

REVISIONES

Déficit de anticoagulantes naturales y enfermedad tromboembólica

H. GONZÁLEZ, M. R. BACHILLER y F. J. GUIASOLA

RESUMEN: Se revisan las características bioquímicas, fisiológicas y la importancia clínica de la proteína C y antitrombina III. Ambas proteínas juegan un papel fundamental en la regulación de los mecanismos de coagulación inhibiendo la formación de trombina. La importancia de la proteína C y antitrombina III en patología humana, ha quedado demostrada por el descubrimiento de que sus deficiencias congénitas están asociadas a enfermedad trombo-embólica. **PALABRAS CLAVE:** ANTICOAGULANTES. PROTEÍNA C. ANTITROMBINA III.

NATURALS ANTICOAGULANTS DEFICIENCY AND THROMBOEMBOLIC DISEASE. (SUMMARY): The biochemistry, physiology and clinical aspects of protein C and antithrombin III are revised. Both proteins plays a major physiologic role in the regulation of blood coagulation as part of a thrombin-dependent feedback inhibition of coagulation pathways. The phatologic properties of protein C and antithrombin III in humans has been demonstrated by the discovery that congenital deficiencies are associated with thromboembolic disease. **KEY WORDS:** ANTICOAGULANTS. PROTEIN C. ANTITHROMBIN III..

INTRODUCCIÓN

La trombina es la principal proteína reguladora implicada en el mantenimiento de la homeostasia. Para su formación es necesario la participación de forma conjunta de enzimas plasmáticos con capacidad proteolítica y de los denominados cofactores de activación.

Los enzimas proteolíticos que intervienen en la coagulación son proteasas serínicas y se encuentran representados por los factores XII, XI, IX, X y VII, todos ellos se encuentran de forma inactiva en el plasma, teniendo que ser activados para que ejerzan su acción lo que implica la

pérdida de fragmentos moleculares. (XIIa, XIa, IXa, Xa, y VIIa).

Los cofactores de activación están constituidos por proteínas que como las anteriores deben de ser modificadas previamente para potenciar su acción la cual no entraña proteolisis sobre el sustrato, sino más bien amplificar la función de alguna de las proteasas serínicas anteriormente enunciadas. A este grupo pertenecen los factores VIII y V que cooperan en la acción proteolíticas del IXa y Xa.

La acción de unos y otros conllevan la formación de trombina. Se conocen en la actualidad dos mecanismos que controlan la generación de trombina bloqueando de

algún modo la función de éstos. Uno a través de los inhibidores de las proteasas serínicas tales como la alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimiotripsina, interalfa-tripsina inhibidor, inhibidor de la C1 esterasa, alfa-2-macroglobulina y antitrombina III. De ellos el que mayor importancia tiene por su amplitud de acción y potencia es sin duda la antitrombina III. El otro mecanismo se encuentra mediado por la inactivación de los cofactores proteicos que intervienen en las reacciones de activación de las proteasas serínicas de la coagulación. La proteína C es el único factor conocido en la actualidad que ejerce esta acción.

De todos los anticoagulantes naturales los que poseen una mayor importancia biológica y cuyo déficit causa enfermedad tromboembólica son la antitrombina III y la proteína C.

ANTITROMBINA III

Seegers y cols. aplicaron el término de antitrombina III (ATIII) al agente que causaba una progresiva inhibición de la trombina en el plasma y el de antitrombina II al cofactor que se necesitaba para la acción de la heparina (1). Hoy sabemos que ambas funciones son efectuadas por la misma proteína, que denominamos antitrombina III y representa uno de los más potentes inhibidores de la coagulación conocidos (2).

Estructura

La antitrombina III es una glicoproteína, perteneciente a las alfa 2 globulinas del plasma, constituida por una única cadena polipeptídica, con un peso molecular aproximado de 60.000 D. Presenta tres puentes disulfuro intracatenarios (3).

Mecanismo de acción

La inhibición de la trombina por la antitrombina III se efectúa formándose

entre ambas un complejo esteoquímico 1:1 al enlazarse el centro activo serínico de la trombina y un residuo arginina de la AT.III (4). La inactivación de la trombina por la AT.III es irreversible (5) y durante la formación del complejo se produce una proteólisis de la AT.III (6).

