



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY HOSPITAL

" MARCADORES DE ACTIVACION DEL SISTEMA DE
COAGULACION EN FORMA TEMPRANA "

TESIS DE POSTGRADO
PARA OBTENER EL TITULO
EN LA ESPECIALIDAD DE:
PATOLOGIA CLINICA
P R E S E N T A :
DR. JESUS ROY ARANDA OSORIO



ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DR. JESUS I. SIMON DOMINGUEZ

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jesus I. Simon Dominguez'.

MEXICO, D.F.

FEBRERO 2000



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.

THE AMERICAN BRITISH
COWDRAY HOSPITAL

★ MAR. 13 2008 ★

— — — — —
JEFATURA DE ENSEÑANZA

INDICE

| | |
|---|----|
| <i>INTRODUCCION</i> | 1 |
| <i>COAGULACION NORMAL</i> | 2 |
| <i>INHIBIDORES DE LA COAGULACION</i> | 8 |
| <i>SISTEMA ATIII-HEPARINA</i> | |
| <i>SISTEMA PROTEINA C-PROTEINA S-TROMBOMODULINA</i> | |
| <i>INHIBIDORES DE LA VIA DEL FACTOR TISULAR</i> | |
| <i>SISTEMA FIBRINOLITICO</i> | 10 |
| <i>EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE COAGULACION POR EL LABORATORIO</i> | 12 |
| <i>TIEMPO DE PROTROMBINA</i> | |
| <i>TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA</i> | |
| <i>TIEMPO DE TROMBINA</i> | |
| <i>FIBRINOGENO</i> | |
| <i>EVALUACION DE LA FIBRINOLISIS</i> | 15 |
| <i>FISIOLOGIA DEL ESTADO HIPERCOAGULABLE</i> | 16 |
| <i>EVALUACION DIAGNOSTICA POR LABORATORIO EN PACIENTES CON ESTADO HIPERCOAGULABLE</i> | 18 |
| <i>PROTROMBINA</i> | 19 |
| <i>FRAGMENTO 1+2 DE LA PROTROMBINA</i> | 20 |
| <i>ANTECEDENTES</i> | 21 |
| <i>HIPOTESIS</i> | 23 |
| <i>OBJETIVOS</i> | 23 |
| <i>MATERIAL Y METODOS</i> | 23 |
| <i>CRITERIOS DE INCLUSION</i> | 27 |
| <i>CRITERIOS DE EXCLUSION</i> | 27 |
| <i>RESULTADOS</i> | 28 |
| <i>DISCUSION</i> | 36 |
| <i>CONCLUSION</i> | 37 |
| <i>BIBLIOGRAFIA</i> | 38 |

INTRODUCCION

Estado hipercoagulable es la tendencia de formar trombos venosos y arteriales. En 1845, Virchow postuló tres factores responsables de la trombosis que aún se mantienen relevantes y son: alteraciones de la sangre (hipercoagulabilidad); cambios en el vaso sanguíneo (lesión vascular); y alteraciones en el flujo sanguíneo (estasis). En la mayoría de los pacientes no se les localiza un defecto específico. Sin embargo, hay gran variedad de condiciones o enfermedades que se asocian con un incremento de riesgo a trombosis (1).

Uno de los problemas en la medicina actual es la frecuencia de trombosis arterial o venosa. Sin embargo, una evidencia firme de que exista un estado de hipercoagulabilidad no hay. En realidad, se trata de un concepto hipotético que surgió debido a que los pacientes que tiene (o han tenido) una trombosis, han mostrado cambios en su función hemostática.

Existen diversas suposiciones para creer que la hipercoagulabilidad sistémica actúa en la patogenia de la trombosis. La palabra hipercoagulabilidad se utiliza para señalar la presencia en el plasma de actividades o concentraciones de varios procoagulantes aumentados, o la presencia en la circulación de factores de la coagulación activados (2).

La trombosis puede ser clasificada en dos tipos: primaria y secundaria. Un estado hipercoagulable primario incluye resistencia a la proteína C activada (o por factor V Leiden), anticoagulante lúpico, anticuerpos anticardiolípidinas, deficiencias de proteína C, proteína S, o de antitrombina III, disfibrinogemias, y aumento de homocisteinemia. La trombosis secundaria es consecuencia de factores que incluyen estados postoperatorios, embarazo, el uso de anticonceptivos orales, estasis, y cáncer (3).

La **estasis** parece ser un factor muy importante en la inducción de trombosis. Desde el punto de vista clínico, la inactividad prolongada predispone a la trombosis venosa. No obstante, deben intervenir también otros factores, ya que pueden existir una estasis importante en venas normales sin que se manifieste una predisposición a la trombosis (4). Está claro que factores tales como la estasis interviene en el embarazo, pero estas consideraciones resultan obvias en la trombosis que se asocia con niveles elevados de los factores de la coagulación en los pacientes no gestantes.

Cuando el estado de hipercoagulabilidad se acompaña de coagulación intravascular diseminada (DIC), puede haber una obstrucción trombótica tanto de los grandes vasos como de los pequeños, a pesar de que uno de los principales efectos de este trastorno es el consumo de los factores de coagulación circulantes y de plaquetas.

COAGULACION NORMAL

La coagulación sanguínea es el sistema de defensa del hospedero, que mantiene la integridad del sistema circulatorio. Alteraciones en el lecho capilar y laceración de venas y arteriolas, provocan extravasación de sangre al espacio extravascular. Para prevenir la excesiva salida de sangre, el sistema hemostático, que incluye plaquetas, células endoteliales vasculares y proteínas plasmáticas de la coagulación, entran en juego.

Inmediatamente después de la lesión tisular, se forma el tapón plaquetario a través del proceso de adhesión y agregación. La coagulación puede considerarse un mecanismo para el reemplazo rápido del tapón plaquetario inestable, por el coágulo estable de fibrina. Una serie de reacciones interdependientes mediadas por enzimas trasladan la señal molecular que inicia la coagulación en un evento biológico, para la formación del coágulo de fibrina.

In vitro la generación de trombina y la formación del coágulo de fibrina se realiza en dos vías separadas, la vía intrínseca y la vía extrínseca. Para generar el coágulo por vía extrínseca, se requiere de un activador, llamado *Factor tisular* que es una proteína de la superficie celular, que entra en contacto con la sangre que fluye en el sitio de la lesión vascular.

La vía intrínseca de la coagulación incluye proteínas, cofactores y enzimas. Esta vía es iniciada por la activación del factor XII, a través de la calicreina o cambios negativos de la superficie, incluyendo el vidrio *in vitro*. El Cimógeno de alto peso molecular facilita ésta activación. La forma activa del factor XII, cataliza la conversión de proenzima factor XI a factor XI activo. En presencia de Calcio (Ca^{2+}), el factor XI activado actúa sobre la proenzima factor IX para convertirlo en factor IXa. El factor IXa al unirse al factor VIIIa, ambos a la superficie de membrana en presencia de Ca^{2+} , generan un complejo con actividad enzimática. Este complejo convierte la proenzima factor X, en su forma activa (factor Xa). En forma paralela, la interacción del factor Xa unido a el cofactor Va, ambos en la superficie de membrana en presencia de Ca^{2+} , generan un complejo con actividad enzimática, llamado *Protrombinasa*. Este complejo convierte la proenzima protrombina (II), a su forma activa llamada trombina (IIa), y liberación del fragmento 1+2. La trombina actúa sobre el fibrinógeno para generar monómeros de fibrina, con rápida polimerización a coágulo de fibrina.

La vía extrínseca de la coagulación sanguínea, incluye proteínas, cofactores y enzimas. Esta vía es iniciada por la formación de un complejo entre el factor tisular de la superficie celular y factor VIIa. Sin embargo, el mecanismo por el cual una pequeña cantidad de factor VII es convertido en factor VIIa es aún no demostrada en ausencia de la salida de sangre. El contenido del factor VIIa en plasma es de 0.5 a 8.4 ng/ml., que en exposición con el factor tisular al existir lesión de la pared vascular, forma un complejo, que actúa activando al factor X. Además esto, puede retroalimentar más la conversión de

factor VII a factor VII activado, acelerando en gran medida la activación de la vía extrínseca. El complejo factor VIIa / factor tisular, convierte el factor X a su forma activa, el factor Xa unido al cofactor Va, ambos a la superficie de membrana en presencia de Ca^{2+} , generan el complejo *protrombinasa*. Este complejo convierte la protrombina en trombina, con la consecuente conversión de fibrinógeno a fibrina y a coágulo de fibrina.

El monitoreo de las pruebas de coagulación, son especialmente para diagnóstico de trastornos de coagulación y para terapia anticoagulante. No obstante, la vía fisiológica relevante de la cascada de coagulación *in vivo* es diferente. Un esquema de la coagulación *in vivo* tiene que considerarse las siguientes características: Primero, desde pacientes con deficiencias hereditarias de factores como: factor XII, precalicreina o cimógeno de alto peso molecular, que tienen una marcada prolongación del TPT, pero no presentan episodios de sangrado. Estas proteínas no son componentes requeridos para mantener la hemostasia en vivo y no se incluyen en el modelo en vivo de la coagulación sanguínea. Segundo, el factor tisular es parte constitucional normal de la superficie de células neovasculares y son estimuladas por monocitos y células endoteliales, que activan la coagulación. Tercero, el complejo factor tisular / factor VIIa activa no sólo el factor X, también factor IX, indicando un papel central para factor VIII y IX de la coagulación. Finalmente, la deficiencia del factor XI no es invariablemente asociada con fenómenos de sangrados. En la Fig.1 se presenta un modelo activación de la coagulación que explica la secuencia de reacciones que se llevan a cabo en la formación de un coágulo en ambas vías.

