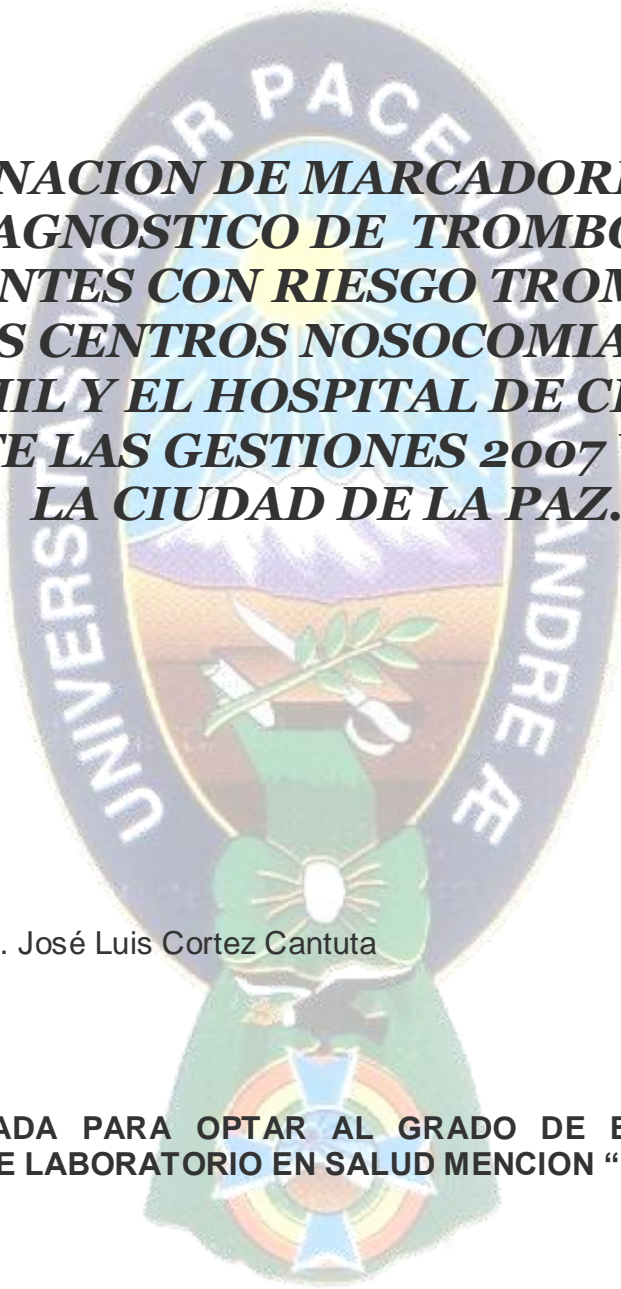


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIO DE LABORATORIO EN DIAGNOSTICO E
INVESTIGACION EN SALUD



***DETERMINACION DE MARCADORES PARA EL
DIAGNOSTICO DE TROMBOSIS
EN PACIENTES CON RIESGO TROMBOFILICO
EN LOS CENTROS NOSOCOMIALES DE
COSSMIL Y EL HOSPITAL DE CLINICAS
DURANTE LAS GESTIONES 2007 Y 2008 EN
LA CIUDAD DE LA PAZ.***

Elaborado por:

Lic. José Luis Cortez Cantuta

**TESIS ELABORADA PARA OPTAR AL GRADO DE ESPECIALIDAD EN
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO EN SALUD MENCION "HEMATOLOGIA"**

**La Paz – Bolivia
2009**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIO DE LABORATORIO EN DIAGNOSTICO E
INVESTIGACION EN SALUD

***DETERMINACION DE MARCADORES PARA EL
DIAGNOSTICO DE TROMBOSIS
EN PACIENTES CON RIESGO TROMBOFILICO
EN LOS CENTROS NOSOCOMIALES DE
COSSMIL Y EL HOSPITAL DE CLINICAS
DURANTE LAS GESTIONES 2007 Y 2008 EN
LA CIUDAD DE LA PAZ.***

Elaborado por:

Lic. José Luis Cortez Cantuta

Asesor Institucional:

Dra. Zorka Castillo

**TESIS ELABORADA PARA OPTAR AL GRADO DE ESPECIALIDAD EN
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO EN SALUD MENCION "HEMATOLOGIA"**

**La Paz – Bolivia
2009**

DEDICATORIA

*En primer lugar a Dios por su amor y por darme la hermosa
oportunidad de vivir.*

*A mis padres, mi esposa y mi familia por todo su amor, apoyo y
comprensión.*

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la doctora Zorka Castillo por todo su apoyo, enseñanza y confianza brindada.

A mis tribunales el Dr. F. Sosa, La Dra. M. Guzman y la Dra. W Strauss por todo su apoyo.

A todo el personal del Instituto SELADIS por brindarme su hospitalidad.

A todos los docentes del Instituto SELADIS por la enseñanza compartida y la amistad brindada.

A mis amigos y amigas por la amistad compartida.

TABLA DE CONTENIDO

	PAG.
1. INTRODUCCION.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
3. JUSTIFICACION.....	6
4. OBJETIVOS.....	8
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
5. MARCO TEORICO.....	9
5.1 GENERALIDADES.....	9
5.2 HIPERCOAGULABILIDAD Y TROMBOSIS.....	10
5.3 TROMBOSIS.....	11
5.4 FORMACION DE UN TROMBO	12
5.4.1 PARED DEL VASO	13
5.4.2 FLUJO SANGUINEO.....	15
5.4.3 CONSTITUYENTES SANGUINEOS.....	16
5.5 ESTADOS QUE PRESISPONEN A LA TROMBOFILIA.....	17
5.5.1 FACTORES HEREDITARIOS	18
5.5.1.1 ANTITROMBINA III.....	19
5.5.1.2 PROTEINA C.....	20
5.5.1.3 PROTEINA S.....	22
5.5.1.4 HOMOCISTEINA.....	24
5.5.1.5 PLASMINOGENO.....	24
5.5.1.6 RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA.....	25
5.5.1.7 FACTOR VIII.....	25
5.5.2 FACTORES ADQUIRIDOS.....	28

5.5.2.1 SINDROME ANTIFOSFOLIPIDICO.....	29
5.5.2.2 ESTASIS SANGUINEA.....	29
5.5.2.3 LESIONES TISULARES TRAUMATICAS Y QUIRURGICAS.....	29
5.5.2.4 CELULAS NEOPLASICAS.....	29
5.5.2.5 DISPOSITIVOS PROTESICOS CARDIOVASCULARES	30
5.5.2.6 ANTICONCEPTIVOS ORALES.....	30
6. DISEÑO METODOLOGICO.....	31
6. 1 POBLACION EN ESTUDIO.....	31
6.2 TAMAÑO MUESTRAL.....	31
6.3 CRITERIOS DE INCLUSION.....	32
6.4 CITERIOS DE EXCLUSION.....	32
6.5 NATURALEZA.....	32
6.6 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	32
7. METODOS.....	32
8. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	33
9. OBTENCION Y CONSERVACION DE MUESTRAS	33
10. DETERMINACION DE PROTEINA C	34
10.1 PROCEDIMIENTO	34
10.2 CURVA DE CALIBRACION.....	35
10.3 INTERPRETACION.....	35
11. DETERMINACION DE PROTEINA S TOTAL	36
11.1 PROCEDIMIENTO.....	36
11.2 CURVA DE CALIBRACION	36
11.3 INTERPRETACION.	37

12. DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA....	37
12.1 PROCEDIMIENTO.....	38
12.2 INTERPRETACION.....	39
13. DETERMINACION DE ANTITROMBINA III.....	39
13.1 PROCEDIMIENTO.....	39
13.2 CURVA DE CALIBRACION.....	40
13.3 INTERPRETACION.....	41
14. DETERMINACION DE FACTOR VIII.....	41
14.1 PROCEDIMIENTO.....	41
14.2 CURVA DE CALIBRACION.....	42
14.3 INTERPRETACION.....	42
15. RESULTADOS Y DISCUSION.....	43
16. CONCLUSIONES.....	55
17. RECOMENDACIONES	56
18. BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXOS I, II Y III	

INDICE DE TABLAS

	PAG.
TABLA 1 Determinación de la concentración de Proteína S total plasmática en pacientes con riesgo de trombosis.....	44
TABLA 2 Determinación de la concentración de Proteína C plasmática en pacientes con riesgo de trombosis	45
TABLA 3 Determinación del índice de la resistencia a la proteína C activada plasmática en pacientes con riesgo de trombosis	47
TABLA 4 Determinación de la concentración de Antitrombina III plasmática en pacientes con riesgo de trombosis	48
TABLA 5 Determinación de la concentración de Factor VIII . plasmática en pacientes con riesgo de trombosis	50
TABLA 6 Causas de trombofilia con riesgo de trombosis en relacion con las pruebas realizadas en pacientes con riesgo de trombosis	52
TABLA 7 Porcentaje de pacientes con el riesgo de trombofilia de acuerdo a las pruebas realizadas en pacientes con riesgo de trombosis.....	53

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	PAG.
FIGURA 1 Cascada de la coagulación.....	9
CUADRO 1 Estados que predisponen a estados de trombofilia primarios o genéticos y secundarios o adquiridos.....	17
FIGURA 2 Vía de la proteína C y factor V LeidenTrombina	22
CUADRO 2 Importancia de las diferentes pruebas para el diagnóstico de trombosis	27
FIGURA 3 El umbral trombótico	31

RESUMEN

La trombosis es la resultante de la interacción de múltiples factores que llevan al desequilibrio entre los mecanismos protrombóticos y los anticoagulantes. En muchos casos, no basta la presencia de un solo factor, sino de varios que sumados pueden traspasar el umbral trombótico que determina la formación del coágulo. El umbral trombótico es un diagrama de la teoría multiriesgo en el desarrollo de la trombosis.

El objetivo principal de este trabajo es el análisis de los marcadores para el diagnóstico de la trombosis en pacientes con riesgo de trombofilia, estos marcadores comprenden a la: proteína C, proteína S total, resistencia a la proteína C activada, Antitrombina III y el Factor VIII.

Se manejó un grupo de 9 pacientes con edades comprendidas entre los 20 y 80 años de edad en el momento del estudio, anteriormente diagnosticados con riesgo de trombosis.

En los resultados obtenidos se detectaron deficiencias en las concentraciones plasmáticas de: proteína S, proteína C, resistencia a la proteína C activada y antitrombina III, en los pacientes en estudio. No se detectó a ningún paciente con concentraciones plasmáticas elevadas de factor VIII, lo que habría sido de gran importancia para consolidar el diagnóstico de trombosis.

Finalmente los datos clínicos de los pacientes presentan una relación estrecha con los resultados obtenidos, lo que además es demostrado con los datos del coeficiente de correlación de Pearson (r) calculados en cada prueba con lo que se evidencia que existe un riesgo de trombosis principalmente venosa en la población en estudio.

1. INTRODUCCION

La trombosis es la formación de un coágulo (trombo) en el interior de las venas o de las arterias, este evento es producido por una alteración en la regulación del proceso de la hemostasia. La hemostasia es el conjunto de procesos que controlan la fluidez de la sangre y la integridad del sistema vascular a través de cuatro grandes mecanismos: la coagulación y anticoagulación controlan la formación del coágulo, mientras que la fibrinólisis y la antifibrinólisis controlan la eliminación del coágulo. La coagulación sanguínea requiere mecanismos de regulación que eviten su propagación y extensión de un modo incontrolado.

La coagulación entonces, está cuidadosamente regulada por: una serie de inhibidores naturales que limitan la generación de trombina y la formación de fibrina; y por el sistema fibrinolítico, que elimina eficazmente los trombos de fibrina. Los defectos hereditarios de estos inhibidores naturales de la coagulación como son: la antitrombina III, proteína C, factor VIII, proteína S y la resistencia a la proteína C activada; las alteraciones del sistema fibrinolítico y ciertas disfibrinogenemias predisponen a las personas a la aparición de trombos.

Los trombos son masas mecánicas que se forman en el interior del sistema cardiovascular sobre superficies denudadas endovasculares o protésicas. Se componen de fibrina insoluble, depósitos de plaquetas y acúmulos de leucocitos y hematíes atrapados en patrones variables que dependen del flujo.

La formación de un trombo es un proceso multifactorial en donde están implicados numerosos factores genéticos y ambientales que interactúan entre sí. La

predisposición trombótica suele identificarse clínicamente. Las características más importantes son los antecedentes familiares, la recurrencia, la edad, la intensidad de la provocación (estímulo trombótico): cirugía, gestación, empleo de anticonceptivos orales y anticuerpos antifosfolipídicos, los cuales son suficientes para originar un estado de trombosis.

Además de una historia médica completa y un examen físico, los procedimientos de diagnóstico para la trombosis requiere una confirmación laboratorial objetiva de los niveles de: Proteína C, Proteína S, Antitrombina III, Factor VIII y un índice de la Resistencia a la proteína C activada, tales determinaciones nos indicaran un riesgo de trombosis cuando los valores de dichas pruebas se encuentren alteradas.

