

Tesis de Posgrado

Niveles plasmáticos e interacciones del sistema cofactor 2 de la heparina-trombina-dermatan sulfato

Rossi, Eleonora Beatriz

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rossi, Eleonora Beatriz. (1999). Niveles plasmáticos e interacciones del sistema cofactor 2 de la heparina-trombina-dermatan sulfato. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3079_Rossi.pdf

Cita tipo Chicago:

Rossi, Eleonora Beatriz. "Niveles plasmáticos e interacciones del sistema cofactor 2 de la heparina-trombina-dermatan sulfato". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3079_Rossi.pdf

EXACTAS UBA

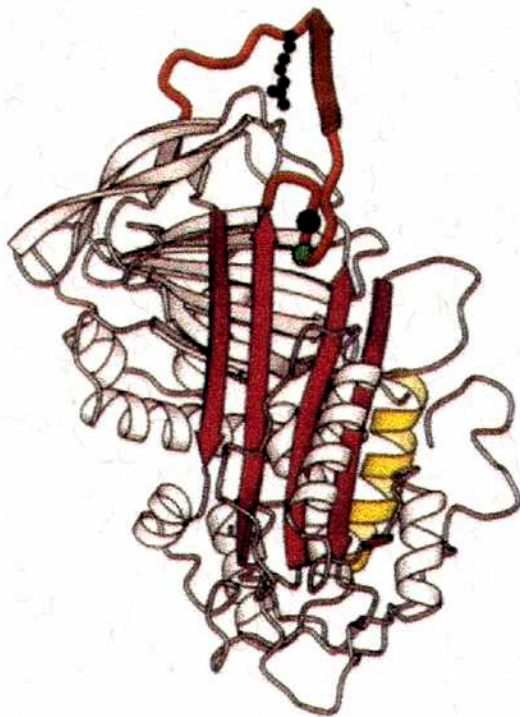
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



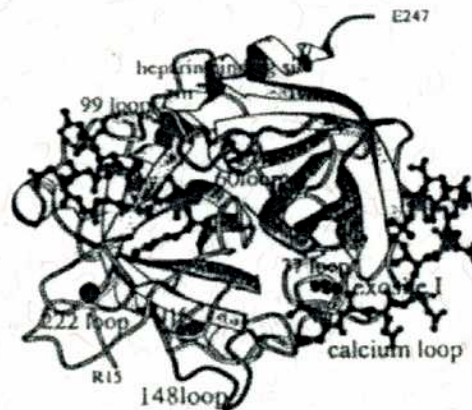
UBA

Universidad de Buenos Aires

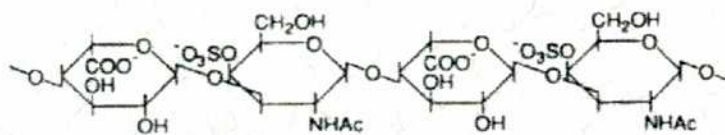
NIVELES PLASMATICOS E INTERACCIONES DEL SISTEMA COFACTOR II DE LA HEPARINA-TROMBINA-DERMATAN SULFATO



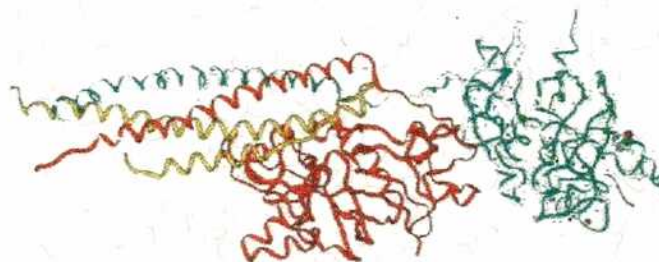
COFACTOR II DE LA HEPARINA



TROMBINA



DERMATAN SULFATO



FIBRINOGENO

3079



**NIVELES PLASMATICOS E INTERACCIONES DEL
SISTEMA COFACTOR II DE LA HEPARINA - TROMBINA -
DERMATAN SULFATO**

Bioq. Eleonora Beatriz Rossi

Directora: Dra. Lucía Kordich

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis.

Departamento de Química Biológica

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

- 1999 -

3079

Tu eres lo que es el profundo deseo que te impulsa.

Tal como es tu deseo es tu voluntad.

Tal como es tu voluntad son tus actos.

Tal como son tus actos es tu destino.

Brihadaranyaka Upanishad IV.4.5

A mis afectos

Agradecimientos

Quisiera manifestar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A mi directora, Dra. Lucía Kordich, no sólo por formarme en el campo de la hemostasia clínica y de investigación, sino por guiarme y acompañarme en esta etapa de mi vida.

Mi especial agradecimiento a la Dra. Cristina Duboscq por su colaboración y estímulo en el desarrollo de esta tesis, por su sincera amistad que me brindó un valioso apoyo.

A la Dra. María Josefina Tomio, por su asesoramiento en el desarrollo cinético de la tesis, y fundamentalmente por su desinteresada disposición.

A la Lic. Irene Quintana por su cálida amistad durante estos años, que significó un lugar de consulta y reflexión.

A mis compañeras del Laboratorio de Hemostasia, Lic. Valeria Genoud y Lic. Ana María Lauricella por su constante apoyo y compañerismo, que me facilitó mi tarea.

A la Lic. María Isabel Viscargüénaga por haber sido mi puerta de entrada en la hemostasia, en especial por su permanente y desinteresada colaboración.

Al Lic. Pablo Porterie y Stella Maris Lingua, por haberme adiestrado en las técnicas del laboratorio de hemostasia clínica.

A la Dra. Beatriz Sassetti, Alcira Nesse y mis compañeras de Análisis Biológicos, por, por su colaboración que facilitó mi tarea.

Al Dr. Ricardo Forastiero, por su colaboración.

A la Dra. Mabel Peragallo por el aporte de los pacientes quemados.

Al Dr. Cavalli por las muestras de pacientes en hemodiálisis.

A la Dra. María del Carmen Perego y Dra. Blanca Ruiz por las muestras de embarazadas.

A la Lic. Susana Ouviaña y Lic Amanda Vazquez por las muestras pediátricas.

A mis padres, por enseñarme con cariño el valor del esfuerzo y la búsqueda de la constante superación.

A mis hermanos Pablo y Esteban por su permanente apoyo

A Lucas por su contención y paciencia.

***A Dios y a todos
Sencillamente gracias***

Nota : Este trabajo fue subsidiado por la Universidad de Buenos Aires

**"Interacción del Cofactor II de la Heparina - Trombina - Dermatán Sulfato :
concentraciones, estructuras y afinidad" (Ex 192).**

**"Acción del Dermatán Sulfato sobre el sistema de hemostasia y las células
endoteliales" (01/TX18).**

Resumen

El Cofactor II de la Heparina (HCII) es un inhibidor fisiológico del sistema de coagulación, miembro de la familia de serpinas. Inhibe específicamente trombina, una enzima clave del sistema hemostático. La capacidad del HCII de inhibir trombina es potenciada mas de 1000 veces por la presencia de glicosaminoglicano el Dermatan Sulfato (DS),.

Aún no está claramente definido el papel que desempeña el HCII en la fisiología de la Hemostasia, postulándose su deficiencia como leve factor de riesgo de trombosis.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- a) Identificar y caracterizar el HCII plasmático.
- b) Investigar *in vitro* la interacción HCII - trombina - Dermatan Sulfato, así como la posible acción de proteínas moduladoras de esta interacción.
- c) Estudiar la respuesta fisiopatológica de este inhibidor, ante estímulos de distinta magnitud de activación del sistema de coagulación. (Sépsis, injuria térmica, hemodiálisis, etc.).

Los estudios electroforéticos (SDS-PAGE / Western Blot) del HCII revelaron que fisiológicamente un porcentaje de este inhibidor circula unido a una proteína plasmática, el fibrinógeno.

La investigación *in vitro* de la interacción HCII-trombina-DS en concentraciones plasmáticas reveló que el HCII inhibe más eficazmente pequeñas (hasta 30 nM) que grandes concentraciones de trombina humana.

La presencia de fibrinógeno en los ensayos *in vitro*, disminuye en un 45% la capacidad antitrombínica del HCII, sugiriendo la existencia de una interacción HCII-fibrinógeno observada en los estudios electroforéticos de plasmas.

La modulación del fibrinógeno sería tiempo, concentración y temperatura dependientes. Lo cual concuerda con los estudios electroforéticos.

La determinación de los valores de referencia de actividad y antigenicidad del HCII estableció un rango de : actividad 75 - 120% ; antigenicidad: 70 - 130%.

El nivel de actividad de HCII de embarazadas con más de 30 semanas de gestación fue de 108 (88 - 160) %, presentando niveles de actividad de Dermatan Sulfato en circulación 1,15 (0 - 3,7) µg/ml.

En pacientes quemados se determinó niveles de actividad de HCII ligeramente disminuídos 81 (75-95) %, que se mantuvieron durante los siete días estudiados. La actividad de DS fue 0,5 (0 - 1,3) µg/ml.

Pacientes en hemodiálisis presentaron leve disminución en los niveles de actividad de HCII 83,0 (60 - 105) %, detectándose actividad de DS en circulación 0,31 (0 - 1,5) µg/ml.

El descenso de la actividad de HCII en pacientes sépticos fue marcado 29 (15-120) %. Los niveles elevados de DS alcanzaron valores de hasta 3,4 µg/ml [1,9 (0,004 - 3,4) µg/ml].

La anticoagulación con dicumarínicos y heparina no fraccionada no modifican significativamente los niveles de HCII ($91 \pm 6,9$ % y $94,8 \pm 6,5$ % respectivamente).

Pacientes con hiperhomocisteinemia niveles de HCII dentro del rango de referencia 95 (60 - 115) % y niveles de actividad de Dermatan Sulfato 1,8 (0-2,9) µg/ml, que si bien son elevados no difieren significativamente del grupo control de edad.

Palabras claves: Cofactor II de la Heparina - Trombina - Dermatan Sulfato

Summary

Heparin Cofactor II (HCII) is a coagulation system inhibitor, member of the serpins family. Specifically it inhibits thrombin (Hemostatic System's central enzyme) and meizothrombin. The rate of inhibition of thrombin by HCII increases more than 1000-fold in the presence of dermatan sulfate (DS).

Physiological HCII role is still undefined, but its deficiency is a weak thrombosis risk factor.

The aims of this thesis were :

- a) Plasmatic HCII characterization and identification.
- b) To investigate HCII-thrombin- DS *in vitro* interaction and the possible proteins modulation.
- c) To measure HCII plasmatic levels in Argentine population and in different pathologies (burn, sepsis, haemodialysis, etc.).

Electrophoresis studies (SDS-PAGE/Western Blot) showed that a HCII fraction circulates bound to a plasmatic protein, fibrinogen.

HCII-thrombin-Ds interaction studies demonstrated that physiological HCII levels inhibit efficiently low human thrombin concentrations (until 30 nM).

HCII antithrombin activity was diminished when fibrinogen was present, so that we suppose a HCII - thrombin interaction. Fibrinogen - HCII modulation would be time and concentration dependent.

This observation agrees with plasmatic HCII electrophoretic studies.

HCII activity and antigenic range, for Buenos Aires population was : 75-120% activity ; 70 - 130% antigenic.

Pregnant women showed increased HCII activity levels : 108 (88-160) % and dermatan sulfate plasmatic activity: 1,15 (0-3,7) µg/ml.

Burnt patients HCII levels were slightly diminished 81 (75-95)% and dermatan sulfate plasmatic activity found in these plasma patients was 0,5 (0-1,3) µg/ml.

Similarly, low HCII plasmatic levels were observed in hemodialyzed patients 83 (60-105) % and dermatan sulfate measured in plasma was 0,31 (0-1,5) µg/ml.

Markedly decreased levels of HCII were found in septic patients, 29 (15-120)% and DS plasmatic concentration reached elevated values, 1,9 (0,004-3,4) µg/ml.

No HCII activity modification was found in patients with hyperhomocysteinemia.

Key words: Heparin Cofactor II - Thrombin - Dermatan Sulfate - Fibrinogen - Haemostasis

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABEI : Exositio de unión aniónica I

ABEII : Exositio de unión aniónica II

ATIII : Antitrombina III

DS : Dermatan Sulfato

DX : Dextrán Sulfato

EPCR : Receptor endotelial de la Proteína C

Fg : Fibrinógeno

FP4 : Factor plaquetario 4

FVL : Factor V Leiden

FvW : Factor von Willebrand

GAG : glicosaminoglicano

GAGS : glicosaminoglicanos

GPIb : Glicoproteína Ib

HCII : Cofactor II de la Heparina

Hcys : Homocisteína

HK : Quininógenos de alto peso molecular

LMWDS : Dermatan Sulfato de bajo peso molecular

LMWH : Heparina de bajo peso molecular

PAF : Factor de activación plaquetaria

PAI : Inhibidor del activado tisular del plasminógeno

PC : Proteína C

PCA : Proteína C activada

PS : Proteína S

TF : Factor Tisular

TFPI : inhibidor de la vía extrínseca

TM : Trombomodulina

t-PA : Activador tisular del plasminógeno

TR : Receptor de trombina

INDICE

INTRODUCCION

I. EL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN EL SISTEMA HEMOSTATICO	1
II. EL SISTEMA HEMOSTATICO	3
II.1. PLAQUETAS	4
II.1.1. Receptor plaquetario de trombina	7
II.2. SISTEMA DE COAGULACIÓN	10
II.2.1. Componentes del sistema de coagulación	11
II.2.2. Fisiología de la activación	13
II.2.3. Trombina, una serinoproteasa con múltiples funciones	19
II.3. MECANISMO REGULATORIO DEL SISTEMA DE COAGULACIÓN	24
II.3.1. Mecanismo del inhibidor de la vía extrínseca	24
II.3.2. Sistema de la proteína C	27
II.3.3. Inhibidores de serinoproteasas	32
II.3.3.1. Antitrombina III	32
II.3.3.1.A. Estructura de la molécula de ATIII	34
II.3.3.1.B. Modelo de inhibición de trombina por ATIII	36
II.3.3.1.C. Deficiencia hereditaria de ATIII	38
II.3.3.2. Cofactor II de la heparina	39
II.3.3.2.A. Estructura de la molécula de HCII	39
II.3.3.2.B. Mecanismo de inhibición de proteasas	43
II.3.3.2.C. Depuración del complejo serpina-trombina	46
II.3.3.2.D. Proteínas moduladoras de la acción de HCII	47
II.3.3.2.E. Acción de proteasas leucocitarias sobre el HCII	49
II.3.3.2.F. Deficiencias de HCII	49
II.3.3.3. Potenciadores de las serpinas (glicosaminoglicanos)	54
II.3.3.3.A. Heparina y heparán sulfato	57
II.3.3.3.B. Condroitín sulfato y dermatan sulfato	58
II.3.3.3.C. Queratán sulfato	59
II.3.3.3.D. Acido hialurónico	60
II.3.3.3.E. Funciones de los proteoglicanos	62
II.3.3.3.F. Potenciación de la actividad de HCII por los glicosaminoglicanos	63
II.3.3.4. El Dermatán Sulfato como droga antitrombótica	64

MATERIALES Y METODOS

I. CARACTERIZACION DEL COFACTOR II DE LA**HEPARINA PLASMATICO**

67

- I.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 67
- I.2. Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida 68
- I.3. Detección inmunológica. Western Blot 69
- I.4. Electroforesis con β mercaptoetanol 69
- I.5. Electroforesis con urea 69
- I.6. Doble electroforesis 70
- I.7. Obtención de muestras modificadas *ex vivo* 71

II. INTERACCION IN VITRO COFACTOR II DE**LA HEPARINA - TROMBINA**

72

- II.1. Actividad de trombina humana sobre sustratos cromogénicos 72
- II.2. Curva de calibración de trombina. 72
- II.3. Estabilidad de trombina a 37° C 73
- II.4. Estabilidad del HCII a 37° C 73
- II.5. inhibición de trombina humana por HCII en sistemas puros 74
 - II.5.1. Inhibición de la actividad de trombina por HCII 75
 - II.5.2. Acción de los potenciadores 75
 - II.5.2.1. Dermatan Sulfato no fraccionado y de bajo peso molecular 75
 - II.5.2.2. Efecto de la concentración de DS no fraccionado 75
 - II.5.2.3. Heparina no fraccionada y de bajo peso molecular 75
 - II.5.3. Efecto de la concentración de trombina 76
 - II.5.4. Efecto de la concentración del inhibidor (HCII) 76
 - II.5.5. Inhibición de trombina bovina por HCII humano 76
 - II.5.6. Efecto de la fuerza iónica 76

II.6. Componentes plasmáticos que modulan la inhibición de trombina por HCII	77
II.6.1. Acción del fibrinógeno	77
II.6.1.1. Efecto de la concentración de fibrinógeno	77
II.6.1.2. Efecto del tiempo de incubación del fibrinógeno	78
II.6.1.3. Incubación HCII-fibrinógeno, caracterización por SDS-PAGE/ Western Blot.	78
II.6.2. Acción de la albúmina	78
II.6.2.1. Efecto del tiempo de incubación de la albúmina	79
II.6.3. Acción de la inmunoglobulina	79
II.6.4. Acción de la homocisteína	79
II.7. Consumo de HCII plasmático <i>in vitro</i> en presencia de glicosaminoglicanos	80
II.8. Acción del Dermátan Sulfato purificado sobre pruebas del sistema hemostático	81
II.8.1. Acción del Dermátan Sulfato sobre las pruebas globales del sistema de coagulación	81
II.8.2. Agregación plaquetaria inducida por trombina humana en presencia de Dermátan Sulfato	81
II.8.3. Acción del Dermátan Sulfato en el APTT de plasmas deficitario de factores	82
 III. DETERMINACION DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN PLASMA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS	 83
III.1. Poblaciones	83
III.1.1. Valores de referencia del Cofactor II de la Heparina en la población de la ciudad de Buenos Aires	83
III.1.2. Niños normales	84
III.1.3. Embarazadas en el tercer trimestre	84
III.1.4. Pacientes quemados	84
III.1.5. Pacientes en hemodiálisis	85

- III.1.6. Pacientes sépticos
- III.1.7. Pacientes con anticoagulación oral crónica y con heparina no fraccionada
- III.1.8. Pacientes con hiperhomocisteinemia
- III.1.8. Tratamiento estadístico de los datos
- III.2. Estudio de los componentes plasmáticos del sistema de coagulación
 - III.2.1. Pruebas globales del sistema de coagulación
 - III.2.2. Estudio de la actividad plasmática de los factores de coagulación
 - III.2.3. Dosaje de los inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación
 - III.2.3.1. Determinación de la actividad de los inhibidores
 - III.2.3.2. Dosaje del nivel antigénico de los inhibidores
 - III.2.3.3. Otras determinaciones

RESULTADOS Y DISCUSION

I. CARACTERIZACION DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA

PLASMATICO	96
I.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	96
I.2. Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida	98
I.3. Detección inmunológica. Western Blot	98
I.4. Investigación de la unión del Cofactor II de la Heparina plasmático a proteínas	101
I.4.1. Electroforesis en condiciones reductoras	101
I.4.2. Doble electroforesis de HCII	104
I.4.3. Investigación de la unión de HCII a fibrinógeno	107
I.5. Discusión de la caracterización del HCII plasmático	115

II. INTERACCION *IN VITRO* COFACTOR II DE LA HEPARINA

- TROMBINA	116
II.1. Actividad de trombina humana sobre sustratos cromogénicos	116
II.2. Curva de calibración de trombina	116
II.3. Estudio de la estabilidad de trombina a 37° C	117
II.4. Estudio de la estabilidad del HCII a 37° C	118
II.5. inhibición de trombina humana por HCII en sistemas puros	120
II.5.1. Inhibición de la actividad de trombina por HCII	120
II.5.2. Acción de los potenciadores	122
II.5.2.1. Dermatán Sulfato no fraccionado	122
II.5.2.2. Efecto de la concentración de DS no fraccionado	125
II.5.2.3. Heparina no fraccionada y de bajo peso molecular	127
II.5.3. Efecto de la concentración de trombina	128
II.5.4. Efecto de la concentración del inhibidor (HCII)	130
II.5.5. Inhibición de trombina bovina por HCII humano	132
II.5.6. Efecto de la fuerza iónica	134
II.5.7. Discusión de la sección II.5.	135

II.6. Componentes plasmáticos que modulan la inhibición de trombina por HCII	136
II.6.1. Acción del fibrinógeno	136
II.6.1.1. Efecto de la concentración de fibrinógeno	138
II.6.1.2. Efecto del tiempo de incubación del fibrinógeno	140
II.6.1.3. Incubación HCII-fibrinógeno, caracterización por SDS-PAGE/ Western Blot	141
II.6.2. Acción de la albúmina	143
II.6.3. Acción de las inmunoglobulinas	144
II.6.4. Acción de la homocisteína	145
II.6.5. Discusión de los componentes plasmáticos que modulan la inhibición de trombina por HCII	147
II.7. Consumo de HCII plasmático <i>in vitro</i> en presencia de glicosaminoglicanos	148
II.8. Acción del Dermatan Sulfato purificado sobre pruebas del sistema hemostático	151
II.8.1. Acción del Dermatan Sulfato sobre las pruebas globales del sistema de coagulación	151
II.8.2. Agregación plaquetaria inducida por trombina humana en presencia de Dermatan Sulfato	153
II.8.3. Acción del Dermatan Sulfato en el APTT de plasmas deficitario de factores	154
II. 8.4. Discusión del <i>item</i> II.8.3.	158
 III. DETERMINACION DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN PLASMA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS	 159
III.1.1. Valores de referencia del Cofactor II de la Heparina en la población de la ciudad de Buenos Aires	159
III.1.2. El Cofactor II de la Heparina en niños normales	162
III.1.3. Cofactor II de la Heparina y Dermatan Sulfato en embarazadas en el tercer trimestre	162
III.1.4. Cofactor II de la Heparina y Dermatan Sulfato en pacientes quemados	166

III.1.5. Cofactor II de la Heparina y Dermatan Sulfato en pacientes en hemodiálisis	171
III.1.6. Cofactor II de la Heparina y Dermatan Sulfato en pacientes sépticos	175
III.1.7. El Cofactor II de la Heparina en pacientes con anticoagulación oral crónica y con heparina no fraccionada	179
III.1.8. Cofactor II de la Heparina y Dermatan Sulfato en pacientes con hiperhomocisteinemia	182
III.1.9. Discusión del <i>ítem</i> III	186
El Cofactor II de la Heparina en las distintas patologías estudiadas	186
El dermatán sulfato en las distintas patologías estudiadas	187
 CONCLUSIONES	 190
 BIBLIOGRAFIA	 198
 DIFUSION DE LOS RESULTADOS	 214

INDICE DE TABLAS

1. Receptores plaquetarios	6
2. Componentes del Sistema de Coagulación	12
3. Clasificación de las serpinas	33
4. Clasificación de las deficiencias congénitas de HCII	52
5. Niveles plasmáticos de HCII en distintas patologías	53
6. Clasificación de los glicosaminoglicanos	56
7. Algunos proteoglicanos comunes	61
8. Consumo de HCII en presencia y ausencia de glicosaminoglicanos	148
9. Efecto del dermatán sulfato no fraccionado y de bajo peso molecular sobre el APTT	151
10. Efecto del Dermatógeno Sulfato sobre el Tiempo de trombina	152
11. Agregación plaquetaria inducida por trombina humana en presencia de Dermatógeno Sulfato	153
12. APTT de plasmas deficientes en factores en presencia de Dermatógeno Sulfato	156
13. Valores de referencia de HCII plasmáticos en la literatura	161
14. Niveles de HCII, ATIII y DS en embarazadas con más de treinta semanas de gestación	163
15. Parámetros hemostáticos en pacientes quemados	167
16. Perfil hemostático de los pacientes en hemodiálisis	172
17. Parámetros hemostáticos en pacientes sépticos	175
18. A. HCII y ATIII actividad y antigenicidad en pacientes anticoagulados con heparina no fraccionada	179
B. HCII y ATIII actividad y antigenicidad en pacientes con anticoagulación oral	180
19. Niveles de actividad de HCII, ATIII y Dermatógeno Sulfato en pacientes con elevados niveles de homocisteína en plasma	183
20. HCII y ATIII en las distintas patologías estudiadas	186
21. Niveles plasmáticos de actividad de Dermatógeno Sulfato	188

INDICE DE FIGURAS

1. Esquema del receptor plaquetario de trombina	9
2. Esquema de la cascada de coagulación	17
3. Esquema de activación de la protrombina	18
4. Mecanismo de inhibición de trombina por templado	37
5. Estructura y esquema de la molécula de HCII	42
6. Modelo de inhibición de trombina alostérico	44
7. Esquema de la molécula de Dermátan Sulfato	58
8. Perfil electroforético del HCII	97
9. SDS-PAGE/ Western Blot de plasma normales revelados con anti HCII	100
10. SDS-PAGE/ Western Blot. Pretratamiento de las muestras con β mercaptoetanol	102
11. SDS-PAGE/ Western Blot. Pretratamiento de las muestras con urea	103
12. Doble electroforesis	106
13. SDS-PAGE/ Western Blot revelado con anti HCII y anti fibrinógeno	108
14. SDS-PAGE/ Western Blot de plasmas desfibrinados	110
15. SDS-PAGE/ Western Blot de plasmas desfibrinados	112
16. SDS-PAGE/ Western Blot revelado con anti HCII y anti ATIII	114
17. Curva de calibración de trombina	117
18. A. Estabilidad de trombina a 37° C	119
B. Estabilidad del HCII a 37°C	119
19. Inhibición de trombina por HCII en ausencia de Dermátan Sulfato	121
20. Actividad antitrombínica del HCII en presencia y ausencia de Dermátan Sulfato no fraccionado	123
21. Actividad antitrombínica del HCII en presencia de DS no fraccionado y de bajo peso molecular	124
22. Efecto de la concentración del Dermátan Sulfato	126

23. Acción de los potenciadores sobre la actividad antitrombínica del HCII	127
24. Efecto de la concentración de trombina en la actividad antitrombínica del HCII	129
25. Efecto de la concentración de HCII sobre su actividad antitrombínica	131
26. A. Inhibición de trombina humana y bovina por HCII	133
B. Inhibición de trombina humana y bovina por ATIII	133
27. Efecto de la fuerza iónica sobre la interacción HCII-trombina-DS	134
28. Interacción HCII-trombina-DS-fibrinógeno	137
29. Acción de la concentración del fibrinógeno	139
30. Efecto del tiempo de incubación del fibrinógeno en la interacción HCII-trombina-DS	140
31. Incubación <i>in vitro</i> de HCII - fibrinógeno	142
32. Efecto de la albúmina en la interacción HCII-trombina-DS	143
33. Acción de las inmunoglobulinas en la interacción HCII-trombina-DS	144
34. Acción de la homocisteína en la interacción HCII-trombina-DS	145
35. Acción de las distintas proteínas sobre la capacidad inhibitoria de trombina del HCII	146
36. Consumo de HCII en presencia y ausencia de los glicosaminoglicanos	149
37. Diferencias entre el APTT de plasmas deficitarios de factores en presencia y ausencia de Dermátan Sulfato	155
38. Histograma de distribución los niveles plasmáticos del HCII en la población de Buenos Aires	160
39. Electroinmunodifusión del HCII	160
40. A. Niveles plasmáticos de HCII y ATIII en embarazadas normales	164
B. Niveles plasmáticos de actividad de Dermátan Sulfato en embarazadas	164

41. A. Inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación en pacientes quemados	168
B. Niveles plasmático del Dermatán Sulfato en pacientes quemados	169
42. A. Inhibidores fisiológicos de la coagulación en pacientes en hemodiálisis	173
B. Niveles plasmático del Dermatán Sulfato en pacientes en hemodiálisis	174
43. A. Inhibidores fisiológicos de la coagulación en pacientes sépticos	176
B. Niveles plasmático del Dermatán Sulfato en pacientes sépticos	177
44. Niveles plasmáticos de HCII y ATIII en pacientes con anticoagulación oral crónica y con heparina no fraccionada	181
45. A. Niveles plasmáticos de HCII y ATIII en hiperhomocisteinémicos	184
B. Niveles plasmático del Dermatán Sulfato en pacientes hiperhomocisteinémicos	184
C. Niveles plasmáticos de homocisteína	185
D. Niveles de factor von Willebrand en pacientes hiperhomocisteinémicos	185

INTRODUCCION

I. EL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN EL SISTEMA HEMOSTATICO

El Cofactor II de la Heparina (HCII) es una proteína plasmática que participa de la regulación del mecanismo hemostático inhibiendo específicamente trombina, proceso que es potenciado por el glicosaminoglicano Dermatan Sulfato.

En 1939 Brinkhous *et al*¹ demostraron que la actividad anticoagulante de la heparina dependía de un componente plasmático, que se denominó Cofactor de la Heparina. Posteriormente se utilizó el término Antitrombina II para referirse a la inhibición de trombina dependiente de heparina en plasma y Antitrombina III para la independiente de heparina. En 1967 Abildgaard² aisló la ATIII y demostró que su acción también era dependiente de heparina, surgiendo la hipótesis que antitrombina II y III eran la misma proteína. Briginshaw³ en 1974 identificó en plasma dos inhibidores de trombina dependientes de heparina: cofactor de heparina A y B. El cofactor de heparina B inhibía trombina y factor Xa y presentaba un peso molecular similar a la Antitrombina III (ATIII). El cofactor de heparina A no inhibía factor Xa y su peso molecular difería al de ATIII (posteriormente denominado Cofactor II de la Heparina). En 1981 Tollefsen *et al*⁴ confirmaron la diferencia inmunológica entre ATIII y HCII, como dos entidades distintas pero con similitudes funcionales y describieron por primera vez la formación del complejo trombina-HCII.

En 1982 Tollefsen *et al*⁵ purificaron y caracterizaron al HCII plasmático, demostrando que el Dermatan Sulfato (DS), es el potenciador específico fisiológico del HCII⁶. A partir de 1985 comienza a describirse el déficit congénito de HCII⁷ asociado o no con trombosis, estableciéndose también la deficiencia adquirida⁸.

Church ⁹ identificó el sitio activo del HCII y posteriormente se determinó la secuencia del DNA que codifica para el HCII humano ¹⁰. En 1997 Han describió que el HCII potenciado por DS inhibía mas eficientemente meizotrombina (producto intermedio de la formación de trombina) que la ATIII potenciada por heparina ¹¹.

II. EL SISTEMA HEMOSTATICO

La hemostasia es el conjunto de mecanismos y procesos que mantienen la fluidez de la sangre y la integridad de la pared vascular, es el sistema del organismo que mantiene la integridad del sistema circulatorio cerrado sometido a altas presiones de flujo sanguíneo ¹².

Cuando ocurre una injuria, alteración o laceración de los vasos sanguíneos que lleva a la extravasación de sangre, se produce la activación del sistema hemostático, compuesto por diversos factores que participan en forma conjunta e interrelacionada, como la pared vascular, las plaquetas, el sistema de coagulación (factores de coagulación e inhibidores fisiológicos) y el sistema fibrinolítico (factores fibrinolíticos e inhibidores) ¹³.

Intervienen en forma indirecta otros sistemas enzimáticos plasmáticos, como el complemento, quininas-caliceínas y renina-angiotensina. Así mismo son importantes los factores reológicos y la interacción de distintas células sanguíneas entre sí, con la pared vascular y con proteínas plasmáticas ¹⁴.

Hemostasia es un delicado balance entre los procesos de coagulación, inhibición, plaquetario y fibrinólisis, en contacto y permanente intercambio con los componentes de las células endoteliales.

II. 1. PLAQUETAS

El mecanismo de hemostasia a nivel celular comienza con la adhesión de las plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo a componentes de las estructuras subendoteliales que fueron expuestos como consecuencia de una lesión vascular.

Como resultado del proceso de adhesión la superficie dañada se cubre de una monocapa de plaquetas, esto induce a la activación de las plaquetas adheridas y del sistema de coagulación que genera trombina ¹⁵.

La trombina es el agonista plaquetario más potente y el mediador encargado de reclutar las plaquetas inactivas circulantes en el lugar de la lesión, provocando la activación y la agregación de otras plaquetas sobre la monocapa inicial, favoreciendo la formación del tapón hemostático en el sitio de injuria ^{16, 17}.

La respuesta hemostática de la plaqueta implica el normal funcionamiento de un conjunto de componentes que incluyen células, pared vascular, moléculas en solución, receptores celulares y diferentes vías metabólicas de la plaqueta.

¿Qué es lo que hace que la plaqueta, "célula" inerte, que circula en el torrente sanguíneo, responda rápidamente a la gran variedad de agentes que la estimulan?

Las interacciones ligando-receptor son la base de la reactividad plaquetaria a los distintos estímulos. La plaqueta expresa en su membrana plasmática una gran cantidad de receptores celulares. Al ser una célula con funciones adhesivas, expresa en su membrana principalmente receptores celulares de adhesión (integrinas) y receptores miembros de la familia de siete dominios de transmembrana asociados a G proteína. ^{17, 18} (ver Tabla N° 1).

La adhesión de las plaquetas mediante sus receptores a las estructuras subendoteliales del lugar de lesión, estimulan las distintas vías de señalización intracelular que conducen a la activación plaquetaria.

Las plaquetas también pueden ser activadas por agonistas solubles fisiológicos como trombina, epinefrina, tromboxano A₂, ADP, etc. que reconocen receptores específicos en la superficie plaquetaria ¹⁵.

Como resultado de la activación por los distintos mecanismos, las plaquetas cambian su forma, emiten pseudópodos, liberan el contenido de sus gránulos, se agregan, pierden microvesículas y manifiestan propiedades procoagulantes en su membrana, exponiendo fosfolípidos cargados negativamente, para permitir el ensamblaje de complejos del sistema de coagulación acelerando la producción de trombina.

La *glicoproteína IIb-IIIa* (GP IIb-IIIa) que normalmente se une a ligandos inmovilizados, sufre un cambio conformacional que le permite unirse al fibrinógeno soluble circulante, el cual al ser una molécula bivalente, funciona como puente uniendo las plaquetas entre sí para formar agregados plaquetarios.

La unión del fibrinógeno a la GP IIb-IIIa induce señales que modifican las propiedades contráctiles de la plaqueta, formándose un coágulo estable en una malla de fibrina.

Esta glicoproteína es una integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en la cual la cadena alfa es exclusiva de la línea megacariocítica. Como todas las integrinas presenta la capacidad de traducir información desde "afuera hacia adentro" y desde "adentro hacia afuera" ^{18, 19}.

El modelo de activación plaquetaria propuesto, sugiere que la plaqueta se activa a través de la unión de los receptores de adhesión a sus ligandos, o a través de la acción de agonistas solubles sobre sus receptores específicos. La activación de la $\alpha_{IIb}\beta_3$ es una consecuencia común, inducida por todos los agonistas plaquetarios utilizando distintas vías; parecería que los diferentes caminos de señalización convergen en la regulación de la IIb-IIIa ²⁰.

Tabla N° 1. Receptores plaquetarios

AGONISTA	RECEPTOR	FAMILIA DE RECEPTORES	
COLÁGENO	GP Ia-IIa	Integrina $\alpha_2\beta_1$ VLA-2	Rec adhesión
	GP IV	CD 36 huérfanas	
	GP VI	Huérfanas	
FIBRINOGENO	GP IIb-IIIa	Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	Rec adhesión
FIBRONECTINA	GP Ic-IIa	Integrina $\alpha_5\beta_1$ VLA-5	Rec adhesión
	GP IIb-IIIa		
TROMBOSPONDINA	GP IV	Huérfanas	Rec adhesión
	IIb-IIIa	Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	
VITRONECTINA	Rec vitronectina	Integrina $\alpha_v\beta_3$	Rec adhesión
	GP IIb-IIIa	Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	
VW	GP Ib-V-IX	GP ricas en leucinas	Rec adhesión
	GP IIb-IIIa	Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	
LAMININA	GP Ic-IIa	$\alpha_6\beta_1$ VLA-6	Rec adhesión
TROMBINA	Rec de trombina	β_2 adrenérgico	
TROMBOXANO A₂	Rec TxA ₂		
EPINEFRINA		α_{2A} adrenérgico	
PAF	Receptor PAF		
VASOPRESINA	Receptor V ₁		
ADP	Purino rec P ₂ Y ₁	β_2 adrenérgico	
	Purino rec P ₂ X ₁	Canal de calcio	

Referencias 16, 17, 19-23

II.1.1. RECEPTOR PLAQUETARIO DE TROMBINA

La trombina es uno de los agonistas solubles fisiológicos más potentes de la activación plaquetaria, generada por activación del sistema de coagulación. Esta proteasa multifuncional, presenta sobre la superficie plaquetaria dos tipos de receptores: receptores de alta y de moderada afinidad ^{24, 25}.

Se postula que la glicoproteína Ib (GPIb) funcionaría como un receptor de trombina de moderada afinidad y modularía la respuesta plaquetaria a bajas concentraciones de trombina ^{26, 27}.

Receptor de trombina de moderada afinidad: En 1991 Vu y colaboradores ²⁸ describieron y clonaron el receptor funcional de trombina, al que se identificó en una gran variedad de células: plaquetas humanas, células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, miocitos cardíacos, células mesangiales del glomérulo renal, etc ^{28 - 31}.

Estructura y función del receptor plaquetario de trombina

El receptor plaquetario de trombina de moderada afinidad forma parte de los receptores tipo β_2 adrenérgicos, con siete dominios intramembrana acoplados a G proteínas. El receptor de trombina (TR) presenta una extensa porción extracelular donde se encuentra la unión peptídica Arg ⁴¹ y Ser ⁴². Una característica muy importante de este receptor es que la trombina debe ser proteolíticamente activa para estimular al receptor ^{24, 32}.

La primera etapa del mecanismo por el cual la trombina activa al receptor, es la unión específica, de la serinoproteasa a una secuencia aminoacídica del TR. Una vez producida la unión, la trombina rompe la unión Arg⁴¹ - Ser⁴² del receptor.

Como consecuencia del clivaje en el receptor se expone un fragmento (Ser⁴² - Phe⁵⁵) denominado "*nuevo ligando*" responsable de la activación del receptor³³.

El nuevo ligando aislado reproduce la mayoría de las respuestas celulares inducidas por trombina. También se comprobó que los primeros cinco residuos del nuevo ligando RT⁴²⁻⁴⁶ (SFLLR) son suficientes para activar el RT pero no producen todas las respuestas o exactamente el mismo patrón que el producido por trombina³³⁻³⁵.

El TR está acoplado al menos a una G proteína que sería la responsable de la formación de los segundos mensajeros que producen las respuestas celulares inducidas por la activación del receptor de trombina (Figura N° 1).

Una vez que el TR fue activado y estimuló a la G proteína, su acción perdura hasta que el dominio citoplasmático del TR sufre una fosforilación, producida por la quinasa del receptor β adrenérgico (β ARK). Esta fosforilación induce la inactivación del receptor de trombina^{36,37}.

La magnitud de la respuesta a trombina está dada por la cantidad de receptores activados. Una respuesta completa requiere el clivaje de la mayoría de los receptores en un corto período de tiempo.

Se considera que se forma una alta concentración de trombina en el sitio de injuria vascular, por lo tanto una vez que se generó dicha enzima se activan la mayoría de los receptores y sólo una pequeña proporción queda intacta³⁸⁻³⁹.

Como para su activación el TR sufre un clivaje proteolítico, no puede ser activado por segunda vez, de manera que un RT en cualquier tipo celular sólo puede ser estimulado una vez³⁷.

Debido a que la plaqueta es una célula sin núcleo, no es capaz de resintetizar los TR, por lo tanto, aunque dicha plaqueta no halla sido utilizada en la formación del coágulo, no recupera la respuesta a trombina³⁸.

En algunas células como las endoteliales, se produce la internalización del 60% de los receptores, los cuales son reciclados y ubicados nuevamente en la membrana.

Las células endoteliales contienen además un reservorio de receptores presintetizados que son expuestos rápidamente en la superficie. Por el contrario, en la mayoría de los tipos celulares el receptor tiene que ser sintetizado *de novo*³⁷.

De este modo, se observa que los TR de la célula endotelial, cercanos al lugar de la lesión, son reemplazados y así la célula endotelial puede responder a varias exposiciones a trombina, mientras que esto no sucede en las plaquetas ³⁷.

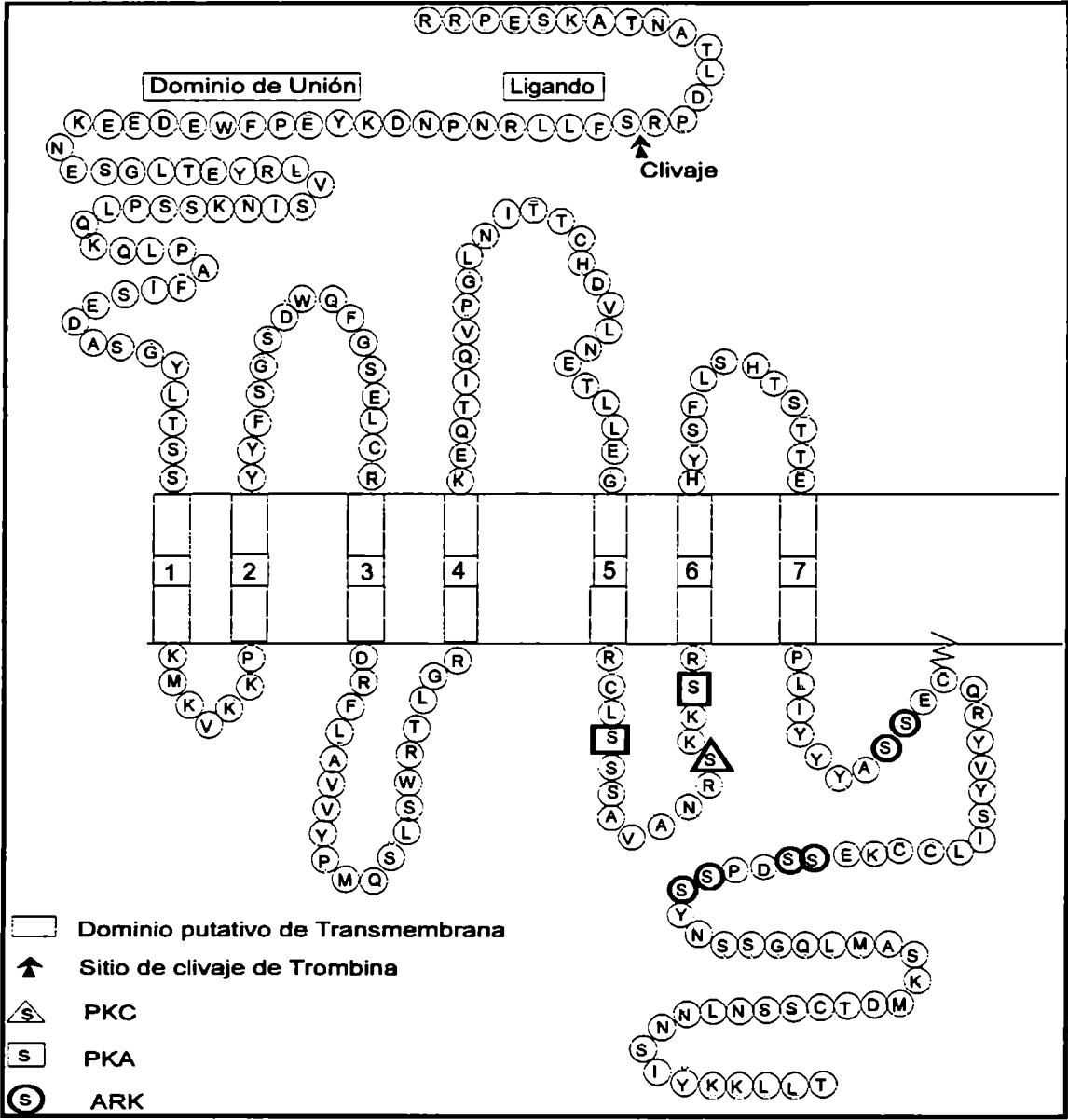


Figura Nº 1. Esquema del receptor plaquetario de trombina

II. 2. SISTEMA DE COAGULACION

Las primeras observaciones científicas en la historia del estudio de los coágulos fueron realizadas por Platón y Aristóteles, posteriormente apoyadas por Galeno, que consideraban la gelificación de la sangre, como una consecuencia de su exposición al frío, al entrar en contacto con el aire.

En el siglo XVII Malpighi describe las fibras de los coágulos sanguíneos y el fibrinógeno es purificado y cuantificado en el siglo XIX. En comienzos del siglo XX Morawitz postuló que cuando la sangre se contactaba con superficies extrañas, como tejidos u otras superficies, los leucocitos y plaquetas se aglutinaban y liberaban factor tisular (TF). Este factor liberado interactuaba con la protrombina en presencia de Ca^{++} para formar trombina, la cual convertía fibrinógeno en mallas de fibrina.

Durante el transcurso de los años se fueron identificando nuevos factores y se postuló que el sistema de coagulación se desarrollaba mediante dos vías. La primera, como lo indicó Morawitz, se iniciaba por la exposición del factor tisular, que se describió como una glicoproteína constitutiva de los fibroblastos en y alrededor de la pared vascular.

La segunda vía se iniciaba por la activación del factor XII mediada por el contacto de la sangre con superficies cargadas negativamente.

En 1964 MacFarlane y Davie proponen un sistema de reacciones secuenciales y amplificadas, donde una enzima activa a un sustrato, el cual se convierte a su vez en una enzima activa para el próximo sustrato, desencadenando un sistema de activación en cascada. De esta manera queda formulado el modelo clásico de cascada de coagulación, con dos vías de activación una "extrínseca" dependiente del factor tisular, y una "intrínseca" independiente del TF ^{40, 41}.

II. 2. 1. COMPONENTES DEL SISTEMA DE COAGULACION

El sistema de coagulación está formado por una serie de reacciones mediadas por enzimas interdependientes, que trasladan la señal molecular de iniciar el proceso de coagulación, a un evento biológico mayor: la generación de trombina y la inmediata formación del coágulo de fibrina.

Las proteínas que constituyen el sistema de coagulación se denominan factores. Generalmente se encuentran en circulación en forma de precursores enzimáticos inactivos o zimógenos, los que a continuación de una proteólisis específica, se transforman en enzimas activas ⁴².

Dentro de los factores de coagulación se encuentran cofactores proteicos no enzimáticos (Factor Tisular, Factor V y Factor VIII), cuya función es favorecer la actividad de serinoproteasas ⁴² (Tabla N° 2).

Las serinoproteasas son enzimas proteolíticas que presentan un sitio activo serina, con una tríada catalítica Ser-His-Asp. Los precursores de las serinoproteasas en el sistema de coagulación son: FII, FVII, FIX, FX y Proteína C.

Estas serinoproteasas poseen un dominio rico en ácido gama carboxiglutámico en el extremo aminoterminal, quien esta ordenado laxamente, pero en presencia de Ca^{++} se pliega y expone los residuos hidrofóbicos, los que actúan como anclas, fijando los factores vitamina K dependientes (FII, VII, IX y X) a los fosfolípidos de las membranas activadas ¹².

Los zimógenos de serinoproteasas son activadas por un clivaje proteolítico, produciendo la transición del zimógeno inactivo a serino proteasa activa. (la nomenclatura que se utiliza es el número romano para el zimógeno y el agregado de la letra a al número romano para indicar la enzima activa) ¹².

Si bien las serinoproteasas demuestran una importante similitud en sus características estructurales, presentan grandes diferencias en sus actividades y especificidades. A excepción de la trombina, necesitan cofactores para

desarrollar su función, ya que los mismos aceleran en tres órdenes de magnitud la velocidad catalítica de los complejos.

Tabla N° 2. Componentes del sistema de coagulación

<i>Proteína</i>	<i>Nombre</i>	<i>Loc. Cromoso mica</i>	<i>Peso Molecu lar (KD)</i>	<i>Conc. Plasmática (mg/ml)</i>	<i>Nivel hemostá tico (%)</i>	<i>Vida media (horas)</i>
	Fibrinógeno		330	300	50	72 - 120
Factor I	Cadena α	4q23-32	66			
	Cadena β	4q 23-32	52			
	Cadena γ	4q 23-32	46,5			
Factor II	Protrombina	11p11-q12	72	100	40	67 - 106
Factor III	Factor tisular	1q 21-22	37	0		
Factor V	Proacelerina	1q21-25	330	10	10 - 20	12 - 15
Factor VII	Proconvertina	13q34	50	0,5		3 - 4
Factor VIII	F. antihemo- fílico A	Xq 27.3	330	0,1	25	10 - 16
Factor vW		12	1.200.000			22 - 40
Factor IX	F. antihemo- fílico B	Xq26-Xq27	55	5	20 - 25	18 - 40
Factor X	Stuart-Prower	13q34-qter	59	10	20	20 - 60
Factor XI		4q 35	160	5	15 - 20	48 - 80
Factor XII	Hageman	5q33-ter	160	30		

II. 2. 2. FISILOGIA DE LA ACTIVACION

En la actualidad se considera que el factor tisular (TF) es el principal iniciador del sistema de coagulación *in vivo*.

El factor tisular es una glicoproteína integral de membrana asociada con fosfolípidos, perteneciente a la superfamilia de receptores de citoquinas que se encuentra en una variedad de tejidos incluyendo células de la adventicia, células musculares lisa y principalmente en cerebro, pulmón y placenta, pero no se identificó TF en las células endoteliales ni en las células sanguíneas ⁴³.

Cuando ocurre daño en la pared vascular, exposición del subendotelio o expresión del TF en la superficie de monocitos estimulados por factor de necrosis tumoral, endotoxinas e interleukina 1, el TF entra en contacto con el torrente sanguíneo donde se une reversiblemente al zimógeno FVII, o se une con gran afinidad al FVIIa proteolíticamente activo ⁴³.

El TF promueve la autoactivación del FVII mediante un mecanismo que depende de la densidad de TF en la superficie de la membrana. A pesar de que el TF es un cofactor, no requiere de activación previa para el desempeño de su función; es sintetizado en forma completamente activa y actúa por asociación física con el FVII y FVIIa ⁴⁴⁻⁴⁶.

Posiblemente la regulación del TF *in vivo* esté dada por la modulación de su exposición ⁴⁴. EL TF además de promover la auto activación del FVII, actúa como cofactor del FVIIa, ya que induce a cambios conformacionales en la molécula del FVIIa, de manera que reordena el sitio activo y favorece su actividad catalítica sobre sus sustratos el FX y FIX ^{47, 48}.

Se demostró que existe una concentración basal de FVIIa plasmático de $3,3 \pm 1,1$ ng/ml, lo cual sería consecuencia de las constantes activaciones del sistema de coagulación. Si bien los factores activados presentan una vida media de segundos a minutos por su rápida inhibición, la vida media del FVIIa es de 2 horas, debido a que no es inactivado por inhibidores de proteasas.

La acción del TF-VIIa sobre el FX unido a la membrana fosfolipídica genera FXa. Estas primeras trazas de FXa son importantes para la generación de pequeñas cantidades de trombina, la cual participa en un importante mecanismo de retroalimentación positiva: activación de los FV y FVIII, FXI y de plaquetas ⁴⁹.

El complejo TF-FVIIa también activa al FIX. En condiciones basales el FIXa es incapaz de activar al FX, necesita la formación del complejo tenasa compuesto por FIXa, FVIIIa, fosfolípidos procoagulantes y calcio, en cuyo caso la activación del FX por el FIXa aumenta en varios ordenes de magnitud ⁴⁸.

La gran producción de FXa a través del complejo tenasa asegura la propagación de la activación y la generación de mayores cantidades de trombina que conducen a la formación de fibrina. El principal sustrato del FXa es el zimógeno protrombina, para generar trombina, la enzima clave del sistema de coagulación por sus múltiples funciones ⁵⁰.

El factor Xa puede generar trombina por clivaje proteolítico de dos uniones peptídicas en la molécula de protrombina, proceso que es ampliamente favorecido por la acción del cofactor Va, ya que el FVa actúa como receptor del FXa, y además aumenta la actividad catalítica del FXa sobre el FII ⁵⁰

El complejo protrombinasa se forma por la unión del FVa, FXa, protrombina y Ca^{++} sobre la superficie de las membranas fosfolipídicas activadas ⁴⁹(Figura N° 2).

La trombina se produce por la acción del factor Xa sobre protrombina ⁵¹, por ruptura de las uniones Arg^{271} y Arg^{320} (Figura N° 3).

El orden en que se rompen estas uniones, dependen del ensamblaje del complejo protrombinasa. En presencia de FXa y Ca^{++} se rompe primero Arg^{271} de la protrombina, generándose el Fragmento $_{1+2}$ y la pretrombina ⁵¹.

Cuando el factor Xa y el cofactor Va están ensamblados en una superficie de membrana en presencia de Ca^{++} , el FXa primero rompe Arg^{230} dando lugar a meizotrombina ^{52, 53}. Posteriormente la acción del Xa sobre pretrombina o sobre meizotrombina genera trombina ⁵⁰.

Recientemente se demostró que la meizotrombina es el principal intermediario formado durante el proceso de coagulación de la sangre *in vitro*⁵⁴.

Actualmente se considera que la trombina y el FXa producidos por la acción del TF-FVIIa son insuficientes para formación de un coágulo firme, ya sea debido a que la circulación de la sangre desplaza los factores activados de la cercanía de la lesión, o porque estos factores activados son neutralizados por inhibidores circulantes. Por lo tanto, se postula que sería necesario reforzar la generación de trombina a través de la acción del FXI.

Pequeñas cantidades de trombina formadas activan al FXI a FXIa en un clivaje proteolítico potenciado por la acción de dextrán sulfato, heparina y/o sulfatidos⁵⁵. El FXIa produce la activación del FIX a FIXa el que genera FXa mediante el complejo tenasa. Actualmente se considera que la función del FXI en la cascada revisada de coagulación es la de “mantener” la activación del sistema de coagulación más que la de “iniciar”, (función propuesta originalmente por la vía clásica).

La activación del sistema de coagulación por la vía clásica (o intrínseca) contempla la activación de los factores de contacto (FXII, quininógenos de alto peso molecular y precalicreínas) por el contacto con superficies cargadas negativamente, como colágeno, tejido conectivo subendotelial o fosfolípidos de la membrana plaquetaria. El FXIIa activaría precalicreína a calicreína y FXI a FXIa, los cuales activarían recíprocamente al FXII⁵⁶.

El quininógeno de alto peso molecular (HK) es una proteína que circula unida al FXI y a precalicreínas, presenta la capacidad de unirse a superficies celulares. Por lo tanto actuaría como cofactor, permitiendo la unión de precalicreínas y FXI a las superficie celulares cercanas al FXII.

Por otra parte el HK favorece la activación del FXI y precalicreínas por el FXIIa y potencia la activación del FXII por precalicreínas⁵⁶.

La calicreína formada rompe al HK liberando bradiquinina, un mediador vasoactivo proinflamatorio que produce cambios en la presión local, edema y dolor como resultado de la vasodilatación y del aumento de la permeabilidad

microvascular; produce también liberación de activador tisular de plasminógeno (t-PA) y liberación de prostaciclina de las células endoteliales.

Una propuesta actual sobre la fase de contacto sugiere que, fisiológicamente las superficies con cargas negativas necesarias para la activación del sistema intrínseco, son el ensamblaje de las precalicreínas, quininógenos de alto peso molecular y FXII sobre las membranas celulares, y la activación de precalicreínas por metaloproteasas celulares (no serinoproteasas) calcio dependientes y es independiente del FXII y sus formas activadas ⁵⁷.

Una vez generada trombina (una serinoproteasa) escindirán las uniones Arginina - Glicina de la molécula de fibrinógeno, si bien el fibrinógeno presenta una variedad de uniones Arg - Gly, la trombina solo escinde cuatro, debido a que esta enzima debe unirse previamente al fibrinógeno en sitios de unión específicos ⁵⁸.

La trombina cliva a nivel de Arg¹⁶ de la cadena A α y en Arg¹⁴ de la cadena B β liberando fibrinopéptido A (FPA) y fibrinopéptido B (FPB) respectivamente y generando los denominados monómeros de fibrina.

Posteriormente se producen cambios en la carga neta de los monómeros modificándose las fuerzas intermoleculares de los mismos. Este hecho conduce a un proceso de polimerización con la obtención de una red de fibrina soluble.

Por acción del factor XIII, que es activado por trombina y en presencia de calcio, los polímeros de fibrina soluble se transforman en un coágulo firme ⁵⁸.