La AT.III no sólo inactiva a la trombina sino también a otras proteínas serínicas como los factores XIIa, XIa, IXa y la Kalicreína, aunque se discute su importancia biológica (7).

Las reacciones de la AT.III con la trombina y con otras proteínas serínicas tienen una velocidad lenta que es potenciada por la heparina, al comportarse ésta como un activador alostérico (8). La heparina provoca un cambio en la configuración de la AT.III que permite un mejor acoplamiento entre el centro activo de la AT.III y el de la trombina.

En la coagulación «in vitro» de sangre normal, con la cantidad de AT.III contenida en un mililitro de plasma toda la trombina formada puede ser inactivada; sin embargo esta inactivación no es lo bastante rápida, generándose suficiente trombina para convertir el fibrinógeno en fibrina (9). La heparina altera esta secuencia acelerando intensamente la inactivación de la trombina por la AT.III, efectuándose la reacción en segundos en lugar de en minutos (7). Estas observaciones hacen difícil la explicación de cómo la AT.III ejerce un papel importante en la regulación de la hemostasia, dado que en ausencia de heparina el porcentaje de reacción con la trombina y otras proteasas serínicas es pequeño. Por otra parte la clínica que produce el déficit de AT.III revela la importancia moduladora de la coagulación de esta proteína (2). Existen algunas hipótesis que intentan explicar estos hechos. Una primera indica que la generación de trombina «in vivo» es menos efectiva que «in vitro», y cuando la trombina se genera «in vivo»

parte se diluye en el torrente sanguíneo. Una segunda hipótesis apunta la existencia de sustancias heparin-like en las células endoteliales (10). El daño de estas células dispara la coagulación pero ésta es modulada por la liberación de actividad heparínica por las mismas células, incrementándose de este modo la efectividad de la AT.III.

Algunos investigadores han sugerido que la importancia moduladora de la coagulación por parte de la AT.III no se debe tanto a la inhibición de la trombina como a la inactivación de otros factores más importantes en la amplificación de la cascada de la coagulación como el factor Xa (11).

Propiedades generales

La antitrombina III se sintetiza fundamentalmente en el hígado. Presenta una concentración plasmática de $19,6 \pm 2,3$ mg/100 ml. con una vida media de $2,8 \pm 0,3$ días. Se encuentra disminuida en el recién nacido, normalizándose al sexto mes, para volver a disminuir ligeramente en la senectud. Las mujeres en edad fértil poseen valores ligeramente menores a los varones de la misma edad. Los individuos del grupo sanguíneo A poseen cifras superiores a los de otros grupos (12), (13), (14).

Déficit familiar de antitrombina III

En el déficit familiar de At. III se suele encontrar niveles inferiores al 50 % del normal, aunque en algunos casos presentan niveles mucho menores o sólo ligeramente inferiores a los normales. El déficit se expresa por aparición de trombosis de repetición de comienzo en etapas precoces de la vida. Más del 85 % de las personas que padecen esta deficiencia sufren algún episodio trombótico antes de los 50 años y aproximadamente el 2 % de todos los episodios trombóticos de la población general pueden atribuirse a carencia congénita de

este inhibidor. La severidad de las manifestaciones es variable entre las familias e incluso entre los miembros de la misma familia sin que se sepa por qué (15).

La manifestación trombótica más frecuente es la *tromboflebitis de extremidades inferiores*, a menudo bilateral y recurrente. También puede aparecer insuficiencia venosa que puede complicarse con úlceras crurales. El embolismo pulmonar también es común. La trombosis de venas mesentéricas es menos frecuente. Pocos casos desarrollan C.I.D. De forma más rara puede aparecer priapismo, S. de Budd-Chiari, trombosis de venas cerebrales, renales y trombosis de vena cava inferior o de la vena central de la retina (2).