2. ANTECEDENTES

El tromboembolismo venoso (TEV) es un problema significativo en los Estados Unidos, en donde se diagnostican aproximadamente 201 000 pacientes por año, con una incidencia de TEV, relativamente constante de uno por 1 000 habitantes.¹

En estudios llevados a cabo en Worcester, Massachusetts, y Olmsted County, Minnesota, la incidencia de TEV, fue alrededor de uno en 1 000 por año. En ambos estudios el TEV fue más común en hombres que en mujeres, anotando que por cada 10 años de incremento en la edad, la incidencia se duplica. Los hombres presentan un mayor porcentaje de decesos que las mujeres, 13,7% y 12,8%, respectivamente; y los negros más que los blancos, 16,1% y 12,9%, respectivamente. Por extrapolación se puede estimar que más de 250 000 pacientes son internados anualmente en Estados Unidos por este problema.²

En la práctica hospitalaria del Perú se desconoce la incidencia. Sin embargo, las observaciones de White y Romano señalan que la incidencia de TEV también varía con el ancestro étnico. Así, la incidencia es más alta entre los caucasianos y afroamericanos, intermedia entre los hispanoamericanos y más baja entre los asiáticos-americanos; mientras que la incidencia entre nativos americanos es desconocida.³

Alrededor de 50.000-60.000 personas fallecen cada año en Estados Unidos por embolias pulmonares procedentes de una trombosis venosa profunda (TVP), y se

¹ BERBARDETTE F. RODACK "Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas". 2 ed. Buenos Aires, 2005. Pag.650-651

² <http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/spmi/v14n2/trombosis.htm>

³ Noticias de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

tratan muchos más casos. Se produce TVP en alrededor del 10-30% de todos los pacientes de cirugía general y de ortopedia mayores de 40 años.

Algunas investigaciones recientes indican que ciertos grupos étnicos, como los árabes, tienen un mayor riesgo por la elevada incidencia de alteraciones hereditarias de la coagulación.⁴

En el país de México de acuerdo a un estudio realizado en el servicio de hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI a cargo del Dr. Luis Meillon, Jefe del servicio, se encontró que se producen hasta 160 mil casos al año de tromboembolismo venoso (TEV), siendo el riesgo de trombosis en pacientes tanto quirúrgicos como no quirúrgicos (pacientes hospitalizados por cualquier otra causa).

La categoría de la enfermedad tromboembólica venosa incluye dos entidades: trombosis venosa profunda (TVP) y embolia pulmonar (EP). “En los últimos años, el diagnóstico, prevención y tratamiento de estos trastornos han experimentado cambios que hoy requieren de una revisión del tema, debido a que sólo el 20% de las tromboembolias pulmonares son diagnosticadas en vida”.⁵

Es importante también señalar que de acuerdo a cifras de la Organización Mundial de la Salud del 29 de junio del 2007 que los riesgos de sufrir una trombosis o embolia pulmonar se duplican durante los viajes de más de 4 horas, sean estos en avión, autobús o en tren. Esto es conocido como el síndrome de la clase turista y es reconocido como tema de salud pública por la OMS.⁶

⁴ <http://www.terra.es/personal2/rmm0005/trombosis.htm>

⁵ <http://www.terra.es/personal2/rmm0005/trombosis.htm>

⁶ [http://www.esmas.com/salud/home/noticiashoy/centro de noticias ONU 14 de Abril 2009](http://www.esmas.com/salud/home/noticiashoy/centro%20de%20noticias%20ONU%2014%20de%20Abril%202009)

3. JUSTIFICACION

La trombosis figura entre una las causas más frecuentes de enfermedad y muerte en los enfermos hospitalizados, la complicación principal es el desprendimiento del trombo y su desplazamiento provocando accidentes tromboembólicos.

La formación de un trombo es un proceso multifactorial en que están implicados numerosos factores genéticos y ambientales que interactúan entre sí, por lo que su diagnóstico se hace un tanto difícil. En los últimos años se han realizado diversos intentos para encontrar pruebas de laboratorio capaces de predecir el desarrollo de una trombosis o de detectar un proceso trombótico oculto antes de que se manifieste clínicamente.

Entre los factores de riesgo trombótico, se distinguen dos grandes grupos, unos primarios, producidos por anomalías de la hemostasia precisas y claramente identificadas, y otros secundarios, entre los que se incluyen diversas situaciones clínicas asociadas a un riesgo aumentado de trombosis, en las que ésta debe tener un origen complejo y multifactorial.

Entre los factores primarios se han identificado diversas alteraciones de la hemostasia entre estas tenemos una alteración en las proteínas anticoagulantes naturales.

En nuestro medio no se cuenta con la determinación de estas pruebas y la importancia de conocer el mal funcionamiento de las proteínas anticoagulantes estriba en que ayudan a predecir en el paciente un estado trombofílico. De hecho,

la trombosis es la principal causa de mortalidad y morbilidad en países desarrollados.

Por lo anteriormente citado en el presente trabajo se pretende demostrar con pruebas de laboratorio, alteraciones de la hemostasia principalmente hereditarias, que afectan a una o varias proteínas y factores de la coagulación y que se asocian a la aparición de trombosis. Entre estos tenemos a los inhibidores naturales de la coagulación como ser: Antitrombina III, Proteína C, Factor VIII, Proteína S y la resistencia a la proteína C activada.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la aplicabilidad de los marcadores para el diagnóstico de trombosis en pacientes con sospecha o diagnóstico de trombofilia en los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de Clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comprender la importancia de los marcadores: Proteína C, Proteína S total, Antitrombina III, Resistencia a la proteína C activada y el factor VIII, en el diagnóstico de la trombosis.
- Determinar la concentración plasmática de proteína C en pacientes con riesgo de trombosis.
- Determinar la concentración plasmática de proteína S total en pacientes con riesgo de trombosis.
- Determinar la concentración plasmática de antitrombina III en pacientes con riesgo de trombosis.
- Determinar la concentración plasmática de Resistencia a la proteína C activada en pacientes con riesgo de trombosis.
- Determinar la concentración plasmática de Factor VIII en pacientes con riesgo de trombosis.

5. MARCO TEORICO

5.1 GENERALIDADES

La sangre es líquida mientras se encuentra dentro del organismo, pero se transforma en un gel resistente unos pocos minutos después de salir del mismo.

La hemostasia es la combinación de acontecimientos celulares y bioquímicos que funcionan en armonía para mantener la sangre líquida dentro de las venas y arterias, evitar la pérdida de sangre en las lesiones mediante la formación de trombos y restablecer el flujo sanguíneo durante el proceso de curación.⁷

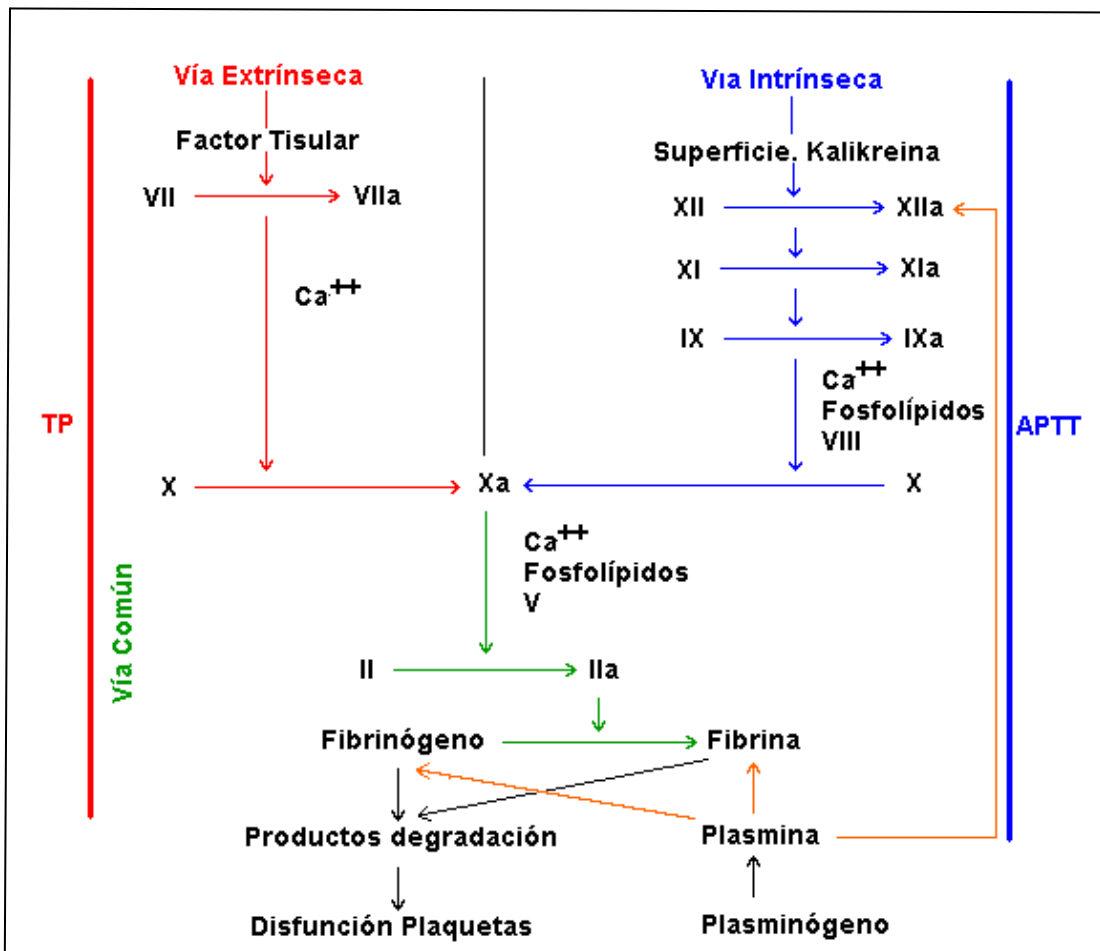


Figura 1. Cascada de la coagulación. <http://www.explored.com.ec/guia/fas872.htm>

⁷ BERNARDETTE F. RODACK "Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas". 2 ed. Buenos Aires, 2005. Pag. 613-614

Cuando se altera el equilibrio de los sistemas de hemostasia, la trombosis (formación de un trombo) o la hemorragia pueden ser fatales. Los científicos de laboratorios clínicos y los hematólogos investigan todos los sistemas de hemostasia principales, los vasos sanguíneos, las células sanguíneas y las proteínas plasmáticas para prevenir, predecir, diagnosticar y manejar la enfermedad hemostática.

La producción de un trombo *in vivo* ocurre como consecuencia patológica de la activación de un mecanismo normal, el mecanismo hemostático. Una vez formado, según su tamaño y localización, puede ocupar totalmente la luz del vaso (trombo oclusivo), obstruyendo el flujo y causando isquemia o infarto de órganos, o adherirse a un solo lado de la pared del vaso (trombo mural), en cuyo caso persiste el flujo sanguíneo a través del vaso afectado. La trombosis, arterial o venosa, junto a los procesos embólicos que pueden aparecer como complicación de una trombosis son, probablemente, la causa más importante de enfermedad y muerte en los países desarrollados en la actualidad.

5.2 HIPERCOAGUBILIDAD Y TROMBOSIS

EL término hipercoagulabilidad se ha usado abundantemente con variadas acepciones, lo que ha conducido a confusión. El concepto de hipercoagulabilidad en relación con la trombosis se refiere a los cambios pretrombóticos de la sangre que pueden ser detectadas y que intervienen patogénicamente en el desarrollo de la trombosis o pueden utilizarse para predecir un estado trombótico. Una modificación de la sangre sólo cumplirá estas condiciones si es específica de los

estados pretrombóticos y si se modifica paralelamente a los cambios del estado trombótico.

Entre las situaciones de hipercoagulabilidad se pueden distinguir por una parte, las consideradas primarias, en las cuales el riesgo trombótico es producto de una anomalía perfectamente establecida, expresión de un trastorno cuantitativo o cualitativo generalmente congénito de una determinada proteína del sistema hemostático. Existen dos marcadores de carácter adquirido que definen un estado de hipercoagulabilidad primaria: el anticoagulante lúpico y los anticuerpos anticardiolipinas. Por otra parte existen hipercoagulabilidades en las que el riesgo trombótico está definido por una enfermedad, cuyos marcadores son significativo de que la coagulación intravascular se ha desencadenado.⁸

5.3 TROMBOSIS

La trombosis es la formación de un cóagulo en el interior de las venas o de las arterias. Cuando el trombo se localiza en una vena profunda (venas que van por el interior del cuerpo) se habla de trombosis venosa profunda.

La trombosis venosa se produce por lesión o enfermedad de las venas, sobre todo de las piernas, por un trauma o una fractura, o por permanecer inmobilizado durante mucho tiempo. Algunas operaciones quirúrgicas importantes, en particular las de la cadera, producen lesiones en las venas que predisponen a una trombosis. Algunos medicamentos (como los anticonceptivos orales) o la obesidad y la vida sedentaria favorecen la aparición de una trombosis. También existen en

⁸ J. SANS-SABRAFEN. "Hematología clínica". 3 ed. Barcelona-España. 2005. p 633-634

algunos individuos factores hereditarios, siendo las mujeres más propensas que los hombres a padecer esta enfermedad.

Los coágulos formados en las venas de las piernas pueden romperse y viajar a los pulmones obstruyendo los vasos pulmonares y produciendo la embolia pulmonar. La embolia pulmonar es una enfermedad grave que produce dificultades para respirar, dolor e incluso la muerte.