VIA INTRINSECA

Superficie de contacto
Precalcreína
CAPM

XII -----> XIIa

XI -----> XIa

IX -----> IXa

VIII -----> VIIIa

VIA EXTRINSECA

lesión tisular

Liberación de factor tisular

VII -----> VIIa

Complejo FT/VIIa

-----> Complejo IXa/VIIIa

X -----> Xa

Xa + Va + Fosfolípido de membrana + Ca²⁺
" PROTROMBINASA "

II -----> IIa -----> XIII -----> XIIIa

Fragmento 1+2 Fibrinógeno -----> MF -----> PF -----> Fibrina

FPA

FPB

Coágulo

Fig. 1. Activación de la Coagulación. Monómero de fibrina (MF), Polímero de fibrina (PF), Fibrinopéptido A (FPA), Fibrinopéptido B (FPB), Cimógeno de Alto Peso Molecular (CAPM).

La clave de la iniciación de la coagulación es el factor tisular. La exposición de la superficie celular expresa factor tisular hacia las proteínas plasmáticas, conduciendo a la unión del factor VIIa y factor tisular. Este complejo factor VIIa / factor tisular, activa a los factores IX y X. El factor Xa y VIIa, ambos catalizan la activación del factor VII, siendo un mecanismo potencial para acelerar la activación del factor VII ya existente. Además, la trombina y el factor XIa en presencia de una carga negativa de la membrana catalizan la activación del mismo factor XI. El IXa junto con el factor VIIIa en contacto con superficie de membrana activan al factor X (5).

Si no se controlan las propiedades de autoamplificación de la coagulación, cada hemorragia importante produciría coagulación generalizada y oclusión permanente de

los vasos. Sin embargo, la coagulación está modulada por varios mecanismos: la dilución de los procoagulantes en el flujo sanguíneo, la remoción de partículas y factores activados a través del sistema reticuloendotelial, especialmente por el hígado, y el antagonismo de los procoagulantes activados por inhibidores circulantes.

Existen cuatro sistemas de control diferentes y separados que regulan y enfatizan cada fase de la hemostasia: 1) el efecto vasoconstrictor y de agregación plaquetaria de la endotelina y del Tromboxano A₂ que se oponen a las acciones vasodilatadoras y de inhibición de la agregación plaquetaria del óxido nítrico y de la prostaciclina (PGL₂); 2) la acción de los procoagulantes de proteasa de serina factor Xa y factor IIa, y quizá también de los factores IXa y XIa, que es contrarrestada en forma específica por el complejo de Heparina - Antitrombina III (AT-III); 3) el sistema de proteína C - Trombomodulina - proteína S, divide en forma proteolítica y destruye a los factores VIIIa y Va, los cofactores proteicos no enzimáticos de la hemostasia; y 4) la sustancia denominada inhibidor de la vía del factor tisular (I-FI), que inhibe el complejo factor tisular / factor VIIa de la vía extrínseca.

Después de que se ha logrado la hemostasia, debe ocurrir cicatrización de la herida y restablecer la permeabilidad del vaso trombosado. Este último paso depende del sistema fibrinolítico. La fibrinólisis comienza por la liberación de activadores del plasminógeno, como el activador del plasminógeno tisular (t-PA), a partir de las paredes del vaso lesionado. Estos activadores convierten al plasminógeno circulante en proteasa activa llamada plasmina. Esta tiene varias acciones de proteasa y puede lisar coágulos de fibrina, además de fibrinógeno y otros procoagulantes. Los moduladores de la acción fibrinolítica son las antiplasminas circulantes, como la α_2 -antiplasmina (antes llamado inhibidor de la α_2 -plasmina) y varias clases de inhibidores de activadores del plasminógeno (IAP).

Todos los procoagulantes, excepto el factor de vonWillebrand (FvW) se sintetizan en el hígado. El FvW proviene de los megacariocitos y en las células endoteliales. Los procoagulantes vitamina K dependientes, son los factores II, VII, IX y X, y los anticoagulantes naturales dependientes también de vitamina K, son la proteína C y la proteína S. Para cada uno de estos factores, la carboxilación de los residuos del ácido glutámico para formar residuos de ácido γ -carboxiglutámico, que actúa como una señal de reconocimiento, guía la modificación pos-traducción de la proteína que se requiere para la actividad biológica. Esta carboxilación es un proceso que depende nuevamente de Vit. K.

Dentro del proceso general de coagulación, la acción de los procoagulantes dependen de una proteasa que se unen a un cofactor sobre la membrana para producir activación y amplificación del siguiente paso en la secuencia. Por ejemplo, la protrombina, que consiste en una proteasa de serina (factor Xa) unido a un cofactor (Va) y el receptor de plaquetas y células endoteliales, convierten a la protrombina (factor II) en trombina (factor IIa). El factor VIII circula como parte de un complejo factor VIII: C (el procoagulante activo del factor VIII)-FvW. Donde el FvW sirve como un acarreador, y puede proteger al factor VIII: C de la degradación proteolítica.

En la actualidad se considera que la vía extrínseca tiene gran importancia para mantener la hemostasia. El complejo factor tisular / factor VIIa tiene un papel crucial dentro de la vía extrínseca al unirse y activarse sus dos substratos; el factor X y el factor IX. La importancia de la activación del factor IX a factor IXa, se demuestra por las hemorragias tan graves que ocurre en los pacientes con deficiencia de éste factor (hemofilia B o deficiencia del factor Christmas) y de su cofactor proteico, el factor VIII (hemofilia A). En forma semejante, debido a que los pacientes con deficiencia de factor XI no sufren hemorragias graves, sino que estas son variables o mínimas, parece ser que la activación por contacto (la vía intrínseca) tiene menor importancia fisiológica.

La trombina ejecuta diversas funciones, su acción procoagulante induce proteolisis de fibrinopéptido A y B del fibrinógeno, además activa los factores V, VIII y XIII; e induce la agregación plaquetaria. También promueve la proliferación de fibroblastos y células endoteliales, así como función de quimiotáxis.

INHIBIDORES DE LA COAGULACION

SISTEMA AT III- HEPARINA

Los inhibidores de la coagulación más importantes son el complejo antitrombina III - heparina (AT III-Heparina) y la proteína C. La AT III antagoniza la acción de los procoagulantes proteasa de serina (factores XIIa, XIa, IXa, Xa y IIa), al formar con ellos complejos estequiométricos. La heparina se une a los residuos lisil de la AT III, produciendo un cambio morfológico que hace que el sitio activo de la AT III sea más accesible a los procoagulantes proteasa de serina. Esta acción de la heparina aumenta la inactivación de la trombina 750 veces, y la inactivación del factor Xa en un grado aún mayor. Sin embargo, tanto la trombina como el factor Xa son protegidos de la inactivación por AT III-heparina cuando se unen a las plaquetas o a las células endoteliales. Al parecer, los proteoglucanos heparán sulfato de la superficie luminal de las células endoteliales activan a la AT III de modo idéntico al de la heparina. Estos proteoglucanos se intercalan dentro de la membrana plasmática de las células endoteliales, la porción proteica de la molécula se inserta en el centro de la membrana y la porción polisacárida, que es análoga a la heparina, protruye de la superficie celular hacia el torrente sanguíneo.

SISTEMA PROTEINA C-PROTEINA S- TROMBOMODULINA

La proteína C y la proteína S son anticoagulantes dependientes de Vitamina K y se sintetizan en el hígado. La trombomodulina es un receptor que fija trombina sobre las células endoteliales y otras células. Cuando la trombina (factor IIa) se une a la

trombomodulina, es modificada de tal manera que no puede ya convertir al fibrinógeno en fibrina. El complejo trombina-trombomodulina activa a la proteína C, una proteasa de serina que degrada en forma proteolítica al factor Va y al factor VIIIa. La proteína C activada actúa en la superficie de la membrana, quizá en asociación con la proteína S y unida al receptor de la célula endotelial. La proteína C activada no sólo degrada los factores VIIIa y Va, sino que también inhibe uno de los inhibidores de los activadores del plasminógeno, permitiendo así que el t-PA lise los coágulos sin oposición. Debido a los poderosos efectos de la proteína C, su activación está regulada en forma estrecha, y su acción es bloqueada por el inhibidor de la proteína C. La deficiencia de proteína C o de proteína S ocasiona estados de hipercoagulabilidad clínicamente importantes.

El sistema proteína C- proteína S también parece constituir un enlace entre la hemostasia y la inflamación. Por ejemplo, la exposición *in vitro* de las células endoteliales a interleucina -1 (IL-1), disminuye la concentración de trombomodulina a alrededor del 33 % del nivel normal, y la función de la proteína C-proteína S a menos del 10 % de los valores controles.

La proteína S circula en dos formas: una forma libre, en la que es activada como anticoagulante, y una forma combinada, unida a la proteína C4b del sistema del complemento, que es inactiva. Debido a que C4b actúa como un reactante de fase aguda, su aumento en los estados de inflamación o infección tiende a disminuir la actividad de la proteína S y, por lo tanto, aumenta la posibilidad de trombosis.

INHIBIDORES DE LA VIA DEL FACTOR TISULAR

Con el descubrimiento del sistema anticoagulante AT-III-heparina (que neutraliza los factores Xa, IIa, IXa, y XIa) y del sistema proteína C-proteína S-trombomodulina (que degrada los factores VIIa y Va), se han identificado anticoagulantes

que controlan cada paso de la hemostasia, excepto el complejo factor tisular / factor VIIa. Como se mencionó antes, en la actualidad se ha identificado un inhibidor específico de este complejo, que se denomina inhibidor de la vía del factor tisular. Este inhibidor es una lipoproteína que es activada por el factor Xa. El complejo factor Xa / inhibidor actúa en forma específica sobre el factor tisular / factor VIIa para formar un complejo cuaternario que provoca su inactivación. El sistema está diseñado en forma admirable para detectar la producción excesiva de factor Xa y usar este acumulo para detener su sitio de origen, el complejo factor tisular / factor VIIa. Aunque, no se ha identificado un estado de deficiencia de inhibidor complejo factor tisular / factor VIIa en humanos.

