHEMICON INTERNATIONAL)**

#### **Introducción**

El kit Chemikine Human TSP-1 es un inmunoensayo enzimático competitivo (EIA), que mide las formas natural y recombinante de la citocina Trombospondina-1 (TSP-1).

#### **Principio del test**

Con el sistema de ensayo ChemiKine, los anticuerpos anti-conejo pegados de antemano sobre los pozos de la microplaca de carnero son utilizados para capturar un complejo específico de TSP-1 en cada muestra consistiendo del anticuerpo TSP-1, TSP-1 biotinilada, y muestra/estándar. El conjugado de TSP-1 biotinilada (ligando competitivo) y la muestra o el estándar compiten por los sitios específicos de unión de anticuerpos de la TSP-1. Así, a medida que la concentración de TSP-1 aumenta en la muestra, la cantidad de TSP-1 biotinilada capturada por el anticuerpo disminuye. El ensayo se visualiza utilizando un conjugado de fosfatasa alcalina - estreptavidina y una subsiguiente reacción cromogénica de sustrato. La cantidad de TSP-1 detectada en cada muestra es comparada con la curva estándar de TSP-1 la cual demuestra una relación inversamente proporcional entre la densidad óptica (O.D) y la concentración de citocina: por ejemplo, a mayor densidad óptica menor concentración de citocina en la muestra.

## Descripción de la proteína

La TSP-1 es una glucoproteína de 165kDa con tres subunidades disulfídicas idénticas. La TSP-1 está presente en altas concentraciones en los gránulos alfa de las plaquetas y puede ser eficientemente secretada después de la activación plaquetaria. La expresión de TSP-1 es altamente regulada por diferentes hormonas y citocinas y es ampliamente controlada. Altos niveles son expresados en el desarrollo del corazón, músculo, hueso y cerebro en el embrión. La TSP-1 tiene una distribución limitada en los tejidos normales de adultos y es expresada altamente en respuesta a lesión y procesos inflamatorios. La TSP-1 tiene propiedades antiangiogénicas y esto puede ser debido a la inhibición de la proteólisis pericelular requerida para la migración celular y la proliferación de células endoteliales.

## Aplicación

Este kit está diseñado para medir la cantidad "total" de TSP-1 en los fluidos. Este sistema de ensayo no es entorpecido por autoanticuerpos, receptores solubles, o proteínas de unión que pueden interferir con la mayoría de ensayos en sandwich comerciales. El resultado es que cantidades en nanogramos pueden ser detectadas usando este sistema. Hay suficiente reactivo incluido en este kit para una placa de 96 pocillos. Se recomienda correr por duplicado las muestras y los estándares.

## Sensibilidad analítica y límites de detección

Sensibilidad: 9.77 ng/mL.

Rango de detección: 9.77 ng/mL a 2,500 ng/mL.

Reacción cruzada: mínima contra estándares de citocinas.

Variación intra-ensayo:  $\pm 7.8\%$ .

Variación inter-ensayo:  $\pm 10\%$ .

## Componentes del kit

1. Buffer de lavado. 1 botella de 50 mL.
2. Anticuerpo TSP-1. 1 vial (liofilizado).
3. Estándar de TSP-1. 1 vial (liofilizado).
4. Conjugado TSP-1. 1 vial (liofilizado).
5. Diluyente # 2. 2 botellas de 30 mL (listo para usar).
6. Reactivo de color A. 1 botella de 12 mL.
7. Reactivo de color B. 1 botella de 12 mL.
8. Fosfatasa alcalina-estreptavidina. 1 vial (liofilizado).
9. Solución de parada. 1 botella que contiene 10 mL de ácido sulfúrico 0.5 M (listo para usar).
10. Placa de 96 pozos pre-cubierta.
11. Sellantes de placa de acetato. 2 sellantes.

## **Materiales requeridos pero no suministrados**

1. Pipetas multicanal o de repeticiones.
2. Pipeteadores y puntas capaces de medir exactamente 10-1000  $\mu\text{L}$ .
3. Pipetas serológicas graduadas de 25 mL y/o 10 mL.
4. Lector de placa con filtro de 490 nm.
5. Lavador de placas.
6. Papel semi-logarítmico para trazar los datos manualmente.
7. Tubos de ensayo de 12x75 y 13x100.
8. Tubos de centrifuga de 15 mL y de 25 mL.
9. Vórtex mecánico.
10. Un contenedor de 1 litro.
11. Agua desionizada para diluir el buffer de lavado.