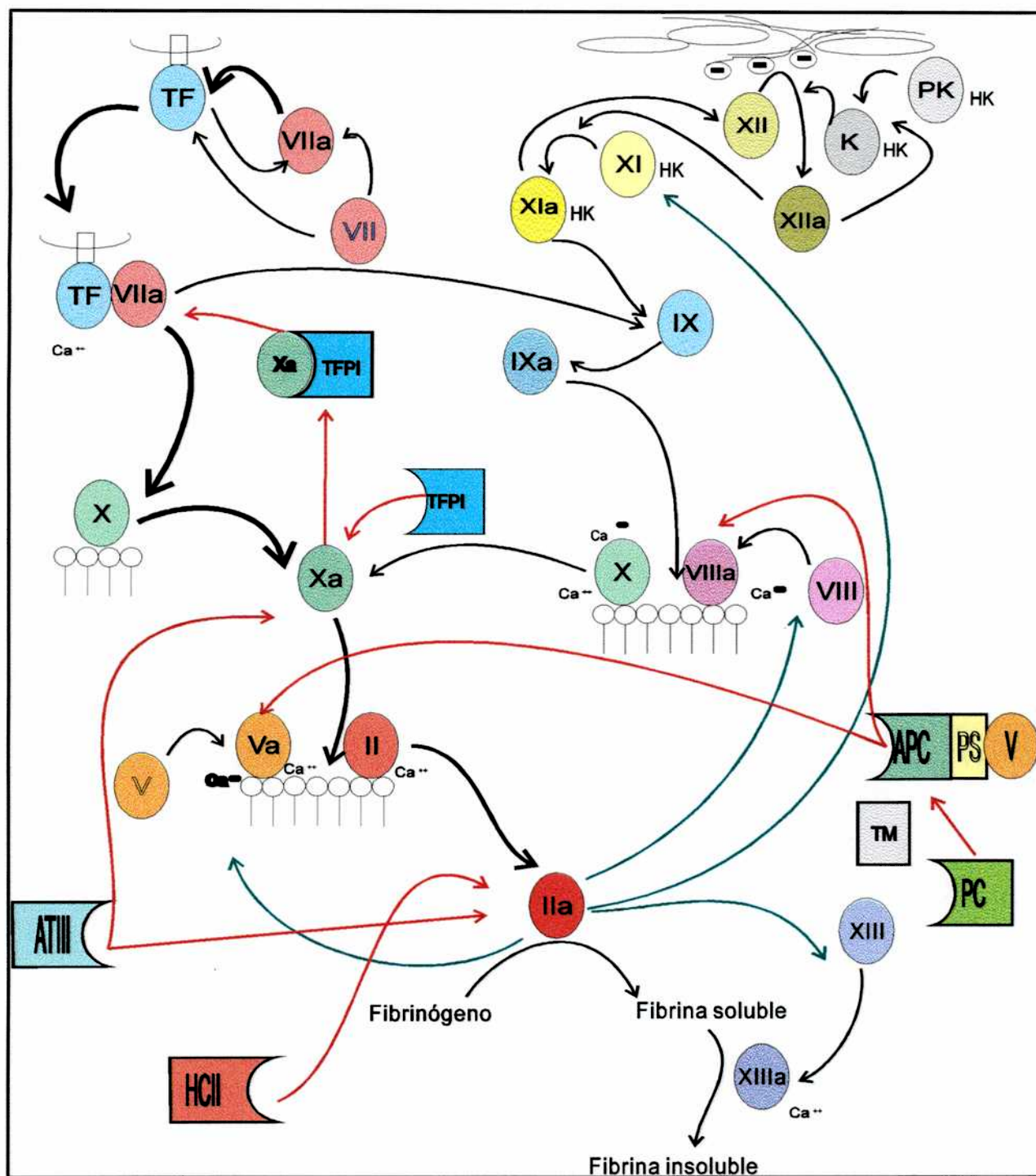


Figura N° 2. Esquema de la cascada de coagulación

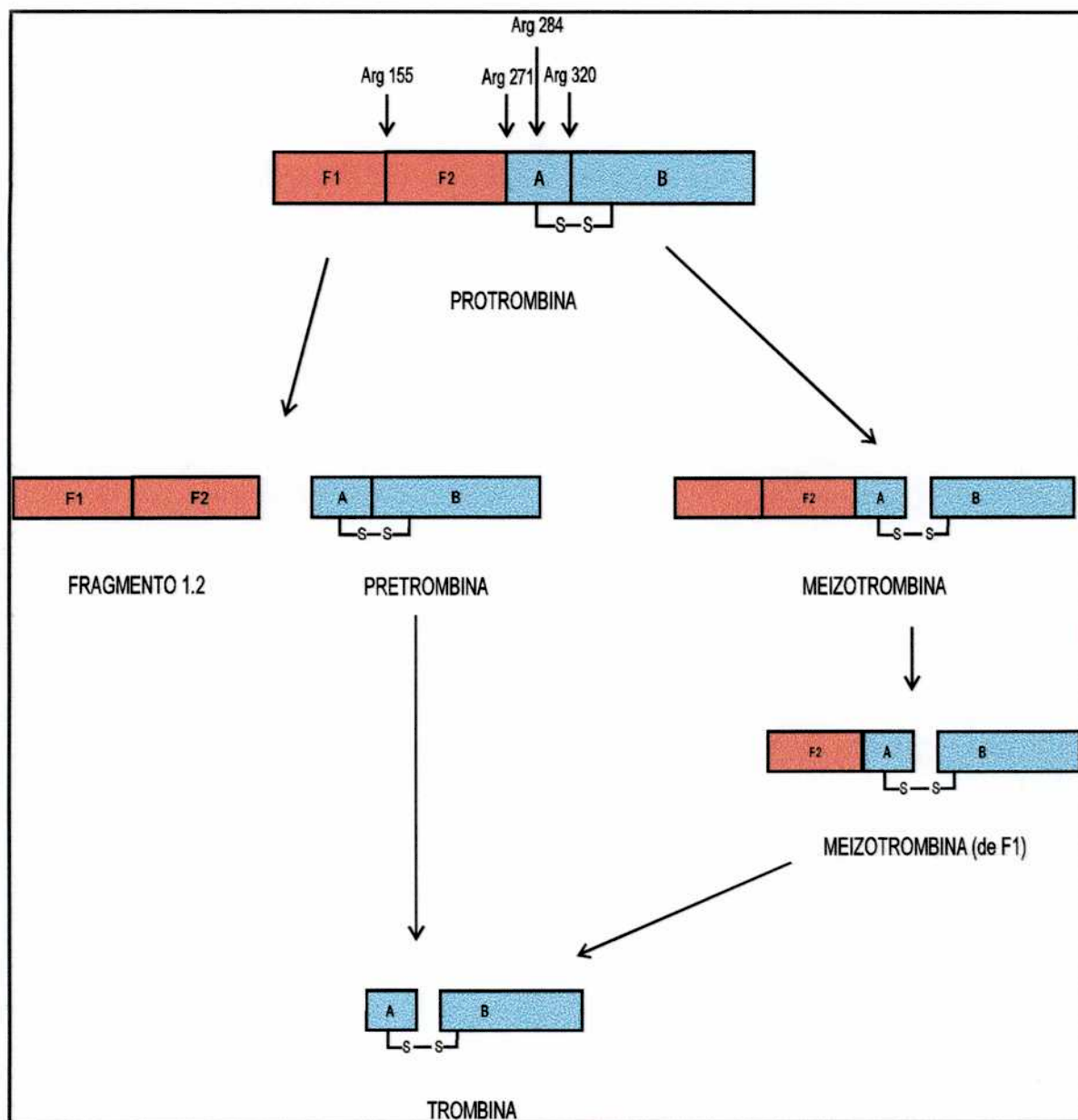


Figura N° 3. Esquema de activación de la protrombina

II. 2. 3. TROMBINA, UNA SERINOPROTEASA CON MULTIPLES FUNCIONES

La trombina es una serinoproteasa multifuncional que desempeña un papel central en la cascada hemostática, es también un potente activador de las células vasculares y sanguíneas.

La principal función de la trombina en el sistema de coagulación, es la de iniciar la formación del trombo de fibrina, también activa plaquetas y los factores de coagulación V, VIII, XI y XIII interviniendo así en la activación, amplificación y propagación de la cascada de coagulación.

Esta enzima procoagulante presenta la propiedad de iniciar la regulación del sistema de coagulación, ya que mediante su unión a trombomodulina activa a la Proteína C, un inhibidor del sistema ¹².

La trombina unida a trombomodulina pierde su capacidad de clivar el fibrinógeno y de activar plaquetas, manteniendo su capacidad de unirse a la ATIII. Además interviene en el proceso trombolítico mediante la estimulación de la célula endotelial ¹².

Esta serinoproteasa desempeña funciones enzimáticas y no enzimáticas. Si bien las funciones más estudiadas son aquellas relacionadas con su actividad como enzima, la interacción de trombina con GPIb, fibrina y trombomodulina se realiza a través de la formación de uniones no covalentes, mediadas por sitios de reconocimiento específicos que son independientes del sitio activo.

Las propiedades adhesivas y quimiotácticas de la trombina tampoco están relacionadas con su actividad enzimática ⁵⁹.

Está ampliamente demostrada la participación de la trombina en diversos procesos biológicos: formación del edema, en procesos inflamatorios, en la respuesta inmune, en la quimiotaxis leucocitaria, en la resorción ósea, en desórdenes del tejido nervioso, en procesos de infección viral, en procesos neoplásicos, en proliferación celular y angiogénesis ⁶⁰.

La trombina (generada por proteólisis enzimática de su precursor protrombina), presenta un peso molecular aproximado de 40.000 D y su molécula está formada por dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por un puente disulfuro ¹². La cadena α corta, constituida por 36 aminoácidos y la cadena β de 259 aminoácidos en donde se encuentra el sitio activo. La molécula de trombina pierde los sitios de unión a superficies y por lo tanto difunde libremente a circulación, e incluso puede alcanzar regiones extravasculares ^{12, 61}.

En su estructura terciaria la molécula presenta una estructura elipsoidal con una hendidura en forma de cañón, en el interior del cual está ubicado el sitio activo con la tríada catalítica (compuesta por los aminoácidos His⁴³, Asp⁹⁹, Ser²⁰⁵); rodeada por un bolsillo específico y un bolsillo hidrofóbico ⁶².

En dos polos de la molécula, distantes del sitio activo, se encuentran conjuntos de aminoácidos cargados positivamente que se denominan "exositios de unión aniónica" (ABE), llamados ABEI y ABE II ⁶³.

El ABEI es el responsable de la unión de trombina a fibrina, fibrinógeno, HCII, receptor de trombina, trombomodulina, hirudina y GPIb pero no se une a ATIII. El ABEII es el que permite la unión de trombina a heparina ^{61 - 64}.

La Meizotrombina, producto intermedio en la formación de trombina, conserva el extremo amino terminal gama carboxiglutámico de protrombina, que le permite mantenerse unido a las membranas fosfolipídicas en presencia de calcio¹².

Cuando ocurre el clivaje en la unión Arg¹⁵⁵ se pierde el dominio gama carboxiglutámico formándose meizotrombina(desF1) (ver figura N° 3).

Meizotrombina y meizotrombina(desF1) desarrollan una actividad procoagulante y profibrinolítica muy reducida, ya que presentan disminuida su capacidad de clivar al fibrinógeno, la activación de plaquetas y la activación del Inhibidor de Fibrinolisis Activable por Trombina (TAFI). Sin embargo desarrollan la misma capacidad anticoagulante que trombina debido a que activan PC con la misma efectividad que trombina en presencia de

trombomodulina. La meizotrombina activa a la PC cuando está unida a fosfolípidos, seis veces más rápido que trombina ¹¹.

A partir de estas características se propone que meizotrombina y meizotrombina(desF1) funcionarían principalmente como proteasas anticoagulantes ¹¹.

Por consiguiente las dos enzimas generadas por activación del factor II (meizotrombina y trombina), mostrarían propiedades particulares y diferentes por lo que se considera que pueden presentarse dos estados. Un estado relativamente anticoagulante y profibrinolítico cuando predomina la meizotrombina, y un segundo estado procoagulante y antifibrinolítico, cuando predomina la trombina ⁶⁵.

Esto indicaría que la activación de protrombina *in vivo* puede potencialmente llevar a dos estados distintos, uno anticoagulante y profibrinolítico y el otro procoagulante y antifibrinolítico ⁶⁵.

La molécula de α trombina humana sufre un proceso de autólisis y se convierte en β y γ trombina, siendo la β una forma intermedia. Estos derivados de trombina, mantienen prácticamente las mismas actividades amidolíticas y esterásicas sobre pequeños sustratos sintéticos y sobre ATIII que α trombina, pero perdieron su capacidad de clivar el fibrinógeno, de clivar el receptor de trombina, su acción sobre Proteína C y trombomodulina, GPV y GPIb plaquetaria y trombospondina ^{61, 66}.

Si bien γ trombina mantiene la actividad amidolítica sobre ATIII, su acción sobre HCII está marcadamente disminuida ⁶⁷.

Debido a la rápida dilución que sufre la trombina por acción del flujo sanguíneo y teniendo en cuenta que es inhibida por los inhibidores de proteasas, la trombina debe ser generada en forma continua en niveles umbrales de 0,1 a 5 nM para lograr la formación del coágulo ⁶⁰.

Una vez que α trombina es generada, es activamente incorporada desde la circulación al trombo en formación, donde los inhibidores de trombina (ATIII, HCII y α_2 macroglobulina) no pueden penetrar. Este hecho concentra trombina

en el lugar de la lesión y crea un microambiente que favorece su acción sobre los sustratos específicos y la aproxima a la célula endotelial favoreciendo la activación de la misma ⁶⁸⁻⁶⁹.

La acción de trombina sobre la célula endotelial conduce a una respuesta que interviene en la regulación de la hemostasia. Una importante propiedad del endotelio vascular es la de ser una superficie no trombogénica y barrera semi selectiva a las proteínas plasmáticas y a las células de la sangre.

La célula endotelial presenta sobre su membrana un receptor específico para la molécula de trombina proteolíticamente activa, similar al receptor de trombina de la plaqueta (ver II.1.1) ⁷⁰.

En respuesta a la estimulación del receptor, la célula endotelial prolifera, aumenta la síntesis de prostaglandinas y del factor de activación plaquetario (PAF), aumenta la expresión del factor tisular, la transcripción y liberación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), promueve la liberación de FVIII y FvW y libera t-PA y PAI ⁷⁰.

Como consecuencia de la estimulación de la célula endotelial por trombina, se generan segundos mensajeros celulares, que producen modificación del citoesqueleto, contracción y redondeamiento de la célula endotelial por modificaciones en las proteínas, proceso que conducen a una disfunción de la célula endotelial.

La estimulación de la célula endotelial altera la permeabilidad de la barrera, produce la migración de proteínas y leucocitos de circulación al subendotelio. Los factores vitamina K dependientes (FII, VII, IX y X) son transportados por la células endoteliales estimuladas, sugiriendo que la trombina además de extravasar desde la circulación, podría generarse *in situ* y los tejidos se convertirían en lugares de generación crónica de trombina ^{60, 71}.

Estudios *in vitro* ⁶⁸ demostraron que la trombina se une al subendotelio a través de dermatán sulfato, aunque se considera que otros constituyentes de

la matriz subendotelial participarían en esta unión formando sitios de unión a trombina de alta afinidad ⁷².

La trombina unida al subendotelio mantiene las propiedades que involucran a su sitio activo, como la capacidad de clivar el fibrinógeno, activación plaquetaria, actividad amidolítica ⁶⁸, estando además protegida de la inactivación de ATIII potenciada por heparina ^{68,73}.

Debido a las múltiples funciones de trombina dentro del sistema hemostático y en otros sistemas, su regulación es importante, proceso que puede presentarse a dos niveles: inhibiendo la formación de trombina y bloqueando la trombina generada.

II. 3. MECANISMO REGULATORIO DEL SISTEMA DE COAGULACION

Las proenzimas que participan en el proceso de coagulación se encuentran en altas concentraciones en el plasma, y una vez iniciado el sistema de coagulación, se transforma en un proceso autocatalítico.

Los inhibidores fisiológicos de la coagulación frenan la autoactivación del sistema de coagulación, localizando y limitando la formación del coágulo al lugar de la lesión,.

Para controlar la respuesta del sistema de coagulación, existen tres mecanismos principales de inhibición ⁷⁴:

- 1- El inhibidor de la vía extrínseca (TFPI)
- 2- Sistema de la Proteína C (PC)
- 3- Inhibidores de serino proteasas (ATIII, HCII).

II. 3. 1. MECANISMO DEL INHIBIDOR DE LA VIA EXTRINSECA

Desde comienzos del siglo XX se conoce la existencia de un inhibidor endógeno del factor tisular, actualmente denominado TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor).

El TFPI es un inhibidor de serinoproteasa tipo Kunitz, su molécula está compuesta por una cadena polipeptídica de 276 aminoácidos, con un extremo amino terminal seguido de tres dominios tipo Kunitz y el extremo carboxiterminal ^{75, 76}.

Las serinoproteasas blanco del TFPI son el factor Xa y el factor VIIa. El TFPI inhibe directamente al FXa mediante la unión del FXa al dominio tipo Kunitz 2 del TFPI, en una reacción independiente del calcio ⁷⁵.

Se considera que la inhibición del FVIIa ocurre por un proceso en dos etapas, primero la formación del complejo TFPI/FXa y luego la formación del complejo cuaternario TFPI/FXa/FVIIa/FT. La inhibición del FVIIa/TF es potenciada por la unión del FXa a la molécula de TFPI, reacción mediada por la unión del dominio tipo Kunitz 1 del TFPI con el FVIIa del complejo FVIIa/TF en un mecanismo dependiente de calcio ⁷⁷.

Existe la hipótesis alternativa que el TFPI se une directamente al complejo FVIIa/FT/FXa y también se comprobó que, con una concentración cinco veces mayor de TFPI, se produce la inhibición directa del complejo FVIIa/FT sin previa unión del FXa ^{75, 77, 78}.

Estudios recientes demostraron que el TFPI es un inhibidor potente del complejo FVIIa/FT que se encuentra en circulación, en la superficie de las membranas y en la matriz extracelular.

Este inhibidor es sintetizado principalmente por la célula endotelial en forma constitutiva y la síntesis es mínimamente afectada por las citoquinas.

La distribución intravascular del TFPI presenta tres compartimentos: una fracción mayoritaria (50 al 80% del total) del TFPI se encuentra unido a la pared vascular. Un pool (10 al 50% del total) circula en plasma a una concentración de 50-150 ng/ml, (de este TFPI circulante al rededor del 80% circula unido a lipoproteínas). Un pequeño pool de TFPI (10%) detectado en las plaquetas desempeñaría un papel importante en la hemostasia primaria ⁷⁷.

El TFPI unido a la pared vascular puede ser liberado luego de la inyección de heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular, heparina de ultra bajo peso molecular y de pentosan polifosfato. Mientras que dermatán sulfato no liberaría cantidades importantes de TFPI.

Las lipoproteínas a las cuales se une el TFPI son lipoproteínas de baja densidad (LDLs), lipoproteínas de alta densidad (HDLs), lipoproteína (a) (Lpa) y una pequeña proporción circula libre. Estas moléculas de TFPI sufrieron un proceso de truncado de su extremo carboxiterminal, el cual es importante para la inhibición del FXa, por lo tanto las formas truncadas de TFPI que circulan

presentan una capacidad anticoagulante menor que la de la molécula completa.

La gran heterogeneidad que presenta el TFPI puede implicar diferentes efectos en la coagulación y diferentes funciones biológicas *in vivo* ⁷⁸.

En el modelo revisado de la cascada de coagulación, luego de un daño tisular, se produciría la exposición del factor tisular y la formación del complejo TF/FVIIa, lo que generaría cantidades limitadas de FXa y FIXa. Por otra parte con el FXa se iniciaría la regulación del sistema por la acción del TFPI.

De esta manera se manifiesta la necesidad de producción de FIXa a través de la acción del complejo tenasa (factor VIIIa potenciado por el FVa), de manera de asegurar la generación de trombina requerida para la formación del coágulo de fibrina ^{79, 80}.

Hasta el momento no se han reportado deficiencias de TFPI en la población normal y/o en pacientes con trombosis, tampoco se encontraron niveles disminuidos de TFPI asociados con un patrón familiar. Por consiguiente se puede deducir que la deficiencia hereditaria de TFPI sería muy poco frecuente o que la metodología disponible para medir los niveles de TFPI no es apropiada, debido a la compleja distribución intravascular.

Se especula que la deficiencia de TFPI está asociada con estados protrombóticos severos y poca protección contra traumas pequeños e infecciones menores; esta situación sería incompatible con la vida y produciría la muerte fetal en útero, o a la niñez temprana ^{78, 81, 82}.

II. 3. 2. SISTEMA DE LA PROTEÍNA C

El mecanismo de inhibición mediado por la Proteína C (PC) está integrado por varios componentes, entre ellos: Proteína C, Proteína S, trombomodulina, factor V y el receptor endotelial de la PC (EPCR).

La Proteína C es una proenzima vitamina K dependiente, sintetizada en el hígado, con una concentración plasmática de 50 a 80 nM. En su estructura proteica, cercano al extremo aminoterminal, presenta 9 dominios gla, que intervienen en la unión de la proteína a las superficies, a través de la interacción con los fosfolípidos y calcio. La molécula también posee dos dominios similares al factor de crecimiento epidermal (EGF) y cercano al extremo carboxiterminal se encuentra el dominio serino proteasa.^{13,74}

La actividad anticoagulante de la PC radica en su capacidad de inactivar a las proteínas regulatorias no proteolíticas (cofactores de la coagulación): FVa y FVIIIa.

La trombina puede escindir la molécula de PC y transformarla en proteína C activada (PCA), pero la velocidad de reacción es muy lenta, este proceso se acelera 20.000 veces mediante la acción de la trombomodulina⁸³.

El mecanismo de activación del sistema de la PC comienza en la superficie endotelial, cuando la trombina se une a trombomodulina. Esta es una proteína que transforma la actividad procoagulante de trombina a una función anticoagulante, ya que la trombina se convierte en un potente activador del sistema de inhibición de la PC⁷⁴.

La trombomodulina es una proteína unida a membrana, cuyo nombre deriva de su capacidad para cambiar la especificidad de trombina por su sustrato, aparentemente por un mecanismo alostérico.

La trombomodulina (TM) se encuentra en las células endoteliales, vasos linfáticos, placenta, plaquetas, megacariocitos, macrófagos, neutrófilos, células

musculares lisas, etc. Dentro de la vasculatura, la trombomodulina se encuentra principalmente en capilares, y en menor proporción en grandes venas y arterias ⁸⁴.

La estructura proteica de TM contiene un extremo amino terminal similar a lectina, con seis dominios EGF que son importantes para la unión a la trombina y además presenta cadenas de condroitín sulfato ⁸⁴.

La actividad anticoagulante de TM se basa en su capacidad de inactivar trombina (mediante la unión entre el EGF 5 y 6 de TM y el ABEl de trombina) y en acelerar la activación de la PC ⁸⁴. El cambio conformacional que sufre la trombina como consecuencia de su unión a TM, conduce a que la trombina adquiera gran afinidad por la PC y se genere PC activada (PCA).

Una vez que se formó APC, ésta se une a las membranas fosfolipídicas o, específicamente al receptor endotelial de la PC (EPCR), un receptor homólogo a la familia de moléculas CD1/clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad, que se encuentra principalmente en las células endoteliales de los grandes vasos y está casi ausente en los capilares ⁸⁵.

El EPCR tiene la capacidad de unir con igual afinidad tanto PC como APC, a través de los residuos gla y en presencia de calcio. Parecería que el EPCR colabora con la TM en la activación de la PC para formar PCA, la cual no presenta actividad anticoagulante cuando está unida al EPCR, sugiriéndose que desempeñaría funciones sobre otros sustratos todavía no conocidos ⁸⁵.

La APC liberada del EPCR recuperaría su capacidad de inhibir al FVa y FVIIIa clivando las cadenas de alto y bajo peso molecular de ambos factores.

La inactivación del FVa por la PCA ocurre mediante la ruptura de tres uniones peptídicas Arg⁵⁰⁶, Arg³⁰⁶ y Arg⁶⁷⁹ en una reacción bifásica, con un clivaje rápido en la unión Arg⁵⁰⁶ seguido de un clivaje lento en la unión Arg³⁰⁶.

La ruptura de la unión Arg⁵⁰⁶ sólo afecta el 50% de la actividad del FVa. La inactivación completa se logra con la escisión de la unión Arg³⁰⁶. Cuando solo ocurrió la escisión en Arg⁵⁰⁶ el FVa pierde su afinidad por el FXa, pero todavía

mantiene su actividad como cofactor en el complejo protrombinasa necesitando en este caso, mayores concentraciones de FXa.

Se describió otro camino de inactivación del FVa, en donde sólo ocurre la ruptura lenta de la unión Arg³⁰⁶. La vía de inactivación predominante sería la bifásica ⁵⁰.

Hasta el momento se describieron más de 160 mutaciones que conducen a déficit de PC que se transmiten con carácter autosómico dominante.

La frecuencia de deficiencia de PC es de 1,4 a 8,6 % en pacientes trombóticos y de 0,15 a 0,5 % en la población en general ^{86, 87}. Es un riesgo importante para la trombosis venosa y de menor importancia para la trombosis arterial.

Una alteración significativa del sistema de la PC se encuentra en una mutación del FV por sustitución de Arginina⁵⁰⁶ por Glicina, que conduce a la síntesis del factor V Leiden (FVL), el cual no presenta el sitio de clivaje 506 ⁸⁸.

Esta mutación induce que la inactivación del FV esté mediada por la segunda vía más lenta (Arg³⁰⁶), disminuyendo 10 veces la velocidad de inhibición del FVa. De esta manera el FVa permanece más tiempo en circulación incrementando la generación de trombina y favoreciendo un estado hipercoagulable ^{88, 89}.

La presencia del Factor V Leiden está asociada con un aumento de 5 a 10 veces en el riesgo de sufrir trombosis venosa. La frecuencia del FVL en la población normal varía entre el 2 al 7 %, según los diferentes grupos étnicos. En pacientes con trombosis o familias con trombofilia la frecuencia asciende al 40 % ⁸⁸.

La Proteína S es una proteína vitamina K dependiente, sintetizada principalmente en el hepatocito y en menor proporción en células endoteliales y en plaquetas, con una concentración plasmática de 250 a 350 nM y una vida media de 42 horas. Su estructura presenta dominios gla, una región sensible a trombina y 4 dominios homólogos a EGF ⁷⁴.

En el torrente sanguíneo el 60% de Proteína S circula unida a una de las proteínas regulatorias del sistema de complemento la C4BP (C4 binding protein), mientras que el 40% restante de la PS circula en forma libre (única responsable de la actividad de cofactor de la PCA) ⁷⁴.

La C4BP es una glicoproteína plasmática, reactante de fase aguda, que presenta una estructura única en forma de pulpo, compuesta por 7 cadenas α idénticas y una cadena β donde se encuentra un sitio de unión para la PS, mientras que cada cadena α contiene un sitio de unión para C4b ⁹⁰.

Se ha encontrado que *in vivo*, existe una alta afinidad entre la PS y la C4BP. Todas las moléculas de C4BP circulan unidas a PS y solamente el exceso de PS circula libre y en condiciones de actuar como cofactor de la PC ⁹¹.

La Proteína S aumenta 20 veces la velocidad de hidrólisis de la Arg³⁰⁶ en la segunda fase de inactivación del FVa por la APC, mientras que el FXa inhibe la fase rápida de inactivación en la escisión de la unión Arg⁵⁰⁶. De esta manera observamos que la PS y el FXa modulan el camino de inhibición de la Proteína C ^{50, 92}.

La inactivación del FVIIIa por APC es también un proceso bifásico, con una primera ruptura en la unión Arg⁵⁶² y luego en Arg³³⁶. Esta reacción es estimulada por la presencia de PS y fosfolípidos. Se demostró que un fragmento de la región B del FV (no del FVa) colabora con la PCA y PS para inhibir al FVIIIa ⁹³.

La PS presenta un efecto inhibitorio independiente de su función como cofactor de la APC inhibiendo directamente la formación de protrombina mediante interacciones con el FVa y FXa ⁹⁴.

La deficiencia hereditaria de Proteína S se transmite en forma autosómica dominante, la mayoría de los pacientes heterocigotas desarrollan eventos tromboembólicos cercanos a la madurez ⁹⁵.

De acuerdo a las recomendaciones del Subcomité de Estandarización de la ISTH, se definen tres tipos de deficiencias de la PS, en base a los niveles de PS total, PS libre y a la actividad de cofactor de la Proteína C activada⁹⁵.

Tipo I: disminución antigénica de la PS total y PS libre.

Tipo II: PS normal y baja actividad del cofactor de APC (esta deficiencia es muy rara indicando que la metodología disponible no detectaría todos los defectos funcionales de la PS).

Tipo III: caracterizada por niveles disminuidos de PS libre y niveles normales o disminuidos de PS total. La frecuencia de la deficiencia de la PS en la población general no está documentada, mientras que en pacientes con trombosis venosa es similar al de la PC (1,4 al 7,5%)⁹⁵.

II. 3. 3. INHIBIDORES DE SERINO PROTEASAS

Los inhibidores de serino proteasas (SERPINAS) son una familia de proteínas que regulan la actividad de algunas de las enzimas del sistema de coagulación y fibrinolítico; representan el 10 % de las proteínas plasmáticas ⁹⁶.

Las serpinas presentan gran homología estructural entre ellas y evolucionaron de un gen ancestral común hace más de 500 millones de años. La familia incluye proteínas que mantuvieron su función de inhibidores de serinoproteasas, mientras que otras lo perdieron y adquirieron propiedades funcionales diferentes ^{96, 97} (ver Tabla N° 3).

La función inhibitoria de las serpinas se basa en que presentan gran movilidad. Esta característica induce un cambio conformacional profundo en donde el rulo que contiene el centro activo P₁ penetra en el cuerpo de la molécula, para unir irreversiblemente la proteasa blanco, en un sistema similar al de una trampa de ratón ⁹⁸. De esta manera se forma el complejo equimolecular enzima-inhibidor altamente estable, que es depurado de la circulación como tal ⁹⁹.

II. 3. 3.1. ANTITROMBINA III (ATIII)

La ATIII es una proteína que inhibe serinoproteasas del sistema de coagulación, principalmente trombina, FXa, FIXa, FXIa y FXIIa. También inhibe al complejo FVIIa-FT, a la enzima fibrinolítica plasmina y en menor grado a calicreínas, a la proteinasa del complemento (C1s) y a tripsina. La inhibición de las serino proteasas está ampliamente potenciada por la acción de heparina y otros glicosaminoglicanos ^{100 - 102}.

La ATIII es una glicoproteína plasmática presente en la mayoría de los vertebrados, se sintetiza en el hígado, con una vida media aproximada de 3 días y con una concentración plasmática de 0,12 mg/ml ó 2,3 µM.

Tabla N° 3. Clasificación de las serpinas

SERPINA	PROTEINASA BLANCO
Antitrombina III	Trombina, FIXa, FXa, FXIa y FXIIa
Cofactor II de la Heparina	Trombina y quimiotripsina
α_1 antitripsina	Elastasa, catepsina G, trombina, plasmina, calicreínas, FXa, t-PA, u-PA
α_1 antiqumiotripsina	Proteasa simil quimiotripsina, catepsina G
C₁ inhibidor	C _{1r} , C _{1s} , FXIIa, calicreínas, FXIa, APC, trombina
Inhibidor de la Proteína C activada	Proteína C activada, t-PA
α_2 antiplasmina	Plasmina
PAI-1	t-PA, u-PA
PAI-2	u-PA
Proteasa nexina I	u-PA, trombina
Ovoalbúmina	
Angiotensinógeno	

El gen que codifica la síntesis de la ATIII está localizado en el cromosoma 1q 23-25, el que da lugar a la formación de una cadena polipeptídica única, compuesta por 432 aminoácidos con cuatro posibles sitios de glicosilación: Asn⁹⁶, Asn¹³⁵, Asn¹⁵⁵ y Asn¹⁹².

En circulación existen dos clases de moléculas de ATIII, la predominante (ATIII α) con cadenas de oligosacáridos en los sitios de glicosilación y una fracción minoritaria, constituida por la ATIII β (10% del total de ATIII, molécula que pierde la cadena de carbohidratos en la Asn¹³⁵, presentando una mayor afinidad por heparina¹⁰³.

La heterogeneidad de la molécula de ATIII que se evidencia por diversas técnicas electroforéticas, se debe a la diversidad de cargas que resultan de la presencia variable de las cadenas de carbohidratos^{103, 104}.

El peso molecular de ATIII es de 58.200 D calculado a partir de su secuencia de aminoácidos y composición en carbohidratos, el cual coincide con el obtenido por equilibrio de sedimentación⁹⁷.

II. 3. 3. 1. A. ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DE ATIII

La molécula de ATIII presenta 9 α -hélices denominadas de A a I y tres láminas beta llamadas A, B y C. En la molécula de ATIII se definen dos dominios importantes, un sitio activo y un sitio de unión a heparina.

Dominio de unión a heparina: La molécula de heparina debe tener una secuencia pentasacárida específica mínima, que es la que se une a la ATIII y además se requiere una longitud de al menos de 16 unidades disacáridas en la molécula, condición necesaria para que una misma cadena de glicosaminoglicano se pueda unir a la proteasa y al inhibidor¹⁰⁵.

En la molécula de ATIII el dominio de unión a heparina está formado por dos regiones que abarcan los aminoácidos 41-49 y 107-156; ambas regiones consisten en conjuntos de aminoácidos básicos (Arg y Lys) que interactúan

con los grupos cargados negativamente (sulfatos y carboxilatos) de la molécula de heparina ¹⁰⁶.

Si bien en la estructura primaria estas dos regiones están distantes, el plegamiento de la molécula induce que, en la estructura terciaria, las dos regiones estén adyacentes entre sí.

Los aminoácidos específicos constituyen el punto de contacto entre ATIII y el pentasacárido de heparina, sin embargo la conformación completa del dominio de unión a heparina, interviene en la modificación estructural que sufre la molécula de ATIII como consecuencia de la unión a heparina ¹⁰⁶.

La ATIII circula en plasma en forma parcialmente inactiva debido a que su centro activo está semi oculto. La ATIII presenta una estructura en forma de cañón, dentro del cual se encuentra su dominio activo parcialmente oculto, uniéndose sin dificultad a la serinoproteasa. ⁹⁹

La unión del pentasacárido de heparina a la molécula de ATIII, produce un cambio conformacional de las láminas beta de la ATIII, con el desplazamiento del centro activo de la zona de semi ocultamiento a una posición expuesta, dando lugar una molécula de ATIII funcionalmente activa ⁹⁸.

Dominio del sitio activo: Como otras serpinas, la ATIII presenta una secuencia de aminoácidos que son accesibles al ataque proteolítico, a la que se denomina sitio activo.

La proteasa blanco (trombina) reconoce la unión peptídica denominada P₁-P₁' (nomenclatura de Schechter y Berger), la cual en la ATIII está constituida por Arg³⁹³ - Ser³⁹⁴ situada en un rulo expuesto en la superficie de la proteína.

La proteinasa cliva el sitio activo, lo que conduce a un cambio conformacional en la molécula de ATIII. El cambio estructural consiste en que un fragmento de 14 residuos (P₁₄ - P₁) es enterrado dentro de la molécula de ATIII por inserción en la lámina beta A, como una hebra extra. Esto induce la unión de la proteasa a la molécula de ATIII formándose el complejo enzima -

inhibidor inactivo altamente estable el cual es rápidamente removido de la circulación^{98, 102}.

La presencia de Arg en la posición P₁ le confiere amplia especificidad a la ATIII, permitiendo que en mayor o menor grado la mayoría de las serino proteasas de la coagulación sean inhibidas por ATIII. Los otros aminoácidos que forman parte del rulo que conforma el sitio activo, desempeñan un papel importante en el reconocimiento, unión y especificidad de ATIII por el sustrato¹⁰⁷.

II. 3. 3. 1. B. MODELO DE INHIBICION DE TROMBINA POR ATIII. MECANISMO DE TEMPLADO

La base del modelo de “templado”, “puente” o “complejo ternario” se basa en que la molécula de heparina actúa de plantilla o molde en donde se unen simultáneamente la molécula de proteasa y el inhibidor.

El mecanismo de inhibición de la proteasa por la ATIII es un proceso en dos etapas. En una primera etapa se forma el complejo con unión débil ($K_d 1,4 \cdot 10^{-3}$ M), se considera que este complejo débil es el que determina el prolongado tiempo de inhibición de trombina en plasma (aproximadamente 40 segundos)⁹⁷.

En una segunda etapa se forma una unión altamente estable entre Arg³⁹³ del sitio activo de ATIII y la Ser del sitio activo de la proteasa. La heparina tiene un apreciable efecto potenciador, ya que acelera al menos 2.000 veces la acción de ATIII en condiciones óptimas y este efecto reduce la vida media de la trombina en plasma a aproximadamente a 10 milisegundos⁹⁷.

Cuando la ATIII se une a la molécula de heparina a través del pentasacárido específico y la trombina se une a heparina a través de su ABEII, se produce el acercamiento de ambas moléculas, de manera que los sitios activos de la proteasa e inhibidor están próximos entre sí¹⁰².

Al inicio la unión del sitio activo de ATIII actúa como un sustrato para trombina, pero cuando se produce el clivaje del sitio activo, ocurre el cambio

conformacional en la ATIII, de manera que la proteasa queda atrapada, en un mecanismo similar al de la trampa de ratón^{97, 98}.

Como consecuencia del cambio conformacional, la afinidad del complejo por la heparina disminuye, liberándose la molécula de heparina que queda en condiciones de actuar como plantilla en la formación de otros complejos. (Ver figura N° 4).

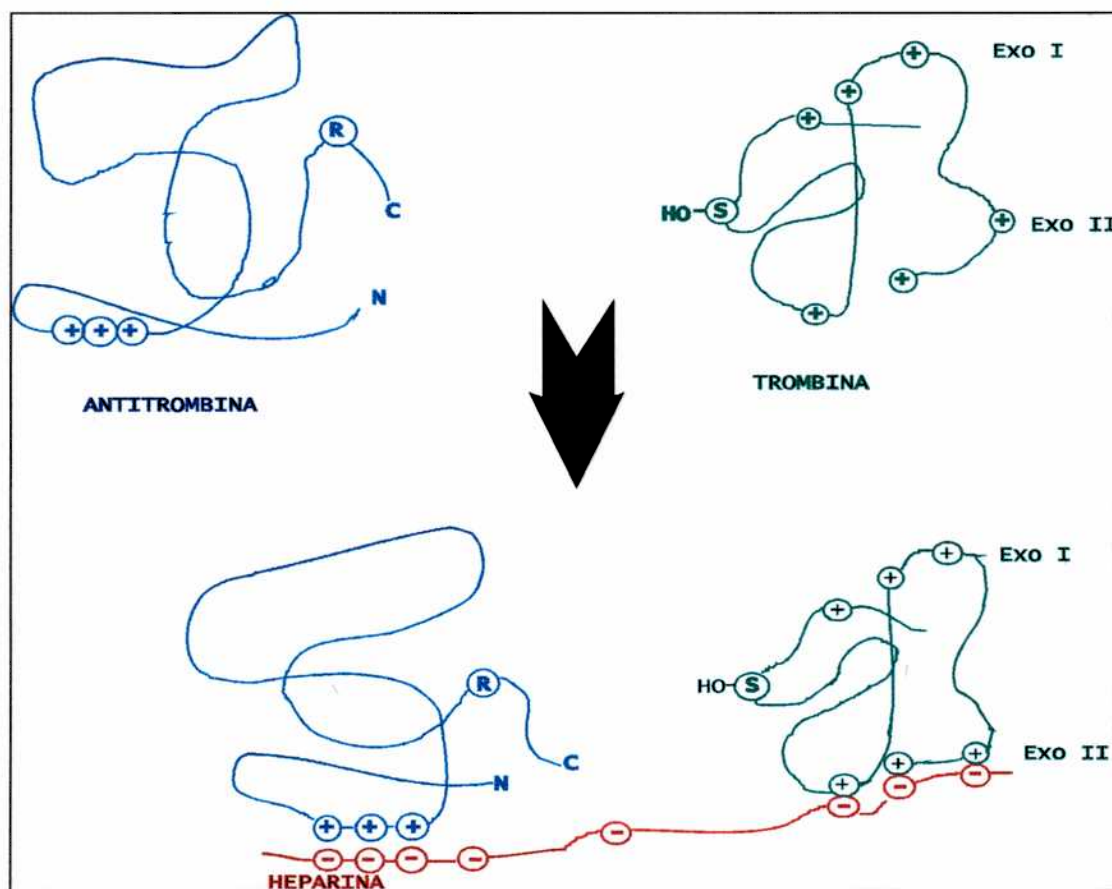


Figura N° 4. Mecanismo de inhibición de trombina por templado

II. 3. 3. 1. C. DEFICIENCIA HEREDITARIA DE ATIII

La deficiencia congénita de ATIII es una patología que se transmite en forma autosómica dominante con manifestaciones heterogéneas, su asociación con eventos trombóticos fue demostrada hace más de 25 años. La mayoría de los individuos heterocigotas presentan niveles de ATIII que oscilan entre 40 y 70% ¹⁰⁸.

La deficiencia de ATIII se asocia con trombosis venosa principalmente en venas profundas de las extremidades inferiores, vena femoral e ilíaca, venas superficiales de las extremidades inferiores y embolia pulmonar, menos frecuentemente en venas mesentérica y cerebrales ¹⁰⁹.

La deficiencia homocigota de ATIII es muy rara, produce eventos trombóticos severos que pueden incluir arterias y se considera que no es compatible con la vida ¹⁰⁸.

La incidencia de la deficiencia hereditaria de ATIII se estima entre 1:2.000 a 1:5.000 en la población general. En pacientes con trombosis venosa de 0,5 a 7% ^{86, 97, 110}.

II. 3. 3. 2. COFACTOR II DE LA HEPARINA

El HCII es una glicoproteína plasmática que inhibe trombina y quimiotripsina, es miembro de la superfamilia de las serpinas (inhibidores de serinoproteasas) ⁷.

El HCII actúa como un pseudosustrato para trombina y quimiotripsina, ya que ellas intentan escindir al HCII y quedan atrapadas formando un complejo 1:1 donde la proteasa permanece inactiva.

El Dermatan sulfato (DS), heparina y otros glicosaminoglicanos potencian la inhibición de trombina por HCII aproximadamente 1000 veces. La interacción HCII - quimiotripsina no se modifica por la presencia de glicosaminoglicanos ⁶⁷.

Aunque se denomina "Cofactor II de la Heparina", esta proteína no interacciona con la heparina en plasma, excepto a concentraciones muy altas de la misma. Sin embargo se mantiene el nombre de la proteína con el que se la denominó inicialmente ¹¹¹.

II. 3. 3. 2. A. ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DE HCII

El HCII es una cadena polipeptídica simple de un peso molecular de 65.600 D ⁵. Es sintetizado en el hígado como una cadena de 480 aminoácidos ¹¹², su concentración plasmática es de aproximadamente 1,2 μ M con una vida media de 2,5 días ¹¹³. La proteína presenta tres sitios de glicosilación y tres cisteínas que aparentemente no forman puentes disulfuros.

El gen que codifica su síntesis está ubicado en la banda 11 del brazo corto del cromosoma 22 (22q11), ocupa 16 kb de ADN, contiene 5 exones y presenta polimorfismo ¹¹⁴.

El HCII estructuralmente está compuesto por tres dominios: del sitio activo, el dominio de unión a los glicosaminoglicanos y un dominio ácido aminoterminal.

Dominio del Sitio activo

Como otras serpinas, el HCII presenta una secuencia de aminoácidos que son accesibles al ataque proteolítico denominado sitio activo, el cual en el HCII está constituida por Leu⁴⁴⁴ - Ser⁴⁴⁵.

La presencia de Leu en la posición P₁ es atípica para los sustratos de trombina y explicaría porque en ausencia de glicosaminoglicanos el HCII inhibe más rápidamente quimiotripsina que trombina¹¹⁵.

Cuando se sustituye Leu⁴⁴⁴ por Arg la inhibición de trombina por HCII en ausencia de glicosaminoglicanos aumenta 100 veces y elimina la capacidad de HCII de inactivar quimiotripsina. El HCII recombinante tiene la capacidad de inhibir FXa, plasmina y calicreína¹¹⁵.

Dominio de unión a glicosaminoglicanos

La inhibición de trombina por HCII aumenta más de 1000 veces por acción de heparina, heparán sulfato o dermatán sulfato⁶ así como también por otras macromoléculas polianiónicas como policarboxilatos, polifosfatos y polisulfatos^{116 - 119}.

La porción central de la molécula de HCII posee un conjunto de aminoácidos básicos que constituyen el lugar de unión a los glicosaminoglicanos. Mutaciones en Arg^{184, 185, 189, 192 y 193} disminuyen la activación de HCII por DS pero no por heparina. Mutaciones en Lys¹⁷³, Arg⁸⁴ y Arg¹⁸⁵ disminuyen la activación por heparina y mutaciones en Arg¹⁸⁴ o Lys¹⁸⁵ afectan la interacción del HCII con los dos glicosaminoglicanos. Por lo tanto se propone que en el HCII los sitios de unión a heparina y Dermatan Sulfato serían diferentes pero se superpondrían^{120, 121}.

Dominio ácido aminoterminal

La porción aminoterminal del HCII posee una secuencia que es similar al extremo carboxiterminal de la hirudina, porción que reconoce el exosito de unión aniónica I de la trombina (ABEI) ¹²². Este segmento del HCII reconocería también el ABEI de la trombina, lo que facilitaría la formación del complejo trombina-HCII. Se comprobó que un péptido sintético del HCII formado por los aminoácidos 54-75 compite con el fibrinógeno y la hirudina por la unión al ABEI de la trombina ¹²¹.

La delección de esa porción en la molécula de HCII reduce su acción inhibitoria de trombina 100 veces en presencia de heparina y 1000 veces en presencia de Dermatan Sulfato ⁶⁷. La inhibición de trombina por el HCII mutado en ausencia de glicosaminoglicanos es casi idéntica a la del HCII nativo, lo cual indicaría que la porción ácida aminoterminal del HCII desempeña su función cuando el glicosaminoglicano está presente.

Se postula que la interacción específica entre el dominio ácido del HCII con el exosito de unión aniónica de la trombina sería la responsable de la alta especificidad del HCII por la trombina ¹²⁴.

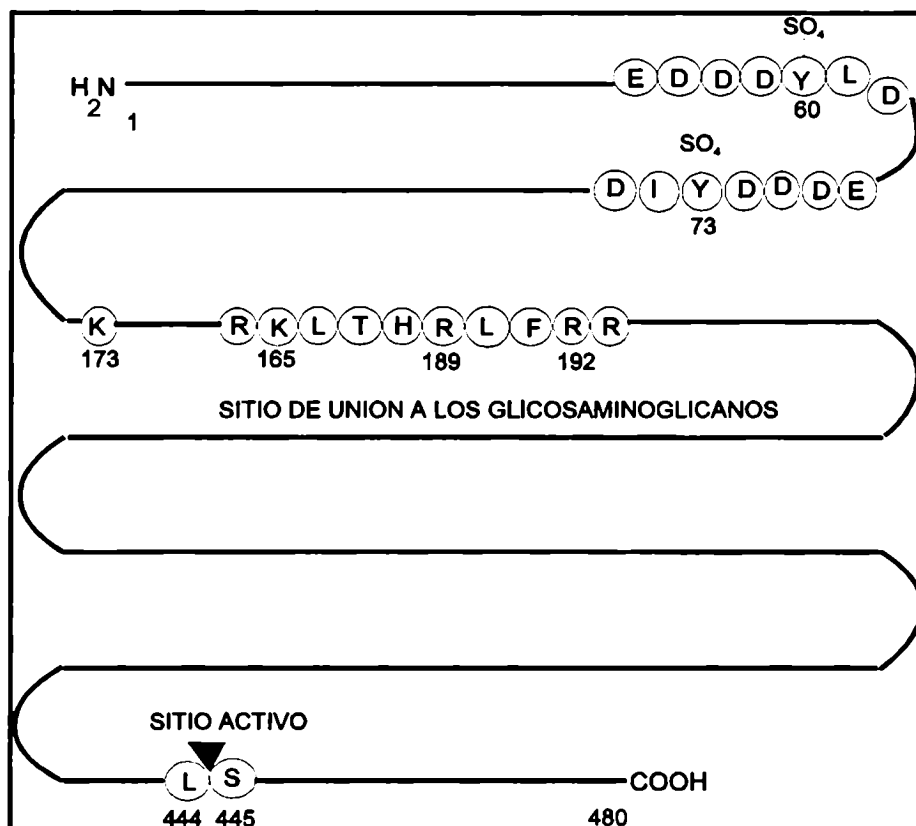


Figura N° 5. Estructura y esquema de la molécula de Cofactor II de la Heparina

II. 3. 3. 2. B. MECANISMO DE INHIBICION DE PROTEASAS

El HCII es una serino proteasa que inhibe trombina y quimiotripsina. A diferencia de otras serpinas como ATIII que tienen un rango más amplio de acción, el HCII presenta una gran especificidad ⁵.

Recientemente Tollefsen describió que HCII en presencia de dermatán sulfato inhibe más eficientemente meizotrombina y desF1meizotrombina que la ATIII potenciada por heparina ¹¹.

INHIBICION DE TROMBINA

Modelo de inhibición alostérica:

El modelo de inhibición de trombina por el HCII propuesto por Tollefsen se muestra en la Figura N° 6 .

La molécula de HCII está estructuralmente conformada de manera que el dominio ácido aminoterminal está unido intramolecularmente al sitio de unión a los glicosaminoglicanos. De esta manera el dominio aminoterminal ácido está bloqueado y no puede interactuar con el ABEI de trombina.

Cuando dermatán sulfato o heparina están presentes compiten por el sitio de unión a heparina, producen el desplazamiento del extremo aminoterminal del HCII, dejándolo libre para actuar sobre el ABEI de la trombina ¹²⁴.

Existen dos hipótesis para explicar este proceso: el acercamiento de ambas moléculas en la orientación adecuada, o un cambio conformacional en la molécula de HCII. La exposición del sitio activo del HCII facilitaría el ataque de la trombina sobre el mismo, promoviendo la formación del complejo ^{124, 125}.

Se postuló que existiría un equilibrio entre conformaciones de HCII expuestas y no expuestas. El agregado de glicosaminoglicanos desplazaría este equilibrio hacia la conformación expuesta, acelerando de esta manera la inhibición.

El mecanismo de inhibición alostérico no requiere la unión de trombina al glicosaminoglicano.

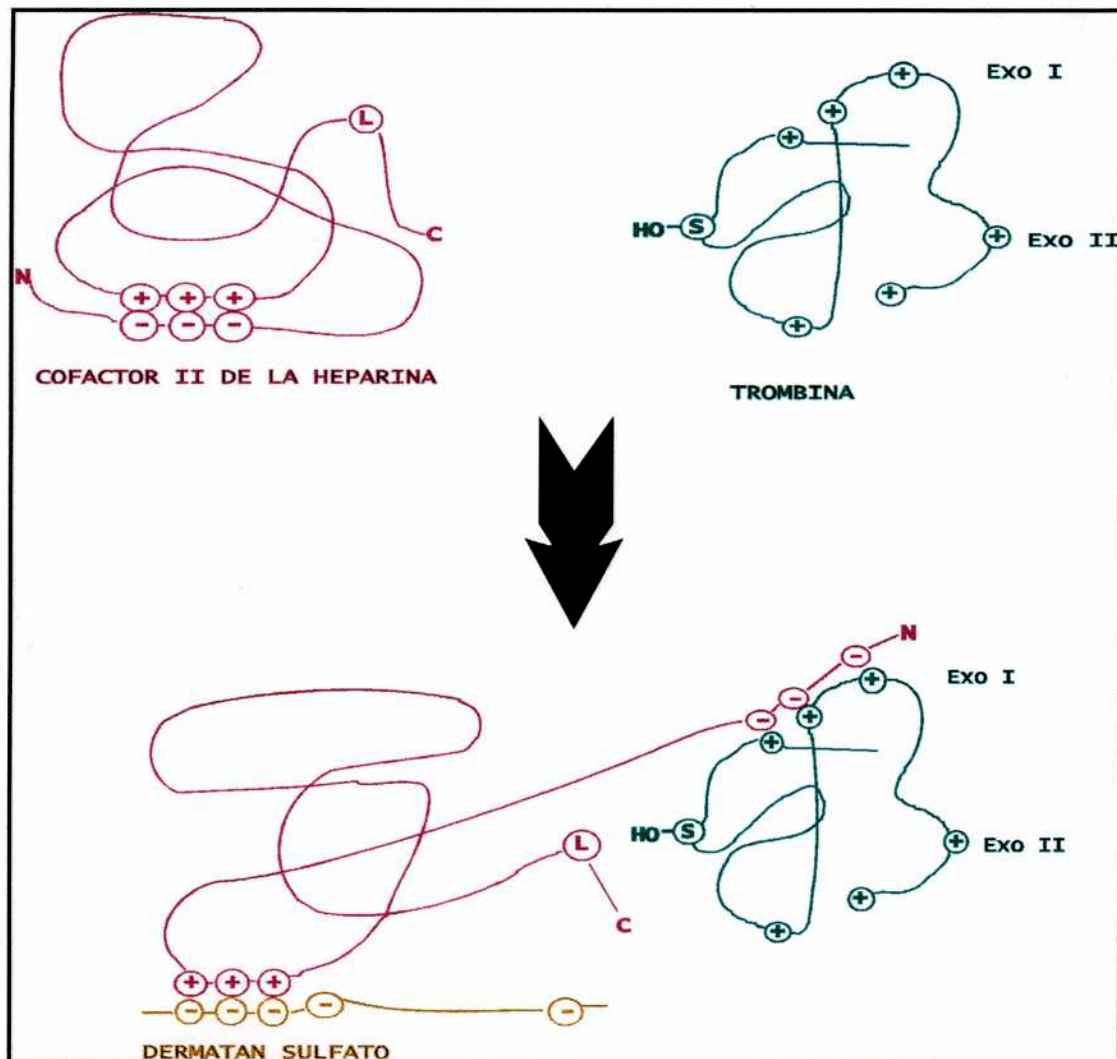


Figura N° 6. Modelo de inhibición de trombina alostérico

INHIBICION DE MEIZOTROMBINA

El Cofactor II de la Heparina y la ATIII inhiben meizotrombina y desF1meizotrombina. Estudios recientes de Han ¹¹ demostraron que el HCII en presencia de dermatán sulfato inhibe más rápidamente meizotrombina que la ATIII potenciada por heparina.

La cristalografía de rayos X del complejo trombina complejada con el fragmento 2, reveló que en la molécula de meizotrombina el ABEII es inaccesible ¹²⁶. Por otro lado evidencias indirectas indican que meizotrombina no se une fuertemente a heparina. Estos hallazgos sugieren que la molécula de meizotrombina no tendría disponible el ABEII para unirse a heparina¹²⁶, por lo tanto el modelo de template propuesto para la acción de ATIII no se adapta. En cambio sí sería compatible con el modelo de inhibición alostérico propuesto para el HCII.

Así el HCII potenciado por DS acelera la inhibición de meizotrombina y meizotrombina(desF1) entre 380 y 1000 veces.

El proceso de inhibición de meizotrombina es favorecido por la presencia de fosfolípidos y calcio, lo que sugeriría que meizotrombina unida a las membranas fosfolípídicas es susceptible de ser inhibida por HCII ¹¹.

Ensayos de Han y colaboradores demostraron que la meizotrombina, componente del complejo protrombinasa, puede ser inhibida por HCII. Además esta serpina también inhibe meizotrombina(desF1) que al perder los gamma carboxiglutámicos se libera del complejo y difunde al medio ¹¹.

Si bien el HCII potenciado por DS inhibe meizotrombina más eficientemente que la ATIII, hay que tener en cuenta que la velocidad con la que el HCII inhibe trombina es 50 veces mayor que la velocidad con la que inhibe meizotrombina. Esto se explicaría por los cambios conformacionales que se producen en el sitio activo cuando la meizotrombina se convierte en trombina¹¹.