SISTEMA FIBRINOLITICO

Se supone que el daño de células endoteliales, y la activación de contacto del sistema intrínseco, desencadenan la fibrinolisis. La cicatrización de la herida comienza en cuanto se ha formado el trombo hemostático y establecido un coágulo con enlaces cruzados firmes en el sitio del daño vascular. Entonces el coágulo debe ser lisado para reestablecer la circulación sanguínea en el área.

El sistema fibrinolítico consiste principalmente del precursor enzimático plasminógeno, que circula en el plasma como glu-plasminógeno (el aminoácido N-terminal es glutamato). El plasminógeno contiene cinco estructuras de triple asa que son características de los componentes del sistema fibrinolítico. Un proceso de proteólisis limitada convierte al glu-plasminógeno en lis-plasminógeno (ahora el aminoácido N-terminal es lisina) y es el lis-plasminógeno el que se convierte, en forma preferente, en la enzima con actividad fibrinolítica, la plasmina. El plasminógeno interactúa con la fibrina por medio de sitios de unión de lisina, que pueden ser bloqueados por agentes parecidos a éste aminoácido.

La conversión crucial de plasminógeno a plasmina está mediada por dos activadores del plasminógeno: el t-PA y la urocinasa (activador del plasminógeno que se encuentra en la orina), y ambos son empleados en la actualidad como agentes fibrinolíticos. La molécula de t-PA producida en las células endoteliales y en otros tejidos, también tiene dominios de asa, y convierte el plasminógeno en plasmina en forma lenta. Cuando el t-PA se une a la fibrina su acción aumenta cien veces. Esta especificidad por la fibrina es ideal desde el punto de vista fisiológico: un complejo ternario que consiste en fibrina, t-PA y plasminógeno, en el que el t-PA unido a fibrina convierte al plasminógeno en plasmina junto en el sitio en que se encuentra el trombo de fibrina. La plasmina asociada a la fibrina también es protegida de la acción inhibitoria específica de la α_2 -antiplasmina. La prourocinasa, o activador urinario del plasminógeno de cadena única (scu-PA) es convertida por medio de proteólisis en urocinasa, o activador urinario del plasminógeno de doble cadena (tcu-PA), que tiene un dominio de asa (al igual que el plasminógeno y el t-PA). La urocinasa (tcu-PA) no tiene especificidad por la fibrina para convertir el plasminógeno en plasmina, mientras que el scu-PA sí la tiene.

Los inhibidores naturales de la fibrinólisis bloquean a la plasmina o a los dos activadores del plasminógeno, el t-PA y la urocinasa. La plasmina es inhibida con rapidez por interacción con su inhibidor (la α_2 -antiplasmina) a nivel de su sitio lisina. Sin embargo, cuando la plasmina está unida a fibrina, el sitio lisina está bloqueado y esto la protege en forma parcial contra el ataque de la α_2 -antiplasmina. Los activadores del plasminógeno son inhibidos por varios PAI, algunos de los cuales ya se han descrito. El PAI-1 se encuentra en el plasma y es el principal inhibidor del t-PA y de la urocinasa. Su expresión y producción dependen de un control complejo, y el aumento en su concentración en plasma se asocia con trombosis. La deficiencias de PAI-1 puede causar fibrinólisis sin oposición y hemorragia (6). El segundo inhibidor es el PAI-2, que es distinto en forma que el PAI-1 y puede encontrarse en extractos de placenta humana. El PAI-2 no se encuentra presente comúnmente en plasma en condiciones normales, pero se incrementa su concentración durante el tercer trimestre del embarazo, presumiblemente deriva de la placenta. El PAI-2 inhibe al t-PA y a la u-PA. Fig. 2 y 3.

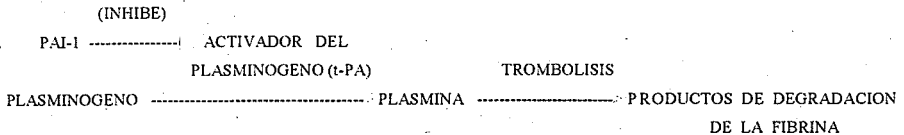


Fig. 2.



Fig. 3.

EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE COAGULACION POR LABORATORIO

Unas cuantas pruebas de coagulación pueden ser eficaces para la detección de la función de los procoagulantes. La mayor parte de estas pruebas están basadas en mediciones del tiempo que se requiere para formar bandas de fibrina, que se pueden detectar por medio de dispositivos ópticos o eléctricos. En cada caso, la prolongación excesiva del tiempo de una de las pruebas puede representar una concentración anormal baja de algún factor, o la presencia de un factor o factores biológicamente inactivos o inhibidores.

TIEMPO DE PROTROMBINA.

El tiempo de protrombina (TP) fue introducido en su inicio como un ensayo para medir la protrombina en plasma, antes que otros factores que participan en las reacciones de la coagulación. Actualmente esta prueba se realiza en forma rutinaria para la identificación de deficiencias adquiridas o inherentes (raramente por inhibidores) de los activadores del fibrinógeno, de la protrombina y de los factores V, VII, y X. También es

utilizado para el monitoreo de terapia anticoagulante oral. Esta prueba valora la vía extrínseca de la coagulación. Es iniciada al recalificar el plasma citratado en presencia de “tromboplastina” (de origen de factor tisular en una suspensión de fosfolípidos). El tiempo de lapso en que se presenta el coágulo es predominantemente determinado por las siguientes reacciones: 1) factor VIIa, factor tisular, fosfolípidos y activación del factor X por el calcio; 2) factor Xa, factor Va, fosfolípidos, y activación de la protrombina; 3) la activación del fibrinógeno por la trombina; y 4) la polimeración de los monómeros de fibrina para ser detectada. El TP de plasma normal es insensible para otros factores. Las deficiencias o inhibidores de factores, pueden ser sospechadas básicamente por una prolongación del TP y deben ser investigadas con ensayos específicos.

En la medición del TP para el monitoreo de la terapia anticoagulante oral, se ha estandarizado el uso del International Normalized Ratio (INR) por los laboratorios para control de dosis terapéuticas de estas drogas, esto al obtener un Índice de sensibilidad Internacional (ISI) de la tromboplastina que se requiere como reactivo. El rango normal del INR es de 0.9 a 1.2, y para terapia anticoagulante es de 1.5 a 2.5, y si el paciente tiene prótesis válvular el valor del INR puede ser de 3 a 4 (5).

TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA

El tiempo parcial de tromboplastina (TPT) es utilizada como prueba de rutina para identificar deficiencias adquiridas, inherentes o por inhibidores de los factores VIII, IX y XI. El TPT es anormal también en deficiencias de factor XII, precalicreína, y cimógeno de alto peso molecular, pero las deficiencias individuales de estos factores no causan sangrados incontrolables. La disminución de la actividad de fibrinógeno, protrombina, factor V o X, pueden prolongar del TPT. También es utilizado para el monitoreo de terapia heparínica y de rutina en el síndrome antifosfolípidos por anticoagulante lúpico. Esta prueba valora la vía intrínseca y es más sensible a las

alteraciones y deficiencias de la secuencia de activadores de los procoagulantes que ocurren antes de la activación del factor X. Sus valores normales son de 20 a 40 segundos (5).

TIEMPO DE TROMBINA

El tiempo de trombina (TT) se usa para investigar alteraciones que afectan la conversión del fibrinógeno en fibrina. Cuando se añade cantidades óptimas de trombina al plasma, aparece fibrina en un lapso de 5 a 6 segundos. Como la trombina es una enzima muy potente puede bloquear a sus inhibidores *in vitro*. Sin embargo, si se agregan diluciones de trombina al plasma hasta que el TT normal sea de cerca de 16 segundos, los inhibidores de la conversión de fibrinógeno a fibrina, como los productos de degradación de fibrina o el cofactor antitrombina-heparina, pueden prolongar claramente el TT. Los pacientes con disfibrinogenemia y paraproteïnemias también pueden tener un TT prolongado. Sus valores normales son de 10 a 15 segundos (6).

FIBRINOGENO

La medición del fibrinógeno es importante en varias entidades clínicas, incluyendo en anomalías hereditarias, procesos crónicos o agudos, enfermedades hepáticas, y terapia trombolítica. Estudios epidemiológicos han identificado concentraciones elevadas de fibrinógeno en plasma como factor de riesgo para enfermedad cardiovascular y niveles disminuidos en pacientes con Coagulación Intravascular. Los valores normales de fibrinógeno son de 200 a 400 mg/dl (5 a 12 $\mu\text{mol/l}$) (5).

EVALUACION DE LA FIBRINOLISIS

La formación de fibrina es el principal estímulo para iniciar la fibrinólisis. El fibrinógeno es un polipéptido formado por tres dominios, llamados $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$, y γ . Al actuar la plasmina sobre el fibrinógeno, fragmenta el dominio de la cadena $\text{A}\alpha$ originando productos de degradación (fibrinopéptido A y B) y fragmento X. La siguiente división es la fragmentación asimétrica del fragmento X, en fragmento D y fragmento Y. Este último, nuevamente sufre fragmentación originando fragmento D y fragmento E (Fig.4). El producto de degradación de la fibrina, es el fragmento DD (Dimero-D), que consiste en dos fragmentos D (7). Fig. 5. Las concentraciones plasmáticas de PDF y DD se elevan en una gran variedad de condiciones fisiopatológicas, tales como en síndromes hiperfibrinolíticos, CID y fibrinólisis primaria. Es útil en la terapia trombolítica en el Infarto Agudo del Miocardio. Se ha relacionado niveles elevados de PDF en pacientes con tumores sólidos.