## **Sistema de generación de color**

ChemiKine utiliza un sistema de generación de color en dos pasos. En este sistema, la fosfatasa alcalina desfosforila al NADPH (substrato) a NADH. El NADH sirve entonces de cofactor, el cual activa una reacción redox cíclica catalizada por una deshidrogenasa alcohólica y una diaforasa. La reacción posterior forma un producto de color rojo (formazán) que absorbe luz a 490 nm.

## **Claves técnicas**

Almacenar el kit y sus reactivos entre 2-8 °C. No congelar.

Todas las muestras y estándares deben correrse por duplicado.

Todas las muestras y los reactivos del kit deben estar a temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de usarlas.

Dejar que las muestras alcancen solas la temperatura ambiente, no utilizar baños de agua para descongelarlas.

Si se utiliza una micropipeta multicanal, utilizar siempre reservorios de reactivos limpios para la adición del anticuerpo de TSP-1, del conjugado de TSP-1, la solución de fosfatasa alcalina-estreptavidina, la solución de reactivo de color y la solución de parada.

Usar puntas limpias para evitar contaminación cruzada.

No mezclar reactivos de diferentes lotes.

Evitar la contaminación microbiana de los reactivos.

Evitar exponer los reactivos del kit a calor excesivo o a la luz durante su almacenamiento e incubación.

No congelar los reactivos del kit.

No mezclar los reactivos de color de antemano. Debe cuidarse mucho que no se contamine la solución de color. Si la solución se vuelve roja inmediatamente después de mezclarla, no usarla.

### **Recolección de las muestras y almacenamiento**

Evaluar rápidamente las muestras o almacenarlas a una temperatura mayor o igual de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los niveles de TSP-1 pueden variar debido a contaminación de la muestra con plaquetas. Evitar continuos ciclos de congelación-descongelación. El plasma congelado puede mostrar valores de TSP-1 disminuidos.

### **Preparación de los reactivos**

Anticuerpo anti-TSP-1 humana de conejo: reconstituir el liofilizado de anticuerpo de TSP-1 con 4 mL de diluyente # 2 y mezclar con el vórtex.

Estándar de TSP-1 recombinante: utilizar el diluyente # 2 para reconstituir el vial de TSP-1 estándar y para diluir los estándares.

Conjugado de TSP-1 humana: reconstituir el liofilizado con 3mL de diluyente # 2 y mezclar con el vórtex.

Buffer de lavado diluído: diluir el buffer de lavado en 1 litro de agua desionizada. Mezclar para homogenizar.

Fosfatasa alcalina- estreptavidina: reconstituir el liofilizado con 6mL de diluyente # 2 y mezclar con el vórtex.

Reactivos de color: permitir que el reactivo de color A y B alcancen la temperatura ambiente. No mezclar los reactivos de antemano. Se necesita aproximadamente 20 mL de la solución de color para toda la placa. Mezclar apropiadamente los volúmenes de cada reactivo en un tubo de centrifuga limpio de 15 mL o de 25 mL y mezclarlos en el vórtex antes de usar. Descartar la solución no utilizada.

### **Almacenamiento de otros componentes del kit**

El almacenamiento posterior de otras soluciones diluídas debe ser a una temperatura de entre  $2-8^{\circ}\text{C}$  por un tiempo no mayor a 14 días.

Los pozos no utilizados deben ser guardados en la bolsa con desecante a una temperatura de entre 2-8 °C por un tiempo no mayor a 14 días.

### **Instrucciones del ensayo**

Por duplicado, dispensar 100 µL de los estándares # 0-5 en sus respectivos pozos.

Se han reportado niveles normales en plasma en el rango de 20-300 ng/mL. Usualmente, las muestras deben ser diluídas en una proporción de 10 a 1000 usando el diluyente # 2. Se recomienda una dilución inicial de 1:100 (10 µL de muestra + 990 µL de diluyente # 2). Debido a las variaciones en la concentración de TSP-1 en las muestras, se pueden necesitar múltiples diluciones. Por duplicado, añadir 100µL de cada muestra diluída en los pozos designados.

Dispensar 25 µL del anticuerpo policlonal anti-TSP-1 humana de conejo en cada pozo, sellar la placa con el sellante de placa de acetato para prevenir la evaporación e incubar por 3 horas a temperatura ambiente.

