

Inhibidores de la coagulación en pacientes neoplásicos

J.A. Páramo, B. Cuesta, M. Hernández, J. Fernández, M.J. Paloma, J. Rifón y E. Rocha

Servicio de Hematología. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona

Se han determinado las concentraciones plasmáticas de los principales inhibidores del sistema de la coagulación, antitrombina III (AT III), proteína C y proteína S en 149 pacientes con tumores localizados y metastásicos de diferente localización. Los resultados se han comparado con los de 44 individuos sanos. No existían diferencias significativas entre pacientes y controles para la AT III, proteína C y proteína S libre. Sin embargo, se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,0003$) de la proteína S total en los enfermos neoplásicos. Ninguno de los parámetros analizados mostraba diferencias significativas en relación a la extensión tumoral o a la localización del tumor primitivo. Se concluye que los principales inhibidores del mecanismo de la coagulación no parecen jugar un papel importante en el estado de hipercoagulabilidad de los pacientes neoplásicos. El aumento en la concentración de proteína S total podría reflejar síntesis endotelial en respuesta a estímulos trombogénicos.

Coagulation inhibitors in patients with neoplasms

Mean plasma concentrations of the main inhibitors of blood coagulation antithrombin III (AT III), protein C and protein S were determined in 149 patients with different local and disseminated malignancies. Results were compared with findings in 44 healthy subjects. No statistical significant differences for AT III, protein C and free protein S were found between patients and controls. However, total protein S showed a significant increase in the patient group ($p < 0.0003$). None of the parameters analyzed showed differences according to the degree of tumoral activity nor to the tumour localization. We conclude that the main inhibitors of the blood coagulation seem not to play an important role in the pathogenesis of the hypercoagulable state in malignancy. The increased levels in total protein S would indicate endothelial synthesis in response to thrombogenic stimuli.

Med Clin (Barc) 1989; 92: 164-166

Diversos estudios han demostrado que el cáncer es un factor de riesgo en el desarrollo de trombosis venosa y embolismo pulmonar¹⁻³. En los pacientes neoplásicos, con o sin evidencia de trombosis, se han detectado diversas anomalías hemostáticas que indican una tendencia hipercoagulable no muy bien definida que puede contribuir a la patogenia de los fenómenos trombóticos en estos pacientes⁴⁻⁶.

La antitrombina III (AT III), el sistema de la proteína C-proteína S y el sistema fibrinolítico son los mecanismos anticoagulantes fisiológicos encargados de prevenir la formación de un trombo⁷. La AT III es el principal inhibidor fisiológico de la trombina y de otras proteasas serínicas del sistema de la coagulación. La proteína C es un zimógeno vitamino K-dependiente que, en su forma activa, inhibe los factores V y VIII⁸. La proteína S es otra proteína vitamino K-dependiente que actúa como cofactor de la proteína C activada y se encuentra en el plasma bajo dos formas: libre, que representa el 40 % del total, y formando complejo con una proteína reguladora del sistema del complemento que liga el C4b. Únicamente la proteína S libre va a actuar como cofactor de la proteína C activada⁹. La importancia fisiopatológica de estos inhibidores deriva de que los defectos congénitos de AT III, proteína C y proteína S se asocian con fenómenos trombóticos recurrentes¹⁰⁻¹².

El objetivo de nuestro trabajo ha sido conocer las concentraciones de AT III, proteína C y proteína S en una serie de pacientes con tumores localizados y metastásicos y, con ello, tratar de comprobar si una alteración en los mecanismos anticoagulantes podría contribuir al estado de hipercoagulabilidad de los pacientes neoplásicos.

Material y métodos

Pacientes. El estudio ha incluido 149 pacientes con tumores localizados y metastásicos. La edad media de los pacientes fue de 57 ± 13 años (varió entre 17-18 años) y había 93 varones y 56 mujeres. Setenta y cinco pacientes (44,8 %) presentaban enfermedad localizada y 84 (55,2 %) tenían metástasis. La localización del tumor primitivo fue digestiva en 61 pacientes, pulmonar en 18, urológica en 24 y

Correspondencia: Dr. E. Rocha. Servicio de Hematología Clínica Universitaria. Apartado 192. 31080 Pamplona

Manuscrito aceptado el 27-10-1988

ginecológica en 16; en 30 enfermos el tumor primario era de localización diversa. Ningún paciente había recibido tratamiento citostático en las dos semanas anteriores a la realización del estudio y se excluyeron aquellos que recibían algún tipo de tratamiento anticoagulante. Un grupo de 44 individuos sanos de edad media 53 ± 8 años, de los que 23 eran varones y 21 mujeres, constituyó el grupo control.