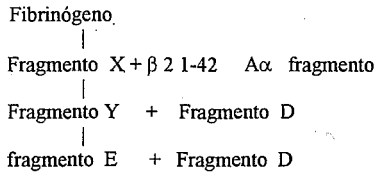


Fig. 4. Degradación asimétrica del fibrinógeno por la plasmina.

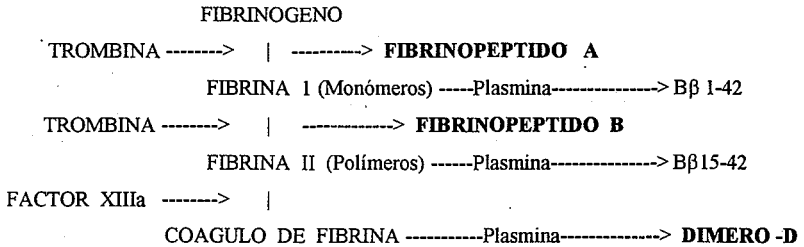


Fig. 5. Representación esquemática de la degradación del fibrinógeno y fibrina, demostrando los productos de degradación del fibrinógeno (PDF).

FISIOPATOLOGIA DEL ESTADO HIPERCOAGULABLE

Rudolf Virchow en 1845, postulo la famosa triada de factores responsables de la formación de un trombo, que es "Estasis, lesión vascular y cambios hipercoagulables de los elementos formes de la sangre". Las alteraciones de la coagulación se han estudiado exhaustivamente, pero todavía no existe una prueba fiable del estado de "hipercoagulabilidad", es decir, una prueba que pueda predecir el riesgo de trombosis.

El 50 % de todos los pacientes que tiene una evento trombótico, se encuentran sufriendo simultáneamente otra patología, lo que hace suponer la causa de la trombogénesis. Sin embargo, el resto no se identifica un factor etiológico. Entre estos factores se piensan como predisponentes la inmovilización, la edad, la cirugía, el tratamiento con estrógenos, pero no como factores etiológicos (8).

La respuesta inmediata de la sangre a la estasis sanguínea, esta relacionada con la agregación eritrocitaria en los capilares, resultado de alteraciones en el flujo sanguíneo y con alta probabilidad de alteraciones de la estructura de los microvasos (9). Se ha observado durante la estasis una sedimentación por un proceso gravitacional que favorece a la separación de los componentes de la sangre, que culmina con una compactación de eritrocitos y, por lo tanto, una agregación de eritrocitaria que ocluye en su totalidad el microvaso (10).

En estudios sobre estasis venosa por efecto traumático al endotelio y lesión celular, fue demostrada a los tres minutos del inicio de la estasis venosa. Y con un periodo prolongado de estasis, las células endoteliales son descamadas, resultando la exposición de la membrana basal subendotelial, fibras de colágeno, y esto seguido de agregación plaquetaria con fibrina. Esto postula el efecto de la estasis venosa en el endotelio, que es un factor primario que puede ser importante en la etiología clínica de la trombogénesis (11).

La estasis venosa durante la inmovilización en anestesia general, lesiones con hemiparesias, y falla cardíaca, juegan un papel importante en la trombosis. Este potencial está relacionado con la tromboplastina y la colágena expuesta durante la lesión vascular por estasis e hipoxia, disminuyendo la fibrinólisis durante la cirugía, y en enfermedad maligna, entre otras (12)

In vitro se ha estudiado la liberación endotelial de tejido al realizar estasis venosa en extremidades superiores en sujetos sanos. Observándose liberación de endotelina-1 (ET-1) que es un potente vasoconstrictor. Esto al realizar oclusión venosa en el brazo derecho (3.3 pg/ml) y de 2.7 pg/ml en el brazo izquierdo, lo que corresponde a un incremento significativo de la concentración plasmática de ET-1 después de 20 minutos (13).

La mayoría de los trombos venosos, son originados en regiones con bajo flujo sanguíneo. Al disminuir el flujo sanguíneo se presenta la estasis, lo que produce una falta de bombeo a lo largo del paquete muscular en pacientes paralizados, siendo sin duda uno de los mayores factores de trombosis. Ya que la sangre estancada produce activación del sistema de coagulación localmente conduciendo potencialmente un estado hipercoagulable localmente. El daño endotelial es el resultado de la distensión de los vasos por el estancamiento de la sangre. El flujo de la sangre es disminuido por la hiperviscosidad debida a la elevación de los niveles de fibrinógeno y de la deshidratación. Inmediatamente después de haber una lesión, inician cambios en el sistema de coagulación, especialmente un aumento del factor von Willebrand y de la agregación plaquetaria, lo cual puede contribuir importantemente a la hipercoagulabilidad (14).

EVALUACION DIAGNOSTICA POR LABORATORIO EN PACIENTES CON ESTADO HIPERCOAGULABLE

Las pruebas de rutina son anormales desde el inicio del estado hipercoagulable, incrementando los factores de coagulación, fibrinógeno, Productos de Degradación de la Fibrina (PDF), y trombocitopenia. Los marcadores de activación de la coagulación en estos pacientes, como el Fibrinopéptido A (FPA), Complejo trombina-antitrombina III (TAT), Dimero-D y Fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) se encuentran elevados. En los pacientes con hipercoagulabilidad los activadores procoagulantes, como el factor tisular puede ser medido, pero no tiene valor predictivo para un evento de tromboembolismo. No obstante, tienen un elevado riesgo de trombosis en condiciones especiales tales, como cirugías o durante la quimioterapia en pacientes neoplásicos, por lo que, se les recomienda la profilaxis con heparina (15).

El protocolo de estudio de un paciente en estado hipercoagulable, consiste en la determinación de pruebas de rutina como; TP, TPT, TT, Fibrinógeno, y descartar deficiencias de Antitrombina III, Proteína C, proteína S, Resistencia a la proteína C activada y una Disfibrinogenemia. **Para evaluar el estado actual de un paciente con trombosis, se determina el fragmento 1+2 de la protrombina, que es un marcador de la conversión de protrombina a trombina.** El Fibrinopéptido A, Dimero-D y Productos de degradación de la fibrina (PDF), son marcadores de la formación y destrucción del coágulo.

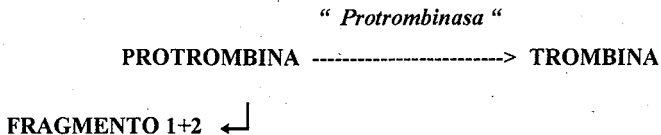
PROTROMBINA

Es una glicoproteína plasmática sintetizada en el hígado, dependiente de vitamina K, con un PM de 72,000 daltons y una vida media de 72 horas. Es una proteasa de serina, compuesta por 579 residuos de aminoácidos en una cadena simple polipeptídica. Se encuentra a una concentración de $1.4 \mu\text{M}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) y su gen codificador se encuentra en el cromosoma 11. Consiste en una cadena **A** unida a una cadena **B**, a través de un puente de disulfuro. La conversión proteolítica de protrombina a trombina es mediada por la acción proteolítica del factor Xa, Ca^{2+} y fosfolípidos, formando el complejo "protrombinasa" quienes son acelerados 300 veces por la presencia del factor V activado.

La formación del complejo de protrombinasa involucra tres pasos: 1) la unión del factor Va a la superficie de membrana; 2) la unión del factor Xa a la superficie de membrana; y 3) la interacción de los factores al unirse a la membrana. Aunque el factor Xa puede activar directamente a la protrombina en ausencia de calcio, factor Va y de la superficie de membrana, el grado de activación es muy bajo e irrelevante. Por el contrario, el grado de activación de la protrombina por el complejo de protrombinasa es cerca de 300,000 veces más intenso. Además, el factor Va unido a las células endoteliales, monocitos y linfocitos, facilitan la unión del complejo protrombinasa.

Aunque, múltiples fragmentos pueden ser generados por la acción de la protrombinasa sobre la protrombina, dos o posiblemente tres péptidos unidos son necesario en la generación de la α -trombina. Con fragmentación de la Arg 271-Thr 272 o Arg 286-Thr 287 unidas en presencia de proteínas plasmáticas dan un fragmento 1+2 (Mr 43,000) o fragmento 1+2+3 (Mr 45,000), respectivamente, ambos derivados del amino terminal (NH_2) de la protrombina (16). En la fragmentación de Arg 322- Ile 323 se genera solamente un cambio intermedio llamada *Meizotrombina*, con poca actividad coagulante. Cuando la

Meizotrombina es fragmentada nuevamente en la posición Arg 284 se genera la α -trombina y *fragmento 1+2*. Este último en posición Arg 155 da fragmento 1 más fragmento 2 (17,18).



FRAGMENTO 1+2 DE LA PROTROMBINA

Es un polipéptido de aproximadamente 34 kD, que es encontrado en la circulación durante la activación de la protrombina a trombina por el complejo protrombinasa. Su vida media es de aproximadamente 90 min, y se encuentra relacionada con los fibrinopéptidos A y B. **La prueba del F1+2, se utiliza como un potente marcador bioquímico definido como pretrombótico en estados hipercoagulables, para valorar el riesgo trombótico o para el monitoreo eficaz de la terapia anticoagulante** (19).

Las fluctuaciones diarias de los niveles plasmáticos de activadores e inhibidores de la coagulación y fibrinólisis, están dados por los cambios correspondientes en los estados de actividad de estos sistemas. En sujetos sanos, el F1+2 disminuye durante el día (8:00 hrs 0.97 nmol/l; 20 :00 hrs 0.78 nmol/L, P = 0.005). Estas variaciones circadianas juegan un papel importante en los eventos cardiovasculares agudos (20). Otros estudios han demostrados que los niveles de F1+2 incrementan con la edad principalmente a partir de los 44 años (21).