Remover cuidadosamente el sellante, dispensar 25 µL de conjugado de TSP-1 en cada pozo, sellar nuevamente la placa e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Lavado: para lavadores automáticos de placas se recomiendan dos ciclos de 5 lavados, dispensando 250 µL de buffer de lavado por pozo con un intervalo de 10 minutos de remojo entre los 2 ciclos.

Permitir que los reactivos de color alcancen la temperatura ambiente. Dispensar 50 µL de fosfatasa alcalina-estreptavidina diluída en cada pozo. Resellar la placa e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Remover suavemente el sellante. Lavar 5 veces la placa como se describió anteriormente.

Dispensar 200 µL de la solución de color preparada en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por 12 minutos.

Es muy importante que se monitoree la formación de color. Se recomienda que la placa sea leída a 490 nm durante los 12 minutos de incubación para monitorear la velocidad a la que se forma el color. Cuando la O.D. ha alcanzado 1.6, tomar una lectura y almacenarla. Dispensar 50 µL de solución de parada en este momento en cada pozo. Este es un paso opcional. Leer la placa por una última vez a 490 nm.

### **13.2.11 Human sL-Selectin Immunoassay (R&D SYSTEMS)**

#### **Introducción**

Este inmunoensayo es un ELISA de fase sólida de 2 horas diseñado para medir sL-Selectina en suero y plasma. Contiene sL-Selectina recombinante humana y anticuerpos obtenidos contra el factor recombinante. Este inmunoensayo ha mostrado la cuantificación precisa de sL-Selectina humana recombinante y natural.

#### **Principio del ensayo**

Este ensayo utiliza una técnica de inmunoensayo enzimático en sándwich. Un anticuerpo monoclonal específico para sL-Selectina se ha pegado de antemano sobre la microplaca. Los estándares, muestras y controles son dispensados en pozos y cualquier cantidad de sL-Selectina presente se une al anticuerpo inmovilizado. Posteriormente se añade a los pozos un anticuerpo policlonal específico unido a una enzima. Luego de un lavado para remover cualquier cantidad de reactivo no unido, se añade una solución de sustrato a los pozos y se desarrolla color en proporción a la cantidad de sL-Selectina unida en el primer paso. El desarrollo de color es detenido y se mide la intensidad del color.

#### **Reactivos**

Microplaca de sL-Selectina: microplaca de 96 pozos con anticuerpos monoclonales de ratón de sL-Selectina humana pegados.

Estándares de sL-Selectina: 6 viales de sL-Selectina recombinante, con tinte azul y preservativos. La concentración de sL-Selectina se muestra en las etiquetas de los viales.

Diluyente de muestra: 3 botellas (de 20 mL/cada una) de un buffer a base de proteínas, con tinte azul y preservativos.

Conjugado de sL-Selectina: 11 mL de anticuerpo policlonal de oveja y conjugado de sL-Selectina humana recombinante y peroxidasa de rábano en un buffer, con tinte rojo y preservativos.

Control de sL-Selectina: 1 vial de suero humano liofilizado que contiene sL-Selectina.

Concentrado de buffer de lavado: 20 mL de buffer surfactante concentrado, con preservativos.

Substrato: 11 mL de solución de substrato estabilizada (tetrametilbenzidina).

Solución de parada: 11 mL de solución ácida.

Sellantes de placa: 8 sellantes adhesivos de placa.

### **Almacenamiento**

El kit no abierto se almacena a una temperatura entre 2-8°C. No usar el kit después de su fecha de caducidad. El kit abierto y con reactivos reconstituidos se puede almacenar por un mes a 2-8°C.

### **Otros insumos requeridos**

Lector de microplacas capaz de leer absorbancias a 450 nm, con la longitud de onda de corrección dispuesta a 620 nm o 650 nm.

Pipetas y puntas para pipetas.

Agua desionizada o destilada.

Lavador de microplacas automático.

Cilindro graduado de 500 mL.

### **Recolección de la muestra y almacenamiento**

Plasma: coleccionar la muestra usando EDTA o heparina o citrato como anticoagulante. Centrifugar por 10 minutos a 4000rpm antes de 120 minutos después de tomada la muestra. Analizar inmediatamente o alicuotar la muestra y almacenarla a 2-8°C por un máximo de 7 días o a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  por 24 semanas. Evitar ciclos repetitivos de congelación-descongelación.

### **Preparación de la muestra**

Las muestras de plasma requieren al menos de una dilución 1:100 con el diluyente de muestras. Se recomienda una dilución con 10  $\mu\text{L}$  de muestra + 990  $\mu\text{L}$  de diluyente de muestras.