La trombosis arterial es el resultado de la arteriosclerosis (endurecimiento de las arterias por depósitos de calcio o de grasas con pérdida de la flexibilidad y estrechamiento) de los vasos sanguíneos. Cuando se produce un coágulo en una arteria, la sangre arterial que lleva el oxígeno a los tejidos deja de pasar produciendo un sufrimiento debido a la isquemia. Cuando el coágulo se forma en la arteria coronaria se produce un infarto de miocardio que puede dañar seriamente al corazón o producir la muerte. Cuando el coágulo se forma en alguna de las arterias que llevan la sangre al cerebro, se produce una isquemia cerebral que puede dañar parte del cerebro.

5.4 FORMACION DE UN TROMBO

En 1856 Virchow, planteó que la tríada formada por las estructuras vasculares, el flujo sanguíneo y los factores circulantes tenía gran importancia en la patogenia de la trombosis. Esta tríada aún sigue vigente y es la interacción de estos tres factores la que condiciona la aparición de una trombosis en el compartimiento vascular. En la trombosis arterial la alteración de la pared vascular y la activación plaquetaria desempeñan el papel más importante (trombo blanco). Por el

contrario, en la trombosis venosa la estasis circulatoria y las alteraciones de los mecanismos de hemostasia son los factores con mayor importancia patogénica, sin que se haya demostrado que la lesión de la pared del vaso desempeñe un papel significativo, excepto en circunstancias especiales, como la cirugía de cadera. El trombo venoso es habitualmente rico en fibrina y hematíes (trombo rojo).⁹

5.4.1 PARED DEL VASO

El endotelio normal actúa como una barrera natural, previniendo la formación del trombo en la pared del vaso y evitando que los constituyentes de la sangre interaccionen con las estructuras subendoteliales. Existe en el endotelio una serie de mecanismos capaces de limitar la formación y el crecimiento del trombo. Entre ellos tienen importancia dos moduladores de la actividad de la trombina: el heparansulfato, un glucosaminoglucano que cataliza la inhibición de trombina y factor Xa por Antotrombina III (AT-III), y la trombomodulina, que unida a la trombina es capaz de aumentar la capacidad de esta última y activar a la proteína C. Por otra parte, el endotelio libera activador del plasminogeno tisular (TPA), lo que provoca la activación de la fibrinólisis. Asimismo, sintetiza Prostaglandina I₂ (PGI₂), que inhibe la agregación plaquetaria, ácido 13-hidroxióctadecadienoico, que inhibe la adherencia plaquetaria, y óxido nítrico, capaz de inhibir la adherencia y la agregación.

En las arterias la trombogénesis es promovida por la pérdida del endotelio, que puede ser causada por estrés hemodinámico, productos derivados del tabaco,

- ⁹ Mark H. Beers, M.D. "El manual Merck" [CD ROM] Madrid, España: Harcourt, S. A.; 2006.

aumento de colesterol y enzimas liberadas por plaquetas y leucocitos. La trombosis arterial casi siempre ocurre como una complicación de la arteriosclerosis. La fisura o la rotura de una placa ateromatosa exponen el subendotelio a la sangre circulante, formándose un trombo en la íntima que puede invadir la luz vascular. Este trombo puede embolizar, provocar una oclusión aguda de la luz vascular o incorporarse gradualmente a la placa. Se han propuesto dos hipótesis para explicar la patogenia de la aterosclerosis: la hipótesis lipídica y la de la lesión endotelial crónica. La primera postula que un aumento de colesterol lipoproteína de baja densidad (LDL-C), provoca su penetración en la pared arterial con acumulación en las células musculares lisas y macrófagos. Las LDL-C son oxidadas en presencia de células endoteliales, lo que las hace adquirir capacidad quimiotáctica sobre los monocitos. Ello explica la aparición temprana de monocitos y la retención de macrófagos en la subíntima. Además, las LDL-C oxidadas son citotóxicas para las células endoteliales y pueden ocasionar la pérdida de estas células en las lesiones más avanzadas. La segunda hipótesis propone que la lesión endotelial provoca pérdida de endotelio, adherencia de plaquetas al subendotelio, agregación plaquetaria y liberación de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el cual induce replicación y migración de células de músculo liso en la íntima y provoca la formación de una placa fibrosa. Las células musculares lisas sintetizan y segregan colágeno y glucosaminoglucanos que contribuyen al aumento de la lesión. Ambas hipótesis están estrechamente ligadas entre sí.

5.4.2 FLUJO SANGUINEO

El flujo sanguíneo condiciona el tamaño, la localización y la estructura del trombo.

En el torrente sanguíneo los hematíes tienden a ocupar la porción central de la luz desplazando selectivamente las plaquetas hacia la periferia.

En regiones donde se producen turbulencias aparecen agregados plaquetarios en la parte exterior de la corriente sanguínea y, simultáneamente, se acumulan en dichas zonas factores de coagulación activados y mediadores de la agregación plaquetaria. Todo ello facilita la formación y el crecimiento del trombo. También pueden acumularse agentes capaces de lesionar el endotelio en las zonas de turbulencia.

Otro efecto del flujo sanguíneo es limitar el crecimiento del trombo; dado que en las zonas de flujo rápido se diluyen pronto los factores de coagulación activados y las sustancias que activan las plaquetas, es difícil que en dichas zonas se produzca un trombo oclusivo.

La estasis sanguínea constituye el principal factor predisponente de la trombosis venosa, como lo demuestra el hecho de que su localización más frecuente sea en las extremidades inferiores, en las que hay enlentecimiento de la corriente sanguínea, y sobre todo en el fondo de las válvulas venosas en las que el flujo es especialmente lento. Aunque la naturaleza del factor que convierte la estasis en trombosis no se conoce en profundidad, parece que la hipercoagulabilidad sanguínea es el principal factor adicional. A partir de Sewitt se reconocen cuatro estadios en el desarrollo de la trombosis venosa: *a)* estasis en el sistema valvular con depósito de hematíes, plaquetas y leucocitos, junto a generación local de trombina, gracias al aporte de factores de coagulación activados; *b)* la trombina

generada induce agregación de plaquetas y formación de fibrina, con aparición de un agregado primario, o *nido*, de plaquetas y fibrina; c) el depósito de capas sucesivas de plaquetas y fibrina sobre el agregado primario determina su propagación, y d) cuando el crecimiento es suficiente se producen bloqueo del flujo venoso, por oclusión de la luz, y extensión retrógrada del trombo.

5.4.3 CONSTITUYENTES SANGUINEOS

Aunque no está claro el papel de las anomalías del sistema hemostático en la fisiopatología de la trombosis, se ha demostrado la existencia de diversas alteraciones que indican activación plaquetaria, activación de la coagulación o inhibición de fibrinólisis en individuos con trombosis y en situaciones clínicas que cursan con un aumento acusado de su incidencia. En los pacientes con trombosis arterial es frecuente encontrar acortamiento de la supervivencia plaquetaria, hecho que demuestra el papel de las plaquetas en la génesis de estos episodios. En el curso de trombosis venosa se han descrito elevaciones de diversos factores de coagulación y disminución de inhibidores, así como alteraciones del sistema fibrinolítico, todo ello como expresión de la importancia de la alteración del mecanismo hemostático en este tipo de trombosis.

En los últimos años se han realizado diversos intentos para encontrar pruebas de laboratorio capaces de predecir el desarrollo de una trombosis o de detectar un proceso trombótico oculto antes de que se manifieste clínicamente. Las de mayor utilidad son las pruebas capaces de detectar la presencia de proteínas específicas plaquetarias liberadas en el proceso de activación, péptidos estables derivados de la activación de factores de coagulación y complejos activador-inhibidor. Sin embargo, la aplicación de muchas de estas pruebas plantea algunos problemas,

dado que pueden confirmar la existencia de un estado de hipercoagulabilidad, pero no demostrar si las anomalías son causa, consecuencia o coincidencia.¹⁰

5.5 ESTADOS QUE PREDISPONEN A LA TROMBOFILIA

Clásicamente se ha diferenciado los estados de trombofilia en primarios (hereditarios) y secundarios (adquiridos). Si bien esta clasificación es útil en categorizar las causas de trombosis y dirigir el estudio, actualmente es bastante simplista. El mejor conocimiento de la frecuencia relativa de cada una de ellas permite dar lugar a otros tipos de clasificaciones como: según la “potencia trombogénica (incidencia de trombosis en pacientes portadores de estados de hipercoagulabilidad), si son predominantemente venosos o arteriales o ambas, o según el sitio en el cual ocurre las trombosis (extremidades o viscerales).¹¹

ESTADOS PRIMARIOS	ESTADOS SECUNDARIOS
Déficit Antitrombina III	Embarazo
Déficit Proteína C	Inmovilidad
Déficit de proteína S	Trauma
Factor V Leiden (resistencia a la proteína C activada)	Pos-operatorio
Mutación del gen protrombina 20210	Anticonceptivos orales
Niveles elevados de factor VIII	Síndrome antifosfolipídico
Hiperhomocisteinemia	Síndrome nefrótico
Disfibrinogenemia	Síndrome mieloproliferativo
Déficit del factor XII	
Trastornos de generación del plasminogeno	

Cuadro 1. Estados que predisponen a estados de trombofilia primarios o genéticos y secundarios o adquiridos.

¹⁰ FARRERAS ROZMAN. Medicina interna. 16 ed. En CD_ROM p 1797-1799.

¹¹ <http://escuela.med.puc.cl/publ/TemasMedicinaInterna/trombofilia.html>

5.5.1 FACTORES HEREDITARIOS

Los pacientes con defectos congénitos de la coagulación plasmática presentan habitualmente hemorragias musculares, articulares y en las cavidades corporales, horas o días después de sufrir un traumatismo. La mayor parte de los trastornos hereditarios de la coagulación plasmática se deben a defectos de una sola proteína de la coagulación o procesos ligados al cromosoma X como son los déficit de los factores VIII y IX, que son los responsables de la mayoría de los trastornos congénitos de la coagulación. Estos pacientes merecen atención especial porque además de sangrar intensamente, pueden padecer invalidez crónica y requerir un tratamiento médico especializado. Con raras excepciones, los trastornos de coagulación que conocemos producen la prolongación del tiempo de protrombina(PT), del tiempo parcial de tromboplastina activada(APTT), o de ambos.¹²

Las probabilidades de que se produzca un episodio trombótico para individuos heterocigotos con deficiencia de antitrombina, proteína C, S, o resistencia a la Proteína C activada son dos a cinco veces mayores que la incidencia de coagulación basal para la población general. La deficiencia homocigota de proteína C causa purpura fulminante grave en lactantes. El riesgo de trombosis es del 100%, pero los médicos pueden mantener a los niños vivos con un tratamiento con anticoagulantes. Es esencial la supervisión por el laboratorio. Las deficiencias homocigotas de antitrombina o proteína S raras veces se describen, lo que indica que suelen ser incompatibles con la vida. La mutación Leiden homocigoto del

¹² HARRISON. Principios de Medicina interna. 16 ed. Mexico, DF. 2005. Pag. 762-763.

factor V tiene un odds ratio (razón de probabilidad) de 80 veces de trombosis venosa con respecto a lo normal.¹³

5.5.1.1 ANTITROMBINA III

La antitrombina III (AT-III) es una glucoproteína producida en el hígado, en las células endoteliales y posiblemente en los megacariocitos. Es una proteasa antiserina que actúa para inactivar todas las serinas proteasas en la cascada de la coagulación. Se une y neutraliza a la trombina y a los factores XIIa XIa, IXa, IIa así como a la plasmina y a la calicreína. Su función más significativa es la inhibición de la trombina (IIa). Como la trombina desempeña una función importante en la coagulación, su inhibición proporciona una regulación significativa de la formación del coágulo. La antitrombina fue la primera de las proteínas plasmáticas reguladoras de la coagulación en identificarse y la primera en analizarse de rutina en el laboratorio clínico de hemostasia.

La AT-III es el inhibidor más importante de la trombina. Su efecto es acelerado por la heparina, la cual cambia la conformación de la AT-III y permite que se una más rápidamente a la trombina.

Cuando se detectan niveles disminuidos de AT-III esto es indicativo de tendencia trombótica. Solo la detección de la actividad funcional puede dar una respuesta directa de esta condición. En algunas familias varios miembros pueden tener una combinación de trombo embolismos recurrentes y antitrombina plasmática disminuida (30%-60%). Un número significativo de pacientes con trombosis

¹³ BERNARDETTE F. RODACK "Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas". 2 ed. Buenos Aires, 2005. pag. 654

mesentérica tienen deficiencia de AT-III recurrente adquirida o hereditaria y esta se vincula con trombosis venosa. La deficiencia adquirida de AT-III es mucho más frecuente que la hereditaria y algunas de sus causas incluyen terapia con: heparina, quimioterapia y con L- asparaginasa también con alteraciones como: coagulación y fibrinólisis intravascular/coagulación intravascular diseminada, enfermedad hepática, síndrome nefrótico. La deficiencia hereditaria de AT-III es un desorden autosómico dominante relativamente raro asociado a diátesis trombótica. El 1-2 % de las poblaciones con trombosis venosa tiene una deficiencia hereditaria de antitrombina. Esta también puede ocurrir debido a una glicosilación defectuosa de esta proteína en individuos con síndromes deficientes de glicoproteína – carbohidrato.