La importancia clínica de la determinación de fragmento 1+2 (F1+2), es en el diagnóstico de eventos trombóticos o estados hipercoagulables. Se incrementa sus valores en pacientes con Trombosis, Cáncer, Embolia pulmonar, DIC, Politraumatizados y

Sépsis. También se encuentran niveles altos en pacientes con deficiencia de Proteína C o Proteína S. Recientemente se esta utilizando del F1+2, para valorar el grado de anticoagulación en pacientes con terapia oral, observándose una disminución en sus niveles.

Estudios recientes han evaluado el nivel plasmático de F1+2 en pacientes neoplásicos para monitoreo de la activación del sistema de coagulación y especialmente con respecto a una detección temprana y oportuno tratamiento de una Coagulación Intravascular Diseminada (22). Estudios en pacientes con neoplasias ginecológicas se ha detectado hasta un 68.4% de ellos un incremento en los niveles de F1+2 durante la quimioterapia, pero sin signos de depósito de fibrina (expresado por niveles normales de Dímero-D) (23). Pacientes con neoplasias hematológicas mostraron niveles significativamente elevados, en comparación con sujetos sanos, principalmente cuando iniciaron la quimioterapia.

Se ha descrito una mutación en el gen de la protrombina (20210 G-->A) en pacientes que se asocia con un incremento en los niveles de protrombina y de riesgo para trombosis venosa y arterial. Esta mutación se observa cerca del 1% de la población normal y en el 2.7% en pacientes que tienen el antecedente de un evento trombótico (24).

ANTECEDENTES

Es bien conocido el efecto de la estasis venosa en la fisiopatología de la trombosis, existen estudios que apoyan esto. En cirugía ortopédica, se realiza oclusiones en forma rutinaria a través del torniquete durante tiempos prolongados (hasta 30 min), sin encontrar evidencias clínicas de trombosis, ni cambios en los factores V o VII, fibrinógeno

o en el número total de plaquetas (25). Crews JC, et al. ha investigado la respuesta de mantener un torniquete inflado en alguna de las extremidades, tomando en cuenta su localización (derecha o izquierda), su extensión o anchura, y la presión a la que se aplica, durante 34 +/- 13 min. Mostrando no diferencias significativas entre los parámetros estudiados (26). Sin embargo, se han reportado embolismos pulmonares masivos con el uso de torniquetes en extremidades, reportando un estudio 8 pacientes de 30 que fueron sometidos a cirugía ortopédica, por lo que, la significancia clínica de estos eventos permanecen aún no determinados (27).

Se pretende realizar un estudio en sujetos jóvenes, provocando en forma fisiológica estasis venosa para valorar los cambios hemostáticos en forma local y conocer en que momento inicia la activación de la coagulación, así como, conocer la utilidad de un marcador bioquímico de activación del sistema de coagulación en forma temprana.

HIPOTESIS

La estasis venosa es capaz de inducir o provocar cambios en el sistema de coagulación.

OBJETIVOS

- 1) Obtener una condición de estasis venosa, para demostrar cambios en la actividad de coagulación en sujetos sanos.
- 2) Determinar los cambios en los factores procoagulantes y de fibrinolisis en estos sujetos.
- 2) Demostrar la utilidad de un marcador bioquímico de activación del sistema de coagulación en forma temprana.

MATERIAL Y METODOS

A 15 sujetos jóvenes sanos voluntarios, se les realizará una oclusión venosa en el antebrazo izquierdo, durante 30 minutos a través del manguito neumático del esfigmomanómetro (para producir en forma fisiológica estasis venosa) a una presión media constante promedio entre la presión diastólica y sistólica, en el horario de las 8:00 y 9:30 am. Se les determinará a cada uno el TP, TPT, Fibrinógeno, número de plaquetas, F1+2 y Dimero-D, en forma basal, a los 15 y 30 min durante la oclusión y 15 y 30 minutos después de haber retirado el manguito. También se les interrogará a cerca de antecedentes familiares

y personales de Hipertensión arterial sistémica, Trombofilia, Hemofilia, Cardiopatías, alteraciones de la coagulación y tabaquismo. Se utilizará el método estadístico t de students para el análisis de resultados.

La obtención de las muestras sanguíneas se realizará a través de punción venosa en el brazo izquierdo, con previa asépsia y antisepsia en las venas medial y radial a nivel del pliegue del codo cara anterior. Se utilizará aguja vacutainer (0.8 x 38 mm) en cada punción, obteniéndose un primer tubo con EDTA (0.057 ml de K3 al 15%), para cuenta plaquetaria y dos tubos con citrato de sodio al 3.8 %, 0.11 mol/L. Cada tubo (13 x 75 mm) con una capacidad de 4.5 ml de sangre total. La relación sangre / anticoagulante será de nueve a uno. La punción venosa deberá hacerse limpiamente y sin lesionar las estructuras anatómicas. La sangre será homogeneizada por inversión suavemente y procesadas a más tardar 2 hrs. después de haberse efectuado la toma. El plasma congelado se puede procesar hasta 2 semanas después de haberse efectuado la toma.

El primer tubo con pata lila será utilizado para cuenta plaquetaria, se procesará durante las primeras dos horas de la obtención de la muestra, con previa homogeneización y con el equipo Coulter (STKS). El tubo número dos con tapa Azul, será destinado a la realización de las determinaciones de: Tiempo de Protrombina (TP); Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TPT); fibrinógeno; y Dimero-D, serán centrifugados a 3000 r.p.m.(1500 x g), durante 10 minutos, para obtener un plasma pobre en plaquetas (PPP) y ser procesadas inmediatamente.

La medición del TP sirve como prueba rápida y sensible para determinar trastornos del sistema extrínseco de la coagulación (factores II, V, VII y X). El equipo que se utilizará para ésta determinación, es el CA de SYSMEX-DADE (SYSMEX CA6000). 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. El reporte de resultados deberá ser en segundos, % e INR.

En donde nuestros valores de referencia son: de 12 a 14.5 seg. , de 120 a 70 % y de 0.9 a 1.2 de INR. Se excluirán muestras hemolizadas, coaguladas, ictericas y con volúmenes no óptimos.

El TPT mide la actividad coagulante de los factores que intervienen en la vía intrínseca (Factor XII, IX), factores IX, VIII (complejo Xasa) y factores X, V, II (vía común), excepto el factor XIII. Evalúa y vigila la acción de anticoagulantes no orales como la heparina, en la que el tiempo de coagulación se prolonga en proporción al nivel de la heparina. Se encuentra acortado en enfermedades trombóticas hereditarias como la Resistencia a la actividad de la Proteína C activada.

El TPT se procesará en el CA de SYSMEX-DADE, que consta de un sistema hidráulico que realiza la aspiración, dilución y mezcla de las muestras a analizar con los reactivos correspondientes. La detección del coágulo está determinada por un cambio de la dispersión de la luz. El TPT de una muestra mide el tiempo en segundos que tarda un plasma citratado en coagular, después de agregarle la fracción lipídica de la tromboplastina más calcio, más un activador en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica. Los valores de referencia en nuestro método son de 20 a 40 segundos.

La prueba de fibrinógeno permite evaluar la cantidad y función del fibrinógeno aún en concentraciones bajas. Esta determinación se realizará en forma inmediata posterior a la toma y centrifugada a 2500 r.p.m. durante 10 minutos. Se procesará en el equipo CA-600 de SYSMEX-DADE, con el reactivo Thrombin, nuestros valores de referencia son de 200 a 400 mg/dL

Para la determinación del Fragmento 1+2 de Protrombina, utilizaremos el tercer tubo de tapa azul, se homogeneizará suavemente para permitir un buen contacto del anticoagulante y la sangre. Se centrifugará a 1500 x g (3000 r.p.m.), durante 10 minutos.

Todos los pacientes serán procesados en una sola corrida, por lo que, las muestras posterior a la centrifugación, serán separadas en alíquotas y congeladas a -70°C , con una estabilidad de las muestras de 2 semanas. La técnica es un inmunoensayo enzimático (ELISA) *in vitro* con el principio de Sándwich, utilizando Anti-protrombina / POD conjugada de conejo (Enzynost F 1+2), y se leerá a 492 nm (490 a 500 nm). Con respecto al método, todas las determinaciones (estándares, controles y pacientes) serán realizados por duplicado. Método: durante la incubación inicial, el antígeno F1+2 presente en la muestra se fija a los anticuerpos contra F1+2 adheridos a la superficie de la placa de microtitulación. Después del lavado, los anticuerpos contra la protrombina humana conjugada con peroxidasa, se unen en una segunda reacción a los determinantes F1+2 todavía libres. Los anticuerpos excedentes conjugados con enzimas se eliminan por el lavado; a continuación se determina la actividad enzimática fijada. La transformación enzimática del peróxido de hidrógeno y del cromógeno se interrumpe al agregar el ácido sulfúrico diluido. La intensidad cromática, proporcional a la concentración de F1+2, se determina fotométricamente. La concentración de los estándares cubren la zona de concentración de 0.04 hasta 10 nmol/l., con una media de: 0.7 nmol/L, y con un rango de sensibilidad de: 0.04 a 10 nmol/l.

Dimero-D es un marcador específico de fibrinólisis, se determinará en el equipo VIDAS D-DIMER. El plasma utilizado para ésta prueba sera del segundo tubo, y se procesará en forma inmediata. Es una prueba automatizada por el sistema VIDAS que permite la medición cuantitativa de los productos de degradación de la fibrina en el plasma humano. El principio de la dosificación asocia el método inmunoenzimático de tipo sándwich en dos etapas con una detección final mediante fluorescencia (ELFA). Todas las etapas de las reacciones son dirigidas por el instrumento. La curva de calibración memorizada en el aparato para cada lote debe ser realizada cada 15 días mediante un calibrador en duplicado. El anticuerpo anti-dimero-D P10B5E12C9 absorbido en la superficie, junto un segundo anticuerpo anti-dimero-D (P2C5A10), conjugado con la fosfatasa alcalina. El tiempo aproximado para este proceso es de 35 min. Nuestros valores de referencia menor de < 500 .