Dos factores son claramente importantes para determinar el riesgo de tromboembolismo en el déficit familiar de AT.III. El primero es la *edad*. No es frecuente encontrar tromboembolismos en enfermos con déficit menores de 10 años y a partir de esta edad el riesgo es acumulativamente mayor en cada década. El segundo factor es el *grado de deficiencia*. Infrecuentemente ocurre tromboembolismo cuando los niveles de AT.III son superiores al 60 %. Sin embargo no todas las personas que tienen niveles bajos desarrollan tromboembolismo, sin que se sepa que protege a estas personas (2).

En mujeres con déficit familiar de AT.III el *embarazo* incrementa el riesgo de tromboembolismo y de igual modo ocurre con los anticonceptivos orales. Finalmente, factores que predisponen al tromboembolismo en personas normales, como el encamamiento prolongado, la cirugía, etc. son más peligrosos en esta enfermedad.

Las causas más frecuentes de muerte en estos enfermos son el embolismo pulmonar, la trombosis mesentérica y la C.I.D.

El déficit familiar de AT.III es heredado como un defecto *autosómico dominante*.

Como en otras enfermedades hereditarias la acumulación de datos prueba que el déficit de AT.III es una enfermedad heterogénea. Así existen diversos tipos de deficiencia según el trastorno afecte a la síntesis global de la proteína o de lugar a una proteína anormal. Hablamos de *deficiencia tipo I* o clásica cuando la actividad biológica y el nivel antigénico disminuyen paralelamente. La electroforesis bidimensional con heparina es normal. La variante *tipo II* o variante de la deficiencia clásica presenta niveles antigénicos y biológicos disminuidos y movilidad electroforética anormal en presencia de heparina. En la variante *tipo III* junto con una antitrombina normal se sintetiza otra carente de actividad por lo que se aprecian niveles antigénicos normales, actividad biológica disminuida y movilidad electroforética anormal (12), (15), (16). Además de estos tres tipos se han encontrado múltiples variedades que han ido recibiendo los nombres de las ciudades donde residen los pacientes afectados (15). Se ha descrito una familia con niveles antigénicos de AT.III bajos sin manifestaciones trombóticas, debido a una gran afinidad de su antitrombina por la trombina (17). Otra familia presenta niveles normales de AT.III plasmática junto con disminución de AT.III plaquetaria con elevada incidencia de enfermedad tromboembólica (18).

La determinación de los niveles antigénicos de AT.III se efectúa mediante inmunodifusión radial. La actividad biológica puede medirse mediante ensayos de coagulación (von Kaulla) o amidolíticos (Kabi). La electroforesis bidimensional de Laurell se utiliza para investigar la posibilidad de un cambio cualitativo en la AT.III (2).

El *tratamiento* de los episodios trombóticos en estos pacientes requieren de la administración de plasma fresco junto con heparina, ya que la heparina sola es ine-

fectiva pues necesita de la presencia de AT.III para actuar. En la actualidad existen concentrados comerciales de AT.III. Para elevar la concentración plasmática de AT.III en 1 % se requiere la administración de 0,67 U/Kg. de concentrado. El tratamiento con anticoagulantes orales comenzará en la fase aguda ya que disminuyen las necesidades de AT.III por disminuir la formación de trombina. El tratamiento con anticoagulantes debe mantenerse indefinidamente para evitar la repetición de las trombosis y de forma profiláctica en los pacientes diagnosticados previamente a las manifestaciones. Se han propuesto también como profilácticos a los andrógenos de síntesis (danazol) que son capaces de estimular la síntesis de esta proteína, aunque son necesarios más estudios para establecer el papel de estos agentes (2).

Déficit adquirido de antitrombina III

Por alteración de la síntesis en las hepatopatías graves disminuyen los niveles de AT.III, aunque no se producen síntomas posiblemente debido a un descenso paralelo del resto de factores de la coagulación (19). Por exceso de eliminación puede aumentar el riesgo de enfermedad tromboembólica en el síndrome nefrótico (20). Por consumo acelerado en la C.I.D. al existir exceso de proteasa serínicas que deben ser inhibidas; en este caso el déficit es secundario al desarrollo de trombos en la microcirculación (21). También se han encontrado disminución de AT.III en enfermos tratados con asparraginas.

