

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL MILITAR CENTRAL GÓMEZ ULLA



* 5 3 0 9 8 2 1 2 7 5 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C
ACTIVADA EN LOS ACCIDENTES
CEREBROVASCULARES

21.432

ALMUDENA HERNÁNDEZ NÚÑEZ
MADRID 1996

A mis padres y hermanos, que continúan siendo mi punto de apoyo más firme.

A mi sobrino Álvaro, que ha venido a alegrar mi vida de un modo que nunca pude imaginar.

A mi novio Antonio, mi mejor amigo y compañero.

Agradecimientos:

Al director de esta tesis, el Comandante médico Dr. José Luis Romero Barbero, del Servicio de Hematología del Hospital Militar Central Gómez Ulla, gran amigo y maestro, que ha sabido extraer de mi modesto quehacer un jugo que no sabía que existía.

Al Doctor Don Carlos Pérez de Oteyza, Profesor Titular de Medicina Interna de la Universidad Complutense de Madrid, que ha codirigido esta tesis, le agradezco el tiempo que ha dedicado a aconsejarme y el interés personal que se ha tomado, haciéndome confiar plenamente en sus criterios.

A mi novio Antonio y a mi hermano Miguel Ángel, quienes con gran cariño y paciencia han soportado mi torpeza ante el ordenador, y sin cuya ayuda nunca habría podido salir de mis constantes bloqueos.

Al Teniente Coronel médico Dr. Elías Marcos Herrero, jefe del Servicio de Hematología del Hospital Militar Central Gómez Ulla, y a todo el personal del citado Servicio, por su amabilidad y su ayuda cuando la he precisado.

INDICE

	PÁG
INTRODUCCIÓN	8
I. MECANISMOS DE CONTROL Y REGULACIÓN DE LA HEMOSTASIA	11
I.a. Antitrombina III (AT-III)	11
I.b. Proteína C-trombomodulina (PC-TM)	11
I.c. Proteína S (PS)	14
I.d. Prostaciclina	14
I.e. Sistema fibrinolítico	14
II. ESTADOS TROMBOFÍLICOS	15
II.a. Hipercoagulabilidad primaria	15
II.b. Hipercoagulabilidad secundaria	19
III. EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C	21
III.a. Sustratos para la PC activada (PCA)	21
III.b. La molécula de proteína C	22
III.c. Activación de la proteína C	22
III.d. La proteína S, cofactor de la PCA	22
III.e. Factor V y PS, cofactores sinérgicos de la PCA	23
IV. DEFECTOS EN EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C ASOCIADOS A	
TROMBOFILIA	24
IV.a. Déficit de proteína C	24
IV.b. Déficit de proteína S	24
IV.c. Resistencia a la proteína C activada (RPCA)	25

OBJETIVOS DEL TRABAJO	30
MATERIAL Y MÉTODO	33
1. MATERIAL: CONTROLES Y PACIENTES	34
1.1. Controles	34
1.2. Pacientes	35
1.3. Requisitos de inclusión	35
2. MÉTODO	37
2.1. Obtención de las muestras	37
2.2. Métodos utilizados para cada determinación	38
2.3. Aparatos	42
2.4. Análisis estadístico	42
RESULTADOS	51
Controles normales	52
Muestras congeladas	53
Estandarización y obtención del rango	54
RPCA en ACV y su relación con otras alteraciones	55
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	99

BIBLIOGRAFIA 102

ABREVIATURAS 116

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN:

Ya en el siglo pasado Virchow señalaba los tres factores principales en la patogenia de la trombosis: cambios en la pared vascular, anomalías del flujo sanguíneo y alteración de los factores circulantes que condicionan un estado de hipercoagulabilidad.

En condiciones normales la fluidez de la sangre queda asegurada por la integridad de la pared vascular y por la resistencia a las trombosis de la célula endotelial (1). La alteración de esta célula produce una activación de la hemostasia a través de la interacción entre el sistema de coagulación, las plaquetas y la pared vascular.

El mecanismo de coagulación consiste en una serie de reacciones proteolíticas, desencadenadas por el contacto entre sangre y células endoteliales, en las cuales unas proteínas o proenzimas se convierten en enzimas activas, cada una de las cuales activa a su vez a otra proenzima (2).

Esta activación se produce por la vía intrínseca, principalmente a través de los factores del sistema de contacto, o por la vía extrínseca a través del factor tisular, y conduce a la producción de trombina, que es el enzima encargado de la transformación del fibrinógeno en fibrina (componente fundamental del coágulo), y también es un potente estímulo para la activación plaquetar (Figura 1).

UIA INTRINSECA

UIA EXTRINSECA

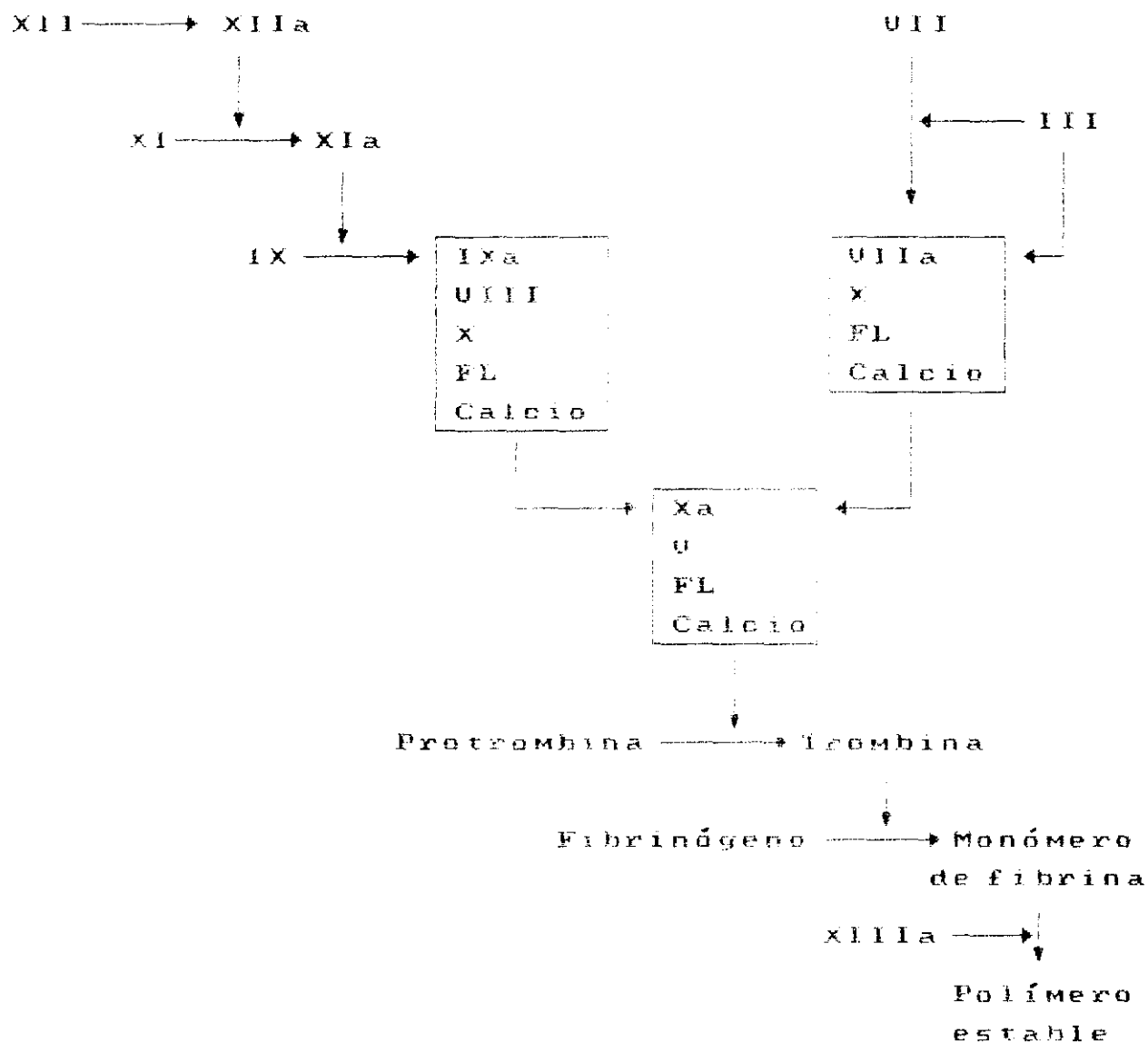


Figure 1. Cascada de la coagulación.
 Tomado de: Rutllant ML, & Artigas. Trastornos de la coagulación; Ed MCR Hoescht Ibérica; 1991; p18.

I. MECANISMOS DE CONTROL Y REGULACIÓN DE LA HEMOSTASIA:

Existen varios mecanismos anticoagulantes naturales que inhiben las acciones procoagulantes de la cascada de la coagulación actuando de forma local e intentando focalizar la formación del coágulo en el lugar preciso (Figura 2).

Estos mecanismos actúan "in vivo" interrelacionándose de forma compleja, requiriendo la presencia de endotelio intacto en las proximidades del trombo y estando la mayoría de ellos mediados por la trombina, que es un elemento fundamental (3). La Figura 3 recoge el mecanismo de acción de la trombina.

I.a. ANTITROMBINA III (AT-III):

La AT-III es un inhibidor de proteasas vitamino-k independiente que se sintetiza a nivel hepático y que neutraliza de forma reversible a los factores de la coagulación XII activado (XIIa), XIa, Xa, IXa y trombina, acción que se ve muy incrementada en presencia de heparina (4).

I.b. PROTEÍNA C-TROMBOMODULINA:

El endotelio vascular, excepto el del cerebro, contiene trombomodulina (TM), un cofactor endotelial que se une a la trombina activando a la proteína C (PC) (5).

La PC es una glicoproteína vitamino-k dependiente que se comporta como un anticoagulante fisiológico; una vez activada, la PC (PCA) ejerce su función anticoagulante inactivando a los factores de la coagulación Va y VIIIa y, posiblemente, estimulando la fibrinólisis (Figura 3).

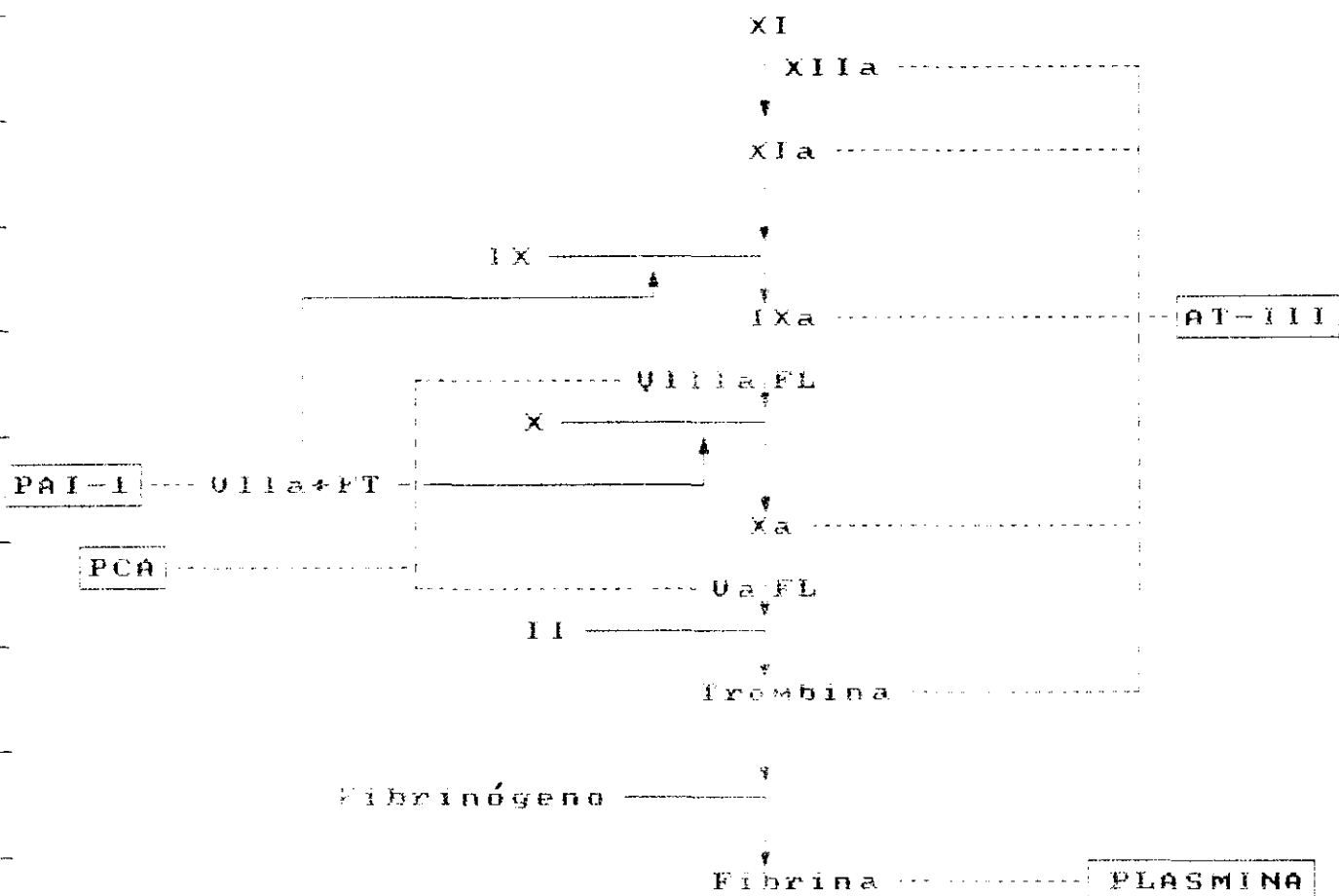


Figura 2. Sistemas anticoagulantes y control de la coagulación. Se muestra la interacción de cuatro sistemas: AT-III, PCA, PAI-1 y plasmina.

PCA= proteína C activada; AT-III= antitrombina III; PAI-1= inhibidor del activador tisular del plasminógeno; FL= fosfolípidos. Tomado de: Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. Ann Intern Med 1993; 119: 819-826 (p828).

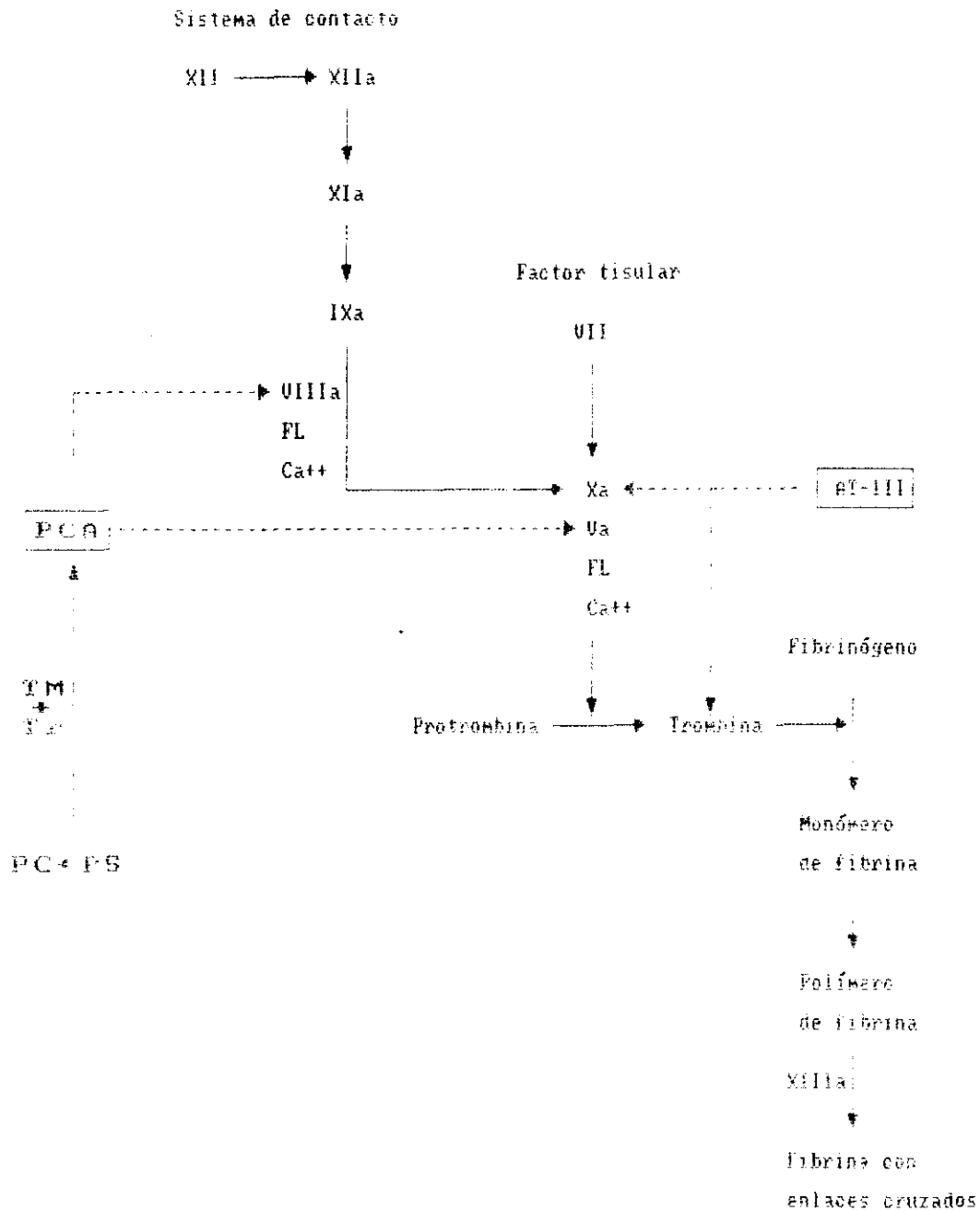


Figura 3. Sistema de la proteína C.

PC= proteína C; PS= proteína S; TM= trombonodulina; II= trombina; PC₂= proteína C activada; AT-III= antitrombina III; FL= fosfolípidos; Ca⁺⁺= calcio. Tomado de: Handin RI. Hemorragia y trombosis. En: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD et al. Harrison Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill, Inc: 1994; Vol 1: p375

I.c. PROTEINA S (PS):

La PS es otra proteína vitamino-k dependiente que sirve como cofactor de la expresión anticoagulante de la PCA, ya que es necesaria la unión de PC y PS para la inactivación de los factores Va y VIIIa (6).

I.d. PROSTACICLINA:

La prostaciclina es sintetizada por las células endoteliales en respuesta a estímulos como la producción de trombina, y actúa como un potente inhibidor plaquetario. Su síntesis permite localizar la formación del coágulo y previene un excesivo aporte de plaquetas en el mismo (7).

I.e. SISTEMA FIBRINOLÍTICO:

El sistema fibrinolítico es el encargado de eliminar la fibrina del lecho vascular, teniendo un papel muy importante en la defensa contra las trombosis. Para realizar esta función, el activador tisular del plasminógeno (t-PA) es liberado por el endotelio vascular convirtiendo el proenzima plasminógeno en el enzima activo plasmina, la cual degradaría la fibrina generando productos de degradación.

La actividad del t-PA está regulada por el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1), que es uno de los principales mecanismos de control de la fibrinólisis (8).

En este contexto tienen lugar los acontecimientos fisiopatológicos que caracterizan el estado hipercoagulable en el hombre, de tal forma que los mecanismos procoagulantes serían responsables de una continua generación de trombina a la cual se opondrían los mecanismos anticoagulantes naturales descritos (1).