Determinaciones analíticas. El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtenía a partir de sangre venosa anticoagulada con citrato (9 volúmenes de sangre y 1 volumen de citrato sódico 0,13 mol/l) y centrifugada a 1.500 g durante 20 minutos a 4 °C. El plasma se almacenaba a -70 °C hasta su uso. Se obtuvo un conjunto de plasmas normales mezclando volúmenes iguales de PPP obtenido de 20 individuos sanos que se congelaron a -70 °C.

La actividad biológica de la AT III se determinó con una técnica de sustratos cromogénicos (Kabi Diagnóstica, Estocolmo), según la metodología de Abildgaard et al¹³.

La proteína C antigénica se determinó por un método de ELISA (Asserachrom Protein C, D Stago). La técnica consistió en aplicar 200 µl de una dilución 1/50 y 1/100 del plasma problema en placas de microtitulación acopladas con un anticuerpo anti-proteína C de conejo. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente la placa se lavaba y se añadían 200 µl de un anticuerpo anti-proteína C conjugado con peroxidasa. Después de 2 horas de incubación se procedía a un nuevo lavado y se añadían 200 µl de una solución de ortofenilendiamina que contenía H₂O₂. Después de 3 minutos de incubación se paraba la reacción añadiendo 50 µl de SO₄H₂, 3M. La absorbancia se leía a 492 nm y los resultados se extrapolaban en una curva de calibración realizada con diluciones de plasma normal. Los valores normales oscilaban entre 0,8 y 1,3 U/ml.

Las concentraciones de proteína S antigénica total y libre se determinaron por una técnica de electroinmuno-difusión (Asseraplate Protein S, Diagnóstica Stago, Francia). La proteína S libre se determinó tras precipitación del complejo proteína S-C4b con polietilenglicol 8.000 (50 µl de una solución PEG 8.000 25 % y 300 µl de plasma) según la metodología de Comp et al¹⁴. El sobrenadante obtenido tras la precipitación contenía la forma libre. Las curvas estándar para la proteína S total y libre se obtuvieron a partir de un conjunto de plasmas normales tratados de la misma manera. Los resultados se expresaron como porcentaje en relación a dichas curvas. Los valores normales oscilaron entre 0,8 y 1,3 U/ml.

Análisis estadístico. Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Los métodos estadísticos empleados incluyeron la prueba de la t de Student y el análisis de varianza. Los datos se procesaron en un ordenador IBM 4341 y se utilizó un programa BMDP para el análisis de los resultados.

TABLA 1

Concentración de antitrombina III (AT III), proteína C y proteína S total y libre en relación con el grado de extensión tumoral

Parámetro	Tumor local (n = 65)	Metástasis (n = 84)
AT III (U/ml)	0,95 \pm 0,34	1,01 \pm 0,32
Proteína C (U/ml)	1,21 \pm 0,61	1,11 \pm 0,38
Proteína S total (U/ml)	1,52 \pm 0,32	1,62 \pm 0,38
Proteína S libre (U/ml)	1,03 \pm 0,51	0,96 \pm 0,31

Valores expresados como $\bar{X} \pm DE$.

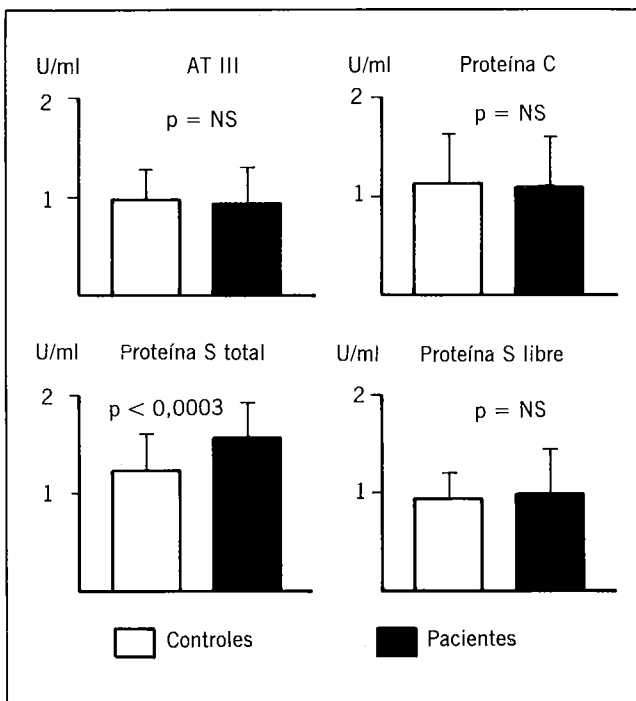
TABLA 2

Concentración de antitrombina III (AT III), proteína C y proteína S total y libre en relación con la localización tumoral