CRITERIOS DE INCLUSION

Sexo indistinto

Edad mayor de 18 años y menor de 46 años

Sano sin antecedentes de trombofilia

Sujetos en ayunas

Consentimiento de autorización de la prueba

CRITERIOS DE EXCLUSION

Menores de 18 años y mayores de 46 años

Sujetos con enfermedades crónicas (DM, HTA, Cardiopatías, etc.)

Sujetos con toma de anti-agregantes plaquetario

Sin consentimiento de autorización de la prueba

Sujetos que manifiesten malestar durante la prueba

Sujetos con ingesta de alcohol en las últimas 48 hrs.

CARTA DE ACEPTACION

Yo _____, acepto a participar en el protocolo de investigación sobre " Estasis y coagulación ", a cargo del DR. JESUS ROY ARANDA O. El cual se me ha informado en forma adecuada y específica sobre el estudio. Así como, mi retiro del protocolo en forma inmediata en el momento que yo lo decida.

ATENTAMENTE

RESULTADOS

Se analizaron 15 sujetos sanos (10 hombres y 5 mujeres), con una edad promedio de 32.1 años en los varones (27 a 46 años) y de 30.4 en las mujeres (25 a 37 años). El 27 % tienen antecedentes quirúrgicos sin complicaciones. El 60 % (9) tienen tabaquismo positivo, con un promedio de 9.6 cigarrillos al día. El 73% de los sujetos tienen antecedentes familiares de hipertensión, con un 40% de Cardiopatías y el 33 % de antecedentes de Trombofilia.

La cuenta plaquetaria durante el procedimiento mostró una elevación durante los primeros 15 minutos y un franco retorno a su cuanta basal posterior al retiro del torniquete e inclusive ligeramente menor al basal. No mostrando diferencia estadísticamente significativa durante el procedimiento (Ver tabla de Plaquetas, Hoja 30).

El Tiempo de Protrombina (TP), mostró un acortamiento en el tiempo (seg.) durante los 15 y 30 minutos de la aplicación del torniquete, posteriormente al retiro de la oclusión el tiempo se prolonga sobrepasando el tiempo basal. Por lo que, el Tiempo de Protrombina mostró diferencias estadísticamente significativas durante la prueba, principalmente durante los 15 y 30 minutos comparado con el basal, con una $P=0.000005$ y $P=0.00001$, respectivamente (Ver tabla de Tiempo de Protrombina, Hoja 31).

El Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (TPT), durante el procedimiento mostró un alargamiento del tiempo (seg.) durante los primeros 15 minutos, posteriormente ligero acortamiento en los tiempos, pero no mostró diferencia estadísticamente significativas durante el procedimiento (Ver tabla Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada, Hoja 32).

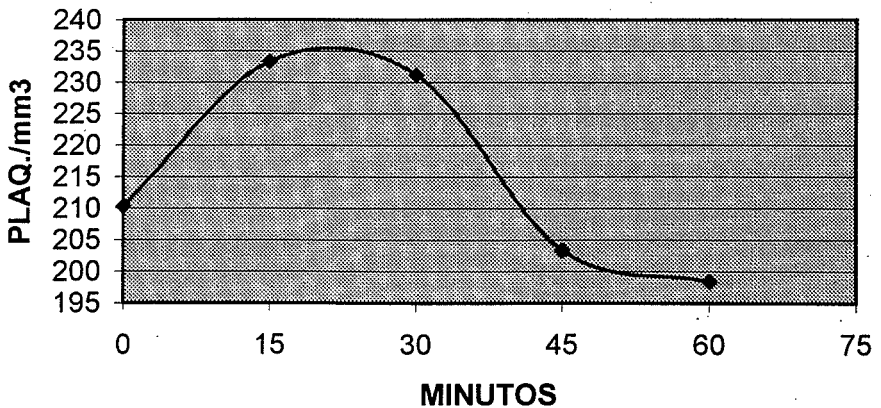
El Fibrinógeno mostró incremento durante los primeros 15 y 30 minutos, y posterior al retiro del torniquete se observó una disminución del fibrinógeno ligeramente por debajo del basal. Sin embargo, no mostró diferencia estadísticamente significativa durante las diferentes determinaciones (Ver tabla de Fibrinógeno, Hoja 33).

El Fragmento 1+2 de la Protrombina (F1+2), mostró una importante elevación durante los 15 y 30 minutos de la aplicación del torniquete, y una disminución a valores ligeramente por debajo del basal al retirar el mismo, mostrando diferencias estadísticamente significativa, principalmente entre el basal y a los 30 minutos ($P=0.003$), con una media de la basal y a los 30 minutos de 0.83 nmol/ml y 1.54 nmol/ml, respectivamente (Ver tabla F1+2, Hoja 34).

La determinación de Dimero-D, mostró un incremento a los 30 minutos de la aplicación del torniquete y una disminución a valores por debajo del basal al retirar la oclusión. Por lo que, no mostró diferencia estadísticamente significativa entre las determinaciones (Ver tabla Dimero-D, Hoja 35).

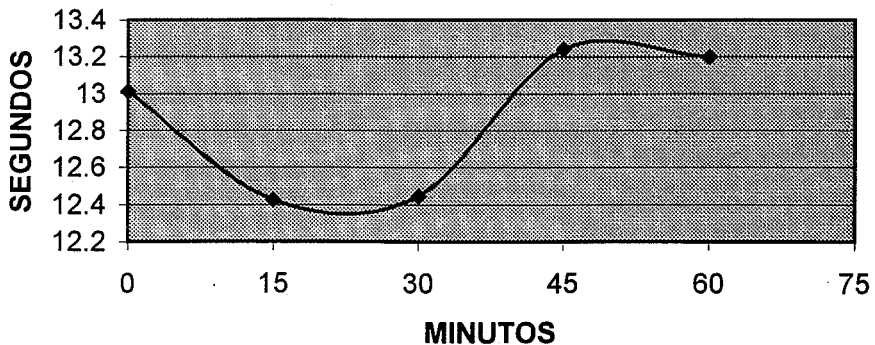
| PACIENTE | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
|------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A | 248 | 295 | 294 | 261 | 249 |
| B | 175 | 188 | 187 | 172 | 164 |
| C | 261 | 321 | 273 | 378 | 248 |
| D | 236 | 250 | 226 | 229 | 214 |
| E | 198 | 230 | 227 | 190 | 200 |
| F | 170 | 190 | 194 | 158 | 161 |
| G | 153 | 173 | 187 | 140 | 148 |
| H | 154 | 188 | 179 | 157 | 153 |
| I | 200 | 217 | 189 | 180 | 176 |
| J | 198 | 210 | 207 | 182 | 180 |
| K | 357 | 371 | 495 | 317 | 318 |
| L | 148 | 160 | 163 | 141 | 160 |
| M | 218 | 224 | 210 | 175 | 188 |
| N | 249 | 262 | 266 | 254 | 238 |
| O | 287 | 328 | 326 | 250 | 254 |
| | | | | | |
| MINUTOS | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| PROMEDIO | 210.201313 | 233.263663 | 231.154161 | 203.247203 | 198.354122 |
| D.S | 57.689068 | 63.0497158 | 84.2639278 | 68.671544 | 48.8887951 |
| C.V. | 27.4446754 | 27.0293774 | 36.453563 | 33.7872025 | 24.6472291 |
| T STUDENT | BASAL-15' | 0.29262427 | | | |
| T STUDENT | BASAL-30' | 0.35624842 | | | |
| T STUDENT | 30'-60' | 0.14072337 | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

PLAQUETAS



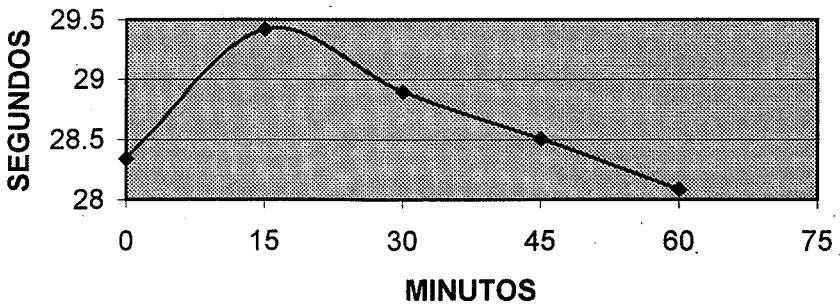
| PACIENTE | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
|-----------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
| A | 13.1 | 12.3 | 12.5 | 13.4 | 13.4 |
| B | 12.9 | 12.6 | 12.6 | 13.2 | 13.1 |
| C | 12.9 | 12.3 | 12.5 | 13.2 | 13.2 |
| D | 12.9 | 12.1 | 12.4 | 13.3 | 13 |
| E | 13.5 | 12.7 | 12.9 | 13.5 | 13.7 |
| F | 13.3 | 12.8 | 12.5 | 13.7 | 13.6 |
| G | 12.9 | 12.2 | 12.1 | 13.2 | 13.2 |
| H | 12.4 | 12 | 12.1 | 12.8 | 12.9 |
| I | 12.9 | 12.6 | 12.5 | 13.3 | 13.2 |
| J | 12.7 | 11.9 | 11.8 | 12.8 | 12.7 |
| K | 13.2 | 12.9 | 12.9 | 13.3 | 13.2 |
| L | 13.3 | 12.8 | 12.8 | 13.3 | 13.3 |
| M | 13.1 | 12.4 | 12.6 | 13.3 | 13.1 |
| N | 12.9 | 12.4 | 12.3 | 12.9 | 13 |
| O | 13.2 | 12.4 | 12.2 | 13.4 | 13.4 |
| | | | | | |
| MINUTOS | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| PROMEDIO | 13.01066251 | 12.42320189 | 12.4430638 | 13.2378332 | 13.19762987 |
| D.S. | 0.272204405 | 0.303471973 | 0.30906926 | 0.24727082 | 0.259119388 |
| C.V. | 2.092164061 | 2.442783874 | 2.48386787 | 1.86791005 | 1.9633782 |
| T.STUDENT | BASAL-15' | 5.79946E-06 | | | |
| | BASAL-30' | 1.12925E-05 | | | |
| | BASAL-45' | 0.02397159 | | | |
| | BASAL-60' | 0.0646136 | | | |
| | 15'-45' | 9.20574E-09 | | | |
| | 15'-60' | 3.55852E-08 | | | |
| | 30'-60' | 7.11003E-08 | | | |