II. ESTADOS TROMBOFÍLICOS:

El término trombofilia ha sido utilizado para describir los desórdenes familiares o adquiridos en el sistema hemostático que predisponen a la aparición de trombosis (9). La trombofilia es, pues, un estado hipercoagulable, es decir, la existencia de un predominio de los mecanismos procoagulantes sobre los anticoagulantes, lo cual trae como consecuencia la aparición de trombosis.

Los estados trombofílicos o hipercoagulables pueden clasificarse en dos grupos: hipercoagulabilidad primaria por afectación de los factores hemostáticos, e hipercoagulabilidad secundaria a ciertas situaciones clínicas que son predisponentes para el padecimiento de trombosis (5).

II.a. HIPERCOAGULABILIDAD PRIMARIA: se han propuesto varias clasificaciones, siendo la más sencilla la que divide a los estados trombofílicos primarios en congénitos y adquiridos (9):

II.a.1. ALTERACIONES CONGÉNITAS:

* Déficit de AT-III:

Es el prototipo de los estados trombofílicos congénitos. Se hereda de forma autosómica dominante, y su prevalencia en la población general es aproximadamente de 1/2000 a 1/5000. Los individuos heterocigóticos tienen niveles de actividad funcional de un 30 a 60% el valor normal, siendo el estado homocigótico incompatible con la vida. En este defecto se pueden observar tanto trombosis venosas (sobre todo) como arteriales (10).

*** Déficit del cofactor-II de la heparina:**

Este factor es un inhibidor de la trombina que actúa independientemente de la AT-III. Esto se ha visto en varios miembros de familias con historia de trombosis, sin que posteriormente se haya demostrado que exista una relación muy clara (11).

*** Déficit de proteína C y proteína S (PC y PS):**

Este sistema es un importante regulador de la fluidez sanguínea y de la prevención de la formación de trombos, sobre todo a nivel capilar. El déficit de estas proteínas se ha asociado con tromboembolismo recurrente. Las manifestaciones clínicas y el tipo de herencia son similares a las del déficit de AT-III.

El déficit heterocigótico suele presentarse con trombosis alrededor de los 30-40 años de edad y con historia familiar de estos desórdenes (1). En las fases iniciales del tratamiento con anticoagulantes orales se han descrito casos de necrosis cutáneas inducidas por cumarínicos, que se caracterizan por la aparición de microtrombos en los vasos de la piel y que suelen aparecer en extremidades, tronco o pecho, tras pocos días de comenzar la terapia (12, 13).

El déficit homocigótico de PC se presenta con trombosis masiva neonatal y púrpura fulminante en recién nacidos (14); estos casos presentan ausencia total de PC y son incompatibles con la vida.

*** Disfibrinogenemias:**

Generalmente las anomalías funcionales del fibrinógeno son asintomáticas o incluso se manifiestan por fenómenos hemorrágicos, pero un 10-18% de estas anomalías cursan con trombosis. En algunos casos la molécula anormal de fibrinógeno forma geles de fibrina rígidos, que son resistentes a la lisis dependiente de plasmina (15).

*** Patología de la fase de contacto:**

El déficit de factor XII (FXII) de la coagulación y de precalicreína puede conducir a la aparición de fenómenos trombóticos, aunque esta asociación no está del todo clara (16).

*** Patología del sistema fibrinolítico:**

Favorecen la aparición de trombosis todas aquellas situaciones en las cuales existe una menor degradación de fibrina, es decir, aquellas en las que no se lisaría un coágulo. Esto sucede en los casos de:

- Hipoplasminogenemia (anomalía cuantitativa) y displasminogenemia (anomalía cualitativa).
- Déficit de t-PA de carácter familiar, y cuyo responsable será probablemente una disfunción a nivel de las células endoteliales (17).
- Aumento del PAI-1, con lo que los coágulos formados no estarían abocados a una destrucción tan rápida como ocurre en condiciones normales; se encuentra en algunos casos de trombosis recurrentes (17).
- Aumento de la glicoproteína rica en histidina, proteína con afinidad moderada por el plasminógeno, al cual se une de manera irreversible, lo que se traduciría en un retraso de la fibrinólisis y una consecuente progresión a las trombosis, pero esta relación no está clara (18).

*** Homocistinuria:**

La homocistinuria produce una lesión vascular, con fibrosis y proliferación de células de músculo liso. Esto trae como consecuencia una elevada incidencia de trombosis arteriales recurrentes en individuos jóvenes, que es la principal causa de morbi-mortalidad en este cuadro, así como el desarrollo de esclerosis prematura a nivel periférico, cerebral y coronario (19).

II.a.2. ALTERACIONES ADQUIRIDAS:

* Síndrome antifosfolípido primario:

Es el prototipo del estado trombofílico adquirido. Los anticuerpos antifosfolípido (AAF) son un grupo de autoanticuerpos adquiridos espontáneamente, de los tipos IgG, IgM o IgA, dirigidos contra estructuras fosfolipídicas de las membranas celulares (20). Los podemos encontrar en distintas situaciones: enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas, neoplasias, embarazo y personas aparentemente sanas; inicialmente se describieron en pacientes con lupus eritematoso sistémico, que sigue siendo la enfermedad en la que se detectan con mayor frecuencia y a títulos más elevados (21,22).

Estas inmunoglobulinas dirigidas contra los fosfolípidos son responsables de la serología lúetica falsamente positiva (23), el anticoagulante lúpico (AL) (24), y la positividad, por técnicas de radioinmunoensayo (RIA) (25) o enzimoimmunoensayo (ELISA) (26), de los anticuerpos anticardiolipina (aCL) y contra otros fosfolípidos de carga negativa o neutra (27).

El AL es un AAF con actividad anticoagulante in vitro que actúa a nivel del complejo protrombínico de la coagulación sanguínea (24). Su detección se efectúa clásicamente mediante diversas técnicas coagulométricas (tiempo de cefalina, de caolín, etc) que ponen en evidencia indirectamente la presencia de anticuerpos contra la fracción fosfolipídica del complejo activador de la protrombina, ya que se manifiesta por la prolongación de estos tiempos de coagulación fosfolípido-dependientes (28).

En este síndrome pueden estar implicados la PC, la prostaciclina o anomalías en la fibrinólisis, aunque el verdadero mecanismo responsable de las trombosis es desconocido (29).

Bajo la denominación de síndrome antifosfolípido primario se engloba a ciertos pacientes, sobre todo jóvenes con trombosis venosas, infartos de miocardio o accidentes cerebrovasculares (30) sin factores de riesgo conocidos, y mujeres con abortos y muertes fetales de repetición de etiología no aclarada, en los cuales se objetiva la presencia de AAF como única alteración autoinmune destacable.

II.b. HIPERCOAGULABILIDAD SECUNDARIA:

II.b.1. ANOMALIAS DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS:

- * **Sepsis:** hay aumento del PAI-1 y del factor de necrosis tumoral (31).
- * **Neoplasias:** existe una activación de la coagulación con disminución de la fibrinólisis (especialmente a causa de un aumento de PAI-1) (32).
- * **Embarazo:** también se caracteriza por un aumento de la coagulación y una disminución de la fibrinólisis, en este caso en relación con el aumento de PAI-2 (inhibidor del activador del plasminógeno de origen placentario) (33).
- * **Cirugía mayor:** se produce una disminución de la actividad fibrinolítica ligada a una disminución de t-PA y a un aumento de PAI-1.
- * **Anticonceptivos orales:** originan una activación del sistema de coagulación semejante a la que se produce en el último trimestre del embarazo (34).
- * **Infusión de concentrados protrombínicos.**
- * **Síndrome nefrótico:** en este cuadro se produce déficit de AT-III, anomalías en la fibrinólisis e hiperactividad plaquetaria (35).

II.b.2. ANOMALÍAS PLAQUETARIAS: síndromes mieloproliferativos y hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), hiperlipemia, diabetes mellitus, trombopenia heparino-dependiente.

II.b.3. ANOMALÍAS VASCULARES Y REOLÓGICAS: estasis venoso (encamados, parapléjicos, ancianos, obesos), superficies artificiales, hiperviscosidad, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), síndrome hemolítico urémico (SHU) y vasculitis.

III. EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C:

La PC es una proteína plasmática vitamino-k dependiente que, después de su activación en las células endoteliales por el complejo trombina-trombomodulina, degrada selectivamente los factores de la coagulación V y VIII activados (Va y VIIIA); otra proteína vitamino-k dependiente, la PS, funciona como cofactor de la proteína C activada (PCA) (5,6). En individuos jóvenes y de mediana edad existe un riesgo incrementado de trombosis asociado al déficit heterocigótico de las proteínas C y/o S (1).

La larga vida media de la PCA y su especificidad por los factores Va y VIIIA son requisitos previos para que la PCA actúe como mecanismo anticoagulante in vivo; los factores V y VIII no activados constituyen, en cambio, un pobre sustrato para la PCA (36).

III.a. SUSTRATOS PARA LA PCA:

Como ya hemos dicho, los sustratos para la PCA son los factores de la coagulación Va y VIIIA. Los factores V y VIII son homólogos. Son glicoproteínas de alto peso molecular, siendo la concentración de factor V en el plasma unas 50 a 100 veces mayor que la de factor VIII (37). Ambos factores son sintetizados como precursores que no expresan propiedades procoagulantes; cuando se produce la activación de la cascada de la coagulación, estas dos proteínas son activadas de forma precoz por la trombina o por el factor Xa.

La PCA degrada específicamente a los factores Va y VIIIA, lo cual trae como consecuencia una acción anticoagulante.

III.b. LA MOLÉCULA DE PROTEÍNA C:

La PC es una enzima vitamino-k dependiente con propiedades anticoagulantes, papel que quedó rápidamente establecido desde su purificación y caracterización en 1976 por el profesor J. Stenflo en Suiza (38). Se sintetiza a nivel hepático y circula en el plasma a concentraciones de 3 a 5 mg/l. Su molécula está compuesta por múltiples módulos, teniendo uno de ellos interacción especial con la trombina (39).

III.c. ACTIVACION DE LA PC:

La trombomodulina (TM) es una proteína de membrana que se une a la trombina, por la cual tiene una gran afinidad. La trombina unida a la TM es al menos 20.000 veces más eficaz en la activación de la PC que la trombina libre (37).

Todas las células endoteliales expresan TM excepto las del cerebro. Debido a que el área de la superficie endotelial por unidad de sangre es mucho mayor en los capilares que en los grandes vasos, la concentración de TM en estos últimos es unas 1.000 veces menor que en la microcirculación. En los grandes vasos la trombina se encuentra en forma libre, pero cuando la sangre pasa a los capilares, la trombina queda expuesta a la TM y se une a ella, activando a la PC (36). Esta acumulación de trombina en la microcirculación podría ocasionar problemas de tipo trombótico, por lo que su modulación mediada por la TM, haciendo que ambas activen un sistema anticoagulante, es crucial.

III.d. LA PROTEÍNA S, COFACTOR DE LA PCA:

La PS es una proteína vitamino-k dependiente que, al contrario que otras proteínas de este grupo, no pertenece a la familia de las serinproteasas. Su concentración en el plasma es de unos 20 a 25 mg/l, de los cuales aproximadamente un 40% forma un complejo no covalente e

inactivo con la proteína de membrana C4B. La PS libre, la única forma activa, es la que actúa como cofactor de la PCA en la degradación de los factores Va y VIIIa, por lo que es esta forma libre el parámetro que aporta más información a la hora del diagnóstico de las enfermedades trombóticas (40).

La PS tiene una gran afinidad por los fosfolípidos con carga negativa; ello ocasiona la unión de la PCA a los fosfolípidos, y ambas proteínas forman un complejo en la superficie de plaquetas y células endoteliales (41). Aunque el mecanismo de acción de la PS no es del todo conocido, su importancia como anticoagulante queda demostrada por la relación existente entre el déficit de PS y la aparición de fenómenos trombóticos (1).

III.e. FACTOR V Y PS, COFACTORES SINÉRGICOS DE LA PCA:

Con el fin de determinar el potencial papel del FV como cofactor de la PCA, se han desarrollado una serie de estudios basados en la degradación del factor VIIIa usando componentes purificados (42). En este estudio se encontró que la PCA es un eficaz inhibidor del factor VIIIa sólo en presencia concomitante de FV y PS, ya que la PCA sola no inhibe la actividad del factor VIIIa, y la PS sola tiene un débil efecto sobre la inhibición del factor VIIIa mediada por PCA. Todo esto demuestra que la PS también es un pobre cofactor de la PCA en la degradación del FVa.

En presencia de una mezcla equimolar de PCA y PS, la adición de FV origina un aumento dosis-dependiente en la inhibición del factor VIIIa. Ello sugiere que el FV es un componente necesario para que la PS exprese su máxima actividad anticoagulante. La PCA en combinación con la PS demuestra ser menos potente en ausencia que en presencia del FV (37). Así pues, es necesaria la presencia tanto del FV como de la PS para que la PCA ejerza su función al máximo.

IV. DEFECTOS EN EL SISTEMA DE LA PC ASOCIADOS A TROMBOFILIA:

IV.a. DÉFICIT DE PC:

Como hemos mencionado anteriormente, el déficit de PC como un factor de riesgo asociado a trombosis se encuentra en un 2-5% de pacientes con enfermedad tromboembólica (43). En estos individuos los accidentes trombóticos suelen ocurrir antes de los 30-40 años de edad, lo que la convertía en un importante factor de riesgo. Actualmente ya no se considera un factor de riesgo de tanto peso, puesto que se ha manifestado como un defecto bastante común entre la población general, y se ha demostrado que la mayoría de los individuos afectados no presentan historia personal ni familiar de trombosis.

El déficit homocigótico sí origina enfermedad trombótica severa en todos los casos, pero el heterocigótico supone solamente un incremento del riesgo de 5 a 10 veces en relación con los individuos normales, lo cual ha sugerido que deben existir otros defectos genéticos asociados con el déficit de PC y que incrementan considerablemente el riesgo de trombosis.

Existen dos tipos de deficiencia de PC: el tipo I, con disminución tanto del nivel de PC como de su actividad funcional, y el tipo II, caracterizado por un defecto de PC solamente funcional.

IV.b. DÉFICIT DE PS:

El déficit de PS es menos frecuente que el de PC en la población general, aunque no se conoce exactamente su prevalencia. Así como el déficit de PC, el de PS tampoco explica un porcentaje demasiado grande de procesos trombofílicos.

Existen tres tipos de deficiencia de PS: el tipo I, en el que están disminuidas tanto la PS libre como la total; el tipo II, que consiste en un defecto funcional de la PS; y el tipo III, en el que únicamente hay

disminución de la PS libre, siendo la cantidad de PS total normal. Se han descrito casos de individuos que han sido clasificados erróneamente como portadores de un defecto tipo II cuando realmente tenían una resistencia a la PCA (RPCA), es decir, una escasa respuesta del plasma a la PCA; una explicación para esto podría ser la influencia de las distintas concentraciones de otros factores plasmáticos que pueden influir tanto en los niveles de RPCA como en los niveles de PS funcionante, ya que ambos defectos son causados por mutaciones puntuales con ciertas analogías (44,45).

IV.c. RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA (RPCA):

Como ya hemos citado anteriormente, el síndrome antifosfolípido primario supone la causa más frecuente de trombofilia de tipo adquirido. Del mismo modo, el déficit de AT-III era el prototipo de los trastornos de tipo congénito causante de hipercoagulabilidad. Este último aspecto cambió en el año 1993, en que Dahlbäck y colaboradores describieron el caso de un paciente joven con historia personal y familiar de fenómenos trombóticos de repetición de causa no filiada, en el que eran normales todos los parámetros medidos, y que presentaba una alteración en el sistema anticoagulante de la PC; dicha alteración consistía en una pobre respuesta del plasma a la PCA, trastorno que ha recibido el nombre de resistencia a la proteína C activada (RPCA) (46).

Cuando existe una RPCA, significa que el plasma es resistente a la PCA, con lo cual no se produce la inhibición de la cascada de la coagulación, por lo que esta situación es un factor de riesgo para el padecimiento de fenómenos trombóticos (47).

Este nuevo defecto está presente en la mayoría de los casos de trombofilia que antes eran de causa no filiada, explicando más del 40% de los mismos, con lo cual la RPCA se revela como el trastorno congénito más frecuente dentro de los responsables del síndrome de hipercoagulabilidad (47).

La importancia de la RPCA radica en su frecuencia, ya que el resto de los trastornos conocidos del sistema hemostático no son capaces de explicar todos juntos más de un 25-30% de los casos (48). Pero no solamente es una alteración destacable entre los pacientes que han sufrido un accidente trombótico, sino que su prevalencia entre la población normal (sin historia personal y/o familiar de trombofilia) asciende hasta un 2-7% según autores (49).

Tras una serie de estudios, se ha comprobado que la RPCA es un trastorno congénito que se hereda de forma autosómica dominante. El hecho de que la RPCA se corrigiese al añadir plasma normal al plasma problema hizo pensar que debía existir un factor anormal o defectivo en este último; este factor ha sido purificado, encontrándose que se trata del factor V (FV) de la coagulación (50, 51). Este hallazgo ha llevado a la conclusión de que la RPCA es la consecuencia de una alteración en el gen del FV, lo cual ha quedado demostrado en muchos casos de familias con trombofilia en las que la mayoría de los miembros con RPCA mostraban la llamada mutación del factor V Leiden (52, 53).

Antes de llegar a la conclusión de que el responsable era el FV de la coagulación, se propusieron y se fueron descartando otras teorías. Los diferentes puntos de vista consideraban que la pobre respuesta del plasma a la PCA podía deberse a cualquiera de los siguientes mecanismos (46):

- 1) Un autoanticuerpo dirigido contra la proteína C.
- 2) Una proteasa del plasma que inhibiese de forma rápida la PCA.

3) Una deficiencia de PS.

4) Alguna mutacion en los genes del FVIII o del FV de la coagulaci3n.

5) Un mecanismo desconocido.

Dado que la RPCA es un defecto cong3nito, era poco probable que se tratase de un inhibidor de inmunoglobulinas, es decir de un autoanticuerpo.

La presencia de un inhibidor en el plasma problema que actuase contra la PCA se excluy3 igualmente, ya que se vio que, al mezclar este plasma con plasma normal, la PCA del plasma normal no resultaba inhibida.

Tambi3n se demostr3 que no se trataba de una deficiencia de PS, puesto que esta 3ltima no siempre estaba presente en los casos de RPCA. Adem3s, al a3adir PS humana purificada al plasma con RPCA, 3sta no se corregia.

La 3ltima posibilidad era que se tratase de un defecto en el gen de los factores de la coagulaci3n VIII y/o V. Dado que la adici3n de FVIII al plasma con RPCA no corregia este defecto y la de FV s3 lo hac3a, parece claro que es una mutaci3n en el gen de este 3ltimo factor la responsable de este trastorno (46).

La mutaci3n del factor V Leiden consiste en una sustituci3n, en la posici3n 506 de la mol3cula del FV, del amino3cido arginina por glutamina (Arg506-Gln) (54, 55). El cambio origina la inactivaci3n del FV, y explica el riesgo tromb3tico, porque estas mol3culas de FV mutadas son resistentes a la PCA pero conservan su actividad procoagulante normal (56).

La mutaci3n del FV viene a explicar aproximadamente el 80% de los casos de RPCA, existiendo diferencias significativas en la supervivencia sin trombosis, as3 como en los niveles de RPCA, entre los

individuos que presentan la mutación y los que no, estando los homocigotos más severamente afectados que los heterocigotos. En un pequeño porcentaje de individuos con RPCA congénita no se encuentra la mutación del FV, lo cual sugiere que otros defectos genéticos aún desconocidos pueden también causar RPCA, y cuya asociación a la mutación del FV ocasionaría incluso una RPCA más marcada (52).