INHIBICION DE QUIMIOTRIPSINA

El HCII inhibe quimiotripsina formando un complejo equimolecular HCII-quimiotripsina, proceso que no es potenciado por los glicosaminoglicanos. En ausencia de glicosaminoglicanos el HCII inhibe más eficientemente quimiotripsina ($1,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) que trombina ($5 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)⁹.

La capacidad de HCII de inhibir quimiotripsina está determinada principalmente por la Leu⁴⁴⁴ que ocupa la posición P₁ en el sitio activo, ya que si se sustituye Leu por Arg (que es el aminoácido habitual para los inhibidores de serino proteasas) el HCII pierde la capacidad de inhibir quimiotripsina¹²⁵.

La especificidad de las serpinas sobre las proteasas blanco esta muy influenciada por el aminoácido que ocupa la posición P₁ en el sitio activo.

II. 3. 3. 2. C. DEPURACION DEL COMPLEJO SERPINA-TROMBINA

Una vez formado el complejo HCII-Trombina tiene una vida media de aproximadamente 10 minutos y es removido de la circulación por un receptor hepático que depura los complejos trombina-ATIII, trombina-HCII, α_1 Antitripsina-tripsina y α_1 Antitripsina-elastasa⁹⁹.

Se propone que este receptor hepático sería la Proteína Relacionada con el Receptor de la Lipoproteína de Baja Densidad (LRP)^{99, 128}.

Si bien los receptores hepáticos para el complejo serpina-trombina fueron identificados, se demostró que la mayor parte del complejo trombina-serpina se une a la vitronectina, una proteína plasmática adhesiva, formando complejos ternarios serpina - trombina - vitronectina¹²⁹.

La unión de la vitronectina al complejo trombina-serpina se realiza a través de la trombina por una secuencia que está oculta en la molécula de alfa trombina, pero que se expone en la molécula de trombina complejada, concluyendo que la vitronectina se une a conformaciones alteradas de trombina¹²⁹.

La unión de trombina-serpina (trombina-HCII) a vitronectina induce un cambio conformacional en la molécula de vitronectina, de manera que expone

sitios de unión a heparina en la vitronectina y se produce la adhesión a células endoteliales mediada por heparina, ya que la vitronectina no pierde sus propiedades de proteína adhesiva ¹³⁰.

Se postula que las células endoteliales internalizan los complejos ternarios a través de un mecanismo de transcitosis desde la superficie luminal de la célula a la matriz extracelular, transportándolos mayormente sin degradarlos ^{131, 132}.

La vitronectina forma complejos ternarios con los complejos binarios: trombina-ATIII, trombina-HCII, trombina-Inhibidor de la proteína C, trombina-proteasa nexina 1, sugiriendo que vitronectina desempeñaría la función de limpieza de los complejos trombina-serpina de circulación ¹³⁰.

II. 3. 3. 2. D. PROTEINAS MODULADORAS DE LA ACCION DE HCII

Varias proteínas modulan la acción de los glicosaminoglicanos endógenos y exógenos en circulación ¹²⁵.

Además de ATIII que es el principal factor de unión a heparina, están presentes glicoproteína rica en histidina, vitronectina multimérica, componente P amiloide del suero, factor plaquetario 4, proteínas básicas que unen heparina de los eosinófilos y fibrinógeno.

Glicoproteína rica en histidina (HRGP) es una glicoproteína plasmática (concentración 1,8 μ M) que presenta la propiedad de unirse a heparina y disminuye la activación de la ATIII *in vitro*.

Tollefsen demostró que HRGP bloquea la inactivación de trombina por HCII potenciada por heparina pero no la potenciada por Dermatan Sulfato, lo cual indicaría que el Dermatan Sulfato no se une al HRGP ¹³³.

Vitronectina multimérica es una proteína adhesiva que presenta diferentes propiedades como inhibidor del complemento, neutralizante de heparina no

fraccionada y de bajo peso molecular, incluyendo al pentasacárido que activa a la ATIII, al heparán sulfato.

La concentración plasmática de vitronectina es de 4 a 6 μM . La vitronectina no tiene la capacidad de unirse (neutralizar) al Dermátan Sulfato ¹³⁴.

Componente P amiloide del suero es una proteína fibrosa que presenta secuencias de aminoácidos similares a la gamaglobulina.

Fue aislada del plasma de pacientes con amiloidosis presentando estructura y características químicas distintas a las proteínas fibrosas de los depósitos amiloides.

Factor plaquetario 4 es una proteína sintetizada por las plaquetas y almacenada en los alfa gránulos plaquetarios. Cuando la plaqueta fue activada y se liberó el contenido de sus gránulos se detecta FP4 en circulación.

El FP4 liberado se une a los proteoglicanos plaquetarios, pero también es capaz de liberarse y unirse a otros glicosaminoglicanos.

El FP4 presenta la propiedad de unirse a heparina y neutralizar su capacidad de potenciar a la ATIII. Se comprobó que en concentraciones mayores de 1,3 μM bloquea la activación de HCII por Dermátan Sulfato y por heparina ^{133, 134}.

El fibrinógeno es una proteína plasmática perteneciente al sistema de coagulación, responsable de la formación de la malla de fibrina que engloba al coágulo; su concentración plasmática oscila entre 1,5 a 4 mg/ml.

Zammit y colaboradores describieron que concentraciones fisiológicas de fibrinógeno disminuyen en un 30% la actividad antitrombínica del Dermátan Sulfato ^{135 - 137}.

II. 3. 3. 2. E. ACCION DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS SOBRE EL HCII

Las alteraciones hemostáticas de los procesos inflamatorios y sépticos se conocen desde hace tiempo ^{138, 139}. La activación en cascada de las proteasas plasmáticas y celulares sería el responsable de la degradación proteica y el daño celular producido durante el evento.

Durante el proceso inflamatorio ocurre la liberación local de una variedad de enzimas proteolíticas, principalmente elastasa leucocitaria liberada por degranulación de los polimorfonucleares. La degradación de ATIII por la elastasa leucocitaria esta ampliamente comprobada ^{140, 141}.

El HCII es rápidamente inactivado por los productos liberados de los leucocitos polimorfonucleares activados, dando lugar a productos de degradación de 54 kD que no presentan la propiedad de inhibir trombina ni quimiotripsina ¹⁴².

En ausencia de glicosaminoglicanos el HCII es degradado por las enzimas leucocitarias siete veces más rápidamente que ATIII ¹⁴². En presencia de heparina, ATIII es inactivada más rápidamente mientras que el HCII es "protegido" de la inactivación. En presencia de Dermátan Sulfato no se observan modificaciones en la velocidad de degradación ¹⁴².

II. 3. 3. 2. F. DEFICIENCIAS DE HCII

La trombofilia es la tendencia a la trombosis. La trombofilia hereditaria es la tendencia al tromboembolismo arterial o venoso genéticamente determinada.

Anormalidades dominantes o combinaciones de defectos menos severos pueden presentarse clínicamente desde edad temprana, con recurrencia frecuente o historia familiar. Alteraciones más leves solo pueden ser descubiertas por investigaciones de laboratorio ¹¹⁰.

La deficiencia hereditaria de algún inhibidor fisiológico de la coagulación (ATIII, PC, PS) o de algún otro de los componentes de los sistemas, está asociada con riesgo trombótico, pero cuando se estudian familias con igual genotipo y se observa que no todos los miembros desarrollan trombosis, sugieren un origen multifactorial de esta patología.

Actualmente se apoya la hipótesis que debe contribuir más de un factor de riesgo genético de trombosis, para que el paciente tenga un fenotipo trombofílico, motivo por el cual se considera a la trombofilia como un desorden multigénico combinado ¹⁴³.

Las deficiencias de HCII pueden ser congénitas o adquiridas

DEFICIENCIA CONGENITA DE HCII

Para la clasificación de las deficiencia congénita de HCII se utiliza la que originalmente se construyó para las mutaciones de ATIII.

Tipo I: Disminución concordante de la actividad funcional y antigénica

Tipo II: Actividad funcional disminuida y antigénica normal

RS: Alteración en el sitio activo del inhibidor

HBS: Alteración en el sitio de unión a glicosaminoglicanos

PE: Alteraciones funcionales múltiples (efecto pleotrópico)

Algunos autores detectaron deficiencias de HCII asociadas a eventos trombóticos ^{7, 144, 145}, pero otros sostienen que la prevalencia de la deficiencia de HCII es similar en personas sanas que en pacientes trombóticos ¹⁴⁶. En la actualidad se la considera como una causa potencial de trombofilia hereditaria pero sin evidencia firme ¹⁰⁷.

Hasta el momento las mutaciones del HCII identificadas (Tabla Nº 4) son: HCII Oslo ¹⁴⁷, HCII Awaji ¹⁴⁸ y HCII Rimini ¹⁴⁹. El HCII Oslo se identificó en dadores de sangre. El HCII Rimini es encontró en dos pacientes con

trombofilia pero que además de presentar la deficiencia de HCII, uno de los pacientes tenía asociado factor V Leiden y el otro una deficiencia de PC del tipo I. El HCII Awaji se halló en un paciente con angina pectoris severa y enfermedad arterial coronaria.

Estos hallazgos sugieren que la deficiencia congénita de HCII representaría un leve riesgo de trombosis, que sólo se manifestaría clínicamente cuando se presenta asociadas otras condiciones trombogénicas hereditarias o adquiridas

143.

DEFICIENCIA ADQUIRIDA DE HCII

La disminución de la concentración de cualquier proteína plasmática puede deberse: disminución de la síntesis de la proteína; pérdida de la proteína; aumento del consumo.

Fisiológicamente la concentración de HCII está marcadamente disminuida en neonatos por la inmadurez hepática (disminución de síntesis). En pacientes con hepatopatías existe alteración de la síntesis normal de HCII con la consecuente disminución de la concentración plasmática⁸.

En la coagulación intravascular diseminada ocurre un aumento en el consumo del inhibidor, comprobado por la presencia del complejo trombina-HCII en circulación¹⁵⁰. En todos estos casos los niveles de HCII y ATIII disminuyen en forma similar^{8, 151}.

Tabla N° 4. Clasificación de las deficiencias congénitas de HCII

Nombre	Tipo	Alteración genética	Alteración molecular
HCII Rimini	I	Deleción de dos Timidinas consecutivas en el exón 5 que produce un cambio del marco de lectura y una traducción elongada	Altera el plegamiento
HCII Oslo	II HBS	Sustitución G por A en la posición 651 del DNA que produce cambio de His por Arg 189	Reducción en la potenciación por DS
HCII Awaji	I	Insertión T después de GAT que codifica para Asp88 en el exón II. Cambio del marco de lectura con alteración en la secuencia de los aminoácidos 89 a 107 con acortamiento	Pérdida del sitio activo para la inhibición de trombina

También se demostró que la concentración de HCII esta ligeramente disminuida ($0,68 \pm 15$ U/ml) en pacientes que presentan anemia drepanocítica, no observándose en estos casos la disminución paralela de ATIII.

El HCII se encuentra disminuido en la talasemia intermedia y en la deficiencia de piruvato kinasa, sugiriendo que la hemólisis intravascular es la responsable de la disminución de HCII ¹⁵².

Se observó un aumento de los niveles plasmáticos de HCII en el embarazo a término ^{132, 153, 154} y en mujeres con contracepción oral ¹⁵⁵, mientras que la Antitrombina III se mantiene dentro de los valores de referencia o ligeramente disminuidos.

De esta manera se sugiere que el HCII desarrollaría un importante papel en el embarazo normal, acompañado por niveles elevados de su potenciador, el dermatán sulfato, debido al proceso de neoformación de vasos (angiogénesis).

Los niveles de HCII retornan a los valores normales después del parto y se correlacionan con la desaparición de la actividad de Dermátán Sulfato en circulación ¹⁵⁴.

En pacientes con pre-eclampsia severa no se observa la elevación del HCII en el tercer trimestre del embarazo ^{155, 156} (Ver tabla N° 5).

Tabla N° 5. Niveles plasmáticos de HCII en diversas patologías

	<i>n</i>	<i>UI/ml</i>	<i>valor de referen</i>	<i>ATIII</i>	<i>Ref</i>
Hepatopatías	21	0,42 0,15	1,00 0,16	-----	151
CID	95	0,40 0,12	1,18 0,45		8
HIV	96	0,75 ± 0,24	0,99 ± 0,17	1,02 ± 0,12	157
Drepanosistosis	61	0,63 ± 0,13	1,0 ± 0,23	0,96 ± 0,15	152
Renal crónico	33	0,85	0,75 ± 1,8	0,80 ± 0,24	158
Anticoag dicum	28	1,17 ± 0,24	1,10 ± 0,21		7
Anticoag Hep	10	1,09 ± 0,25	1,11 ± 0,26	0,81 ± 0,15	159
Diabetes	40	0,83 ± 0,7	0,95 ± 0,17		148,160

II.3. 3. 3. POTENCIADORES DE LAS SERPINAS (GLICOSAMINOGLICANOS)

El desarrollo y normal funcionamiento de todos los tipos celulares de un organismo, dependen de las interacciones con las moléculas de su medio ambiente.

En un principio se definió la matriz extracelular como el material extracelular visible como fibrillas o láminas al microscopio electrónico. Actualmente se la define como el conjunto de moléculas secretadas por las células que son inmovilizadas fuera de las mismas ¹⁶¹.

Los principales componentes de la matriz extracelular son los distintos tipos de colágenos y de glicosaminoglicanos que suelen estar unidos a proteínas formando proteoglicanos.

Los glicosaminoglicanos (GAGS), anteriormente conocidos como mucopolisacáridos, son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas, compuestas por unidades repetidas de disacáridos. Se denominan glicosaminoglicanos debido a que uno de los dos residuos de azúcar del disacárido repetido es siempre un aminoazúcar (N-acetilglucosamina ó N-acetilgalactosamina).

Los glicosaminoglicanos son polímeros lineales, no presentan ramificaciones, se unen a proteínas (que forman el núcleo proteico) a través de un residuo serina de la proteína y una xilosa de un trisacárido de unión específico (xilosa - galactosa - galactosa) del GAG, conformando de esta manera un proteoglicano.

El resto de la cadena de GAG consiste en una unidad repetida de disacáridos (compuesta por dos monosacáridos) unidos entre sí de manera estrictamente alternada.

Los GAGS están unidos covalentemente a proteínas formando moléculas de proteoglicanos, conocidas anteriormente como mucoproteínas. La característica estructural común de los proteoglicanos es la presencia de glicosaminoglicanos ¹⁶².

Solo existen tres unidades distintas de disacáridos que pueden polimerizarse para formar los GAGS denominadas "polímeros parentales". Luego de la polimerización de las cadenas, ocurren modificaciones enzimáticas sobre los azúcares.

Las modificaciones que pueden sufrir los azúcares son cinco: el agregado de grupos O-sulfatos en distintas posiciones (posición 2 del iduronato, posiciones 3 y/o 6 de la glucosamina), el reemplazo de grupos N-acetilo en glucosamina por N-sulfato; y pasos de isomerización del quinto carbono en el ácido D-glucurónico que convierte a este azúcar en su epímero el L-idurónico.

Cada unidad de disacárido que la cadena de GAG puede contener cualquiera o ninguna de estas modificaciones, de tal forma que una cadena de GAG esta formada por unidades disacáridas unidas, cada una de las cuales ha sido modificada en una manera particular.

Se diferenciaron siete grupos de glicosaminoglicanos (ver tabla N° 6), según los residuos de azúcar, el tipo de enlace entre estos residuos y el número y localización del grupo sulfato: heparán sulfato, heparina, condroitín 4 y 6 sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico ¹⁶³.

Tabla N° 6. Clasificación de los glicosaminoglicanos

Glicosamino glicano	Peso Mole cular	Dísacárido		Sulfatos/ disacárido	Distribución los tejidos	en
Acido Hialurónico	4.000 - 8166	Ac D- glucurónico	N-acetil-D- glucosamina	0	Conjuntivos, cartilago, sinovial	piel, liq.
Condroitín 4-Sulfato	5.000- 50.000	Ac D- glucurónico	N-acetil-D- galactosami na	0,2 - 1,0	Cartilago, hueso, arterias	córnea, piel,
Condroitín 6-sulfato	5.000- 50.000	Ac D- glucurónico	N-acetil-D- glucosamina	0,2 - 2,3	Córnea, piel, arterias	hueso,
Dermatán Sulfato	15.000 -	Ac D- glucurónico	N-acetil-D- galactosami na	1,0 - 2,0	Piel, corazón	vasos,
	40.000	Ac L- idurónico				
Heparán Sulfato	5.000- 12.000	Ac D- glucurónico	N-acetil-D- glucosamina	0,2 - 3,0	Pulmón, vasos, corazón	sangre,
		Ac L- idurónico				
Heparina	6.000- 25.000	Ac D- glucurónico	N-acetil-D- glucosamina	2,0 - 3,0	Pulmón, piel, cebadas	hígado, células
		Ac L- idurónico				
Queratán Sulfato	4.000- 19.000	D-galactosa	N-acetil-D- glucosamina	0,9 - 1,8	Cartilago, córnea	

II. 3. 3. 3. A. HEPARINA Y HEPARAN SULFATO

Presentan el polímero parental común [ácido D-glucurónico beta (1->4) D-N-acetil glucosamina alfa (1->4)]_n, cuyos disacáridos pueden sufrir cualquiera de las modificaciones descriptas.

La diferencia entre heparina y heparán sulfato es que el heparán sulfato contiene mayor proporción de ácido glucurónico y es menos O-sulfatado y más N-acetilado. El heparán sulfato presenta menos grupos sulfatos que heparina, entre 0,4 y 2 grupos sulfatos por disacárido.

Comparada con otros glicosaminoglicanos la heparina es particularmente sulfatada conteniendo hasta tres grupos sulfatos por disacáridos, aunque el grado de sulfatación entre los disacáridos es muy variable (de 1,6 a 3).

La heparina se une a una proteína del núcleo proteico de 17 a 19 kD que presenta una gran proporción de unidades glicinas y serinas, los residuos serina están sustituidos con cadenas de heparina.

Los proteoglicanos que contienen este núcleo proteico se conocen genéricamente con el nombre de serglicinas y se encuentran en gránulos secretorios intracelulares ¹⁶¹.

El heparán sulfato se puede encontrarse en la mayoría de los tejidos y se puede unir a una variedad de núcleos proteicos. La heparina deriva de un único proteoglicano producido por las células tipo mastocitos del tejido conectivo, pero el proteoglicano extracelular mejor caracterizado que contiene heparán sulfato es el perlecan ^{162, 164}.

El Perlecan esta presente casi en todas las membranas basales y en la matriz extracelular, generalmente contiene tres cadenas de heparán sulfato unidas en el extremo de la proteína.

El perlecán es el proteoglicano más grande y más común de las membranas basales. Desempeña funciones en la adhesión celular, ensamblaje de la membrana basal, filtración iónica glomerular, control de actividad de proteasa de serina, etc.

Se identificaron dos familias de proteoglicanos heparán sulfato unidos a las membranas celulares, la familia del *sindecan* y del *glipican*.

II. 3. 3. 3. B. CONDROITIN SULFATO Y DERMATAN SULFATO

Son dos glicosaminoglicanos que derivan del mismo polímero inicial [ácido D-glucurónico beta (1->3) D-N-acetil galactosamina beta (1->4)]_n, pueden ser modificados por sulfatación en la posición 2 del ácido urónico y en las posiciones 4 ó 6 del amino-azúcar.

La diferencia entre condroitín sulfato y dermatán sulfato es que Dermatán Sulfato presenta la epimerización de ácido glucurónico a ácido idurónico, en algunos disacáridos ¹⁶⁵.

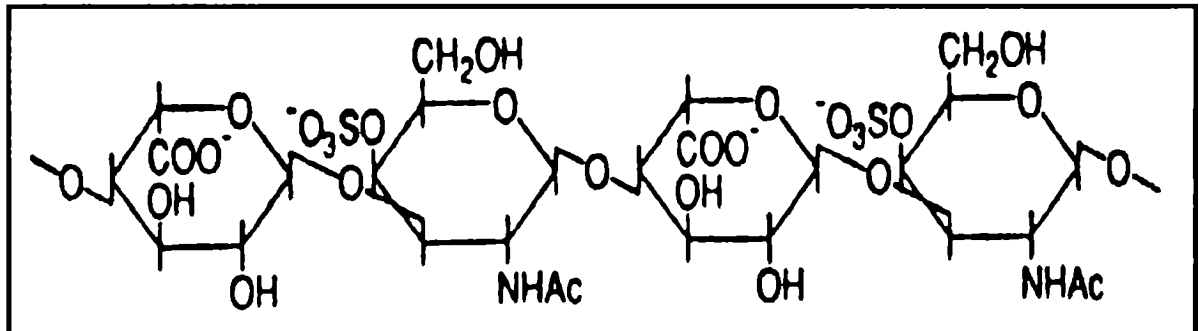


Figura N° 7. Esquema del Dermatán Sulfato

El Biglicano es el proteoglicano del condroitín sulfato y se aísla de hueso fetal o joven , mientras que el biglicano que contiene dermatán sulfato se aísla de cartílago articular.

Se expresa en un rango de células especializadas en tejidos en desarrollo, incluyendo hueso, cartílago, células endoteliales de vasos sanguíneos, miofibrillas esqueléticas, epitelio tubular renal y queratinocitos en diferenciación.

El CD44 se presenta como un proteoglicano con un corazón proteico con carbohidratos unidos a N, glicosaminoglicanos de condroitín sulfato y heparán sulfato y grupos polilactosamina.

El CD44 se expresa en la superficie de la mayoría de las células mamíferas estudiadas, se piensa que actúa como receptor para el componente de la matriz extracelular, posiblemente el colágeno tipo I o VI.

El Decorín también denominado PG-40, PG-II, PG-2, PG-S2 y CS/DS-PGII es un proteoglicano pequeño con una única cadena de condroitín 4-sulfato o dermatán sulfato unido al núcleo proteico. Se lo encontró en casi todos los tejidos conectivos asociado con fibrillas de colágeno.

II.3. 3. 3. C. QUERATAN SULFATO

Deriva de su polímero parental [D-galactosa beta (1- >4) D-N-acetil glucosamina beta (1->3)]_n y difiere del mismo sólo por O sulfatación en la posición 6 de la glucosamina y/o posición 6 de la galactosa.

El queratán sulfato es el único glicosaminoglicano que puede sintetizarse además, de como un azúcar unido a serina, como un N-azúcar.

Este GAG encuentra unido a núcleos proteicos formado proteoglicanos como el agregán, la sialoproteína de hueso (BSP) y la fibromodulina

II. 3. 3. 3. D. ACIDO HIALURONICO

Es el único glicosaminoglicano que no se sintetiza unido a proteína y no se modifica a partir de la estructura de su polímero parental el [ácido D-glucurónico beta (1->3) D-N-acetil glucosamina beta (1->4)]_n. Es un polisacárido altamente aniónico de alto peso molecular. Se lo encuentra en la matriz extracelular desarrollando un papel estructural y en superficie celular.

Se denominan hialadherina a las proteínas que unen ácido hialurónico, las hialadeherinas asociadas a la superficie celular actuarían como receptores para hialuronidato, mediando los efectos del mismo sobre el comportamiento celular.

El ácido hialurónico en solución acuosa adopta una configuración voluminosa debido a repulsión de cargas intracelulares, como consecuencia presenta alta viscosidad, exclusión molecular, resistencia al flujo, ósmosis tisular, etc. que se manifiestan en matrices ricas en hialuronidato como fluido sinovial, cordón umbilical, dermis y tejido subcutáneo.

Tabla N° 7. Algunos proteoglicanos comunes

Proteo glicano	PM núcleo	Tipo de GAG	N° cadenas	Localiza- ción	Funciones
Aggrecan	210 10 ³	condroitín sulfato + queratán sulfato	130	cartílago	Soporte mecánico, forma agregados con hialuronato, une TGF-β
Betaglicano	36 10 ³	condroitín sulfato/ dermatán sulfato	1	Superficie celular y matriz	Une TGF-β
Decorin	40 10 ³	condroitín sulfato/ dermatán sulfato	1	Tejidos conectivos	Se une a fibrillas de colágeno tipo I y TGF-β
Perlecan	600 10 ³	Heparán sulfato	2 - 15	Lámina basal	Estructural y función de filtración en la lámina basal
Serglicina	20 10 ³	condroitín sulfato/ dermatán sulfato	10 - 15	Vesículas secretora en GB	Ayuda a empaquetar y almacenar molécula secretorias
Sindecan-1	32 10 ³	condroitín sulfato +heparán sulfato	1 - 3	fibroblastos y superficie de células epiteliales	Adhesión celular, une TGF-β

II. 3. 3. 3. E. FUNCIONES DE LOS PROTEOGLICANOS

Hasta el momento no se conoce cuál es exactamente la función de los proteoglicanos, pero en general se considera por separado las funciones del núcleo proteico y la función de las cadenas de glicosaminoglicanos.

Dentro de las funciones del núcleo proteico, los proteoglicanos pequeños tendrían la propiedad de modular la fibrillogénesis colágena, de unir TGF- β , otros proteoglicanos de unir ácido hialurónico.

Una de las funciones tradicionalmente conocidas de los glicosaminoglicanos son las de atraer agua formando geles hidratados, debido a su elevada densidad de carga atraen cationes osmóticamente activos. Las cadenas de glicosaminoglicanos son demasiado rígidas para plegarse formando estructuras compactas, tienden a formar estructuras enrolladas al azar muy extendidas y que ocupan gran volumen.

A consecuencia de su organización porosa e hidratada, las cadenas de glicosaminoglicanos permiten la rápida difusión de moléculas hidrosolubles, la migración de células y el desarrollo de procesos celulares.

II.3.3.3.F. POTENCIACION DE LA ACTIVIDAD DEL HCII POR LOS GLICOSAMINOGLICANOS

Como se describió en la sección II.3.3.2.A el HCII es potenciado principalmente por el Dermatán Sulfato como activador fisiológico en el espacio extravascular. Si bien HCII puede ser potenciado por altas concentraciones de heparina, ésta no se encuentra normalmente en circulación ni en el espacio extravascular.

El Dermatán Sulfato es sintetizado por los fibroblastos de la matriz subendotelial, se presenta unido a núcleos proteicos componiendo los proteoglicanos decorín y biglicano, los que se encuentran en la matriz extracelular de tejidos como piel, tendón, ligamentos, menisco y cartílago articular^{166,167}.

Estos proteoglicanos están presentes en la superficie de las fibrillas de colágeno e intervienen en la organización y función de la matriz extracelular del tejido conectivo, inhiben la fibrilogenesis *in vitro* y cuando están unidas a la superficie de fibronectina pueden modificar los procesos de adhesión y migración.

Los primeros estudios de potenciación de serpinas se realizaron con glicosaminoglicanos purificados, pero estudios en cultivos celulares demostraron que los proteoglicanos decorín y biglicano potencian al HCII a través de las cadenas de glicosaminoglicanos¹⁶⁶.

El decorín y el biglicano unidos al colágeno tipo V tienen capacidad de activar HCII que los proteoglicanos en solución.

Por lo tanto luego de la injuria endotelial, el HCII plasmático se uniría específicamente a las cadenas del Dermatán Sulfato en la matriz extracelular y regularía las múltiples funciones de trombina¹⁶⁶.

El Dermatán Sulfato no es el único glicosaminoglicano capaz de potenciar al HCII, Shirk y colaboradores demostraron que el proteoglicano de heparán sulfato en la superficie de cultivo de células musculares lisa de aorta de mono

y en la matriz extracelular del mismo cultivo, presenta la capacidad de potenciar al HCII aunque en menor grado. La importancia de este hallazgo radica en la amplia distribución de los proteoglicanos de heparán sulfato en las membranas basales ¹⁶⁸.

II.3.3.4. EL DERMATAN SULFATO COMO DROGA ANTITROMBOTICA

Normalmente este glicosaminoglicano no se encuentra en circulación, ya que los niveles de DS plasmáticos en personas sanas no se detectan por métodos funcionales ¹⁶⁹. Se encontraron niveles plasmáticos de DS elevados en mujeres embarazadas en el tercer trimestre del embarazo y en pacientes en hemodiálisis crónica ^{153, 170}.

Se realizaron estudios en animales y en pacientes utilizando Dermatan Sulfato que confirmaron su capacidad como droga antitrombótica. Los pacientes anticoagulados con DS tienen menor tendencia al sangrado que los anticoagulados con heparina de bajo peso molecular, pero el DS administrado en forma subcutánea e intramuscular presenta baja biodisponibilidad ¹⁷¹.

Se demostró que el dermatán sulfato de bajo peso molecular (LMWDS) presenta mejor biodisponibilidad y una mayor depuración plasmática. Actualmente se han iniciado estudios clínicos utilizando LMWDS como droga antitrombótica ¹⁷¹.

Dos ensayos clínicos demostraron que 100 mg de DS intramuscular previene la trombosis venosa profunda post cirugía, presentando menor incidencia de sangrado que con heparina no fraccionada ¹⁷². También se comprobó que 300 mg de DS es efectivo en prevenir la trombosis venosa profunda en pacientes con fractura de cadera ¹⁷³.

La mejor indicación para la administración de Dermatan Sulfato, sería en la prevención y tratamiento de la trombosis venosa profunda en pacientes con

alto riesgo de sangrado, como procedimientos ortopédicos, neurocirugía, infarto y coagulación intravascular diseminada ¹⁷⁴.

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis fue estudiar el Cofactor II de la Heparina (HCII) y su comportamiento en la fisiología del sistema de coagulación. Para ello se utilizaron tres líneas de abordaje:

- I) Investigar el HCII plasmático y su posible interacción con proteínas plasmáticas.
- II) Determinar *in vitro* las condiciones que favorecen la actividad antitrombínica del HCII en concentraciones fisiológicas. Investigar la acción moduladora de diversas proteínas plasmáticas en la interacción HCII - trombina y HCII - trombina - dermatán sulfato.
- III) Estudiar la respuesta del HCII ante estímulos de activación del sistema de coagulación de diversa magnitud, determinando los niveles de HCII plasmático en distintos estados fisiopatológicos (población normal, pacientes sépticos, quemados, en hemodiálisis, embarazadas, etc). Determinar los niveles plasmáticos de actividad de dermatán sulfato en las patologías mencionadas.

MATERIALES
Y
METODOS

I. CARACTERIZACION DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA PLASMATICO

I.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Con el objetivo de caracterizar al Cofactor II de la Heparina plasmático se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida según la técnica descrita por Laemmli ¹⁷⁵, con un T= 7 % C= 2,6 ; utilizando para el revelado de la placa Azul Brillante de Coomassie R-250 (Sigma) 1 g/l en metanol: ácido acético: agua (relación de volúmenes 5:1:4). Las separación electroforética se llevó a cabo a voltaje máximo 200 volts, intensidad menor 30 mA hasta que el frente de corrida alcanzó la máxima distancia interelectródica. Tiempo de corrida 3 horas.

Testigos de HCII. Se caracterizó el HCII humano purificado (Serbio. Francia) y HCII bovino purificado (Stago. Francia) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando un T= 10% C= 2,6 revelado con Azul Brillante de Coomasie R.

Determinación de proteínas: La concentración proteica de las soluciones fue determinada por el método de Lowry y col ¹⁷⁶.

Determinación del Peso Molecular del HCII

Una masa de 30 µg de proteínas proveniente de un pool de plasmas normales fue sometida a fraccionamiento electroforético en geles de poliacrilamida-SDS en placa vertical, empleando un sistema discontinuo de buffers según la técnica descrita por Laemmli ¹⁷⁵. En cada placa se incluyeron proteínas marcadoras de peso molecular: anhidrasa carbónica (29 kD); albúmina de huevo (45 kD); albúmina bovina (66 kD) y fosforilasa b (97,4 kD) (Sigma Co. USA) y el HCII humano y bovino previamente caracterizados como testigos. Finalizado el desarrollo electroforético, las bandas proteicas fueron teñidas con solución

colorante durante 1 hora. El gel fue lavado con ácido acético 7% hasta lograr la completa decoloración del fondo.

Se graficó el cuadrado de la distancia entre el comienzo del gel separador y la posición de la banda, en función del peso molecular de los marcadores y se extrapolo el PM del HCII de acuerdo a la distancia recorrida. Se determinó el peso molecular del HCII como el promedio de tres determinaciones.

I.2. ISOELECTROENFOQUE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para realizar el isoelectroenfoque (IEF) se prepararon geles de poliacrilamida T= 4,5 % y una solución de anfolito que cubre el rango de 3 a 10 (Pharmalyte 3-10, Pharmacia, Suecia). Los geles se prepararon según la técnica de Righetti ¹⁷⁷. Se estudiaron distintas condiciones eléctricas hasta obtener un gradiente de pH estable y con buena resolución. Las condiciones eléctricas óptimas fueron: Potencia máx. 8 watts, voltaje máx. 2.000 volts e intensidad máx. 15 mA ; temperatura 8° C, tiempo de corrida 2 horas y se aplicaron 3.500 volts horas en todas las placas. Para la determinación de punto isoeléctrico (PI) del HCII, una vez finalizada la corrida, se cortó el extremo superior de la placa y se dividió en segmentos de 1 cm² desde el cátodo hacia el ánodo, se eluyeron los anfolitos de cada fragmento en solución de cloruro de potasio 1 M y se determinó el pH de cada solución ¹⁷⁵. El resto de la placa se fijó con solución de tricloro acético 10%, ácido sulfosalicílico 5% durante 30 minutos, se lavó y tiñó con Azul Brillante de Coomassie. Con los datos obtenidos se realizó una curva de pH vs. distancia y se extrapolo el punto isoeléctrico de la muestra.

Una vez obtenido una aproximación del PI con la placa de 3-10, se realizó isoelectroenfoque con una solución de anfolitos 3 - 6 (Serva Feinbiochemica), de manera de obtener mayor precisión en la determinación del punto isoeléctrico de la muestra. Las condiciones de corrida fueron similares que las anteriores realizándose ambas técnicas por triplicado.

I.3. DETECCION INMUNOLOGICA. WESTERN BLOT

Se investigó el HCII plasmático de 25 individuos (15 mujeres y 10 hombres) seleccionados de acuerdo a las recomendaciones de la IFCC ¹⁷⁸.

Con la técnica de dot blot se establecieron las concentraciones óptimas de los anticuerpos necesarias para revelar la transferencia en nitrocelulosa según la técnica de Towbin ¹⁷⁹. Una vez finalizado el SDS-PAGE se procedió a la detección inmunológica de las proteínas mediante Western Blot con la utilización de anticuerpo policlonal anti HCII humano en conejo (Serbio. Francia).

I.4. ELECTROFORESIS CON β MERCAPTOETANOL

Se realizó un SDS-PAGE (T= 7 %) seguida de un Western Blot según lo descrito en I.2. pretratando la muestra con β mercaptoetanol (Sigma. USA).

Pretratamiento de la muestra: A un volumen de la muestra se agrega β mercaptoetanol 0,1M en concentración final, SDS 1%, azul de bromofenol, sacarosa.

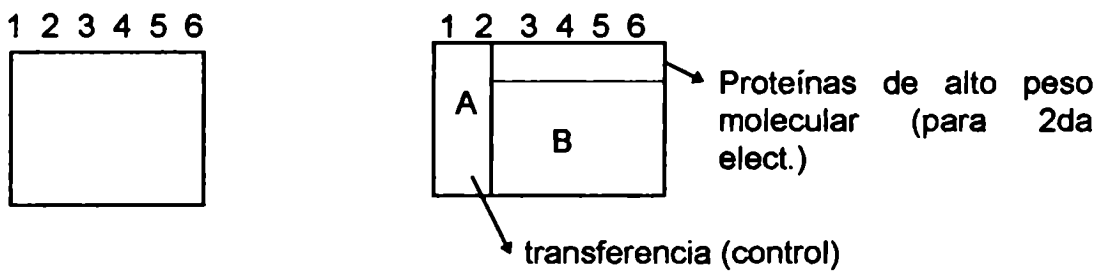
I.5. ELECTROFORESIS CON UREA

Se preparó una placa de SDS-PAGE según la técnica descrita por Laemmli con un T= 7 %, los reactivos son similares a los descritos en I.1. con el agregado de urea 8 M en el buffer del gel separador y concentrador. Se realizó el pretratamiento de la muestra con un buffer cracking sample (buffer Tris-HCl 125 mmol/l, SDS 1%, β mercaptoetanol 1%, urea 8 mol/l pH = 6,8). Se realizó la separación electroforética SDS-PAGE seguida del Western Blot revelado con anticuerpo anti HCII.

I.6. DOBLE ELECTROFORESIS

Se realizó un SDS-PAGE (T= 7 %) de plasmas normales con testigos de HCII purificado. Finalizado el mismo, se cortaron las dos primeras calles del gel y se completó el Western Blot revelado con anti-HCII (A), este fragmento se utilizó como testigo. En el resto de la placa de SDS-PAGE (B), de cada calle se separó el segmento de acrilamida que contiene las proteínas de alto peso molecular, se eluyó el contenido de las mismas con buffer de corrida (Tris - Glicina - SDS pH = 8,3). Los eluidos, la mitad recibieron un pretratamineto con βmercaptoetanol y la otra mitad condiciones reductoras de urea 8 M y βmercaptoetanol. Se realizó una segunda electroforesis (SDS-PAGE T= 7 %) corriéndose en las condiciones reductoras con urea. Posteriormente se realizó el Western Blot revelando la placa con anticuerpo anti HCII. El procedimiento se realizó tres veces.

Primera electroforesis:



Calle 1: Testigo de HCII humano purificado

Calles 2 a 6: plasmas normales

Se eluyeron las proteínas de alto peso molecular de calles 3, 4, 5 y 6.

2^{da} electroforesis

3' 4' 5' 6' 7'

Calles 3' y 4': eluidos de las calles 3 y 4 (plasmas normales) de la primera corrida.

Calles 5' y 6': eluidos de las calles 5 y 6 de la primera corrida (plasmas normales) tratados con βmercaptoetanol.

Calle 7': HCII humano purificado, control de la segunda corrida.

I.7. OBTENCION DE MUESTRAS MODIFICADAS *EX VIVO*

Obtención de plasma desfibrinado por calor según la técnica rápida de microprecipitación por calor de Ruiz Reyes ¹⁸⁰. Se calentó plasma a 56° C durante 15 minutos y se separó el plasma desfibrinado por centrifugación.

Obtención de plasma desfibrinado por veneno de *Bothrops atrox* (Stago. Francia). Se coaguló plasma por el agregado de 2 Unidades batroxobin de veneno, se incubó 2 horas a 37° C separándose el coágulo por centrifugación.

Obtención de plasma desfibrinado por veneno de *Agkistrodon rhodostoma*: Se coaguló plasma por el agregado de 1 Unidad de veneno, se incubó 2 horas a 37° C y se separó el coágulo por centrifugación.

Obtención de suero: Se extrajo sangre por punción venosa, se dejó coagular sangre a 37° C durante 2 horas, separándose posteriormente el suero por centrifugación, se almacenó a -20° C hasta su utilización.

Obtención del complejo trombina - HCII: Para obtener el complejo HCII-Trombina se dejó coagular sangre en presencia de dermatán sulfato (Syntex. Argentina 100 µg/ml) (9 vol. de sangre/1 vol. de DS), se incubó a 37° C durante 2 horas y posteriormente se separó el suero por centrifugación. Se verificó la formación del complejo mediante electroforesis. Se conservó a -20° C hasta su utilización.

II. INTERACCION *IN VITRO* COFACTOR II DE LA HEPARINA-TROMBINA

Se ensayaron *in vitro*, con reactivos purificados, la interacción Cofactor II de la Heparina - trombina. En todos los casos se midió la capacidad antitrombínica del HCII, determinando la actividad amidolítica de la trombina residual. Si bien los ensayos son *in vitro*, las concentraciones de los reactivos utilizadas equivalen a las fisiológicas, y a variaciones de la misma. Todos los ensayos *in vitro* fueron realizados por triplicado.

II.1. ACTIVIDAD DE TROMBINA HUMANA SOBRE SUSTRATOS CROMOGENICOS

Se determinó la actividad amidolítica de trombina humana (Sigma. USA) sobre dos sustratos cromogénicos (S-2238 Chromogenix, Suecia) y (Chromozyn Th, Behringer. Alemania) para lo cual se incubó a 37° C 1 volumen de trombina humana (20 nM) con 1 volumen de sustrato cromogénico (1 mM) durante 120 segundos exactos, se frenó la reacción por el agregado de ácido acético 75%. La absorbancia leída a 405 nm es directamente proporcional a la actividad de la trombina.

II.2. CURVA DE CALIBRACION DE TROMBINA

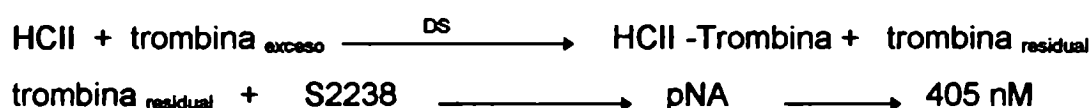
Se realizó una curva de calibración de trombina humana (Sigma. USA), midiendo la actividad amidolítica de la misma sobre un sustrato cromogénico (S2238 Chromogenix. Suecia 1mM). Las concentraciones de trombina medidas fueron 20, 30, 40, 50, 80, 100, 130, 160, 200 y 230 nM (en buffer Tris 20 mM, cloruro de sodio 0,15 M pH 7,4).

II. 3. ESTABILIDAD DE TROMBINA A 37° C

Se determinó la estabilidad de trombina humana 10 nM a 37° C midiendo la actividad amidolítica de la misma en las alícuotas obtenidas al 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos.

Medición de la actividad de HCII

La actividad del Cofactor II de la Heparina se determinó según el método de Sié modificado por Duboscq y colaboradores ^{7,181}, proceso que se realiza en dos etapas. La primera etapa mide la capacidad del HCII de inhibir trombina humana agregada en exceso. En un segundo paso se determina la actividad amidolítica de la trombina residual sobre un sustrato cromogénico S 2238 que libera pNA la que se lee espectrofotométricamente a 405 nm. El valor de absorbancia obtenida es inversamente proporcional a la actividad de HCII.



En la determinación de la actividad de HCII plasmático se realiza una dilución 1/50 de un pool plasmas normales, a esa dilución se le asigna el valor el 100% de actividad, o 1 Unidad Internacional, o 1 PEU (Unidad Equivalente al plasma) que corresponde a la cantidad de inhibidor que se encuentra en 1 ml de plasma. De esta manera trabajamos *in vitro* con 1 PEU diluido en 50 (0,02 PEU/ml)

II. 4. ESTABILIDAD DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA A 37° C

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de HCII humano a 37° C se incubó una solución de HCII (0,02 PEU/ml) tomándose alícuotas a los tiempos: 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos. En cada alícuota se determinó la capacidad del HCII de inhibir trombina, midiendo la actividad amidolítica de la trombina residual.

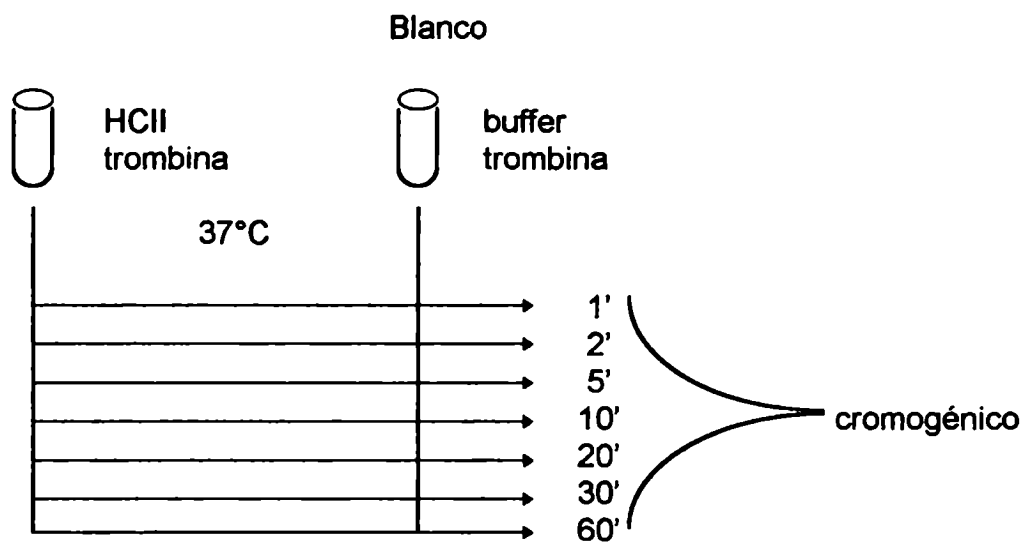
II.5. INHIBICION DE TROMBINA HUMANA POR HCII EN SISTEMAS PUROS

Reacción base:

Se incubó a 37°C 1 volumen de HCII con un volumen de trombina humana, se extrajeron alícuotas al 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 minutos. En cada alícuota se determinó inmediatamente la actividad residual de trombina mediante la incubación de un volumen de la alícuota con un vol. de sustrato cromogénico 1 mM. A los 120 segundos exactos se frenó la reacción por el agregado de un vol. de ácido acético 75%. Se calculó la actividad de trombina residual mediante la lectura de la absorbancia a 405 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado con un blanco de trombina simultáneo.

Se calculó la actividad de trombina residual del ensayo considerando a la absorbancia del blanco como el 100% de trombina para cada tiempo de incubación.

El porcentaje de inhibición de trombina por HCII se calculó como:
% Inhibición = 100 - % trombina residual



II.5.1. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE TROMBINA POR HCII

Se midió la capacidad de HCII (0,02 PEU/ml) de inhibir distintas concentraciones de trombina (10, 50 y 100 nM), en ausencia de su potenciador específico, siguiendo la reacción básica.

II.5.2. ACCION DE LOS POTENCIADORES

II.5.2.1. Dermatán sulfato no fraccionado y de bajo peso molecular

Purificación del Dermatán Sulfato

Se trataron 100 mg de DS con 30 ml de NaNO_2 0,24 M en ácido acético 1,8 M durante 80 minutos. Se inactivó la mezcla agregando 10 ml de sulfonato de amonio 12,5 p/v. Se dializó 2 horas contra buffer Tris-HCl 0,05M en NaCl 1 M pH 8, y se desaló dializando toda la noche contra agua destilada ¹⁸².

Se midió la capacidad de HCII (0,02 PEU/ml) de inhibir distintas concentraciones de trombina (5, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 nM) en presencia de 0,25 mg/ml de Dermatán Sulfato no fraccionado purificado (Syntex. Argentina) y dermatán sulfato de bajo peso molecular purificado (Syntex. Argentina).

II.5.2.2. Efecto de la concentración de dermatan sulfato no fraccionado

Se midió la capacidad del HCII (0,02PEU/ml) de inhibir trombina (10 nM) en presencia de distintas concentraciones de dermatán sulfato no fraccionado (0,25; 0,025 y 0,0025 mg/ml).

II.5.2.3. Heparina no fraccionada y de bajo peso molecular

Se determinó la capacidad del Cofactor II de la Heparina (0,02 PEU/ml) de inhibir trombina (10 nM), potenciada por 0,25 mg/ml de heparina no fraccionada (Riveparin) y heparina de bajo peso molecular (Clexane. Francia).

II.5.3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TROMBINA

Se estudió la capacidad del HCII (0,02 PEU/ml) de inhibir distintas concentraciones de trombina humana: 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 nM en presencia de 0,25 mg/ml de dermatán sulfato purificado siguiendo la reacción básica.

II.5.4. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL INHIBIDOR (HCII)

Se midió la capacidad de distintas concentraciones de HCII de inhibir trombina 10 nM en presencia de 0,25 g/l de dermatán sulfato no fraccionado purificado. Se ensayó la inhibición con soluciones de HCII de 0,005; 0,01; 0,03 y 0,04 PEU/ml que corresponden a un rango de HCII del 25% al 200% de la concentración plasmática normal.

II.5.5. INHIBICION DE TROMBINA BOVINA POR HCII HUMANO

Se estudió la inhibición de trombina bovina (Parke Davis. Francia) 10 nM por el HCII humano (0,02 PEU/ml) en presencia de DS (0,25 mg/ml) según la reacción básica.

II.5.6. EFECTO DE LA FUERZA IONICA

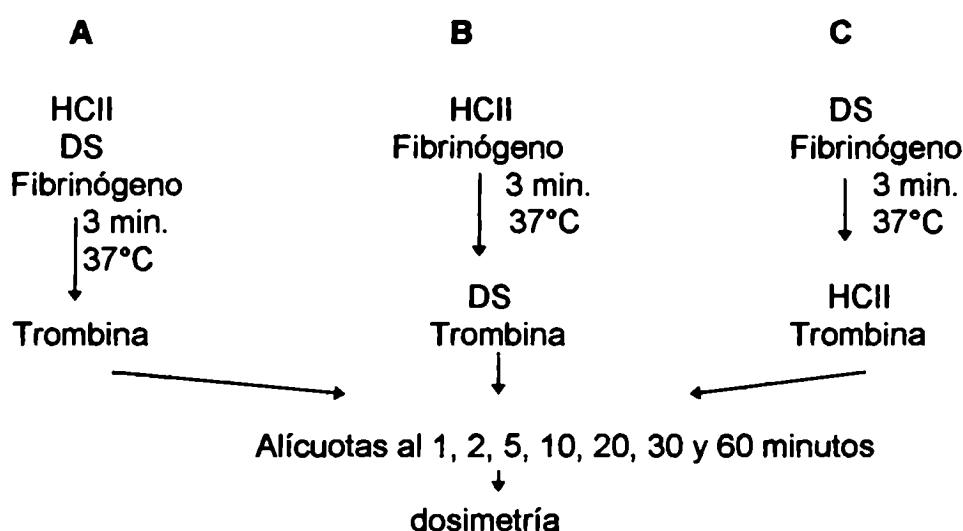
Se estudió el efecto de la fuerza iónica del medio en la actividad antitrombínica del HCII. Para lo cual se ensayó la inhibición de trombina (10 nM) por HCII (0,02 PEU/ml) en presencia de dermatán sulfato (0,25 mg/ml) agregando a la mezcla de reacción, una solución de KCl (Merck) en concentraciones finales de 0,25; 0,5 y 1M.

II.6. COMPONENTES PLASMATICOS QUE MODULAN LA INHIBICION DE TROMBINA POR HCII

II.6.1. ACCION DEL FIBRINOGENO

Se ensayó la inhibición de trombina (10 nM) por HCII (0,02 PEU/ml) en presencia de dermatán sulfato (0,25 mg/ml) y fibrinógeno purificado (Sigma. USA) en concentraciones plasmáticas (3 mg/ml) que corresponden 0,06 mg/ml en el tubo de reacción.

Se incubó HCII, Dermatán Sulfato y fibrinógeno en las concentraciones indicadas durante 3 minutos a 37° C y posteriormente se agregó trombina, siguiendo la reacción básica (Ensayo A). Se modificó el orden de incubación de los reactivos, determinándose la inhibición de trombina. (Ensayos B y C)



II.6.1.1. Efecto de la concentración de fibrinógeno

Se estudió la acción de la concentración de fibrinógeno sobre la inhibición de trombina por HCII, incubando HCII (0,02 PEU/ml) con 0,06 y 0,18 mg/ml de fibrinógeno que corresponden a valores plasmáticos de 3 y 12 mg/ml

respectivamente. Posteriormente se agregó dermatán sulfato (0,25 mg/ml) y trombina (10 nM), midiéndose la actividad de trombina residual mediante sustrato cromogénico.

II.6.1.2. Efecto del tiempo de incubación del fibrinógeno

Con el objetivo de determinar si el tiempo de incubación del fibrinógeno con el HCII modifica la interacción entre ambos, se realizaron estudios incubando HCII (0,02 PEU/ml) con fibrinógeno (0,06 mg/ml) 3, 6 y 20 minutos, luego se agregó dermatán sulfato (0,25 mg/ml) y trombina (10 nM), midiéndose la actividad de trombina residual mediante sustrato cromogénico.

II.6.1.3. Incubación HCII-fibrinógeno caracterización por SDS-PAGE/ Western - blot

Se realizó la incubación *in vitro* de HCII humano purificado 0,02 PEU/ml (concentración final en el tubo de reacción) con fibrinógeno humano purificado (0,06 mg/ml), tomándose alícuotas a los 3, 6, 20 y 60 minutos de incubación. Las alícuotas se sumergieron en hielo para frenar la reacción siendo luego conservadas a -20° C hasta el momento de su procesamiento.

Se realizó un SDS-PAGE en geles de poliacrilamida con un T= 7% según lo descrito en el punto II.1. de este capítulo, sembrándose las alícuotas de las incubaciones HCII-fibrinógeno. Finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas sobre nitrocelulosa y se detectaron inmunológicamente las proteínas con anticuerpo policlonal anti HCII humano.

II.6.2. ACCION DE LA ALBUMINA

Se ensayó la inhibición de trombina (10 nM) por HCII (0,02 PEU/ml) en presencia de dermatán sulfato (0,25 mg/ml) y albúmina humana (ORHA) en concentraciones plasmáticas (0,08 mg/ml en el tubo de reacción) siguiendo la reacción básica.

II.6.2.1. Efecto del tiempo de incubación de la albúmina

Se ensayó la inhibición de trombina por HCII en presencia de DS y albúmina a concentraciones plasmáticas con 3 y 20 minutos de incubación siguiendo la reacción básica.

II.6.3. ACCION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Se estudió la acción de las inmunoglobulinas humana (gama globulina elaborada a partir de pool de plasma humano) sobre la capacidad antitrombínica del HCII. Para lo cual se incubó durante 3 minutos HCII (0,02 PEU/ml) con inmunoglobulina (0,25 y 0,5 mg/ml) y DS (0,25 mg/ml) y posterior agregado de trombina (10 nM) siguiendo la reacción básica.

II.6.4. ACCION DE LA HOMOCISTEINA

Se ensayó la inhibición de trombina por HCII (0,02 PEU/ml) en presencia de Dermatán Sulfato (0,25 mg/ml) y homocisteína en concentraciones que se encuentran en pacientes con elevados niveles de homocistinemia (0,8 μ M en el tubo de reacción).

II.7. CONSUMO DEL HCII PLASMÁTICO *IN VITRO* EN PRESENCIA DE GLICOSAMINOGLICANOS

Se estudió el consumo del HCII *in vitro* en presencia de distintos potenciadores como dermatán sulfato purificado (de piel porcina Sigma Chem. USA), heparina (Heparina sódica. Abbott) y dextrán sulfato (de mucosa porcina Sigma Chem. USA).

Población: Se estudiaron 10 individuos normales (5 mujeres y 5 hombres), con valores de hematocrito entre 38 - 48 %. De cada uno de ellos se obtuvieron las siguientes muestras:

Plasma: Se colocaron 9 volúmenes de sangre con un vol. de citrato de sodio 3,8 %

Suero en presencia de NaCl 0,9% : Se colocaron 9 vol. de sangre con un vol. de solución fisiológica, de esta manera se mantiene la dilución de la sangre en todas las muestras. (Ensayo A)

Suero en presencia de DS: Se deja coagular 9 vol. de sangre en presencia de 1 vol. de DS (10 µg/ml y 100 µg/ml). Ensayo B y C.

Suero en presencia de Dextrán Sulfato (DX): Se deja coagular 9 vol. de sangre con 1 vol. de DX 10 µg/ml (Ensayo D) y 100 µg/ml (Ensayo E).

Suero en presencia de heparina: Se colocó 9 vol. de sangre con 1 vol. de heparina 0,6 U/ml (Ensayo F) y 1,2 U/ml (Ensayo G).

Las muestras se dejaron coagular 10 horas a 37° C , luego se separaron por centrifugación durante 20 minutos a 3.000 rpm, se conservaron a - 20° C hasta determinar la actividad de HCII. Se calculó el consumo de HCII como:

$$\text{CONSUMO} = \frac{\text{act HCII}_{\text{plasma}} - \text{act HCII}_{\text{suero}}}{\text{act HCII}_{\text{plasma}}} \times 100$$

II.8. ACCION DEL DERMATAN SULFATO PURIFICADO SOBRE PRUEBAS DEL SISTEMA HEMOSTATICO

II.8.1. ACCION DEL DERMATAN SULFATO SOBRE LAS PRUEBAS GLOBALES DEL SISTEMA DE COAGULACION

Para estudiar la acción del dermatán sulfato no fraccionado y dermatán sulfato de bajo peso molecular (Syntex. Argentina) sobre las pruebas globales del sistema de coagulación, se incubó durante 5 minutos plasmas normales (n=15) con DS concentraciones finales 0,0013; 0,0025; 0,025 y 0,25 mg/ml. Posterior a la incubación se determinó el tiempo de protrombina (Tromborel-S. Medi-Tech. USA), tiempo de tromboplastina parcial activado con caolín (reactivo no comercial) y tiempo de trombina (Parke-Davis. USA).