TIEMPO DE PROTROMBINA



| PACIENTE | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
|-----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A | 28 | 30 | 29 | 27 | 28 |
| B | 27 | 27 | 28 | 27 | 27 |
| C | 28 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| D | 29 | 30 | 29 | 28 | 29 |
| E | 29 | 29 | 27 | 29 | 29 |
| F | 29 | 30 | 28 | 30 | 30 |
| G | 29 | 29 | 27 | 29 | 28 |
| H | 25 | 26 | 25 | 25 | 25 |
| I | 32 | 33 | 33 | 34 | 29 |
| J | 28 | 32 | 31 | 33 | 29 |
| K | 26 | 26 | 26 | 26 | 25 |
| L | 29 | 32 | 32 | 29 | 30 |
| M | 29 | 32 | 32 | 29 | 30 |
| N | 26 | 26 | 28 | 26 | 26 |
| O | 32 | 34 | 33 | 30 | 30 |
| | | | | | |
| MINUTOS | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| PROMEDIO | 28.3374544 | 29.4182392 | 28.893331 | 28.5012709 | 28.08007507 |
| D.S. | 1.95667356 | 2.69567555 | 2.5911939 | 2.50142816 | 1.767430203 |
| C.V. | 6.90490238 | 9.16327973 | 8.9681382 | 8.77654956 | 6.29425028 |
| T.STUDENT | BASAL-15' | 0.19826602 | | | |
| | BASAL-30' | 0.48011631 | | | |
| | 15'-45' | 0.33404827 | | | |
| | 15-60' | 0.10366771 | | | |

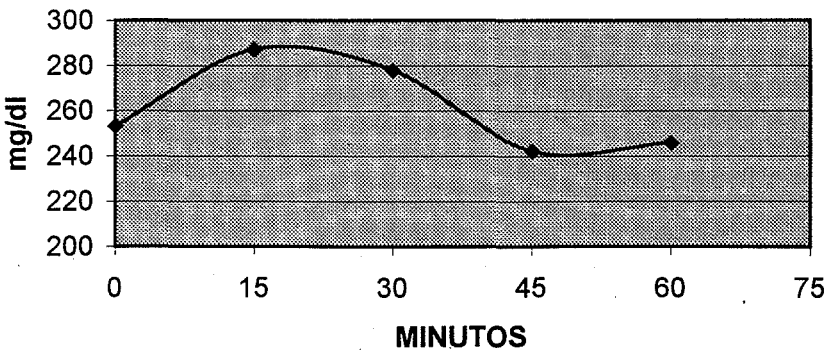
TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADA



| PACIENTE | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
|----------|-------|--------|--------|--------|--------|
| A | 270 | 279 | 266 | 232 | 243 |
| B | 218 | 223 | 222 | 214 | 218 |
| C | 238 | 273 | 257 | 222 | 229 |
| D | 225 | 262 | 254 | 216 | 227 |
| E | 266 | 330 | 311 | 257 | 263 |
| F | 248 | 277 | 277 | 234 | 259 |
| G | 243 | 284 | 295 | 234 | 243 |
| H | 259 | 300 | 304 | 255 | 243 |
| I | 282 | 300 | 302 | 254 | 279 |
| J | 255 | 304 | 279 | 227 | 247 |
| K | 298 | 387 | 346 | 291 | 284 |
| L | 252 | 261 | 261 | 256 | 241 |
| M | 263 | 309 | 275 | 257 | 256 |
| N | 233 | 250 | 238 | 250 | 220 |
| O | 259 | 302 | 307 | 245 | 248 |

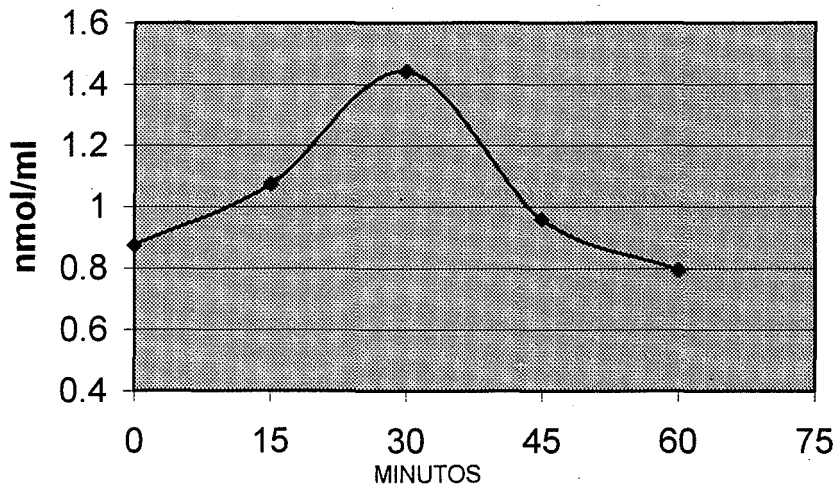
| MINUTOS | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| PROMEDIO | 253.117657 | 287.168767 | 277.899351 | 242.164057 | 245.966636 |
| D.S. | 21.1236721 | 38.0165378 | 31.9079032 | 20.2359887 | 19.3673756 |
| C.V. | 8.34539653 | 13.2383957 | 11.48182 | 8.35631388 | 7.87398482 |
| T.STUDENT | BASAL-15' | 0.0037823 | | | |
| | BASAL-30' | 0.01479369 | | | |
| | 15'-45' | 0.00025976 | | | |
| | 15'-60' | 0.0005805 | | | |

FIBRINOGENO



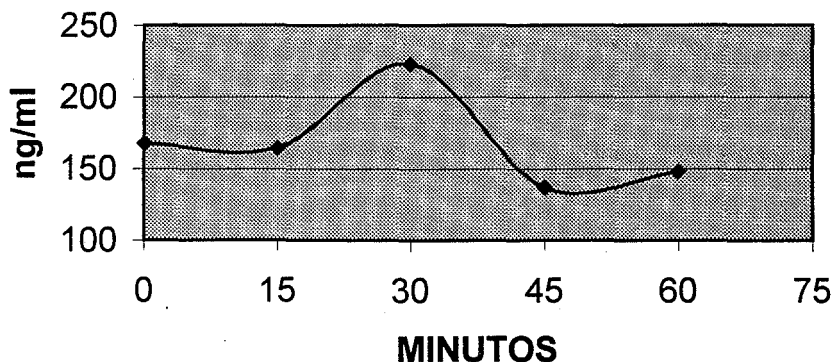
| PACIENTE | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| A | 0.39 | 0.67 | 0.77 | 0.55 | 0.88 |
| B | 0.79 | 0.87 | 2.13 | 1.35 | 0.98 |
| C | 0.87 | 0.9 | 1.4 | 1.12 | 0.98 |
| D | 0.93 | 1.33 | 1.45 | 1.08 | 0.82 |
| E | 0.65 | 1.03 | 1.58 | 0.98 | 0.57 |
| F | 0.45 | 0.61 | 0.69 | 0.62 | 0.46 |
| G | 0.39 | 0.96 | 1.1 | 0.61 | 0.43 |
| H | 1.97 | 2.13 | 2.59 | 1.76 | 1.3 |
| I | 1.01 | 1.12 | 2.2 | 1.78 | 1.52 |
| J | 1.37 | 1.68 | 3.33 | 1.12 | 1.12 |
| K | 0.6 | 0.85 | 1.1 | 0.9 | 0.56 |
| L | 0.82 | 0.85 | 0.96 | 0.64 | 0.56 |
| M | 0.72 | 0.85 | 1.44 | 0.57 | 0.51 |
| N | 0.99 | 1.37 | 1.54 | 0.88 | 0.82 |
| O | 0.56 | 0.75 | 0.86 | 0.42 | 0.4 |
| MEDIA | 0.834 | 1.06466667 | 1.54266667 | 0.95866667 | 0.794 |
| DS | 0.41093621 | 0.41032856 | 0.73828437 | 0.42196592 | 0.33879619 |
| CV | 49.2729273 | 38.5405657 | 47.857673 | 44.0159166 | 42.6695451 |
| T.STUDENT | BASAL-15 | 0.13518251 | | | |
| T.STUDENT | BASAL-30 | 0.00301228 | | | |
| T.STUDENT | BASAL-45 | 0.41928491 | | | |
| T.STUDENT | 15-30 | 0.03687469 | | | |