El estudio de la RPCA se realiza midiendo el cociente ("ratio") de TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activada o tiempo de cefalina) en presencia y en ausencia de PCA, considerándose que existe tal RPCA cuando se produce un alargamiento del TTPA en presencia de PCA (47). Dependiendo de los autores, en general se diagnostica una RPCA cuando el cociente de TTPA es menor de 2.0, aunque siempre es conveniente estandarizar el método de realización de la medición y establecer los valores de referencia a utilizar antes de llegar a una conclusión definitiva (57).

El hecho de que la RPCA se asociaba a un riesgo elevado en el padecimiento de trombosis venosa quedó claramente establecido desde el principio (58, 59), mientras que su papel en lo referente a la producción de trombosis arteriales ha tardado más en ser elucidado.

Desde el descubrimiento de este importante defecto genético, han sido muchos los estudios encaminados a determinar su incidencia entre las trombosis arteriales y a establecer su relación con ellas; dentro de este tipo de trombosis han destacado, por ser las más frecuentes, los accidentes cerebrovasculares (ACV). Los resultados a este respecto son muy heterogéneos, ya que mientras que algunos sí encuentran cierta asociación

entre los ACV y la RPCA, aunque con reservas (60), otros no hallan ninguna relación entre ellos (61).

Considerando la importancia y la frecuencia que tiene la RPCA y estando clara la necesidad de su introducción dentro de los protocolos de estudio de las trombofilias, sería conveniente que las investigaciones enfocadas a establecer su relación con las trombosis arteriales fuesen de mayor envergadura, ya que sería un importante marcador de riesgo de estos fenómenos para los pacientes que la presentasen.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVOS DEL TRABAJO:

El diagnóstico del estado hipercoagulable o trombofílico supone afirmar que existe un predominio de los mecanismos procoagulantes sobre los anticoagulantes que traen como consecuencia la aparición de fenómenos trombóticos. En este sentido, conviene descartar todas las posibilidades, es decir todas las alteraciones que podrían ser las responsables de esta situación.

Dada la relevancia del descubrimiento de la resistencia a la proteína C activada (RPCA), hemos considerado importante estudiar su prevalencia en la población normal y su incidencia entre los pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular (ACV). Para ello, hemos estudiado a un amplio grupo control y a un también nutrido grupo de pacientes con ACV.

Puesto que la relación de la RPCA con las trombosis venosas esta clara, nos hemos preguntado si también en las trombosis arteriales, concretamente en los ACV, la frecuencia de RPCA es mayor que en los individuos sanos.

Tampoco podemos olvidar que existen otras alteraciones del sistema hemostático que producen un estado de hipercoagulabilidad, aunque son menos frecuentes que la RPCA. Para comprobar si también en el grupo de ACV se produce este predominio de la RPCA, hemos incluido la determinación de proteínas anticoagulantes naturales (proteínas C y S, y antitrombina III), parámetros fibrinolíticos (plasminógeno, activador tisular del plasminógeno e inhibidor del activador tisular del plasminógeno),

anticuerpos antifosfolípido (anticuerpos anticardiolipina y anticoagulante lúpico) y lipoproteína a, estando esta última relacionada con los accidentes aterotrombóticos.

Por todo lo expuesto, en el presente trabajo se pretende:

1. Estandarizar el método de medida de la RPCA mediante un sistema coagulométrico automático y obtener el rango de referencia, buscando las posibles diferencias entre sexos, grupos de edad y tiempo de congelación de las muestras.

2. Determinar la incidencia de RPCA en los pacientes con ACV, comparándola con su prevalencia entre la población normal, y establecer si su frecuencia es mayor o no que la de otras alteraciones del sistema hemostático.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO:

1. MATERIAL: CONTROLES Y PACIENTES.

1.1. Controles:

Se estudian un total de 433 muestras sanguíneas, las cuales se distribuyen en tres grupos:

1.1.1. Un primer grupo de 249 muestras de individuos sanos, 135 varones y 114 mujeres, de edades comprendidas entre los 15 y 87 años (media de 46,37 años); de ellos, 44 menores de 20 años, 53 entre 21 y 35 años, 53 de 36 a 50 años, 51 entre 51 y 65 años y 48 mayores de 66 años (Tablas nº 1 y nº 2). Este grupo sirvió para comparar las diferencias de RPCA existentes entre ambos sexos, así como las posibles variaciones de la misma con la edad.

1.1.2. En un segundo grupo de 50 controles sanos, las determinaciones de RPCA se realizaron tanto en las muestras recién extraídas como después de su conservación por congelación. Este grupo fue el utilizado para comprobar la influencia que sobre los valores de RPCA pueda tener el tiempo de congelación de la muestra en estudio.

1.1.3. Un tercer grupo de 134 muestras muestras congeladas normales, que es el que se utilizó para estandarizar el método de medición de RPCA y calcular el rango de referencia.

La Gráfica 1 recoge los tres grupos de controles utilizados en el estudio.

1.2. Pacientes:

Este grupo estaba formado por 160 muestras de pacientes con accidente cerebrovascular (ACV); en este grupo 84 eran varones y 76 mujeres. La edad media de este grupo fue de 72,25 años, siendo las edades límite 19 y 94 años (Tabla nº 3). En este grupo se determinó la incidencia de RPCA así como su relación con otras alteraciones del sistema hemostático.

1.3. Requisitos de inclusión:

1.3.1. Controles:

1.3.1.1. Para el primer grupo de controles se seleccionaron muestras con estudio rutinario de hemostasia normal (recuento de plaquetas, TP, TTPA y fibrinógeno) y sin antecedentes de trombosis venosa o arterial.

1.3.1.2. El segundo grupo de control correspondía a individuos sanos, con estudio de hemostasia y rango de RPCA normal y carentes de antecedentes patológicos de origen vascular.

1.3.1.3. El tercer grupo era el de controles normales congelados, y los requisitos de inclusión eran los mismos que para el primer grupo, es decir, estudio rutinario de hemostasia normal y ausencia de antecedentes de fenómenos trombóticos.

1.3.2. Pacientes:

En el cuarto grupo, el grupo de pacientes con ACV, las muestras se extrajeron en las primeras 72 horas después del ingreso y antes de

recibir cualquier tratamiento anticoagulante y/o antiagregante, siendo necesario para su inclusión tener un TTPA dentro de la normalidad.

2. MÉTODO:

2.1. Obtención de las muestras:

2.1.1. Las muestras del primer grupo son plasma citratado de estudios rutinarios de hemostasia (citrato sódico al 3,8% en proporción 10:1), las cuales se procesaron en las cuatro primeras horas después de su extracción, determinándose en todas ellas TP, TTPA, fibrinógeno y la RPCA.

2.1.2. En el segundo grupo de control, las muestras de sangre se extrajeron por venopunción, recogiendo sobre citrato sódico al 3,8% en proporción 10:1. En ellas se realizó la determinación de TP, TTPA, fibrinógeno y RPCA en las primeras cuatro horas, conservando el resto del plasma pobre en plaquetas congelado a -40 C en alícuotas, repitiendo la determinación de la RPCA a los 7 y 14 días después de la extracción, previa descongelación a 37 C durante 10 minutos.

2.1.3. El tercer grupo de controles normales las muestras se anticoagularon con citrato sódico al 3,8%, y se conservaron congeladas un periodo superior a 7 días e inferior a 14; tras la descongelación a 37 C, se determinaron los valores de TP, TTPA, fibrinógeno y RPCA.

2.1.4. En el grupo de pacientes, cada muestra de plasma citratado se dividió en alícuotas, conservándose a -40 C, y se realizó un estudio de hipercoagulabilidad biológica en el que se incluyeron: TP, TTPA, niveles de fibrinógeno, plasminógeno, activador tisular del plasminógeno (t-PA), inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1), antitrombina III (AT-III), proteína C (PC), proteína S (PS), anticuerpos anticardiolipina

(aCl), anticoagulante lúpico (AL), lipoproteína a (Lpa) y RPCA (Tabla nº 4).

2.2. Métodos utilizados para cada determinación:

2.2.1. Resistencia a la proteína C activada (RPCA):

La determinación de la RPCA se realizó mediante el método coagulométrico (COATEST APC resistance. Chromogenix AB, Taljegardsgatan 3, S-431 53 Mölndal, Sweden). El plasma se incubó con el reactivo de TTPA durante un determinado período de tiempo; la coagulación se activa por la adición de cloruro cálcico (CaCl₂) en ausencia y en presencia de proteína C activada (PCA), determinándose el tiempo de formación del coágulo en cada caso.

1º/ REACTIVOS:

- CaCl₂, 0.025 moles/litro.
- Reactivos de TTPA: fosfolípidos purificados como activador de contacto.
- PCA liofilizada con CaCl₂ (PCA/CaCl₂): la combinación se deja a temperatura ambiente durante 20 minutos y se mezcla suavemente antes de realizar la medición.

2º/ PROCEDIMIENTO:

- 1) Todos los reactivos deben someterse a temperatura ambiente antes de ser usados.
- 2) Precalentar un volumen suficiente de CaCl₂ y PCA/CaCl₂ a 37±0.5 C.
- 3) Añadir un volumen de plasma en una cubeta y después añadir un volumen igual de reactivo TTPA. Se incuba a 37 C durante 5 minutos.
- 4) Añadir un volumen de CaCl₂ , momento en que comienza la formación del coágulo. Se anota dicho tiempo de formación.

5) Se realiza un segundo análisis del plasma cambiando el CaCl_2 por PCA/ CaCl_2 , y se anota nuevamente el tiempo de formación del coágulo.

39/ RESULTADO DE LA PRUEBA:

El resultado se expresa en forma de cociente ("ratio") del TTPA en presencia y en ausencia de PCA, es decir, cociente de TTPA con PCA/ CaCl_2 /TTPA con CaCl_2 . La RPCA se diagnostica cuando el ratio es igual o inferior al de referencia (según la calibración) (57).

40/ ESPECIFICIDAD Y FACTORES DE INTERFERENCIA:

El TTPA debe estar dentro del rango normal. Los plasmas que presenten TTPA prolongados asociados a deficiencias de factores de la coagulación intrínseca o a la presencia de anticoagulante lúpico, no permiten llegar a una conclusión aceptable sobre la influencia de la adición de PCA a los mismos. Los individuos que se someten a la determinación tampoco deben estar en tratamiento con heparina o con antagonistas de la vitamina k; en última instancia y si es necesario hacerlo de todos modos, el tratamiento debe suspenderse durante una semana aproximadamente, hasta que los valores de TP (tiempo de protrombina) se restablezcan, momento que será el adecuado para hacer el test.

Del mismo modo que todas las técnicas de medición basadas en el TTPA, hay que tener cuidado de evitar la activación de la fase de contacto de las muestras, ya que ésto puede causar la activación de los factores V y VIII. Por razones similares es importante evitar la contaminación de plaquetas en el plasma decantado tras la centrifugación (57).

50/ AUTOMATIZACIÓN: PROTOCOLO PARA AUTOANALIZADOR STA:

En las tablas nº 5 y nº 6 se muestra la metódica utilizada en el coagulómetro STA empleado.

2.2.2. Parámetros fibrinolíticos:

A. Plasminógeno:

La determinación de los niveles de plasminógeno se hizo siguiendo el método amidolítico utilizando sustratos cromogénicos (STACHROM PLG, Referencia 00907. Laboratorios DIAGNOSTICA STAGO), y los resultados se expresan en tantos por ciento.

B. Activador tisular del plasminógeno (t-PA):

La determinación del t-PA se realizó mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) (Biopool TintElize tPA). Los resultados se expresan en ng/ml.

C. Inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1):

La cuantificación de este inhibidor se realizó mediante técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) (Biopool TintElize PAI-1), expresándose los resultados en ng/ml.

2.2.3. Proteínas anticoagulantes naturales:

A. Antitrombina III (AT-III):

Determinación colorimétrica (sustratos cromogénicos) en el analizador STA con reactivos STA Antitrombina III. Referencia 1 447 173. Laboratorios DIAGNOSTICA STAGO. 1994. Los valores de AT-III se expresaron en tantos por ciento.

B. Proteína C (PC):

Cuantificación funcional coagulométrica con STA (Proteína C clotting. Referencia 1 447 084. Laboratorios DIAGNOSTICA STAGO. 1993). Los resultados se expresaron en tantos por ciento.

C. Proteína S (PS):

Dosificación de PS funcional por método coagulométrico con STA Proteína S clotting. Referencia 1 447 076. Laboratorios DIAGNOSTICA STAGO. 1993, y los resultados se expresaron también en tantos por ciento.

2.2.4. Anticuerpos antifosfolípido (AAF):

A. Anticuerpos anticardiolipina (aCl):

La determinación de los aCl tipo IgG e IgM se realizó mediante técnica de ELISA. Los resultados de las muestras se expresan en unidades GPL (para la IgG) y MPL (para la IgM), es decir, unidades/ml (KIT-ELISA. MENARINI DIAGNÓSTICOS SA).

B. Anticoagulante lúpico (AL):

El inhibidor o anticoagulante lúpico se determina a través de la realización de:

a) El test del veneno de víbora de Russel (DVV test AMERICAN DIAGNOSTICA INC.).

b) La prueba de inhibición de tromboplastina (TTI) o prueba con tromboplastina diluída (Schleider y cols.).

2.2.5. Lipoproteína a (Lpa):

La determinación de la Lpa como factor de riesgo aterogénico se realizó mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) (Biopool TintElize Lpa), expresandose los resultados en mg/l.

En la tabla nº 7 se recogen todos los parámetros estudiados y los métodos utilizados para determinar cada uno de ellos.

2.3. Aparatos:

2.3.1. Las técnicas coagulométricas y colorimétricas con sustratos cromogénicos se realizaron con un coagulómetro automático: BM/STAGO COAGULATION ANALYZER STA, versión V2.1b, de BOEHRINGER MANHEIM.

2.3.2. Las determinaciones por técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) se efectuaron en un sistema automático de AUTOPLATE SOFTWARE (HEMOSTASIA), de MENARINI DIAGNOSTICS.

2.4. Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó por ordenador, utilizando la hoja de cálculo "QUATRO-PRO". El nivel de significación estadística empleado fue de $p < 0,001$.

Para comparar las diferencias entre las medias de RPCA de ambos sexos, se utilizó el criterio t de Student. La comparación entre los cinco grupos de edades se hizo por ANOVA, método estadístico que se emplea cuando se comparan las medias de más de dos grupos entre sí.

Las diferencias según el tiempo de congelación se midieron utilizando la "t-pareada", método utilizado para la comparación de muestras "antes-después".

Para comparar los porcentajes de RPCA positiva y negativa en los ACV se utilizó la Chi-cuadrado para muestras independientes. También se utilizó para comparar las alteraciones de otros parámetros del sistema hemostático entre los grupos con y sin RPCA.

La relación entre RPCA y el resto de los parámetros se estableció calculando el índice de correlación de Pearson (62, 63).

Tabla n. 1. Controles normales distribuidos por sexos.

	NÚMERO DE CASOS	RANGO DE EDAD	EDAD MEDIA
TOTAL	249	15-87	46,37
VARONES	135	17-87	49,10
MUJERES	114	15-84	45,20

Tabla n.2. Controles normales distribuidos por edades .

RANGO DE EDAD	NUMERO DE CASOS	EDAD MEDIA
< 20	44	17,6
21-35	53	30,5
36-50	53	42,8
51-65	<u>51</u>	59,2
> 66	48	80,6

Graf.1: Grupos de control

433 individuos sanos

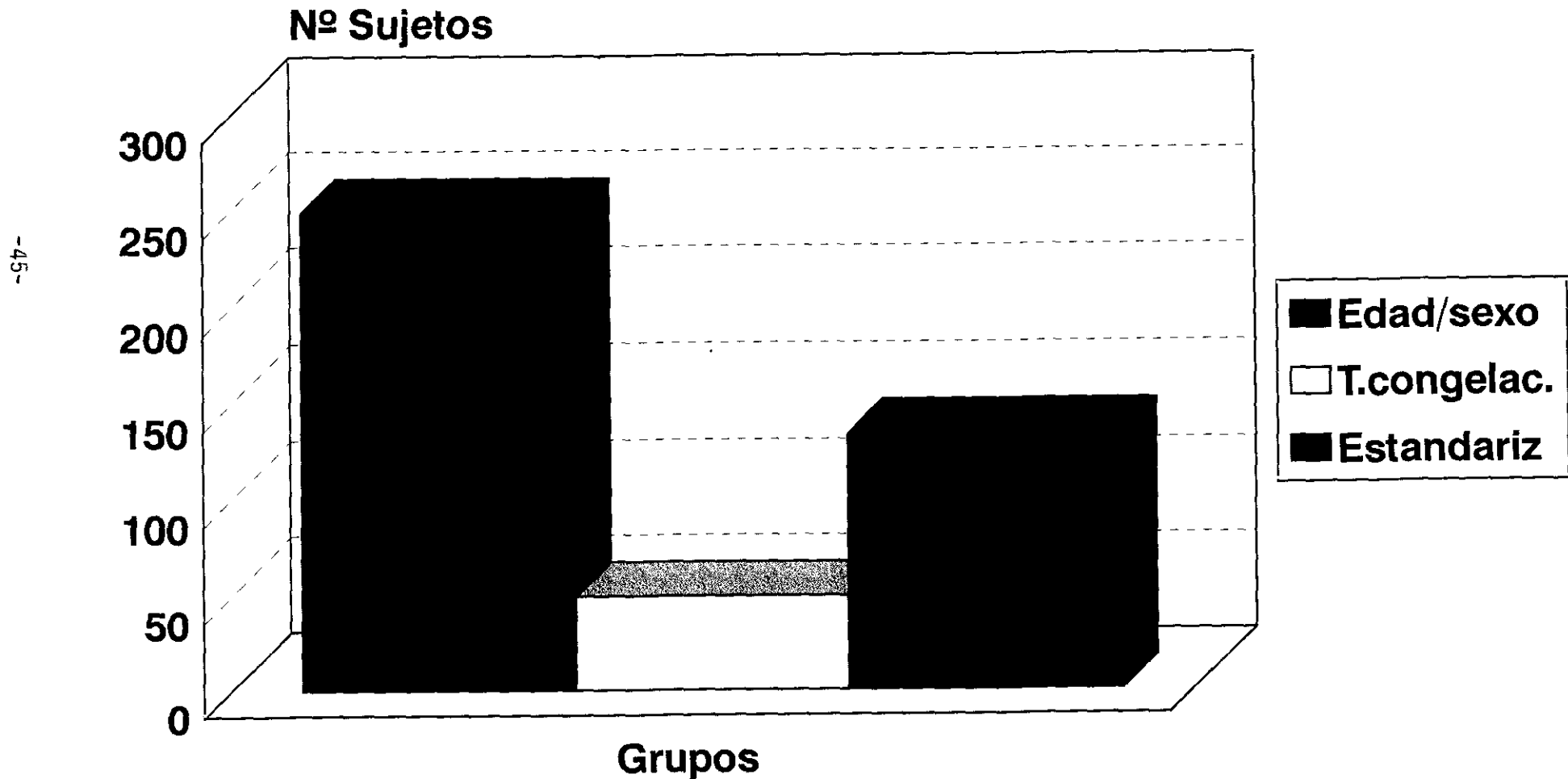


Tabla n.3. Pacientes con ACU.

	NUMERO DE CASOS	RANGO DE EDAD	EDAD MEDIA
TOTAL	160	19-94	72,25
VARONES	84	19-91	71,22
MUJERES	76	20-94	73,26

Tabla n.4. Parámetros hemostáticos valorados en los pacientes con ACU.