II.8.2. AGREGACION PLAQUETARIA INDUCIDA POR TROMBINA HUMANA EN PRESENCIA DE DERMATAN SULFATO

Se estudió el proceso de agregación plaquetaria inducida por trombina humana en presencia de dermatán sulfato purificado. Para lo cual se obtuvo plasma rico en plaquetas de dadores sanos que no ingirieron medicamentos durante un período previo de 10 días.

La agregación plaquetaria de plasma rico en plaquetas se realizó de acuerdo al método turbidimétrico, que se basa en la disminución de la densidad óptica de un plasma rico en plaquetas por el agregado de un inductor de la activación plaquetaria con formación de agregados plaquetarios.

Se realizó la agregación de plasma rico en plaquetas (n= 5) con trombina humana 0,3 U/ml (Sigma Chemical Como. USA) en presencia de 0,0013; 0,0025 ; 0,025 y 0,25 mg/ml (concentraciones finales) de dermatán sulfato no fraccionado, dermatán sulfato de bajo peso molecular (LMWDS) purificado (Syntex. Argentina).

II.8.3. ACCION DEL DERMATAN SULFATO EN EL APTT DE PLASMAS DEFICITARIO DE FACTORES

Se investigó la acción del dermatán sulfato no fraccionado y de bajo peso molecular en las prueba de APTT de plasmas deficitario de factores II, V, VIII, X, IX, VII, XI y XII en forma individual y se comparó con la acción de heparina.

Se prepararon plasmas deficitarios de cada factor (60, 30 y 15%) mezclando el plasma deficitario comercial, que presenta un 0% del factor a estudiar (Medi-Tech. USA), con un pool de plasmas normales. Posteriormente se determinó el Tiempo de tromboplastina parcial activada (reactivo no comercial) de las mezclas deficientes en cada factor en presencia de dermatán sulfato no fraccionado y de bajo peso molecular (0,0013; 0,0025; 0,025 y 0,25 g/l) (Syntex. Argentina)

III. DETERMINACION DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN PLASMA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLOGÍAS

Dada la escasa información sobre el HCII tanto en la literatura internacional como los datos disponibles en la Argentina, esta sección final se dedicó a establecer los niveles plasmáticos de HCII definiendo su valor de referencia en la población normal de la ciudad de Buenos Aires y en distintas patologías, tratando de relacionarla con otros inhibidores fisiológicos.

III.1. POBLACIONES

III.1.1. VALORES DE REFERENCIA DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN LA POBLACION DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

Debido a que no existían datos sobre los valores de referencia para la actividad y antigenicidad del Cofactor II de la Heparina para la población de Buenos Aires, se determinaron los mismos en 150 individuos normales.

Se midieron los niveles de actividad y antigenicidad de Cofactor II de la Heparina en 150 muestras individuos normales (83 mujeres y 67 hombres) seleccionados de acuerdo a las recomendaciones del Panel de Expertos en teoría de Valores de Referencia de la Federación Internacional de Química Clínica ¹⁷⁸.

Las muestras de sangre fueron extraídas, anticoaguladas con citrato de sodio 3,8 % (9 vols de sangre + 1 vol. de anticoagulante) se centrifugaron a 3000 G 15 minutos, se separó el sobrenadante y se repitió la centrifugación para obtener un plasma libre de plaquetas. El plasma se conservó a -20° C hasta su utilización.

III.1.2. NIÑOS NORMALES

Se estudió una pequeña población de niños normales compuesta por 13 niños (10 varones y 3 mujeres) con una edad promedio de 8,5 años (3 - 17), con un hematocrito promedio de 39,0 % (37-46) y hemoglobina 13,2 mg/dl (12,6-15,6).

III.1.3. EMBARAZADAS EN EL TERCER TRIMESTRE

Grupo embarazadas (GE): Se estudiaron 30 mujeres embarazadas normales con más de 30 semanas de gestación, con una edad promedio de 28 años (18 a 35).

Grupo Control (GC): Se estudiaron 30 individuos normales según las recomendaciones del Panel de expertos en Teoría de Valores de Referencia ¹⁷⁸.

III.1.4. PACIENTES QUEMADOS

Grupo quemados (GQ): Se estudió un grupo compuesto por 15 pacientes que sufrieron quemaduras térmicas (3 mujeres y 12 hombres) con un 45,2% (30 - 75 %) de superficie total quemada, con 22,3 % (2 - 55 %) de quemadura tipo AB y un 22 (2 - 40 %) tipo B, edad $38,3 \pm 18,8$ años. La muestra se obtuvo dentro de las primeras 10 horas de producido el accidente, al 4^{to} y 7^{mo} día post quemadura. Se separó el plasma por doble centrifugación y se conservó a -70° C hasta su procesamiento.

Grupo control (GC): Se estudiaron 15 individuos sanos según las recomendaciones del Panel de expertos en Teoría de Valores de Referencia ¹⁷⁸.

III.1.5. PACIENTES EN HEMODIALISIS

Grupo Renales (GR): Se estudiaron 22 pacientes en hemodiálisis (11 mujeres y 11 hombres) con una edad promedio de 65 (25-74) años (mediana y rango), hematocrito de 32,0 % (22 - 44), índice de adecuación de diálisis (Kt/V) de 1,52 (1,0 - 2,52), con un tiempo de diálisis promedio de 36,0 meses (2,0 - 168).

Se obtuvo la muestra de sangre previa a la diálisis de la férula arteriovenosa que se coloca en los pacientes para tal fin. La muestra de sangre se anticoaguló con citrato de sodio 3,8% (9 volúmenes de sangre + 1 volumen de anticoagulante), se separó el plasma por doble centrifugación y se conservaron las muestras alicuotadas a -70° C hasta su procesamiento.

Grupo Control (GC): Se estudiaron 22 individuos sanos según las recomendaciones del Panel de expertos en Teoría de Valores de Referencia ¹⁷⁸.

III.1.6. PACIENTES SEPTICOS

Grupo Séptico (GS): Se estudiaron 45 pacientes que entraron en la unidad de terapia intensiva con diagnóstico de sepsis, de acuerdo al Conference Committee of The American Collage of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine ¹⁸³.

Se diagnosticó sepsis cuando el paciente presentaba evidencia clínica de infección y cumplía con dos de los siguientes requisitos: recuento leucocitario < 3.500 ó > 15.000 células/ μ l, o más de 10% de formas inmaduras, recuento plaquetario < 100.000 células/ μ l; temperatura < 35,5° C ó > 38° C, frecuencia cardíaca mayor de 90 pulsaciones/min.; frecuencia respiratoria mayor de 20 inhalaciones/min o la pCO₂ < 32 mm Hg. La edad promedio fue de 58 años (38 - 72), 25 hombres y 33 mujeres.

Grupo No Séptico o Grupo Control Terapia (GCT): Compuesto por 17 pacientes no sépticos internados en la misma unidad de terapia intensiva, con problemas

traumatológicos o accidente cerebro vascular. Este grupo constituyó un grupo control que reflejaba el manejo de la terapia intensiva independiente de la sepsis. La edad fue de 52 (30 - 68) años (mediana y rango); 10 hombres y 7 mujeres.

Grupo Control (GC): 40 individuos normales según las recomendaciones del Panel de expertos en Teoría de Valores de Referencia¹⁷⁸.

III.1.7. PACIENTES CON ANTICOAGULACION ORAL CRONICA Y CON HEPARINA NO FRACCIONADA

Grupo dicumarínicos (GD): Se estudiaron 30 pacientes anticoagulados con dicumarínicos (20 hombres y 10 mujeres), estabilizados en rango terapéutico, con un RIN entre 2 y 3.

Grupo heparinizados (GH): Se estudiaron 26 pacientes (18 hombres y 8 mujeres) anticoagulados con heparina no fraccionada por vía endovenosa con dosis terapéuticas, con valores de KPTT de 55 - 65 segundos. Las muestras fueron extraídas al tercer día de comenzada la heparinización.

Grupo Control (GC): Se estudiaron 30 individuos normales según las recomendaciones del Panel de expertos en Teoría de Valores de Referencia¹⁷⁸.

III.1.8. PACIENTES CON HIPERHOMOCISTEINEMIA

Grupo Hiperhomocisteinémicos (GHH): Se estudiaron 20 pacientes con niveles de homocisteína plasmática mayores a 14 μ M. Edad promedio mayor de 65 años (67 - 92) compuesto por 13 mujeres y 7 hombres.

Grupo Control (GC): Se estudiaron 20 individuos seleccionados según las recomendaciones del Panel de expertos en Teoría de Valores de Referencia.

Grupo Control de edad (GCE): Debido a que la edad de los pacientes hiperhomocisteinémicos superaba los 65 años, se utilizó un grupo control de edad compuesto por 20 individuos sin manifestaciones patológicas, con niveles de homocisteína menores a 13 μM y mayores de 65 años.

III.1.8. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

El análisis extrapolatorio de los datos se realizó utilizando el procedimiento de Multiple Box & Wisker Plot.

La comparación de las distintas variables entre los grupos se realizó utilizando los métodos no paramétricos de Mann-Whitney y el Test del Signo.

El Box-Plot es un gráfico que muestra la distribución de los datos representando el mínimo y el máximo, el primer y tercer cuartil y la mediana. La caja central representa el 50% de los datos. Se puede así observar la distribución de los datos y detectar posibles valores extremos. El múltiple Box & Wisker Plot permite representar en un mismo gráfico distintas distribuciones, facilitando así una rápida comparación exploratoria.

III.2. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES PLASMATICOS DEL SISTEMA DE COAGULACION

III.2. 1. PRUEBAS GLOBALES DEL SISTEMA DE COAGULACION

Tiempo de protrombina o tiempo de Quick (TP)

Es una prueba global para estudiar la vía extrínseca de la coagulación. Se basa en determinar el tiempo de coagulación del plasma en presencia de un exceso de factor tisular (Tromboplastina) e iones calcio ¹⁸⁴. Esta prueba detecta anomalías de los factores II, V, VII y X. Se realizó una curva de calibración Tiempo de coagulación vs. Protrombina con un pool de al menos 10 plasmas normales. El tiempo de coagulación de la muestra se extrapola el % de protrombina correspondiente. Los resultados se expresaron en % de protrombina.

Se utilizó para esta determinación Tromborel S (Medi-Tech.USA)

Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado con Caolín (KPTT)

Es una prueba global para estudiar la vía intrínseca de la coagulación. Se basa en medir el tiempo de coagulación de un plasma con el agregado de una cantidad estándar de fosfolípidos (cefalina), un activador del sistema de contacto (caolín) e iones calcio. Esta prueba detecta deficiencia en los factores como precalicreínas, quinínógenos de alto peso molecular, factores XII, XI, VIII y IX, V, X, V, X, II y fibrinógeno.

Se utilizó para esta determinación cefalina no comercial preparada de acuerdo al protocolo de Bell ¹⁸⁵. El valor de referencia determinado en nuestro laboratorio (n= 60) es de 35 - 45 segundos.

Tiempo de Trombina (TT)

Esta técnica evalúa el proceso de fibrino formación. Se basa en medir el tiempo en el cual el fibrinógeno presente en el plasma se transforma en fibrina, por el agregado de una cantidad estándar de trombina ¹⁴. Estudia la cantidad y calidad del fibrinógeno plasmático, así como también la presencia de heparina.

Se utilizó trombina bovina (Parker-Davis. USA) en una concentración aproximada de 15 UI/ml. Debido a que la solución de trombina es muy inestable, se ajustó la dilución de trombina de forma tal que un pool de plasmas normales coaguló en 13 a 15 segundos.

III.2.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PLASMÁTICA DE LOS FACTORES DE COAGULACIÓN

Determinación de fibrinógeno

El método funcional de Clauss se basa en medir el tiempo de coagulación de un plasma diluido, por el agregado de una cantidad estandarizada de trombina ¹⁸⁸.

Se realizó siguiendo las instrucciones del equipo comercial (Fibrinogen prest, Stago. Francia). La concentración de fibrinógeno (expresada en mg/dl) se calculó a partir de una curva de calibración.

Dosaje de los factores de la vía extrínseca por métodos coagulables (II, VII, X y V)

Esta técnica determina la actividad funcional de los factores presentes en el plasma en estudio, respecto a un plasma control o pool de plasmas normales. Los factores de la vía extrínseca se determinan en base a la presencia de tromboplastina¹⁴.

Técnica: Se diluyó el plasma a estudiar 1/10 con solución fisiológica, considerando esta dilución como el 100% de actividad del factor. Se mezcló 1 volumen de esta dilución con 1 volumen de plasma deficitario del factor en estudio (Stago. Francia) y un volumen de tromboplastina, se recalcificó con un volumen de CaCl_2 0,025 M y se midió el tiempo de coagulación.

La concentración del factor se determinó extrapolando a partir de una curva de calibración de un pool normal (tiempo de coagulación vs. concentración del factor). Se informó el % de actividad respecto al normal o UI/ml, siendo una unidad internacional del factor la cantidad funcional del mismo en 1 ml de plasma.

Dosaje de los factores de la vía intrínseca por método coagulable (XII, XI, IX y VIII)

Los factores de la vía intrínseca se determinan en base a la acción de cefalina como fuente de fosfolípidos y caolín como activador de la vía intrínseca ¹⁴.

Técnica: Se diluyó 1/10 el plasma en estudio, siendo esta dilución el 100% de actividad. Se colocaron un volumen de la dilución con un volumen del plasma deficitario en el factor a estudiar (Stago. Francia) y un volumen de la solución de cefalina, se incubó 60 segundos y se midió el tiempo de coagulación posterior al agregado de CaCl_2 0,025M.

La concentración del factor se extrapoló de la curva de calibración y se informó la actividad en % respecto al normal o en UI/ml¹⁴.

Determinación del factor von Willebrand

El dosaje del factor von Willebrand en plasma se realizó mediante electroinmunodifusión simple según la metodología detallada por el fabricante (Stago. Francia).

III.2.3. DOSAJE DE LOS INHIBIDORES FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE COAGULACIÓN

III.2.3.1. Determinación de la actividad de los inhibidores

Actividad de Cofactor II de la Heparina

La actividad del Cofactor II de la Heparina se determinó según lo descrito en II.3.

Determinación de actividad de Antitrombina III

La actividad de Antitrombina III se determinó por método amidolítico indirecto. Al reaccionar plasma diluido con trombina en presencia de heparina se forma el complejo trombina-ATIII (TAT) y queda trombina residual. La trombina en exceso actúa frente al sustrato S2238 (Chromogenix. Suecia) liberando p-nitroanilina (pNA). La concentración de pNA, determinada a 405 nm, es inversamente proporcional a la concentración de ATIII en el plasma ¹⁸⁷.

La técnica se realizó según el protocolo del fabricante. La concentración de ATIII, determinada funcionalmente, se informó en porcentaje respecto a un plasma normal o en UI/ml de plasma.

Determinación de Proteína C

La actividad plasmática de la PC se determinó por método amidolítico directo. En presencia de un activador específico, *Agkistrodon contortrix*, la proteína C del plasma es transformada en PC activada, cuya concentración es determinada por su actividad amidolítica sobre el sustrato sintético CBS-42-46 (STACHROM PC. STAGO. Francia)¹⁸⁸. La p-nitroanilina liberada se determina espectrofotométricamente a 405 nm.

La técnica se realizó de acuerdo a las instrucciones del equipo comercial utilizado y la concentración de PC se informó en porcentaje respecto al valor normal o en UI/ml

Determinación de Proteína S

El ensayo se basa en la habilidad de la PS para actuar como cofactor de la PC activada, potenciando su efecto anticoagulante frente al factor V. Se determina el tiempo de coagulación de una mezcla que contiene el plasma incógnita diluido, PC activada, factor V y plasma normal deficiente en PS. El tiempo de coagulación es directamente proporcional a la concentración de PS en el plasma incógnito ¹⁸⁹. La técnica se realizó según las instrucciones del fabricante (STACLOT Protein S. Diagnóstica STAGO, Francia).

III.2.3.2. Dosaje del nivel antigénico de los inhibidores

Determinación de HCII antigénico

Los niveles de antigenicidad de HCII se determinaron por electroinmunodifusión simple o rocket según la técnica descrita por Laurell ¹⁹⁰.

La cuantificación del niveles de HCII se realizó corriendo simultáneamente con las muestras una curva normal preparada a partir de un pool de 10 plasmas normales, que se diluyeron en solución fisiológica 1:2 y 1:4 de manera que corresponden al 100, 50 y 25 %. El desarrollo electroforético se realizó a intensidad máx. 4 mA, voltaje máx. 180 volts y tiempo de corrida: 170 minutos. Una vez finalizada la corrida, se midió la altura de los picos y se construyó en papel milimetrado una curva de calibración (concentración vs. altura) a partir de la cual se extrapoló la concentración de HCII.

Electroforesis bidimensional del Cofactor II de la Heparina

Se realizó electroforesis bidimensional del Cofactor II de la Heparina con Dermatán Sulfato en la primera dimensión, siguiendo la técnica de Söderholm ^{191, 192}.

El método consiste en dos procesos de electroforesis combinado con inmunodifusión. En la primera electroforesis se produce la separación de las

proteínas del plasma de acuerdo a su carga neta y peso molecular, luego se siembra el anticuerpo de la proteína a estudiar, se gira la placa 45° de manera de proceder a la segunda electroforesis en donde ocurre la formación y precipitación del complejo antígeno-anticuerpo.

Se sembraron 45 µl de plasma y Dermatán Sulfato purificado en la calle de la corrida en la primera dimensión, finalizada la misma se giró la placa 45°, se sembró el anticuerpo y se realizó la corrida en la segunda dimensión durante 150 minutos.

Se lavó con solución fisiológica durante 12 horas, se coloreó con Azul brillante de Coomassie 0,5 % en metanol: ácido acético: agua (45: 10: 45) durante una hora y luego se decoloró el fondo de la corrida con metanol: ácido acético: agua (45: 10: 45)

Antitrombina III antigénica

La determinación de ATIII inmunológica se realizó mediante inmunoaglutinación en micropartículas de látex. La técnica se basa en la inmunoadsorción de partículas de látex, conjugadas con anticuerpo anti ATIII, el ATIII del plasma forma el inmuno complejo con el anticuerpo, el complejo precipita y la absorbancia de la solución a 590 nm disminuye. La concentración de ATIII es inversamente proporcional a la absorbancia. Se utilizó el equipo Lía test ATIII (Stago. Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración de ATIII de la muestra se extrapoló a partir de una curva de calibración, concentración de ATIII expresado en % o UI/ml vs. Absorbancia.

Proteína C antigénica

La concentración de PC antigénica se determinó por técnica de ~~enzimainmunoensayo~~ (Trombostika Proteína C. Micro elisa Organon Tecknika. Holanda).

Proteína S antigénica

El dosaje del nivel antigénico de PS total en plasma se realizó mediante inmunoaglutinación en micropartículas de látex (Lía Test PS. Stago. Francia) El fundamento del método es similar al detallado para ATIII.

III.2.3.3. Otras determinaciones

Actividad de Dermatógeno Sulfato en plasma

La medición de los niveles de DS en plasma se realizan por método amidolítico indirecto en dos etapas. En una primera etapa, se adsorbe el plasma con una suspensión de bentonita para eliminar el HCII, ATIII y fibrinógeno, el sobrenadante se incuba con HCII bovino purificado y un exceso de trombina. Se determina la actividad amidolítica de la trombina residual sobre el sustrato cromogénico CBS 61.50. La absorbancia, medida a 405 nm, es inversamente proporcional a la concentración de dermatán sulfato ¹⁸³.

La determinación se realizó siguiendo el protocolo comercial (STACHROM DS, Diagnóstica STAGO). Los valores de referencia del DS se determinaron midiendo el DS plasmático en 40 plasmas normales, de los utilizados para determinar los valores de referencia del Cofactor II de la Heparina.

Concentración de homocisteína plasmática

Se determinó la concentración de homocisteína plasmática mediante un enzaimmunoensayo Axis Homocysteine EIA (Axis Biochemicals ASA. Noruega). Para lo cual se utilizó plasma anticoagulado con EDTA, centrifugado y separado dentro de la primera hora de extracción.

Las distintas especies en que se encuentra la homocisteína (Hcy) son reducidas a Hcy libre y ésta es convertida enzimáticamente a S-Adenosil Hcy (SAH). A continuación se procede a un enzaimmunoensayo en fase sólida, basado en la competición entre SAH de la muestra y la SAH unida al medio soporte, por los distintos sitios de unión a un anticuerpo monoclonal anti-SAH.

RESULTADOS
Y
DISCUSION

I. CARACTERIZACION DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA PLASMATICO

Se investigaron las características del HCII humano purificado utilizando técnicas electroforéticas, comparando su comportamiento con HCII de origen bovino con el objetivo de utilizarlos posteriormente como testigos de las corridas electroforéticas del plasma humano.

I.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida según la técnica descrita por Laemmli ¹⁷⁵, con un T= 9 % C= 2,6 con SDS.

Se determinó el peso molecular del HCII humano y bovino purificado para su posterior utilización como testigo mediante el cálculo del Rf de las proteínas y de los marcadores de peso molecular. Se construyó de la curva Rf en función del peso molecular de los marcadores a partir de la cual, se extrapoló el PM del HCII.

El HCII humano presentó una banda correspondiente a 65.600 ± 2 daltons (el peso molecular es promedio de tres experiencias), el HCII bovino presentó una banda mayoritaria correspondiente a 53.000 ± 2 daltons. La figura N° 8 muestra la electroforesis en geles de poliacrilamida de la solución de HCII humano (calles 2 y 4) y HCII bovino (calles 3 y 5).

Si bien el PM del HCII calculado a partir de su secuencia de aminoácidos es de 54.996 D la molécula presenta tres sitios de glicosilación, lo que lleva al PM a 61.110 D para la glicoproteína ¹¹², coincidente con los valores determinados por análisis de equilibrio de sedimentación 65.600^5 ó 62.100^144 y los calculados a partir de SDS-PAGE 65.600 D.

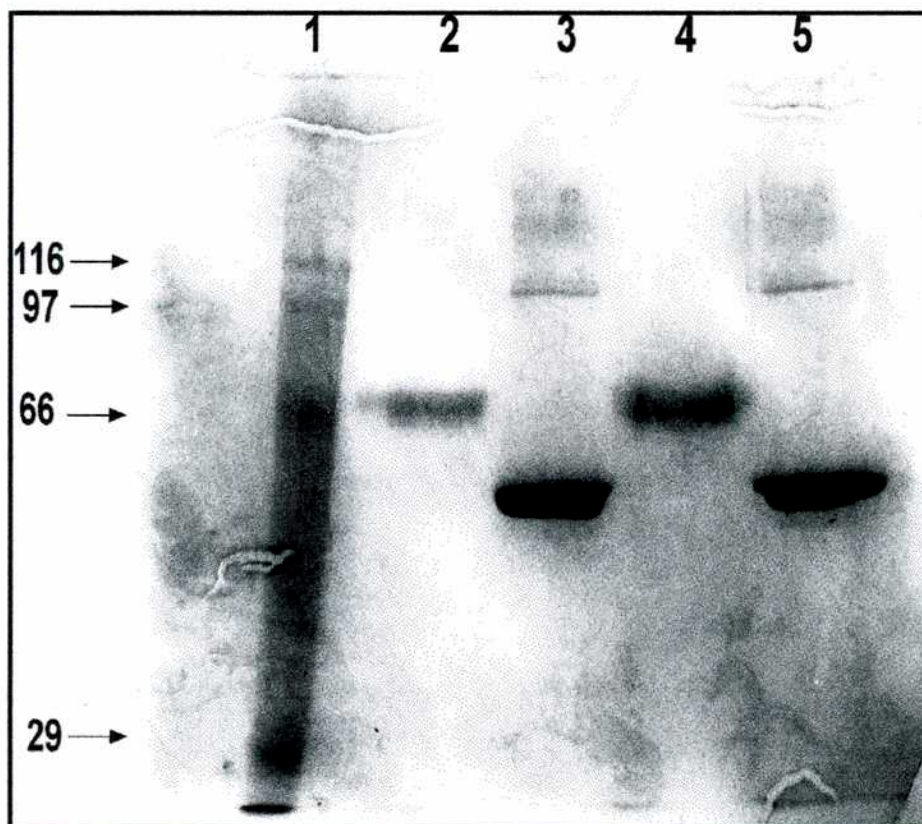


Figura N° 8. Perfil electroforético del HClI humano y bovino puro

Electroforesis en gel de poliacrilamida (T= 9 %; C= 2,6) con SDS utilizando un sistema discontinuo de buffers.

Calle 1: marcadores de peso molecular

Calles 2 y 4: HClI humano purificado.

Calles 3 y 5: HClI bovino purificado.

I.2. ISOELECTROENFOQUE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se realizó un primer isoelectroenfoque utilizando anfolitos de amplio rango (3 - 10) para estimar la zona de punto isoeléctrico (pI) donde se ubica el HCII humano purificado. Finalizado el mismo, se construyó una curva de pH en función de la distancia y se extrapoló la distancia recorrida por el HCII. De esta manera se determinó que el HCII se ubicaba en la zona punto isoeléctrico (pI) cercano a 5.

Se realizó un segundo isoelectroenfoque con un gradiente de anfolito más cercano al pI de la proteína (3 - 6), para obtener mejor resolución. Una vez estandarizada la técnica se realizaron tres isoelectroenfocos, con la misma relación vots/horas. Se construyó la curva de pH en función de distancia y se determinó el pI del HCII.

El HCII humano presenta microheterogeneidad con respecto a su pI, ya que se observa una banda mayoritaria a 5,15 y bandas menores a pI 5,05 y 4,95, lo cual coincide con lo descrito en la literatura ⁵.

Una vez que se caracterizó el HCII purificado de origen humano y bovino mediante técnicas electroforéticas, se utilizaron como testigos en las corridas posteriores.

I.3. DETECCION INMUNOLOGICA. WESTERN BLOT

Con el objetivo de caracterizar el HCII plasmático se aplicaron diversas técnicas electroforéticas al plasma de 25 individuos sanos, seleccionados según las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica ¹⁷⁸.

Se realizaron técnicas de SDS-PAGE con T= 7% y C= 2,6 seguidas de detección inmunológica del HCII por Western blot.

La figura N° 9 muestra el resultado de corridas por SDS-PAGE, seguidas de un electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa, reveladas con anticuerpo

policlonal para HCII humano. Todas las calles corresponden a plasma humano normal de los distintos individuos.

Se observa la presencia de una banda mayoritaria y otras de menor intensidad correspondiente al HCII, que se ubican aproximadamente a los 65,6 kD. Resulta llamativa la presencia de tres bandas de intensidad suave en una zona de mayor peso molecular, que revelan con el anticuerpo anti HCII. Los 25 plasmas normales estudiados por duplicado, presentaron el mismo perfil.

Se indujo la formación *in vitro* el complejo trombina-HCII, para compararlo con las bandas de alto peso molecular. El western-blot reveló que el peso molecular del complejo es de aproximadamente 96.000 D, mientras que las bandas de alto PM que revelaron con anti-HCII, que se observaron en el plasma normal, presentaron una movilidad electroforética correspondientes a un peso molecular mayor (ver figura N° 14).

Se comprobó la especificidad del anticuerpo anti HCII realizando un SDS-PAGE sembrando HCII, fibrinógeno, ATIII y albúmina humana purificada, luego se transfirió mediante Western Blot a la membrana de nitrocelulosa y se reveló con anti HCII. El anticuerpo anti HCII no reconoció la ATIII (Fig. N° 16), fibrinógeno (Fig. N° 10 y 13) ni albúmina, corroborando la especificidad del mismo.

De esta manera, al realizar las corridas electroforéticas seguidas de Western blot con el plasma de los 25 individuos normales, detectamos una banda de HCII de 65.600 D de PM y tres bandas de menor intensidad y mayor peso molecular que revelaron con anti HCII.

En la bibliografía no se encontró referencias sobre la presencia de bandas de alto PM en SDS-PAGE, Western-Blot. Esto podría deberse a que los autores trabajan con muestras pretratadas, ya sea HCII purificado a partir de plasma humano ^{5, 10}, o con plasmas desfibrinados ¹³².

Durante el desarrollo de este trabajo estudiaremos dichas bandas, principalmente en el punto II.3.

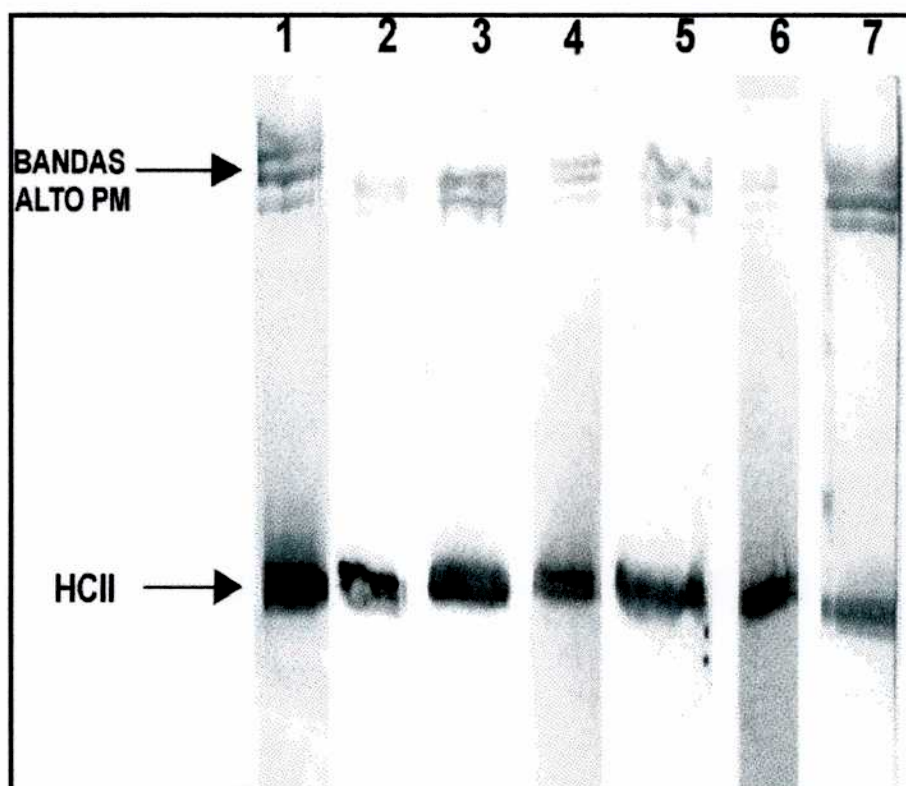


Figura Nº 9. SDS - Western Blot de plasmas normales revelados con anticuerpo anti HCII policlonal humano.

Se realizó un SDS con T= 7% ; C= 2,6 seguida de detección inmunológica de HCII por Westen Blot. Las calles 1-7 corresponden a distintos plasmas normales.

I.4. INVESTIGACION DE LA UNION DEL HCII PLASMATICO A PROTEINAS

En los SDS-PAGE, Western Blot de plasmas normales revelados con anticuerpo anti HCII se observó la presencia de bandas de alto peso molecular distintas a la del HCII nativo. A partir de este hallazgo se comprobó si las bandas de alto PM correspondían al HCII unido a otras proteínas, mediante el uso de técnicas electroforéticas.

I.4.1. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES REDUCTORAS

Se realizó el fraccionamiento electroforético a intensidad de corriente constante (25 mA) en gel de poliacrilamida (T= 7 %; C= 2,6) con SDS empleando el sistema discontinuo de buffers. Las muestras fueron previamente tratadas con β mercaptoetanol 100 mmol/l y SDS 10 g/l, seguido de transferencia sobre nitrocelulosa y revelado con anticuerpo policlonal anti-HCII.

La Figura N° 10 presenta el perfil electroforético obtenido. En el plasma normal (calle 1), se observa la presencia de una banda mayoritaria y otras de menor intensidad, cuya movilidad electroforética coincide con la de HCII testigo. Se destaca nuevamente la presencia de bandas que revelan con anti-HCII, pero cuyo peso molecular es apreciablemente mayor que el del inhibidor nativo.

En los plasmas normales pretratados con β mercaptoetanol (calles 4 y 5), solo se evidencia la banda correspondiente al HCII puro, sin observarse las de alto peso molecular, presentando esta banda la misma movilidad electroforética que el HCII testigo (calle7). En esta transferencia también se observa que el fibrinógeno humano no revela con anti HCII (calle 3).

El β mercaptoetanol es un agente que rompe los puentes S-S. Las condiciones reductoras del β mercaptoetanol habrían escindido uniones disulfuro, permitiendo la liberación del HCII el cual se movilizó como HCII testigo.

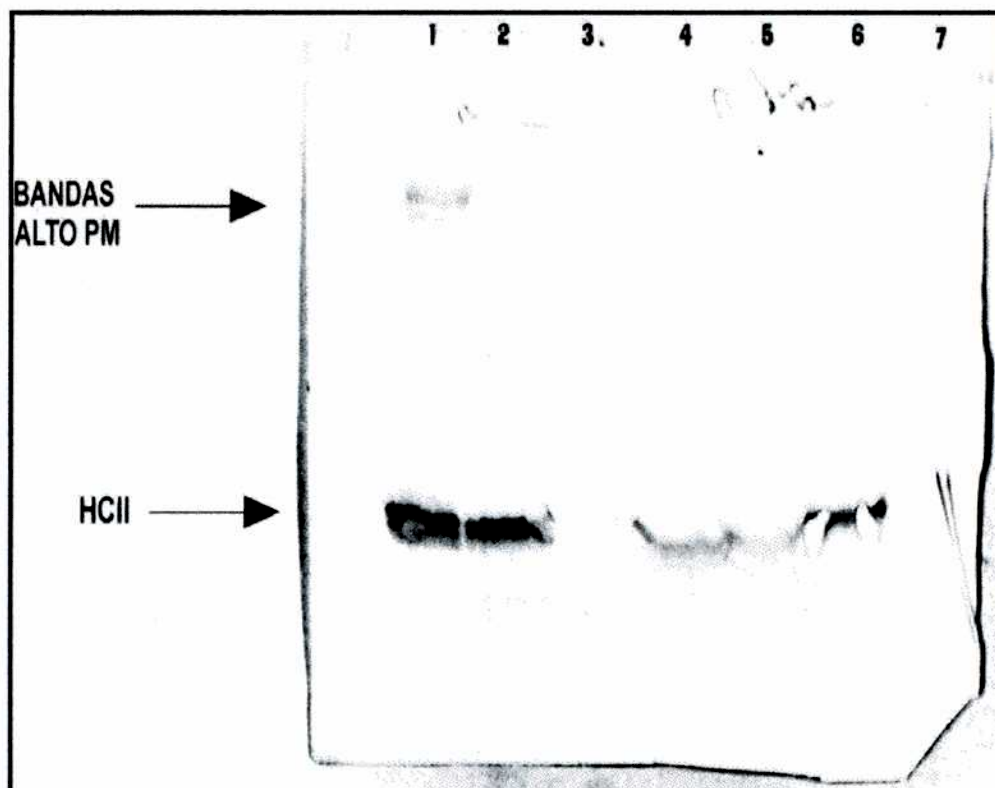


Figura N° 10. SDS-PAGE seguido de Western Blot. Pretratamiento de las muestras con β mercaptoetanol.

Calles 1: Plasma normal sin β mercaptoetanol.

Calle 2: HCII humano purificado sin β mercaptoetanol.

Calle 3: Fibrinógeno humano purificado sin β mercaptoetanol .

Calles 4 y 5: Plasmas normales tratados con β mercaptoetanol.

Calle 6: HCII humano purificado tratado con β mercaptoetanol.

Calle 7: Fibrinógeno humano purificado tratado con β mercaptoetanol

Se realizó un SDS-PAGE seguido de Western - Blot utilizando urea como agente reductor.

La figura N° 11 muestra el perfil obtenido. El pretratamiento del plasma normal con urea, no modifica el perfil, se observan las bandas de alto peso molecular que revelan con anti-HCII (calle 4). Cuando el plasma normal es pretratado con urea y β mercaptoetanol, no se observan las bandas de alto PM, mientras que se mantiene la del HCII nativo (calle 1).

Observamos que la presencia de urea como agente reductor no permite la separación del HCII de la proteína a la cual está agregada, por lo cual concluimos que no están presentes uniones del tipo de puentes hidrógenos, ni de fuerzas de van der Waals.

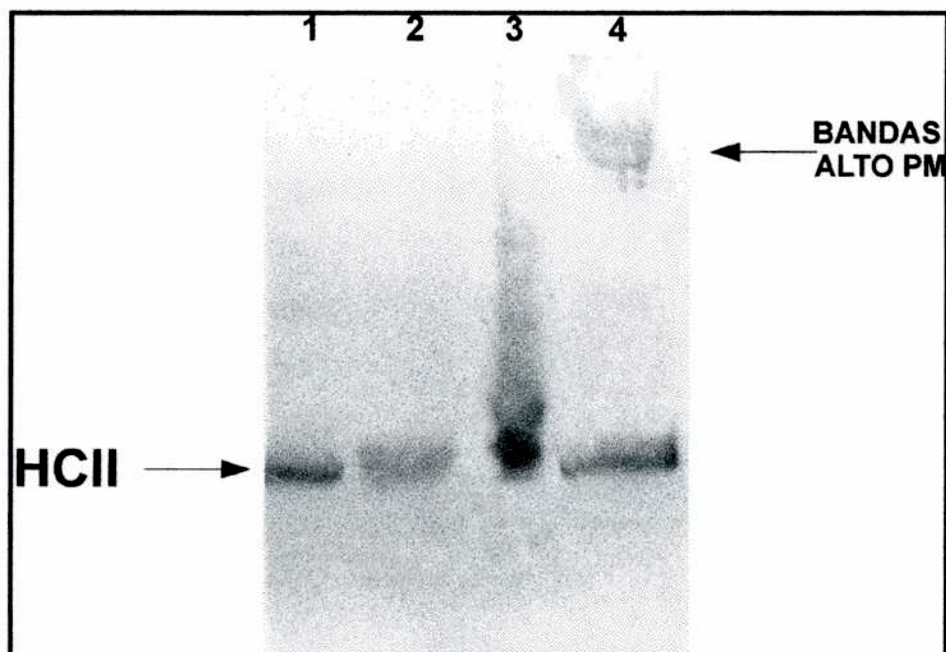


Figura N° 11. SDS-PAGE seguido de Western - Blot. Pretratamiento con urea

Calle 1: Plasma normal pretratado con urea 8 M y β mercaptoetanol

Calle 2: HCII humano purificado pretratado con urea y β mercaptoetanol

Calle 3: HCII purificado pretratado con urea, sin β mercaptoetanol

Calle 4: Plasma normal pretratado con urea, sin β mercaptoetanol

II.4.2. DOBLE ELECTROFORESIS DE HCH

Con el objetivo de separar las bandas de alto peso molecular que revelaron en SDS-PAGE, Western blot con anticuerpo anti HCII, se realizó una doble electroforesis, seguida de transferencia sobre nitrocelulosa revelada con anticuerpo anti HCII como se detalla en II.4.2. de materiales y métodos.

La Figura N° 12 muestra los resultados obtenidos. La calle 1 corresponde a HCII humano testigo y la calle 2 a plasma normal en la primera electroforesis. Se observó que el plasma normal presenta la banda mayoritaria cuya movilidad electroforética es similar al del HCII testigo y las bandas de alto peso molecular que revelan con anti HCII, este fragmento de nitrocelulosa es el testigo de la primera corrida.

Finalizada la primera electroforesis, se cortó el gel aislando la zona que corresponde a las proteínas de alto peso molecular, de esta manera se separaron las proteínas de alto peso molecular que revelan con anti HCII, de aquellas que presentan la misma movilidad electroforética que el HCII testigo presentes en el plasma normal.

Las calles 3', 4' corresponden a las proteínas de alto peso molecular de plasmas normales, que fueron separadas luego de la primera electroforesis, eluidas y resembradas en la segunda electroforesis. Se observa que las proteínas de alto peso molecular que se aislaron y corrieron nuevamente sin tratamiento reductor, en la 2^{da} electroforesis permanecen en el sector de alto peso molecular.

Las calles 5' y 6' corresponden al mismo segmento de alto peso molecular de plasmas normales, pero pretratados con β mercaptoetanol en la segunda corrida electroforética. Las proteínas de alto PM que fueron tratadas con β mercaptoetanol, migraron de forma similar al testigo de HCII humano (calle 7') indicando que las bandas de alto peso molecular que revelan con anti HCII corresponderían a HCII unido a proteínas .

Con la doble electroforesis del HCII se pudo separar las bandas de alto PM de las de HCII nativo; estas bandas se mantuvieron en la zona de alto PM en la segunda electroforesis y el tratamiento con β mercaptoetanol liberó al HCII del agregado macromolecular por lo cual se movilizó como HCII puro.

Del tratamiento del plasma humano normal con agentes reductores y posterior SDS-PAGE/ Western Blot revelado con anticuerpo policlonal anti HCII, concluimos que la acción de la urea 8 M no permite la separación del HCII de la proteína a la cual está unida. El agente reductor β mercaptoetanol al romper puentes disulfuros, libera al HCII del agregado macromolecular y permite que migre como HCII testigo.

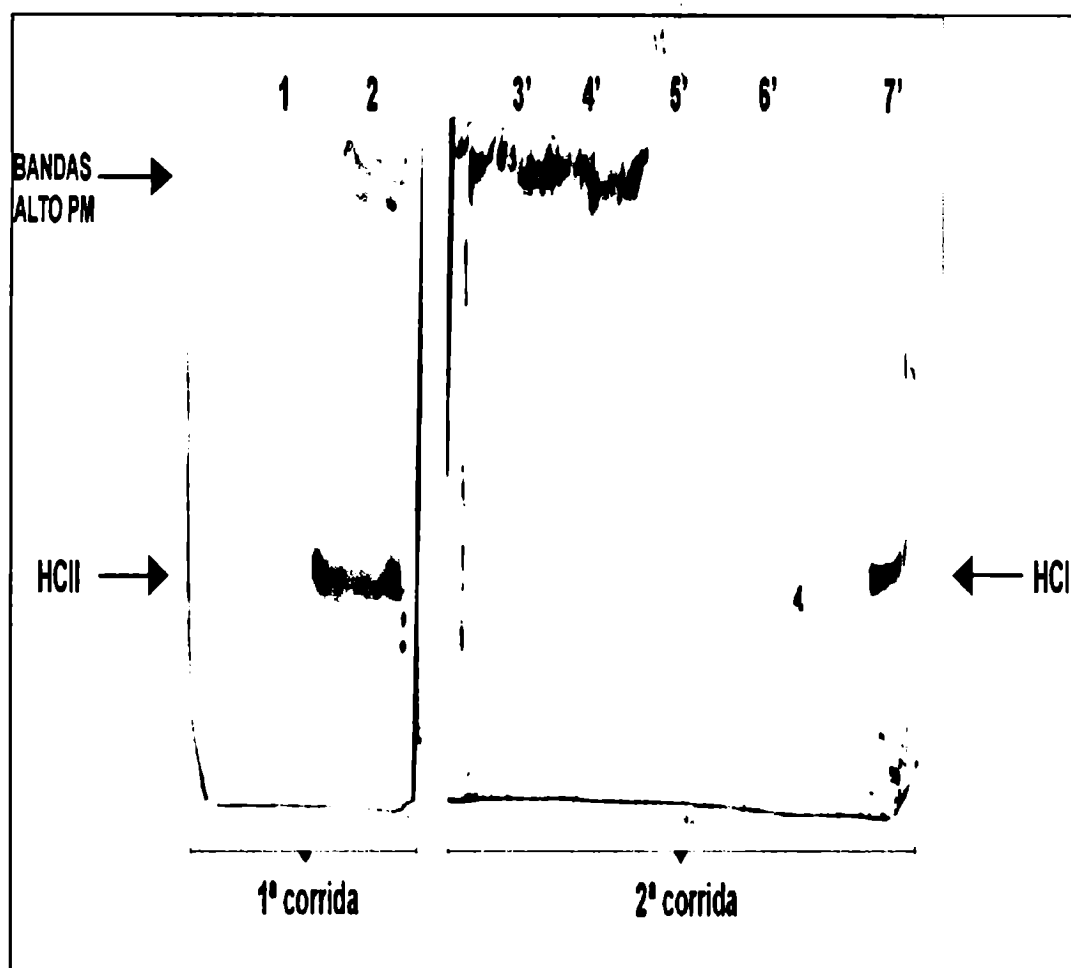


Figura N° 12. Electroforesis doble seguida de Western Blot revelado con anticuerpo policlonal anti HCII.

Calle 1: HCII humano purificado, testigo. (primera corrida).

Calle 2: Plasma humano (primera corrida).

Calles 3' y 4': Proteínas de alto peso molecular de los plasmas normales que fueron separadas luego de la primera electroforesis y resembradas (Segunda electroforesis).

Calles 5' y 6': Proteínas de alto peso molecular de los plasmas normales que fueron separadas luego de la primera electroforesis tratadas con β mercaptoetanol y resembradas. (Segunda electroforesis).

Calle 7': HCII humano purificado. Testigo de la segunda electroforesis.

II.4.3. INVESTIGACION DE LA UNION DE HCII A FIBRINOGENO

Con el objetivo de determinar la o las proteínas a las cuales se une el HCII se realizaron las siguientes electroforesis:

Revelado con anti fibrinógeno: La figura N° 13 muestra un SDS-PAGE/ Western Blot. Una vez finalizada la transferencia, se dividió la lámina y se reveló una mitad con anti HCII y la mitad restante con anti fibrinógeno, como se detalla en la sección II.4.3 de materiales y métodos.

El segmento comprendido por las calles 1 a 4 se reveló con anticuerpo anti HCII y el formado por las calles 5 a 7 con anticuerpo anti fibrinógeno. El HCII bovino purificado (calle 3) presenta movilidad electroforética similar al HCII humano testigo y al plasmático. El plasma normal presenta nuevamente las bandas de alto PM (calle 4), en esta transferencia se observa claramente que estas bandas desarrollan la misma movilidad electroforética que el fibrinógeno del plasma normal (calle 7). El HCII humano y bovino testigos (calles 5 y 6) no revelan con anti fibrinógeno, y el fibrinógeno (calle 1) no revela con el anticuerpo anti HCII, indicando de esta manera que los anticuerpos no presentaron reacción cruzada.

Si bien se esperaría que al formarse la unión entre el HCII y fibrinógeno el peso molecular del fibrinógeno se modificara, y junto con él la movilidad electroforética, hay que tener en cuenta que el fibrinógeno es la proteína del sistema de coagulación que se encuentra en mayor concentración en el plasma (300 mg/ml), además de presentar un alto peso molecular (330 kD). La concentración plasmática de HCII es 4.000 veces menor (aproximadamente 0,09 mg/ml) y sólo una pequeña proporción del mismo se uniría al fibrinógeno, por lo tanto mediante las técnicas utilizadas, el peso molecular del fibrinógeno no se modificaría por la unión del HCII.

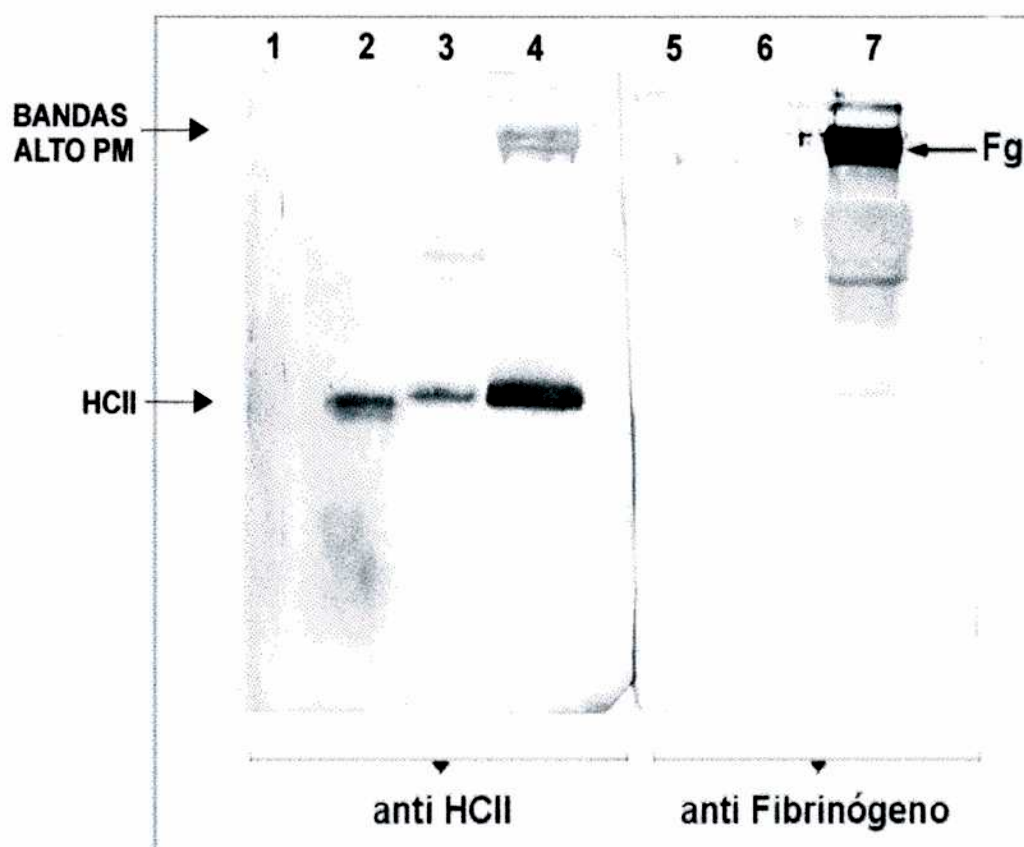


Figura N° 13. SDS-PAGE Western Blot revelado con anticuerpo policlonal anti HCII humano y anti fibrinógeno humano.

Calle 1 : Fibrinógeno humano.

Calles 2 y 5: HCII humano.

Calle 3 y 6: HCII bovino.

Calle 4 y 7: Plasma normal

La sección que contiene las calles 1 - 4 se reveló con anti HCII, y las que contiene las calles 5 - 7 con anti fibrinógeno.

Plasma desfibrinado: Con el objeto de comprobar que la proteína a la cual se une el HCII es el fibrinógeno, se obtuvo plasmas desfibrinados para observar la presencia o ausencia de las bandas de alto PM conteniendo HCII.

Se desfibrinó por acción del calor un pool de plasmas normales como se detalla en materiales y métodos. Se dejó coagular sangre en presencia de Dermátan Sulfato para inducir la formación del complejo Trombina-HCII *in vitro* y se realizó un SDS-PAGE, finalizado el mismo se dividió la lámina revelándose una mitad con anti HCII y la otra con anti fibrinógeno. Los resultados se muestran en la figura N° 14.

El segmento comprendido por las calles 1 a 3 se revelaron con anticuerpo anti HCII y la porción que contiene las calles 4 y 5 con anticuerpo anti fibrinógeno.

Tanto el plasma desfibrinado (calle 1), como el suero (calle 2) ,no presentan las bandas de alto PM que revelen con anti HCII, mientras que sí se observan en el plasma normal (calle 3). Nuevamente se puso de manifiesto que estas bandas de alto PM presentan la misma movilidad que el fibrinógeno, e incluso un número y posición similares, siendo la intensidad de las bandas de HCII apreciablemente mayor que las del fibrinógeno. En esta corrida se puede observar el complejo HCII - trombina (calle 2) cuyo peso molecular es de aproximadamente 96.000 D, mientras que el PM de las bandas que revelan con anti HCII es apreciablemente mayor.

Este hallazgo permite descartar que las bandas de alto PM reveladas con anti-HCII, correspondan al complejo trombina - HCII.

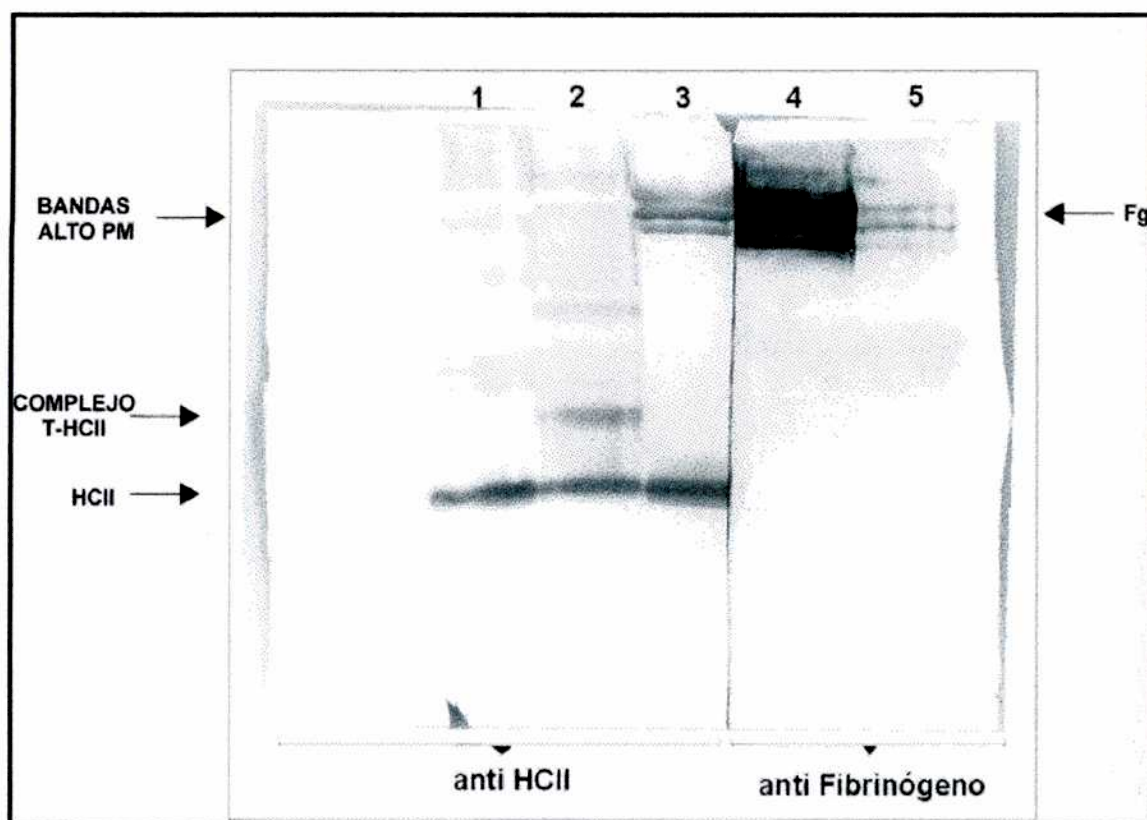


Figura N° 14. SDS-PAGE/Western Blot de plasmas desfibrinados relevado con anticuerpo policlonal anti HCII fibrinógeno humano.

Calles 1 y 5: Plasma desfibrinado por calentamiento.

Calle 2: Suero coagulado en presencia de Dermatan Sulfato.

Calle 3 y 4: Plasmas normales.

El segmento que contiene las calles 1 a 3 se revelaron con anticuerpo anti HCII humano y las 4 y 5 con anticuerpo anti fibrinógeno humano.

La figura N° 15 muestra un SDS-PAGE seguido de transferencia revelado con anti HCII de un mismo plasma desfibrinado mediante distintos procedimientos (ver materiales y métodos 1.7.).

Se observa que al eliminar el fibrinógeno por cualquiera de las metodologías utilizadas, como calentamiento (calle 2), liberación del fibrinopéptido A de la cadena α de la fibrina producida por acción del veneno de *Bothrops atrox* (calle 3), proteólisis del fibrinógeno realizada por el veneno de *Agkistrodon rhodostoma* (calle 4), o por coagulación en el suero (calle 5), se eliminan las bandas de alto peso molecular que revelan con anti HCII.

De esta manera se refuerza la evidencia de que el HCII fisiológicamente circula unido al fibrinógeno y que cualquier modificación en la estructura de la molécula del fibrinógeno afecta la unión del HCII al mismo.