Los heterocigotos para los defectos de antitrombina, de proteína C y proteína S tienen una reducción de un 50% de la concentración de la proteína o la presencia de una mezcla de moléculas normales y mutantes. Estas moléculas malfuncionantes han sido identificadas en algunos pacientes con trombosis.

5.5.1.2 PROTEINA C

Es una pro enzima anticoagulante dependiente de la vitamina K, sintetizada en el hígado y que circula en el plasma. Es activada por la trombina en presencia de un cofactor de las células endoteliales, llamado trombomodulina y se convierte en una enzima activa, la proteína C activada (PCA). La PCA actúa como un anticoagulante al inactivar proteolíticamente las formas activadas de los Factores de Coagulación V y VIII (Factores Va y VIIIa), impidiendo la formación de fibrina.

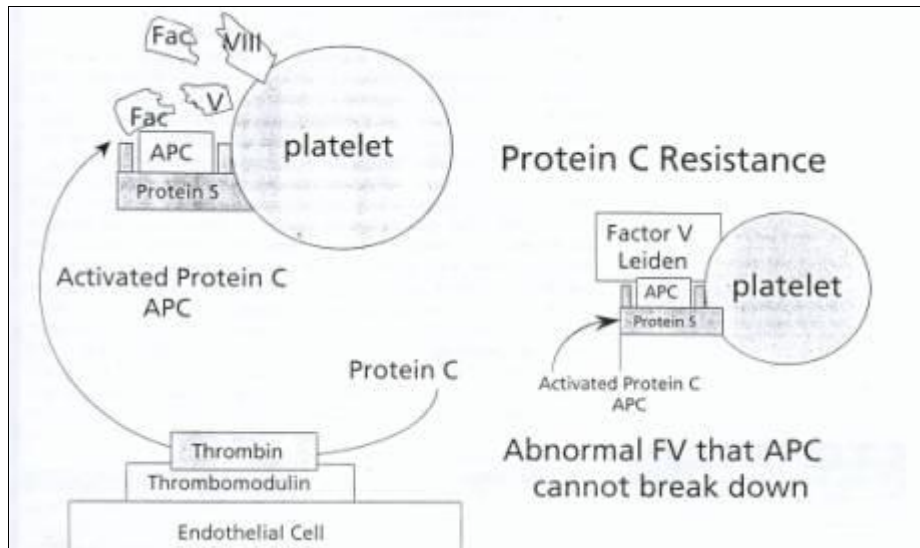
La PCA también puede estimular la fibrinólisis y acelerar la lisis del coágulo al inactivar el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1). La deficiencia congénita heterocigótica de proteína C puede predisponer a eventos tromboticos, principalmente trombo embolismo venoso. También se puede acompañar de trombosis arterial (ACV, infarto del miocardio, etc.). Esta condición también puede predisponer al desarrollo de necrosis de la piel asociada a la cumarina. Esta necrosis se ha presentado durante el inicio de la terapia oral con anticoagulantes.

Se han reconocido dos tipos de deficiencia hereditaria heterocigótica de proteína C: la tipo I, en la cual están disminuidas tanto la función como el antígeno de proteína C; y la tipo II, en la cual la función de la proteína C está disminuida con un antígeno normal.

Las deficiencias adquiridas de proteína C se pueden presentar asociadas a: deficiencia de vitamina K, anticoagulación oral con compuestos de cumarina, enfermedad hepática, y coagulación y fibrinólisis intravascular/coagulación intravascular diseminada (CFI/CID). No se conoce con certeza la importancia hemostática clínica de la deficiencia adquirida de proteína C.

En la evaluación inicial de pacientes en los que se sospecha una deficiencia congénita de proteína C (historia personal o familiar de diátesis trombotica) se recomienda la determinación de la actividad funcional de la proteína C en lugar de la determinación del antígeno de proteína C.

Los casos poco frecuentes de déficit homocigótico de la proteína C presentan coagulación intravascular fulminante en el período neonatal y requieren un diagnóstico y tratamiento inmediato con un mayor riesgo de trombosis.



*Figura 2. Vía de la proteína C y factor V Leiden Trombina.
www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/analisis/p3.htm*

5.5.1.3 PROTEINA S

Es una glicoproteína dependiente de vitamina K, sintetizada predominantemente dentro del hígado. También es sintetizada en las células endoteliales y está presente en las plaquetas.

Como parte de los mecanismos reguladores de la coagulación, la proteína S actúa como un cofactor necesario para la proteína C activada (PCA) en la inactivación proteolítica de los factores pro-coagulantes Va y VIIIa. Alrededor del 60% del antígeno de proteína S plasmática total circula unida a la proteína de unión C4b y la restante circula libre. Solo la libre tiene actividad anticoagulante.

La deficiencia congénita de proteína S es un trastorno autosómico codominante, presente en el 1-3% de los pacientes con trombo embolismo venoso. Los portadores de la deficiencia heterocigótica de proteína S tienen un aumento de 10 veces en el riesgo de trombo embolismo venoso. Otras manifestaciones son abortos recurrentes, complicaciones del embarazo (pre-eclampsia, desprendimiento prematuro de placenta, restricción del crecimiento intrauterino, y natimueños), y posiblemente trombosis arterial. Se han descrito tres tipos de deficiencia heterocigótica congénita de proteína S de acuerdo con los niveles de antígeno total de proteína S, antígeno libre de proteína S, y actividad plasmática de proteína S (cofactor de PCA).

La deficiencia homocigótica de proteína S es una condición rara, pero se puede manifestar como púrpura fulminante neonatal, lo que refleja una coagulación y fibrinólisis intravascular/ coagulación intravascular diseminada (CFI/CID) severas, causadas por la ausencia o deficiencia de proteína S plasmática.

La deficiencia adquirida de proteína S es mucho más común que la deficiencia hereditaria y generalmente se desconoce su importancia hemostática. Entre las muchas causas de esta se encuentran: deficiencia de vitamina K, terapia anticoagulante oral, enfermedad aguda, enfermedad hepática, coagulación y fibrinólisis intravascular/coagulación intravascular diseminada (CFI/CID), púrpura trombótica trombocitopénica, embarazo, anticoncepción oral o terapia estrogénica, síndrome nefrótico y anemia falciforme.

La determinación de la actividad funcional de la proteína S es útil en la evaluación de pacientes con historia de trombo embolismo venoso.

El déficit de ambas proteínas puede causar un síndrome idéntico de trombosis repetidas y embolias pulmonares.¹⁴

5.5.1.4 HOMOCISTEINA

Los niveles de homocisteína plasmática se encuentran elevados en diez o más veces en la deficiencia homocigota de cistationina a-sintasa. Estos pacientes tienen un mayor riesgo de presentar tromboembolias arteriales y venosas. La hiperhomocisteinemia también se correlaciona intensamente con la trombosis aterosclerótica. Aparecen casos leves en la deficiencia heterocigota de cistationina b-sintasa y en otras alteraciones del metabolismo del folato, como la deficiencia de metiltetrahidrofolato deshidrogenasa. Las concentraciones de homocisteína pueden normalizarse suplementando la dieta con folato y, si se requiere, con piridoxina, si bien no se ha demostrado que este hecho reduzca el riesgo de trombosis.

5.5.1.5 PLASMINOGENO

Los trastornos hereditarios del plasminógeno (disminución de la concentración del activador del plasminógeno tisular o aumento de los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno) son raros y se asocian a tromboembolias venosas inexplicables en pacientes jóvenes. Las pruebas de detección deparan numerosos

¹⁴ ALFONSO BALCELLS. "La clínica y el laboratorio". 20 ed. Barcelona-Madrid, 2006. p 207-208.

resultados falsos positivos y falsos negativos. Las posibles alteraciones fibrinolíticas hereditarias deben estudiarse en un centro de investigación.

5.5.1.6 RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA

Este fenómeno fue descrito por primera vez en 1993 por Dahlback, en un paciente con importante historia familiar y personal de trombosis. Encontró que al agregar proteína C activada (APC) al plasma del paciente, no se evidenció una prolongación del TTPA como se esperaba. Esto es lo que se denomina la resistencia a la proteína C activada. En los años posteriores, se encontró que el defecto no recaía en la proteína C, sino en el sitio de clivaje en el Factor V. Aproximadamente 90 al 95% de los casos se debe a una mutación en la posición 506 de arginina por glutamina que confiere una resistencia a la degradación por la APC. La mutación es lo que se denomina actualmente como Factor V Leiden, por la ciudad en la que se describió por primera vez.

A diferencia de las deficiencias de proteína C, S y antitrombina III, que usualmente manifiestan trombosis precozmente en la vida, el riesgo de enfermedad tromboembólica en la mutación factor V Leiden aumenta con la edad, de hecho, es una causa importante incluso en la tercera edad.¹⁵

5.5.1.7 FACTOR VIII

El factor VIII es una proteína bicatenaria de 285 Daltons (Da) traducida del cromosoma X sensible a la trombina y con una vida media de 10 a 12 horas. La

¹⁵ <http://escuela.med.puc.cl/publ/TemasMedicinalInterna/trombofilia.html>

trombina cliva el factor VIII circulante y libera un polipéptido grande denominado dominio B que se disocia de la molécula. Esto deja detrás un heterodimero dependiente del calcio que desprende de la molécula portadora de factor von Willebrand y se une al fosfolipido y al factor IX a. El complejo VIIIa-IXa, a veces denominado “tenasa”, cliva y activa el factor X. Por consiguiente la deficiencia del factor VIII retarda la producción de la vía de la coagulación de trombina y niveles altos provocaran un estado de trombosis.

Los niveles de Factor VIII dependen tanto de factores genéticos como adquiridos. Se recomienda comenzar con el estudio de la actividad funcional del Factor VIII. Estos niveles deben permanecer persistentemente elevados después de meses del episodio trombótico lo que permitirá distinguirlo de elevaciones transitorias como reactante de fase aguda.

Prueba	Mide	Se solicita para	Resultados anómalos indican
Actividad antitrombina III	Función del factor antitrombina	Evaluar la presencia de coágulos recurrentes	Una actividad baja puede aumentar el riesgo trombótico
RPCA (Resistencia a la proteína C activada)	Resistencia a la degradación del factor V activado	Evaluar la presencia de coágulos recurrentes	La mutación del Factor V Leiden necesita confirmación analizando la mutación
Actividad de la proteína C	Mide la función de la proteína C	Evaluar la presencia de coágulos recurrentes	La proteína C ayuda a ralentizar la cascada de la coagulación degradando los factores V y VIII activados. Si su actividad es baja, aumenta el riesgo de trombosis.
Antígeno de la proteína C	Mide la cantidad de proteína C	Cuando disminuye la actividad de la proteína C	Si está disminuida, puede deberse a trastornos adquiridos o heredados. Riesgo aumentado de trombosis.
Actividad de la proteína S	Mide la función de la proteína S	Evaluar la presencia de coágulos recurrentes	La proteína S es un cofactor que ayuda a la proteína C.
Antígeno de la proteína S (total y libre)	Mide la cantidad total y libre de proteína S	Cuando la actividad de la proteína S está disminuida	Únicamente la proteína S libre puede ayudar a la proteína C.
Mutación 20210 A en la protrombina	Mutación genética	Evaluar la presencia de coágulos recurrentes	Riesgo aumentado de trombosis

Cuadro 2. Importancia de las diferentes pruebas para el diagnóstico de trombosis.

5.5.2 FACTORES ADQUIRIDOS

A lo largo de la vida adquirimos una cantidad de hábitos y condiciones que pueden mantener o dañar nuestros sistemas de homeostasia. Su diversidad hace difícil indicar los factores precisos que contribuyen con la trombosis o determinar cuales tienen mayor influencia. Además estos factores parecen contribuir tanto con la trombosis venosa como con la arterial en grados variables. Sin embargo, es claro que al menos el 80% de todos los episodios trombóticos se asocian de algún modo con los factores de riesgo que adquirimos durante la vida y que se relacionan ya sea con el estilo de vida o con la enfermedad.

La inmovilización se padece en situaciones cotidianas como manejo de distancias largas, viajes en avión, ropa ajustada o la posición habitual de piernas cruzadas. La inmovilización crónica se refiere a la confinación a una cama o una silla de ruedas. La obesidad puede contribuir con la trombosis por la inmovilización. Estas situaciones implican la disminución en el uso de músculos de la pantorrilla, que en condiciones normales ayudan en el bombeo de la sangre hacia arriba.

Además de las situaciones cotidianas, diversas enfermedades conllevan riesgo de trombosis, por ejemplo: los anticuerpos antifosfolipídicos transitorios y crónicos, coagulación intravascular diseminada, trastornos mieloproliferativos, la trombocitemia esencial, la policitemia vera, las enfermedades inflamatorias crónicas y el síndrome nefrótico.¹⁶

¹⁶ BERNARDETTE F. RODACK "Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas". 2 ed. Buenos Aires, 2005. pag 651 - 653

5.5.2.1 SINDROME ANTIFOSFOLIPIDICO

Este síndrome incluye tromboembolias que afectan sobre todo a la vasculatura del sistema nervioso central (SNC), trombocitopenia y pérdida fetal en asociación con anticuerpos autoinmunitarios dirigidos contra los componentes de la membrana fosfolípida. Las pruebas de coagulación *in vitro* están prolongadas. El mecanismo de acción puede estar relacionado con la activación de las plaquetas inducida por anticuerpos, con la producción de superficies procoagulantes ricas en fosfatidilserina y con la trombocitopenia.