PARAMETROS FIBRINOLITICOS	PROTEINAS ANTICOAGULANTES NATURALES	ANTICUERPOS ANTIPOSLITICO (AAF)	FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR	TRASTORNOS CONGENITOS
Plasminógeno	AT-III	aCl	Lpa	RPCA
t-Pa	PC	AL		
FBI-1	PS			

Tabla n. 5. Metodica utilizada en el coagulometro STA para la determinación de RPC normal.

CONFIGURACION TEST

Identificación									
Abreviación	Nombre				Método			Fecha	
PCA N	RESISTECIA PC NORMAL				coagulativo			09/07/1996	
Muestra			Diluyente						
Volumen	incub.	Dil.	ID	Nombre			Vial	Estab.	Vol. Mínimo
50 µl	0 seg	1/1	11078	Diluent Buffer			50 ml	120 h	3.50 ml
Reactivos									
ID	Nombre		Incub	Vol.	Vial	Estb	Vol. Mínimo	Lavado	
Ra PCA1	PCA PTT		300	50	5	8	0.00	no	normal
Rb									
Rc									
Rd PCA2	CL2CA N			50	5	8	0.00	no	normal
Análisis			Resultado				Validación (seg)		
En Serie	no	Unidad Principal			seg	Prefijo		Mín.	Máx.
Tiempo Mín.	20	Factor corrección			1.000	ESTANDAR		20.00	50.00
Tiempo Máx.	90	Simple/Duplicado			duplic				
Tiempo Medio	45	Precisión			10.0 %				
Rd Atemperado	si	Criterios Redil.			(seg)				
Agitador	no	<							
Tipo Coágulo	normal	>							

CONFIGURACION TEST

PCA N: RESISTECIA PC NORMAL

Impresión / Transmisión					Valores normales (seg)		
Unidad	Factor Conver.	Impres.	Transmisión Código Test		Mín.	Máx.	
Principal	seg		si	0	ESTANDAR	60.00	150.00
Aux. 1							
Aux. 2							
Aux. 3							
Límites de Impresión			Mín.	0.00 seg			
			Máx.	200.00			
Control de Calidad				Período	Vial	Estab	Vol. Mínimo
ID	Clave	Nombre		h	ml	h	(ml)
Nivel 1	POOL	CONTROL I		4	2	8	0.30
Nivel 2							
Nivel 3							

Tabla n. 6. Metodica utilizada en el coagulometro STA para la determinación de RPCA.

CONFIGURACION TEST

Identificación									
Abreviación	Nombre				Método			Fecha	
PCA A	RESISTENCIA PC ACTIVADA				coagulativo			09/07/1996	
Muestra		Dil.		Diluyente					
Volumen	incub.	Dil.	ID	Nombre		Vial	Estab.	Vol. Mínimo	
50 µl	0 seg	1/1	11078	Diluent Buffer		50 ml	120 h	3.50 ml	
Reactivos									
ID	Nombre		Incub	Vol.	Vial	Estb	Vol. Mínimo	Lavado	
Ra PCA1	PCA PTT		seg.	µl	ml	h	(ml)	Antes	Después
Rb									
Rc									
Rd PCA3	CL2CA PCA			50	5	8	0.00	no	normal
Análisis			Resultado			Validación (seg)			
En Serie	no	Unidad Principal			seg	Prefijo		Mín.	Máx.
Tiempo Mín.	30	Factor corrección			1.000	ESTANDAR		50.00	150.00
Tiempo Máx.	150	Simple/Duplicado			duplic				
Tiempo Medio	90	Precisión			10.0 %				
Rd Atemperado	si	Criterios Redil.			(seg)				
Agitador	no	<							
Tipo Coágulo	normal	>							

CONFIGURACION TEST

PCA A: RESISTENCIA PC ACTIVADA

Impresión / Transmisión					Valores normales (seg)		
Unidad	Factor Conver.	Impres.	Transmisión	Código Test	Mín.	Máx.	
Principal	seg		si	0	ESTANDAR	25.00 150.00	
Aux. 1							
Aux. 2							
Aux. 3							
Límites de Impresión			Mín.	0.00 seg			
			Máx.	200.00			
Control de Calidad				Período	Vial	Estab	Vol. Mínimo
ID	Clave	Nombre		h	ml	h	(ml)
Nivel 1	POOL	CONTROL I		4	2	8	0.30
Nivel 2							
Nivel 3							

Tabla n.7. Parámetros estudiados y métodos de medida empleados.

PARAMETRO	TEST DE MEDICION
RPCA	Coagulométrico
Plasminógeno	Cromogénico
t-PA	ELISA
PAI-1	ELISA
AT-III	Cromogénico
PC	Coagulométrico
PS	Coagulométrico
aCl	ELISA
AL	Coagulométrico
Lpa	ELISA

RPCA= resistencia a la proteína C activada. t-PA= activador tisular del plasminógeno. PAI-1= inhibidor del activador tisular del plasminógeno. AT-III= antitrombina-III. PC= proteína C. PS= proteína S. aCl= anticuerpos anticardiolipina. AL= anticoagulante lúpico. Lpa= lipoproteína a. ELISA= enzoinmunoensayo.

RESULTADOS

RESULTADOS:

Controles normales:

El primer grupo de 249 controles normales se empleó para determinar las variaciones de los valores de RPCA según el sexo y la edad.

1) En la tabla nº 8 se recogen los valores de medias y desviaciones estándar obtenidos en cada grupo según fueran varones o mujeres. La media de RPCA en el grupo de 135 varones fue de 2,62 con una desviación estándar (D.E.) de 0,35, y en el grupo de las 114 mujeres la media y D.E. fueron de 2,57 y 0,33, respectivamente. El análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas en los valores de RPCA entre ambos grupos.

2) En la tabla nº 9 se comparan los valores de RPCA por edades. Del total de 249 controles, teníamos: 44 menores de 20 años de edad, en los cuales la media de RPCA era de 2,62 y la D.E. de 0,34; 53 individuos entre 21 y 35 años con media de 2,61 y D.E. de 0,35; 53 entre 36 y 50 años, cuya media era de 2,61 y D.E. de 0,35; 51 casos entre 51 y 65 años, en los que la media era de 2,64 y la D.E. de 0,36; y un último subgrupo de 48 controles de edad superior a los 66 años, en el cual la media y la D.E. fueron, respectivamente, 2,62 y 0,36. Las diferencias encontradas en este caso comparando todos los grupos entre sí tampoco son estadísticamente significativas.

La Gráfica 2 recoge las medias y desviaciones estándar obtenidas en los cinco grupos de edades mostrando, igual que la tabla nº 9, que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos (ANOVA).

Muestras congeladas:

El segundo grupo de 50 controles sanos se utilizó para observar las diferencias que sobre los valores de RPCA inducía el tiempo de congelación de las muestras en las que se determinaba.

3) En la tabla nº 10 se comparan los valores de RPCA en los 50 controles según la determinación haya sido en fresco o tras una y dos semanas de congelación. En fresco obtuvimos una media de RPCA de 2,61 y una D.E. de 0,30; tras la primera semana de congelación de las muestras encontramos una media de 1,90 y una D.E. de 0,22; y al cabo de las dos semanas, la media fue de 1,93 y la D.E. de 0,23. A la vista de los resultados, se aprecian diferencias significativas en los valores de RPCA, siendo mayores tanto la media como la desviación estándar cuando la determinación se hace en fresco que cuando se hace sobre muestras congeladas.

4) La tabla nº 11 recoge el resultado del análisis estadístico realizado comparando dos a dos los valores de RPCA obtenidos en cada situación. Encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos los valores de RPCA en fresco y tras una y dos semanas de congelación; en cambio, las diferencias no son significativas según el tiempo de congelación, es decir, no existen cuando se comparan los valores de RPCA obtenidos tras una y dos semanas de congelación de las muestras.

La Gráfica 3 recoge las medias y desviaciones estándar de los valores de RPCA en muestras en fresco y en muestras congeladas, mostrando las mismas diferencias que la tabla nº 11 ("t-pareada").

5) En la tabla nº 12 se expresan los valores de TTPA en ausencia y en presencia de PCA en cada situación. En las determinaciones en fresco, el TTPA en ausencia de PCA tenía un valor medio de 35,06 (D.E. 3,51), siendo éste de 92,22 (D.E. 16,95) en presencia de PCA; tras una semana de congelación, el TTPA en ausencia y en presencia de PCA tenía una media de 34,99 (D.E. 3,38) y 68,70 (D.E. 15,04), respectivamente; y, tras congelar las muestras durante dos semanas, la media del TTPA en ausencia de PCA fue de 36,32 (D.E. 3,59), y en presencia de PCA fue de 70,52 (D.E. 12,37). Observamos pues que las diferencias obtenidas en el cociente de TTPA, es decir, en los valores de RPCA, se deben a que el TTPA en presencia de PCA disminuye con la congelación, mientras que el TTPA en ausencia de PCA apenas se modifica.

Estandarización y obtención del rango:

Para obtener el rango normal de referencia de RPCA y estandarizar el método de medida de la misma, se utilizó el grupo de 134 muestras congeladas normales, realizándose la determinación con el método coagulométrico STA.

6) La tabla nº 13 recoge la media, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.) de los valores de TTPA en ausencia y en presencia de PCA y del cociente (RPCA). La media de TTPA en ausencia de PCA en las 134 muestras normales congeladas fue de 32,6, su D.E. de 2,20 y su C.V. de 6,72; en cuanto al TTPA en presencia de PCA, la media fue de 81,8, la D.E. de 10 y el C.V. de 12,20; la media y la D.E. del cociente de TTPA, es decir, de RPCA, fueron de 2,28 y de 0,19, respectivamente. Estos valores sirvieron para calcular el rango normal de RPCA que debe tomarse como referencia cuando se utilice el método coagulométrico STA.

El rango normal se determina con los valores de la media + 2D.E. De este modo, se obtiene que el rango de referencia a utilizar es 1,90-2,66.

Por tanto, se considera que existe una RPCA cuando el valor del cociente se encuentra por debajo de 1,90.

7) En las tablas números 14 a 17 figuran las medias diarias, los coeficientes de variación y la gráfica de acumulación diaria y mensual de la RPC normal y de la RPCA (sin y con calcio).

RPCA en ACV y su relación con otras alteraciones:

El grupo de los 160 pacientes con ACV se utilizó para estudiar la incidencia de RPCA y de otras alteraciones del sistema hemostático en estos pacientes, así como determinar si existía alguna asociación entre ellas.

8) La tabla nº 18 expresa en porcentaje la incidencia de RPCA en los pacientes con ACV, comparándola con la prevalencia en la población normal, tanto en el total de los mismos como separados por sexos. Globalmente encontramos que había una RPCA en un 18,13% de pacientes con ACV; en el grupo de 84 varones, la RPCA existía en el 16,67% de ellos, y en el grupo de mujeres (76 casos) se encontraba en el 19,74% de los casos. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, igual que ocurría con los controles normales, aunque la RPCA parece ser algo más frecuente entre las mujeres con ACV que entre los varones con esta patología.

En cuanto a la prevalencia de RPCA en la población normal, encontramos que es de un 2,81% (n=249), siendo de 2,23% para los varones (n=135) y de 3,5% para las mujeres (n=114). Existen diferencias

estadísticamente significativas entre los pacientes con ACV y los controles normales, siendo mayor la frecuencia de PPCA en aquellos.

La Gráfica 4 presenta las diferencias entre la incidencia de RPCA en el grupo de 160 ACV y su prevalencia en el grupo de 249 controles sanos.

9) La tabla nº 19 recoge la incidencia de otras anomalías del sistema hemostático en el grupo total y en varones y mujeres por separado. Las incidencias de estas otras anomalías responsables de fenómenos tromboembólicos encontradas en estos 160 pacientes fueron las siguientes: déficit de proteína C (PC) en 24 individuos (15% del total); déficit de proteína S (PS) en 28 casos (17,5%); déficit de antitrombina III (AT-III) en 6 (3,75%); déficit de plasminógeno en 9 (5,63%); déficit de activador tisular del plasminógeno (t-PA) en ningún caso (0%); aumento de los niveles de activador tisular del plasminógeno (PAI-1) en 6 ACV (3,75%); positividad para anticuerpos anticardiolipina (aCl) IgG y/o IgM en 11 individuos (6,88% de los casos); positividad del anticoagulante lúpico (AL) en 14 (8,75%); y elevación de los niveles de lipoproteína a (Lpa) en 14 pacientes (8,75% del total).

Al comparar la incidencia de los distintos trastornos entre ambos sexos, encontramos que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al déficit de AT-III, déficit de t-PA, aumento de PAI-1 y positividad para aCl. En cuanto al resto de parámetros, sí existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos: son más frecuentes en los varones los déficits de PC y plasminógeno, la positividad de AL y el aumento en los niveles de Lpa; en cambio, el déficit de PS es significativamente mayor en el grupo de las mujeres.

10) La tabla nº 20 y la Gráfica 5 recogen la incidencia en porcentaje de las distintas alteraciones estudiadas del sistema

hemostático según exista o no RPCA, respectivamente. Del total de pacientes con ACV, tienen RPCA 29 de ellos, en los cuales encontramos las siguientes incidencias de las otras alteraciones estudiadas: déficit de PC en 13,8% de ellos; 34,5% con déficit de PS; ningún caso con RPCA que además tuviese déficit de AT-III, déficit de plasminógeno o déficit de t-PA; aumento de los niveles de PAI-1 en el 13,8%; positividad de aCl en 6,9%; AL positivo en otro 6,9% de los casos; y elevación de Lpa en el 65,51% de los pacientes con ACV y RPCA.

El resto de los pacientes con ACV, es decir, un total de 131, no presentan RPCA. En este grupo encontramos que existía: déficit de PC en el 15,27% de ellos; déficit de PS en el 13,74%; déficit de AT-III en un 4,58% de casos; déficit de plasminógeno en un 6,87%; ningún caso tampoco en este grupo de déficit de t-PA; aumento de los niveles de PAI-1 en el 1,53%; aCl positivos en el 6,87% de casos; AL positivo en un 9,16%; y aumento de Lpa por encima de lo normal en un 39,7% de casos de ACV sin RPCA.

No existe correlación positiva o negativa entre la existencia o no de RPCA y otros defectos. Sin embargo, sí se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de algunas alteraciones entre el grupo de ACV con RPCA y el grupo de ACV sin RPCA: en los pacientes con RPCA es mayor la frecuencia de déficit de PS, aumento de PAI-1 y elevación de los niveles de Lpa. En cambio, la incidencia de los déficits de AT-III y plasminógeno es significativamente mayor en el grupo de ACV sin RPCA. El déficit de PC y la positividad para aCl y AL han mostrado una incidencia similar en los dos grupos de pacientes. No se ha constatado ningún caso de déficit de t-PA en los ACV estudiados.

11) La tabla nº 21 y la Gráfica 6 recogen todos los parámetros estudiados en los pacientes con ACV y su incidencia, sin hacer distinción de sexo y edad. En el total de los 160 pacientes, encontramos: RPCA en 29

casos, lo que supone un 18,12% del total; déficit de PC en 24 casos (15%); déficit de PS en 28 individuos (17,5%); déficit de AT-III en 6 pacientes (3,75%); déficit de plasminógeno en 9 casos (5,63%); ningún caso de déficit de t-PA; aumento del PAI-1 en 6 casos (3,75%); positividad para aCL en 11 individuos (6,88%); AL en 14 pacientes (8,75%); y aumento de los niveles de Lpa en 71 de los pacientes con ACV (44,38%) de los casos.

Tabla n.8. Resultados de RPCA comparados por sexos.
n = 249.

	MEDIA	D.E.	S.E.
VARONES n = 135	2,62	0,35	N.S.
MUJERES n = 114	2,57	0,33	

n = número de casos. D.E. = desviación estándar. S.E. = significación estadística.
N.S. = no significativo (t de Student, p < 0,001).

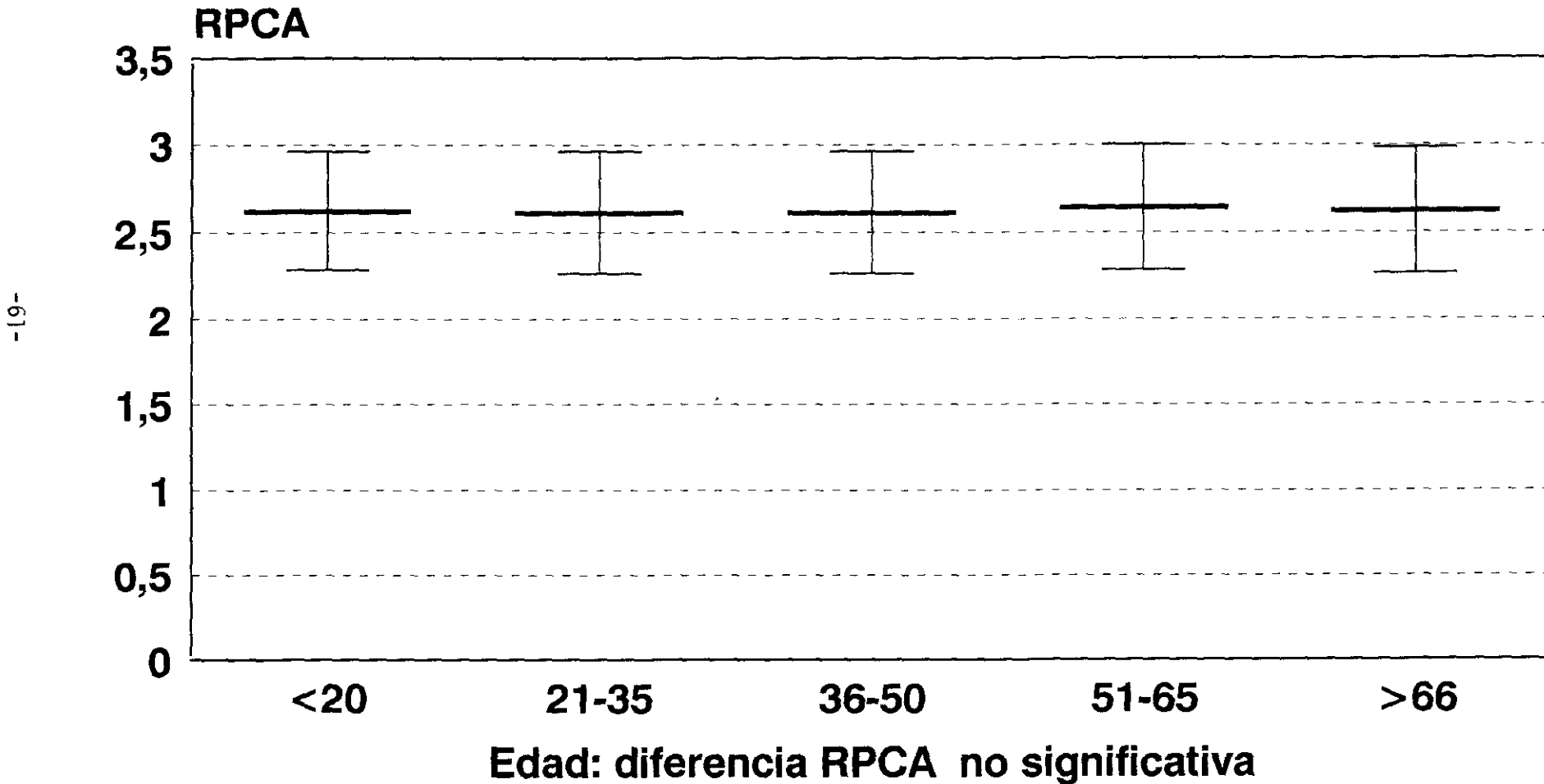
Tabla n. 9. Resultados de RPCA comparados por edades.
n= 249.