Parámetro	Localización tumoral				
	Digestiva (n = 61)	Pulmonar (n = 18)	Urológica (n = 24)	Ginecológica (n = 16)	Miscelánea (n = 30)
AT III (U/ml)	0,94 \pm 0,34	0,94 \pm 0,31	1,03 \pm 0,31	0,98 \pm 0,33	1,02 \pm 0,36
Proteína C (U/ml)	1,10 \pm 0,66	1,01 \pm 0,34	1,26 \pm 0,40	1,20 \pm 0,28	1,29 \pm 0,47
Proteína S total (U/ml)	1,54 \pm 0,33	1,67 \pm 0,34	1,41 \pm 0,34	1,48 \pm 0,34	1,63 \pm 0,36
Proteína C libre (U/ml)	0,96 \pm 0,38	1,07 \pm 0,41	0,93 \pm 0,38	1,07 \pm 0,44	1,05 \pm 0,57

Resultados expresados como $\bar{X} \pm DE$.

Fig. 1. Concentraciones plasmáticas de antitrombina III (AT III), proteína C y proteína S total y libre en el grupo de pacientes y en los controles. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.



Resultados

Las concentraciones medias de AT III, proteína C y proteína S total y libre en los 149 pacientes y en el grupo control se representan en la figura 1. No existían diferencias significativas para las concentraciones de AT III, (0,98 \pm 0,33 U/ml frente a 0,99 \pm 0,31 U/ml), proteína C (1,16 \pm 0,52 U/ml frente a 1,20 \pm 0,53 U/ml) y proteína S libre (1,00 \pm 0,43 U/ml frente a 0,94 \pm 0,25 U/ml) entre el grupo de pacientes y el de individuos normales. Sin embargo, existía un aumento estadísticamente significativo (p < 0,0003) de la proteína S total en el grupo de pacientes (1,56 \pm 0,35 U/ml) en relación al grupo control (1,28 \pm 0,36 U/ml).

En la tabla 1 se muestran los valores medios y la desviación estándar de los diversos parámetros analizados en relación con el grado de extensión tumoral. No existían diferencias significativas para ninguno de los parámetros entre los pacientes con enfermedad local y los que presentaban metástasis.

Las concentraciones de AT III, proteína C y proteína S total y libre en relación con la localización del tumor se muestran en la tabla 2. Los tumores digestivos, pulmonares y el grupo miscelánea presentaban valores de proteína S total más elevados que los de origen urológico y ginecológico, aunque sin diferencias significativas.

Discusión

La alta incidencia de complicaciones troboembólicas asociada a neoplasias, que puede alcanzar el 50 % en adenocarcinomas de páncreas, pulmón, estómago, ovario y colon y la clara relación entre la enfermedad troboembólica y los defectos congénitos y adquiridos de antitrombina III, proteína C y proteína S, fue el motivo del estudio de estos inhibidores naturales

del sistema de la coagulación en una amplia serie de pacientes con tumores locales y metastásicos. En nuestro estudio no pudimos demostrar un descenso de AT III, proteína C y proteína S en los pacientes neoplásicos, pero observamos un aumento estadísticamente significativo de la proteína S total en el grupo de pacientes en relación a los controles.

Las anomalías de la coagulación y fibrinólisis son frecuentes en pacientes con cáncer; varían con el tipo y grado de tumor, pero se presentan en aproximadamente el 50 % de los pacientes con enfermedad local y hasta en el 90 % de aquellos con enfermedad metastásica¹⁵⁻¹⁷. Los mecanismos implicados en tales alteraciones aún no se conocen totalmente. Algunos tumores pueden producir sustancias procoagulantes, tipo factor hístico o activadores directos del factor X, así como activadores del plasminógeno¹⁸⁻²⁰. Además los monocitos parecen jugar un papel importante en pacientes con tumores sólidos liberando factores procoagulantes, como se demuestra por las concentraciones elevadas de fibrinopéptido A y su correlación con la progresión de la enfermedad^{21,22}.