5.5.2.2 ESTASIS SANGUINEA

Conlleva un aumento de las tromboembolias venosas durante la inmovilización quirúrgica, ortopédica o paralítica, la insuficiencia cardíaca congestiva, la gestación, las varicosidades y la obesidad.

5.5.2.3 LESIONES TISULARES TRAUMATICAS Y QUIRURGICAS

Incrementan la frecuencia de tromboembolias venosas al activar las proteasas séricas de la coagulación y las plaquetas mediante la exposición de factor tisular a la sangre circulante.

5.5.2.4 CELULAS NEOPLASICAS

Pueden activar las plaquetas, las proteasas de la coagulación o ambas por medio de la secreción de sustancias activadoras similares a la adenosina difosfato y la expresión de factor tisular sobre las superficies membranosas expuestas. Las

sustancias activadas circulantes resultantes inician la formación de trombos en los lugares vulnerables de estasis vascular o lesión. Las enfermedades malignas que se asocian a una mayor predisposición trombótica incluyen la leucemia promielocítica y los tumores que afectan a pulmón, mama, próstata, tracto gastrointestinal y otras áreas. La enfermedad metastásica avanzada puede inducir coagulación intravascular diseminada (CID). No está indicada una investigación amplia para identificar la enfermedad subyacente, ya que la neoplasia suele resultar evidente. Cuando se exponen a la sangre circulante, los **procesos inflamatorios crónicos** que suponen la expresión de factor tisular por monocitos o macrófagos pueden desencadenar trombosis.

5.5.2.5 DISPOSITIVOS PROTESICOS CARDIOVASCULARES

Los dispositivos protésicos cardiovasculares inducen una acumulación crónica de monocitos y macrófagos en relación con sus superficies de flujo, favoreciendo de esta manera el riesgo de fracaso trombótico del dispositivo.

5.5.2.6 ANTICONCEPTIVOS ORALES

Los anticonceptivos orales que contienen estrógenos se asocian a tromboembolias venosas. Estas pacientes presentan a menudo un factor genético coexistente, sobre todo resistencia del factor V a la PCA o deficiencia de proteína C o S, que las predispone a padecer trombosis venosas.¹⁷

¹⁷ Mark H. Beers, M.D. "El manual Merck" [CD ROM] Madrid, España: Harcourt, S. A.; 2006.

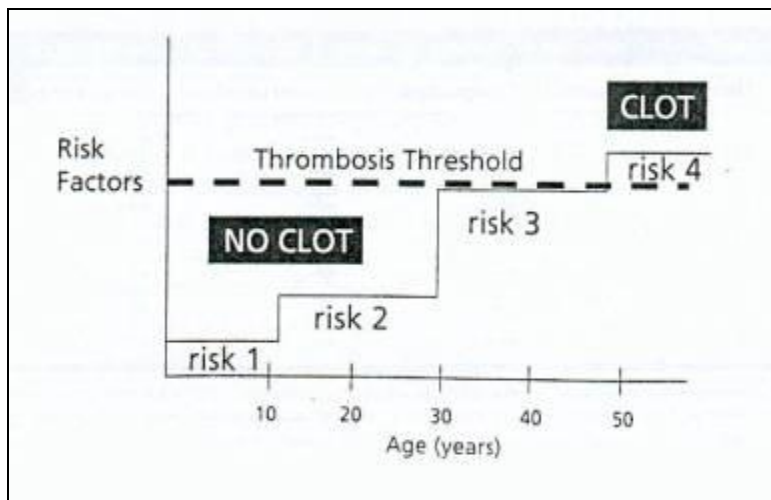


Figura 3. El umbral trombótico es un diagrama de la teoría multiriesgo del desarrollo de la trombosis. Varios factores de distintas magnitudes son necesarios para cruzar la línea de formación del trombo. www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/analisis/p3.htm

6. DISEÑO METODOLOGICO

6. 1 POBLACION EN ESTUDIO

La población en estudio comprendió a pacientes de ambos sexos entre 20 y 80 años de edad y con diagnóstico de trombosis en los centros hospitalarios de COSSMIL y el Hospital de Clínicas de la ciudad de La Paz entre los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008.

6.2 TAMAÑO MUESTRAL

Para el presente estudio se tomo una población de 9 pacientes como control positivo, es decir personas con diagnóstico presuntivo de trombosis.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSION

- Personas con diagnóstico clínico presuntivo de trombosis.
- Hombres y mujeres con edad comprendida entre los 20 y 80 años de edad.
- Personas que provienen de familias diagnosticadas con trombosis.

6.4 CRITERIOS DE EXCLUSION

- Personas que se encuentren con tratamiento de anticoagulantes.
- Personas que consumieron bebidas alcohólicas 24 horas antes del estudio.
- Mujeres en estado de gestación.

6.5 NATURALEZA

Para la recolección de las muestras, se realizó la toma de muestra de sangre venosa, usando como anticoagulante citrato de sodio al 3,8 % y teniendo cuidado de que los pacientes se encuentren en estado de ayuno.

6.6 DISEÑO DEL ESTUDIO

De acuerdo al tiempo de ejecución, el presente estudio preliminar es descriptivo y transversal.

7. METODOS

Para el presente estudio se utilizó Kits comerciales de: Acticlot de procedencia alemana línea American Diagnostica (Factor VIII, Resistencia a la proteína C activada y Proteína S) y AMAX de procedencia Irlandes línea Trinity Biotech (Antitrombina III y Proteína C).

Como control de calidad para la determinación de las diferentes pruebas se revisaron los siguientes parámetros: que los Kits comerciales estén almacenados a una temperatura de 4^o C, se utilizo plasmas control de los Kits comerciales en el caso de la determinación de Proteína C, S y la Resistencia a la proteína C

activada. Para la Antitrombina III y el factor VIII se utilizó una muestra de plasma normal y uno patológico durante las determinaciones. Se revisó también la temperatura de almacenamiento de las muestras (-20°C), estabilidad de temperatura de los equipos, limpieza de todos los materiales y calibración de micropipetas.

8. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Tubos de plástico graduados, jeringas, agujas nº 21 ½, algodón, ligadura guantes de latex, gradillas, cronómetros, pipetas de vidrio graduadas de 5 y 10 mL, tapones de goma para tubos, micropipetas de 20 a 1000 uL y cubetas de lectura para coagulómetros. Centrifuga, Coagulometro mecánico con espoletas, coagulometro semiautomático óptico y espectrofotometro. Kits comerciales para la determinación de Proteína C, Proteína S total, Resistencia a la proteína C activada, Antitrombina III, Factor VIII y plasmas control de la resistencia a la proteína C activada.

9. OBTENCION Y CONSERVACION DE MUESTRAS

Para cada determinación después de tomada la muestra se procedió a separar el plasma por centrifugación, esto para las muestras y el pool como sigue:

- Proteína C y Antitrombina III: centrifugación por 15 minutos a 3000 rpm.
- Resistencia a la proteína C activada y proteína S: centrifugación por 20 minutos a 3800 rpm.
- Factor VIII: centrifugación por 30 minutos a 1500 rpm.
- Se guardó las muestras a -20°C hasta el momento del procesamiento.

Debido a la variación de pesos que existe a razón de las diferentes estructuras en las proteínas y glucoproteínas en estudio, se manejaron variaciones en los tiempos y en las revoluciones por minuto para lograr separarlas y se las almaceno a -20° C para poder mantener sus propiedades hasta el momento de su procesamiento.

10. DETERMINACION DE PROTEINA C

La prueba se baso en el principio de la coagulación. En el ensayo, la prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada es causada por la in activación de los factor Va y VIIIa de la cascada de la coagulación por la proteína C presente en el plasma.

La muestra se prediluyo en un plasma deficiente en proteína C (proporcionado en el Kit comercial) y luego se activa por medio de veneno de víbora (Agkistrodon contortrix) que actúa como activador. El efecto inhibitorio de la proteína C activada se detecta mediante la prolongación del APTT, la cual será proporcional a la actividad de la Proteína C presente en el plasma.

10.1. PROCEDIMIENTO

- Precalear el activador y el cloruro de calcio por 2 min. a 37° C. Añadir en una cubeta 50uL de plasma deficiente en proteína C y 50uL de muestra (plasma diluido 1/10; 50uL de plasma + 450uL de tampón). Incubar 2 minutos a 37° C. Añadir 50uL del activador precalentado e incubar 5 minutos exactos a 37° C. Añadir 50uL de cloruro de calcio. Anotar el tiempo de coagulación. Realizar la prueba por duplicado al igual que el control del Kit. y obtener los promedios de los tiempos de coagulación.
- Interpolar el resultado en la curva de calibración.

10.2. CURVA DE CALIBRACION

Una vez recolectado el pool de plasmas (proveniente de 10 muestras normales, obtenidas de personas clínicamente sanas) realizar diluciones como se muestra en la tabla y determinar la proteína C con el procedimiento anterior.

POOL DE PLASMA (uL)	TAMPÓN DE DILUCIÓN (uL)	CONCENTRACIÓN %
100	400	100
250 de la dil. anterior	250	50
250 de la dil. anterior	250	25
250 de la dil. anterior	250	12,5

- Obtener los promedios de los tiempos de coagulación y graficar estos versus las concentraciones.
- Realizar una regresión lineal para obtener una recta.

10.3. INTERPRETACION

Se observa valores disminuidos de proteína C en pacientes con riesgo de trombosis venosa y embolias pulmonares.

La correlación entre las concentraciones de Proteína C y S y el riesgo de trombosis no es tan exacta como en el déficit de antitrombina III.

11. DETERMINACION DE PROTEINA S TOTAL

La prueba se baso en el principio de la coagulación. En el ensayo, diluciones de plasma del paciente se mezclo con plasma libre de proteína S (proporcionado en el Kit comercial). A la mezcla se le añade un reactivo que contiene factor Xa, proteína C activada y fosfolipidos. Tras un periodo de incubación, se añade cloruro de calcio para provocar la coagulación. En estas condiciones, la prolongación del tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración de proteína S en la muestra de plasma del paciente.

11.1. PROCEDIMIENTO

- Precaentar el R1 (activador) y el cloruro de calcio por 2 min. a 37°C. Añadir en una cubeta 50uL de plasma libre en proteína S (R2) y 50uL de muestra (plasma diluido 1/10; 50uL de plasma + 450uL de tampón). Incubar 2 minutos a 37°C. Añadir 50uL del activador (R1) precalentado e incubar 5 minutos exactos a 37°C. Añadir 50uL de cloruro de calcio. Registrar el tiempo de coagulación. Realizar la prueba por duplicado al igual que el control del Kit y obtener los promedios de los tiempos de coagulación.
- Interpolar el resultado en la curva de calibración.

11.2. CURVA DE CALIBRACION

Una vez recolectado el pool de plasmas (proveniente de 20 muestras normales, obtenidas de personas clínicamente sanas) realizar diluciones como se muestra en la tabla y determinar la proteína S con el procedimiento anterior.

POOL DE PLASMA (uL)	TAMPÓN DE DILUCIÓN (uL)	CONCENTRACIÓN %
100	900	100
500	500	50
300	700	25
0	1000	0

- Obtener los promedios de los tiempos de coagulación y graficar estos versus las concentraciones.
- Realizar una regresión lineal para obtener una recta.

11.3. INTERPRETACION

La disminución de la concentración de proteína S está asociada a una incidencia mayor de tromboembolismo venoso.

La disminución de proteína S no indica necesariamente en el plasma una disminución de este, ya que la proteína S total se halla presente en el plasma como proteína libre y como proteína ligada a la fracción C4b del sistema del complemento.

Se pueden encontrar niveles normales de proteína S total en las deficiencias tipo IIa y IIb.

12. DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA

La prueba se baso en el principio de la coagulación en donde el plasma problema se mezclo con un plasma humano diluido procesado y se incubo a 37°C, en presencia y ausencia de proteína C activada (APC), con un activador del factor V, aislado del veneno de víbora de Russel. La coagulación se desencadena en ausencia de calcio por adición del activador de protrombina (PTA) dependiente del

factor Va. Se determinan los tiempos de coagulación y el cociente (tiempo de coagulación en presencia de APC y tiempo de coagulación en ausencia de APC).

A diferencia de otros reactivos en el kit utilizado, la activación del complejo de protrombina se produce por un activador de la protrombina dependiente del factor Va, aislado del veneno de víbora tigre australiana, lo cual elimina potenciales interferencias debidas a factores de la cascada de la coagulación acumulados. Esta menor interferencia y especificidad de la prueba se ve favorecida además por el hecho de ser independiente del calcio endógeno.

12.1. PROCEDIMIENTO

	PRESENCIA DE PROTEINA C ACTIVADA APC (+)	AUSENCIA DE PROTEINA C ACTIVADA APC (-)
Muestra o control	30uL	30uL
Reactivo 4	20uL	20uL

- Mezclar bien.

Reactivo 1 (APC +)	50uL	----
Reactivo 2 (APC -)	---	50uL

- Incubar 3 minutos a 37°C

Reactivo 3 (PTA)	50uL	50uL
------------------	------	------

- Determinar el tiempo de coagulación y calcular el índice de ratio:

$$\text{INDICE} = \frac{\text{Tiempo de coagulación (seg.) APC +}}{\text{Tiempo de coagulación (seg.) APC -}}$$

- Realizar el mismo procedimiento para los controles positivo y negativo y los resultados comparar con la tabla del inserto de acuerdo al Kit comercial utilizado.