### **Preparación de reactivos**

Buffer de lavado concentrado: Si han formado cristales en el concentrado, llevarlo a temperatura ambiente y mezclar suavemente hasta que los cristales desaparezcan

por completo. Diluir 20 mL del buffer de lavado concentrado en agua desionizada o destilada para preparar 500 mL de buffer de lavado.

Control de sL-Selectina: reconstituir el control inmediatamente antes de usar con 500  $\mu$ L de agua deionizada o destilada. Dejar el control en reposo a temperatura ambiente por al menos 10 minutos. Mezclar suavemente por inversión. El control debe diluirse con el diluyente de muestras (1:100; 10  $\mu$ L de control + 990  $\mu$ L de diluyente de muestra) antes de usarse.

### **Procedimiento del ensayo**

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de utilizar. Se recomienda que los estándares, controles y muestras se analicen por duplicado.

Preparar los reactivos, muestras y controles como se indicó anteriormente.

Guardar en la bolsa las tiras de pozos de la microplaca que no se utilicen.

Añadir 100  $\mu$ L de estándar, de control y de muestra a cada pozo. Asegurarse que la adición de la muestra sea ininterrumpida y completada antes de 15 minutos.

Cubrir la placa con los sellantes proporcionados e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

Añadir 100  $\mu$ L de conjugado de sL-Selectina a cada pozo con suficiente fuerza para asegurar que se mezclen.

Cubrir nuevamente la placa e incubarla a temperatura ambiente por 30 minutos.

Aspirar o decantar cada pozo y lavar, repetir este proceso por 5 veces para un total de 6 lavados. Para lavar se llena cada pozo con buffer de lavado (400  $\mu$ L). Eliminar cualquier exceso de líquido es esencial para un buen desempeño. Después del último lavado, remover cualquier resto de buffer de lavado por aspiración o decantación. Invertir la placa y secarla sobre toallas limpias de papel.

Añadir 100  $\mu$ L de sustrato a cada pozo. Cubrir la placa con el sellante de placa e incubarla a temperatura ambiente por 30 minutos.

Añadir 100  $\mu$ L de solución de parada en cada pozo.

Determinar la densidad óptica de cada pozo dentro de los 30 minutos siguientes usando un lector de microplacas a 450 nm. Colocar la longitud de onda corregida en 620 nm o 650 nm.

## Calculo de resultados

Calcular la media de los valores de absorbancia para cada juego de estándares por duplicado. Crear una curva de calibración y determinar la concentración de cada muestra desconocida calculando la concentración de sL-Selectina correspondiente a la media de absorbancia de la curva estándar. Para las muestras y el control, la concentración determinada a partir de la curva estándar se debe multiplicar por el factor de dilución.

## Precisión

### Precisión Intraensayo

Muestra	1	2	3
n	20	20	20
Media (ng/mL)	210	881	3025
CV (%)	5.0	2.5	4.1

### Precisión Interensayo

Muestra	1	2	3
n	21	21	21
Media (ng/mL)	209	882	3083
CV (%)	11.9	8.8	7.1

## Sensibilidad

La dosis mínima detectable es típicamente menor a 0.3 ng/mL.

## Especificidad

Este ensayo reconoce tanto la sL-Selectina natural como recombinante. No se ha encontrado reacción cruzada con la sE-Selectina humana recombinante. Se analizaron 56 moléculas de adhesión adicionales y no se observó reacción cruzada ni interferencia.

## Valores de muestras

Tipo de muestra	Media (ng/mL)	Rango (ng/mL)
Suero	663	269 – 1208
Plasma con EDTA	648	374 – 1041
Plasma con Citrato de sodio	858	500 – 1451

### **13.2.12 Human sP-Selectin Immunoassay (R&D SYSTEMS)**

#### **Introducción**

Este inmunoensayo es un ELISA de fase sólida de 1.25 horas diseñado para medir sP-Selectina en suero y plasma. Contiene sP-Selectina recombinante humana y anticuerpos obtenidos contra el factor recombinante. Este inmunoensayo ha mostrado la cuantificación precisa de sP-Selectina humana recombinante.