PROTEÍNA C

En 1960 Seegers y cols. descubren una actividad anticoagulante que se generaba cuando trataban concentrados de proteínas vitamino-K dependientes con trombina. A la proteína responsable de esta actividad

la denominaron autoprotrombina IIa porque pensaron que era un derivado proteolítico de la trombina (22). Posteriormente Marciniak demostró que la autoprotrombina IIa no deriva de la protrombina, sino que era una proteína diferente (23). En 1976 Stenflo separó por cromatografía las proteínas dependientes de la vitamina K y obtuvo cuatro picos proteicos que denominó A, B, C, y D. Más tarde demostró que el pico A correspondía al factor IX, el pico B a la protrombina y el D al factor X. La función del pico C «la proteína C» le fue desconocida (24). De nuevo Seeger y col. demostraron que la proteína C y la previamente descrita autoprotrombina IIa eran inmunológicamente idénticas (25).

Estructura

Es una glicoproteína de peso molecular 62.000 D, constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. Es una proteasa serínica vitamínica K dependiente, característica que comparte con los factores VII, IX, X y protrombina. Contiene 10 residuos gamma-carboxiglutámicos, formados por carboxilación de residuos glutámicos, que le dan la capacidad de unirse a los iones calcio y a las superficies fosfolípicas (26).

Mecanismo de acción

Activación de la proteína C (Fig. 1). La proteína C para ejercer su función necesita ser activada. El único activador fisiológico conocido es la trombina. La activación consiste en la hidrólisis de un pequeño péptido de la cadena pesada. Al activar la proteína C en su sistema «in vitro» se aprecia que la reacción es muy lenta. Sin embargo la inyección directa de trombina en la vena yugular de rata produce una acción anticoagulante en minutos (27). Este hecho sugiere un mecanismo diferente a la simple activación direc-

ta por la trombina. Se ha demostrado que el endotelio capilar es capaz de catalizar la activación por la trombina de la proteína C en un tiempo infinitamente menor que con la trombina «in vitro» (28), lo que evidencia la existencia de un «cofactor» endotelial en la activación de la proteína C. Este cofactor recibe el nombre de trombomodulina. Al unirse la trombina a la superficie celular a través de la trombomodulina, aquella pierde su acción procoagulante, efecto que es reversible al deshacerse la unión (29). Para que la trombomodulina ejerza plenamente su papel de cofactor necesita la superficie endotelial puesto que al añadir trombomodulina, trombina y proteína C «in vitro» se acelera la activación de la proteína C pero no alcanza los niveles apreciados «in vitro» (30). Los iones calcio son necesarios para que la trombomodulina cumpla su papel de cofactor (31), sin embargo, en ausencia de trombomodulina los iones calcio inhiben la activación de la proteína C por la trombina (30).

Como veremos posteriormente una de las funciones de la proteína C activada es la inactivación del Factor V activado. Salem y col. han demostrado que, paradójicamente, el factor V activado puede actuar como un cofactor en la activación de la proteína C por la trombina, aunque la afinidad de la trombina por el factor V es mucho menor que por la trombomodulina (32). Recientemente se ha demostrado que bajas concentraciones de factor V activado promueven la activación de la proteína C y altas concentraciones de dicho factor la inhiben, por lo que se propone el factor V como regulador de la activación de la proteína C en la superficie de los endotelios (33). Otro regulador es la antitrombina III ya que inhibe la activación de la proteína C en la superficie endotelial, mediante la neutralización de la trombina unida a la trombomodulina (30).

Acción anticoagulante y fibrinolítica de la proteína C activada (Fig. 1).