12.2. INTERPRETACION

Se observa valores inferiores a 3,2 en una tendencia a un tromboembolismo venoso inexplicable, recurrente o con historia familiar positiva. La prueba es muy sensible y específica y es adecuada como prueba inicial para los pacientes con sospecha de trombosis, exceptuando aquellos bajo tratamiento con heparina o con anticoagulantes orales, o con anormalidades de la coagulación. En estos casos es conveniente realizar una prueba de ADN para determinar mutaciones en el factor V Leiden.

13. DETERMINACION DE ANTITROMBINA III

Método fotocolorimétrico a 405 nm de longitud de onda.

La prueba se baso en un método colorimetrico en dos etapas, la trombina es añadida a una dilución de plasma conteniendo antitrombina en presencia de heparina. Luego de un periodo de incubación inicial (primera etapa) la trombina residual es determinada con un sustrato cromogénico específico para la trombina (segunda etapa). La actividad residual de trombina es inversamente proporcional a la concentración de antitrombina III.

13.1. PROCEDIMIENTO

- Diluir la muestra: 25uL de plasma + 1000uL de tampón de dilución. Colocar 200uL de la dilución en una cubeta. Incubar 4 minutos a 37°C. Añadir 200uL del reactivo heparina/trombina. Mezclar e incubar 2 minutos a 37°C.

Añadir 200uL de sustrato de trombina. Mezclar e incubar 2 minutos a 37°C.
 Añadir 200uL de ácido acético glacial para detener la reacción. Añadir 200uL de agua destilada y leer la absorvancia a 405 nm de longitud de onda contra blanco preparado como sigue:

200 uL de agua destilada
200 uL de tampón de dilución
200 uL de reactivo heparina/trombina
200 uL de sustrato de trombina
200 uL de ácido acético glacial

- Interpolar las absorvancias en la curva de calibración para obtener la concentración de antitrombina III.

13.2. CURVA DE CALIBRACIÓN

Una vez recolectado el pool de plasmas (proveniente de 10 muestras normales, obtenidas de personas clínicamente sanas) realizar diluciones como se muestra en la tabla y determinar la antitrombina III con el procedimiento anterior.

POOL DE PLASMA (uL)	TAMPÓN DE DILUCIÓN (uL)	CONCENTRACIÓN %
25	1000	100
500 de la dil. anterior	500	50
---	1000	0

- Graficar las absorvancias versus las concentraciones.
- Realizar una regresión lineal para obtener una recta.

13.3. INTERPRETACION

Se pueden observar niveles bajos de Antitrombina III en pacientes con deficiencia hereditaria o congénita de AT, lo que se caracteriza por una predilección por la trombosis y una respuesta inadecuada a la terapia con heparina.

Varias condiciones clínicas con deficiencia adquirida de Antitrombina III, incluyen enfermedad hepática, CID, síndrome nefrótico, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular y tromboflebitis. En adición a estas, los anticonceptivos orales pueden llevar a niveles reducidos de AT.

14. DETERMINACION DEL FACTOR VIII

La prueba se baso en un ELISA tipo sándwich, se utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor VIII humano. Las muestras son incubadas en los micropozos que contienen el segundo anticuerpo monoclonal, luego usando un conjugado que contiene una enzima (peroxidasa) se detecta la unión del factor VIII (antígeno) al anticuerpo. La adición de tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato, reacciona con la enzima produciendo una coloración azul. La reacción es detenida por la adición de ácido sulfúrico 0,5N y finalmente se produce una coloración amarillenta. Los niveles de factor VIII son determinados por la lectura de la absorvancia a 405 nm de longitud de onda y por extrapolación a la curva de calibración.

14.1. PROCEDIMIENTO

- Diluir la muestra 1/100 con el diluyente de la muestra. Colocar 50uL de la muestra diluida al pozo correspondiente de la placa. Colocar 50uL del control al pozo correspondiente de la placa. Adicionar a cada pozo 100uL del diluyente de muestra. Incubar 90 minutos a temperatura ambiente.

Lavar 4 veces con el buffer de lavado. Diluir el conjugado 1/101 con el diluyente de muestra (calcular el volumen necesario de acuerdo a los pozos usados). Adicionar 100uL de la dilución del conjugado a cada pozo. Incubar 1 hora a temperatura ambiente. Lavar 4 veces con el buffer de lavado. Adicionar 100uL del sustrato. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 50uL de solución stop (H_2SO_4 0,5N) y leer inmediatamente la absorbancia a 450 nm con filtro diferencial.

- Interpolar la absorbancia a la curva de calibración para obtener la concentración de factor VIII.

14.2. CURVA DE CALIBRACIÓN

- Colocar 50uL de cada estándar a los pozos correspondientes.
- Continuar con el procedimiento anterior.
- Graficar las absorbancias versus las concentraciones de los estándares.
- Realizar una regresión lineal para obtener una recta.

14.3. INTERPRETACION

Usualmente el factor VIII del plasma se mide para diagnosticar o controlar el tratamiento para la hemofilia A.

Se observan niveles disminuidos de Factor VIII en: Hemofilia A, CID, Presencia de inhibidor del factor VIII.

Se pueden observar niveles elevados de Factor VIII en: edad avanzada, diabetes, enfermedad hepática, inflamación, embarazo y en un riesgo de trombosis.

Los niveles de Factor VIII dependen tanto de factores genéticos como adquiridos.

Se recomienda comenzar con el estudio de la actividad funcional del Factor VIII,

estos niveles deben permanecer persistentemente elevados después de meses del episodio trombótico lo que permitirá distinguirlo de elevaciones transitorias como reactante de fase aguda.

15. RESULTADOS Y DISCUSION

- Se realizaron las respectivas curvas de calibración para cada prueba con el pool de plasmas (ver anexo 1)
- Se procesaron 5 muestras de personas clínicamente sanas como control de normalidad. (ver anexo 2)
- En la población de estudio se procesaron un total de 9 muestras, de las cuales 4 fueron del sexo femenino y 5 del sexo masculino.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N° 1

Determinación de la concentración de Proteína S total en pacientes de los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

N° de paciente	Conc. De proteína S %
1	72
2	81
3	62
4	74,5
5	39
6	77
7	61
8	88
9	48

Estadísticos = DS. 15,9 r: -0,21 P: < 0,05

VALOR DE REFERENCIA: 55 – 160 %

Se observa que 2 de los pacientes presentan valores bajos de proteína S total y 7 de ellos valores normales de acuerdo al valor de referencia. Estos resultados se deben a que se realizó la determinación de la proteína S total plasmática y no solo la fracción con función anticoagulante, lo que nos sería de mayor utilidad en este tipo de pacientes.

Es necesario mencionar que los estados deficitarios se clasifican en tipo I y II basados en los análisis cuantitativos, y funcionales con una subclasificación del tipo II. En el IIa hay niveles normales de proteína S total con descenso de las

formas libres y por tanto de la actividad. El tipo IIb tiene niveles normales de proteína S total y libre pero con un descenso de su actividad sugiriendo la existencia de una proteína S anómala, lo que causaría un estado de trombosis venosa.¹⁸

TABLA Nº 2

Determinación de la concentración de Proteína C en pacientes de los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

Nº de paciente	Conc. de proteína C %
1	97,5
2	59,5
3	53,5
4	25
5	26
6	10,5
7	72
8	67
9	76

Estadísticos = DS: 28,3 r: -0,06 P: < 0,05

VALOR DE REFERENCIA: 72-106 %

Observamos que 6 de los pacientes presentan concentraciones bajas de proteína C en comparación con el valor de referencia, lo que nos indica que existe una

¹⁸ <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol23/suple3/suple7.html>

alteración a nivel de esta proteína lo se interpretaría como un estado de trombosis en estos pacientes.

Para el estudio de la proteína C deben realizarse análisis cuantitativos y cualitativos (amidolíticos o coagulativos) para diferenciar los dos tipos existentes de déficit de proteína C: el tipo 1 en el cual está disminuida la síntesis de la molécula, lo cual produce un descenso en los niveles de la proteína y de su función, y el tipo 2 en los que existe una proteína funcionalmente anómala pero con niveles cuantitativos normales. Esta última puede subdividirse en dos tipos el 2a y 2b según se ponga de manifiesto la alteración cuando se determina con el método coagulativo o amidolítico.

El déficit de proteína C se hereda de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta. Miletich y col encontraron que uno de cada 200 ó 300 adultos sanos eran portadores del déficit. La alteración puede ser difícil de diagnosticar por la amplitud de rangos de normalidad. Los autores recomiendan repetir las determinaciones en pacientes con valores límites y en estos casos el estudio familiar es de gran importancia.¹⁹

¹⁹ <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol23/suple3/suple7.html>

TABLA N° 3

Determinación del índice de la resistencia a la proteína C activada en pacientes de los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

N° de paciente	Índice
1	1,5
2	3,0
3	3,4
4	2,5
5	4,8
6	5,7
7	2,8
8	2,0
9	3,5

Estadísticos = DS: 1,3 r: 0,24 P: < 0,05

VALOR DE REFERENCIA: 3,2 – 5,4

Los resultados de esta tabla nos muestran que 5 de los pacientes presentan valores por debajo del valor de referencia lo que nos indica que existe una resistencia a la proteína C activada lo que lleva aun estado de trombosis.

Una mutación del factor V Leiden es responsable del hallazgo plasmático de resistencia a la proteína C activada. El riesgo trombótico en estos pacientes se estima que es de 7 veces superior en los heterocigotos que en los individuos sin mutación y en los homocigotos 10 veces más que en los heterocigotos. Como

peculiaridad clínica se destaca que causa un mayor riesgo de trombosis cuando se relaciona el uso de anticonceptivos orales. La resistencia a la proteína C activada puede observarse en pacientes sin la mutación del factor V Leiden, pero con valores elevados de factor VIII, con anticoagulante lúpico o en mujeres embarazadas.

TABLA N° 4

Determinación de la concentración de Antitrombina III en pacientes de los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

N° de paciente	Conc. de Antitrombina III (%)
1	50
2	35
3	54
4	71
5	96
6	29
7	69
8	75
9	73,5

Estadísticos = DS: 21,2 r: 0,43 P: < 0,05

VALOR DE REFERENCIA: 79 –125 %

La tabla nos muestra que solo un paciente presenta un valor normal de antitrombina III y que 8 de ellos presentan valores bajos con respecto al valor de

referencia lo que se puede interpretar como un estado o riesgo de trombosis venosa.

En el déficit de ATIII pueden diferenciarse dos tipos según exista un descenso en la síntesis global de la proteína, el tipo I, o una anomalía en su molécula, con niveles de proteína normales pero funcionalmente inactivos, el tipo II. A su vez en el tipo II puede estar afectada la parte de su molécula con acción serpina, Tipo IIa, o el lugar de unión a la heparina: tipo IIb. Las consecuencias clínicas de la alteración son similares en cualquiera de los tipos excepto en el IIb en el que la frecuencia de episodios trombóticos es menor.²⁰

²⁰ <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol23/suple3/suple7.html>

TABLA Nº 5

Determinación de la concentración de Factor VIII en pacientes de los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

Nº de paciente	Conc. de Factor VIII Umol/L
1	53
2	53
3	51
4	16
5	50
6	51
7	195
8	10
9	9

Estadísticos = DS: 56,3 r: 0,01 P: < 0,05

VALOR DE REFERENCIA: 50 – 200 Umol/L

Estos resultados nos muestran que 3 de los 9 pacientes presentan valores por debajo del valor de referencia, lo que es un indicador de un estado de hipocoagulabilidad. No se evidencia a ningún paciente con un valor por encima del valor de referencia, es decir, según esta determinación ningún paciente presentaría un estado o riesgo de trombosis.

En 1995 Koster publicó un trabajo sobre la relación entre FVIII, Fw y grupos sanguíneos en el que se puso de manifiesto que los niveles elevados de FVIII constituían un factor de riesgo independiente para la trombosis. Estas

conclusiones han sido corroboradas por otros autores que han hallado cifras de FVIII superiores al 150Umol/L en un 25% de pacientes con trombosis inexplicadas. Aunque el mecanismo de actuación se desconoce, no parece deberse únicamente a sus características del reactante de fase aguda, sino que es posible que los valores elevados de la concentración de FVIII en plasma estén determinados genéticamente, aunque los estudios sobre el polimorfismo del gen del FVIII no han dado de momento ningún resultado positivo.²¹

²¹ M^a Teresa Orúe Servicio de Hematología Hospital de Navarra Irunlarrea, 31008 Pamplona

TABLA N° 6

Causas de trombofilia con riesgo de trombosis en relación con las pruebas realizadas en pacientes de los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

N° DE PACIENTES	EDAD	DEFICIT ENCONTRADO	DIAGNOSTICO CLINICO
1	28	rPCA – AT III	Hemiparesia izquierda Trombosis venosa
2	62	PC – rPCA – AT III	Trombosis venosa profunda de miembros inferiores
3	27	PC- AT III	LES, nefropatia lupica, Hipertensión arterial y anemia severa Trombosis venosa
4	40	PC- rPCA – AT III	Riesgo de Trombofilia por antecedentes familiares
5	66	PS- PC	Trombosis venosa profunda, hipertensión arterial, obesidad de grado II
6	34	PC- AT III	LES, Síndrome antifosfolipidico, Trombosis venosa profunda, Nefropatia lupica.
7	20	rPCA- AT III	Riesgo de Trombofilia por antecedentes familiares
8	20	PC- rPCA – AT III	Riesgo de Trombofilia por antecedentes familiares
9	34	PS- AT III	Riesgo de Trombofilia por antecedentes familiares

rPCA: resistencia a la proteína C activada, AT III: antitrombina III, PC: proteína C, PS: proteína S.