#### **Principio del ensayo**

Este ensayo utiliza una técnica de inmunoensayo enzimático en sándwich. Un anticuerpo monoclonal específico para sP-Selectina se ha pegado de antemano sobre la microplaca. Los estándares, muestras y controles son dispensados en pozos junto con un anticuerpo policlonal específico para sP-Selectina que ha sido conjugado con peroxidasa de rábano. Luego de un lavado para remover cualquier cantidad de reactivo no unido, se añade una solución de sustrato a los pozos y se desarrolla color en proporción a la cantidad de sP-Selectina unida en el primer paso.

#### **Reactivos**

Microplaca de sP-Selectina: microplaca de 96 pozos con anticuerpos monoclonales de ratón de sP-Selectina humana pegados.

Estándares de sP-Selectina: 6 viales de sP-Selectina recombinante, con tinte azul y preservativos. La concentración de sP-Selectina se muestra en las etiquetas de los viales.

Diluyente de muestra: 2 botellas (de 20 mL/cada una) de un buffer a base de proteínas, con tinte azul y preservativos.

Conjugado de sP-Selectina concentrado: 0.3 mL de anticuerpo policlonal de oveja y conjugado de sP-Selectina humana recombinante y peroxidasa de rábano en un buffer, con tinte rojo y preservativos.

Diluyente del concentrado: 11 mL de diluyente HRP-conjugado concentrado, con tinte rojo y preservativos.

Control de sP-Selectina: 1 vial de suero humano liofilizado que contiene sP-Selectina.

Concentrado de buffer de lavado: 20 mL de buffer surfactante concentrado, con preservativos.

Substrato: 11 mL de solución de substrato estabilizada (tetrametilbenzidina).

Solución de parada: 11 mL de solución ácida.

Sellantes de placa: 8 sellantes adhesivos de placa.

### **Almacenamiento**

El kit no abierto se almacena a una temperatura entre 2-8°C. No usar el kit después de su fecha de caducidad. El kit abierto y con reactivos reconstituidos se puede almacenar por un mes a 2-8°C.

### **Otros insumos requeridos**

Lector de microplacas capaz de leer absorbancias a 450 nm, con la longitud de onda de corrección dispuesta a 620 nm o 650 nm.

Pipetas y puntas para pipetas.

Agua desionizada o destilada.

Lavador de microplacas automático.

Cilindro graduado de 500 mL.

### **Recolección de la muestra y almacenamiento**

Plasma: coleccionar la muestra usando EDTA o heparina o citrato como anticoagulante. Centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm antes de 120 minutos después de tomada la muestra. Analizar inmediatamente o alicuotar la muestra y almacenarla a 2-8°C por un máximo de 7 días o a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  por 24 semanas. Evitar ciclos repetitivos de congelación-descongelación.

### **Preparación de la muestra**

Las muestras de plasma requieren al menos de una dilución 1:20 con el diluyente de muestras. Se recomienda una dilución con 15  $\mu\text{L}$  de muestra + 285  $\mu\text{L}$  de diluyente de muestras.

### **Preparación de reactivos**

Buffer de lavado concentrado: Si han formado cristales en el concentrado, llevarlo a temperatura ambiente y mezclar suavemente hasta que los cristales desaparezcan

por completo. Diluir 20 mL del buffer de lavado concentrado en agua desionizada o destilada para preparar 500 mL de buffer de lavado.

Estándares: reconstituir los estándares inmediatamente antes de usar con 1.0 mL de agua destilada o desionizada. Mezclar suavemente por inversión. Dejar los estándares en reposo a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 10 minutos y mezclar suavemente por inversión hasta que se haya disuelto todo el contenido. No requieren dilución.

Control de sP-Selectina: reconstituir el control inmediatamente antes de usar con 500  $\mu$ L de agua deionizada o destilada. Dejar el control en reposo a temperatura ambiente por al menos 10 minutos. Mezclar suavemente por inversión. El control debe diluirse con el diluyente de muestras (1:20; 15  $\mu$ L de control + 285  $\mu$ L de diluyente de muestra) antes de usarse.

Conjugado de sP-Selectina concentrado: Adicionar 250  $\mu$ L del conjugado concentrado a la botella de diluyente de concentrado. Mezclar suavemente por inversión. No requiere dilución.

### **Procedimiento del ensayo**

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de utilizar. Se recomienda que los estándares, controles y muestras se analicen por duplicado.

Preparar los reactivos, muestras y controles como se indicó anteriormente.

Guardar en la bolsa las tiras de pozos de la microplaca que no se utilicen.

Añadir 100  $\mu$ L de estándar, de control y de muestra a cada pozo.