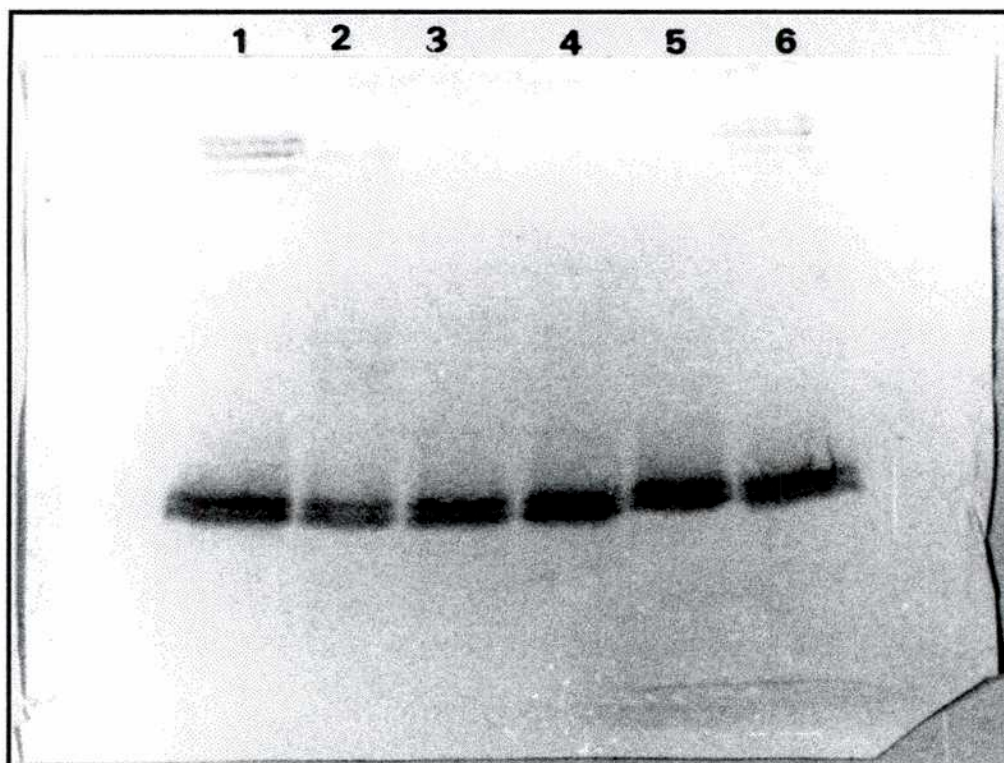


Figura N° 15. SDS-PAGE/Western Blot de plasma desfibrinado con distintas técnicas, revelado con anticuerpo anti HCII humano.

Calles 1 y 6: Plasmas normales.

Calle 2: Plasma desfibrinado por calentamiento.

Calle 3: Plasma desfibrinado con veneno de *Bothrops atrox*.

Calle 4: Plasma desfibrinado con veneno de *Agkistrodon rhodostoma*.

Calle 5: Suero.

Revelado con anti vitronectina: Se repitió el mismo procedimiento revelando la mitad de la placa con anticuerpo anti vitronectina y la otra mitad con anti HCII.

Las bandas que revelan con anti vitronectina, presentan distinta movilidad electroforética que las de alto peso molecular que revelan con anti HCII, indicando que el HCII no se uniría a vitronectina.

Revelado con Antitrombina III: Dado que el Cofactor II de la Heparina presenta gran homología estructural con la ATIII, se realizó una transferencia para verificar que no hubiera reacción cruzada del anticuerpo anti HCII (Figura N° 16).

Luego de la transferencia, se dividió la lámina, la porción que contiene las calles 1 y 2 se reveló con anticuerpo anti ATIII, mientras que las calles 3 y 4 con anticuerpo anti HCII.

Las bandas que evidencian a la ATIII presentan una movilidad electroforética mayor que las bandas de HCII, lo cual coincide con las diferencias en los pesos moleculares (ATIII 56 kD ; HCII 65,6 kD). El plasma normal revelado con anti ATIII no presenta las bandas de alto PM.

De esta manera observamos que la identidad inmunológica del HCII, el cual no presenta reacción cruzada con la ATIII, proteína con la cual comparte un 60% de homología estructural.

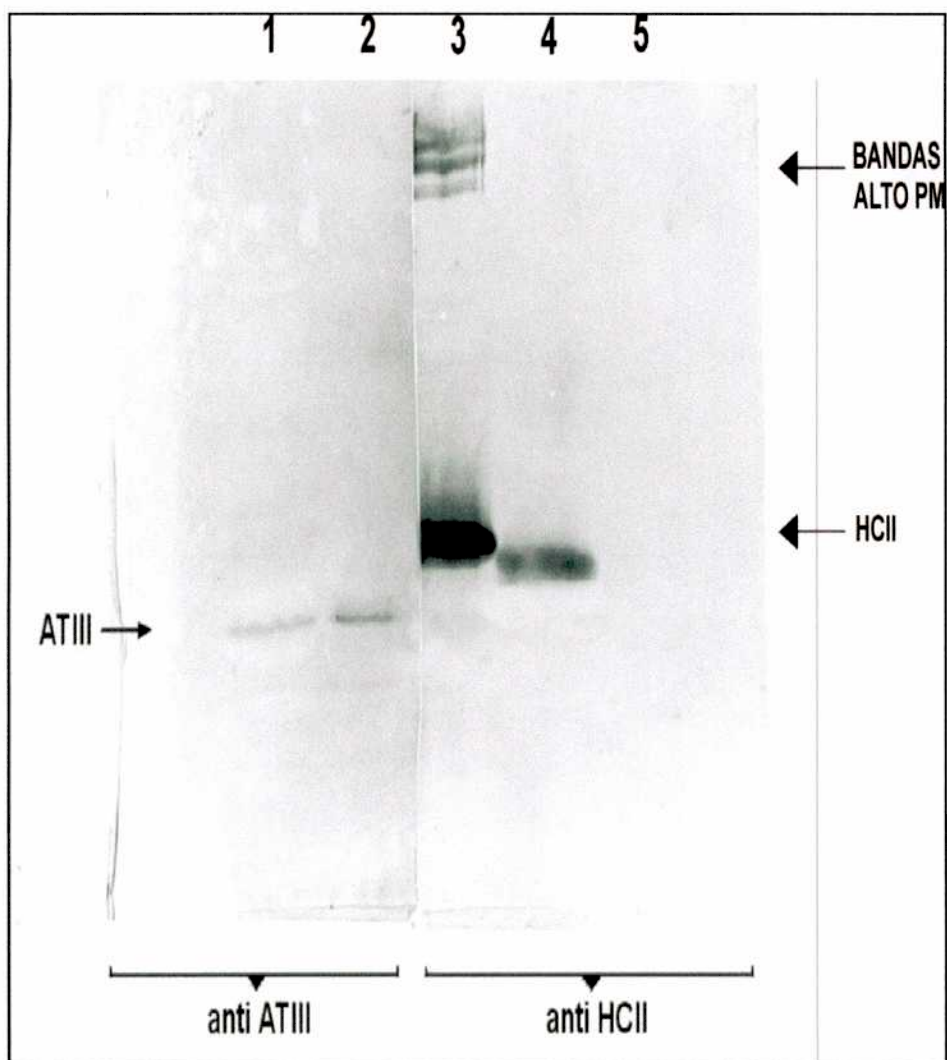


Figura N° 16. SDS-PAGE/Western blot de plasmas revelados con anticuerpos policlonales anti HCII y anti ATIII
 Calle 1 y 3: Plasma normal ; Calle 2: ATIII humana purificada (control de ATIII) ; Calle 4: HCII bovino purificado (control de HCII)

I.5. DISCUSION DE LA CARACTERIZACION DEL HCII PLASMATICO

Al estudiar mediante técnicas electroforéticas al HCII plasmático encontramos que no solo se presenta como un banda mayoritaria de 65.600 D de peso molecular, si no que se observa la presencia de tres bandas de HCII en zonas de mayor peso molecular.

Mediante la utilización de SDS-PAGE/ Western Blot revelado con antisuero anti-HCII se estableció que las bandas de alto peso molecular, que revelan con anti-HCII, corresponderían a un agregado macromolecular de HCII unido a otra proteína plasmática.

El desarrollo del SDS-PAGE/ Western Blot en presencia de urea no modifica el perfil electroforético. En cambio el tratamiento de la muestra con β mercaptoetanol permite la separación del HCII del agregado macromolecular, el HCII liberado se desplaza como el HCII testigo, determinando que puentes disulfuros estarían implicados en la estabilidad del agregado.

Para identificar la proteína a la cual se une el HCII se realizaron SDS-PAGE seguidos de Western Blot revelando con diversos anticuerpos, observándose que el agregado macromolecular presenta la misma movilidad electroforética que el fibrinógeno plasmático. Al eliminar el fibrinógeno de plasmas normales con diversos agentes (calor, veneno de *Bothrops atrox*, veneno de *Agkistrodon rhodostoma*, suero) se observa la eliminación de la banda de alto PM, corroborando la unión del HCII al fibrinógeno.

Del análisis de los estudios del HCII plasmático mediante técnicas electroforéticas, podemos inferir que, fisiológicamente un porcentaje del HCII plasmático circularía unido al fibrinógeno.

II. INTERACCION *IN VITRO* COFACTOR II DE LA HEPARINA-TROMBINA

II.1. ACTIVIDAD DE TROMBINA HUMANA SOBRE SUSTRATOS CROMOGENICOS

Se determinó la actividad amidolítica de trombina humana purificada sobre dos sustratos cromogénicos S-2238 y Chromozyn Th, observándose que la actividad amidolítica de la trombina sobre ambos sustratos fue similar. Como consecuencia se eligió el sustrato S-2238 para las determinaciones de la actividad de trombina. Los sustratos cromogénicos miden la actividad estearásica de la enzima, que en la trombina es paralela a la actividad proteolítica intrínseca.

II.2. CURVA DE CALIBRACION DE TROMBINA

Se realizó una curva de calibración de trombina comprendida entre de 10 a 230 nM. Como se observa en la figura N° 17 es una línea recta ($R^2 = 0,99$) dentro de las concentraciones de 10 a 200 nM, que corresponden a absorbancias entre 0,2 y 2,00; siendo este el rango de concentraciones adecuado para el estudio de la actividad de HCII *in vitro*, mediante la utilización del sustrato cromogénico seleccionado.

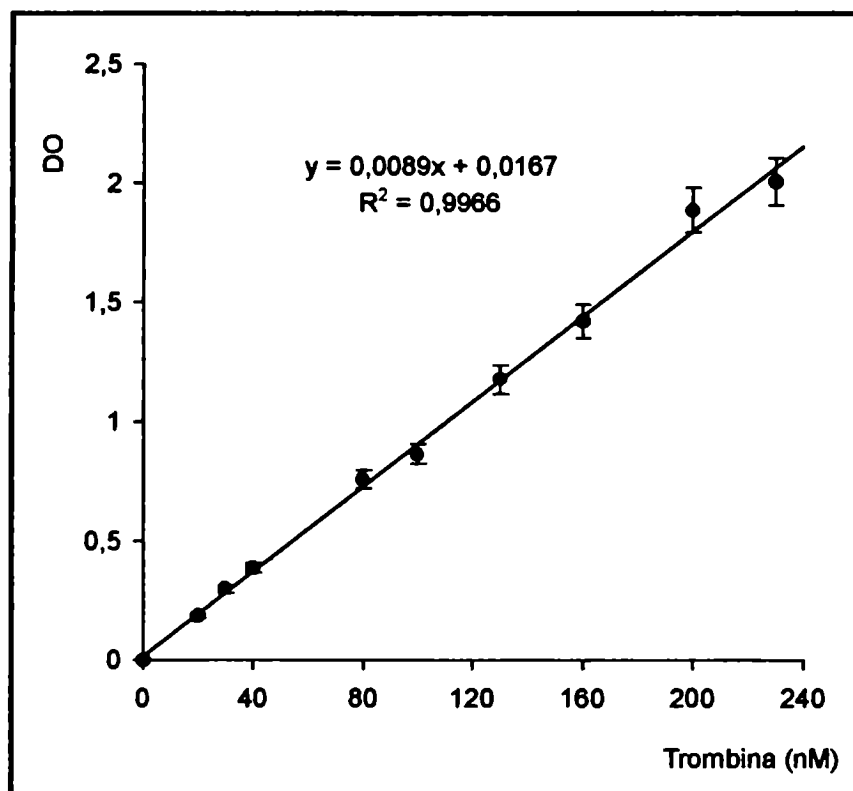


Figura N° 17. Curva de calibración de trombina humana

II.3. ESTABILIDAD DE TROMBINA A 37° C

Cuando se estudió la estabilidad de la trombina humana a 37°C se observó que esta enzima presenta un decaimiento de su actividad amidolítica en el tiempo (Figura N° 18 A).

El análisis cinéticos de los resultados demostró dos pendientes con velocidades diferenciales, durante los primeros minutos el decaimiento de la actividad de trombina es mas pronunciado ($v_1 = 8 \cdot 10^{-3}$) que en el tiempo posterior (hasta 30 min.: $v_2 = 3 \cdot 10^{-3}$).

Como consecuencia de la inestabilidad de la trombina a 37°C observada, los estudios de inhibición de trombina *in vitro* se diseñaron realizando blancos de estabilidad de trombina en cada alícuota. De forma tal, la inestabilidad de la trombina se calcula para cada uno de los resultados.

La trombina normalmente no se encuentra en circulación, sino que debe ser generada a partir de la activación de protrombina. Por nuestros resultados vemos que esta serinoproteasa presenta una gran pérdida de actividad a la temperatura corporal, primordialmente en los primeros minutos. Este decaimiento de actividad de trombina a 37°C podría ser un mecanismo más, que colaborara con el proceso de inactivación de una enzima clave del sistema de coagulación.

II.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE HCII A 37° C

El estudio de la estabilidad del HCII a 37° C como se observa en la Figura N° 18 B reveló que la serpina es mucho mas estable que la trombina, lo cual coincidiría con su vida media de 2,5 días en la circulación.

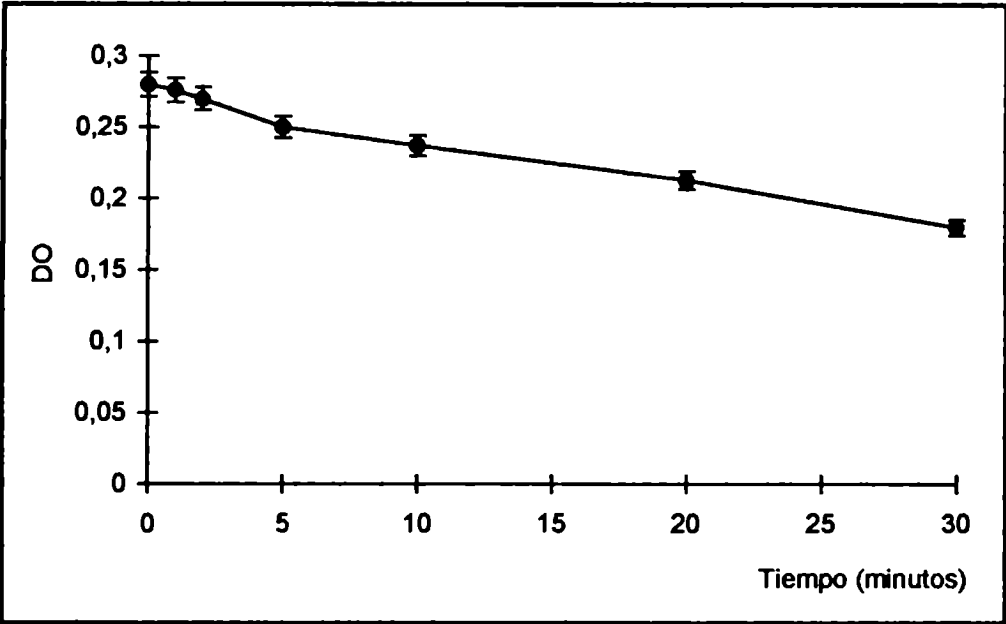


Figura N° 18.A. Estabilidad de la trombina humana a 37° C

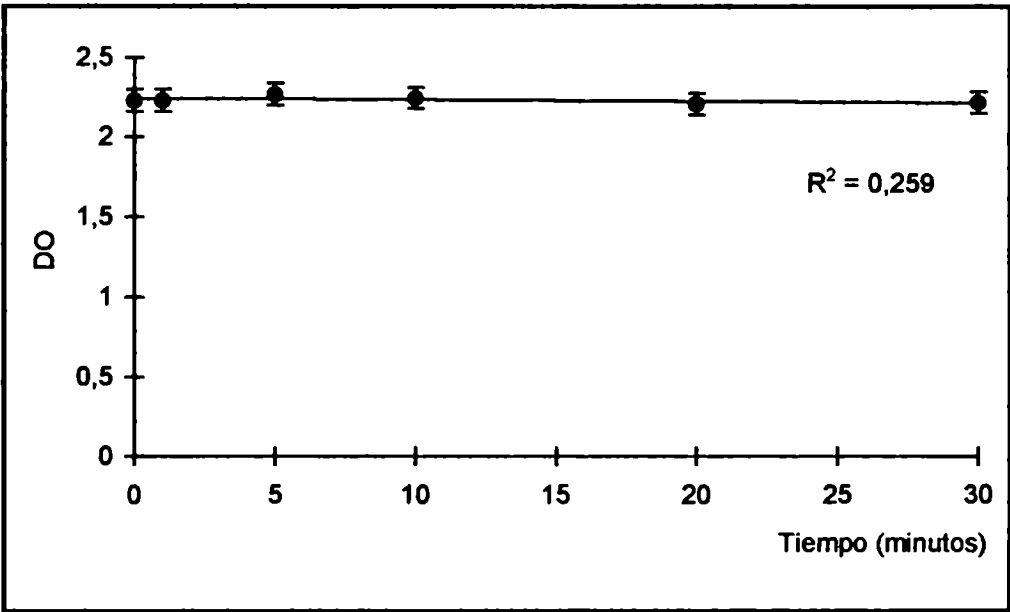


Figura N° 18.B. Estabilidad del Cofactor II de la Heparina humano a 37° C

II.5. INHIBICION DE TROMBINA HUMANA POR HCII EN SISTEMAS PUROS

II.5.1. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE TROMBINA POR HCII

La capacidad inhibitoria de trombina del HCII en concentraciones fisiológicas en ausencia de glicosaminoglicanos se muestra en la Figura N° 19. Estos estudios ponen en evidencia una leve acción antitrombótica del HCII en ausencia de su potenciador específico después del período de latencia.

Para todas las concentraciones trombina utilizadas, se observa un período de latencia durante el primer minuto en la actividad antitrombínica del HCII.

Luego del periodo de latencia, la capacidad del HCII de inhibir trombina, varia de acuerdo a la concentración de la misma. A altas concentraciones de trombina (100 nM) la inhibición es mínima, mientras que la acción inhibitoria es mayor a la menor concentración de trombina utilizada (10 nM).

La incapacidad inicial del HCII de inhibir trombina coincidiría con la estructura de la molécula de HCII, que presenta el sitio activo oculto, necesita un cambio conformacional para exponer el sitio activo y que el HCII pueda desarrollar su función (ver II.3.3.2.B. de introducción). El sitio activo del HCII presenta el aminoácido Leucina en la posición P1, atípico para los inhibidores de trombina, motivo por el cual el HCII manifiesta gran especificidad por trombina pero baja capacidad antitrombínica en ausencia de su potenciador.

Los resultados obtenidos coinciden con lo descrito por Derechin *et al*¹¹⁵, quien informa que, la constante de segundo orden de la inhibición de trombina por HCII en ausencia de DS es de $k_2 = 6,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

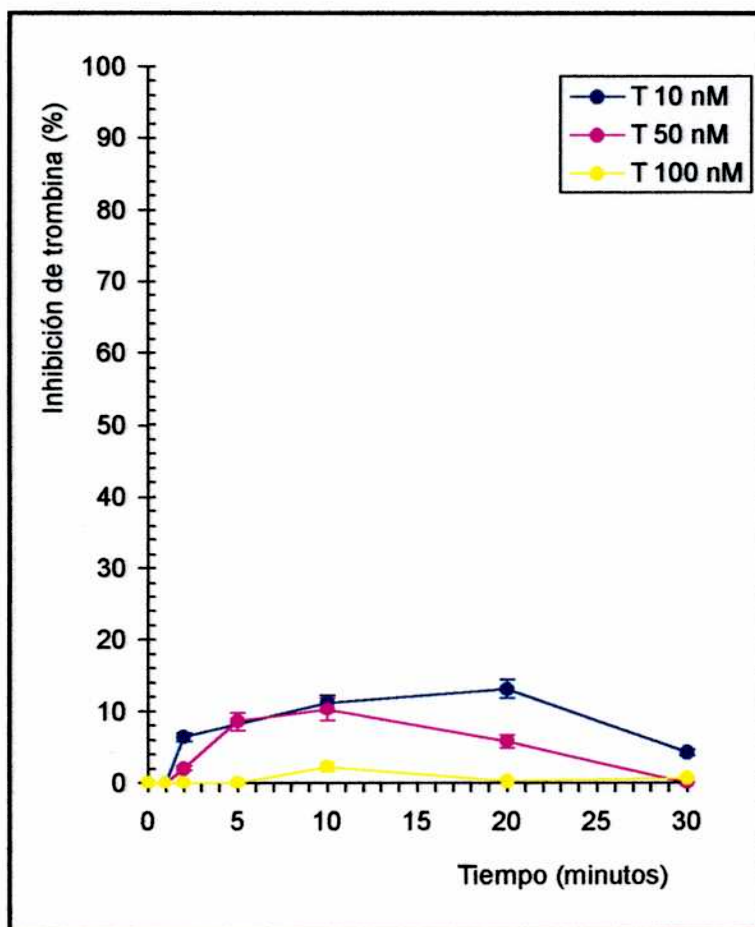


Figura N° 19. Inhibición de trombina por HCII en ausencia de Dermatán Sulfato.

II.5.2. ACCION DE LOS POTENCIADORES

Se investigó el efecto de los glicosaminoglicanos sobre la actividad antitrombínica del HCII. Los glicosaminoglicanos estudiados fueron :

Dermatán sulfato no fraccionado y de bajo peso molecular.

Heparina no fraccionada y de bajo peso molecular.

II.5.2.1. DERMATAN SULFATO NO FRACCIONADO

Con el objetivo de estudiar como varía la acción antitrombínica del HCII en presencia de distintos glicosaminoglicanos, se realizó primariamente el dosaje de la inhibición de trombina 10 nM por HCII (concentraciones fisiológicas) en presencia de un potenciador específico como el dermatán sulfato no fraccionado.

Como se observa en la Figura N° 20, la presencia del GAG (0,25 mg/ml concentración final), salva el período de latencia en la inhibición de trombina por HCII con una pendiente de 42 UA (Unidades arbitrarias: Δ DO/min.) en presencia de DS.

A los dos minutos, la inhibición de trombina potenciada por el DS alcanza valores cercanos al 50 %, mientras que en ausencia del mismo la inhibición es sólo del 7 %. A partir de los 10 minutos se obtiene el máximo de funcionalidad del HCII.

Debido a la desaparición del período de latencia por el DS, su presencia podría inducir el cambio conformacional en la molécula de HCII, ya que competiría con el extremo aminoterminal del HCII por el sitio de unión a los glicosaminoglicanos, produciendo el desplazamiento de dicho extremo y la apertura de la molécula de HCII exponiendo el sitio activo.

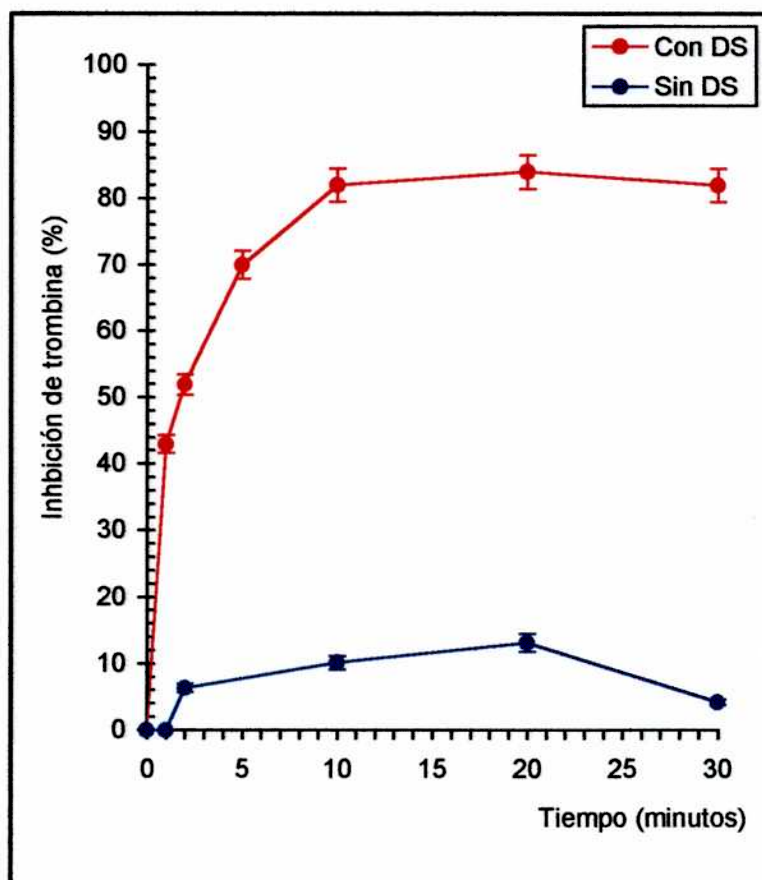


Figura N° 20. Actividad antitrombínica del HCII en presencia y ausencia de Dermatan Sulfato no fraccionado.

DERMATAN SULFATO DE BAJO PESO MOLECULAR

Se determinó la acción del dermatán sulfato de bajo peso molecular (LMWDS), una droga antitrombótica de mayor biodisponibilidad, en la inhibición de trombina por HCII.

Se observa en la Figura N° 21 que las velocidades iniciales con DS no fraccionado y con LMWDS son similares ($v_i = 0,11$ UA y $0,076$ UA con LMWDS). En ambos casos se alcanza la funcionalidad máxima de HCII a los 10 minutos, siendo esta un 30% menor con LMWDS.

Así el dermatán sulfato no fraccionado es ligeramente mas efectivo en inhibir trombina que el LMWDS.

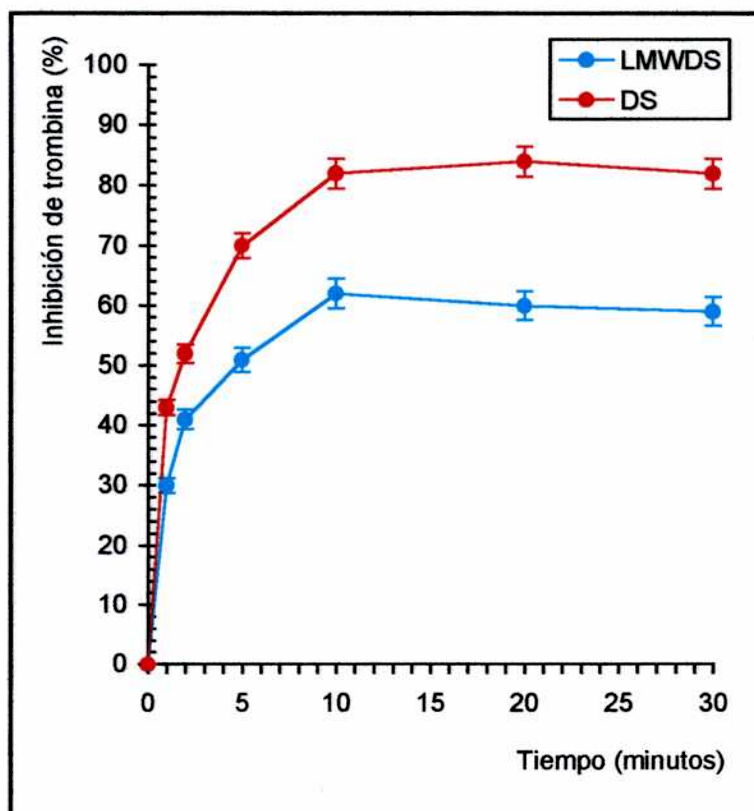


Figura N° 21. Actividad antitrombótica del HCII en presencia de dermatán sulfato no fraccionado (DS) y dermatán sulfato de bajo peso molecular (LMWDS)

II.5.2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE DERMATAN SULFATO NO FRACCIONADO

Se estudió la capacidad potenciadora del HCII de distintas concentraciones de dermatán sulfato en función del tiempo (Figura N° 22 A y B).

Se observa en la Figura N° 22 A que al aumentar la concentración del potenciador, se incrementa la actividad antitrombínica del HCII para el rango estudiado. Para todas las concentraciones de DS ensayadas, la presencia del mismo salva el período de latencia.

La capacidad potenciadora de la actividad antitrombínica mediada por el HCII depende de la concentración de DS en forma logarítmica como se ve en el inserto de la figura N° 22 B, al aumentar la concentración de DS aumenta la capacidad del HCII de inhibir trombina.

Los resultados muestran capacidad antitrombínica mayor que en ausencia del potenciador, aún a concentraciones de $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml salvando el período de latencia. La gráfica de v_i en función de la concentración de dermatán sulfato es una hipérbola que se satura a concentraciones mayores de $2,5 \cdot 10^{-2}$ (Figura N° 22 B)

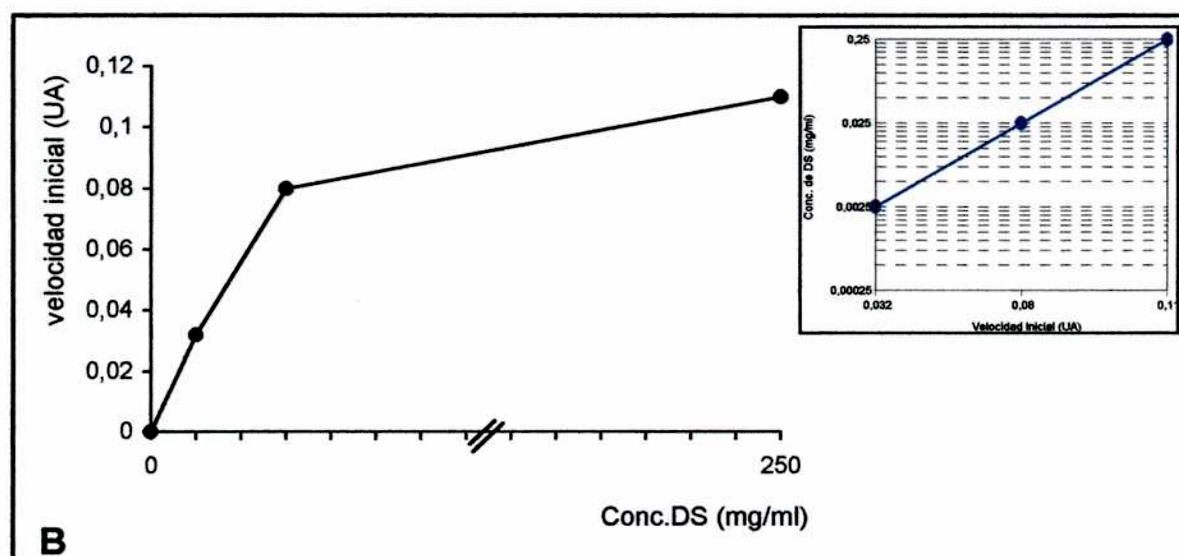
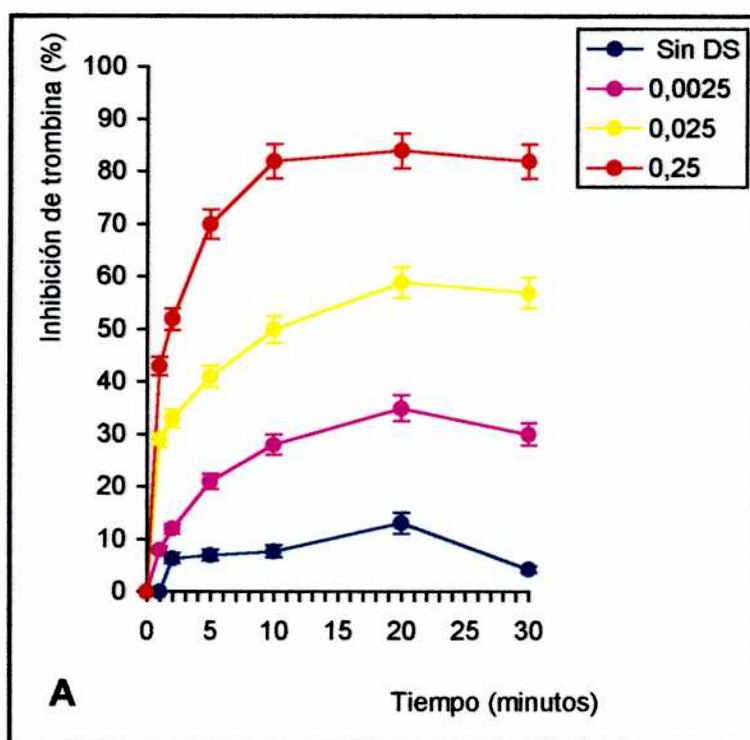


Figura N° 22 A y B. Efecto de la concentración de dermatán sulfato.

Inhibición de trombina 10 nM por HCII (0,02 PEU/ml) en presencia de 0,0; 0,25; 0,025 y 0,0025 mg/ml de dermatán sulfato no fraccionado.

II.5.2.3. HEPARINA NO FRACCIONADA Y DE BAJO PESO MOLECULAR

La heparina no fraccionada y de bajo peso molecular en concentraciones similares a las de dermatán sulfato utilizadas (0,25 mg/ml), no es un potenciador eficiente del HCII en el proceso de inhibición de trombina.

Nuestros resultados coinciden con lo descrito por Tollefsen quien demostró que la potenciación del HCII por heparina se produce a partir de concentraciones de heparina superiores a 20 U/ml, valores que superan la dosis terapéutica.

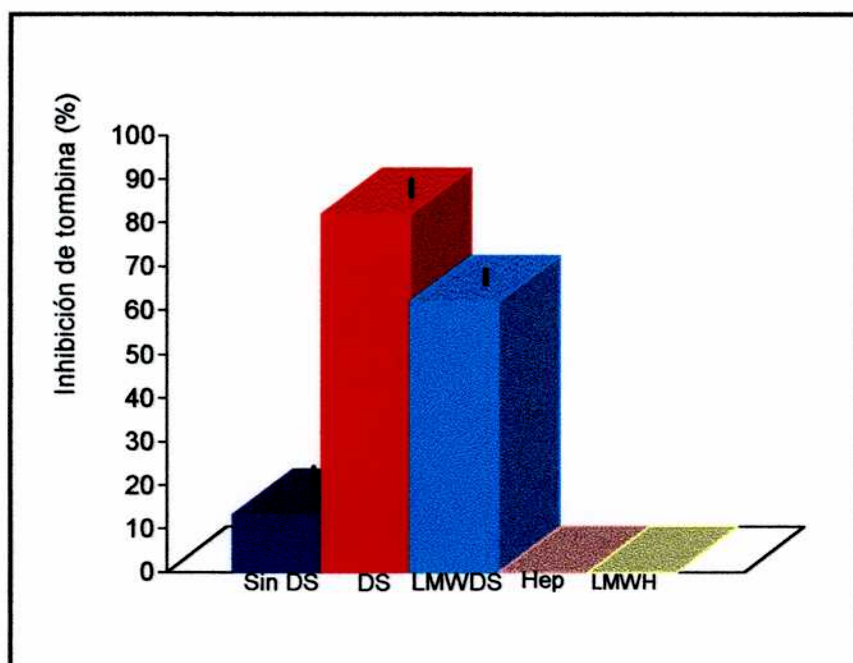


Figura N° 23. Acción de los potenciadores sobre la actividad antitrombínica del HCII.

En la Figura N° 23 se compara la acción de los potenciadores ensayados. Como se ha indicado la capacidad antitrombínica del HCII aumenta significativamente en presencia de DS no fraccionado. El DS de bajo peso molecular (LMWDS) potencia menos eficientemente al HCII, mientras que la heparina no fraccionada y de bajo peso molecular (LMWH) a las concentraciones ensayadas no favorecen la actividad de HCII.

IL5.3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TROMBINA

Se estudió la capacidad antitrombínica del HCII en niveles fisiológicos de inhibir concentraciones crecientes de trombina en presencia del potenciador, que simulan el proceso de generación de la enzima ante estímulos de distinta magnitud.

En la Figura N° 24 A se observa que la capacidad del HCII de inhibir trombina aumenta a medida que se disminuye la concentración de trombina.

El análisis de las velocidades iniciales revela que el HCII inhibe mas eficientemente trombina hasta concentraciones 30 nM, a partir de la cual la capacidad del HCII decae hasta ser casi nula con trombina 50 nM (Figura N° 24 B).

Si bien trombina 30 nM presenta la mayor velocidad de interacción, el máximo de actividad antitrombínica se alcanza a los 10 minutos con la menor concentración de trombina (10 nM) obteniéndose un 82% de inhibición (Figura N° 24 A). La actividad de menores concentraciones de trombina (5 nM) no puede ser detectada mediante la utilización del sustrato cromogénico.

Los resultados indicarían que el HCII inhibe eficientemente hasta concentraciones de trombina 30 nM, pero que una vez que se generan altas concentraciones de trombina, a pesar que el potenciador este presente, el HCII no desempeñaría un papel preponderante en la inhibición de trombina.

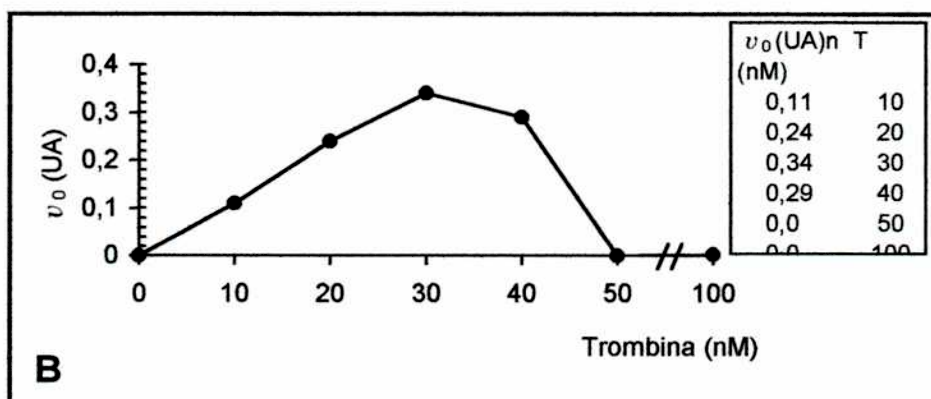
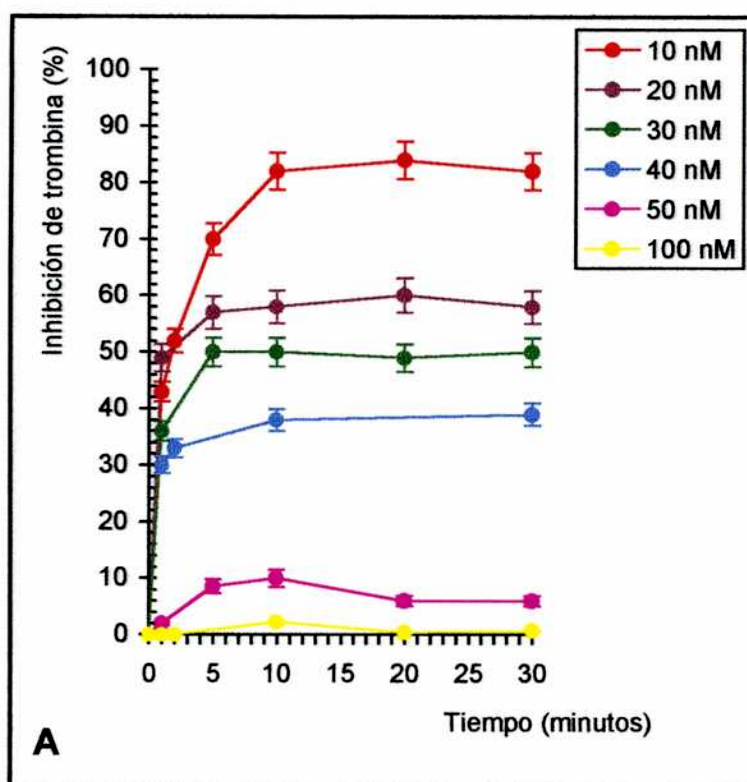


Figura N° 24 A y B. Efecto de la concentración de trombina en la actividad antitrombínica del HCII en presencia DS.

II.5.4. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL INHIBIDOR (HCII)

Con el objetivo de establecer como varía la capacidad antitrombínica del HCII en función de su concentración, se investigó la inhibición de trombina 10 nM por distintas concentraciones de HCII, que comprenden el rango de 25 a 200% del nivel plasmático fisiológico del HCII.

El estudio de la cinética obtenida (Figura N° 25 A) reveló que al aumentar la concentración de HCII aumenta su capacidad de inhibir trombina, que corresponde a la respuesta inmediata fisiológica del HCII.

Las velocidades iniciales son proporcionales a la concentración de HCII hasta 0,03 PEU/ml (150 %), no así al valor máximo ensayado (200%), sin embargo a los 10 minutos, la concentración fisiológica del HCII (1 PEU/ml, que por la metodología utilizada corresponde a una concentración final en el tubo de reacción de 0,02 PEU/ml) obtiene un 80% de inhibición de trombina.

Es decir al incrementar el nivel de HCII a 150 (0,03 PEU/ml) y 200% (0,04 PEU/ml) aumenta la capacidad de inhibir trombina en el primer minuto, no así la funcionalidad máxima a los 10 minutos.

Una disminución de la concentración de HCII de hasta un 50% modifica ligeramente la capacidad del HCII de inhibir trombina de 10 nM (65 %), cuando el descenso en HCII es marcado (del 25% 0,005 PEU/ml) se reduce ampliamente la capacidad de la serpina de inhibir trombina 10 nM *in vitro* (20 %).

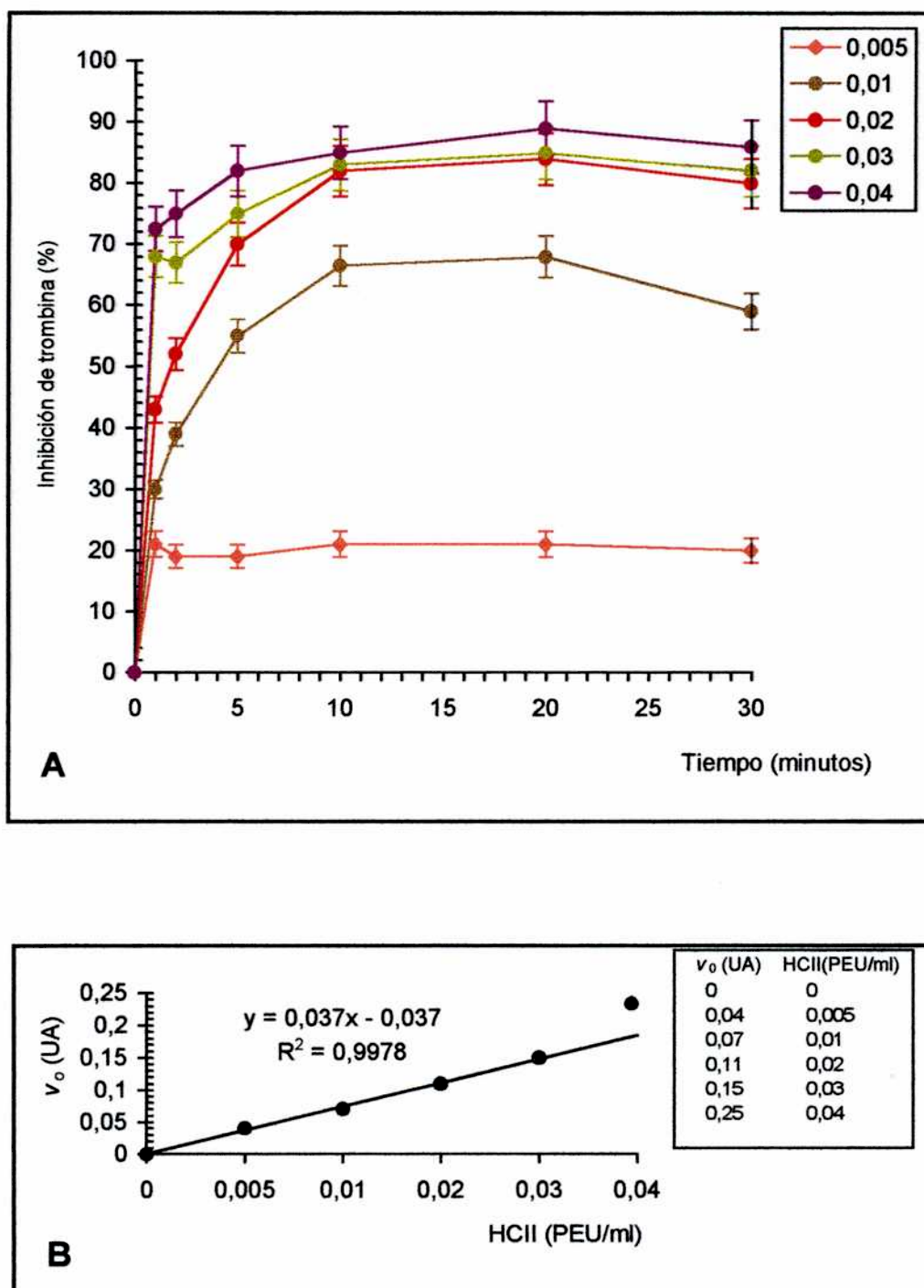


Figura N° 25 A y B. Efecto de la concentración del HCII sobre su actividad inhibitoria de trombina en presencia de DS.

IL5.5. INHIBICION DE TROMBINA BOVINA POR HCII HUMANO

En muchos de los ensayos desarrollados para el diagnóstico en el laboratorio clínico, utilizan reactivos de origen animal, debido a su mayor accesibilidad y bioseguridad. En la metodología clásica descrita para el dosaje de Antitrombina III, el fundamento es similar al del dosaje de HCII con trombina bovina como fuente de serinoproteasa. El HCII presenta especificidad de especie, por lo tanto cabe esperar que inhiba más eficientemente trombina humana que trombina de otro origen.

El estudio de la capacidad del HCII de inhibir trombina de origen bovino y humano reveló que el HCII es mas efectivo sobre la trombina humana, alcanzando la funcionalidad máxima un 82% de inhibición de trombina humana y un 17% de bovina. (Figura N° 26. A.). El HCII humano inhibió 5 veces más trombina humana que bovina.

Al estudiar la actividad antitrombínica de la ATIII, serpina que comparte gran homología estructural y funcional con el HCII, se observó que presenta una capacidad similar de inhibir trombina humana y bovina (Figura N° 26.B.).

De esta manera comprobamos que el HCII presenta especificidad de especie ya que interactúa mejor con trombina humana, debido quizás a que la molécula de HCII se abre y el extremo amino terminal, que presenta una secuencia similar a hirudina, se une específicamente a trombina. En el modelo de templado propuesto para la ATIII, no se produce unión específica entre la serpina y trombina, por lo tanto, la ATIII inhibe con similar eficiencia trombina humana y bovina.

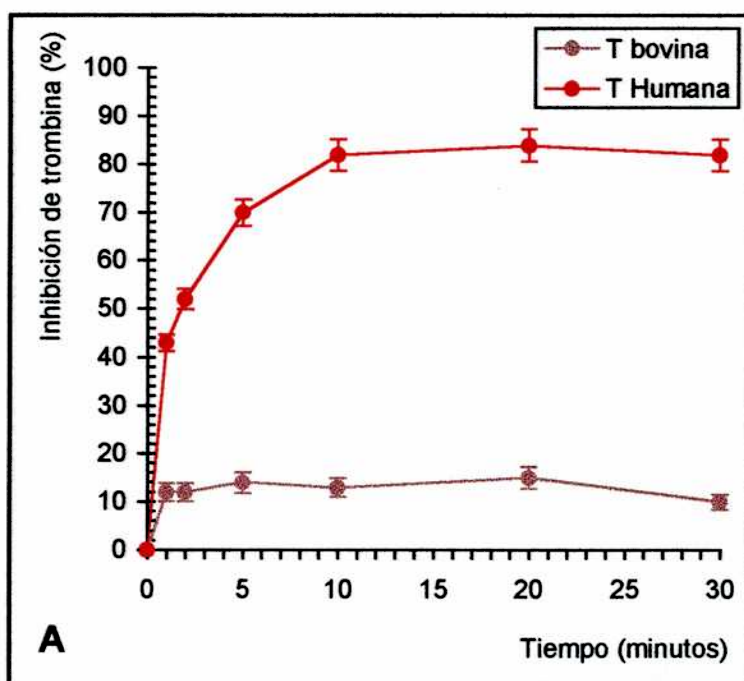


Figura N° 26.A. Inhibición de trombina humana y trombina bovina por HCII humano en presencia de dermatán sulfato.

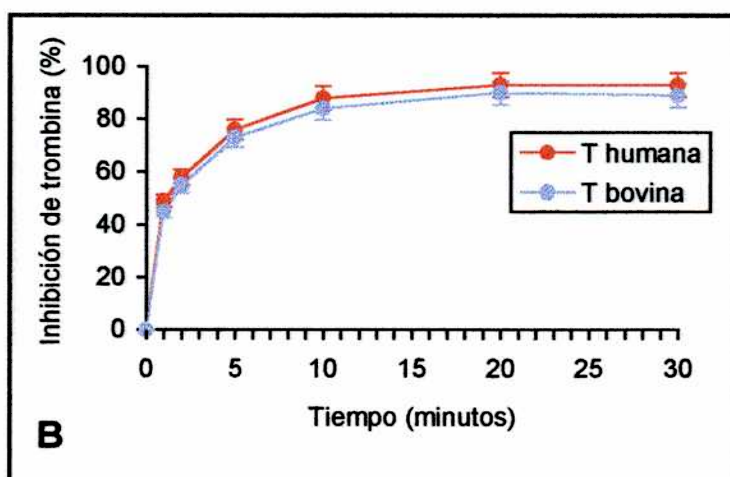


Figura N° 26.B. Inhibición de trombina humana y bovina por ATIII humana en presencia de heparina no fraccionada.

II.5.6. EFECTO DE LA FUERZA IONICA

Con el objetivo de estudiar la influencia de la fuerza iónica sobre la interacción trombina - DS - HCII se ensayó la inhibición de trombina 10 nM en presencia de KCl (0,25 ; 0,5 y 1M). A todas estas concentraciones la capacidad antitrombínica del HCII fue nula (Figura N° 27).

El proceso de inhibición de trombina por el HCII potenciado por el DS no se realiza cuando el medio de reacción presenta alta fuerza iónica, manteniéndose la actividad de trombina sobre el sustrato cromogénico.

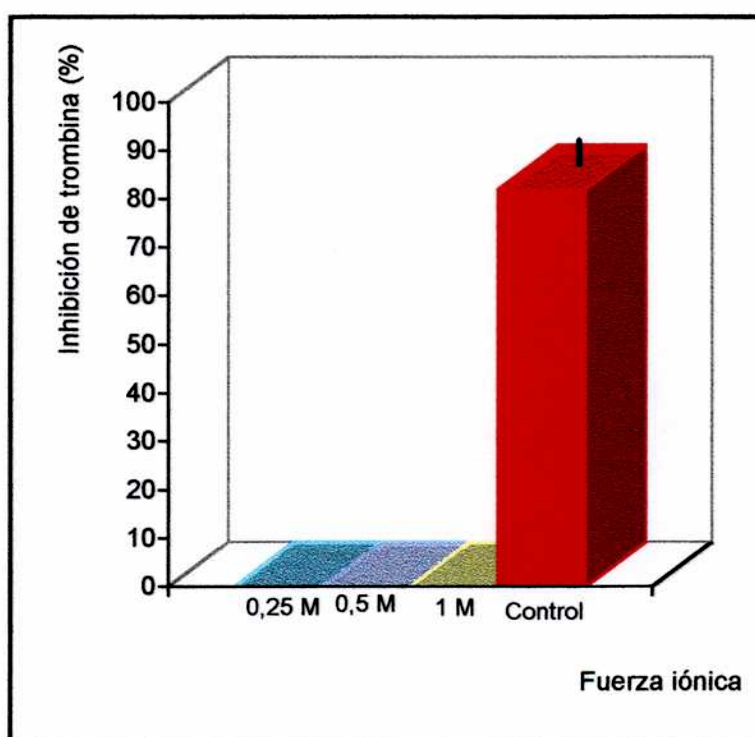


Figura N° 27. Efecto de la fuerza iónica sobre la interacción HCII- trombina - dermatán sulfato .

Es evidente que el aumento de la fuerza iónica interfiere en la interacción de estas moléculas para formar el complejo fisiológico activo.

II.5.7. DISCUSION DE LA SECCION II.5.

El estudio *in vitro* de la interacción HCII - trombina utilizando concentraciones fisiológicas del inhibidor, reveló que : A) la capacidad antitrombínica del HCII en ausencia de los glicosaminoglicanos es muy reducida (Fig. N° 19); B) la presencia de dermatán sulfato favorece notablemente la reacción, en forma dependiente de la concentración del potenciador (Fig. N° 20). El DS no fraccionado demostró ser ligeramente mas efectivo que el DS de bajo peso molecular (Fig. N° 21), mientras que la heparina en las concentraciones ensayadas no potenció al HCII (Fig. N° 23). Esta interacción estaría mediada por uniones de tipo iónicas, ya que al aumentar la fuerza iónica del medio, no se produce la interacción. (Fig. N° 27).

El HCII en las concentraciones fisiológicas estudiadas, inhibió más eficazmente pequeñas que grandes cantidades de trombina (Fig. N° 24). **Esto sugeriría que este inhibidor desarrollaría principalmente su función en las etapas iniciales de activación, cuando la serinoproteasa esta en formación, lo cual se complementaría con la capacidad de HCII de inhibir meizotrombina descrita por Han en 1997 ¹¹.**

Si bien al aumentar la concentración de HCII aumenta su actividad antitrombínica, concentraciones superiores al 100 % inducen un incremento leve en la actividad máxima del inhibidor. Cuando la concentración de HCII disminuye, también lo hace su actividad antitrombínica, con un descenso muy marcado en concentraciones inferiores al 50 % (Fig. N° 25).

II.6. COMPONENTES PLASMATICOS QUE MODULAN LA INHIBICION DE TROMBINA POR HCII

Dado que en las experiencias realizadas en la caracterización del HCII plasmático (*Item II de materiales y métodos*) observamos que el HCII se encuentra unido fibrinógeno, investigamos la posible modulación de la actividad del HCII por diferentes proteínas plasmáticas.

II.6.1. ACCION DEL FIBRINOGENO

El fibrinógeno es la proteína perteneciente al sistema de coagulación que se encuentra **en mayor** concentración en el plasma (1,5 a 4,5 mg/ml).

Con el objeto de determinar si el fibrinógeno ejerce algún efecto en interacción HCII-DS-trombina se incubó durante 3 minutos fibrinógeno en concentraciones fisiológicas, con HCII (0,02 PEU/ml) y DS (0,25 mg/ml), agregando posteriormente trombina 10 nM (Métodos: ensayo A).

Se observó que la actividad máxima alcanzada a los 10 minutos de incubación es un 15 % menor cuando el fibrinógeno esta presente que en su ausencia.

Como consecuencia de esta observación se diseñaron los ensayos B y C para intentar determinar a que nivel se producía la interacción del fibrinógeno.

La figura N° 28 muestra que si bien las velocidades iniciales de los ensayos son similares, el porcentaje de inhibición que puede alcanzar difiere. Cuando se preincuba DS con fibrinógeno (ensayo C) se obtiene una actividad similar a la del control, que estaría indicando que no ocurre interacción entre el DS y el fibrinógeno.

El ensayo B demuestra ya desde el primer minuto, una actividad antitrombínica disminuida en un 45% del control, sin capacidad residual, lo que reflejaría la potencial interacción entre el HCII y el fibrinógeno.