Tabla N° 7

Porcentaje de pacientes con el riesgo de trombofilia de acuerdo a las pruebas realizadas en pacientes de los centros nosocomiales de COSSMIL y el Hospital de clínicas durante los meses de Octubre a Marzo de las gestiones 2007 y 2008 en la ciudad de La Paz.

Nº DE PACIENTES	Nª DE PACIENTES EN PORCENTAJE (%)	FACTOR DE TROMBOFILIA
8	89	<i>AT III</i>
6	67	<i>PC</i>
5	55	<i>rPCA</i>
2	22	<i>PS</i>

Los resultados de la tabla 6 nos muestran que todos los pacientes presentan deficiencias en las concentraciones plasmáticas en por lo menos dos de las determinaciones realizadas, lo que nos lleva a considerar que existe un riesgo de trombosis en este tipo de pacientes. Además se muestra que existe una relación de los resultados con los datos clínicos de cada paciente, lo que conforma el riesgo de trombosis.

La tabla 7 nos muestra que existe una deficiencia en la concentración plasmática de Antitrombina III en un 89% de los pacientes, de proteína C en 67%, la resistencia a la proteína C activada en 55% de ellos y la proteína S total en el

22%. Estos resultados confirman que existe un riesgo elevado de trombosis o que existen coágulos recurrentes, lo que también conduciría a un estado trombótico.

Esto sienta las bases para efectuar estudios de prevalencia de los defectos trombofílicos, así como de su incidencia en los accidentes trombóticos. Estos defectos se consideran hoy factores de riesgo de trombosis, predominantemente venosa, que aumentan el potencial pro-coagulante del plasma y, aislados o en conjunto con otros factores hereditarios o adquiridos, alcanzan el umbral trombótico desencadenando el episodio oclusivo. Cada factor trombofílico se asocia a un riesgo relativo de trombosis distinto, considerándose que la deficiencia de antitrombina III es el más potente de ellos. Es de interés notar que los resultados muestran deficiencias de las proteínas a una temprana edad de algunos pacientes.

En la tabla 6 se muestra que ningún paciente presentó valores elevados del factor VIII (riesgo de trombosis). La deficiencia del factor VIII observada en tres de los pacientes puede deberse a que los niveles plasmáticos bajos de proteína C inactivan al factor VIII lo que conduce a su disminución en su concentración plasmática.

Las deficiencias en las concentraciones de Antitrombina III, Proteína S, Proteína C y la Resistencia a la Proteína C Activada observadas en los pacientes se asocian a trombosis venosa y sólo mínimamente con la arterial. El fibrinógeno y las alteraciones del sistema fibrinolítico están relacionados con la trombosis arterial y no con la trombosis venosa. La Homocisteína y la protrombina G20210 A, parece

ser uno de los pocos marcadores que se asocian tanto con la trombosis venosa como con la arterial; por lo que es recomendable realizar tal determinación para un estudio más completo.

16. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos lleva a concluir que en los 9 pacientes estudiados, se encontró que todos presentaron una alteración en las concentraciones plasmáticas de los marcadores para el diagnóstico de trombosis, 89% de los pacientes presentaron deficiencia de AT III, 67% deficiencia de proteína C, 55% presento una resistencia a la proteína C activada y 22% deficiencia de proteína S.

Por otro lado, en la historia clínica de estos 9 pacientes se encontró que: en 3 de los casos el diagnóstico es trombosis venosa profunda, en 2 trombosis venosa y en los otros 4 riesgo de trombofilia por antecedentes familiares, además se encuentran diagnósticos como: LES, Hipertensión arterial, Nefropatía lúpica y Obesidad de grado II, lo que demuestra que existe una relación entre los resultados obtenidos y los factores de riesgo de estos pacientes, lo que nos lleva a concluir que existe un riesgo de trombosis principalmente venosa, tales resultados confirman la necesidad de que se maneje conceptualmente el problema de las trombofilias y que existan centros especializados de diagnóstico y tratamiento de estos cuadros.

Por todo lo anterior, el interés del trabajo fue presentar datos para apoyar al diagnóstico y estudio de trombofilias, lo que conduce a una tendencia de trombosis y la trombosis tanto arterial como venosa es una enfermedad de

etiología múltiple, con lo que la realización de este perfil trombofilico ayudaría de manera eficiente en el diagnóstico, tratamiento y evolución favorable de pacientes que padecen o que podrían padecer esta enfermedad.

Finalmente debe enfatizarse que el estudio demostró que los pacientes diagnosticados con trombosis presentaron relación con las pruebas realizadas y el otro grupo de pacientes en los cuales se sospechaba de riesgo trombotico, presentaron deficiencias en las concentraciones plasmáticas de proteínas del sistema de coagulación. El grupo control de normalidad presento niveles normales en todas las determinaciones (ver anexo II), con lo que se demuestra la aplicabilidad y la importancia de las pruebas realizadas.

17. RECOMENDACIONES

En el presente estudio se trabajo con una población muy pequeña, esto debido a la cantidad de reactivos, su estabilidad una vez preparados y el encontrar los pacientes adecuados, con lo que se recomienda trabajar con grupos más grandes. También habrá que revisar otros condicionantes de la enfermedad trombotica, como las mutaciones en el gen de la protrombina y el factor V; y otros factores de riesgo hereditario de trombosis para seguir avanzando en el esclarecimiento de la etiología de estas alteraciones.

En el presente estudio se determino los niveles de proteína S total, y como se menciona anteriormente la proteína S circula fijada de forma reversible a otra proteína, la C4b-BP. Sólo la forma libre, que representa un 40% de la proteína S total, tiene actividad de cofactor de la proteína C activada. Por ello es

recomendable realizar la determinación de la fracción libre de la proteína S para un mejor diagnóstico.

Por último es importante señalar que siempre que se lleven a cabo estas determinaciones se deben tomar en cuenta todas las recomendaciones para su realización ya que malos procedimientos durante la etapa pre-analítica, analítica y post-analítica nos llevarán a reportar resultados erróneos y por ende un mal diagnóstico en el paciente.

18. BIBLIOGRAFIA

- Murrari, Robert K. "Bioquímica de Harper". 16 ed. Mexico. Manual Moderno. 2005. p. 860-871.
- Balcells, Alfonso. "La clínica y el laboratorio". 20 ed. Barcelona-Madrid. Masson. 2006. p. 207-208.
- Berbardette F, Rodack. "Hematología, fundamentos y aplicaciones clínicas". 2 ed. Buenos Aires, 2005. p..650-651
- J. Sans-Sabrafen. "Hematología clínica". Barcelona-España. 2005. p 675-685.
- Harrison "Principios de medicina interna" 16 ed Mexico, DF. Mac Graw Hill. 2005. p. 755-777.
- REVISTA "Medi clin". Emabarazo y trombofilia en mujeres con deficit congenito de antitrombina III, proteína S y proteína C. [Revisión en Internet] Monteagud M, Monteserrat y col. Barcelona, 2005. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/TemasMedicinaInterna/trombofilia.html>

- Mark H. Beers, M.D. "El manual Merck" [CD ROM] Madrid, España: Harcourt, S. A.; 2006.

- Farreras rozman. "Medicina interna" [CD ROM] Barcelona, España: Elsevier; 2008.

- Huerta Vinaly, Adnina Maruja. Prevalencia de trombosis venosa profunda [Monografía en Internet]. Mexico 2006. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/spmi/v14n2/trombosis.htm>

- Gonzales, Hernandez A. Prevalencia de trastornos de la coagulación-trombosis. [Artículo en Internet]. España: Hospital universitario de Gran Canaria; 2007. Disponible en: <http://www.infodoctor.org>

- Kemmeren, JM. Algra A, Grobbee. Anticonceptivos orales de tercera generación y riesgo de trombosis. [Documento en Internet]. British medical Journal, 2008. OMS. Disponible en: [http://www.esmas.com/salud/noticias hoy](http://www.esmas.com/salud/noticias_hoy).

- Cosin, Leonardo. Embarazo y trombofilia. [publicación en internet]. Argentina, 2007. Diponible en: <http://www.asterisco/tusalud.com>

ANEXO I

A continuación se presentan las curvas de calibración para la determinación de las concentraciones plasmáticas de Antitrombina III, proteína C, proteína S total y factor VIII. Para la resistencia al proteína C activada se usa plasmas control proporcionados por el kit comercial.

Se usaron muestras de 30 personas clínicamente sanas para obtener el pool de plasmas.

CRITERIOS DE INCLUSION:

- Hombres y mujeres con edades comprendidas entre los 20 y 50 años de edad.
- Personas clínicamente sanas.
- Personas en estado de ayuno.
- Personas sin tratamiento alguno.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Personas con algún tratamiento de anticoagulantes.
- Personas que presenten algún problema de coagulación o hemorragias.
- Mujeres en estado de gestación.

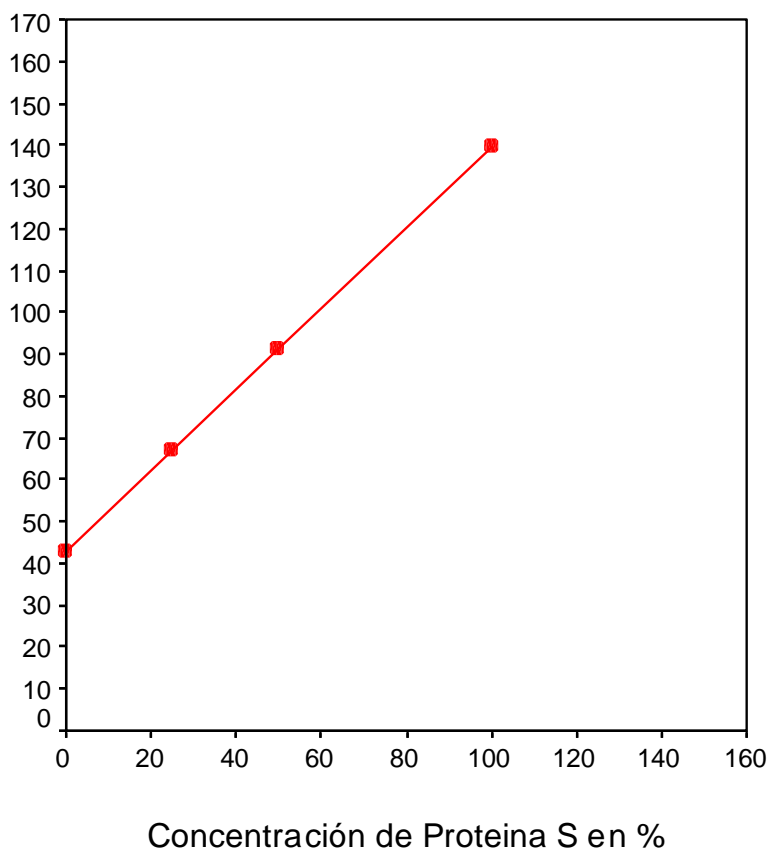
TABLA N° 1

CONCENTRACION DE PROTEINA S TOTAL OBTENIDA A PARTIR DEL POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007

N° tubo	Concentración %	Tiempo en seg.	Regresión lineal
1	0	43	40,6
2	25	60	65,3
3	50	93	89,9
4	100	139	139,2

GRAFICA N° 1

CURVAS DE CALIBRACION DE LA PROTEINA S TOTAL PROCESADA CON POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007



Estadísticos: Promedio= 83,7 DS= 42,3 r = 0,99

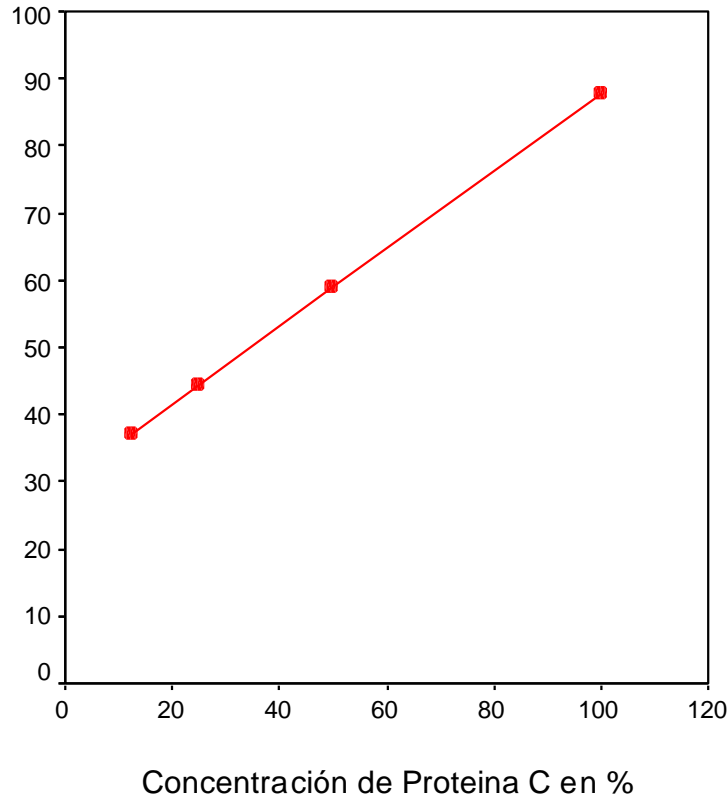
TABLA Nº 2

CONCENTRACION DE PROTEINA C OBTENIDA A PARTIR DEL POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007

Nº tubo	Concentración %	Tiempo en seg.	Regresión lineal
1	12,5	34,3	37,1
2	25	47	44,3
3	50	59,8	58,8
4	100	86,9	87,6