Añadir 100  $\mu$ L de conjugado de sP-Selectina diluido a cada pozo con suficiente fuerza para asegurar que se mezclen.

Cubrir la placa con los sellantes proporcionados e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

Aspirar o decantar cada pozo y lavar, repetir este proceso por 2 veces para un total de 3 lavados. Para lavar se llena cada pozo con buffer de lavado (300  $\mu$ L). Eliminar cualquier exceso de líquido es esencial para un buen desempeño. Después del último lavado, remover cualquier resto de buffer de lavado por aspiración o decantación. Invertir la placa y secarla sobre toallas limpias de papel.

Añadir 100  $\mu$ L de sustrato a cada pozo. Cubrir la placa con el sellante de placa e incubarla a temperatura ambiente por 15 minutos.

Añadir 100  $\mu$ L de solución de parada en cada pozo.

Determinar la densidad óptica de cada pozo dentro de los 30 minutos siguientes usando un lector de microplacas a 450 nm. Colocar la longitud de onda corregida en 620 nm o 650 nm.

### Cálculo de resultados

Calcular la media de los valores de absorbancia para cada juego de estándares por duplicado. Crear una curva de calibración y determinar la concentración de cada muestra desconocida calculando la concentración de sP-Selectina correspondiente a la media de absorbancia de la curva estándar. Para las muestras y el control, la concentración determinada a partir de la curva estándar se debe multiplicar por el factor de dilución.

### Precisión

#### Precisión Intraensayo

Muestra	1	2	3
n	10	10	10
Media (ng/mL)	84	430	668
Desviación estándar	4.28	21.1	37.4
CV (%)	5.1	4.9	5.6

#### Precisión Interensayo

Muestra	1	2	3
n	18	18	18
Media (ng/mL)	94	451	730
Desviación estándar	9.31	39.7	57.7
CV (%)	9.9	8.8	7.9

### Sensibilidad

La dosis mínima detectable es típicamente menor a 0.5 ng/mL.

### Especificidad

Este ensayo reconoce tanto la sP-Selectina natural como recombinante. No se ha encontrado reacción cruzada con la sE-Selectina ni con la sL-Selectina humana recombinante.

## Valores de muestras

Tipo de muestra	Media (ng/mL)	Rango (ng/mL)
Suero	82	51 – 113
Plasma con EDTA	33	22 – 44
Plasma con citrato	29	18 – 40
Plasma con Heparina	39	25 – 53

Niveles de sP-Selectina de hasta 50,000 ng/mL dan lectura en densidades ópticas mayores que el estándar máximo.

### 13.2.13 Human sE-Selectin Immunoassay (R&D SYSTEMS)

#### Introducción

Este inmunoensayo es un ELISA de fase sólida de 2 horas diseñado para medir sE-Selectina en suero y plasma. Contiene sE-Selectina recombinante humana y anticuerpos obtenidos contra el factor recombinante. Este inmunoensayo ha mostrado la cuantificación precisa de sE-Selectina humana recombinante y natural.

#### Principio del ensayo

Este ensayo utiliza una técnica de inmunoensayo enzimático en sándwich. Un anticuerpo monoclonal específico para sE-Selectina se ha pegado de antemano sobre la microplaca. Los estándares, muestras y controles son dispensados en pozos y cualquier cantidad de sE-Selectina presente se une al anticuerpo inmovilizado y a un segundo anticuerpo monoclonal específico para sE-Selectina unido a una enzima. Posteriormente se añade a los pozos un anticuerpo policlonal específico unido a una enzima. Luego de un lavado para remover cualquier cantidad de reactivo no unido, se añade una solución de substrato a los pozos y se desarrolla color en proporción a la cantidad de sE-Selectina unida en el primer paso. El desarrollo de color es detenido y se mide la intensidad del color.

#### Reactivos

Microplaca de sE-Selectina: microplaca de 96 pozos con anticuerpos monoclonales de ratón de sE-Selectina humana pegados.

Estándares de sE-Selectina: 6 viales de sE-Selectina recombinante, con tinte azul y preservativos. La concentración de sE-Selectina se muestra en las etiquetas de los viales.

Diluyente de muestra: 2 botellas (de 21 mL/cada una) de un buffer a base de proteínas, con tinte azul y preservativos.

Conjugado de sE-Selectina concentrado: 0.3 mL de anticuerpo conjugado de sE-Selectina humana recombinante y peroxidasa de rábano en un buffer, con preservativos.

Diluyente del concentrado: 11 mL de diluyente HRP-conjugado concentrado, con preservativos.