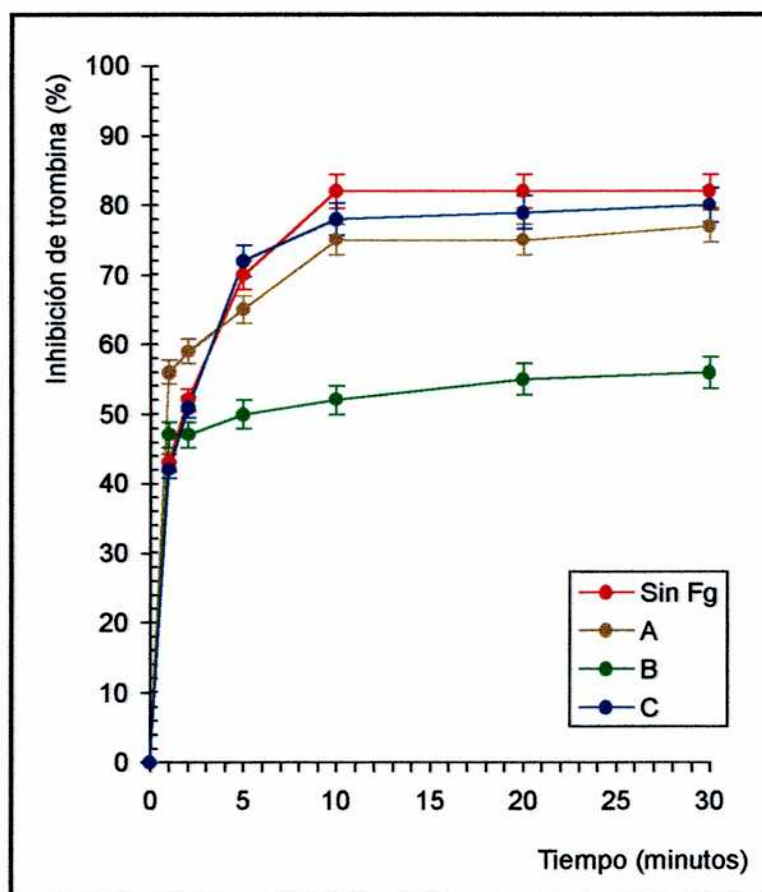


Figura N° 28. Interacción HCII - DS - fibrinógeno - trombina

Ensayo A: Incubación 3 min. HCII - Fg - DS

Ensayo B: Incubación 3 min. HCII - Fg

Ensayo C: Incubación 3 min. DS - Fg

Control : Sin fibrinógeno

Estos resultados sugieren que el fibrinógeno ejercería un efecto modulador en la interacción HCII - DS - trombina. El hecho de presentar al minuto velocidades similares, estaría indicando que la eficiencia de la enzima inicialmente es la misma, y por ende el fibrinógeno no afectaría el sitio activo del HCII. Además en presencia del fibrinógeno se reduce la actividad máxima (Ensayo B), lo cual sugiere que este factor disminuiría el número de moléculas de HCII disponibles para la interacción HCII - trombina.

Se observó que cuando se preincuba DS - fibrinógeno la modulación ejercida por el fibrinógeno es menor, lo cual sugiere que el Dermatán Sulfato impediría la interacción del fibrinógeno sobre el HCII, posiblemente la afinidad del DS por el HCII sea mayor que la del fibrinógeno, pero una vez producida la interacción HCII - fibrinógeno, el agregado posterior de DS no desplazaría al fibrinógeno de su unión al HCII.

II.6.1.1. Efecto de la concentración de fibrinógeno

El efecto de la concentración de fibrinógeno sobre la capacidad antitrombínica del HCII se determinó repitiendo el ensayo B. Para ello se utilizaron dos concentraciones, la plasmática fisiológica (3 mg/ml correspondiente a 0,06 mg/ml en el tubo de reacción), y una de mayor concentración 9 mg/ml (0,18 mg/ml).

Se observó que al aumentar la concentración de fibrinógeno al triple, se evidencia aún mas el efecto modulador del fibrinógeno, disminuyendo la funcionalidad máxima del HCII al 37 %. Como consecuencia del aumento de la concentración, habría mayor número de moléculas de fibrinógeno que interactuarían con el HCII.

Al ser el fibrinógeno una proteína reactante de fase aguda, aumenta su concentración plasmática en procesos como infección, inflamación, cirugía, sepsis, cáncer y aterosclerosis, indicando que en estos estados fisiopatológicos

habría una mayor interacción entre fibrinógeno y HCII y menor disponibilidad de este último para inhibir trombina.

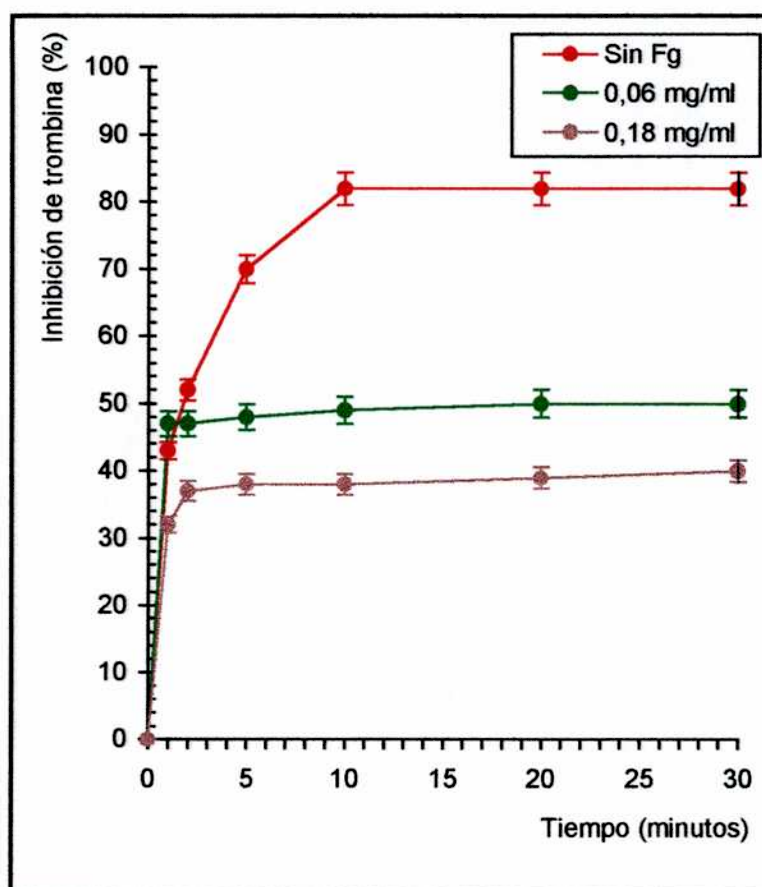


Figura N° 29. Acción de la concentración de fibrinógeno (0,06 y 0,18 mg/ml) en la interacción HCII - trombina - DS.

II.6.1.2. Efecto del tiempo de incubación del fibrinógeno

Al prolongar el tiempo de preincubación del fibrinógeno con el HCII (ensayo B), observamos que la capacidad del HCII de inhibir trombina disminuye aproximadamente un 34 %. (Figura N° 30). Un período mayor de preincubación *in vitro* HCII - fibrinógeno favorecería entonces la interacción entre ambas moléculas.

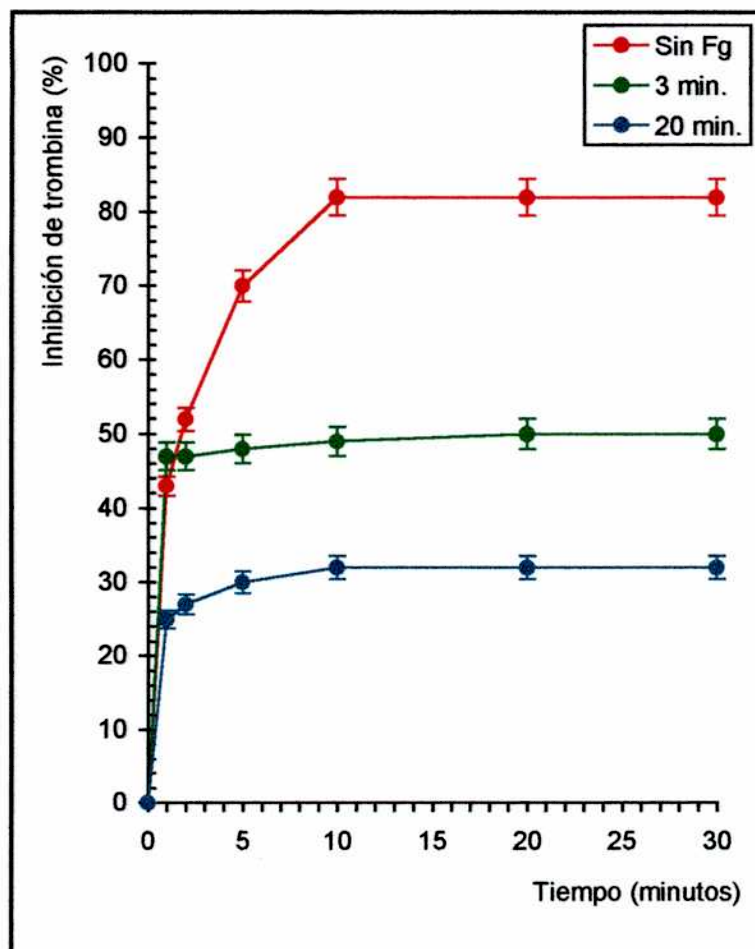


Figura N° 30. Efecto del tiempo de incubación del fibrinógeno en la interacción HCII - DS - Trombina

II.6.1.3. Incubación HCII - fibrinógeno caracterización por SDS-PAGE/Western - blot

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización del HCII plasmático donde se observó que fisiológicamente un porcentaje del HCII plasmático se encuentra unido al fibrinógeno (Figuras N° 9 y 13), y de los obtenidos en los estudios de la interacción HCII-trombina *in vitro* que revelaron que el fibrinógeno ejercería un efecto modulador de la actividad antitrombínica del HCII, se diseñó la siguiente experiencia.

Se incubó a 37° C *in vitro* del HCII humano con fibrinógeno humano en concentraciones plasmáticas. Se tomaron alícuotas en tiempos definidos realizándose un SDS-PAGE seguido de Western - Blot revelado con anticuerpo anti HCII de los productos de incubación.

Se puede observar en la figura N° 31 que a medida que aumenta el tiempo de incubación HCII - fibrinógeno (calles 2 - 6) se intensifica la banda de alto peso molecular que revela con anti HCII, indicando que se produciría *in vitro* la unión del HCII con el fibrinógeno y que correspondería a la movilidad electroforética del fibrinógeno. De esta manera comprobaríamos la unión del HCII al fibrinógeno, lo cual concuerda con el efecto modulador que ejercería el fibrinógeno en la actividad antitrombínica del HCII y que ese efecto se intensifica al aumentar el tiempo de incubación. Como se puede observar no se produciría la unión del 100% de las moléculas de HCII, sino de un pequeño porcentaje de las mismas, lo cual podríamos asociar con el hecho que las velocidades de formación de los complejos trombina - HCII con y sin fibrinógeno son similares, pero no la funcionalidad máxima del inhibidor. Esto sugeriría que al estar el fibrinógeno presente, un porcentaje de las moléculas de HCII pierden su capacidad antitrombínica. En los estudios *in vitro* al aumentar la concentración del fibrinógeno disminuye la actividad antitrombínica del HCII, indicando que al haber mayor número de moléculas de fibrinógeno se unirían mas cantidad de moléculas de HCII disminuyendo la capacidad antitrombínica del mismo.

Al ensayar este abordaje con fibrinógeno que no tiene su estructura terciaria intacta, no se observa la unión del HCII al mismo. Por lo tanto que para que se produzca la unión es necesario que el fibrinógeno posea la estructura de tres pares de cadenas. Este hecho coincide con la observación que las bandas de alto peso molecular que revelan con anti HCII son tres, como se observó en la figura N° 9.

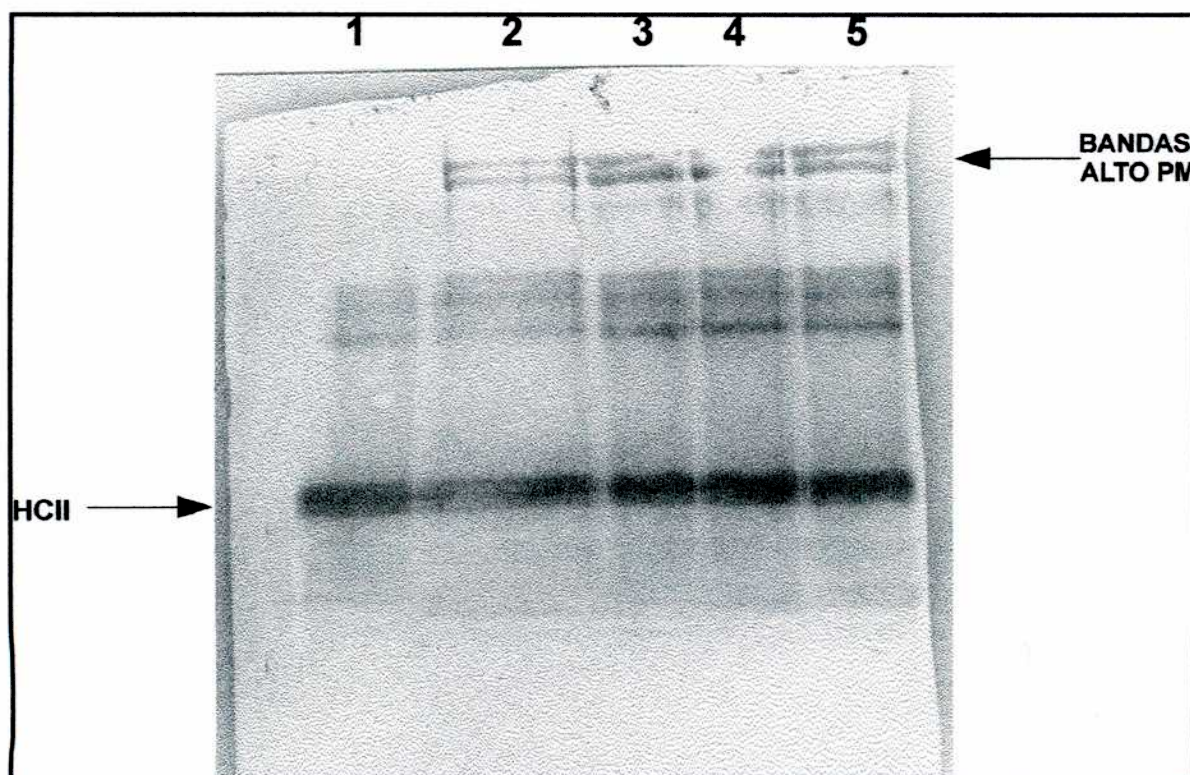


Figura N° 31. Incubación *in vitro* HCII-fibrinógeno. Caracterización por SDS-PAGE/ Western Blot

Calle 1: HCII ; Calle 2 :Incubación 3 min. HCII-fibrinógeno ; calle 3 : Incubación 6 min. HCII-fibrinógeno ; calle 4 : Incubación 20 min. ; calle 5 : Incubación 60 min.

II.6.2. ACCION DE LA ALBUMINA

La albúmina es la proteína mayoritaria del plasma y presenta propiedades de transporte, a partir de lo cual surgió la necesidad de investigar si la presencia de albúmina modifica la interacción HCII - trombina.

La presencia de albúmina en concentraciones fisiológicas en el medio de reacción disminuye la capacidad antitrombínica del HCII en aproximadamente un 35 % (con 0,08 mg/ml de albúmina). Diferentemente a los resultados con el fibrinógeno, esta disminución de la inhibición no se favorece por la prolongación de la preincubación durante 20 minutos, por el contrario, su efecto es menor (Figura N° 32).

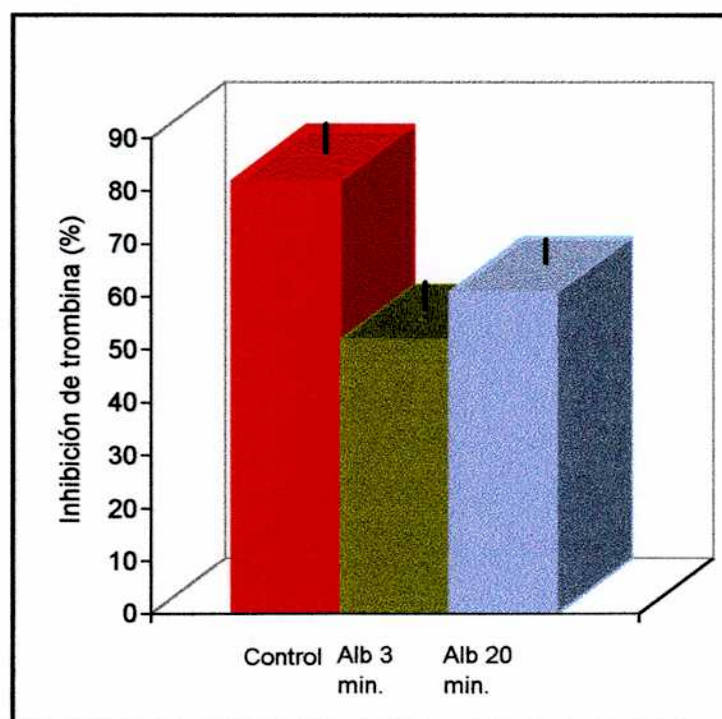


Figura N° 32. Efecto de la albúmina (0,08 mg/ml) en la interacción HCII - trombina - DS, preincubando HCII - albúmina 3 y 20 minutos.

II.6.3. ACCION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Se estudió la acción de las inmunoglobulinas en concentraciones fisiológicas y elevadas (0,5 mg/ml concentración final) de manera de observar si en un proceso infeccioso, el aumento de inmunoglobulinas modificaría la interacción trombina - HCII.

Se observa que la presencia de inmunoglobulinas en una concentración de 0,25 y 0,5 g/l no modifica la inhibición de trombina por HCII en presencia de DS, por ende supondría no interacción.

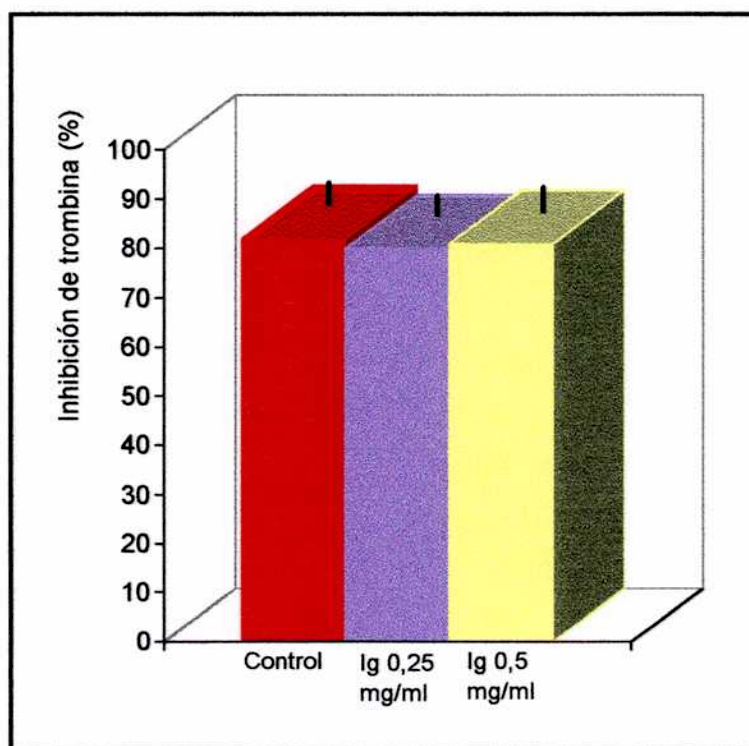


Figura N° 33. Acción de las inmunoglobulinas (0,25 y 0,5 mg/ml) en la interacción HCII - trombina - DS

II.6.4. ACCION DE LA HOMOCISTEINA

Se ensayó la inhibición de trombina por HCII en presencia de dermatán sulfato (0,25 mg/ml) y homocisteína (análogo de aminoácido) en concentraciones que se encuentran en pacientes con elevados niveles de homocistinemia (0,8 μ M en el tubo de reacción).

La presencia de homocisteína en el tubo de reacción disminuye la capacidad del HCII de inhibir trombina en aproximadamente un 22 % (82% es la inhibición de trombina por HCII en ausencia de homocisteína, mientras que la inhibición es del 69 % cuando la homocisteína esta presente).

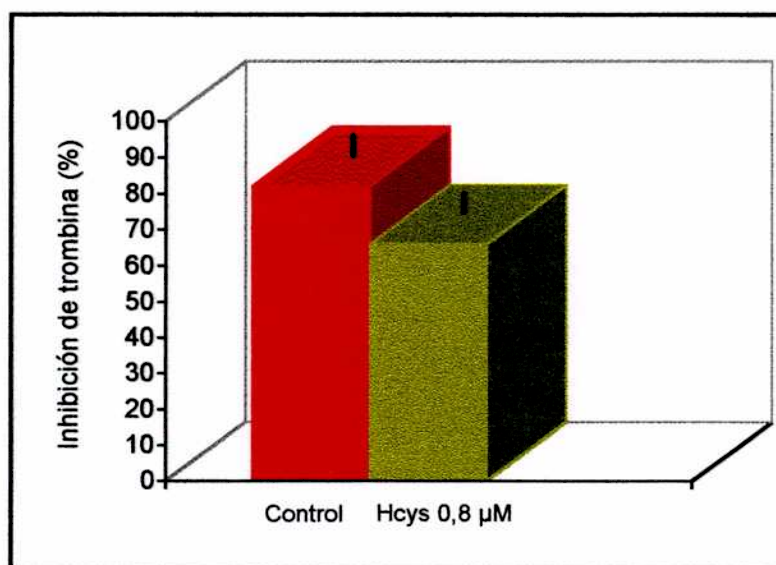


Figura N°.34. Acción de la homocisteína 0,8 μ M en la interacción HCl I - trombina - DS.

Como es dable de observar, el análisis comparativo de los diferentes componentes ensayados que podrían modificar la capacidad antitrombínica del HCII se presentan en la Figura N° 35.

Mientras que el mayor efecto es el producido por el fibrinógeno, la albúmina y la homocisteína ejercen una ligera inhibición en la capacidad del HCII de inhibir trombina.

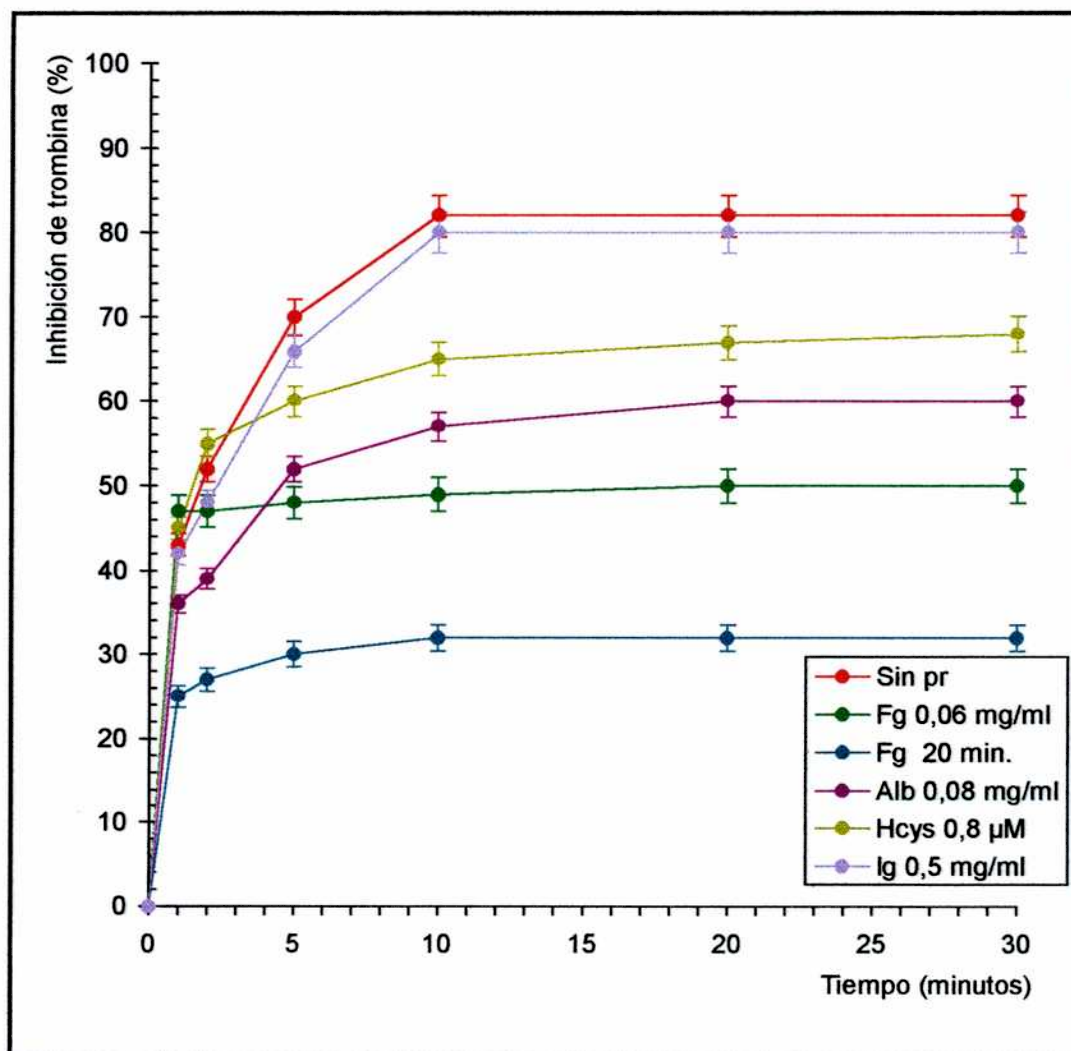


Figura N° 35. Acción de distintas proteínas sobre la capacidad inhibitoria de trombina del HCII en presencia de dermatán sulfato.

IL6.5. DISCUSION DE LOS COMPONENTES PLASMATICOS QUE MODULAN AL INHIBICION DE TROMBINA POR HCII

El análisis de los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* sobre la interacción HCII - trombina - DS utilizando concentraciones fisiológicas del inhibidor, revelaron que otras proteínas plasmáticas ejercerían un efecto modulador en esta interacción en diferentes grados.

El fibrinógeno manifestó la mayor capacidad moduladora, al preincubar fibrinógeno con HCII la capacidad antitrombínica del HCII se reduce significativamente. Esto sugiere la existencia de una interacción molecular entre el HCII y el fibrinógeno, lo cual concuerda con los resultados de la caracterización del HCII plasmático, en donde se observó que un porcentaje del HCII fisiológicamente se encuentra unido al fibrinógeno plasmático.

Los estudios cinéticos revelaron que esta unión fibrinógeno - HCII modificaría la actividad de la serpina manifestada por su capacidad de inhibir trombina en presencia de dermatán sulfato.

La modulación ejercida por el fibrinógeno es tiempo y concentración dependiente, indicando que al estar presente mayor número de moléculas de fibrinógeno, habría una mayor interacción que se favorecería por la prolongación del tiempo de incubación.

II.7. CONSUMO DEL HCII PLASMATICO *IN VITRO* EN PRESENCIA DE GLICOSAMINOGLICANOS

Se estudió el consumo de HCII durante el proceso de coagulación *in vitro*, para inferir si el HCII desempeña un papel preponderante en la inhibición de trombina *in vitro*.

El consumo del HCII se determinó en 11 individuos dejando coagular sangre a 37°C durante 2 hs. Luego se midió la actividad de HCII en el plasma y en el suero calculando posteriormente el consumo según lo descrito en materiales (sección III.3.). Una vez finalizada las 2 horas del proceso de coagulación, la actividad de HCII en el suero fue entre un 20 y un 40% menor que la del plasma correspondiente. Los valores obtenidos (media $\pm$ desvío estándar) fueron de $101,9 \pm 5,4$ % de actividad de HCII en plasma, $71,7 \pm 8,9$ en suero, correspondiendo a un consumo de $29,7 \pm 7,5$ %.

Tabla N° 8. Consumo de HCII en presencia y ausencia de glicosaminoglicanos

	Consumo HCII (%)	p
NaCl 0,9%	$14,5 \pm 1,9$	
DS 10 $\mu\text{g/ml}$	$22,45 \pm 3,3$	< 0,0001
DS 100 $\mu\text{g/ml}$	$43,5 \pm 4,4$	< 0,0001
DX 10 $\mu\text{g/ml}$	$41,6 \pm 2,9$	< 0,0001
DX 100 $\mu\text{g/ml}$	$71,53 \pm 7,6$	< 0,0001
Heparina 1 $\mu\text{g/ml}$	$14,65 \pm 1,4$	0,84
Heparina 10 $\mu\text{g/ml}$	$14,4 \pm 1,3$	0,77

Los resultados se expresan como mediana y rango $n=10$

Cuando el proceso de coagulación es potenciado por la presencia de DS (tabla N° II.3.2.) a una concentración final de 10 µg/ml, el consumo de HCII es significativamente mayor ($p < 0,0001$). El dextrán sulfato es diez veces mas efectivo en potenciar al HCII que el DS, como vimos el dextrán sulfato es un polímero sintético que presenta mayor grado de sulfatación que el DS, indicando que los grupos sulfatos desempeñan un papel preponderante en la interacción glicosaminoglicano - serpina, siendo menos importante la presencia de grupos carboxilos. Figura N° 36.

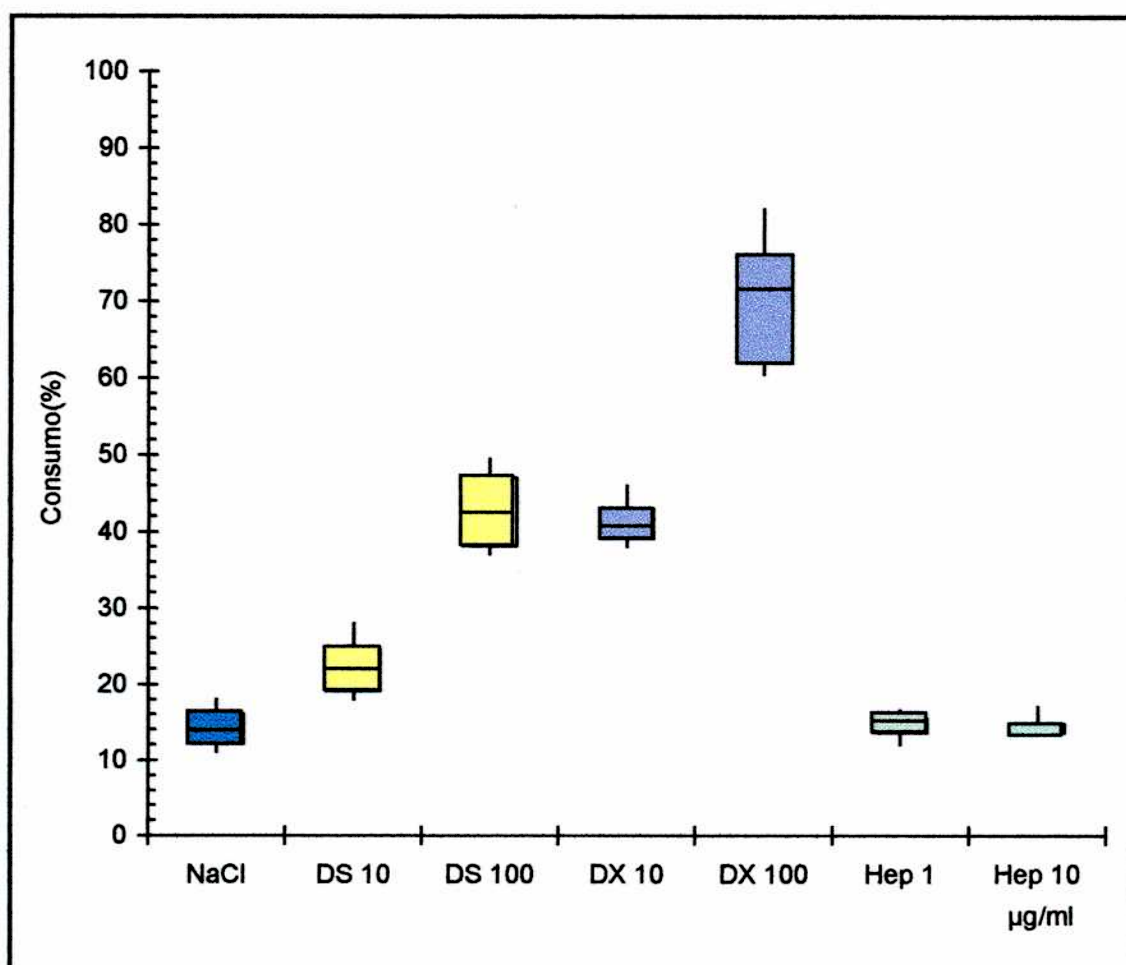


Figura N° 36. Consumo de HCII en presencia y ausencia de distintos glicosaminoglicanos expresado en %, las concentraciones finales de los glicosaminoglicanos en µg/ml

Ninguna de las concentraciones de heparina utilizadas (1 y 10 $\mu\text{g/ml}$) presentan diferencias significativas respecto al consumo de HCII ($p= 0,84$ y $p= 0,77$ respectivamente), lo cual coincide con lo descrito por Tollefsen quien relata que sólo concentraciones de heparina mayores a 20 U/ml potencian al HCII.

La principal característica de las serpinas es la potenciación de su actividad por los glicosaminoglicanos. Los GAGs favorecen la actividad antitrombínica promoviendo la formación del complejo serpina-trombina mediante la formación del templado, o por cambios conformacionales en el sitio activo del inhibidor. La unión del glicosaminoglicano al inhibidor se produce mediante interacciones iónicas, entre los GAGs cargados negativamente y los aminoácidos del inhibidor cargados positivamente. Debido a esto, la presencia de grupos sulfatos en el glicosaminoglicano desempeñan un papel predominante en el proceso de inhibición.

Si bien el DX es el GAG que manifiesta mayor capacidad de potenciar al HCII, es un polímero sintético, que no se encuentra fisiológicamente, mientras que el Dermátan Sulfato que es producido por los fibroblastos subendoteliales, se presenta unido a núcleos proteicos componiendo los proteoglicanos decorín y biglicano, los que se encuentran en la matriz extracelular diversos tejidos serían el potenciador fisiológico del HCII.

Los GAGS endoteliales intervendrían en la función de los inhibidores de la coagulación, probablemente el heparán sulfato es el principal catalizador intravascular de la interacción trombina - ATIII, además de actuar como receptor del TFPI. El Dermátan Sulfato sería el GAG fisiológico que específicamente catalizaría la reacción trombina-HCII.

II.8. ACCION DEL DERMATAN SULFATO PURIFICADO SOBRE PRUEBAS DEL SISTEMA HEMOSTATICO

Dado que la presencia de heparina en el plasma de los pacientes modifica las pruebas globales del sistema de coagulación, se investigó si la presencia de Dermatán Sulfato en el plasma modificaría los valores de estas determinaciones.

II.8.1. ACCION DEL DERMATAN SULFATO SOBRE LAS PRUEBAS GLOBALES DEL SISTEMA DE COAGULACION

Se estudió la influencia del dermatán sulfato no fraccionado (DSnf) y de bajo peso molecular (LMWDS) sobre las pruebas globales del sistema de coagulación.

El Tiempo de protrombina no se modificó por el agregado de dermatán sulfato no fraccionado (DSnf) o LMWDS al plasma, en ninguna de las concentraciones estudiadas. En forma similar a la heparina en el plasma de los pacientes, en donde sólo altas concentraciones prolongan en 2 ó 3 segundos el tiempo de protrombina.

Tabla Nº 9. Efecto del DS no fraccionado y LMWDS en el APTT

	0,0013	0,0025	0,025	0,25
DSnf	0 (0-5,5)	0,25 (0-10)	7,75 (2-24,5)	39,5 (11,5-63,5)
LMWDS	0 (0-2)	0 (0-7,5)	5 (2-11,5)	32 (14,5-39)

La tabla expresa diferencia en seg.(mediana y rango) entre el KPTT basal y el del plasma con DS, concentraciones finales en mg/ml.

Altas concentraciones de DS no fraccionado (0,025 y 0,25 mg/ml) modifican el APTT, presentando gran variabilidad entre los individuos. Similares concentraciones de heparina (2,5 y 25 UI/ml) en plasma inducen importantes a

prolongaciones del APTT, llevando esta determinación a valores en donde la prueba carece de sensibilidad.

La acción del dermatán sulfato de bajo peso molecular es mas moderada que el Dermatán Sulfato no fraccionado, pero se observa un efecto del LMWDS sobre el APTT. La heparina de bajo peso molecular pierde la capacidad de formar la plantilla o molde, de manera que la actividad antitrombínica de la ATIII disminuye significativamente, manteniendo su potenciación sobre la inhibición del factor Xa, no produciendo importante prolongación del APTT. El DS sólo potencia al HCII en su actividad inhibitoria de trombina, y el DS de bajo peso molecular conserva esta actividad, lo cual se observa en la prolongación del APTT por acción del LMWDS, que es ligeramente menor que la del DS no fraccionado.

La acción del DS sobre el tiempo de trombina manifestó que esta prueba es sensible a la presencia de altas concentraciones de dermatán sulfato (0,025 y 0,25 mg/ml).

Tabla N° 10. Efecto del dermatán sulfato sobre el Tiempo de Trombina

	0,0013	0,0025	0,025	0,25
Dsnf	0,75 (0-2)	1,5 (1-4)	7,5 (1,5-39)	> 60 (> 60)
LMWDS	0 (0-0,5)	1 (0-2)	9 (2-17)	> 60 (> 60)

La tabla expresa diferencia en seg. (mediana y rango) entre el tiempo de trombina basal y el del plasma con DS, concentraciones finales en mg/ml

Concentraciones similares de heparina no fraccionada prolongan esta prueba fuera de los rangos de sensibilidad de la misma, mientras que LMWH induce una ligera modificación del tiempo de trombina.

II.8.2. AGREGACION PLAQUETARIA INDUCIDA POR TROMBINA HUMANA EN PRESENCIA DE DS

Se estudió el proceso de agregación plaquetaria inducida por trombina humana en presencia de dermatán sulfato purificado.

La agregación plaquetaria inducida por trombina humana en presencia de 0,0013 y de 0,0025 mg/ml de DS no fraccionado presentó una curva de agregación disminuida, mientras que con DS de bajo peso molecular la curva de agregación fue similar a la normal. Concentraciones de DS de 0,025 y 0,25 mg/ml inhibieron completamente la agregación plaquetaria inducida por trombina.

Tabla N° 11. Agregación plaquetaria inducida por trombina humana en presencia de dermatán sulfato

Conc. (mg/ml)†	DS	LMWDS
0,0013	disminuida	normal
0,0025	disminuida	normal
0,025	ausente	ausente
0,25	ausente	ausente

† Corresponde a concentraciones finales de DS en el tubo de reacción.

Altas concentraciones de DS no fraccionado (DSnf) y LMWDS en el plasma inhiben la agregación plaquetaria inducida por trombina humana. La presencia de grandes cantidades de DS potenciaría la inhibición de trombina por el HCII presente en el plasma, la trombina presente sería complejada por el HCII no pudiendo activar los receptores específicos en las plaquetas, mientras que

cuando la concentración del potenciador es menor, un porcentaje de trombina quedaría sin inhibir y activaría los receptores plaquetarios de trombina.

II.8.3. ACCION DEL DERMATAN SULFATO EN EL APTT DE PLASMAS DEFICITARIO DE FACTORES

Se investigó la acción del Dermatán Sulfato no fraccionado y de bajo peso molecular en las prueba de APTT de plasmas deficitario de factores II, V, VIII, X, IX, VII, XI y XII (desde 0 hasta 100% del factor) en forma individual y se comparó con la acción de heparina.

La tabla N° 12 muestra los valores de KPTT en plasmas deficitarios en factores. Si bien todos los plasmas deficitarios de factores presentaron una prolongación significativa del KPTT, la mayor prolongación se observó en el plasma deficitario de FII. Considerando que el Factor II es el zimógeno a partir del cual se forma la trombina, la deficiencia de este factor generaría menor cantidad de trombina la cual sería inhibida mas eficientemente por el HCII potenciado por el DS presente.

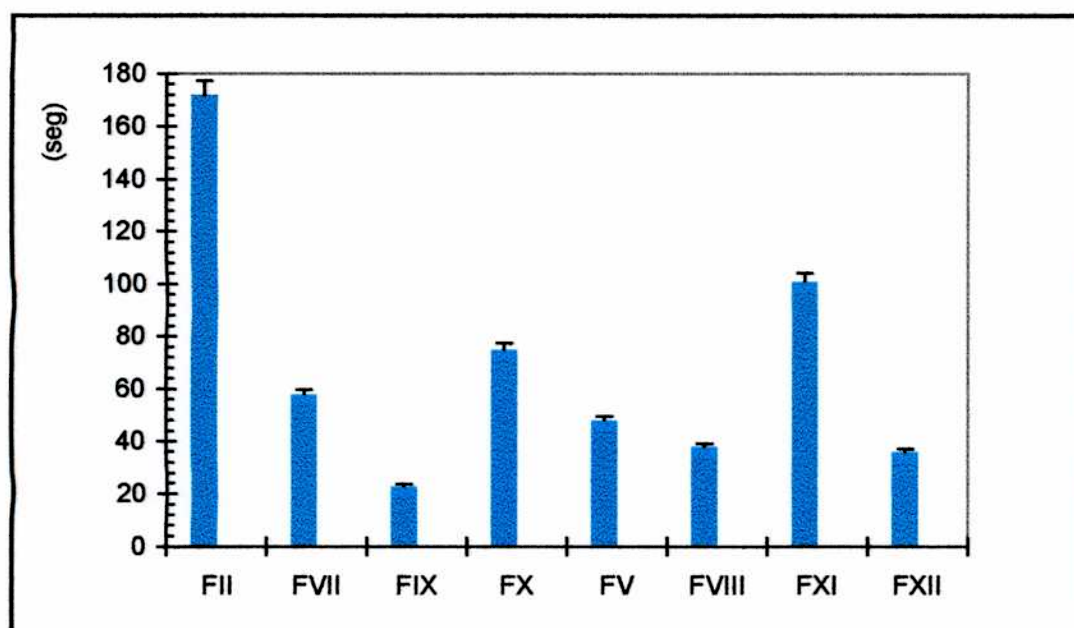


Figura N° 37. Diferencias (en segundos) entre el APTT de los plasmas deficitarios en factores (15% de factor) en presencia de 0,25 mg/ml de dermatán sulfato no fraccionado y en ausencia del mismo.

Tabla N° 12. APTT de plasmas deficitarios en factores en presencia de Dermátan Sulfato

Plasma deficitario en factor II

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	33±0	35±1,2	33±0	42,5±1,4	80±0
60 %	37,5±0,7	37,5±1,4	44±1,2	57±0	92,3±1,4
30 %	44±0	44,5±0,7	45,5±1,4	62±0	132,5±3,5
15 %	48±2,4	49,5±0,7	51,5±0,7	75,5±1,4	220,5±6,4

Plasma deficitario en VII

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	35±0	35,5±0,7	36±1,2	43,5±1,2	77,5±1,4
60 %	38,5±1,4	38±4,2	37,5±0,7	49±0	89±2,8
30 %	37±0	40±1,2	41,5±0,7	52±0	97±0
15 %	42±0	42,5±0,7	41,5±0,7	55±0	100,5±0,7

Plasma deficitario en factor IX

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	42±0	41±0	40,5±0,7	47,5±1,4	81±0
60 %	41,5±0,7	44±0	45,5±0,7	46±1,2	72,5±1,4
30 %	50,5±0,7	51±1,2	50,5±3,5	50±0	74,5±3,5
15 %	61,5±1,4	59,5±0,7	59,5±0,7	59,5±0,7	84±0

Plasma deficitario en factor X

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	38±4,2	45±0	44,5±4,9	50±0	81±1,2
60 %	40±4,2	42,5±3,5	44±1,2	52,5±0,7	94,5±0,7
30 %	47±0	50±1,2	54,5±0,7	61,5±0,7	110,5±0,7
15 %	58,5±0,7	70±5,6	62,5±6,3	71,5±0,7	133±1,2

Las tablas expresan los valores de APTT en segundos (media $\pm$ desviación estándar) de plasmas deficitarios en factores individuales (100, 60, 30 y 15% de factor) en presencia de DS no fraccionado en concentraciones finales mg/ml

Plasma deficitario en factor V

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	41±1,2	40,5±0,7	36±0	43,5±0,7	76,5±1,4
60 %	41±0	42,5±0,7	38,5±0,7	48,5±0,7	82±0
30 %	45±0	44±0	42,5±0,7	51,5±0,7	94±1,2
15 %	51±0	51±1,2	51±0	49±0	135,5±3,5

Plasma deficitario en factor VIII

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	43±1,2	47±0	44±4,2	46,5±4,9	76,5±1,2
60 %	48,5±0,7	48±1,2	46,5±1,4	45±0	86±1,2
30 %	56±1,2	56,5±4,9	60±0	53,5±1,4	97,5±3,5
15 %	54,5±0,7	60±0	58,5±1,4	55±1,2	92,5±0,7

Plasma deficitario en factor XI

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	35,5±0,7	35±0	35±0	41,5±1,4	72±1,2
60 %	36±1,2	40,5±0,7	40,5±1,4	52,5±0,7	91±2,8
30 %	53,5±0,7	55±1,2	56,5±0,7	67,5±0,7	123,5±1,4
15 %	66,5±4,9	70,5±1,4	61,5±3,5	90±4,2	167±4,2

Plasma deficitario de factor XII

Def/DS	Control	0,0013	0,0025	0,025	0,25
100 %	35±1,2	34±1,2	35±0	50±4,2	75±0
60 %	40±1,2	40±2,8	41±1,2	50±0	85±1,2
30 %	51±0	52,5±3,5	55±1,2	61,5±0,7	92±0
15 %	71,5±1,4	70±2,8	63±1,2	72,5±1,4	107±2,8

Las tablas expresan los valores de APTT en segundos (media $\pm$ desviación estándar) de plasmas deficitarios en factores individuales (100, 60, 30 y 15% de factor) en presencia de DS no fraccionado en concentraciones finales mg/ml

II.8.4. DISCUSION DEL ITEM II.8.3.

El análisis de los resultados obtenidos revela que la presencia del dermatán sulfato en el plasma afecta principalmente al deficitario de factor II, zimógeno que es el precursor de la trombina, por lo tanto en dichos plasmas la activación del sistema de coagulación generaría menor cantidad de trombina.

Los resultados del estudio cinético del HCII mostraron que el HCII inhibe mas eficientemente menores concentraciones de trombina (*Item II.5.3.*), por lo tanto en estos plasmas la acción antitrombínica del HCII potenciada por DS presente sería mas evidente.

Se observa que la presencia del DS en el plasma deficitario de factor XI, prolonga significativamente el KPTT. En la cascada revisada la activación del sistema de coagulación afirma que la trombina es el principal activador del FXI ⁵⁵. Los estudios de Gailini ¹⁹⁴ demostraron que la presencia de dextrán sulfato y heparina acelera el proceso y los trabajos de von dem Borne ¹⁹⁵ relatan que la meizotrombina desarrollaría un importante papel en la activación del factor XI.

La presencia de DS en los plasmas deficitarios de factor XI pondría en evidencia la potenciación del HCII en su actividad inhibitoria de trombina y de meizotrombina, impidiendo la activación de la pequeña proporción de FXI del plasma.

III. DETERMINACION DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN PLASMA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLOGÍAS

Se estudió en diversas patologías el nivel plasmático de actividad y antigenicidad del HCII, también el de su potenciador (dermatán sulfato). Se realizó además la comparación de HCII con los otros inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación.

III.1.1. VALORES DE REFERENCIA DEL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN LA POBLACION DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

Debido a que no existían datos sobre los valores de referencia para la actividad y antigenicidad del Cofactor II de la Heparina para la población de Buenos Aires, se determinaron los mismos en 150 individuos normales.

Se estudiaron los niveles antigénicos de HCII mediante la técnica de electroinmunodifusión simple descripta por Laurell ¹⁹⁰. Una vez obtenidas las condiciones óptimas, se realizó la medición de los niveles antigénicos de HCII plasmático.

Con este esquema de trabajo se determinaron los niveles antigénicos de HCII de las diferentes muestras estudiadas.

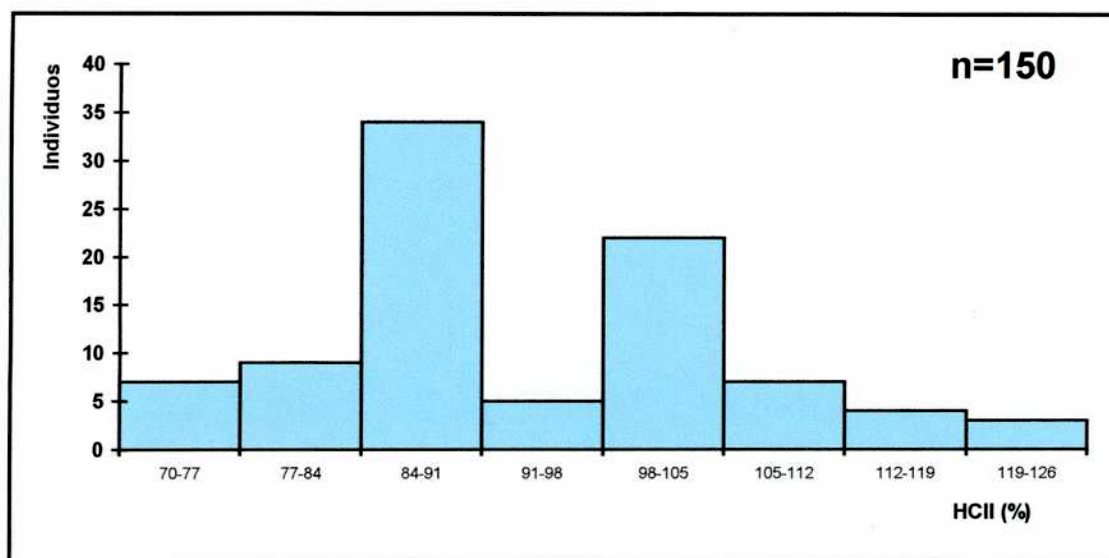


Figura N° 38. Histograma de distribución de los niveles de HCII en la población de Buenos Aires



Figura N° 39. Electroinmunodifusión del HCII

Calles 1,2 y 3 curva de calibración (100, 50 y 25%)
Calles 4 y 5 Plasmas en estudio

Los intervalos de referencia del Cofactor II de la Heparina definidos por fractiles y determinados por métodos no paramétricos fueron 75 - 120 % de actividad y 70 - 130 % de antigenicidad.

La tabla N° 13 ejemplifica los valores de referencia reportados en la bibliografía, obtenido por distintos autores.

Tabla N° 13. Valores de referencia de HCII plasmáticos en la literatura

AUTOR	n	MEDIA $\pm$ SD	RANGO	Ref.
Tran y Duckert	40		70 - 115	196
Andersson y col	197	95 $\pm$ 17	43 - 146	197
Sie y col	70	110 $\pm$ 21	75 - 180	7
Abilgaard y Larsen	50	100 $\pm$ 15	75 - 139	182
Tollefsen y Petska	34	118 $\pm$ 22	62 - 140	8
Toulon y col	80	105 $\pm$ 22	58 - 192	159
Griffith y col	140		60 - 140	198
Proyecto VITA	4000	93 $\pm$ 18	65 - 128	199
Duboscq y col	150		70 - 130	181

Los resultados se expresan en media $\pm$ SD y/o rango (%)

El análisis de los resultados refleja que el rango de normalidad establecido para la ciudad de Buenos Aires concuerda con lo descrito por Tran¹⁹⁶ y más recientemente por el rango establecido en el proyecto VITA para la población italiana¹⁹⁹. El rango de referencia del HCII es amplio comparado con otros inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación, como la ATIII, presentando gran variabilidad individual.

III.1.2. EL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN NIÑOS NORMALES

Los niveles de actividad de HCII encontrados en una pequeña población de niños normales (n= 13) expresados en mediana y rango fue de 108,0 % (74 - 150). Debido a que el HCII presenta gran homología estructural y funcional con la ATIII se determinaron los niveles de esta serpina en los niños, que fue de 94,0 % (77 - 120).

Los valores de actividad de HCII encontrados no correlacionan con los niveles de ATIII, edad ni con el hematocrito.

Si bien la población estudiada fue pequeña, permite observar que los valores de HCII actividad coinciden con los adultos, mostrando así mismo un rango mas amplio que la Antitrombina III, presentando una gran variabilidad.

III.1.3. COFACTOR II DE LA HEPARINA Y DERMATAN SULFATO EN EMBARAZADAS EN EL TERCER TRIMESTRE

La mujer embarazada sufre importantes cambios en su sistema hemostático durante el desarrollo de la gestación, evidenciados por el aumento de los factores de la coagulación I, II, VII, X, VIII, disminución de la PS total y libre, ligera disminución de la ATIII, leve incremento del TFPI y HCII ^{154, 200, 201}. Como resultado de estos cambios, se considera al embarazo un estado hipercoagulable debido al aumento de la incidencia de complicaciones tromboembólicas (0,55 casos por cada 1000 embarazos) ²⁰².

Durante la gestación se encuentra aumentada la generación de trombina manifestada por la presencia de los marcadores de activación en circulación (F₁₊₂, FPA, TAT, T-HCII). Se considera a la placenta una fuente importante de generación de trombina, debido a que es necesaria la fibrinoformación para la normal implantación y mantenimiento de la placenta, así como para la reparación del tejido coriónico ¹⁵⁴.

En este trabajo se determinaron los niveles de actividad de HCII, ATIII y Dermatán Sulfato durante el tercer trimestre de gestación en 30 embarazadas normales.

Tabla N° 14. Niveles de HCII, ATIII y DS en embarazadas con mas de 30 semanas de gestación

	Grupo Embarazadas (GE)	Grupo Control (GC)	
HCII actividad (%)	108 (88-160)	100 (70-120)	p= 0,026
ATIII actividad (%)	75 (40-99)	100 (80-120)	p< 0,0001
Dermatán Sulfato (µg/ml)	1,15 (0,0-3,7)	no detectable	p< 0,0001

La tabla presenta los niveles plasmáticos de actividad de HCII, ATIII (%) y Dermatán Sulfato (µg/ml) en embarazadas y en el grupo control, expresados en mediana y rango.

Los niveles de actividad de HCII en las embarazadas a término están significativamente aumentados respecto al control (p= 0,026) alcanzando valores de hasta 160 %, mientras que los niveles de ATIII se encuentran significativamente disminuídos (p< 0,0001) presentando una mediana de 75% con valores que alcanzan el 40%.

En el plasma de embarazadas se detecta actividad de DS que está aumentada respecto al control (p< 0,0001) presentando niveles máximos de 3,7 µg/ml los cuales se mantienen dentro del tercer cuartil. El 92% de las embarazadas presentó actividad de Dermatán Sulfato en el plasma.

En la mayoría de los procesos fisiopatológicos los niveles de antitrombina III y de Cofactor II de la Heparina presentan un comportamiento similar, sin embargo en las mujeres embarazadas a término, el HCII presenta valores significativamente aumentados mientras que los de ATIII ligeramente disminuídos.