EDAD	MEDIA	D.E.	S.E.
< 20 años n= 44	2,62	0,34	N.S.
21-35 años n= 53	2,61	0,35	
36-50 años n= 53	2,61	0,35	
51-65 años n= 51	2,64	0,36	
> 66 años n= 48	2,62	0,36	

n= número de casos. D.E.= desviación estándar. S.E.= significación estadística. N.S.= no significativo (ANOVA, $p < 0,001$).

Graf.2: Resistencia PCA

Valores normales según grupos de edad



n=249 controles sanos

Tabla n. 10. Comparación de los valores de RPCA según el tiempo de congelación de las muestras.
 Temperatura de congelación: -40°C .
 n = 50.

	MEDIA	D.E.
EN FRESCO	2,61	0,30
UNA SEMANA	1,90	0,22
DOS SEMANAS	1,93	0,23

n = número de casos. D.E. = desviación estándar.

Tabla n. 11. Comparación dos a dos de los valores de
 RPCA según el tiempo de congelación.
 n = 60.

	S. E.
EN FRESCO-UNA SEMANA	$p < 0,001$
EN FRESCO-DOS SEMANAS	$p < 0,001$
UNA SEMANA-DOS SEMANAS	N. S.

n= número de casos. S.E.= significación estadística. N.S.= no significativo ("t-pareada", $p < 0,001$).

Graf.3: Resistencia PCA

Valores según tiempo de congelación muestras

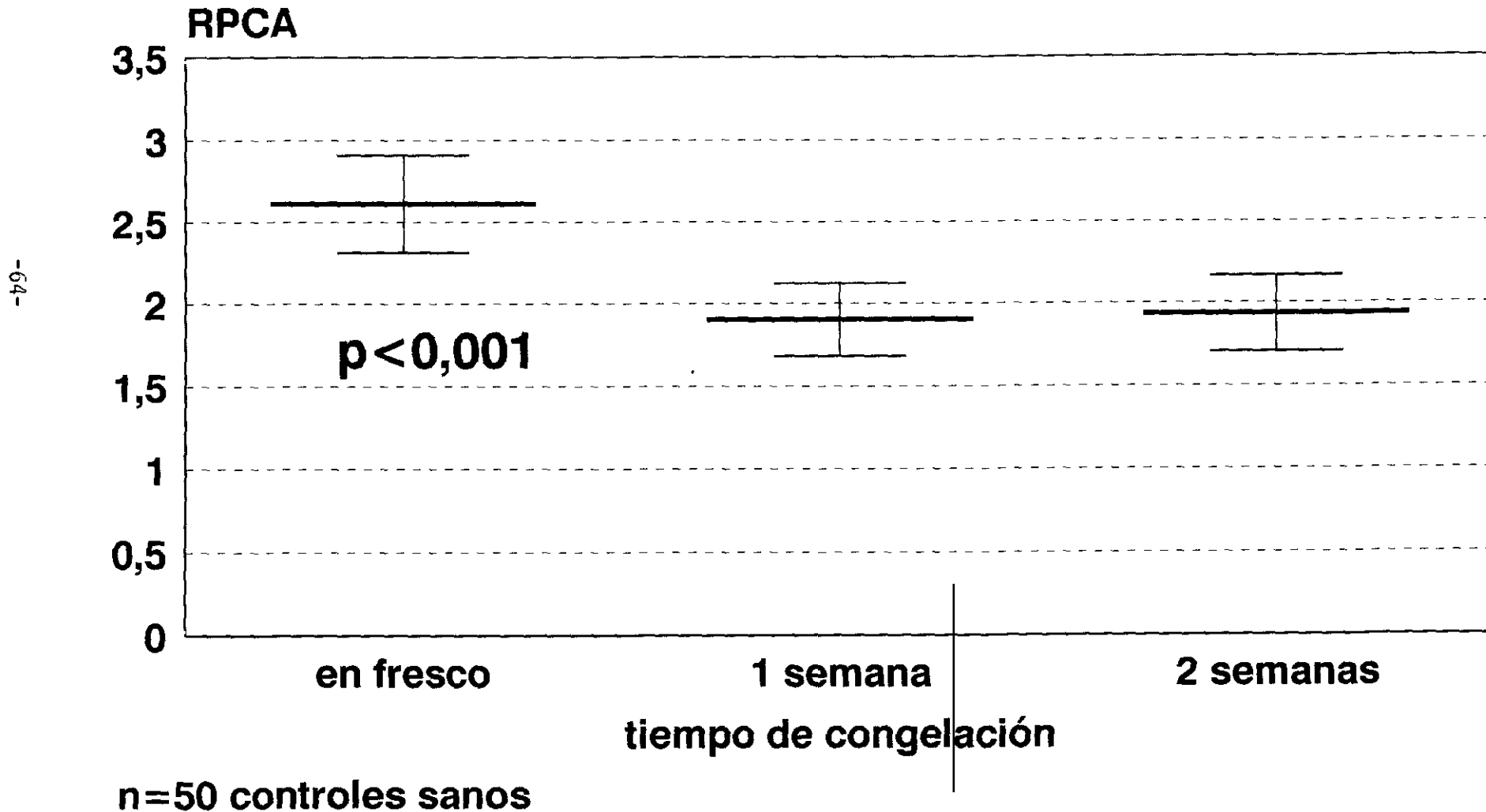


Tabla n. 12. Resultados de TTPA en ausencia y en presencia de PCA según el tiempo de congelación de las muestras. n= 50.

	TTPAn Media ± D.E.	TTPAa Media ± D.E.
EN FRESCO	35,06 ± 3,51	92,22 ± 16,95
UNA SEMANA	34,99 ± 3,38	68,70 ± 15,04
DOS SEMANAS	36,32 ± 3,59	70,52 ± 12,37
SIGNIFICACION ESTADISTICA	N.S.	P < 0,001

n= número de casos. D.E.= desviación estándar. TTPAn= tiempo de tromboplastina parcial activada en ausencia de PCA (proteína C activada). TTPAa= tiempo de tromboplastina parcial activada en presencia de PCA. N.S.= no significativo ("i-pareada", p<0,001).

Tabla n. 13. Valores utilizados para la inferencia del rango normal de HPCa mediante el χ^2 en 124.

	MEDIA	D.E.	C.U.
TTPan	32,6	2,20	6,72
TTPAa	81,8	10	12,20
COCIENTE TTPA (HPCa)	2,28	0,19	

en número de casos. D.E.= desviación estandar. C.U.= coeficiente de variación. TTPan= tiempo de tromboplastina parcial activada en ausencia de PCA. TTPAa= tiempo de tromboplastina parcial activada en presencia de PCA.

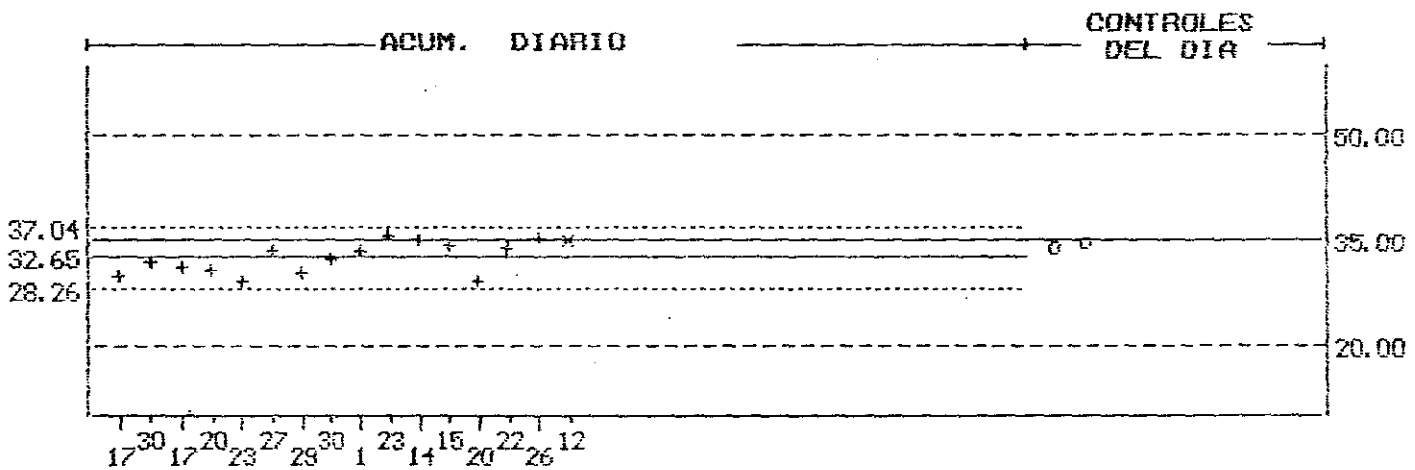
Tabla n. 14. Gráfica de acumulación diaria y mensual de la RPC normal (sin calcio).

CONTROL DE CALIDAD - Nivel 1

RESISTENCIA PC NORMAL

Control POOL Lote 1 CONTROL I

Unidad : seg



Glosario

- +++ Ultimo Mes
- xxx Mes en curso
- Media
- ... Media $\pm 2\sigma$
- - Rango
- Media Rango
- ▲ Fuera de Limites

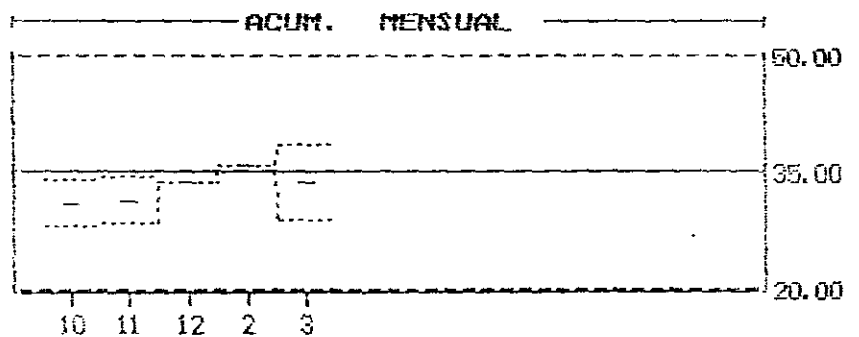


Tabla n. 15. Medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación de la RPC normal (sin calcio).

CONTROL DE CALIDAD - Nivel 1

RESISTENCIA PC NORMAL

Control POOL CONTROL I
Lote 1 Unidades seg

CONTROL ACTUAL (25/04/1996)

Result. Tiempo Result. Tiempo Result. Tiempo Result. Tiempo

34.0 11:28

34.6 11:28

Valor Mín. 20.0

Valor Máx. 50.0

Media 34.3

σ 0.42

CV 1.24

MEDIAS DIARIAS

D Media D Media D Media D Media D Media

17 30.0 30 32.3 26 35.3

30 32.0 1 33.7 12 35.1

17 31.4 23 35.7

20 31.0 14 34.9

23 29.4 15 34.4

27 33.6 20 29.4

29 30.3 22 33.9

Antiguo Actual
Lote Lote

Media 32.6

σ 2.20

CV 6.72

MEDIAS MENSUALES

M Media σ CV M Media σ CV M Media σ CV M Media σ CV

10 31.0 1.41 4.56 2 35.7 0.00 0.00

11 31.3 1.48 4.73 3 33.6 2.39 7.11

12 33.7 0.00 0.00

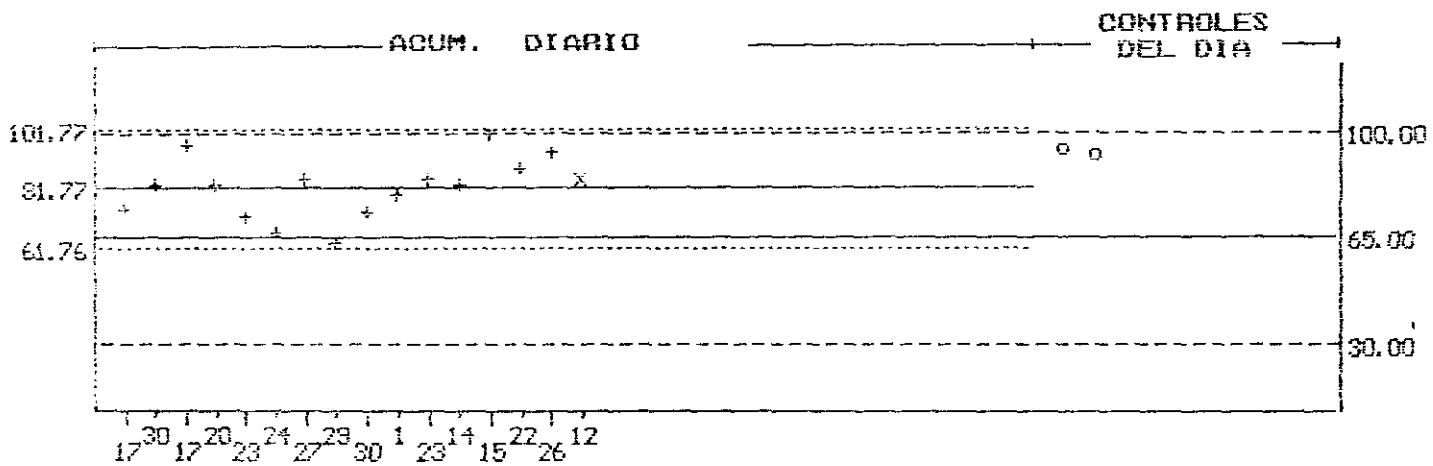
Tabla n. 16. Gráfica de acumulación diaria y mensual de la RPCA (con balcío).

CONTROL DE CALIDAD - Nivel 1

RESISTENCIA PC ACTIVADA

Control POOL CONTROL I
Lote 1

Unidad : seg



Glosario

- +++ Último Mes
- xxx Mes en curso
- Media
- ... Media $\pm 2\sigma$
- - Rango
- Media Rango
- ▲ Fuera de Límites

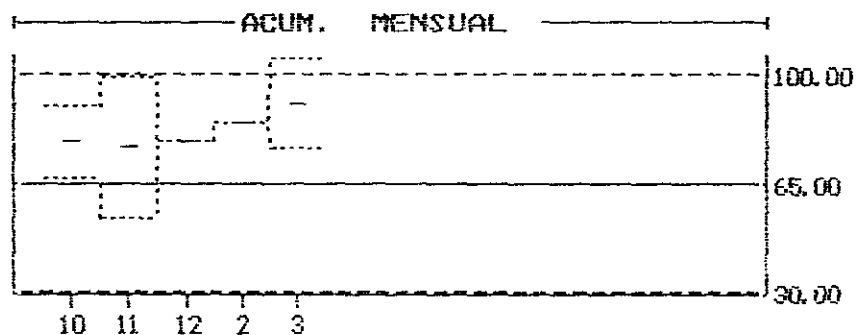


Tabla n. 17. Medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación de la RPCA (con calcio).

CONTROL DE CALIDAD - Nivel 1

RESISTENCIA PC ACTIVADA

Control POOL CONTROL I
Lote 1 Unidades seg

CONTROL ACTUAL (25/04/1996)

Result.	Tiempo	Result.	Tiempo	Result.	Tiempo	Result.	Tiempo
94.3	11:30					Valor Mín.	30.0
92.2	11:30					Valor Máx.	100.0
						Media	93.2
						σ	1.48
						CV	1.59

MEDIAS DIARIAS

D	Media	D	Media	D	Media	D	Media	D	Media	Antiguo Lote	Actual Lote
17	74.5	29	63.0	26	93.7						
30	62.6	30	73.6	12	84.9						
17	96.0	1	78.9								
20	82.4	23	84.6								
23	72.6	14	82.5							Media	81.8
24	67.2	15	99.6							σ	10.0
27	84.6	22	87.7							CV	12.2

MEDIAS MENSUALES

M	Media	σ	CV	M	Media	σ	CV	M	Media	σ	CV	M	Media	σ	CV
10	78.6	5.73	7.29	2	84.6	0.00	0.00								
11	77.1	11.3	14.7	3	90.9	7.41	8.15								
12	78.9	0.00	0.00												

Tabla n. 18. Incidencia de RPCA en los pacientes con ACU (n= 160) y comparación con su prevalencia en la población normal (n= 249).

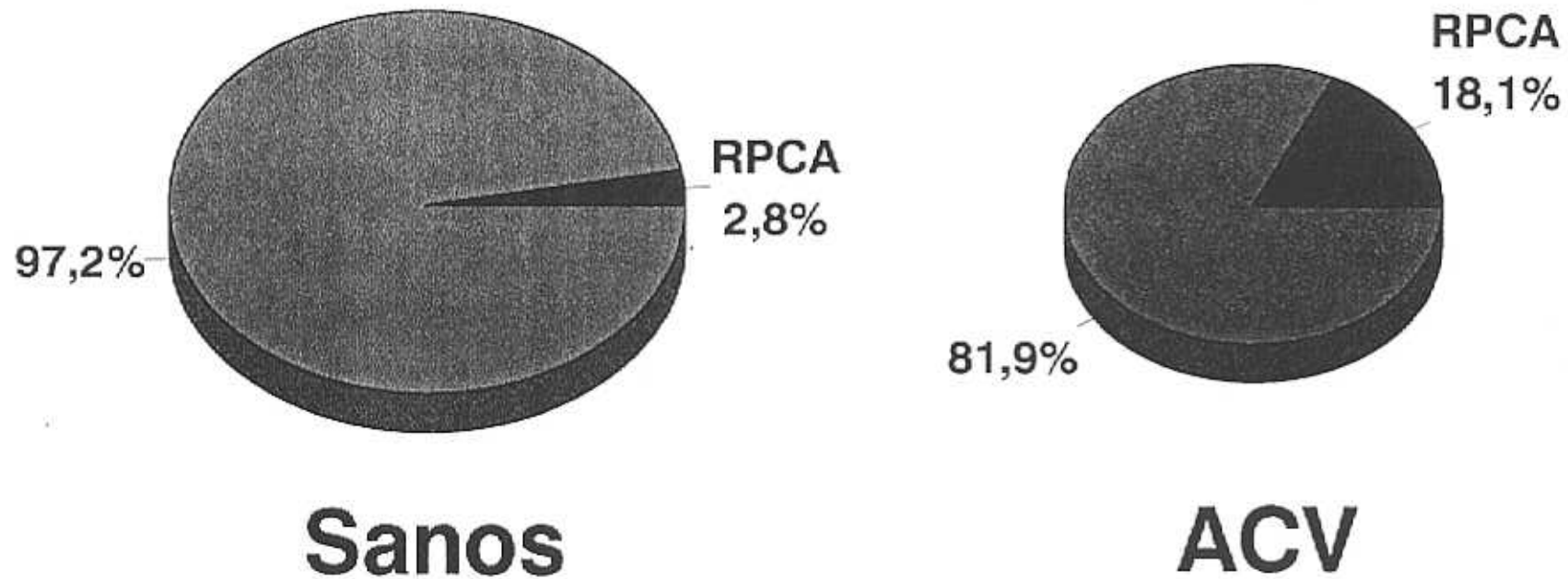
	RPCA ACU	RPCA SANOS	S.E.
TOTAL	18,13%	2,81%	P<0,001
VARONES	16,67%	2,23%	P<0,001
MUJERES	19,74%	3,5%	P<0,001

RPCA= resistencia a la proteína C activada. n= número de casos. ACU= accidentes cerebrovasculares. S.E.= significación estadística. N.S.= no significativo (Chi-cuadrado, p<0,001).

Graf.4: Resistencia PCA

249 controles sanos y 160 ACV

-72-



Diferencia $p < 0,001$

Tabla n. 19. Incidencia de otras alteraciones del sistema hemostático en los pacientes con ACU. Comparación por sexos.