GRAFICA Nº 2

CURVA DE CALIBRACION PARA LA PROTEINA C PROCESADA CON POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007



Estadísticos: Promedio= 57 DS= 22,5 r = 0,99

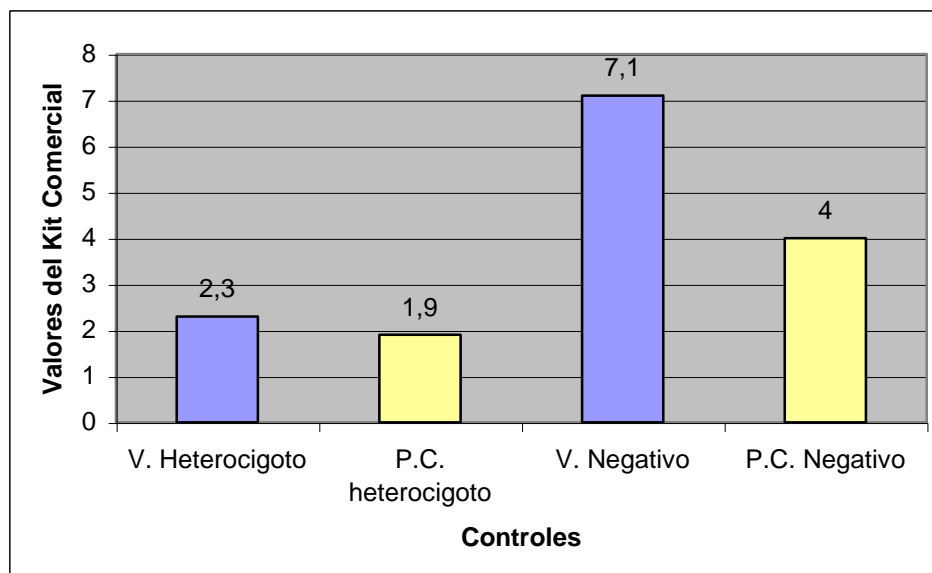
TABLA Nº 3

INDICE DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA OBTENIDA A PARTIR DEL CONTROL DE PLASMAS PROVENIENTE DEL KIT COMERCIAL, DETERMINACION QUE FUE REALIZADA EN EL INSITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007

CONTROL	APC +	APC -	INDICE	VALOR TEORICO (kit comercial)
HETEROCIGOTO	80,8	42,9	1,9	1,3 – 2,3
NEGATIVO	140,7	35,1	4,0	3,9 – 7,1

GRAFICA Nº 3

COMPARACION DEL INDICE DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA ENTRE LOS VALORES DEL KIT COMERCIAL Y LOS VALORES OBTENIDOS AL PROCESAR EL PLASMA CONTROL HETEROCIGOTO Y NEGATIVO EN EL INSITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007



V= Valor
PC=Plasma control

Se puede observar que los valores obtenidos con el plasma control, tanto del heterocigoto y negativo procesados en el laboratorio, entran dentro los valores que nos proporciona el Kit comercial, por lo tanto podemos usar este valor para obtener el valor de referencia del kit comercial.

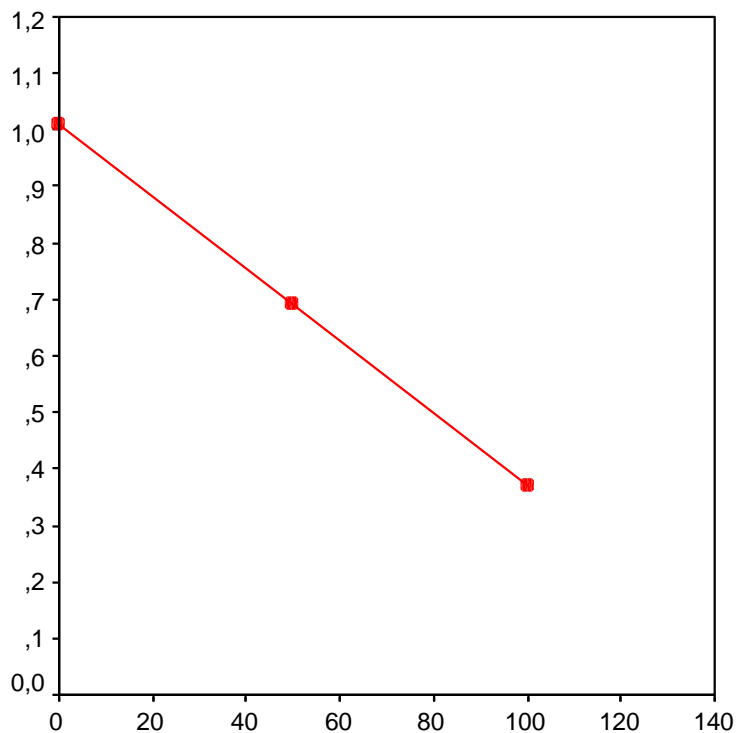
TABLA N° 4

CONCENTRACION DE ANTITROMBINA III OBTENIDA A PARTIR DEL POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007

N° tubo	Concentración %	Absorvancia nm	Regresión lineal
1	0	0,991	1,01
2	50	0,723	0,69
3	100	0,351	0,37

GRAFICA N° 4

CURVA DE CALIBRACION PARA LA ANTITROMBINA III PROCESADA CON POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007



Concentración de Antitrombina III

Estadísticos: Promedio= 0,69 DS= 0,32 r = 0,99

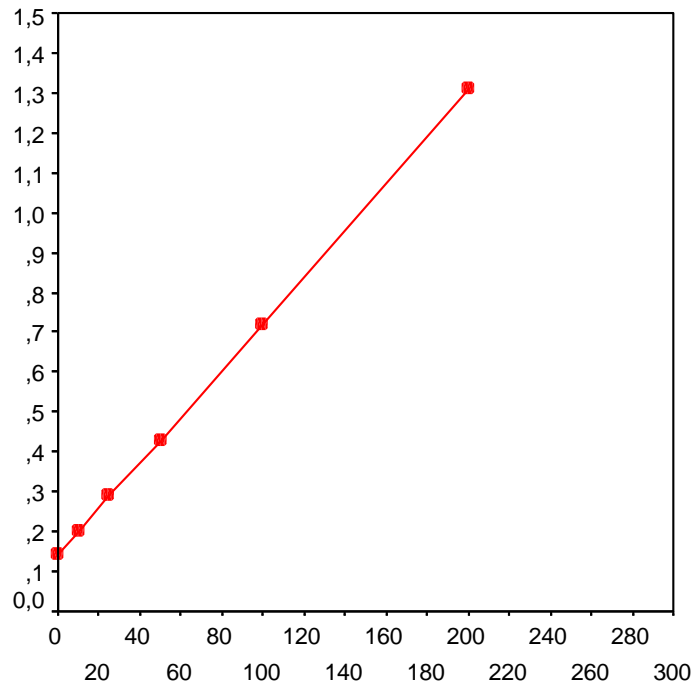
TABLA N° 5

CONCENTRACION DE FACTOR VIII OBTENIDA A PARTIR DEL POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007

N° tubo	Concentración %	Absorvancia nm	Regresión lineal
1	0	0,05	0,14
2	10	0,12	0,19
3	25	0,30	0,28
4	50	0,50	0,42
5	100	0,90	0,72
6	200	1,20	1,30

GRAFICA N° 5

CURVA DE CALIBRACION PARA EL FACTOR VIII PROCESADA CON POOL DE PLASMAS DE PERSONAS CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES OCTUBRE DEL 2007



Concentración de Factor VIII en Umol/L

Estadísticos: Promedio= 0,51 DS= 0,45 r = 0,97

ANEXO II

Los valores de normalidad de las técnicas descritas se establecieron en individuos clínicamente sanos como grupo control. El número de personas para este grupo fue de 5.

Los criterios de inclusión y exclusión son los mismos que para las curvas de calibración.

**DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE
 PROTEINA S TOTAL, PROTEINA C, RESISTENCIA A LA PROTEINA C
 ACTIVADA, ANTITROMBINA III Y FACTOR VIII, EN PERSONAS
 CLINICAMENTE SANAS QUE ASISTIERON AL INSTITUTO SELADIS DE LA
 CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES NOVIEMBRE DEL 2007**

TABLA Nº 6

CONCENTRACION DE PROTEINA S TOTAL

NºPaciente	Tiempo en seg. 1	Tiempo en seg. 2	Promedio	Concentración (%)
1	124,7	125,8	125	85
2	113,0	112,5	113	73
3	109,0	110,0	109	68
4	119,2	122,0	121	81
5	112,5	111,5	110	71

TABLA Nº 7

CONCENTRACION DE PROTEINA C

NºPaciente	Tiempo en seg. 1	Tiempo en seg. 2	Promedio	Concentración (%)
1	72,6	74,1	73,3	74,0
2	85,8	83,2	84,0	92,5
3	90,5	92,6	91,5	106,0
4	84,8	85,8	85,3	94,0
5	79,2	77,5	78,3	82,5

TABLA Nº 8

INDICE DE LA RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA

NºPaciente	APC +	APC -	INDICE
1	62,7	15	4,2
2	95,1	27	3,5
3	125,1	36,8	3,4
4	154,1	44,3	3,5
5	148,8	40,2	3,7

TABLA Nº 9

CONCENTRACION DE ANTITROMBINA III

NºPaciente	Absorvancia nm	Concentración (%)
1	0,320	109,0
2	0,251	120,0
3	0,273	117,5
4	0,280	115,0
5	0,451	87,5

TABLA Nº 10

CONCENTRACION DE FACTOR VIII

NºPaciente	Absorvancia nm	Concentración (Umol/L)
1	0,763	106
2	0,561	72
3	0,477	58
4	0,500	62
5	0,703	96

TABLA Nº 11

CONCENTRACION DE PROTEINA S TOTAL DETERMINADA EN EL PLASMA CONTROL PROVENIENTE DEL KIT COMERCIAL REALIZADO EN EL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES NOVIEMBRE DEL 2007

	Tiempo en segundos	Concentración en (%)	Valor de referencia
Plasma control	125	84	82 - 102

TABLA Nº 12

CONCENTRACION DE PROTEINA C DETERMINADA EN EL PLASMA CONTROL PROVENIENTE DEL KIT COMERCIAL REALIZADO EN EL INSTITUTO SELADIS DE LA CIUDAD DE LA PAZ EN EL MES NOVIEMBRE DEL 2007

	Tiempo en segundos	Concentración en (%)	Valor de referencia
Plasma control	94,1	110	116

ANEXO III

TABLA Nº 13
DATOS SOBRE HISTORIAS CLINICAS DE PACIENTES QUE ASISTIERON A LOS
CENTROS NOSOCOMIALES DE COSSMIL Y EL HOSPITAL DE CLÍNICAS DE LA
CIUDAD DE LA PAZ DURANTE LAS GESTIONES 2007 Y 2008

Nº DE PACIENTE	EDAD	DIAGNOSTICO PRESUNTIVO	ANTECEDENTES FAMILIARES	RECUESTO DE PLAQUETAS	TIEMPO DE PROTROMBINA EN ACTIVIDAD
1	28	Hemiparesia izquierda Trombosis venosa	Madre fallecida por hipertensión	Normal	Normal
2	62	Trombosis venosa profunda de miembros inferiores	Padre fallecido por diabetes, madre fallecida por CA uterino, trombosis venosa profunda	Bajo	disminuido
3	27	LES, nefropatia lupica, Hipertensión arterial y anemia severa Trombosis venosa	Madre diabetica	Ligeramente bajo	Normal
4	40	Riesgo de Trombofilia	Hijo fallecido por LES, sindrome antifosfolipidico fulminante y anemia hemolitica		
5	66	Trombosis venosa profunda, hipertensión arterial, obesidad de grado II		Normal	Disminuido
6	34	LES, Sindrome antifosfolipidico, Trombosis venosa profunda, Nefropatia lupica.		Bajo	Disminuido
7	20	Riesgo de Trombofilia	Hermano fallecido por LES, sindrome antifosfolipidico fulminante y anemia hemolitica		
8	20	Riesgo de Trombofilia	Hermano fallecido por LES, sindrome antifosfolipidico fulminante y anemia hemolitica		
9	34	Riesgo de Trombofilia	Hermano fallecido por LES, sindrome antifosfolipidico fulminante y anemia hemolitica		