Control de sE-Selectina: 1 vial de suero humano liofilizado que contiene sE-Selectina.

Concentrado de buffer de lavado: 20 mL de buffer surfactante concentrado, con preservativos.

Substrato: 11mL de solución de substrato estabilizada (tetrametilbenzidina).

Solución de parada: 11 mL de solución ácida.

Sellantes de placa: 8 sellantes adhesivos de placa.

### **Almacenamiento**

El kit no abierto se almacena a una temperatura entre 2-8°C. No usar el kit después de su fecha de caducidad. El kit abierto y con reactivos reconstituidos se puede almacenar por un mes a 2-8°C.

### **Otros insumos requeridos**

Lector de microplacas capaz de leer absorbancias a 450 nm, con la longitud de onda de corrección dispuesta a 620 nm o 650 nm.

Pipetas y puntas para pipetas.

Agua desionizada o destilada.

Lavador de microplacas automático.

## **Recolección de la muestra y almacenamiento**

Plasma: colectar la muestra usando EDTA o heparina o citrato como anticoagulante. Centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm antes de 120 minutos después de tomada la muestra. Analizar inmediatamente o alicuotar la muestra y almacenarla a 2-8°C por un máximo de 7 días o a  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  por 24 semanas. Evitar ciclos repetitivos de congelación-descongelación.

## **Preparación de la muestra**

Las muestras de plasma requieren al menos de una dilución 1:20 con el diluyente de muestras. Se recomienda una dilución con 25  $\mu\text{L}$  de muestra + 475  $\mu\text{L}$  de diluyente de muestras.

## **Preparación de reactivos**

Buffer de lavado concentrado: Si han formado cristales en el concentrado, llevarlo a temperatura ambiente y mezclar suavemente hasta que los cristales desaparezcan por completo. Diluir 20 mL del buffer de lavado concentrado en agua desionizada o destilada para preparar 500 mL de buffer de lavado.

Estándares: reconstituir los estándares inmediatamente antes de usar con 1.0 mL de agua destilada o desionizada. Mezclar suavemente por inversión. Dejar los estándares en reposo a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 10 minutos y mezclar suavemente por inversión hasta que se haya disuelto todo el contenido. No requieren dilución.

Control de sE-Selectina: reconstituir el control inmediatamente antes de usar con 500  $\mu\text{L}$  de agua deionizada o destilada. Dejar el control en reposo a temperatura ambiente por al menos 10 minutos. Mezclar suavemente por inversión. El control debe diluirse con el diluyente de muestras (1:20; 25  $\mu\text{L}$  de control + 475  $\mu\text{L}$  de diluyente de muestra) antes de usarse.

Conjugado de sE-Selectina concentrado: Adicionar 250  $\mu\text{L}$  del conjugado concentrado a la botella de diluyente de concentrado. Mezclar suavemente por inversión. No requiere dilución.

## **Procedimiento del ensayo**

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de utilizar. Se recomienda que los estándares, controles y muestras se analicen por duplicado. Preparar los reactivos, muestras y controles como se indicó anteriormente. Guardar en la bolsa las tiras de pozos de la microplaca que no se utilicen.

Añadir 100  $\mu\text{L}$  de conjugado de sE-Selectina diluído a cada pozo.  
Añadir 100  $\mu\text{L}$  de estándar, de control y de muestra a cada pozo.

Cubrir la placa con los sellantes proporcionados e incubar a temperatura ambiente por 1.5 horas.

Aspirar o decantar cada pozo y lavar, repetir este proceso por 5 veces para un total de 6 lavados. Para lavar se llena cada pozo con buffer de lavado (300  $\mu\text{L}$ ). Eliminar cualquier exceso de líquido es esencial para un buen desempeño. Después del último lavado, remover cualquier resto de buffer de lavado por aspiración o decantación. Invertir la placa y secarla sobre toallas limpias de papel.

Añadir 100  $\mu\text{L}$  de substrato a cada pozo. Cubrir la placa con el sellante de placa e incubarla a temperatura ambiente por 30 minutos.

Añadir 100  $\mu\text{L}$  de solución de parada en cada pozo.

Determinar la densidad óptica de cada pozo dentro de los 30 minutos siguientes usando un lector de microplacas a 450 nm. Colocar la longitud de onda corregida en 620 nm o 650 nm.