Una vez activada la proteína C (proteína Ca) ejerce su función de potente anticoagulante al inhibir mediante proteólisis

sustratos sobre los que actúe la proteína Ca (34). En 1980 Walker aprecia que la inactivación in vitro del factor V por la proteína C activada es mejorada por un cofactor plasmático (35). Identificó este cofactor y encontró que era idéntico a una

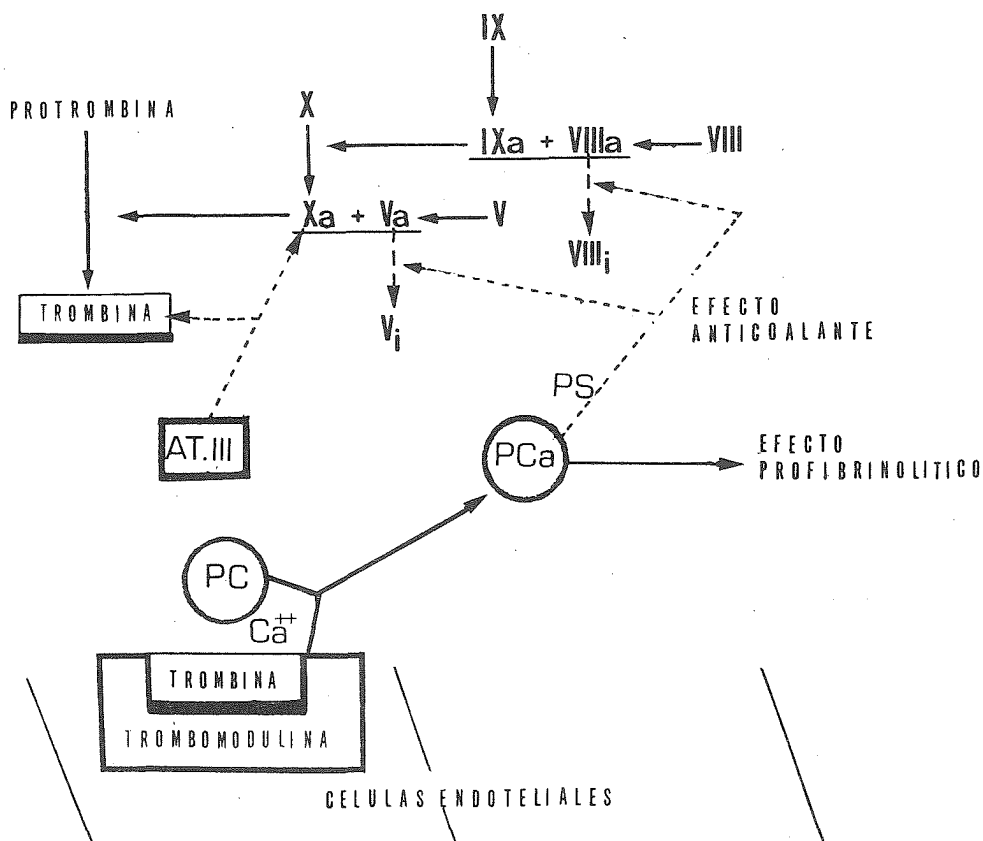


FIG. 1. Efecto anticoagulante de la proteína C y antitrombina III. La primera actúa sobre cofactores de coagulación (V y VIII) mientras que la segunda lo hace de forma directa como antitrombina y ant-X. Obsérvese como es la propia trombina generada la que pone en marcha la activación de la proteína C

a los factores V y VIII de la coagulación. La inhibición de estos factores requiere calcio y fosfolípidos y es mucho más rápida sobre los factores activados que sobre los nativos. No se han encontrado otros

proteína dependiente de la vitamina K que había sido previamente descrita por Di Scipio (36) y que había designado «proteína S». Tanto en sistemas purificados como en superficies fosfolipídicas se

había observado que la velocidad de inactivación de los factores V y VII por la proteína Ca era muy lenta. El hallazgo de este cofactor justifica la potente acción anticoagulante observada en el plasma. La proteína S está regulada por la trombina que la hidroliza en solución, no así cuando está unida a los fosfolípidos. Además de libre en el plasma la proteína S está contenida en un inhibidor proteico del sistema de complemento y constituye una nueva interrelación entre el sistema de coagulación y complemento (37).

Además del factor anticoagulante ya analizado, la proteína Ca realiza una acción fibrinolítica. La proteína Ca eleva el activador del plasminógeno al neutralizar el inhibidor de dicho activador (38).

La proteína C activada también posee su regulador, el inhibidor de la proteína Ca. Su función se ejerce formando complejos 1:1 con la proteína Ca (39).