El papel de los inhibidores de la coagulación en la patogenia de la hipercoagulabilidad asociada a las neoplasias es menos conocido. Se han descrito déficit adquiridos de AT III, por defecto de síntesis, aumento del consumo o pérdidas excesivas, en pacientes con hepatopatías crónicas, coagulación intravascular diseminada, síndrome nefrótico e ingesta de anticonceptivos orales entre otros²³⁻²⁶. Sin embargo, los resultados en pacientes neoplásicos son contradictorios, con concentraciones disminuidas en cáncer de páncreas y elevadas en tumores renales, tumores intraabdominales o metastasis óseas de carcinoma²⁷. Los déficit adquiridos de proteína C se observan generalmente en el curso de hepatopatías, coagulación intravascular diseminada, tratamientos con L-asparaginasa o antivitaminicos K^{28,29}. Rodeghiero et al³⁰ encontraron un descenso de proteína C en leucemia aguda, pero en relación con disfunción hepática y otros autores incluyen un aumento de las concentraciones de este inhibidor en pacientes leucémicos³¹. Los defectos adquiridos de proteína S se observan en pacientes tratados con antivitaminicos K, en aquellos que toman anticonceptivos orales, durante el embarazo y hepatopatías, pero se desconoce su papel en los procesos neoplásicos^{32,33}.

Por consiguiente, nuestros resultados están de acuerdo con los de otros autores e indican que la deficiencia de AT III, proteína C y proteína S no es un hallazgo frecuente en los pacientes neoplásicos y que un déficit de los inhibidores fisiológicos más importantes del sistema de

coagulación no parece jugar un papel en el estado hipercoagulable de estos pacientes. Ello puede indicar, o bien que en la patogenia de dicho estado intervienen otros mecanismos como una menor capacidad fibrinolítica¹⁷, o que el agente trombogénico posee características diferentes de la trombina, como podría inferirse de la falta de respuesta del fibrinopéptido A a la acción de los anticoagulantes en estos pacientes³⁴.

Por el contrario, hemos encontrado un aumento significativo de la concentración de proteína S total en nuestros pacientes, cuyo significado es incierto. Recientemente, Fair et al³⁵ han demostrado que las células endoteliales humanas son capaces de sintetizar este inhibidor. Es interesante considerar que la producción de proteína S por estas células en respuesta a determinados estímulos podría jugar un papel en la regulación de la hemostasia y en la trombosis. Se sabe que la trombina y la vitamina K aumentan la síntesis endotelial de proteína S³⁵. La liberación de trombina o sustancias similares a la trombina por diversos tumores podrían tener un efecto similar, aunque esta hipótesis necesita ser contrastada.

En conclusión, las concentraciones de AT III, proteína C y proteína S libre son normales en pacientes con cáncer, lo que indica que estos inhibidores no parecen jugar un papel importante en el estado de hipercoagulabilidad de estos pacientes. El aumento en la concentración de proteína S total podría reflejar síntesis endotelial en respuesta a estímulos trombogénicos, hipótesis que precisa ser confirmada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trousseau A Lectures on Clinical Medicine delivered at the Hotel-Dieu, Paris. Londres: New Sydenham Society 1865; 282-332.
2. Sack GH Jr, Levin J, Bell WR. Trousseau's syndrome and other manifestations of chronic disseminated coagulopathy in patients with neoplasms: clinical, pathophysiological, and therapeutic features. *Medicine* 1977; 56: 1-37.
3. Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood* 1983; 62: 14-31.
4. Davis RB, Theologides A, Kennedy BJ. Comparative studies of blood coagulation and platelet aggregation in patients with cancer and non-malignant diseases. *Ann Intern Med* 1969; 71: 67-80.
5. Donati MB, Poggi A. Malignancy and haemostasis. *Br J Haematol* 1980; 44: 173-182.
6. Edwards R, Rickles FR, Cronlund M. Abnormalities of blood coagulation in patients with cancer. Mononuclear cell tissue factor generation. *J Lab Clin Med* 1981; 98: 917-928.
7. Rosenberg RD, Rosenberg JS. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 1984; 74: 1-6.
8. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *N Engl J Med* 1986; 314: 1.298-1.303.
9. Dahlback B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2.512-2.516.
10. Féléz J, Rubio N, Grau E, Steegmann JL, Fontcuberta J. Anomalías congénitas de la antitrombina III. *Biol Clin Hemat* 1985; 7: 73-80.

11. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1.370-1.373.
12. Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984; 311: 1.525-1.528.
13. Abildgaard U, Lie M, Odegard OR. Antithrombin (heparin cofactor) assay with new chromogenic substrate (S-2.238 and chromozym TH). *Thromb Res* 1977; 11: 549-553.
14. Comp PC, Doray D, Patton D, Esmon CT. An abnormal distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood* 1986; 67: 504-508.
15. Slichter SJ, Harker LA. Hemostasis in malignancy. *Ann NY Acad Sci* 1974; 23-: 252-261.
16. Sun NCJ, McAfee WM, Hum GJ et al. Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred patients. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 10-16.
17. Páramo JA, Campbell W, Cuesta B, Gómez C, Aranda A, Rocha E. Fibrinolytic response in malignancy. *Fibrinolysis* 1987; 1: 195-199.
18. Pineo GF, Brain MC, Gallus AS, Hirsh J, Hattton MWC, Regoeci E. Tumors, mucus production and hypercoagulability. *Ann NY Acad Sci* 1974; 230: 262-270.
19. Gordon SG, Franks JJ, Lewis B. Cancer procoagulant A: a factor X activating procoagulant from malignant tissue. *Throm Res* 1975; 6: 127-137.
20. Duffy MJ, O'Grady P. Plasminogen activator and cancer. *Eur J Clin Oncol* 1984; 20: 577-582.
21. Rickles FR, Edwards RL, Barb C et al. Abnormalities of blood coagulation in patients with cancer. Fibrinopeptide A generation and tumour growth. *Cancer* 1983; 51: 301-307.
22. Fernández J, Páramo JA, Aranda A, Cuesta B, Paloma MJ, Rocha E. Fibrinogen, fibrin derivatives and fibronectin in malignancy. En: Lowe GDO, Douglas JT, Forbes CD, Henschen A, ed. *Fibrinogen 2. Biochemistry, physiology and clinical relevance*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers BV 1987; 257-260.
23. Mannucci L, Dioguardi N, Del Ninno E, Mannucci PM. Value of normotest and antithrombin III in the assesment of liver function. *Scand J Gastroenterol* 1973; 19: 103-107.
24. Bick RL, Kovacs I, Fekete LF. New 2-stage functional assay for antithrombin III (heparin cofactor). Clinical and laboratory evaluation. *Throm Res* 1976; 8: 745-756.
25. Sagar S, Thomas DP, Stamatakis JD, Kakkar VV. Oral contraceptives, antithrombin-III activity, and postoperative deep vein thrombosis. *Lancet* 1976; 1: 509-511.
26. Jorgensen KA, Stoffersen E. Antithrombin III and the nephrotic syndrome. *Scand J Haematol* 1979; 22: 442-448.
27. Losito R, Beauchy P, Valderrama JL, Cousineau L, Longpre B. Antithrombin III and factor VIII in patients with neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1977; 68: 258-264.
28. Griffin JH, Mosher DF, Zimmerman TS, Kleiss AJ. Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 1982; 60: 261-263.
29. Mannucci PM, Viganò S. Deficiencies of protein C, and inhibitor of blood coagulation. *Lancet* 1982; 2: 463-466.
30. Rodeghiero F, Mannucci PM, Viganò S et al. Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main cause of low protein C and antithrombin III in acute leukemia. *Blood* 1984; 63: 965-969.
31. Takahashi H, Takakuwa E, Yoshino N, Hanano H, Shibata A. Protein C levels in disseminated intravascular coagulation and thrombotic thrombocytopenic purpura: its correlation with other coagulation parameters. *Thromb Haemost* 1985; 54: 445-449.
32. Bertina RM, Van Wijngaarden A, Reinalda-Poot J, Poort SR, Born VJJ. Determination of plasma protein S. The protein cofactor of activated protein C. *Thromb Haemost* 1985; 268-272.
33. Kessler CM, Strickland DK. Protein C and protein S clinical perspectives. *Clin Chim Acta* 1987; 170: 25-36.
34. Bell WR, Starksen NF, Tong S, Porterfield JK. Trousseau's syndrome. Devastating coagulopathy in the absence of heparin. *Am J Med* 1985; 79: 423-430.
35. Fair DS, Marlur RA, Levin EG. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood* 1986; 67: 1.168-1.171.