### **Cálculo de resultados**

Calcular la media de los valores de absorbancia para cada juego de estándares por duplicado. Crear una curva de calibración y determinar la concentración de cada muestra desconocida calculando la concentración de sE-Selectina correspondiente a la media de absorbancia de la curva estándar. Para las muestras y el control, la concentración determinada a partir de la curva estándar se debe multiplicar por el factor de dilución.

### **Precisión**

Precisión Intraensayo

Muestra	1	2	3
n	10	10	10
Media (ng/mL)	21.9	56.6	115
Desviación estándar	1.1	2.7	5.4
CV (%)	5.0	4.8	4.7

### Precisión Interensayo

Muestra	1	2	3
n	18	18	18
Media (ng/mL)	20.4	54.7	115
Desviación estándar	1.8	3.1	8.5
CV (%)	8.8	5.7	7.4

## **SENSIBILIDAD**

La dosis mínima detectable es típicamente menor a 0.1 ng/mL.

## **Especificidad**

Este ensayo reconoce tanto la sE-Selectina natural como recombinante. No se ha encontrado reacción cruzada con IgG humana natural, sVCAM-1 recombinante humana, sICAM-1 recombinante humana o con la sP-Selectina humana natural.

## **Valores de muestras**

Se analizaron 30 muestras de plasma para concentraciones de sE-Selectina usando el procedimiento antes descrito. El valor medio fue de 46.3 mg/mL con un rango de  $\pm$  1 desviación estándar de 29.1 – 63.4 ng/mL. Se encontró que los valores en plasmas recolectados con citrato están ligeramente disminuidos comparados con los de muestras de suero o plasmas recolectados con heparina.

## **13.3 ESTABLECIMIENTO DE INTERVALOS DE REFERENCIA**

El CLIA1'88 Subparte K, 493.1213(b)(1) y (2) presenta los requerimientos para la verificación de los intervalos de referencia de un nuevo procedimiento previo al reporte de resultados de pacientes. Algunos ensayos, como ensayos de factores, no requieren que cada laboratorio realice un estudio de intervalos de referencia, debido a que investigaciones clínicas han establecido intervalos de referencia que son aceptados totalmente por la comunidad clínica. Sin embargo se deben establecer intervalos de referencia para el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado.

### Requisitos:

- Los donadores deben ser una población normal (sin condición patológica conocida).
- Los donadores no deben tomar medicamentos, ni siquiera aspirina.

- Se debe incluir un mínimo de 20 donadores con una distribución razonablemente pareja de hombres y mujeres.
- Los donadores deben abarcar todo el rango de edad adulta.
- El estudio debe realizarse en un período de varios días y por personas diferentes, si es posible, para minimizar la variación de día a día.
- Se debe analizar un mínimo de 4 a 6 muestras por día, siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio para la recolección, almacenamiento y procesamiento de las muestras de plasma.
- Los resultados de los donadores deben ser analizados estadísticamente y se debe calcular la media  $\pm$  2DS o calcular un límite de confianza del 95%.

Nota: Debido a que el intervalo de referencia es definido a partir de  $\pm$  2DS, los valores que caen por fuera de este rango puede que sean o no normales y deben ser evaluados posteriormente. Estadísticamente un cierto porcentaje de estos pacientes serán normales. Sin embargo, debido a que se definen los rangos normales de esta forma, será menos probable que los pacientes anormales no sean detectados.

#### Procedimiento del instrumento:

- Reconstituir el reactivo apropiado usando agua destilada o desionizada según lo que se indique en la etiqueta del vial. Mezclar suavemente por inversión.
- Preparar el instrumento con los reactivos adecuados para la prueba a evaluar siguiendo las instrucciones del manual del operador del instrumento.
- Realizar la prueba como se indica en las hojas de aplicación.
- Almacenar los resultados en las hojas destinadas para anotar los intervalos de referencia.
- Estadísticamente determinar la media  $\pm$  2DS o calcular un límite de confianza del 95%.
- Debido a que el intervalo de referencia es definido a partir de  $\pm$  2DS, los valores que caen por fuera de este rango puede que sean o no normales y deben ser evaluados posteriormente.

#### Cálculo del intervalo de referencia:

1. Calcular la media aritmética y la desviación estándar.
2. El intervalo de referencia determinado es la media aritmética  $\pm$  2DS.

#### Referencias:

NCCLS document C28-A, June, 1995. How to Define and Determine Referente Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline; Vol.15, No 4.  
 NCCLS Document H47. One-Stage Prothrombin Time Test (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time Test (APTT).