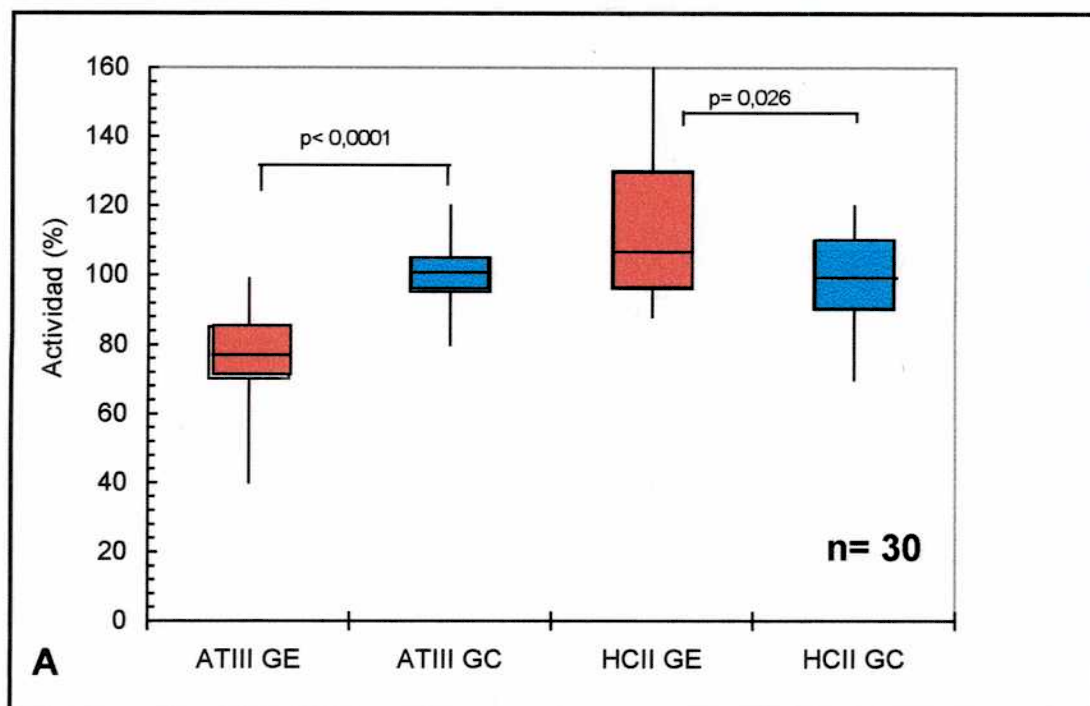


Figura N° 40.A. Niveles plasmáticos de HCII y ATIII en embarazadas normales.

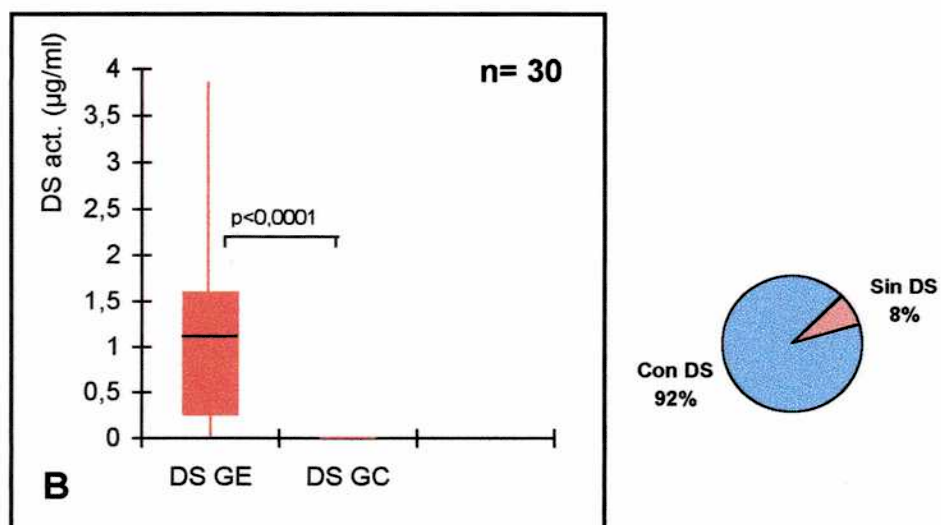


Figura N° 40.B. Niveles plasmáticos de actividad de Dermátán Sulfato en embarazadas normales.

Durante la gestación, fisiológicamente ocurre el proceso de angiogénesis (neoformación de vasos sanguíneos) con proliferación de los tejidos que lo acompañan. La síntesis de Dermatan Sulfato por los fibroblastos subendoteliales se encuentra aumentada. Esta estimulación explicaría la presencia de actividad de DS en el plasma de mujeres en el tercer trimestre del embarazo ²⁰³.

Si bien el útero y la placenta son tejidos ricos en proteoglicanos de DS, aún no se conoce el mecanismo preciso por el cual pasan a circulación en las mujeres embarazadas.

Estudios *in vitro* sobre la generación de trombina, revelaron que en el plasma de mujeres embarazadas se forma mayor cantidad del complejo trombina-HCII que en los plasmas controles, debido principalmente a la presencia del potenciador específico ¹⁵⁴. Se observó que la formación del complejo trombina-HCII está incrementada durante el embarazo normal ¹³².

La asociación de la pre-eclampsia con la generación de trombina está ampliamente documentada. En pacientes que desarrollaron pre-eclampsia los niveles de HCII no disminuyeron significativamente, proceso que correlaciona con la severidad de la patología ²⁰⁴.

Los elevados niveles de HCII y la presencia de DS en circulación podrían indicar un importante papel del HCII en la inhibición de trombina, ya sea a nivel vascular, o en los tejidos placentario y uterino.

III.1.4. COFACTOR II DE LA HEPARINA Y DERMATAN SULFATO EN PACIENTES QUEMADOS

En el individuo que sufre una quemadura grave, se desencadenan simultáneamente un conjunto de procesos fisiopatológicos que tienden a contrarrestar el daño producido. Una de las respuestas inmediatas al daño epitelial es el control del sangrado mediante la vasoconstricción, y la activación plaquetaria por la exposición de las estructuras subendoteliales y la estimulación del sistema de coagulación ^{205, 206}. El mecanismo hemostático recibe estímulos desde diferentes focos debido a que se produce una gran destrucción de tejidos con liberación de factor tisular, alteraciones en la permeabilidad capilar, exposición de tejido subendotelial, importante hemoconcentración con aumento de la viscosidad sanguínea, liberación de mediadores de los macrófagos que son los responsables de la respuesta inflamatoria. Todos estos factores contribuyen a la activación del sistema hemostático en su conjunto ^{205, 207}.

Al ser tan compleja la fisiopatología del paciente quemado, resultó de interés estudiar el papel que desempeña el HCII en la misma, para lo cual se determinaron los niveles plasmáticos de HCII y Dermatan Sulfato en un grupo de pacientes quemados a las pocas horas de haber sufrido el accidente térmico y al 4^{to} y 7^{mo} día post quemadura. Se descartaron los pacientes con alcoholismo y se monitoreó la funcionalidad hepática mediante el hepatograma. El comportamiento del HCII fue comparado con el resto de los inhibidores (Antitrombina III, Proteína C y Proteína S).

Los inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación (Antitrombina III, Proteína C, Proteína S) están disminuídos en los pacientes quemados, como se puede observar en la Figura N° 41.A. Los niveles antigénicos de los inhibidores presentan un patrón similar al de actividad.

Tabla N° 15. Parámetros hemostáticos en pacientes quemados

Grupo Control (GC)		Grupo Quemados (GQ)		
		1 ^{er} día	4 ^{to} día	7 ^{mo} día
APTT	30	31	31	31
(segundos)	(25 - 35)	(28 - 36)	(25 - 35)	(25 - 35)
PT (%)	100	80	75	85
	(70 - 100)	(75 - 80)	(65 - 100)	(58 - 100)
ATIII act(%)	98	21.5*	43.5	55
	(82 - 120)	(17 - 52)	(30 - 68)	(30 - 72)
ATIII ag (%)	100	18*	37	52
	(81 - 120)	(15 - 50)	(26 - 65)	(27 - 70)
HCII act (%)	101	81	85	87
	(75 - 128)	(75 - 95)	(68 - 92)	(70 - 90)
HCII ag (%)	105	80×	83	84
	(73 - 130)	(70 - 90)	(65-92)	(63 - 88)
PC act (%)	97	48*	25	41
	(75 - 135)	(20 - 65)	(17 - 75)	(20 - 89)
PC ag (UI/L)	99	40*	22	37
	(82 - 137)	(20 - 60)	(15 - 60)	(18 - 87)
PS act (%)	96	40*	21	36
	(74 - 133)	(18 - 60)	(16 - 56)	(20 - 86)
PS ag (%)	100	35	20	35
	(75 - 135)	(15 - 60)	(15 - 55)	(19 - 86)
DS act	no detectable	0,5	0,4	
(µg/ml)		(0,0 - 1,3)	(0,0 - 2,2)	

La tabla presenta los parámetros hemostáticos estudiados en los pacientes quemados expresados en mediana y rango.

* $p = 0.0015$ diferencia entre grupo quemado y grupo control

× $p = 0.0094$ diferencia entre grupo quemado y grupo control

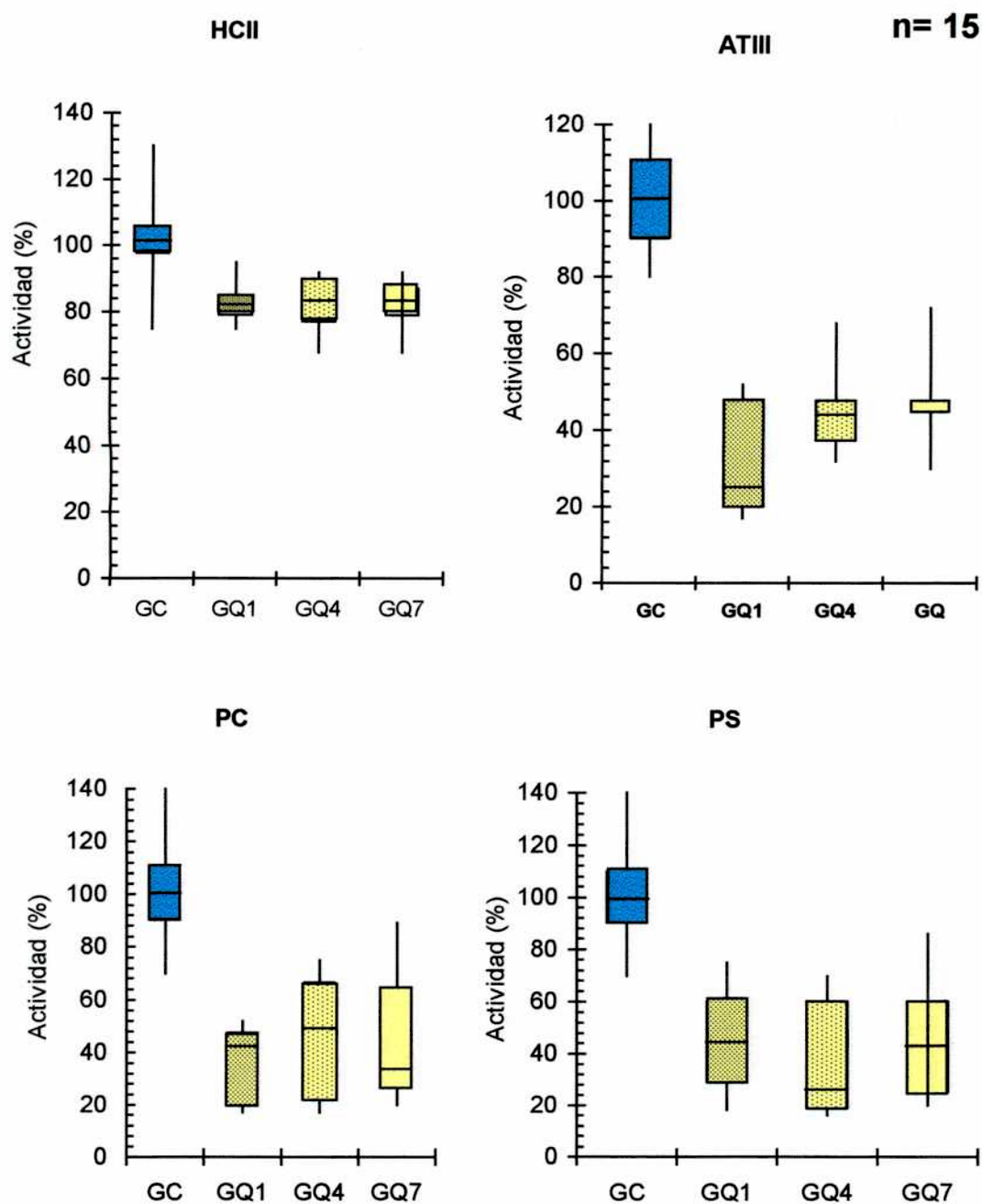


Figura N° 41.A. Inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación en pacientes quemados.

GC : Grupo control ; GQ1: Grupo quemados día 1

GQ4 : Grupo quemados día 4 ; GQ7: Grupo quemados día 7

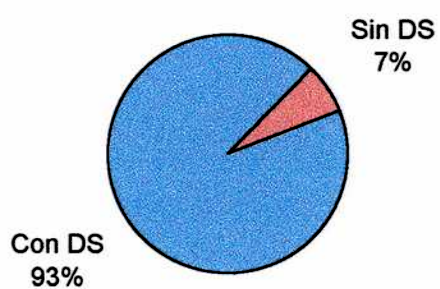
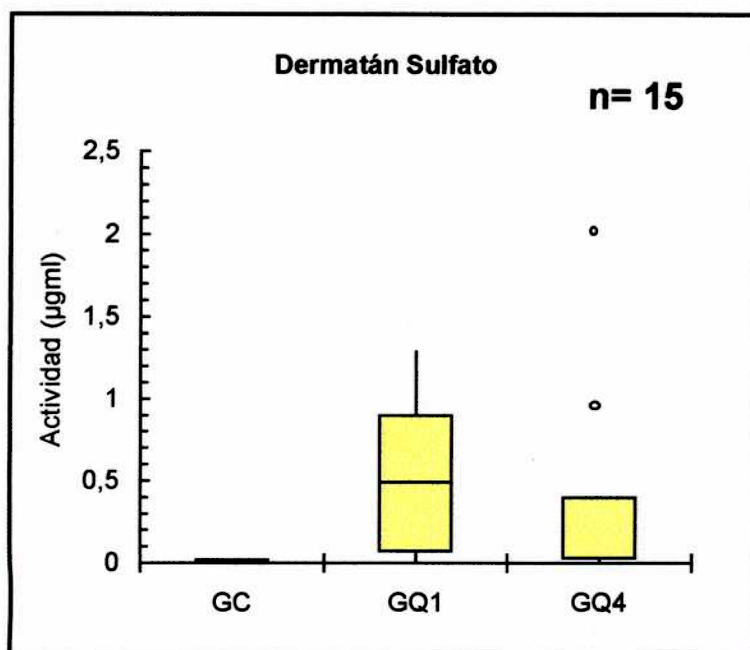


Figura N° 41.B. Niveles plasmáticos de DS en pacientes quemados

La media de la ATIII se encuentra debajo del grupo control, presentando los valores más bajos (21,5 %) el primer día del estudio, reflejando la gran generación de trombina producida por la injuria. A pesar que durante la evolución los niveles de ATIII aumentan, no alcanzan los valores normales durante el desarrollo del estudio.

El sistema de la PC y PS se encuentra disminuido (PC 48 y PS 40 %) durante la evolución del estudio, sin alcanzar los valores de referencia.

Los valores de HCII en los pacientes quemados se encuentran significativamente disminuidos respecto al grupo control ($p= 0,002$) aunque cercanos al límite inferior del grupo control. Si bien la activación del sistema de coagulación es un proceso ampliamente demostrado en los pacientes quemados, la bibliografía no relata referencias respecto a los niveles de HCII ni de Dermatán Sulfato.

Los pacientes quemados presentan actividad de Dermatán Sulfato, con valores que alcanzan a los 2,2 $\mu\text{g/ml}$. El 93,3 % de los pacientes presentaron actividad de DS, mientras que sólo en el 6,7 % de los casos no se detectó actividad.

Aunque tanto el HCII como la ATIII participan en el proceso de inhibición de trombina, el gran descenso en los niveles de ATIII indicaría que este sería el principal inhibidor de trombina cuando ocurre la activación del sistema de coagulación y de otros sistemas plasmáticos, como el complemento y fibrinolítico, mediado por proteasas leucocitarias y citoquinas estimuladas por la injuria térmica.

Los niveles de HCII en los pacientes quemados, a diferencia de los otros inhibidores, se detectaron en el límite inferior normal, indicando que a pesar que su potenciador específico se encuentra en circulación, el HCII no desempeñaría un papel preponderante en el proceso de inhibición de la trombina generada por la injuria térmica.

III.1.5. COFACTOR II DE LA HEPARINA Y DERMATAN SULFATO EN PACIENTES EN HEMODIALISIS

Los pacientes en hemodiálisis presentan múltiples trastornos del sistema de coagulación, los cuales son mucho más complejos que la acción de la uremia sobre los componentes del sistema. Estos trastornos pueden conducir a complicaciones de sangrado y/o estados hipercoagulables^{208, 209}.

Las complicaciones hemostáticas pueden ser producidas por la retención de los productos urémicos, la anemia crónica, disfunción plaquetaria inducida por la uremia, deficiencia de los factores de coagulación por pérdida urinaria, trombocitopenia. Puede presentarse una deficiencia adquirida de ATIII por pérdida urinaria²⁰⁸, consumo²⁰⁹, degradación por elastasas leucocitarias¹⁴¹ o por déficit de síntesis²⁰⁸. La PS activa puede estar disminuida por incremento del C4BP o por excreción, los niveles de PC pueden estar disminuidos por consumo o por degradación^{209, 210}.

En un intento de establecer el papel que desempeña el HCII en este tipo de patología, se estudió un grupo de 22 pacientes en hemodiálisis, determinando los niveles de HCII, comparando el mismo con los otros inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación. También se dosó la actividad de Dermatan Sulfato en el plasma de los pacientes en hemodiálisis.

Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla N° 16.

Los niveles de actividad de Antitrombina III y Proteína C se encuentran significativamente disminuidos respecto al grupo control ($p= 0,001$ y $0,005$ respectivamente) lo cual coincide con lo descrito por la literatura²⁰⁸.

Tabla N° 16. Perfil hemostático de los pacientes en hemodiálisis

	<i>Renales (GR)</i>	<i>Control (GC)</i>	
HCII act (%)	83,0 (60-105)	98 (75-110)	p= 0,0001
ATIII act (%)	88,0 (55-120)	100 (80-120)	p= 0,001
PC act (%)	76,5 (56-116)	99 (80-120)	p= 0,005
PS ag (%)	93 (79-105)	98 (70-120)	p= 0,007
DS (µg/ml)	0,215 (0,0-1,5)	no detectable	p= 0,0002
fvW (%)	110 (60-170)	105 (50-150)	p= 0,128

Los resultados se expresan en mediana y rango.

El nivel de actividad del HCII se encuentra disminuido en los pacientes en hemodiálisis, sin presentar correlación con el índice de adecuación de diálisis (Ktv), el tiempo en diálisis, el reuso del filtro, la diuresis ni relación con la enfermedad de base.

Se destaca la presencia de niveles de actividad de Dermatán Sulfato en circulación en los pacientes en hemodiálisis, considerando que en individuos normales no se detecta actividad de DS en plasma con la metodología utilizada. La mediana de DS en los pacientes es de 0,215 µg/ml obteniéndose valores considerablemente altos como 1,5 y 1,0 µg/ml.

De los 22 pacientes estudiados el 63,6 % de los mismos presentan Dermatán Sulfato en circulación, mientras que en el 36,4% no se detectó DS con la metodología utilizada.

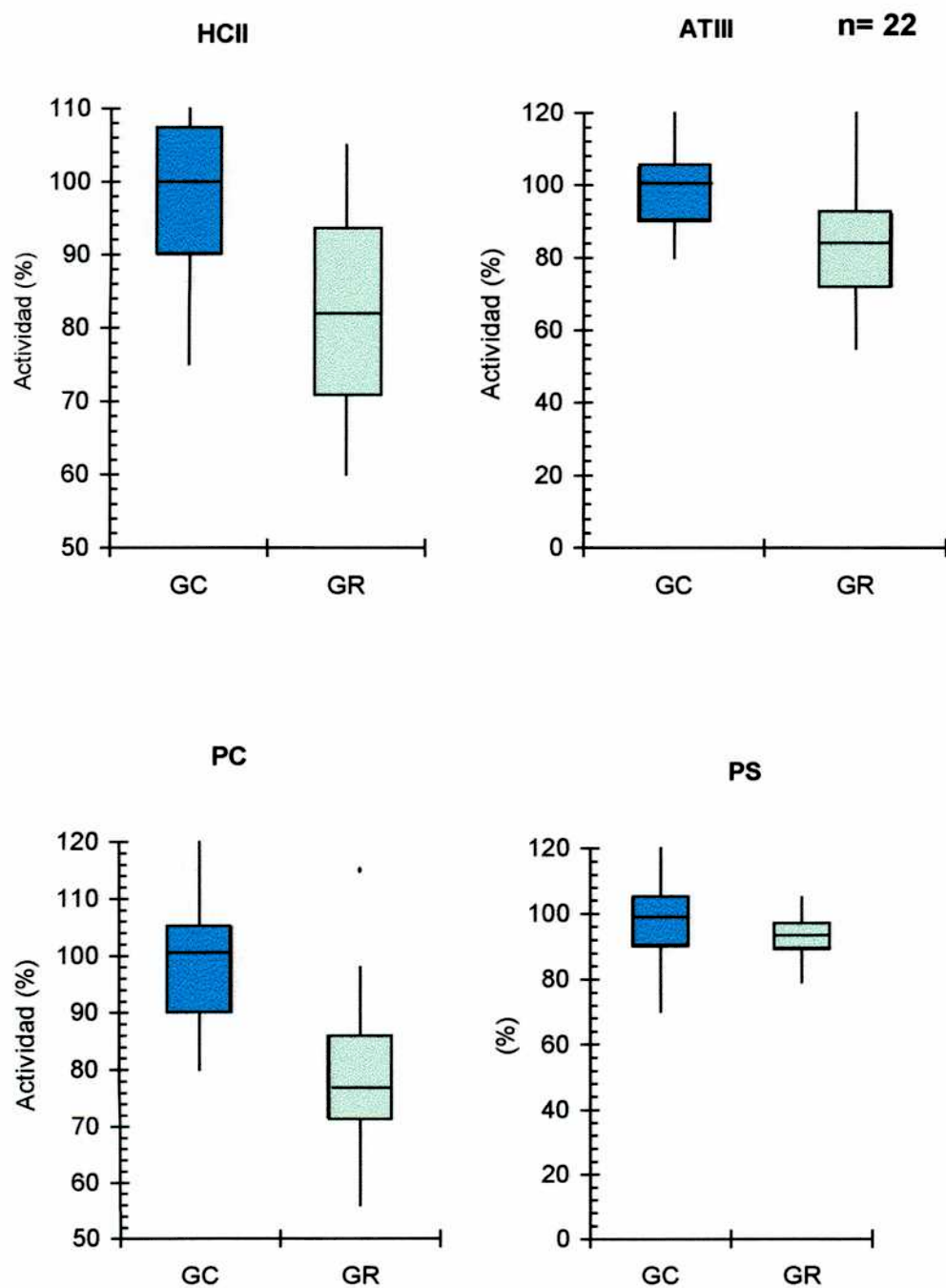


Figura N° 42.A. Inhibidores fisiológicos de la coagulación en pacientes en hemodiálisis

GC : Grupo control ; GR: Grupo renales

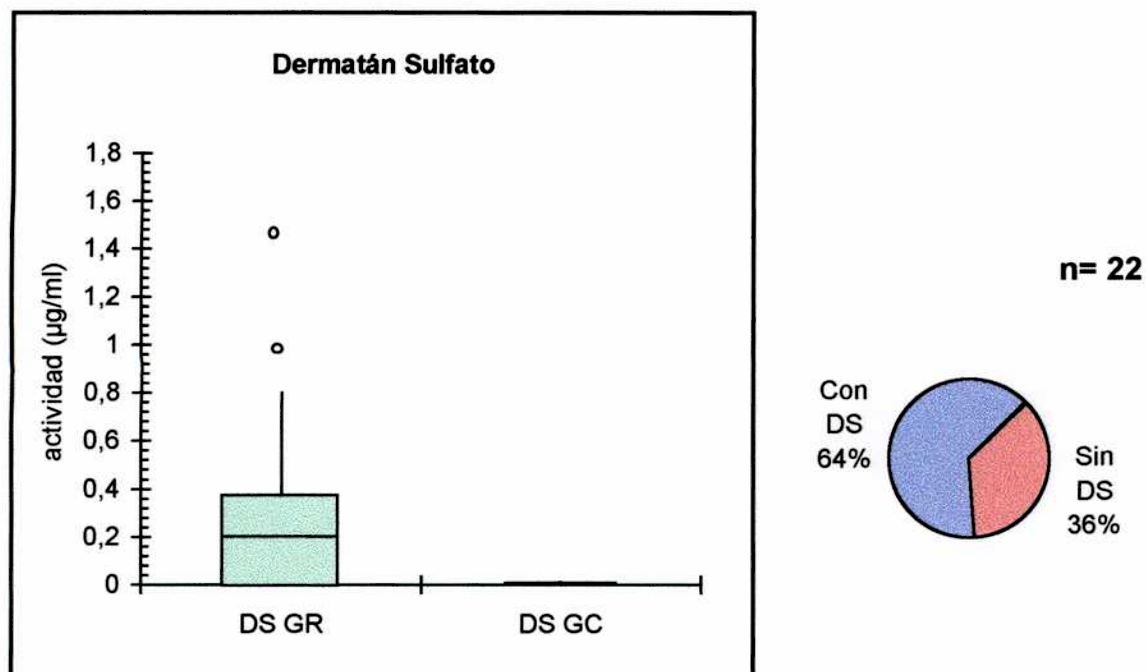


Figura N° 42.B. Niveles plasmáticos de Dermátan Sulfato en pacientes en hemodiálisis

Se dosaron los niveles plasmáticos de factor von Willebrand en los pacientes en hemodiálisis, no encontrándose correlación con los niveles de DS. Si bien el factor von Willebrand está propuesto como un marcador de daño endotelial, sólo se tiene la certeza que valores aumentados del mismo indicarían daño endotelial, pero se ha sugerido que niveles en el rango de referencia no aseguran la integridad de la barrera endotelial²¹².

III.1.6. COFACTOR II DE LA HEPARINA Y DERMATAN SULFATO EN PACIENTES SEPTICOS

La sepsis es una respuesta inflamatoria generalizada inducida por procesos infecciosos. En el curso de la evolución de la sepsis se produce la activación de numerosos sistemas plasmáticos (coagulación, quininas y calicreínas, fibrinolítico, complemento) y celulares (granulocitos, monocitos, células endoteliales)^{183, 213}. Dada la interrelación dinámica que existe entre los sistemas, el perfil hemostático de estos pacientes es complejo, varía durante el curso del episodio séptico y depende de la terapéutica aplicada^{213 - 216}. En este trabajo se estudiaron los inhibidores fisiológicos de 45 pacientes sépticos (GS), comparándolos con un grupo control de sujetos normales (GC) y un grupo control de pacientes internados en la misma unidad de terapia intensiva, sin manifestaciones clínicas de sepsis (GCT).

Los inhibidores del Sistema de Coagulación de los pacientes sépticos al primer día del diagnóstico de sepsis se detallan en la siguiente tabla.

Tabla Nº 17. Parámetros hemostáticos en pacientes sépticos

	Grupo Séptico GS	Grupo Control Terapia GCT	Grupo Control GC
HCII act (%)	29 (15-120)**	85 (80-110)	92 (75-110)
ATIII act (%)	71 (25-140)**	90 (70-110)	100 (80-120)
Proteína C act (%)	49 (10-95)##	50 (35-85)	100 (70-140)
Proteína S act (%)	81 (41-110)#	80 (65-100)	100 (70-140)
Dermatán Sulfato (µg/ml)	1,9 (0,004-3,4)		no detectable

Los resultados se expresaron en mediana y rango

**p < 0,001: Diferencias entre Grupo Séptico y ambos grupos controles (Control Terapia y Control Normal)

p < 0,005 ## p < 0,001: Diferencias entre Grupo Séptico y Grupo Control Terapia respecto del Grupo Control Normal.

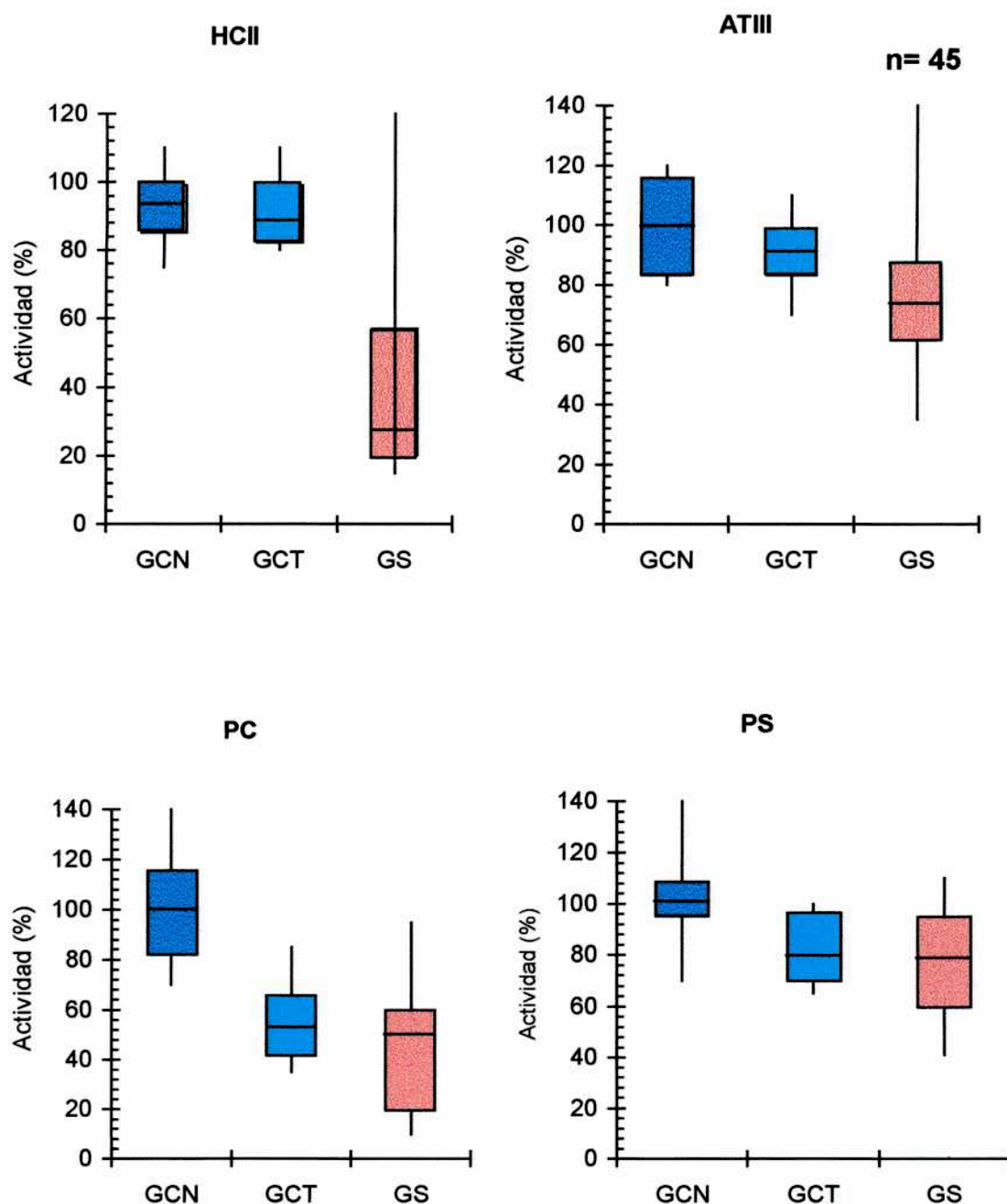


Figura N° 43.A. Inhibidores fisiológicos de la coagulación en pacientes sépticos (Multiple Box and Whisker plot).

GCN: grupo control normal; GCT: Grupo control terapia; GS: Grupo sépticos

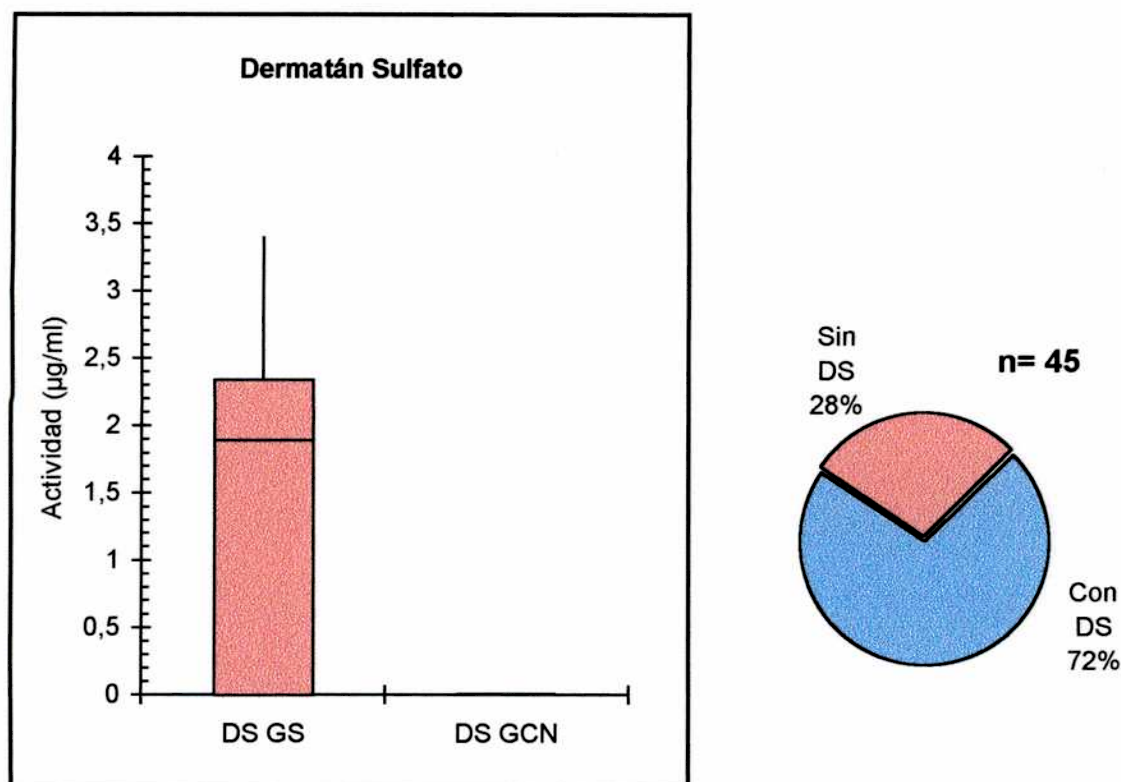


Figura N° 43.B. Niveles plasmáticos de Dermatan Sulfato en pacientes sépticos (Multiple Box and Whisker plot).

Los niveles plasmáticos de los inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación Antitrombina III, Proteína C, Proteína S y Cofactor II de la Heparina están significativamente disminuídos en los pacientes sépticos. La ATIII presenta un descenso de su concentración plasmática respecto al Grupo Control Terapia y al Grupo Normal ($p < 0,001$). Las PC y PS están significativamente disminuidas en ambos grupos de pacientes respecto al grupo control sanos, pero no respecto a los pacientes no sépticos internados en la misma unidad de terapia intensiva. La síntesis de estos inhibidores es dependiente de la vitamina K, por lo tanto es

probable que el descenso se deba, parcialmente, a la falta de ingesta de esta vitamina en la dieta.

La actividad de HCII está significativamente disminuida respecto a ambos grupos controles ($p < 0,001$). En la bibliografía no se encuentran datos de niveles plasmáticos de HCII en pacientes sépticos sin coagulación intravascular diseminada.

Durante el proceso inflamatorio ocurre la liberación de una variedad de enzimas proteolíticas, principalmente elastasa leucocitaria, liberada por degranulación de los polimorfonucleares ²¹⁶. La degradación de la ATIII por la elastasa leucocitaria esta ampliamente comprobada ^{140, 141} y existen trabajos *in vitro* de Sie y colaboradores que corroboran que la elastasa leucocitaria liberada de los polimorfonucleares degrada al HCII mas rápidamente que a la ATIII ¹⁴².

Se observa niveles elevados de Dermátan Sulfato en circulación en los pacientes sépticos, con una diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0,0001$). La presencia de Dermátan Sulfato en circulación podría ser consecuencia de la activación y/o disrupción del endotelio que sufren los pacientes sépticos.

El importante descenso de la actividad de Cofactor II de la Heparina que se observa en los pacientes sépticos respecto a los restantes inhibidores (ATIII, PC y PS), podría deberse a la suma de varios factores: a la degradación del inhibidor por acción de elastasas leucocitarias liberadas por los polimorfonucleares ¹⁴² y a un mayor consumo del HCII al estar presente su potenciador, el Dermátan Sulfato, que facilita la formación del complejo trombina-HCII.

III.1.7. EL COFACTOR II DE LA HEPARINA EN PACIENTES CON ANTICOAGULACION ORAL CRONICA Y CON HEPARINA NO FRACCIONADA

Los pacientes con tratamientos de anticoagulación prolongados con heparina presentan disminución de los niveles plasmáticos de ATIII. Este descenso se debería al consumo de la ATIII y a que al unirse la misma con el glicosaminoglicano, se modifica la estructura de la proteína, acelerando su depuración plasmática.

Dada la gran similitud entre ATIII y HCII se estudió la actividad y antigenicidad de ambos inhibidores en 26 pacientes que recibieron heparina no fraccionada administrada por vía endovenosa.

Tabla N° 18 A. HCII y ATIII actividad y antigenicidad en pacientes anticoagulados con heparina no fraccionada

	<i>Grupo Heparinizados (GH)</i>	<i>Grupo Control (GC)</i>
HCII actividad (%)	94,8 ± 6,5	99 ± 19
HCII ag (%)	95,6 ± 7,4	100 ± 23
ATIII actividad (%)	93,0 ± 1,5	101 ± 15
ATIII ag (%)	93,2 ± 15,2	105 ± 19

Los resultados se expresan en media y desviación estándar

En los pacientes heparinizados los valores medios de ATIII actividad y ATIII antigenicidad se encuentran dentro de los valores normales, excepto tres pacientes que mostraron niveles disminuidos (ATIII actividad 53, 55 y 58%; ATIIIag 55, 57 y 59%). Esta disminución se debería a la falta de reposición de la ATIII ante su mayor depuración y/o consumo potenciado por heparina, ya que estos pacientes sufren un proceso de activación que fundamenta su anticoagulación.

Se observa que ninguno de los pacientes heparinizados presentaron modificaciones significativas en la actividad y concentración antigénica del HCII.

Los resultados del estudio de la actividad y antigenicidad de la ATIII y HCII en 30 pacientes con anticoagulación oral se presentan en la siguiente tabla :

Tabla N° 18 B. HCII y ATIII actividad y antigenicidad en pacientes con anticoagulación oral

	<i>Grupo Dicumarínicos (GD)</i>	<i>Grupo Control (GC)</i>
HCII actividad (%)	91 ± 6,9	99 ± 19
HCII ag (%)	97,5 ± 9,7	100 ± 23
ATIII actividad (%)	98,1 ± 5,2	101 ± 15
ATIII ag (%)	98,2 ± 3,2	105 ± 19

Los resultados se expresan en media y desviación estándar

En los pacientes bajo anticoagulación oral crónica, la actividad y la concentración antigénica de HCII y ATIII no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control.

El tratamiento con anticoagulantes orales no modifica los niveles plasmáticos de HCII, lo que concuerda con lo descrito en la literatura ^{7, 159}.

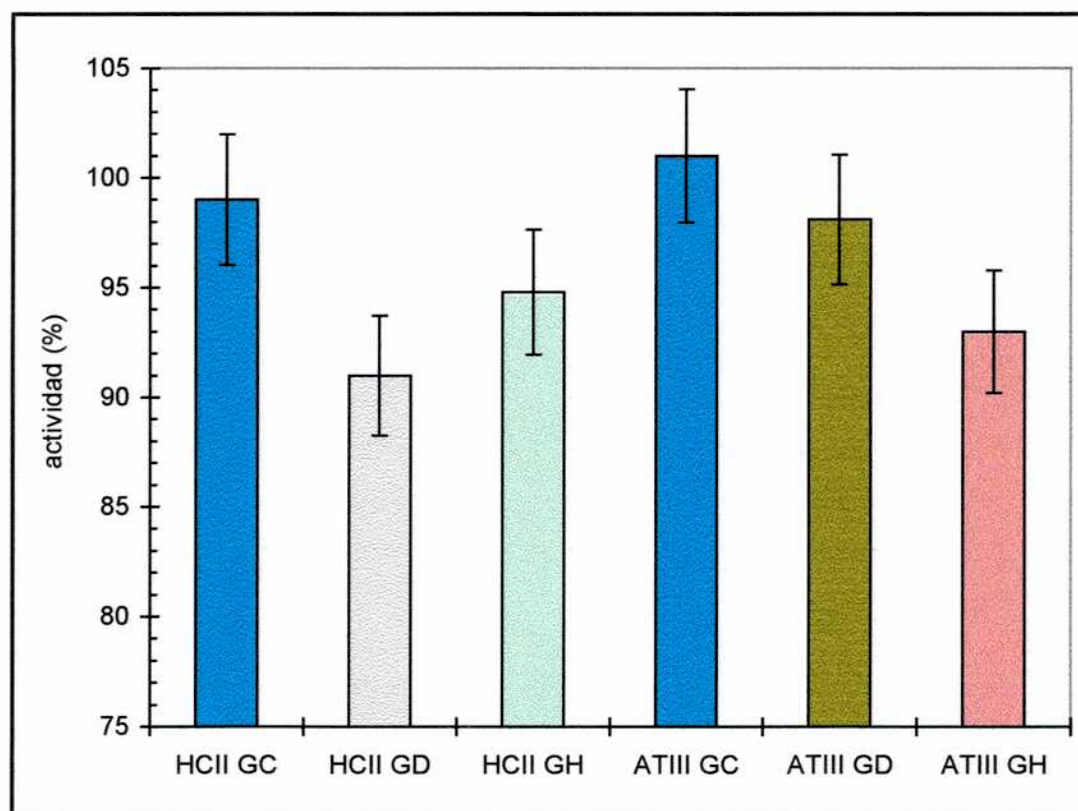


Figura N° 44. Niveles plasmáticos de HCII y ATIII en pacientes con anticoagulación oral crónica y con heparina no fraccionada.

III.1.8. COFACTOR H DE LA HEPARINA Y DERMATAN SULFARO EN PACIENTES CON HIPERHOMOCISTEINEMIA

La relación entre enfermedad vascular y homocisteinemia fue postulada en 1969 por McCully ²¹⁷. Varios estudios epidemiológicos recientes han confirmado que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente de enfermedad vascular ^{218, 219}.

Los mecanismos por los cuales la homocisteinemia induce aterosclerosis y trombosis no están completamente esclarecidos, pero se conoce que la homocisteína induce la injuria de la célula endotelial mediante la producción de peróxido de hidrógeno. El daño endotelial conduce a un aumento de adhesividad plaquetaria, depósito de LDL en la pared arterial y activación de la cascada de coagulación ²¹⁸.

Debido a la asociación que presenta la hiperhomocisteinemia con la trombosis venosa y arterial y considerando que la trombosis es un evento multifactorial ²¹⁷⁻²¹⁹, estudiamos los niveles de HCII y ATIII en pacientes con hiperhomocisteinemia, así como también la actividad de Dermatógeno Sulfato en plasma.

Los niveles plasmáticos elevados de homocisteína indican un importante riesgo de trombosis arterial o venosa, los valores de actividad de HCII y de ATIII plasmático (95 y 104% respectivamente) no difieren significativamente del grupo control.

Entre los resultados se observó la presencia de Dermatógeno Sulfato en circulación en los pacientes con elevados niveles de homocisteinemia. El grupo control de edad reveló que los individuos añosos presentan actividad de dermatógeno sulfato en circulación, no presentando diferencia significativa con los pacientes hiperhomocisteinémicos. No se encontró correlación entre los valores de DS y la concentración plasmática de homocisteína.

Los elevados niveles de factor von Willebrand son indicativos de daño endotelial ²¹², pero estos valores no correlacionan con los niveles de Dermatán Sulfato encontrados.

Tabla N° 19. Niveles de actividad de HCII, ATIII y Dermatán Sulfato en pacientes con elevados niveles de homocisteína en plasma

	<i>Grupo Hiperhomo- cisteinémicos (GH)</i>	<i>Grupo Control (GC)</i>	<i>p</i>
HCII actividad (%)	95 (60 - 115)	99 (70 - 120)	0,36
ATIII actividad (%)	104 (58 - 130)	100 (80 - 120)	0,81
Dermatán Sulfato (µg/ml)	1,8 (0,0 - 2,9) *	No detectable	0,0003
Homocisteína (µM)	20,5 (14 - >40)	8 (5 - 15)	0,0004
fvW (%)	328 (80 - 368)	125 (60 - 150)	0,0004

La tabla presenta los niveles de los inhibidores HCII y ATIII, la actividad de Dermatán Sulfato y el nivel del factor von Willebrand expresados en mediana y rango

** El Grupo Control Edad (GCE) reveló una actividad de dermatán sulfato de 1,6 (0,0 - 2,8) µg/ml no presentando diferencia significativa con el Grupo Hiperhomocisteinémicos ($p > 0,05$)*

Los niveles elevados de homocisteína en plasma no modifican la actividad del Cofactor II de la Heparina ni de la Antitrombina III. En la bibliografía no se encuentran referencias de niveles de HCII y Dermatán Sulfato en hiperhomocisteinemia.

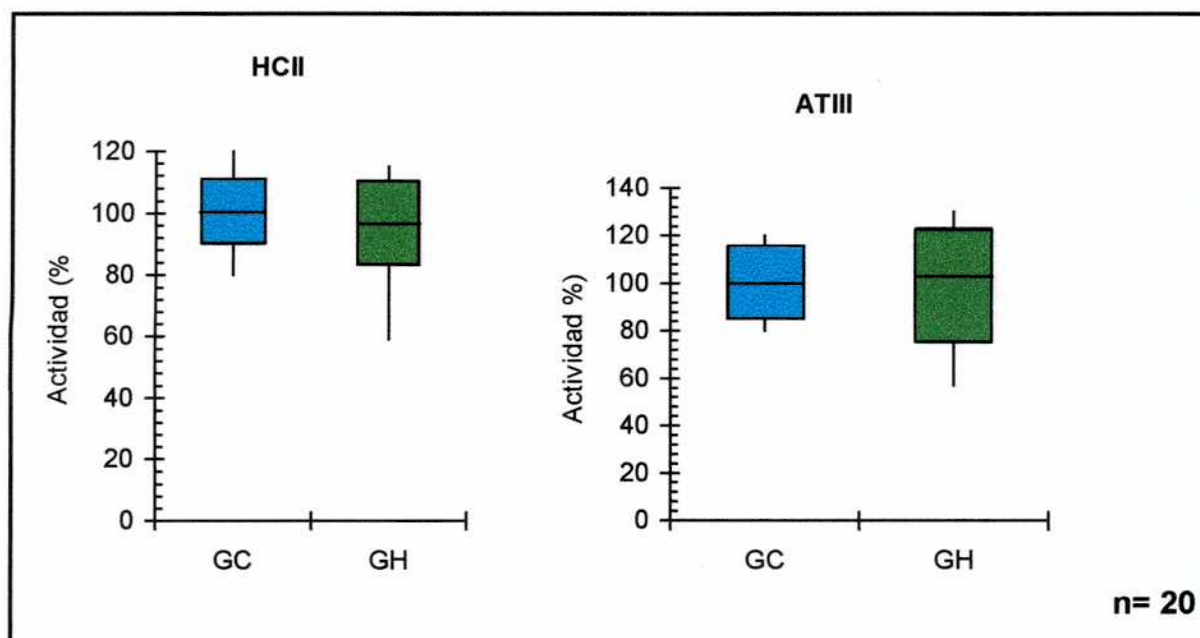


Figura N° 45.A. Niveles plasmáticos de HCII y ATIII en hiperhomocisteinémicos

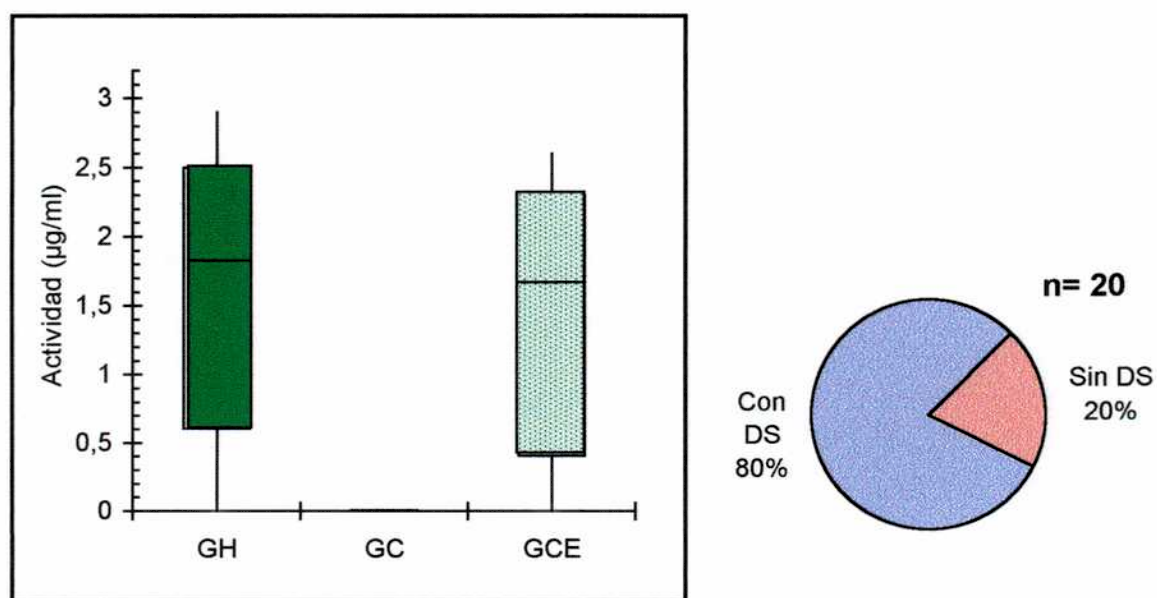


Figura N° 45.B. Niveles plasmáticos de Dermatan Sulfato en pacientes hiperhomocisteinémicos. GH : Grupo Hiperhomocisteinémicos; GC : Grupo Control ; GCE : Grupo control edad.

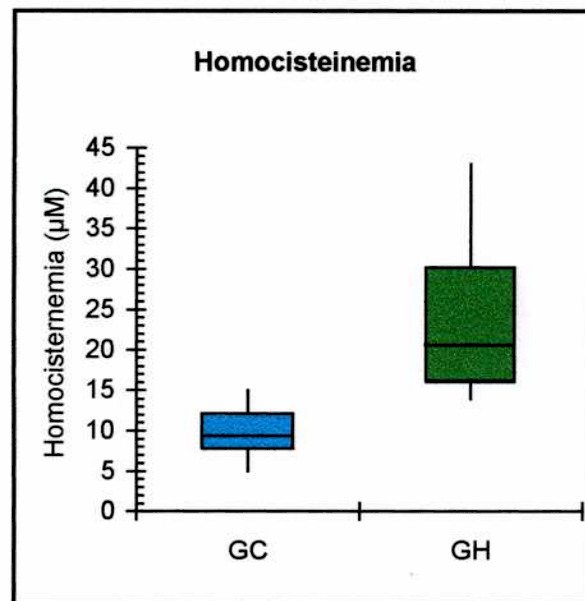


Figura Nº 45.C. Niveles plasmáticos de homocisteína

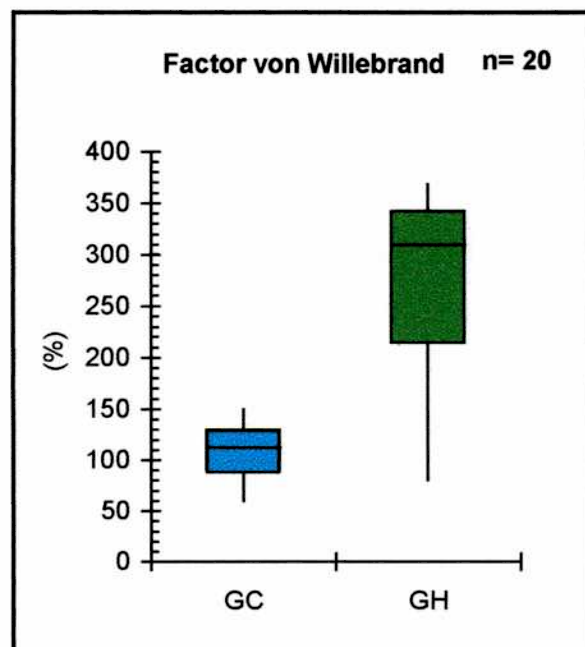


Figura Nº 45.D. Niveles de factor von Willebrand en pacientes hiperhomociteinémicos

III. 1. 9. DISCUSION DEL ITEM III

EL HCII EN LAS DISTINTAS PATOLOGIAS ESTUDIADAS

A partir de las determinaciones de HCII actividad y antigenicidad realizadas, construimos el siguiente cuadro comparativo.

Tabla N° 20. HCII y ATIII en las distintas patologías estudiadas

	<i>n</i>	HCII act (%)	HCII ag (%)	ATIII act (%)
Valor de referencia	150	75 - 110	70 - 130	-----
Niños	13	108 (74-150)	—	94,0 (77-120)
Embarazadas	30	108 (88-160)		75 (40-99)
Quemados	15	81 (75-85)	80 (70-90)	21,5 (17 - 52)
Hemodializados	22	83,0 (60-105)	—	88,0 (55-120)
Sépticos	45	29 (15 - 120)	—	71 (25-140)
Dicumarínicos	30	91 ± 6,9	97,5 ± 9,7	98,1 ± 5,2
Heparina	26	94,8 ± 6,5	95,6 ± 7,4	93,0 ± 1,5
Hiperhomocisteinemia	20	95 (60-115)	—	104 (58-130)

El estudio del HCII en patologías que conllevan a una gran activación del sistema de coagulación, con importante generación de trombina como en pacientes sépticos y quemados, reveló que en los pacientes quemados si bien se produce un descenso de la actividad de HCII, esta disminución no es tan importante como la de ATIII. Este hecho indicaría que la ATIII se desempeñaría

como el principal inhibidor de trombina en esta patología, mientras que el HCII desarrollaría un papel secundario en la inhibición de trombina.

Al estudiar los pacientes sépticos observamos un marcado descenso de HCII, aún mas importante que la disminución de ATIII. En este tipo de pacientes el descenso de HCII se debería a la combinación de dos eventos : por un lado el consumo del inhibidor y por otro la degradación proteolítica del HCII por acción de las elastasas leucocitarias y otras proteasas liberadas al medio.

Durante el embarazo, se observa un incremento significativo en los niveles de HCII, a diferencia de los de ATIII que sufren un descenso. El incremento del HCII acompañado de la presencia de su potenciador en circulación, podrían indicar que el HCII desempeñaría un papel fisiológico importante en el proceso de inhibición de trombina durante la gestación.

En procesos fisiopatológicos que muestran un estado protrombótico como la diabetes, hiperhomocisteinemia, hemodiálisis, los niveles plasmáticos de HCII presentan una ligera disminución en su actividad.

EL DERMATAN SULFATO EN LAS PATOLOGIAS ESTUDIADAS

El Dermatóan Sulfato es un glicosaminoglicano sintetizado por los fibroblastos localizado en el subendotelio, el cual normalmente no se detecta en circulación. Se postula que es necesario que ocurra la disrupción del endotelio vascular para que el GAG pase al torrente sanguíneo. Siendo el Dermatóan Sulfato el potenciador específico del HCII su presencia en plasma favorecería la acción del mismo.

A partir de las determinaciones de actividad de Dermatóan Sulfato construimos el siguiente cuadro comparativo.

Tabla N° 21. Niveles plasmáticos de actividad de DS

	<i>n</i>	DS (µg/ml)
Embarazadas	30	1,15 (0,0-3,7)
Quemados	15	0,5 (0,0 - 1,3)
Hemodializados	22	0,306 (0,0 - 1,5)
Sépticos	45	1,9 (0,004-3,4)
Pacientes añosos	20	1,8 (0,0-2,9)
Control	50	no detectable

La tabla presenta los niveles plasmáticos de DS en diversas patologías expresados en mediana y rango.

Los niveles plasmáticos más elevados de dermatán sulfato en patologías se encontraron en los pacientes sépticos, con valores que alcanzan al 3,4 µg/ml. Los pacientes sépticos muestran activación de diversos sistemas como el de coagulación, fibrinolítico, calicreínas-quininas, complemento, etc, que liberarían distintos intermediarios moleculares, los cuales tendrían como blanco a la célula endotelial ²¹⁶. Este hecho sumado a la estimulación de los fibroblastos subendoteliales se reflejaría en la elevación de los niveles plasmáticos de actividad de dermatán sulfato.