Propiedades generales

La proteína C se sintetiza en el hígado y se encuentra circulando en el plasma en una concentración de $4,8 \pm \text{img/litro}$ ó $100 \% \pm 30 \%$ de un pool de plasma normal. Presenta una vida media/corta de 6 horas. Se encuentra disminuida en el recién nacido (26, 48).

Déficit familiar de proteína C

En 1981, Griffin y col. describieron el caso de un varón de 21 años con tromboflebitis recidivantes que tenía concentraciones normales de antitrombina III y el resto de parámetros de coagulación sin alterar. Presentaba historia familiar de trombosis recurrentes en la edad adulta joven. Encontraron niveles de proteína C por debajo del 50 % en el paciente, en el padre y en un tío paterno (40). Posteriormente se identificaron nuevas familias quedando demostrada la relación entre niveles dis-

minuidos de proteína C y aparición de enfermedad tromboembólica.

Las manifestaciones clínicas del déficit de proteína C son muy similares al de antitrombina III, con aparición de *trombosis en extremidades inferiores* y episodios de *embolismo pulmonar* en personas jóvenes como trastornos más frecuentes. La deficiencia homocigota puede expresarse por la aparición de *púrpura fulminante neonatal* (41) o por trombosis masiva venosa también neonatal (42), procesos mortales en la mayoría de los casos. En estos niños se demuestran cifras de proteína C por debajo del 10 % y deficiencia heterocigota en los progenitores. La mitad de los pacientes con déficit de proteína C presentan tromboembolismo antes de los 30 años de vida y el 1 % de todos los episodios de tromboembolismo pueden atribuirse a esta carencia (43). La enfermedad se hereda de un modo autosómico dominante. Recientemente se han descrito métodos que permiten determinar la actividad funcional de la proteína C (44, 45), lo que ha permitido describir pacientes con niveles antigénicos normales y baja actividad funcional que presentan trombosis de repetición (46).

El *tratamiento* de los episodios trombóticos en esta enfermedad se efectúa con heparina en su inicio y posteriormente con anticoagulantes orales. El inicio de la terapia cumarínica puede desencadenar necrosis cutánea recurrente con mayor facilidad en estos pacientes puesto que los cumarínicos reducen aún más los niveles de proteína C y de forma más precoz que los niveles de protrombina, factor IX y factor X (26). Dado que los cumarínicos deprimen la función y los niveles antigénicos de los factores vitamínicos K dependientes, la deficiencia de proteína C puede ser estudiada en personas que toman cumarínicos por el cálculo de la relación entre los niveles antigénicos de proteína C y protrombina. En condiciones normales es de 0,9 a 1,55 y en caso de dé-

ficit de proteína C la relación es menor de 0,6 (40). La deficiencia homocigota requiere de transfusión de plasma fresco y crio-precipitados a la vez de cumarínicos (47).

Déficit adquirido de proteína C

En la C.I.D. disminuye la proteína C por consumo, así como en el síndrome de distress respiratorio del adulto. En las hepatopatías graves los niveles de proteína C están bajos por trastornos de la síntesis hepática (49).

Déficit de proteínas S

En 1984 se describieron los primeros casos de déficit de esta proteína de forma familiar en pacientes con niveles normales de proteína C, antitrombina III y trombosis recurrente (50). La herencia es autosómica dominante.

La proteína S disminuye de forma adquirida en las hepatopatías y en la C.I.D. (51).