F1+2



| PACIENTE | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
|-----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A | 56.85 | 73.25 | 67.31 | 45 | 49.84 |
| B | 45 | 69.7 | 96.63 | 173.25 | 233.89 |
| C | 67.91 | 89.07 | 78.92 | 73.31 | 128.06 |
| D | 190.14 | 218.46 | 243.46 | 170.01 | 177.36 |
| E | 83.42 | 116.8 | 125.6 | 80.67 | 105.78 |
| F | 75 | 107 | 123.55 | 77.3 | 69.11 |
| G | 66.53 | 88.06 | 104.12 | 66.82 | 98.29 |
| H | 841.82 | 305.82 | 401.83 | 284.52 | 298.46 |
| I | 210.29 | 290.91 | 241.14 | 173.93 | 202.46 |
| J | 160.62 | 201.85 | 693.3 | 179.11 | 165.5 |
| K | 345.09 | 371.53 | 500.3 | 321.65 | 289.96 |
| L | 66.37 | 88.09 | 106.49 | 70.51 | 63.69 |
| M | 109.78 | 172.14 | 144.52 | 108.96 | 108.41 |
| N | 104.85 | 159.84 | 275.02 | 146.35 | 149.74 |
| O | 89.5 | 117.39 | 142.95 | 80.96 | 73.43 |
| | | | | | |
| MINUTOS | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| PROMEDIO | 167.544667 | 164.660667 | 223.009333 | 136.823333 | 147.598667 |
| D.S. | 202.694863 | 94.749442 | 180.105189 | 81.9477087 | 79.7537151 |
| C.V. | 120.979597 | 57.5422437 | 80.7612787 | 59.8930802 | 54.0341704 |
| T.STUDENT | BASAL-15' | 0.9605397 | | | |
| | BASAL-30' | 0.43488885 | | | |
| | BASAL-45' | 0.59060284 | | | |
| | 30'-45' | 0.10272785 | | | |
| | 30'-60' | 0.14930731 | | | |

DIMERO D



DISCUSION

La cuenta plaquetaria se mostró elevación durante los primeros 15 y 30 minutos de la aplicación del torniquete, probablemente éste efecto se debió a que la estasis venosa provoca en su fase inicial una distensión de los vasos con lesión de células endoteliales que podrían ser las responsables de un aumento en el número de plaquetas en ese sitio. Con el periodo prolongado de estasis, las células endoteliales son descamadas, resultando la exposición de la membrana basal subendotelial y fibras de colágeno. Estos es seguido de agregación de plaquetas y fibrina (11).

El tiempo de Protrombina (TP), mostró un acortamiento en la activación de los factores que intervienen en la vía extrínseca. Estos es debido a que la estasis venosa provoca lesión endotelial y liberación de abundante Factor Tisular (FT). Siendo éste el principal activador el factor VII al formar el complejo FT-FVII e iniciar la activación del sistema de coagulación.

El Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (TPT), mostró un alargamiento en segundos durante los primeros 15 minutos de la aplicación del torniquete. Probablemente por la activación de los anticoagulantes naturales (Proteína C, Proteína S, Antitrombina III, Trombomodulina, etc.), que inhiben a factores de la vía intrínseca, en forma compensatoria a la activación del sistema de coagulación.

El aumento en los niveles de Fibrinógeno durante la aplicación del torniquete, nos muestra una activación del sistema de coagulación, además de ser un reactante de fase aguda.

El Fragmento 1+2 de la Protrombina (F1+2) es un biomarcador de generación de trombina durante la coagulación sanguínea. Su incremento en los valores sanguíneos a los 15 y 30 minutos de la aplicación del torniquete en forma importante, nos muestra claramente la activación del sistema de coagulación.

La elevación del Dímero-D que se observó principalmente a los 30 minutos de la aplicación del torniquete, responde a una activación del sistema de fibrinólisis, esto al tratar de destruir el coágulo de fibrina que se formó durante la activación de la coagulación.

CONCLUSIONES

Se cumplió con los objetivos; el primero al obtener una estasis venosa a través de un torniquete que mostró cambios en la actividad del sistema de coagulación; el segundo al realizar diferentes determinaciones para demostrar activación del sistema de coagulación. Y el tercer objetivo, al pretender demostrar un marcador bioquímico de activación del sistema de coagulación en forma temprana.

Por lo que, nuestra hipótesis fue cierta al obtener resultados que apoyaran a demostrar que la estasis venosa fue capaz de provocar o inducir cambios en el sistema de coagulación.

La cuenta Plaquetaria, el Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada, el Fibrinógeno y Dímero-D, son determinaciones que no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo que, no son útiles en la valoración o determinación de la activación del sistema de coagulación.

El Tiempo de Protrombina (TP), mostró en sus determinaciones diferencias estadísticamente significativas, por lo que, nos es útil como indicador de la activación del sistema de coagulación.

El Fragmento 1+2 de la Protrombina (F1+2), mostró ser un indicador más preciso y demostrativo de activación del sistema de coagulación, al obtener incremento importante en sus valores durante la aplicación del torniquete, mostrando diferencias estadísticamente significativas en sus determinaciones. Por lo que, es un mejor marcador bioquímico de activación del sistema de coagulación sanguínea en forma temprana.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Rogers JS. **Hypercoagulable state** W.V Med J 1993 Feb; 89(2): 61 a 63.
- 2.-Harrison, et al. **Principios de Medicina Interna**. 13ª. Edición, Ed. Interamericana. Vol. I 1994, Cap57 y 226.
- 3.-M.Cushman, MD, et al. **The hypercoagulable state** . Evaluation of Coagulation Disorders. Division of Vascular and Transplant Surgery MEDLINE 1999.
- 4.-W.J.Williams **HEMATOLOGIA** Tomo I y II Primera Edición. Editorial Salvat 1975 Capitulo 17 ; Pag: 1282 a 1291.
- 5.-Ronald Hoffman. **HEMATOLOGY Basic Principles and Practice** Segunda Edición 1995 . Capítulos: 100, 101 , 102 y 104 .
- 6.-Rubenstein and Federman **Scientific American Medicina**. Ed. Científica Médica Latinoamericana, 1993. Cap. VI Trastornos de la Hemostasia y Coagulación. Pag:VI-1 a VI-26
- 7.-Doyle MF. et al. **Meizothrombin : Active intermediate formed during prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin, in *Methods in Enzymology*, Part A**, edited by L Lorand, KG Mann, pp 299-312. Academic, San Diego, 1993.
- 8.-Pilger E, et al. **Etiology of deep venous thrombosis of the leg**. Acta Med Austriaca 1991; 18(3):68 a 72.
- 9.-Schmid-Schonbein H. **Fahraeus-effect-reversal (FER) in compaction (CS): microrheological and haemodynamic consequences of intravascular sedimentation of red cell aggregates**. Biorheology 1988; 25(1-2): 355 a 366.
- 10.-Mchedlishvili G, et al. **Microcirculatory stasis induced by hemorheological disorders: Further evidence**. Microcirculation 1999 Jun; 6(2): 97 a 106.
- 11.- Wu A, Mansfield AO. **The morphological changes of the endothelium to venous stasis as observed under the scanning electron microscope**. J.Cardiovasc Surg 1980 Mar-Apr;21(2):193 a 202.
- 12.-Nielsen HK. **Pathophysiology of venous thromboembolism** Semin Thromb Hemost 1991; 17 Suppl 3: 250 a 253.
- 13.-Metsarinne K, et al. **Effects of prolonged tourniquet ischaemia and short-term venous stasis on plasma endothelin-1 levels in man**. Scand J Clin Lab Invest 1995 May; 55(3): 251 a 256.
- 14.-Mammen EF. **Pathogenesis of venous thrombosis** Chest 1992 Dec; 102(6 suppl): 640S - 644S
- 15.-Gouin-Thibault Y, Samama MM. **Laboratory diagnosis of the thrombophilic state in cancer patients**. Semin Thromb Hemost 1999; 25 (2): 167 a 172.
- 16.-Rabiet et al. **Prothrombin fragment 1 x 2 x 3, a major product of prothrombin activation un human plasma**. J. Biol Chem 1986 Oct 5 ; 261(28) : 13210-5.

- 17.-Doyle MF, et al. **Multiple active forms of trombin. IV. Relative activities of meizothrombins** J. Biol Chem 1990; 265: 10693.
- 18.-Doyle MF, et al. **Meizothrombin: Active intermediate formed during prothrombinase catalyzed activation of prothrombin, in *Methods in Enzymology*, Part A, edited by L Lorand, KG Mann, Pag: 299 a 1312. Academic, San Diego, Cal. 1993.**
- 19.-Beutler, et al. **HEMATOLOGY Williams**, 5°. - Edición. Editorial Internacional, 1995. Cap. 121, 122, 124, y 126.
- 20.-Kapiotis S, et al. **Morning hypercoagulability and hypofibrinolysis. Diurnal variations in circulating activated factor VII, prothrombin fragment F1+2, and plasmin-plasmin inhibitor complex.** Circulation 1997 Jul 1; 96 (1): 117 a 122.
- 21.-Hursting MJ, et al. **Effects of age, race, sex, and smoking on prothrombin fragment 1.2 in a healthy population.** Clin Chem 1993 Apr; 39(4): 683 a 686.
- 22.-Nakagawa K, et al. **Evaluation of hypercoagulable state in patients with malignancies by using prothrombin fragment F1+2.** Rinsho Ketsueki, 1992 Nov; 33(11): 1666-1672.
- 23.-Hanzal E, et al. **Prothrombin fragment 1+2 plasma concentrations in patients with gynecologic malignancies.** Gynecol Oncol. 1993 Jun; 49(3): 373 a 376.
- 24.-Franco RF, et al. **The 20210 G →A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease.** Br. J Haematol 1999 Jan; 104 (1): 50 - 54.
- 25.-Klenerman L, et al. **Chances in haemostatic system after application of a tourniquet** Lancet 1899 May 7; 1 (8019): 970 a 972.
- 26.-Crews JC, et al. **Tourniquet pain: the response to the maintenance of tourniquet inflation on the upper extremity of volunteers.** Reg Anesth 1991 Nov-Dic; 16(6): 314 a 317.
- 27.-McGrath BJ, et al. **Venous embolization after deflation of lower extremity tourniquets** Anesth Analg 1994 Feb; 78(2): 349 a 352.