Los pacientes quemados presentaron niveles elevados de DS en circulación pero no correlacionaron con la severidad de la quemadura. El 93,3% de los pacientes estudiados presentaron actividad de DS.

Si bien en los pacientes hiperhomocisteinémicos se detectó actividad de dermatán sulfato en plasma, este ascenso se debería a un proceso propio del envejecimiento, ya que el grupo control de la misma edad presentó también niveles elevados de DS.

Hasta el momento, el único estado fisiológico descrito con presencia de Dermatan Sulfato circulante es en el embarazo y en sangre de cordón umbilical²⁰³ debido a que se produce un importante desarrollo de la angiogénesis. El 92 % de las embarazadas estudiadas mostraron altos niveles de DS, alcanzando valores de hasta 3,7 µg/ml.

El ascenso de los niveles de Cofactor II de la Heparina y dermatán sulfato en las embarazadas sugeriría un importante rol fisiológico del HCII durante la gestación.

CONCLUSIONES

El Cofactor II de la Heparina (HCII) es un inhibidor fisiológico del sistema de coagulación, miembro de la familia de las serpinas, que inhibe específicamente trombina, meizotrombina y quimiotripsina. Como toda serpina, su acción es potenciada por los glicosaminoglicanos, principalmente el dermatán sulfato, un proteoglicano fisiológico sintetizado por los fibroblastos subendoteliales. El dermatán sulfato potencia más de 1000 veces la inhibición de trombina y meizotrombina, mientras que no modifica su actividad sobre quimiotripsina. El HCII presenta gran homología estructural y funcional con la ATIII, su concentración plasmática es 1,2 μM con una vida media en circulación de 2,5 días.

Dado que en la literatura no estaban descriptos los valores de referencia de este inhibidor para la población de la Argentina, determinamos los niveles de actividad y antigenicidad del HCII en la Ciudad de Buenos Aires. **Los intervalos de referencia determinados para la actividad y antigenicidad del HCII fueron : 75-120% actividad y 70-130% antigenicidad.** El rango de referencia establecido es amplio cuando se lo compara con otros inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación, el cual es coincidente con lo reportado por Tran y el proyecto VITA para poblaciones europeas.

La similitud de las propiedades fisicoquímicas y de la vida media de la ATIII y el HCII explicaría el descenso paralelo de estas proteínas en la mayoría de los estados fisiopatológicos .

Con el fin de dilucidar los probables mecanismos antitrombóticos mediados por el HCII se estudiaron los niveles de este inhibidor en diversos procesos fisiopatológicos.

A partir de los resultados obtenidos observamos que la actividad de HCII en embarazadas normales, con mas de 30 semanas de gestación, se encuentra significativamente elevada, alcanzando valores de hasta 160%.

Estos niveles coinciden con trabajos recientemente publicados. En la mayoría de los estados fisiopatológicos los niveles de HCII acompañan a los de ATIII, pero no en el embarazo. **Esta inusual elevación del HCII, nos permite postular que esta serpina desempeñaría una importante función en el proceso inhibitorio de trombina durante la gestación, el cual estaría favorecido por los elevados niveles de actividad de dermatán sulfato detectados en estas pacientes.**

En los estudios realizados en pacientes quemados (quemadura tipo AB y B), en los cuales se produce una gran activación del sistema de coagulación que se evidencian por la elevación de los marcadores de activación (TAT, F1+2, FPA) y un brusco descenso de los inhibidores (PC, PS y ATIII), **los niveles de actividad del HCII se encuentran ligeramente disminuidos, aún cuando se detecta actividad de dermatán sulfato en circulación.** Esto indicaría que al generarse grandes cantidades de trombina, la ATIII actuaría como principal inhibidor, conjuntamente con el sistema de la PC. Si bien el HCII inhibe específicamente trombina, desempeñaría un papel secundario en esta patología. En la bibliografía no se encuentran reportes sobre los niveles de HCII y dermatán sulfato en quemados.

En los pacientes sépticos, se desarrolla activación de diversos sistemas interrelacionados con liberación de mediadores celulares. El $\text{TNF}\alpha$ e interleuquinas liberados por los macrófagos, la estimulación de la célula endotelial con exposición del factor tisular, la acción de distintos mediadores que inducen a la adhesión y migración de los leucocitos al sitio de lesión, donde los neutrófilos se degranulan liberando diversas proteasas denominadas enzimas simil elastasa, son mecanismos bien estudiados en esta patología.

De los datos obtenidos de pacientes sépticos llama la atención el descenso importante de la actividad de HCII en relación a la disminución de

los inhibidores ATIII, PC y PS y la detección de actividad de dermatán sulfato en circulación.

El descenso del HCII se debería a la suma de dos mecanismos: por un lado la degradación del inhibidor por elastasas leucocitarias liberadas de los polimorfonucleares y por otro lado, a un mayor consumo del HCII debido a la presencia plasmática de su potenciador. En la bibliografía no se reportan niveles de HCII y dermatán sulfato plasmático en pacientes sépticos sin coagulación intravascular diseminada.

Los pacientes en hemodiálisis sufren múltiples alteraciones del sistema hemostático que conducen a complicaciones de sangrado y/o estados hipercoagulables. En estos pacientes se produce la elevación de productos urémicos que modifican la funcionalidad de las plaquetas. Otros factores importantes que alteran el balance hemostático estarían relacionados con la pérdida urinaria de proteínas .

En los pacientes en hemodiálisis se observó niveles plasmáticos de HCII disminuidos, similares a los de actividad de ATIII. No se encontró correlación con el índice de adecuación de diálisis, tiempo en diálisis o rehuso de los filtros , ni relación con la patología de base. **En estos pacientes se destaca la presencia de actividad de dermatán sulfato en circulación, que colaboraría con la actividad antitrombínica del HCII.**

Los estudios realizados en la población de **pacientes con tratamiento anticoagulante oral crónico y con heparina no fraccionada** revelan que **el nivel de actividad del HCII se mantiene dentro del rango de referencia.**

Debido a la asociación entre la hiperhomocisteinemia y la patología vascular (trombosis venosa o arterial) y considerando que la trombosis es un proceso desencadenado por múltiples factores, determinamos la actividad de HCII como

un inhibidor de trombina, en pacientes hiperhomocisteinémicos. **Los elevados niveles de homocisteína en el plasma no modifican la actividad de HCII, aunque en estos pacientes se detecte actividad de dermatán sulfato en circulación.** La hiperhomocisteinemia actualmente es objeto de múltiples investigaciones, sin embargo la bibliografía no refiere niveles de HCII ni dermatán sulfato en estos pacientes.

Dada la variación de los niveles de actividad de HCII en las distintas patologías estudiadas, resultó interesante investigar *in vitro*, en sistemas puros, cuáles eran las condiciones que favorecían la actividad antitrombínica del HCII. En primer lugar se consideró fundamental trabajar con concentraciones del inhibidor similares a las fisiológicas, ya que en las publicaciones las concentraciones de trabajo son distintas a las que presentaría este inhibidor en procesos fisiopatológicos.

Encontramos que la capacidad del HCII de inhibir trombina en ausencia de su potenciador es casi nula, presentando un período de latencia inicial que permitiría suponer un cambio conformacional que expondría el sitio activo oculto en la estructura de la molécula del HCII.

Se determinó la acción de los potenciadores, la cual reveló que la actividad del HCII aumenta significativamente en presencia de DS no fraccionado y de bajo peso molecular en forma dependiente de su concentración. En cambio la acción de la heparina no fraccionada y de bajo peso molecular no potencian al HCII en las concentraciones terapéuticas.

Los ensayos de consumo de HCII *in vitro* revelaron que éste aumenta de 15 a 71% por la presencia del potenciador (DS 100 µg/ml).

Normalmente el dermatán sulfato no se encuentra en circulación, mientras que **en los diversos estados fisiopatológicos estudiados se detectó actividad de**

DS. La concentración de 0,0025 mg/ml de DS utilizada en algunos ensayos *in vitro* coincide con la detectada en estas patologías, con lo que extrapolando podríamos concluir que la pequeña cantidad de dermatán sulfato liberada a circulación en estos estados produciría un efecto potenciador del HCII *in vivo*.

Los estudios cinéticos en los que se ensayó un amplio rango de concentraciones de trombina revelaron que el HCII (concentración fisiológica) **inhibe más eficientemente pequeñas cantidades de trombina (hasta 30 nM), aún en la presencia del DS. Este hecho sumado a que el HCII potenciado por DS inhibe meizotrombina, favorece la hipótesis de que el HCII desarrollaría una importante función antitrombínica cuando el proceso de generación de trombina recién comienza, mediante el bloqueo del intermediario meizotrombina y de las pequeñas concentraciones de trombina.**

Este hallazgo *in vitro* podría explicar los resultados encontrados *in vivo* como el leve descenso de HCII en patologías con generación de trombina, como pacientes quemados y hemodializados.

El aumento de la concentración de HCII en procesos de inhibición de trombina *in vitro* (entre 150 a 200%) mostró sólo un ligero incremento en la actividad máxima de la serpina. Es interesante destacar que concentraciones de HCII superiores a 100% se pueden detectar durante el embarazo.

El estudio del HCII plasmático mediante SDS-PAGE/ Western- Blot reveló una banda mayoritaria de 65.600 D de peso molecular y destacó la presencia de HCII en las bandas de alto peso molecular, revelando con antisuero policlonal anti-HCII. En la bibliografía no se reporta la presencia de HCII en

estas bandas de estas bandas, quizás debido a que los autores utilizan HCII purificado o plasmas desfibrinados.

Las investigaciones de estas bandas, mediante la doble electroforesis, mostraron que el agregado macromolecular estaría conformado por HCII unido a otra proteína plasmática. La identidad de esta proteína se reveló mediante la utilización de distintos anticuerpos, observándose que las bandas de alto PM presentan la misma movilidad electroforética y posición que las del fibrinógeno.

Podemos concluir así que, el SDS-PAGE/ Western Blot de plasma humano revelado con antisuero policlonal anti-HCII muestra una banda de movilidad similar al HCII testigo y otra en la una zona de alto peso molecular, que corresponde un agregado macromolecular HCII - fibrinógeno. Modificaciones en la estructura del fibrinógeno permiten la liberación del HCII del agregado macromolecular.

A partir de estos hallazgos nos resultó interesante estudiar la modulación de la interacción HCII - trombina - DS *in vitro*, por distintas proteínas plasmáticas, principalmente el fibrinógeno, concluyendo que:

La presencia de fibrinógeno disminuye la actividad antitrombínica máxima del HCII, aún en presencia del potenciador. Al preincubar fibrinógeno a distintas con HCII el efecto modulador del mismo se acentúa disminuyendo un 45% respecto del control, indicando que existiría una interacción entre el fibrinógeno y la serpina. Esta interacción no afectaría el sitio activo ya que inicialmente la actividad del HCII es similar; en cambio, sí limita la funcionalidad máxima de la serpina. Este comportamiento sugiere que el fibrinógeno disminuiría el número de moléculas de HCII activas disponibles para la interacción HCII - trombina.

Cuando el fibrinógeno se preincuba con DS, la modulación es menor, lo cual sugiere que el DS impediría la interacción, posiblemente por competición. Sin embargo una vez producida la unión HCII - fibrinógeno, el DS no desplazaría al fibrinógeno de su unión al HCII. Al aumentar la concentración de fibrinógeno al triple, se evidencia un efecto modulador negativo (30%).

La modulación ejercida por el fibrinógeno es tiempo y concentración dependiente, sugiriendo que al estar presente un mayor número de moléculas de fibrinógeno, habría una mayor interacción, la cual se favorecería por la prolongación del tiempo de incubación.

En la electroforesis SDS-PAGE/ Western Blot de la preincubación (*in vitro*) de las diferentes proteínas mostró la unión del HCII al fibrinógeno, evidenciada por la aparición de bandas de alto peso molecular reveladas con antisuero anti-HCII.

Los estudios electroforéticos realizados demostraron que fisiológicamente un porcentaje del HCII circula unido al fibrinógeno. Los ensayos diagramados *in vitro* para el estudio cinético del HCII nos permitió demostrar la interacción entre este inhibidor y el fibrinógeno, la cual modularía la actividad antitrombínica de esta serpina. El análisis electroforético de estos ensayos confirmó la formación del agregado macromolecular responsable de la disminución de la funcionalidad máxima del HCII .

El fibrinógeno es una proteína reactante de fase aguda, como tal aumenta su síntesis en procesos como infección, inflamación, sepsis, cáncer, etc., indicando que en estas patologías habría una mayor interacción entre fibrinógeno y HCII resultando en una menor disponibilidad plasmática de la capacidad antitrombínica de HCII.

El fibrinógeno actuaría como proteína transportadora de una pequeña proporción de HCII plasmático, de esta manera se aseguraría la presencia del HCII en los procesos fisiológicos que generan trombina.

A partir de los estudios realizados observamos que modificaciones en la estructura del fibrinógeno produciría la liberación del HCII del agregado macromolecular. La acción de la trombina sobre el fibrinógeno permitiría la liberación del HCII en el sitio de lesión, de esta manera el HCII desarrollaría su función de inhibiendo meizotrombina y las pequeñas cantidades de trombina en cercanía a los glicosaminoglicanos del subendotelio, cuando el proceso de generación de trombina recién comienza.

Los hallazgos más importantes de esta tesis son la comprobación de que fisiológicamente un porcentaje del Cofactor II de la Heparina circula en plasma unido al fibrinógeno y que cuando la estructura del fibrinógeno es modificada, el Cofactor II de la Heparina es liberado del complejo macromolecular.

La cantidad de Cofactor II de la Heparina unido depende de la concentración de fibrinógeno presente.

La formación de este agregado disminuye la funcionalidad máxima del Cofactor II de la Heparina aún en presencia de su potenciador, el dermatán sulfato.

**DIFUSION
DE LOS
RESULTADOS**

PUBLICACIONES EN REVISTAS CON ARBITRAJE

1- “Cofactor II de la Heparina (HCII), un inhibidor de trombina cuyo rol fisiológico no está completamente esclarecido”.

Rossi E., Duboscq C y Kordich L

Revista Medicina. En prensa

2- “Cofactor II de la Heparina, valores de referencia, consumo en presencia de distintos glicosaminoglicanos”.

Duboscq C., Quintana I., Rossi E. y Kordich L.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1995, volumen XXIX, N°. 4 485-492.

3- “Increased Dermatan sulfate plasmatic levels in burnt patients”

Rossi E, Duboscq C, Peragallo M, Kordich L

Enviado a Hemostasis

4- “Serial measurement of physiological coagulation inhibitors in burnt patients”

Rossi E., Duboscq C, Peragallo M, Kordich L

Enviado a Burns

TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS Y RESUMENES PUBLICADOS EN REVISTAS DE PUBLICACION PERIODICA

1- "Cofactor II de la Heparina y Dermatan Sulfato en pacientes en hemodiálisis"

Rossi E, Porterie P, Vavich R, Cavalli N, Kordich L (Presentación personal)

ILIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata.
Noviembre 1998

Publicado en : Medicina 1998 ; 58 (2) ; 589

2- "Acción del fibrinógeno en la modulación de la actividad inhibitoria de trombina del Cofactor II de la Heparina"

Rossi E, Duboscq C, Kordich L. (Presentación personal)

ILIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata.
Noviembre 1998

Publicado en: Medicina 1998 ; 58 (2) ; 589

3- "Niveles plasmáticos de Cofactor II de la Heparina y Dermatan Sulfato en embarazadas normales".

Rossi E, Lauricella AM, Perego MC, Riuz B. y Kordich L. (Presentación personal)

III Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis del Grupo CHAT.
Noviembre de 1998

4- "Fibrinogen modulates Heparin Cofactor II (HCII) antithrombin activity"

E. Rossi, Duboscq C, Kordich L.

Combined Haematology Congress ISH-EHA (International Society of Hematology- European Haematology Association

Amsterdam. Holanda. 4 al 8 de Julio de 1998

Publicado en : British Journal of Haematology 1998; 102 (1) : 138

5- "Heparin Cofactor II (HCII) and Dermatan Sulfate plasmatic levels in acute burnt patients".

Rossi E., Duboscq D., Peragallo M., Kordich L.

XVIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.

Florenca. Italia. 6 al 12 de Junio de 1997

Publicado en: Thrombosis and Haemostasis, supplement June 1997, p435.

6- "Niveles plasmáticos de Cofactor II de la Heparina y Dermátan Sulfato en pacientes quemados"

Rossi E., Duboscq C., Peragallo M., Kordich L. (presentación personal)

II Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis.

Mar del Plata, Noviembre de 1996

7- "Cofactor II de la Heparina en pacientes quemados"

Rossi E., Peragallo M., Quintana I. y Duboscq C. (presentación personal, exposición oral).

VI Jornadas Científicas del Hospital de Quemados, VIII Jornadas de Normalización del Tratamiento del Paciente Quemado.

Buenos Aires, Mayo de 1996

8- "Inhibidores fisiológicos del sistema de coagulación en pacientes quemados".

E. Rossi, M. Peragallo, I. Quintana y C. Duboscq.

XIV Congreso Internacional de Hemostasis y Trombosis del Grupo CLAHT.

Punta del Este. 21 al 24 de Noviembre de 1995

Publicado en : Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia, 8 Supl. 3 : 102, 1995

9- "Actividad del Cofactor II de la Heparina en pacientes anticoagulados"

Duboscq C., Quintana I., Rossi E., Porterie P. Kordich L.

XII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica.

Buenos Aires, Setiembre de 1995.

Mención especial cinco mejores poster del Congreso

Publicado en : Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1995, vol. XXIX, Nro. 3, 420.

10- "Actividad del Cofactor II de la Heparina y concentración de Dermatán Sulfato en pacientes sépticos"

Duboscq C., Rossi E., Quintana I. y Kordich L.

XXXIX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. 1994

Publicado en: Revista Medicina 1994, vol. 54 nro. 5/2; 509.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Briginshaw GF, Shanberge JN. Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. Separation and partial purification.
Arc. Biochem Biophys 1974; 161: 683-90.
- 2- Abildgaard U.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1967,19 : 190.
- 3- Briginshaw GF, Shanberge JN. Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. Separation and partial purification.
Arc. Biochem Biophys 1974; 161: 683-90.
- 4- Tollefsen DM, Blank MK. Detection of a new Heparin-dependent inhibitor of Thrombin in human plasma.
J Clin. Invest. 1981, 68: 589-96.
- 5- Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin Cofactor II purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human.
The Journal of Biological Chemistry 1982; 257, 5: 2161-9.
- 6- Tollefsen DM, Pestka CA, Mofano WJ. Activation of Heparin Cofactor II by Dermatan Sulfate.
J. Biol. Chem. 1983; 258: 6713-6.
- 7- Sié P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B. Constitutional Heparin Cofactor II deficiency associated with recurrent thrombosis.
The Lancet 1985; 24: 414-20.
- 8- Tollefsen DM, Pestka C. Heparin Cofactor II activity in patients with Disseminated Intravascular Coagulation and hepatic failure.
Blood 1985; 66: 769-74.
- 9- Church FC, Noyes CM, Griffith MJ. Inhibition of chymotrypsin by heparin cofactor II.
Proc. Natl Acad. Sci U.S.A. 1985; 82: 6431-4.
- 10- Inhom RC, Tollefsen DM. Isolation and characterization of a partial cDNA clone for Heparin Cofactor II.
Biochem. Biophys. Res. Com. 1986; 137: 431-6.
- 11- Han JH, Coté HCF, Tollefsen DM. Inhibition of meizothrombin and meizothrombin(desF1) by Heparin Cofactor II.
J Biol Chem 1997; 272: 28660-5.
- 12- Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H Ed. Hematology basic principles and practice 3rd ed Livingstone: Churchill : Pp 1213. 1991
- 13- Bode W, Brandstetter H, Mather T, Stubbs M. Comparative analysis of haemostatic proteinases: structural aspects of thrombin, factor Xa, factor IXa and protein C.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 501-11.
- 14- Sánchez Avalos JC, Fisiología de la hemostasia en: Manual de Hemostasia y Trombosis del Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis, Eds Kordich LC, Sánchez Avalos JC, Vidal H, De Campos Guerra C. 1990, p 3
- 15- Calvete JJ. Integrina GPIIb/IIIa, un receptor plaquetario de doble sentido: Unión de fibrinógeno, mecanismo de señalización y antagonistas naturales.
Rev. Iberoamer de Tromb Hemostasia 1995; 8: 1-12.

- 16- Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 611-16.
- 17- Brass LF, Manning RD, Cichowski K, Abrams CS. Signalling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 581-9.
- 18- Shattil SJ, Gao J, Kashiwagi H. Not just another pretty face: regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 220-5.
- 19- Du X, Ginsberg MH. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and platelet function.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 96-100.
- 20- Fox JEB. Platelet activation: new aspects.
Haemostasis 1996; 26 (suppl 4): 102-31.
- 21- Sixma JJ, van Zanten H, Huizinga EG, van der Plaquetas M, Verkley M, Wu YP, Gros P, de Groot PG. Platelet adhesion to collagen: an update.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 434-8.
- 22- Akkerman JWN, van Willigen G. Platelet activation via trimeric GTP-binding proteins.
Haemostasis 1996; 26 (suppl 4): 199-209.
- 23- Moroi M, Jung SM. Platelet receptors for collagen.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 439-44.
- 24- Ganguli P. Binding of Thrombin to functionally defective platelets: A hypothesis on the nature of the thrombin receptor.
J Biol Hematol 1997; 7: 47-51.
- 25- Jamieson GA, Okumura T. Reduced thrombin-binding and aggregation in Bernard Soullier platelets.
J Clin Invest 1978; 1: 861-4.
- 26- Jandrot-Perrus M, Rendu F, Caen JP, Levy-Toledano S, Guillin MC. The common pathway for alpha and gamma thrombin induced platelet activation is independent of GPIb: A study of Bernard-Soulier platelet.
Br J Haematol 1990; 5: 385-92.
- 27- De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, Fenton JW, Jandrot-Perrus M, Bouton MC, et al. Thrombin Interaction with platelet membrane glycoprotein Ib.
Semin Thromb Haemost 1996; 2: 151-6.
- 28- Vu T, Wheaton V, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. Domains specifying Thrombin-receptor interaction.
Nature 1991; 353: 674-7.
- 29- Steven M, Seiler. Thrombin Receptor Antagonists.
Semin Thromb Haemost 1996; 22, 3: 223-32.
- 30- Zhong C, Hayzer DJ, Corson MA, Runge MS. Molecular Clonning of the rat vascular smooth muscle Thrombin Receptor: evidence for in vivo regulation by basic fibroblast growth factor.
J Biol Chem 1992; 267: 16975-9.

- 31- Glembostski CC, Irons, CE, Krown KA, Murray SF, Sprenkle AB, Sei CA. Myocardial alpha-thrombin receptor activation induces hypertrophy and increases atrial natriuretic factor gene expression.
J Biol Chem 1993; 268: 20646-52.
- 32- Norton KJ, Scarborough RM, Kutok JL, Escobedo M, Nannizzi L, Collier BS. Immunologic analysis of the cloned platelet thrombin receptor activation mechanisms: Evidence supporting receptor cleavage, release of the N-terminal peptide, and insertion of the tethered ligand into a protected environment.
Blood 1993; 82: 2125-36.
- 33- Mathews I, Padmanabhan KP, Ganesh V, Tulinsky A, Ishii M, Chen J, et al. Crystallographic structures of Thrombin complexed with thrombin receptor peptides: existence of expected and novel binding modes.
Biochemistry 1994; 33: 3266-79.
- 34- Kinlough-Rathbone RL, Rand ML, Packham MA. Rabbit and rat platelets do not respond to thrombin receptor peptides that activate human platelets.
Blood 1993; 82: 103-6.
- 35- Lau LF, Pumiglia K, Côté HCF YP, Feinstein MB. Thrombin receptor agonist peptides, in contrast to thrombin itself, are not full agonist for activation and signal transduction in human platelets in the absence of platelet-derived secondary mediators.
Biochem J 1994; 303: 391-400.
- 36- Ishii K, Chen J, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, et al. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor Kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases.
J Biol Chem 1994; 269: 1125-30.
- 37- Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin.
Thromb Haemost 1995; 74: 218-23.
- 38- Brass LF, Pizarro S, Ahuja M, Belmonte E, Stadel J, Hoxie JA. Changes in structure and function of the human thrombin receptor during activation, internalization and recycling.
J Biol Chem 1994; 269: 2943-52.
- 39- Brass LF. Homologous desensitization of HEL cell thrombin receptors distinguishable roles for proteolysis and phosphorylation.
J Biol Chem 1992; 267: 6044-50.
- 40- MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier.
Nature 1964; 202: 498-9.
- 41- Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood coagulation.
Science 1964; 145: 1310-2.
- 42- Davie E. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade.
Thrombosis and Haemostasis 1995; 74 (1): 1-6
- 43- Bauer KA. Activation of the factor VII-tissue factor pathway.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 108-111

- 44- Andree HAM, Nemerson Y. Tissue factor: regulation of activity by flow and phospholipid surfaces.
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1995; 6: 189-197.
- 45- Nemerson Y. Tissue Factor: Then and now.
Thromb. Haemost. 1995; 74 (1): 180-4
- 46- Morrissey JH, Neuenschwander PF, Huang Q, McCallum CD, Su B, Johnson AE. Factor VIIa-Tissue factor : functional importance of protein-membrane interactions.
Thromb. Haemost. 1997; 78 (1): 112-16
- 47- Banner DW. The factor VIIa/tissue factor complex.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 512-515.
- 48- Cooper DN, Millar DS, Wacey A, Pemberton S, Tuddenham EGD. Inherited factor X deficiency: molecular genetics and pathophysiology.
Thromb Haemost 1997; 78 (1) 161-172
- 49- Dachary-Prigent J, Toti F, Satta N, Pasquet JM, Uzan A, Freyssinet JM. Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin.
Sem in Thromb and Hemostas 1996; 22/2 : 157-164.
- 50- Rosing J, Tans G. Coagulation factor V: An old star shines again.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 427 - 433
- 51- Esmon CT, Jackson CM. The conversion of prothrombin to thrombin III. The factor Xa-catalyzed activation of prothrombin.
J. Biol. Chem 1974; 249: 7782-90.
- 52- Krishnaswamy S, Mann KG, Nesheim ME. The prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin proceeds through the intermediate meizothrombin in an ordered, sequential reaction.
J Biol Chem 1986; 261: 8977-84.
- 53- Krishnaswamy S, Church WR, Nesheim ME, Mann KG. Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism.
J Biol Chem 1987; 262: 3291-9.
- 54- Bovill EG, Tracy RP, Hayes TE, Jenny RJ, Bhushan FH, Mann KG. Evidence that meizothrombin is an intermediate product in the clotting of whole blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 12: 754-8.
- 55- Broze GJ, Gailani D. The role of factor XI in coagulation.
Thromb Haemost 1993; 70 (1): 72-74
- 56- Rokjaer R, Hasan AMINOÁCIDOS, Motta G, Schousboc J, Schmaier AH. Factor XII does not initiate prekallikrein activation on endothelial cells
Thrombosis and Haemostasis 1997; 80: 74-81
- 57- Schmaier AH. Contact activation: a revision.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 101-107.
- 58- Bithell TC. Blood coagulation. En Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Wintrobe's Clinical Hematology. Tomo I . Londres. Ed Lea & Febiger, 1993, 9na edición. Pag 566-615

- 59- Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, Bode W, Vlodavsky I. Thrombin as a multifunctional protein. Induction of cell adhesion and proliferation.
Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 6:
- 60- Fenton JW II. Thrombin functions and antithrombotic intervention.
Thromb Haemost 1995; 74 (1): 493-8.
- 61- Guillin MC, Bezeaud A, Bouton MC, Jandrot-Perrus M. Thrombin specificity. *Thromb Haemost* 1995, 74 (1): 129-133.
- 62- Tulinsky A, Qiu X. Active site and exosite binding of alpha thrombin
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1993; 4: 305-12
- 63- Tulinsky A. Molecular interaction of thrombin
Seminars in Thrombosis and Haemostasis 1996; 22 (2) : 112-124
- 64- Binnie CG, Lord ST The fibrinogen sequences that interact with thrombin.
Blood 1993; 12: 3186 - 3192
- 65- Côté HCF, Bajzar L, Stevens WK, Samis JA, Morser J, MacGillivray RTA, Nesheim ME. Functional characterization of recombinant human meizothrombin and meizothrombin(desF1).
The Journal of Biological Chemistry 1997; 272 (10): 6194-6200.
- 66- Guillin MC, Bezeaud A. Thrombin derivatives obtained by autolytic or limited tryptic cleavage.
Sem in Thromb and Hemostas 1992; 18 (2): 224-9
- 67- Van Deerlin VM, Tollefsen DM. The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans.
J Biol Chem 1991; 266: 20223-31
- 68- Bar-Shavit R, Eldor A, Vlodavsky I. Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix. Protection and expression of functional properties.
J Clin Invest 1989; 84: 1096-1104.
- 69- Kumar R, Béguin S, Hemker C. The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation- Evidence of feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin
Thrombosis and Haemostasis 1994; 72 (5): 713-21
- 70- García JGN, Verin AD, Schaphorst KL. Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability.
Seminars in Thrombosis and Haemostasis 1996 ; 22 (4) : 309-15
- 71- García JGN, Pavalko FM, Patterson CE. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin.
Blood Coag Fibrinol 1995; 6: 609-26.
- 72- Hatton MWC, Moar SL. A role of pericellular proteoglycan in the binding of thrombin or antithrombin III by the blood vessel endothelium. The effects of proteoglycans-degrading enzymes and glycosaminoglycan-binding proteins on 125I-thrombin binding by rabbit thoracic aorta in vitro.
Thromb Haemost 1985; 53: 228-234.
- 73- DeMichele MA, Minnear FL. Modulation of vascular endothelial permeability by thrombin.
Seminars in Thrombosis and Haemostasis 1992; 18 (3): 287-295.

- 74- Comp P, Esmon CT. Regulatory mechanisms in hemostasis : Natural anticoagulants. In : Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H. Hematology basic principles and practice 3rd edition. Livingstone. Churchill. Pp1245-1251.
- 75- Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coag Fibrinol* 1995; 6 (1): S7-13.
- 76- Rapaport S, Rao VM. The tissue factor pathway: how it has become a "Prima ballerina". *Thromb Haemost* 1995; 74 (1): 7-17.
- 77- Sandset PM. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) - an update. *Haemostasis* 1996; 26 (4): 154-65.
- 78- Sandset PM, Bendz B. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Clinical deficiency states. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 467-70.
- 79- Osterud B. Tissue factor : a complex biological role. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78 (1): 755-8
- 80- Lindhout T, Salemink I, Valentin S, Willems G. Tissue factor pathway inhibitor : regulation of its inhibitory activity by phospholipid surface. *Hemostasis* 1996; 26 (4): 89-97
- 81- Sandset PM, Warm-Cramer BJ, Maki SL, Rapaport SI. Immunodepletion of extrinsic pathway inhibitor (EPI) sensitizes rabbits to disseminated intravascular coagulation induced with tissue factor : evidence supporting a physiologic role for EPI as a natural anticoagulant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 708-12.
- 82- Sandset PM, Warm-Cramer BJ, Maki SL, Rapaport SI. Immunodepletion of extrinsic pathway inhibitor sensitizes rabbits to endotoxin-induced intravascular coagulation and the generalized Schwartzman reaction. *Blood* 1991; 78: 1496-502.
- 83- Hendl SM, España F, Andrés C, Gilabert J, Estellés A, Aznar J. Trombomodulina y sistema de la proteína C. *Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia* 1990; 1: 1-6
- 84- Sadler JE. Trombomodulin structure and function. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 392-5.
- 85- Esmon CT, Ding W, Yasuhiro K, Gu JM, Ferrel G, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mather T, Iaszi Z, Esmon NL. The Protein C Pathway: New insights. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 70 - 4
- 86- De Stefano, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996; 87 (9): 3531-44
- 87- Reitsma C. Protein C deficiency from gene defects to disease. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78 (1): 344 - 50
- 88- Dahlbäck B. Resistance to activated Protein C caused by the factor V R506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 483-488.

- 89- Bertina R. Laboratory diagnosis of resistance to activated protein C, (APC-resistance)
Thrombosis and Haemostasis 1997; 78 (1): 478-82
- 90- Dahlbäck B. Protein S and C4b-binding protein: components involved in the regulation of the protein C anticoagulant system.
Thromb Haemost 1991; 66 (1) 49-61.
- 91- Sala N, Espinosa Parrilla Y, Norell M, Souto JC, Heine-Suñer D, Borrel M, Estivill X, Fontcuberta J. Relación entre el genotipo y el fenotipo de los distintos tipos de déficit de proteína S. Complejidad del tipo III. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 1997; 10 (1): 125-132.
- 92- Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium.
Thrombosis and Haemostasis 1997; 77 (3) 408-23)
- 93- Shen L, Dahlback B. Factor V and Protein S as Synergistic Cofactors to Activated Protein C in degradation of Factor VIIIa.
J Biol Chem 1994; 269 (29): 18735-8.
- 94- Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to Factor Va Associated with Inhibition of Prothrombinase That Is Independent of Activated Protein C.
J Biol Chem 1993; 268 (4): 2872-7.
- 95- Borgel D, Gandrille S, Aiach M. Protein S Deficiency.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 351-6.
- 96- Pratt CW, Church F. General features of the heparin-binding serpins antithrombin, heparin cofactor II and protein C inhibitor
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1993; 4: 479-90
- 97- Olds RJ, Lane DA, Mille B, Chowdhury V, Lay Thein S. Antithrombin: the principal inhibitor of thrombin.
Seminars in Thrombosis and Hemostasis 1994; 20: 353-72.
- 98- Carrell R, Skinner R, Jin L, Abrahams JP. Structural mobility of antithrombin and its modulation by heparin.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 516-9.
- 99- Gils A, Declerck PJ. Structure-function relationships in serpins : currents concepts and controverisies.
Thrombosis and Haemostasis 1998; 80: 531-41
- 100- Rosemberg RD, Damus PS : the purification and mechanism of action of human antithrombin- heparin cofactor
J Biol. Chem. 1973; 248: 6490-6505
- 101- Rao LVM, Nordfang O, Hoang AD, Pendurthi UR. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/Tissue Factor activity on cell surfaces. Comparision with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity.
Blood 1995; 85 (1): 121-129.
- 102- Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike R, Carrel RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin.
Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94: 14683-88
- 103- Olson ST, Björk I. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin
Sem in Thromb and Hemostas 1994; 20 (4): 373-409.

- 104- Olson ST, Björk I. Role of protein conformational changes, surface approximation and proteins cofactors in heparin-accelerated antithrombin-proteinase reactions. En: Lane D. A., Björk I, Lindahl U., Eds Heparin and related polysaccharides. Vol 313. New York: Plenum Press, 1992, p 155-165.
- 105- Prat CW, Whinna HC, Church FC. A comparison of three heparin-binding serine protease inhibitors.
J Biol Chem 1992; 267: 8795-801.
- 106- Thumberg L, Backstrom G, Lindahl U. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin.
Carbohydr. Res 1982; 100: 393-410
- 107- Patston P, Gettins PGW, Schapira M. The mechanism by which serpins inhibit thrombin and other serine proteases.
Ann NY Acad Sci 1992 : 13- 20.
- 108- Rosendaal FR. Thrombosis in the young: Epidemiology and risk factors. A focus on venous thrombosis.
Thrombosis and Haemostasis 1997; 78 (1): 1-6
- 109- Van Boven HH, Vandenbroucke JP, Westendorp RGJ, Rosendaal FR. Mortality and causes of death in inherited antithrombin deficiency.
Thromb Haemost 1997; 77 (3): 452-5
- 110- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: part 1
Thromb Haemost 1996; 76 (5): 641-62
- 111- Sié P, Lansen J, Lacheretz F, Verschuere B, Boneu B. Comparative tum-over of Heparin Cofactor II and Antithrombin III in baboons.
Thromb Haemost 1986; 56 (3): 302-7.
- 112- Blinder MA, Marasa JC, Craig HR, Deaven LL, Tollefsen DM. Heparin Cofactor II: cDNA sequence, chromosome localisation, restriction fragment length polymorphism, and expression in *Escherichia coli*.
Biochemistry 1988; 27: 752-9
- 113- Sié P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B. Turnover study of Heparin Cofactor II in healthy man.
Thrombosis and Haemostasis 1985; 54 (3): 635-8.
- 114- Herzog R, Lutz S, Blin N, Marasa JC, Blinder MA, Tollefsen DM. Complete nucleotide sequence of the gene for human heparin cofactor II and mapping to chromosomal band 22q11.
Biochemistry 1991; 30: 1350-7.
- 115- Derechin VM, Blinder MA, Tollefsen DM. Substitution of arginine for leucine 444 in the reactive site of heparin cofactor II enhances the rate of thrombin inhibition.
J. Biol. Chem. 1990; 265: 5623-8.
- 116- Church FC, Treabor RE, Sherrill GB, Whinna HC. Carboxylate polyanions accelerate inhibition of thrombin by heparin cofactor II.
Biochem Biophys Res Commun 1987; 148: 362-8.
- 117- Church F C, Pratt CW, Treanor RE, Whinna HC. Antithrombotic action of phosvitin and other phosphate containing polyaniones is mediated by heparin cofactor II.
FEBS Lett 1988; 237: 26-30.

- 118- Church FC, Meade JB, Treanor RE, Whinna HC. Antithrombin activity of fucoidan: the interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin. *J. Biol. Chem* 1989; 264: 3618-23.
- 119- Hayakawa Y, Hayashi Toshimitsu, Hayashi Tomohiro, Niiya K, Sakuragawa N. Selective activation of heparin cofactor II by a sulfated polysaccharide isolates from the leaves of *Artemisia princeps*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1995; 6: 643-9.
- 120- Ragg H, Ulshofer T, Gerewitz J. On the activation of human leuserpin 2. A thrombin inhibitor by glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem* 1990; 265: 5211-8.
- 121- Tollefsen DM. The interaction of Glycosaminoglycans with heparin cofactor II. *Annals New York Academy of Sciences* 1994; 714: 21-31.
- 122- Rydel TJ, Ravichandran KG, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roitsch C, Fenton JWII. The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha thrombin. *Science* 1990; 249: 277-80.
- 123- Hortin GL, Tollefsen D M, Benutto BM. Antithrombin activity of a peptide corresponding to residues 54-75 of heparin cofactor II. *J. Biol Chem* 1989; 264: 13979-82.
- 124- Sheehan JP, Wu Q, Tollefsen DM, Sadler JE. Mutagenesis of thrombin selectively modulars inhibition by serpins Heparin Cofactor II and Antithrombin III. *J. Biol. Chem* 1993; 268: 3639-45.
- 125- Tollefsen DM. Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. *Thrombosis and Haemostasis* 1995; 74 (5): 1209-14.
- 126- Ami RK, Padmanabhan KP, Wu TP, Tulinsky A. Structures of the noncovalent complexes of human and bovine prothrombin fragment 2 with human PPACK-thrombin. *Biochemistry* 1993; 32: 4727-37.
- 127- Pieters J, Franssen J, Visch C, Lindhout T. Neutralization of heparin by prothrombin activation products. *Thrombosis Research* 1987; 45: 573-80.
- 128- Kounnas MZ, Church FC, Argraves WS, Strickland DK. Cellular internalisation and degradation of Antithrombin III-Thrombin, Heparin Cofactor II-Thrombin, and α_1 Antytrypsin-Trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-relates protein. *J. Biol Chem.* 1996; 271: 6523-9.
- 129- de Boer HC, Preissner KT, Bouma BN, de Groot PG. Binding of vitronectin-thrombin-antithrombin III complex to human endothelial cells is mediated by the heparin binding site of vitronectin. *J Biol Chem* 1992; 267: 2264-8).
- 130- Preissner KT, De Boer H, Pannekoek H, De Groot PG. Thrombin regulation by physiological inhibitors: the role of vitronectin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1996; 22: 165-72
- 131- Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 275-310)

- 132- Liu L, Dewar L, Song Y, Kulczycky M, Blajchman MA, Fenton JWII et al. Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II in vivo.
Thrombosis and Haemostasis 1995; 73 (3): 405-12
- 133- Tollefsen DM, Pestka CA. Modulation of heparin cofactor II activity by histidine-rich glycoprotein and platelet platelet factor 4.
Clin Invest 1985; 75: 496-501
- 134- Preissner KT, Sié P. Modulation of heparin cofactor II function by S protein (vitronectin) and formation of a ternary S protein-thrombin-heparin cofactor II complex
Thrombosis and Haemostasis 1988; 60 (3): 399-406
- 135- Zammit A, Dawes J. Fibrinogen inhibits the heprin cofactor II-mediated antithrombin activity of dermatan sulfate.
Blood 1995; 85 (3): 720-6
- 136- Hogg PJ, Jackson CM. Formation of a ternary complex between thrombin, fibrin monomer, and heparin influences the action of thrombin on its substrates.
The Journal of Biological Chemistry 1990; 265 (1): 248-255
- 137- Hotchkiss KA, Chesterman CN, Hogg PJ. Inhibition of heparin activity in plasma by soluble fibrin: evidence for ternary thrombin-fibrin-heparin complex formation.
Blood 1994; 84 (2): 498-503
- 138- Egbring R, Schmidt W, Fuchs G, Haveman K. Demonstration of granulocyte proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects.
Blood 1977; 49 : 219
- 139- Egbring R, Seitz R, Lerch L. Interaction of granulocyte and coagulation proteases in septicaemia.
Clin Chem and Enz meetings- Jerusalem 1995
- 140- Kordich L, Sassetti B, Lago O. Modificación de los factores de coagulación y ATIII por acción de enzimas leucocitarias.
Medicina 1978; 38 (6): 840-844.
- 141- Sassetti B. Acción de serinoproteasas leucocitarias aisladas de leucemias agudas sobre Antitrombina III humana purificada.
Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. 1983.
- 142- Sie P, Dupouy D, Dol F., Boneu B. Inactivation of heparin cofactor II by polymorphonuclear leukocytes.
Thrombosis Research 1987 ; 47 : 657-64
- 143- Seligsohn U, Zivelin A. Thrombophilia as a multigenic disorder.
Thromb Haemost 1997; 78 (1): 297-301.
- 144- Tran TH, Marbet GA, Duckert F. Association of hereditary heparin cofactor II deficiency with thrombosis.
Lancet 1985; II: 413-4.
- 145- Simioni P, Lazzaro AR, Coser E, Salmistraro G, Girolami A. Hereditary heparin cofactor II deficiency and thrombosis: report of six patients belonging to two separate kindreds.
Blood Coag Fibrinol 1990; 1: 351-6

- 146- Berina RM, van der Linden IK, Engesser L, Muller HP, Brommer JP. Hereditary heparin cofactor II deficiency and the risk of development of thrombosis. *Thromb Haemost* 1987; 57: 196-200.
- 147- Blinder M, Anderson TR, Abildgaard U, Tollefsen DM. Heparin Cofactor II Oslo. *The Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 5128-33.
- 148- Matsuo T, Kario K, Sakamoto S, Yamada T, Miki T, Hirase T, et al. Hereditary heparin cofactor II deficiency and coronary artery disease. *Thromb Res* 1992; 65: 495-7.
- 149- Bernardi F, Legnani C, Micheletti F, Lunghi B, Ferraresi P, Palareti G, et al. A Heparin Cofactor II mutation (HCII Rimini) combined with factor V Leiden or type I protein C deficiency in two unrelated thrombophilic subjects. *Thromb Haemost* 1996; 76 (4): 505-9.
- 150- Andersson TR, Sié P, Pelzer H, Aamodt LM, Mistad K, Abildgaard U. Elevated levels of thrombin-Heparin Cofactor II complex in plasma from patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res.* 1992; 66: 591-8
- 151- Vinazzer H, Stocker K. Heparin Cofactor II: Experimental approach to a new assay and clinical results. *Thrombosis Research* 1991; 61: 235-41.
- 152- Porter JB, Young L, Mackie IJ, Marshall L, Machin SJ. Sickle cell disorders and chronic intravascular haemolysis are associated with low plasma heparin cofactor II. *British Journal of Haematology* 1993; 83: 459-65
- 153- Andrew M, Mitchel L, Berry L, Paes B, Delorme M, Ofori F, Burrows R and Khambalia B. An anticoagulant Dermatan sulfate proteoglycan circulates in the pregnant women and her fetus. *J Clin Invest* 1992; 89: 321-6.
- 154- Delorme MA, Burrows RF, Ofori FA, Andrew M. Thrombin regulation in mother and fetus during pregnancy. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1992; 18: 81-90.
- 155- Mackie IJ, Segal H, Burren T, Gallimore M, Walshe KJ, Robinson G, Machin SJ. Heparin cofactor II levels are increased by the use of combined oral contraceptives. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1990; 1: 647-51
- 156- Sandset PM, Hellgren M, Uvebrandt M, Bergström H. Extrinsic coagulation pathway inhibitor and heparin cofactor II during normal and hypertensive pregnancy. *Thromb Res* 1989; 55: 665-670.
- 157- Toulon P, Lamine M, Lejeu I, Guez T, Holleman ME, Sereni D, Sicard D. Heparin cofactor II deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Thromb Haemost* 1993; 70: 730-5.
- 158- Sie P, Meguira B, Boissou F, Boneu B, Barthe P. Plasma levels of Heparin Cofactor II in nephrotic syndrome of children. *Nephron.* 1988 ; 48 (2) : 175-6.
- 159- Toulon P, Vitoux JF, Capron L, Roncato M, Fiessinger JN, Aiach M. Heparin Cofactor II in patients with deep venous thrombosis under heparin and oral anticoagulant therapy. *Thrombosis Research* 1988 ; 49 (5) : 497-500.

- 160- Duboscq C, Quintna I, Barros J, Kordich L. Heparin Cofactor II in diabetic patients. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1994 ; 5 : 201-4
- 161- Wight TN, Heinegard DK, Hascall VC. Proteoglycans : structure and functions. In : Cell Biology of extracellular matrix. Hay DE. Plenum Press, New York Pp 45-78, 1991
- 162- Lindahl U, Lidholt K, Spillmann D, Kjellin L. More to heparin than anticoagulation *Thrombosis Research* 1994; 75 (1): 1-32
- 163- Carney SL. Proteoglycans in : Chalin MF, Kennedy IF. Carbohydrate analysis. A practical approach. IRL Press 1986
- 164- Kusche M, Torri G, Casu B, Lindahl . Biosynthesis of heparin. Availability of glycosaminyl 3-O-sulfatation sites. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 7292-7300
- 165- Volpi N. Dermatan sulphate from beef mucosa : structure, physicochemical and biological properties of fractions prepared by chemical depolymerization and anion-exchange chromatography. *Carb. Res.* 1994; 255 : 133-44
- 166- Whinna HC, Choi HV, Rosemberg LC, Church FUNCIÓN. Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin. *The Journal of Biological Chemistry* 1993 ; 268 (6) : 3920-24
- 167- Linhart R, Hakim A, Liu, Kim YS and Fareed J. Molecular profile and mapping of Dermatan sulafates from different origins. *Sem. in Thromb and Hemostas.* 1991; 71: 15-22.
- 168- Shirk RA, Church F, Wagner WD. Arterial smooth muscle cell heparan sulfate proteoglycans accelerate thrombin inhibition by Heparin Cofactor II. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1996; 16 (9): 1138-46
- 169- Hampson IN, Gallagher JY. Separation of radiolabelled glycosaminoglycan oligosaccharides by poliacrilamide-gel; electrophoresis. *Biochem J.* 1984; 221: 697-705.
- 170- Delorme MA, Saees N, Seveck A Mitchell L, Berry L, Johnston M, Andrew M Plasma Dermatan sulfate proteoglycan in a patient on chronic hemodialysis. *Blood* 1993; 82: 3380-5.
- 171- Kretz J, Chakje N, Wiesel ML, Grunebaum L, Zamboni V, palazzini E, Cazenave JP. The treatment of deep vein thrombosis with continuous intravenous Low-molecular-weight dermatan sulfate (Desmin). A pilot study. *Thromb Res.* 1996; 84 (6): 391 - 8
- 172- Pradoi P, Meduri F, Cuppini S, Toniato A, Zangrandi F, Polistena P, Gianese F, Maffei Faccioli A. Dematan sulfate: a safe approach to prevention of postoperative deep vein thrombosis. *Br J Surg* 1992; 79: 505-9.
- 173- Agnelli G, Cosmi B, Di Filippo P, Ranucci V, Veschi F, Lobgetti M, Renga C, Barzi F, Gianese F, Lupattelli L, Rinonpoli E, Nenci GG. A R. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of dermatan sulfate for prevention of deep vein thrombosis in hip fracture. *Thromb Haemost* 1992; 67: 203-8.

- 174- Boneu B. Glycosaminoglycans: Clinical use.
Sem in Thromb Hemost 1996; 22: 209-12.
- 175- Laemmli U, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 1970, 227
- 176- Lowry O, Rosenbrough N, Fan A, Randal R. Protein measurement with the folin phenol reagent.
J Biol. Chem. 1951; 193 : 265
- 177- Riggett P, Isoelectring focusing: principles and methods
Ed. Pharmacial Fine Chemical 1980
- 178- Recomendación aprobada sobre teoría de los valores de referencia *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 1988; XXII (3): 443.
- 179- Tobwin H, Stochelim T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1979; 76 : 4350
- 180- Ruiz Reyes G, Jiménez Vázquez T. Técnica rápida de microprecipitación en tubo capilar para la determinación de fibrinógeno.
Revista Mexicana de Laboratorio Clínico 1965; 17: 3.
- 181- Duboscq C, Quintana I, Rossi E, Kordich L. Cofactor II de la Heparina , valores de referencia, consumo en presencia de distintos glicosaminoglicanos.
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1995 ; XXIX (4) : 485-92
- 182- Abidlgard U, Larsen M. Assay of dermatan sulfate cofactor (heparin cofactor II) activity in humana plasma.
Thromb. Res. 1984; 35 : 257
- 183- ACCP/SCCM consensus conference. Definitions for sepsis an organ failure and guidelines for the use of innovactive therapies in sepsis.
Chest 1992; 101 (6): 1644.
- 184- Quick AJ. Hemorrhagic Diseases.
De. Lear and Fabiger, Philadelphia 1957
- 185- Bell WN and Anson HG. A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test.
Nature 1954; 889: 883.
- 186- Destaing F, Duzer A, Fenand B, Portier. Dosage du fibrinogene par la micro-methode de coagulation de von A Clauss.
Pathol Biol 1960; 8 (17) : 1616
- 187- Odegard OR, Lie M, Abidlgard U. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method.
Thromb. Res. 1975; 6: 287
- 188- Mannucci PM, Vigano S : Deficiencia de Protein C and inhibitor of blood coagulation.
Lancet 1982; 2 : 463
- 189- Amiral J, Grosley M, Boyer-Neuman C, et al.
Blood Coagulation Fibrinolysis 1994; 5 : 179

- 190- Laurell C M Quantitative stimulation of proteins by electrophoresis in agarose containing antibodies.
Anal Biochem 1966 ; 15 :42.
- 191- Söderholm J., Smyth CJ, Wadström T. A simple reproducible method of crossed immunoelectrofocusing.
Scan. J. Immunol. 1997; 4: suppl. 2, 107-112.
- 192- Andrews AT. Electrophoresis, theory, techniques and biochemical and clinical applications. Oxford University Press, 2nd edition. Gran Bretania. 1992
- 193- Dupuy D, Sie P, Boneu B. A simple method to measure dermatan sulfate at sub-microgram concentrations in plasma.
Thromb. Haemost. 1988; 60 (2) : 236
- 194- Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation
Science 1991; 253: 909-12
- 195- Von dem Borne PAK, Mosnier LO, Tans G, Meijers JCM. Factor XI activation by meizothrombin: stimulation by phospholipid vesicles containing both phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine.
Thromb Haemost 1997; 78: 834-9.
- 196- Tran TH, Duckert F. Heparin Cofactor II determination- levels in normals and patients with hereditary antithrombin III deficiency and disseminated intravascular coagulation.
Thromb. Haemost. 1984 ; 52 :112-6.
- 197- Anderson TR, Larsen ML, Handeland GF, Abildgaard U. Heparin Cofactor II activity in plasma : application of an automated assay method to the study of a normal adult population.
Scand. J. Haematol 1986; 36 : 96-102.
- 198- Griffith MJ, Thompson GF, McNeely T, Marbet GA, White GC. Measurement of heparin cofactor II levels in human plasma.
Circulation 1984; 70 : 361
- 199- Rodeghiero F, Tosi A. The VITA project : Population-based distributions of Protein C, Antithrombin III, Heparin-Cofactor II and Plasminogen- Relationship with physiological variables and establishment of reference ranges.
Thromb. Haemost. 1996 ; 76 (2) : 226-33
- 200- Sattar N, Greer IA, Rumley A, Stewart G, Shepherd J, Packard CJ, Lowe GDO A longitudinal study of the relationships between haemostatic, lipid and oestradiol changes during normal human pregnancy
Thrombosis and Haemostasis 1999; 81: 71-5
- 201- Clark P, Brennan J, Conkie JA, McCall F, Greer IA, Walker ID. Activated protein C sensitivity, protein C, protein S and coagulation in normal pregnancy.
Thromb Haemost 1998; 79: 1166-70
- 202- McColl MD, Ramsay JE, Tait RC, Walker ID, McCall F, Conkie JA, Carty MJ, Greer IA. Superficial vein thrombosis: incidence in association with pregnancy and prevalence of thrombophilic defects.
Thromb Haemost 1998; 79: 741-2

- 203- Andrew M, Mitchell L, Berry L, Paes B, Delorme M, Ofofu F, Burrows R, Khambalia B. An anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan circulates in the pregnant woman and her fetus.
J Clin Invest 1992; 89 : 321-6.
- 204- Bellart J, Gilabert R, Cabero L, Fontcuberta J, Monasterio J, Miralles RM. Heparin Cofactor II: a new marker for pre-eclampsia.
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1998; 9: 205-8.
- 205- Linares HA. From wound to scar
Burns 1996; 22 (5): 339-52
- 206- Allöwer M, Schoenenberg GA, Sparkes BG. Burning the largest immune organ.
Burns 1995; 21 (suppl 1): S7-47.
- 207- Padubidri AN, Rayner CR. Early, fatal disseminated intravascular coagulation in a patient with 60 per cent burns.
Burns 1996 ; 22 (3): 246-9
- 208- Eberst ME, Berkowitz LR. Hemostasis in renal disease: Pathophysiology and management.
The American Journal of Medicine 1994; 96 : 168- 79.
- 209- Schetz MRC. Coagulation disorders in acute renal failure
Kidney International 1998; 53: S96-101
- 210- Opatný K. Hemostasis disorders in chronic renal failure.
Kidney International 1997; 52 (62): S-87-9
- 211- Mezzano D, Tagle R, Panes O, Pérez M, Downey P, Muñoz B, Aranda E, Barja P, Thambo S, González F, Mezzano S, Pereira J. Hemostatic disorder of uremia: The platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis.
Thromb. Haemost 1996; 76 (3): 312-21
- 212- Jong S.C. ,Stehouwer C, van den Berg M, Vischer U, Rauwerda J, Emeis J. Endothelial marker proteins in Hyperhomocysteinemia.
Thrombosis and Haemostasis 1997; 78: 1332-7
- 213- Bone R. The pathogenesis of sepsis.
Ann. Of Int. Med. 1991; 115 (6): 457
- 214- Hesselvik F, Blombäck M, Bradin B, Maller R. Coagulation fibrinolysis and kallikrein system in sepsis: Relation to outcome.
Crit. Care Med. 1989; 17 (8): 724.
- 215- Montaser A, Robbi LA, Adey G, Bemrett B. Inhibitors of plasminogen activators in neutrophils and mononuclear cells from septic patients.
Thromb Haemost 1995; 74 (6): 1528
- 216- Salgado A, Boveda JL, Monasterio J, Segura RM, Mourelle M, Gómez-Jimenez J, Percaula R. Inflammatory mediators and their influence on haemostasis.
Haemostasis 1994 ; 24 : 132.
- 217- Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis
Thrombosis and Haemostasis 1999; 81: 165-76

218- Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Kooner JS. Acute hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction

Lancet 1998 ; 351: 36-7

219- D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease.

Blood 1997 ; 90: 1-11.