	TOTAL n= 160	VARONES n= 84	MUJERES n= 76	S. E.
Déficit PC	15%	20,24%	9,2%	P<0,001
Déficit PS	17,5%	10,72%	25%	P<0,001
Déficit AT-III	3,75%	3,58%	3,95%	N. S.
Déficit plasminógeno	5,63%	8,34%	2,63%	P<0,001
Déficit t-PA	0%	0%	0%	N. S.
Aumento PAI-1	3,75%	4,77%	2,63%	N. S.
aCl positivos	6,88%	5,96%	7,9%	N. S.
AL positivo	8,75%	13,09%	3,95%	P<0,001
Aumento Lpa	44,38%	36,9%	25,63%	P<0,001

n= número de casos. PC= proteína C. PS= proteína S. AT-III= antitrombina III. t-PA= activador tisular del plasminógeno. PAI-1= inhibidor del activador tisular del plasminógeno. aCl= anticuerpos anticardiolipina. AL= anticoagulante lúpico. Lpa= lipoproteína a. S.E.= significación estadística. N.S.= no significativo (Chi-cuadrado, p<0,001).

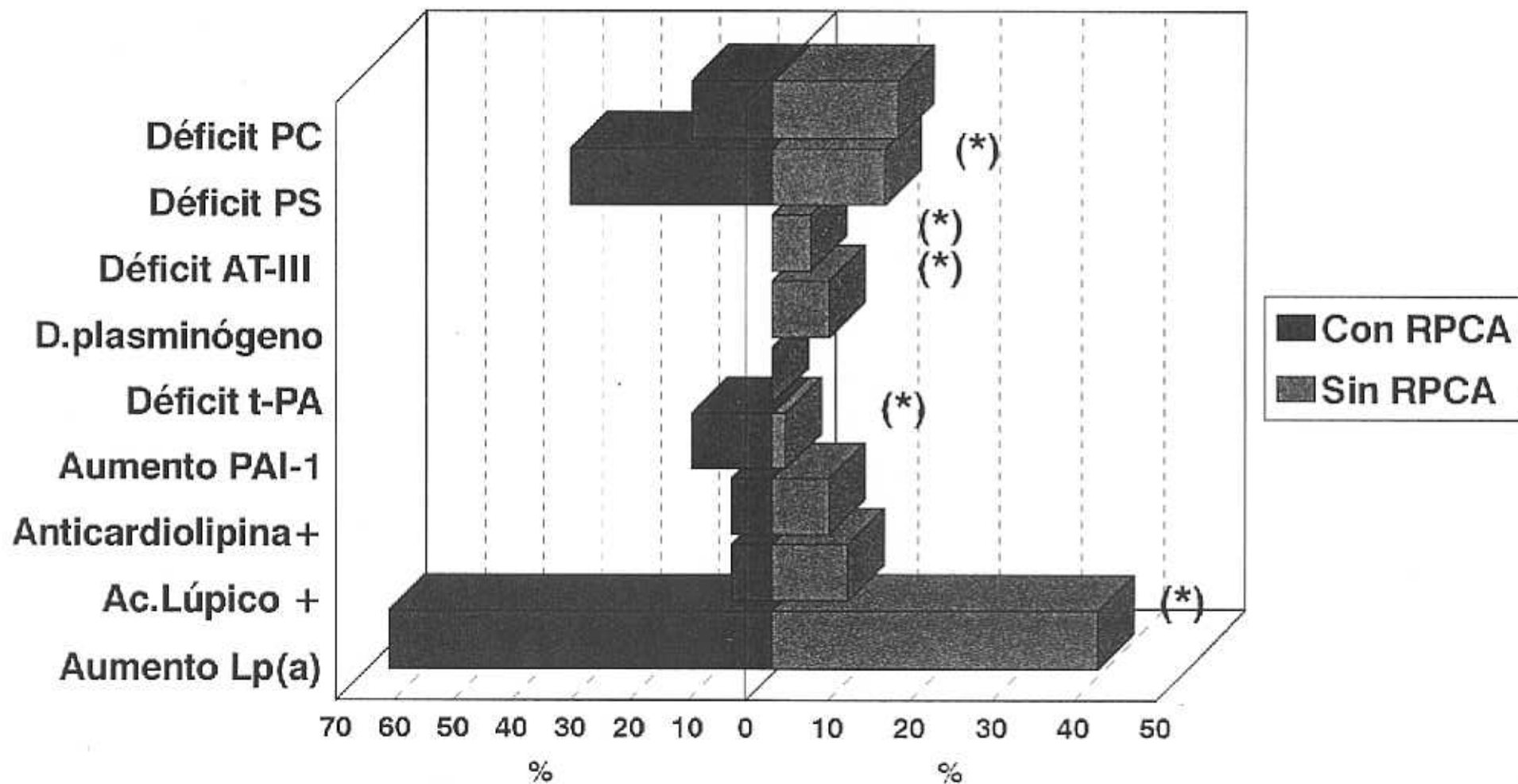
Tabla n. 20. Comparación de las alteraciones de las principales alteraciones del sistema hemostático en los PCU según haya o no RPCA.
n=100.

ALTERACION HEMOSTÁTICA	RPCA + n= 29	RPCA - n= 131	S.E.
Déficit PC	13,8%	13,27%	N.S.
Déficit PS	34,5%	13,74%	p<0,001
Déficit AT-III	0%	4,58%	p<0,001
Déficit plasminógeno	0%	6,87%	p<0,001
Déficit t-PA	0%	0%	N.S.
Aumento PAI-1	13,8%	1,53%	p<0,001
aCl positivos	6,9%	6,87%	N.S.
AL positivo	6,9%	9,16%	N.S.
Aumento Lpa	65,51%	39,7%	p<0,001

n= número de casos. PC= proteína C. PS= proteína S. AT-III= antitrombina III. t-PA= activador tisular del plasminógeno. PAI-1= inhibidor del activador tisular del plasminógeno. aCl= anticuerpos anticardiolipina. AL= anticoagulante lúpico. Lpa= lipoproteína a. S.E.= significación estadística. N.S.= no significativo (Chi-cuadrado, p<0,001).

Graf.5: Trombofilia en ACV

Comparación de pacientes con y sin RPCA



(*) diferencia $p < 0,001$

Tabla n. 21. Alteraciones del sistema hemostático en los pacientes con ACU. n= 160.

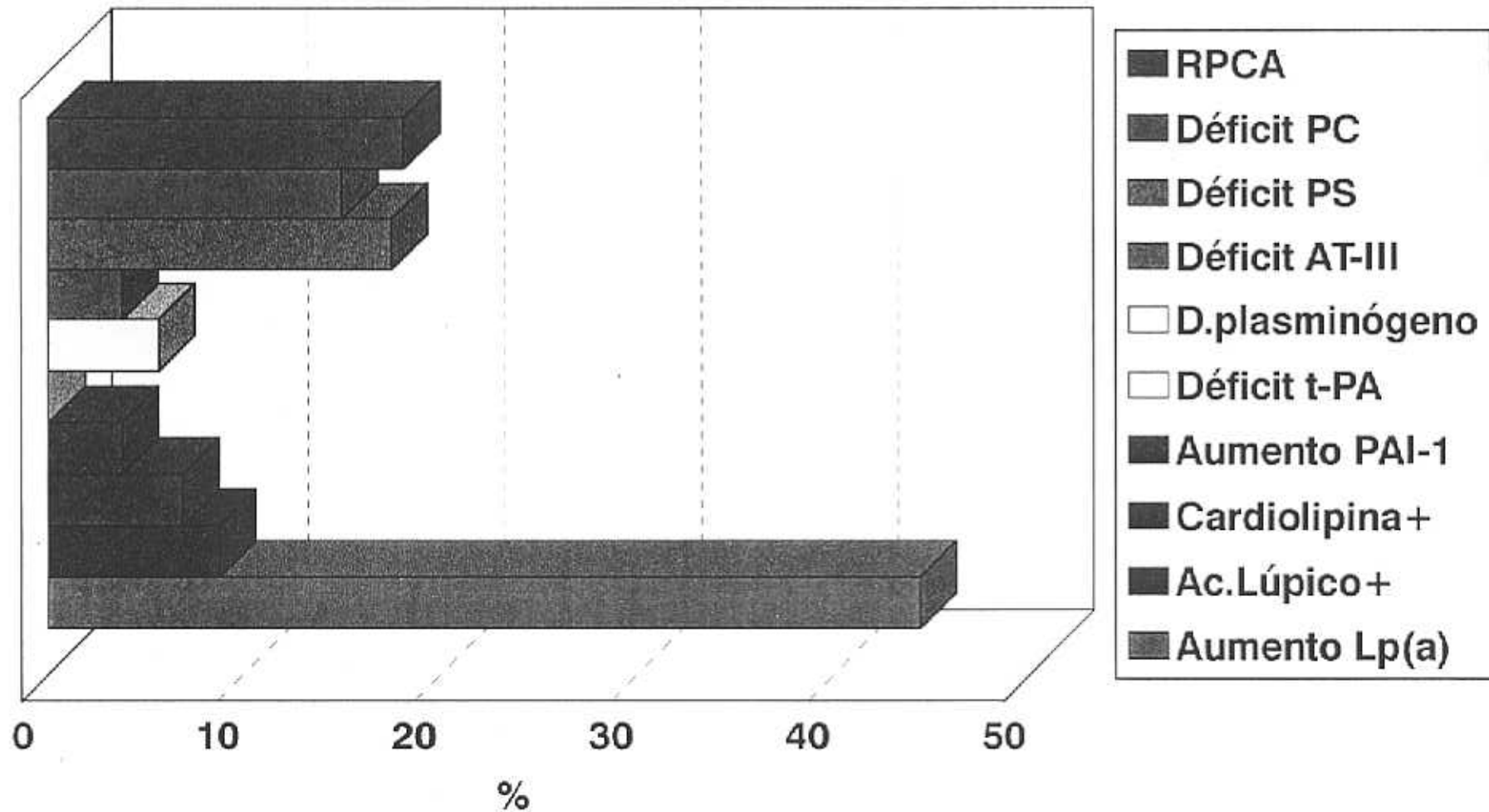
ALTERACION HEMOSTATICA	INCIDENCIA	NUMERO DE CASOS
RPCA	18,12%	29
Déficit PC	15%	24
Déficit PS	17,5%	28
Déficit AT-III	3,75%	6
Déficit plasminógeno	5,63%	9
Déficit t-PA	0%	0
Aumento PAI-1	3,75%	6
aCl positivos	6,88%	11
AL positivo	8,75%	14
Aumento Lpa	44,38%	71

n= número de casos. RPCA= resistencia a la proteína C activada. PC= proteína C. PS= proteína S. AT-III= antitrombina III. t-PA= activador tisular del plasminógeno. PAI-1= inhibidor del activador tisular del plasminógeno. aCl= anticuerpos anticardiolipina. AL= anticoagulante lúpico. Lpa= lipoproteína a.

Graf.6: Trombofilia en ACV

Frecuencia de alteraciones en 160 pacientes

-77-



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN:

La trombofilia puede ser definida como una tendencia hacia la enfermedad tromboembólica en adultos menores de 50 años, en ausencia de factores de riesgo conocidos (1). Esta tendencia trombótica puede derivar de una mayor activación de la coagulación, de una disminución de los mecanismos anticoagulantes y/o de una hipofunción del sistema fibrinolítico.

Hasta hace pocos años, las deficiencias de antitrombina III (AT-III), proteína C (PC) y proteína S (PS) eran, dentro de las alteraciones congénitas responsables de la aparición de fenómenos tromboembólicos, las más frecuentemente diagnosticadas, estando presentes en un 10-20% de los pacientes trombofílicos (43).

Pero en 1993, Dählback y col. describieron un nuevo trastorno llamado resistencia a la proteína C activada (RPCA), cuadro de carácter hereditario que consiste en una falta de respuesta del plasma afecto a la proteína C activada (PCA) (46).

La PCA es una proteína anticoagulante natural que interacciona con los factores V y VIII, inhibiendo la cascada de la coagulación (5). La ausencia de respuesta del plasma a esta PCA, es decir, la existencia de una RPCA, impide la inhibición de la cascada de la coagulación (47). Esta situación se convierte, pues, en factor de riesgo para el padecimiento de fenómenos tromboembólicos (64).

En el 80-90% de los casos, la RPCA es debida a la denominada mutación del factor V Leiden. Esta mutación consiste en una alteración del gen del factor V, concretamente en una sustitución del aminoácido Arginina

por Glutamina en la posición 506 de la molécula del factor V; este defecto se transmite a la descendencia de forma autosómica dominante (65,66).

Desde el descubrimiento de este trastorno, muchos han sido los trabajos realizados que han demostrado su asociación con un gran número de enfermedades trombóticas. Tanto ha sido así, que se ha demostrado que su responsabilidad etiológica en los cuadros de trombofilia antes considerados idiopáticos es mucho mayor que la alcanzada por cualquier otro trastorno congénito conocido (66), alcanzando el 40% en algunas series.

Una de las primeras preguntas que nos planteamos a la hora de realizar un estudio de incidencia de la RPCA es si dicha incidencia es o no igual según edades y sexos.

Han sido múltiples los estudios familiares realizados sobre este tema, en los cuales los árboles genealógicos muestran una transmisión similar del defecto a varones y mujeres (52, 54, 67), lo cual es lógico si tenemos en cuenta el modo de herencia autosómica dominante del mismo.

Algunos autores han encontrado diferencias entre ambos sexos en la incidencia de RPCA, pero en situaciones en las cuales existen otros factores coadyuvantes. Tal es el caso de un estudio realizado por Dählback, en el que hace la observación de que las mujeres gestantes que padecen una trombosis constituyen un subgrupo de pacientes con RPCA en un porcentaje de casos inusualmente elevado (hasta un 60%) (37).

En lo referente a la comparación de la incidencia de RPCA por edades, tampoco se han encontrado diferencias importantes entre los distintos grupos (51), lo cual nuevamente es comprensible debido al modo de transmisión del defecto.

Otra cuestión diferente es la que se refiere a la edad de aparición de los fenómenos trombóticos en los individuos que presentan una RPCA, pues aquellos aparecen a edades más tempranas que en los individuos que no tienen RPCA (68). En cualquier caso, dada la alta prevalencia de este trastorno en la población normal, podemos afirmar que su manifestación como fenómeno tromboembólico no es muy frecuente, y su expresión va aumentando a medida que lo hace la edad del paciente portador (59).

En general, todos los estudios revisados vienen a confirmar lo mismo que nosotros: separando a los individuos por sexos y/o por grupos de

edades, la incidencia de RPCA viene a ser la misma (59, 69), con variaciones no significativas. por lo que en adelante no haremos distinciones, pudiéndose aplicar todos los resultados obtenidos en el estudio de esta alteración a cualquier individuo que la presente.

Un punto importante a establecer para llegar a la conclusión de que la incidencia de RPCA es igual independientemente de cuáles sean las edades o sexos de las poblaciones estudiadas, es determinar de antemano lo que nosotros consideramos como rango normal.

Para calcular el valor de RPCA, se utiliza un test de medición basado en la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) (38, 53). La base de este método es la siguiente: la mutación del factor V se asocia con una resistencia de dicho factor V activado (Va) a ser degradado por la PCA, pero el factor Va mutado conserva sus propiedades procoagulantes (56). Consecuentemente, los complejos de protrombinasa que contienen el factor Va mutado no son normalmente inhibidos por la PCA, con el consiguiente incremento en la tasa de trombina, incremento que se ve muy elevado por la activación (feed-back) de los factores VIII y V. A causa de esta activación, la diferencia de respuesta de los factores Va normal y mutado es amplificada en el test de TTPA (70).

Los resultados de este análisis se expresan en cociente de TTPA, es decir, midiendo el TTPA en ausencia y en presencia de PCA (numerador y denominador, respectivamente). La RPCA se manifiesta por un alargamiento del TTPA en presencia de PCA, lo cual hace disminuir el cociente (57,70).

Los valores tomados de referencia, es decir, el valor del cociente por debajo del cual se considera que existe una RPCA, varían

dependiendo del reactivo utilizado, de la concentración y calidad de la PCA, y del coagulómetro empleado (57, 71, 72).

En nuestro caso, con nuestros reactivos y con nuestro coagulómetro, hemos considerado que: calculando la media + 2 desviaciones estándar, y rechazando los valores límite, el rango normal que vamos a utilizar es 1.90-2.66; por tanto, existe una EPCA cuando el cociente o "ratio" está por debajo de 1.90.

En definitiva, los valores por nosotros obtenidos son tan válidos como los dados por otros autores, siempre y cuando se calcule de antemano el rango de referencia para cada situación y laboratorio (73).

Otra forma de expresar los resultados obtenidos con el test de TTPA es con el llamado "ratio corregido" (51), que es el "ratio" obtenido como previamente hemos descrito pero hecho referencia a un control normal. Es decir, el resultado se obtendría dividiendo el cociente de cada paciente (numerador) por el cociente de un control normal o de un grupo de controles normales (denominador).

Los valores del "ratio corregido" se aproximan a 1. En caso de que decidamos utilizar este cociente, habría que calcular el rango de referencia de la misma forma que lo hacíamos con el cociente o "ratio" normal que hemos empleado nosotros.

Del mismo modo que conviene tener en cuenta los reactivos y aparatos utilizados para la realización del test de TTPA, nos ha llamado la atención el hecho de que la situación del plasma también es digna de consideración. Al hablar de la situación del plasma, nos referimos únicamente a que debemos concretar previamente si las mediciones del cociente de TTPA las vamos a realizar sobre plasma fresco o sobre plasma congelado.

El primero en hacer esta observación fue Dählback en 1995 (70). Según este autor, la medición de la RPCA puede hacerse tanto en plasma normal como en plasma congelado, pero según se realice en una u otra situación hay que calcular los valores de referencia para cada una de ellas.

La necesidad de matizar este punto se basa en el hecho de que los tests realizados con plasma congelado dan como resultado ratios menores que los realizados con plasma en fresco. Las temperaturas de congelación no parecen influir en el resultado (74).

En nuestro estudio hemos coincidido con lo expuesto por estos autores ya que, tras una semana de congelación de las muestras, los niveles de **RPCA** (ratio) disminuyen de un modo significativo con respecto al ratio del plasma en fresco. Además, hemos observado que el tiempo de congelación no influye, es decir, que la diferencia existe entre plasma fresco y plasma congelado, pero no entre el plasma congelado durante más o menos tiempo.

La razón por la cual la congelación disminuye el cociente de TTPA podría tener relación con la inactivación que sufre el factor XII con la congelación (2). Pero entonces, ¿por qué solamente se alarga el TTPA en

presencia de PCA mientras que el TTPA en ausencia de PCA se mantiene constante? Hasta ahora no existe ninguna explicación aceptable, por lo cual ésta es una interesante puerta que queda abierta para la investigación.

En relación a las condiciones de determinación de los valores de RPCA, otro punto importante es la estandarización del método de medida.

Existen dos métodos para determinar si existe o no una RPCA. Uno es el ya mencionado test basado en la medición del TTPA con y sin PCA, y otro es el test del DNA (70). Desde el momento en que se demostró que la responsable del trastorno era, en la mayoría de los casos, una mutación del factor V (75), los estudios genéticos para la detección de la misma también sirven para diagnosticar una RPCA (76, 77).

La principal ventaja del estudio genético es que permite distinguir a los individuos homocigóticos y heterocigóticos, y que el diagnóstico no tiene discusión al no existir valores límite difíciles de interpretar, ya que la mutación existe o no existe. Pero por razones económicas y prácticas no es posible realizarlo en todos los individuos (70), dada la alta tecnología que requiere y el riesgo de contaminación que existe si no se maneja adecuadamente el ADN, en cuyo caso aparecen bandas supernumerarias con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Por las razones expuestas, el test del TTPA se ha convertido en la mejor alternativa. Es un test muy barato, rápido y fácil de realizar (78), y se puede hacer tanto en plasma en fresco como congelado. El problema es que no distingue entre homocigotos y heterocigotos, que existen numerosos casos límite de difícil interpretación, que no se puede realizar en pacientes que reciban anticoagulantes orales y/o heparina, y que hay que estandarizar cuidadosamente el método de medida (70).

Ateniéndonos a esto último, realmente el test de TTPA presenta una elevada sensibilidad y especificidad, por lo cual nos sirve perfectamente para realizar el estudio de RPCA, aunque hay autores como Díaz Cremades,

que no comparten esta opinión (79), aunque es cierto que lo ideal sería la combinación de los estudios fenotípico y genotípico para identificar a los verdaderos portadores de una RPCA (80).

Los diferentes estudios que han llegado a la conclusión de que el test de TTPA no es válido como test de "screening" (79), pueden deberse a que el método de medida no se realizó de forma correcta. Todos los autores recomiendan la utilización de un reactivo de modo constante, el establecimiento de un rango de referencia propio para cada laboratorio e instrumento, y la utilización con cada grupo de determinaciones de un número de 30-40 sujetos como mínimo (67, 70, 73).

Por lo tanto, los valores obtenidos en nuestro estudio son únicamente válidos y reproducibles si se realizan en las mismas condiciones y con los mismos reactivos y coagulómetro STA que utilizamos en nuestro laboratorio.

Aunque la cuestión de la toma de anticoagulantes ha quedado solventada con una modificación de la prueba de TTPA mediante dilución en plasma carente de factor V (81, 82), en nuestro estudio hemos desechado a este grupo de pacientes para que todos estuvieran en iguales circunstancias.

El hecho de que la RPCA está relacionada con un aumento del riesgo de padecimiento de enfermedad tromboembólica venosa está fuera de discusión desde el hallazgo de este trastorno (46).

En cuanto a su papel en las trombosis arteriales es muy controvertido. Mientras que algunos autores como Lindblad afirman no tener datos suficientes para defender su asociación y sólo describen casos anecdóticos (83), otros como Cushman y De Stefano aseguran que tal relación no existe (84, 85), y otros como Halbmayer dicen que, aunque la asociación no es tan fuerte como con la enfermedad tromboembólica venosa, sí que se produce (49, 60, 61).

Las principales trombosis arteriales objeto de estudio han sido los accidentes cerebrovasculares (ACV), debido a la mayor frecuencia de este trastorno, aunque también se ha demostrado la existencia de RPCA en otras trombosis arteriales periféricas (69).

En general, todos los estudios que defienden la relación entre la RPCA y las trombosis arteriales aclaran que, del mismo modo que en otros estados hipercoagulables, la RPCA se asocia más frecuentemente a trombosis venosas que arteriales. Estas afirmaciones son compatibles con nuestros resultados, ya que encontramos una incidencia considerable de RPCA en los pacientes con ACV (un 18,12%), pero no es tan elevada como las constatadas en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa.

La importancia de la elevada incidencia de los ACV, especialmente en la población mayor de 65 años, y la llamativa tasa de fenómenos tromboembólicos que se relacionan con la RPCA, nos llevan a sugerir que los estudios en este terreno deberían ser más amplios. Puesto que unos autores no han encontrado relación y otros sí, podríamos pensar que en este tipo de accidentes son otros los factores que concurren. Entre

estos factores especulamos si se puede encontrar el momento de realización del test de TTPA: ¿quizá en una fase inicial se comporta la RPCA en este tipo de fenómenos como un reactante de fase aguda?

Lo que nosotros hemos dejado claro es que la relación entre RPCA y ACV existe y es estadísticamente significativa, al menos en las condiciones en las que hemos realizado nuestro estudio.

La RPCA se ha revelado como el trastorno congénito más frecuente relacionado con la aparición de fenómenos tromboembólicos. En este sentido, ha "desbancado" a otros trastornos congénitos del sistema hemostático que antes eran considerados los más frecuentes, como los déficits de proteínas anticoagulantes naturales, y otras anomalías con menos incidencia como las alteraciones procoagulantes del sistema fibrinolítico (86).

En todos los trabajos realizados sobre enfermedad tromboembólica venosa se ha demostrado que, mientras que todas las alteraciones del sistema hemostático son en conjunto responsables de un 25-30% de los casos no filiados, la RPCA viene a explicar un 20-60% de los mismos, según autores (65, 87).

Del mismo modo, y al contrario que otros defectos genéticos que son factor de riesgo para las trombosis, la RPCA tiene una elevada prevalencia entre la población general, oscilando entre un 2-7% (85,88).

En el caso de las trombosis arteriales, el tema es más controvertido, pues las bajas incidencias de RPCA encontradas por algunos autores (83) hacen que sean similares e incluso inferiores a las de otros defectos responsables de la aparición de este tipo de cuadros.

En nuestro estudio, no obstante, hemos demostrado que la incidencia de RPCA en los ACV es mayor que la de cualquier otro defecto conocido del sistema hemostático, incluso mayor que la de un importante estado de trombofilia adquirido como es el síndrome antifosfolípido primario.

Son muchos los trabajos realizados sobre los ACV como principales cuadros de trombosis de tipo arterial. En los individuos que padecen estos accidentes, es conveniente realizar un protocolo de búsqueda

de un posible estado de hipercoagulabilidad o trombofilia responsable (89,90). A la vista de los resultados de nuestro estudio, lógicamente aconsejamos añadir la determinación de la RPCA en este protocolo, dado que está clara su relación, o al menos coexistencia, con este tipo de accidentes vasculares.

Se han publicado muchos trabajos sobre los ACV en los cuales se constata claramente la asociación de los mismos con distintas alteraciones del sistema hemostático (90-92), considerando muy importante en todos ellos la realización del ya mencionado protocolo de estudio de un estado hipercoagulable; ésto es tan importante en los ACV como en otros tipos de trombosis arteriales (90, 93, 94), especialmente si se trata de adultos jóvenes (92).

Las alteraciones del sistema hemostático que más frecuentemente se incluyen en el protocolo de un estudio de hipercoagulabilidad son las que nosotros hemos buscado, es decir: déficit de proteínas anticoagulantes naturales, alteraciones del sistema fibrinolítico, anticuerpos antifosfolípido y lipoproteína a. Igual que nosotros, cada vez son más los autores que consideran necesaria la detección de la RPCA (89).

En cuanto al déficit de proteína C (PC), del cual hemos obtenido una incidencia del 15% en nuestro grupo de ACV, son numerosos los estudios publicados que la relacionan con esta alteración, tanto como defecto aislado (95) como en asociación con otras alteraciones (96). En ningún trabajo de los revisados la incidencia de este déficit es tan alta como en el nuestro.

Los déficits de PC y de proteína S (PS)(que hemos constatado en un 17,5% en nuestra serie), se ha demostrado que están relacionados con la

aparición de ACV (97-100); por ello, consideramos su existencia como un factor de alto riesgo, especialmente en el caso de la PC (100).

Tanto en el caso de la PC como en el de la PS, por tratarse de dos proteínas que intervienen en el sistema de la proteína C, se ha indagado sobre la posible relación de su déficit con la presencia de una RPCA.

Nuestros estudios de correlación han demostrado que el déficit de PC es un factor de riesgo independiente de la RPCA, cosa que ya ha sido previamente afirmada por autores como Griffin y col. (47), que tampoco consideran que esta última tenga relación con el déficit de PS.

Por contra, en otros casos se ha defendido su asociación, aunque leve, con el déficit de PS (101). En nuestro caso podríamos decir que la relación que existe entre ellos es algo más que leve, pues la incidencia del déficit de PS en el grupo de pacientes con RPCA (34,5%) es casi tres veces mayor que en el grupo de pacientes que no tienen RPCA (13,74%).

Un punto muy importante de cara a estas dos proteínas es el hecho de que pueden existir confusiones a la hora del diagnóstico. Por un lado, se han descrito casos en los que se diagnosticó erróneamente un déficit de PC tipo II cuando realmente se trataba de una RPCA (102), error que quedó solucionado al realizar el estudio genético de la familia en cuestión.

Por otro lado, se han publicado una serie de trabajos en los cuales se advierte que la RPCA interfiere en los niveles de PS funcional, de tal modo que existen casos en los que se ha diagnosticado un déficit de PS cuando lo que había era una RPCA (103-105). Este fallo ha sido detectado con varios sistemas de medida (106).

En presencia de una RPCA, la concentración obtenida de PS funcional o libre depende de la dilución del plasma, obteniéndose valores mayores o menores según la dilución sea mayor o menor, respectivamente. Las observaciones en este sentido de Faioni (103) y de Cooper (104) llevan a sugerir que aquellos individuos que previamente hayan sido diagnosticados como pacientes con déficit de PS sean reevaluados y se investigue la existencia de una RPCA.

Otra importante proteína anticoagulante natural es la antitrombina III (AT-III). Su déficit también ha sido relacionado con la producción de trombosis venosas (107,108) y, menos frecuentemente, de trombosis arteriales (10).

En lo que se refiere a su asociación con la RPCA, ninguna de las revisiones que hemos hecho han reflejado su existencia. Tampoco nosotros la hemos encontrado; es más, mientras que en los individuos sin RPCA hemos encontrado déficit de AT-III en un 4,58% (que supone un 3,75% del total de pacientes con ACV), en los individuos con RPCA no hallamos ningún caso de aquel defecto.

A pesar de nuestros resultados, y aunque la relación no es del todo explicable, sí es cierto que muchos individuos con otros defectos genéticos, como los déficits de PC, PS y AT-III, también han presentado una RPCA (70). Esto no implica una relación causal, sino que simplemente nos hace afirmar que, como es lógico, el riesgo trombótico de un determinado individuo está relacionado con el número de factores genéticos y circunstanciales o ambientales que concurran en él. Por tanto, en los individuos que además de una RPCA tengan algún otro defecto genético, el riesgo de padecer un fenómeno trombótico es mayor, lo cual no quiere decir

que las dos alteraciones estén más frecuentemente asociadas, sino sólo que han coincidido casualmente en la misma persona.

Por lo que se refiere a la patología del sistema fibrinolítico, en nuestro trabajo hemos determinado los niveles de plasminógeno, activador tisular del plasminógeno (t-PA) e inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1). Los porcentajes de incidencia del déficit de plasminógeno (5,63% del total de ACV) y del aumento del PAI-1 (3,75%), son bastante menores que los obtenidos para la RPCA y para el déficit de proteínas anticoagulantes naturales, datos que coinciden con los publicados para otras series de pacientes trombóticos (91, 92, 109, 110). Todos los casos de déficit de plasminógeno se deben a los pacientes sin RPCA, pues ninguno de los pacientes con RPCA la ha presentado; en cuanto al PAI-1, es significativamente mayor el número de pacientes con RPCA que la presentan que el de pacientes sin RPCA (un 13,8% frente a un 1,53%), por lo que este defecto sí podría tener alguna relación con la RPCA.

No obstante, no hemos encontrado ningún paciente con ACV que presentase cifras de t-PA por debajo de lo normal, aunque su déficit sí se ha relacionado con enfermedades trombóticas, sobre todo venosas (17). Por otra parte, incluso hemos publicado un trabajo en el cual encontrábamos, en contra de lo constatado por otros autores, que los pacientes con ACV presentan niveles de t-PA por encima de lo normal (111).

Por tanto, aunque no hemos encontrado una relación clara entre estas anomalías y la RPCA, sí consideramos muy importante incluirlas en el

estudio de los pacientes con ACV puesto que podrían explicar un número no muy elevado, pero sí digno de consideración, de los casos (112).

Además de las anomalías congénitas citadas y de las alteraciones en la fibrinólisis, también hemos buscado en nuestro grupo de ACV la existencia de anticuerpos antifosfolípido (AAF), tanto anticuerpos anticardiolipina (aCl) como el anticoagulante lúpico (AL).

La incidencia de positividad de estos parámetros ha sido de 6,88% para los aCl y de 8,75% para el AL, porcentajes que no son tan elevados como los de RPCA y déficit de proteínas anticoagulantes, pero sí son lo bastante importantes como para considerarlos. Esto coincide con lo publicado por otros autores (30), algunos de los cuales los han relacionado con el sistema fibrinolítico (113), y en muchos casos con el sistema de la PC (114).

La gran importancia del síndrome antifosfolípido primario y su posible relación con la RPCA, hacen que este capítulo merezca especial mención.

En este sentido, son numerosos los estudios orientados hacia la búsqueda de una asociación entre los AAF y la RPCA, dados los numerosos casos de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y con AAF que han presentado valores del cociente de TTPA compatibles con una RPCA (115).

La búsqueda de esta relación ha mostrado que en los pacientes con AL se presentan unos datos de laboratorio que realmente sugieren una RPCA, pero es una RPCA adquirida y no de tipo congénito (116,117).

Todos estos datos quedan demostrados en una serie de trabajos en los que se observa lo siguiente: mientras que en ausencia de RPCA la

mutación del factor V es igual de frecuente en pacientes con y sin AAF, en los casos de AL positivo la frecuencia de la mutación en los individuos resistentes a la PCA es significativamente más baja (118).

Existen varias teorías que intentan explicar la posible influencia de los AAF sobre la actividad de la PC, destacando dos de ellas: la primera es la de la fosfatidiletanolamina. La fosfatidiletanolamina es un importante componente de membrana necesario para que la PCA pueda ejercer su función anticoagulante, mientras que su influencia sobre la trombina es muy pequeña. Esta diferencia constituye un mecanismo potencial de inhibición de la acción anticoagulante de la PC por parte del AL y/o los distintos AAF. El hecho de que la fosfatidiletanolamina sea necesaria en la expresión de la acción anticoagulante de la PCA, y dado que la presencia de fosfatidiletanolamina incrementa la actividad del AL, se sugiere que existe un mecanismo básico que inhibe selectivamente la PC (119).

La otra teoría es la de la trombomodulina (TM), cofactor endotelial que se une a la trombina activando la PC. Se ha postulado que la acción anticoagulante de la PCA es inhibida por el AL porque este último inhibe a la TM. Este mecanismo sería el responsable de esta disfunción adquirida de la PCA, que puede contribuir a la patogénesis de los casos de trombofilia asociados con el AL (120).

Estos hallazgos han llevado a la conclusión de que en los individuos con LES y/o que sean portadores del AL debería hacerse el test de la RPCA, pues ésta podría ser un marcador muy útil que identifique a los pacientes con un riesgo elevado de trombosis.

En nuestro trabajo no parece existir tal relación, puesto que la incidencia de aCl es similar en los pacientes con y sin RPCA, y en cambio el AL se presenta más frecuentemente en los ACV sin RPCA.

El último parámetro que hemos considerado ha sido la lipoproteína a (Lpa), lipoproteína que resulta interesante como marcador de riesgo cardiovascular.

Los pacientes con una RPCA que desarrollan una trombosis arterial lo hacen a una edad generalmente tan avanzada como aquellos que no la tienen; esta observación es compatible con la afirmación de que la RPCA no es factor de riesgo para la arteriosclerosis, sino que son independientes (69, 121).

La Lpa es una lipoproteína rica en colesterol, constituida por una parte de lipoproteína de baja densidad (LDL) y una molécula de apolipoproteína específica. Es muy importante la estrecha relación estructural de la Lpa con el plasminógeno, puesto que se ha postulado que, debido a dicha similitud, la Lpa tendría propiedades aterogénicas y trombogénicas y, consecuentemente, imbricarse con la patología cardiovascular (122,123).

Debido al creciente interés de la Lpa como factor de riesgo independiente ligado a la incidencia de cardiopatía y/o ACV, ha sido introducida en nuestro estudio.

Aunque no se ha barajado ninguna hipótesis que relacione a la RPCA y a la Lpa, sino que han sido consideradas independientes, nosotros sí que encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la incidencia de Lpa en el grupo de pacientes con RPCA (65,51% en los pacientes con RPCA

frente a 39,7% en los pacientes sin RPCA). Esto nos conduce a afirmar que, aunque son considerados independientes, sí concurren con mucha frecuencia, especialmente en los pacientes con ACV.

El estudio de los defectos congénitos del sistema hemostático y de las alteraciones de la fibrinólisis, así como los defectos adquiridos, forman un grupo de alteraciones que cada vez demuestran tener más importancia en las alteraciones trombóticas. Asimismo, la elevada incidencia de los ACV confieren a esta patología una importancia especial en el estudio de su etiología.

Aunque este estudio ha sido realizado con un amplio grupo de pacientes, nos proponemos continuar investigando en esta línea, dado el gran número de incógnitas con las que nos hemos encontrado, especialmente en un defecto tan nuevo y que ha demostrado tener más importancia que ningún otro como es la RPCA.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

En relacion a los objetivos planteados al iniciar este trabajo, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1a. No existen diferencias en la prevalencia de la resistencia a la proteina C activada (RPCA) ni entre sexos ni entre los distintos grupos de edad.

2a. La congelación de las muestras influye de manera significativa, siendo los valores de RPCA menores que cuando se determinan en fresco. El tiempo de congelación de la muestra no influye.

3a. Es fundamental la estandarización del método de medida de la RPCA, estableciendo de antemano los reactivos a utilizar, así como el rango de referencia propio para cada laboratorio e instrumento. El rango normal con nuestros reactivos y nuestro coagulómetro STA es de 1,90-2,65.

4a. La incidencia de la RPCA en nuestra serie de pacientes con ACV ha sido de un 18,13%, frente a una prevalencia del 2,81% en la población normal, mostrándose como un importante factor de riesgo para este tipo de trombosis arteriales.

5a. La frecuencia de RPCA es mayor que la del resto de las alteraciones estudiadas, con excepción del aumento en los niveles de Lpa. Los déficits de PS y PAI-1 y el aumento de Lpa son significativamente más frecuentes en los pacientes con ACV y RPCA; en cambio, los déficits de AT-III y plasminógeno son más frecuentes entre los pacientes sin RPCA.

62. Es fundamental incluir la determinación de la RPCA en los protocolo de estudio de los ACV, dada la elevada frecuencia de ACV idiopáticos y su probada relación con un defecto tan importante como la RPCA.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA:

(1) Páramo JA, Rocha E. Hipercoagulabilidad y estados trombofílicos. *Sangre* 1991; 36(6): 477-486.

(2) Rutllant ML, Artigas A. Trastornos de la coagulación. Hoechst Ibérica SA; Ed MCR SA 1991; 3-43.

(3) Rosenberg RD, Rosenberg JS. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 1984; 74: 1-6.

(4) Fischer AM, Begiun S, Sternberg C, Dautzenberg MD. Comparative effect of heparin and heparan sulphate on two abnormal antithrombin III type variants. *Br J Haematol* 1987; 66: 213-217.

(5) Ralph L, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1993; 119: 819-827.

(6) Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S: the role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem* 1981; 256: 11128-11131.

(7) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor: biological interactions and significance. En: Verstaete M, Vermylen J, Lijnen HR and Arnout J editors. *Thromb Haemost Isth Leuven*; University Press; Leuven; 587-618.

(8) Müllertz S. Fibrinolysis. General aspects, characteristic features and perspectives. *Fibrinolysis* 1987; 1: 3-12.

(9) The British Committee for standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of thrombophilia. *J Clin Pathol* 1990; 43: 703-709.

(10) Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, Henderson A, Blajchman NA. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 1992; 116: 754-761.

- (11) Trans TH, Marbet GA, Duckert F. Association of hereditary heparin co-factor II deficiency with thrombosis. *Lancet* 1985; 2: 413-414.
- (12) McGehee WG, Klotz TA, Epstein DJ, et al. Coumarin necrosis associated with hereditary protein C deficiency. *Ann Intern Med* 1984; 101: 59-60.
- (13) Freedman KD, Marlar RA, Houston JG, et al. Warfarin induced skin necrosis in a patient with protein deficiency. *Blood* 1986; 68: 333.
- (14) Seligshon V, Berger A, Abend M, et al. Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* 1984; 310: 559-562.
- (15) Rocha E, Fernández J, Cuesta B, et al. Anomalías moleculares del fibrinógeno y de la protrombina. *Sangre* 1989; 34: 210-220.
- (16) Kluft C, Dooijewaard G, Emeis JJ. Role of the contact system in fibrinolysis. *Sem Thromb Haemost* 1987; 13: 50-68.
- (17) Juhan-Vaghe I, Valadier J, Alessi MC, et al. Deficient t-PA released and elevated PA-inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1987; 57(1): 67-72.
- (18) Falkon L, Gari M, Monserrat I, et al. Familial elevation of plasma histidine rich-glicoprotein associated with high PAI-1 levels in a case of recurrent venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1991; 65: 1262.
- (19) Mudd SH, Skovby F, Levy HL, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31.
- (20) Khasmashta MA, Cervera R, López-Soto A, et al. El síndrome de los anticuerpos antifosfolípido. *Jano* 1990; 893(38): 59-66.
- (21) Asherson RA, Harris EN. Anticardiolipin antibodies: clinical associations. *Postgrad Med J* 1986; 62: 1081-1087.

- (22) Johanson EA, Lassus A. The occurrence of circulating anticoagulants in patients with syphilitic and biologically false-positive antilipoidal antibodies. *Am Clin Res* 1974; 105-108.
- (23) Colaço CB, Male DK. Antiphospholipid antibodies in syphilis and thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 449-456.
- (24) Thiagarajan P, Shapiro SS, De Marco L. Monoclonal immunoglobulin coagulation inhibitor with phospholipid specificity: mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1980; 66: 397-405.
- (25) Harris EN, Gharari AE, Boey ML, et al. Measurement of anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211-1214.
- (26) Triplett DA, Brandt JT, Musgrave KA, et al. The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid. *JAMA* 1988; 259: 550-554.
- (27) Alarcón-Segovia D. Pathogenetic potential of antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1988; 15: 890-893.
- (28) Ordi J, Vilardell M. Diagnóstico y tratamiento del anticoagulante lúpico. *Med Clin* 1983; 81: 178-181.
- (29) Zini JM. Physiopathology of thrombosis induced by antiphospholipid antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 1995; 13(1): 5-9.
- (30) Ferro D, Quintarelli C, Rasura M, et al. Lupus anticoagulant and the fibrinolytic system in young patients with stroke. *Stroke* 1993; 24(3): 368-370.
- (31) Páramo JA, Pérez JL, Serrano M, et al. Types 1 and 2 plasminogen activator inhibitor and tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis. *Thromb Haemost* 1990; 64: 3-6.

(32) Prandoni P, Lensing AWA, Buller HL, et al. Deep vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med* 1992; 327: 1128-1133.

(33) Kruithof EKO, Tran-Thang C, Gudinchet A, et al. Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 460-466.

(34) Tooke JE, McNicol GP. Thrombotic disorders associated with pregnancy and the pill. *Clin Haematol* 1981; 10: 613-630.

(35) Varizi ND. Nephrotic syndrome and coagulation and fibrinolytic abnormalities. *Am J Nephrol* 1983; 3: 1-6.

(36) Dahlbäck B, Stenflo J. The protein C anticoagulant system. In: The molecular basis of blood diseases. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW and Varmus H editors. WB Sanders Philadelphia 1994; 599-628.

(37) Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995; 85(3): 607-614.

(38) Rosén S. APC resistance, a major risk factor in familial thrombosis. *Enter Clin* 1993; 2616.

(39) Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood* 1982; 59: 1067.

(40) Wolf M, Boyer-Neumann C, Peynaud-Debayle E, et al. Clinical applications of a direct assay of free protein S antigen using monoclonal antibodies. A study of 59 cases. *Blood Coag Fibrinol* 1994; 5: 187-192.

(41) Bertina RM. Specificity of protein C and protein S assays. *Res Clin Lab* 1990; 20: 127-138.

(42) Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994; 269(29): 18735-18738.

(43) Tabernero MD, Tomas JF, Alberca I, et al. Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. Am J Haematol 1991; 36: 249.

(44) Simioni P, Gavasso S, Luni S, et al. A protein S functional assay yields unsatisfactory results in patients with activated protein C resistance. Blood Coag Fibrinol 1995; 6: 286-287.

(45) Gandrille S, Borgel D, Eschwege-Gufflet V, et al. Identification of 15 different candidate casual point mutations and three polymorphisms in 19 patients with protein S using a scanning method for the analysis of the protein S active gene. Blood 1995; 85(1): 130-138.

(46) Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 1004-1008.

(47) Griffin JH, Evatt B, Wideman C, et al. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. Blood 1993; 82(7): 1989-1993.

(48) Heijboer H, Brandjes DPM, Büller HR, et al. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. N Engl J Med 1990; 323: 1512-1516.

(49) Halbmayer WM, Haushofer A, Schön R, et al. The prevalence of poor anticoagulant response to activated protein C (APC resistance) among patients suffering from stroke or venous thrombosis and among healthy subjects. Blood Coag Fibrinol 1994; 5: 51-57.

(50) Dahlbäck B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 1396-1400.

(51) Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.

(52) Zoller B, Svensson PJ, He X, et al. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994; 94: 2521-2524.

(53) Zoller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343(8912): 1536-1538.

(54) Beuifé M, Borg JY, Vasse M, et al. Co-segregation of thrombosis with the factor V Q506 mutation in an extended family with resistance to activated protein C. *Br J Haematol* 1994; 89: 659-662.

(55) Voorberg J, Roelse J, Koopman R, et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* 1994; 343: 1535-1538.

(56) Majerus PW. Bad blood by mutation. *Nature* 1994; 369: 14-15.

(57) Rosén S, Johansson K, Lindberg K, et al. Multicenter evaluation of a kit for activated protein C resistance on various coagulation instruments using plasmas from healthy individuals. *Thromb Haemost* 1994; 72(2): 255-260.

(58) Dahlbäck B. Physiological anticoagulation: resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest* 1994; 94: 923-927.

(59) Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993; 342: 1503-1506.

(60) Ma DD, Abond MR, Williams BG, et al. Activated protein C resistance (APC) and inherited factor V (FV) mis-sense mutation in patients with

venous and arterial thrombosis in a haematology clinic. Aust N Z J Med 1995; 25(2): 151-154.

(61) Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. N Engl J Med 1995; 332(14): 912-917.

(62) Carrasco JL. El método estadístico en la investigación médica. EC3 SA (Madrid); 3ª Ed 1986; 136-146.

(63) Armitage P, Berry G. Estadística para la investigación biomédica. Ed Doyma SA (Barc); 1992; 89-186.

(64) Cycowitz Z, Seligshon U, Zivelin A, et al. Resistance to activated protein C: a novel cause of thrombophilia. Harefuah 1995; 129(1-2): 1-5, 80.

(65) Dahlback B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. Thromb Haemost 1995; 74(1): 139-148.

(66) Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major basis of venous thrombosis, is caused by deficient anticoagulant cofactor function of factor V. Haematologica 1995; 80(2): 102-103.

(67) Zöller B, Dahlback B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. Lancet 1994; 343: 1536-1538.

(68) Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. N Engl J Med 1994; 330: 517-522.

(69) Ouriel K, Green RM, DeWeese JA, et al. Activated protein C resistance: prevalence and implications in peripheral vascular disease. J Vasc Surg 1996; 23(1): 46-52.

(70) Dahlback E. Resistance to activated protein C, the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. Functional tests and DNA-based assays, pros and cons. *Thromb Haemost* 1995; 73(5): 739-742.

(71) Márquez JA, Iruin G, Aragués P, et al. Valores normales de ARC/R en ACL 3000 y prevalencia en pacientes no seleccionados con patología trombótica. XXXVI Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. *Sangre* 1994; 39(2): 97.

(72) de Roude H, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-resistance: a critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemost* 1994; 72; 880-886.

(73) Krsnik I, Espinazo N, Padilla MV, et al. Valores de referencia de la resistencia a PCA. XXXVI Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. *Sangre* 1994; 39(2): 98.

(74) Trossaert M, Conard J, Horellou MH, et al. Influence of storage conditions on activated protein C assay. *Thromb Haemost* 1995; 73: 163-164.

(75) Tuddenham EGD. Thrombophilia: the new factor is old factor V. *Lancet* 1994; 343: 1515-1516.

(76) Dahlback E. Molecular genetics of thrombophilia: factor V gene mutation causing resistance to activated protein C as a basis of the hypercoagulable state. *J Lab Clin Med* 1995; 125(5): 566-571.

(77) Dahlback E. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Hemostasis* 1994; 24(2): 139-151.

(78) Tuddenham EGD. Thrombophilia: a new factor emerges from the mists. *Lancet* 1993; 342: 1501-1502.

(79) Díaz Cremades JM, Tapia Martín M, González San Miguel JD, et al. Utilidad del APTT como test de screening de la resistencia a la proteína C activada. XXXVI Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. *Sangre* 1994; 39(2): 98.

(80) Tirado I, Llobet D, Vallvé C, et al. Identificación de la mutación 1691 G-A en el gen del factor V en 5 propósitos con resistencia a la PC activada. XXXVI Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Sangre 1994; 39(2): 19.

(81) Jorquera JI, Montoro JM, Fernández MA, et al. Modificación de la prueba de resistencia a la proteína C activada aplicada al estudio de pacientes con trombosis en tratamiento con antagonistas de la vitamina K. XXXVI Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Sangre 1994; 39(2): 18.

(82) Le DT, Griffin JH, Greengard JS, et al. Use of a generally applicable tissue factor-dependent factor V assay to detect activated protein C-resistant factor Va in patients receiving warfarin and in patients with a lupus anticoagulant. Blood 1995; 85(7): 1704-1711.

(83) Lindblad B, Svensson PJ, Dahlback B. Arterial and venous thromboembolism with fatal outcome and resistance to activated protein C. Lancet 1994; 343: 917.

(84) Cushman M, Bhushan F, Bovill E. Plasma resistance to activated protein C in venous and arterial thrombosis (letter). Thromb Haemost 1994; 72: 255-260.

(85) De Stefano V, Leone G. Resistance to activated protein C due to mutated factor V as a novel cause of inherited thrombophilia. Haematologica 1995; 80(4): 344-356.

(86) Bick RL. Blood protein defects associated with thrombosis. Laboratory assessment. Clin Lab Med 1995; 15(1): 125-163.

(87) Cuevas V, Tortosa JI, Rodríguez C, et al. Trombophilia familiar debida a resistencia a la proteína C activada. Sangre 1994; 39(4): 283-286.

(88) Dahlback B. Factor V gene mutation causing inherited resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism. J Intern Med 1995; 237(3): 221-117.

(89) Levy PJ, González FM, Rush DS, et al. Hypercoagulable states as an involving risk for spontaneous venous and arterial thrombosis. *J Am Coll Surg* 1994; 178(3): 266-270.

(90) Altes A, Abellán MT, Mateo J, et al. Hemostatic disturbances in acute ischemic stroke: a study of 86 patients. *Acta Haematol* 1995; 94(1): 10-15.

(91) Boneu B. Predisposing factors for thrombosis. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35(3): 187-190.

(92) Martínez HR, Rangel-Guerra RA, Marfil LJ. Ischemic stroke due to a deficiency of coagulation inhibitors. Report of 10 young adults. *Stroke* 1993; 24(1): 19-25.

(93) Ray SA, Rowley MR, Loh A. Hypercoagulable states in patients with leg ischaemia. *Br J Surg* 1994; 81(6): 811-814.

(94) Halbmayr WM, Mannhalter C, Feichtinger C, et al. Factor XII (Hageman factor) deficiency: a risk factor for development of thromboembolism. Incidence of factor XII deficiency in patients after recurrent venous or arterial thromboembolism and myocardial infarction. *Wien Med Wochenschr* 1993; 143(2): 43-50 (Abstract).

(95) Kato H, Shirahama M, Ohmori K, et al. Cerebral infarction in a young adult associated with protein C deficiency. A case report. *Angiology* 1995; 46(2): 169-173.

(96) Korte W, Otremba H, Lutz S, et al. Childhood stroke at three years of age with transient protein C deficiency, familial antiphospholipid antibodies and F XII deficiency: a family study. *Neuropediatrics* 1994; 25(6): 290-294 (Abstract).

(97) van-Kuijck MA, Rotteveel JJ, van-Oostrom CG, et al. Neurological complications in children with protein C deficiency. *Neuropediatrics* 1994; 25(1): 16-19 (Abstract).

(98) Kazui S, Kuriyama Y, Sakata T, et al. Accelerated brain infarction in hypertension complicated by hereditary heterozygous protein C deficiency. *Stroke* 1993; 24(12): 2097-2103.

(99) Koller H, Stoll G, Sitzer M, et al. Deficiency of both protein C and protein S in a family with ischemic stroke in young adults. *Neurology* 1994; 44(7): 1238-1240.

(100) Anzola GP, Magoni M, Ascari E, et al. Early prognostic factors in ischemic stroke. The role of protein C and protein S. *Stroke* 1993; 24: 1496-1500.

(101) Soto Ortega I, fernández Urquellés M, Ramírez Páyer A, et al. Influencia de al R-PCA en la determinación de PC y PS por técnica coagulométrica. XXXVI Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. *Sangre* 1994; 39(2): 97.

(102) Ireland H, Bayston T, Thompson E, et al. Apparent heterozygous type II protein C deficiency caused by the factor V 506 Arg to Gln mutation (letter). *Thromb Haemost* 1994; 73(2): 731-732.

(103) Faioni EM, Franchi F, Asti D. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic patients: interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost* 1993; 70(6): 1067-1071.

(104) Cooper PC, Hampton KK, Makris M, et al. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. *Br J Haematol* 1994; 88: 201-203.

(105) Llobet D, Tirado I, Urrutia T, et al. Detección de 1 homocigoto y 11 heterocigotos para la mutación 1691G-A del gen del factor V en una extensa familia con resistencia a la PC activada catalogada previamente como déficit de PS funcional. XXXVI Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. *Sangre* 1994; 39(2): 99.

(106) Van Dreden P, Trossaert M, Bara L, et al. Possible influence of factor V Leiden on protein S functional measurement with two different

clotting methods. XV Congress of the ISTH Jerusalem. Thromb Haemost 1995; 73(6): 1365.

(107) Pabinger I, Brucker S, Kyrle PA, et al. Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S: prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening. Blood Coag Fibrinol 1992; 3: 547.

(108) Pabinger I, Schneider B; GTH Study Group on Natural Inhibitors. Thrombotic risk of women with hereditary antithrombin-III, protein C and protein S deficiency taking oral contraceptive medication. Thromb Haemost 1994; 71(5): 548-552.

(109) Lau HK, Teitel JM, Cheung T, et al. Hypofibrinolysis in patients with hypercoagulability: the roles of urokinase and of plasminogen activator inhibitor. Am J Hematol 1993; 44(4): 260-265.

(110) Ceriello A, Pirisi M, Giacomello R, et al. Fibrinogen plasma levels as a marker of thrombin activation: new insights on the role of fibrinogen as a cardiovascular risk factor. Thromb Haemost 1994; 71(5): 593-595.

(111) Hernández Núñez A, Romero Barbero JL, Cáceres Sansaloni A, Pérez de Oteyza C. Alteraciones de la fibrinólisis en los ACV. An Med Intern 1996; 13(3): 107-110.

(112) Raya Sánchez JM, Hernández Nieto L. Papel del sistema fibrinolítico en la fisiología de los accidentes cerebrovasculares agudos. Ann Med Intern 1996; 13(3): 105-106.

(113) Ferro D, Quintarelli C, Rasura M, et al. Lupus anticoagulant and the fibrinolytic system in young patients with stroke. Stroke 1993; 24(3): 368-370.

(114) Bokarewa MI, Blomback M, Egberg N, et al. A new variant of interaction between phospholipid antibodies and the protein C system. Blood Coag Fibrinol 1994; 5(1): 37-41.

(115) Bokarewa MI, Blomback M, Bremme K. Phospholipid antibodies and resistance to activated protein C in women with thrombophilia. *Blood Coag Fibrinol* 1995; 6(5): 417-422.

(116) Ehrenforth S, Radtke KP, Scharrer I. Acquired activated protein C resistance in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74(2): 797-798.

(117) Tsakiris DA, Yasikoff ML, Wolf F, et al. Anticardiolipin antibodies do not seem to be associated with APC resistance in vivo or in vitro. *Ann Hematol* 1995; 71(4): 195-198.

(118) Bokarewa MI, Bremme K, Falk G. Studies on phospholipid antibodies, APC resistance and associated mutation in the coagulation factor V gene. *Thromb Res* 1995; 78(3): 193-200.

(119) Smirnov MD, Triplett DT, Comp PC, et al. On the role of phosphatidyletanolamine in the inhibition of activated protein C activity by phospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 95(1): 309-316.

(120) Potzsch B, Kawamura H, Preissner KT, et al. Acquired protein C dysfunction but not decreased activity of thrombomodulin is a possible marker of thrombophilia in patients with lupus anticoagulant. *J Lab Clin Med* 1995; 125(1): 56-65.

(121) Valentine RJ, Kaplan HS, Green R, et al. Lipoprotein (a), homocysteine and hypercoagulable states in young men with peripheral atherosclerosis: a prospective, controlled analysis. *J Vasc Surg* 1996; 23(1): 53-61.

(122) Scanu AM, Fless GM. Lipoprotein (a) heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest* 1990; 85: 1709-1715.

(123) Levy PJ, González MF, Hornung CA, et al. A prospective evaluation of atherosclerotic risk factors and hypercoagulability in young adults with premature lower extremity atherosclerosis. *J Vasc Surg* 1996; 23(1): 43-45.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS:

AAF	Anticuerpos antifosfolípido
aCl	Anticuerpos anticardiolipina
ACV	Accidente cerebrovascular
AL	Anticoagulante lúpico
Arg	Arginina
AT-III	Antitrombina III
Ca ⁺⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro cálcico
C.V.	Coefficiente de variación
DDV	Veneno de víbora de Russel
D.E.	Desviación estándar
ELISA	Enzimoimmunoensayo
FL	Fosfolípidos
FV	Factor V de la coagulación
FVa	Factor V activado
Gln	Glutamina
GPL	Unidades por mililitro de inmunoglobulina G
HPN	Hemoglobinuria paroxística nocturna
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
LES	Lupus eritematoso sistémico
Lpa	Lipoproteína a
mg/l	Miligramos por litro
MPL	Unidades por mililitro de inmunoglobulina M
n	Número de casos

ng/ml	Nanogramos por mililitro
N.S.	No significativo
PAI-1	Inhibidor del activador tisular del plasminógeno de origen endotelial
PAI-2	Inhibidor del activador tisular del plasminógeno de origen placentario
PC	Proteína C
PCA	Proteína C activada
PS	Proteína S
PTT	Púrpura trombocitopénica trombótica
RIA	Radioinmunoensayo
RPCA	Resistencia a la proteína C activada
S.E.	Significación estadística
SHU	Síndrome hemolítico urémico
TM	Trombomodulina
TP	Tiempo de protrombina
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
Tr	Trombina
TTI	Tiempo de inhibición de tromboplastina
TTPA	Tiempo de tromboplastina parcial activada
TTPAa	Tiempo de tromboplastina parcial activada en presencia de proteína C activada
TTPAn	Tiempo de tromboplastina parcial activada en ausencia de proteína C activada
U/ml	Unidades por mililitro