BIBLIOGRAFIA

1. SEEGER, N. H.; JOHNSON, J. F.; FELL, C.: *Antithrombin reaction related to protrombin activation*. Am. J. Physiol., 1954, 176: 97-103.
2. COSGRIFF, T. M.; BISHOP, P. D. T.; HERSHGOLD, E. J.; SKOLNICK, M. H.; MARTÍN, B. A.; BATY, B. J. and CARLSON, K. S.: *Familial Antithrombin III Deficiency; Its Natural History, Genetics, Diagnosis and Treatment*. Medicine., 1983, 62: 209-220.
3. NORDENMANN, B.; NYSTROM, C.; BJORK, I.: *The size and shape of human and bovine antithrombin III*. Eur. J. Biochem., 1977, 78: 195-203.
4. FISH, W. W.; BJORK, I.: *Production by thrombin of a proteolytically modified form of antithrombin and release of the same form from the antithrombin-thrombin complex*. Thromb. Haemost. (A). 1979, 42: 129.
5. ABILDGAARD, U.; ODEGARD, O. R.; KJERULF, P.; PEPPER, D. S.: *Influence of platelet factor 4 on inhibited thrombin substrate reactions*. Thromb. Res., 1974, 5: 185.
6. FISH, W. W.; BJORK, I.: *Release of a two-chain form of antithrombin from the antithrombin-thrombin complex*. Eur. J. Biochem., 1979, 101: 31-38.
7. ROSENBERG, R. D.; DAMUS, P. S.: *The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor*. J. Biol. Chem., 1973, 248: 6.490.
8. ROSEMBERG, R. D.; LAM, L.: *Correlation between structure and function of heparin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76: 1.218-22.
9. ABILDGAARD, U.: *Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by antithrombin III, studied by N-terminal analysis*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1967, 20: 205.
10. BUONASSISI, V.: *Sulfated mucopolysaccharides synthesis and secretion in endothelial cell cultures*. Exp. Cell. Res., 1973, 76: 363.
11. YIN, E. T.; WESSLER, S.; STOLL, P. J.: *Biological properties of the naturally occurring plasma inhibitor to activated factor X*. J. Biol. Chem., 1971, 246: 3.703.
12. GONZÁLEZ SARMIENTO, R.: *Biología de estados trombofílicos. Estudio de inhibidores de proteasa serínicas y proteína C*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. 1985.
13. COLLEN, D.; SCHETZ, J.; DE COCK, F.; HOLMER, E.: *Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man. Effects of venous thrombosis and of heparin administration*. Eur. J. Clin. Invest., 1977, 7: 27-35.
14. TEGER-NILSON, A. C.: *Antithrombin in infancy and childhood*. Acta Paediatr. Scand., 1974, 64: 624-628.
15. THALER, E.; LECHNER, K.: *Antithrombin III deficiency and thromboembolism*. Clin. Haematol., 1981, 10: 369-390.
16. SAS, G.; PETO, I.; BANHEGYI, D. et al.: *Heterogeneity of the classical antithrombin III deficiency*. Thromb. Haemost., 1980, 43: 133-136.
17. PENNER, J. A.; HASSOUNA, H.; HUNTER, M. J.; CHOCKLEY, M.: *A clinically silent antithrombin III defect in an Ann Arbor family*. Thromb. Hemostas (A), 1979, 42: 189.
18. TULLIS, J. L.; WANATABE, K.: *Platelet antithrombin deficiency, a new clinical entity*. Am. J. Med., 1978, 65: 472-478.
19. VICENTE, J. M.; DÍAZ CREMADES, J. M.; BORREL, M. y cols.: *Antitrombina III: correlación, estructura función en individuos normales y cí-móticos*. Sangre, 1978, 23: 544-553.

20. KAUFFMAN, R.; VELTKAMP, J.; VAN TILBURG, N.; VAN, E. S.: *Acquired antithrombin III deficiency and thrombosis in de nephrotic syndrome*. Am. J. Med., 1978, 65: 605-613.
21. MULLER-BERGHHAUS, G.: *Pathophysiology of generalized intravascular coagulation*. Sem. Thromb. Hemost., 1977, 3: 209-246.
22. MAMMEN, E. F.; THOMAS, W. R.; SEEGER, W. H.: *Activation of purified prothrombin to autoprothrombin II (platelet cofactor II on autoprothrombin II-A)*. Thromb. Diath. Haemorrh., 1960, 5: 218-49.
23. MARCINIAK, E.; MURANO, G.; SEEGER, W. H.: *Inhibitor of blood clotting derived from prothrombin*. Thromb. Diath. Haemorrh., 1967, 18: 161-6.
24. STENFLO, J.: *A new vitamin K-dependent protein: purification from bovine plasma and preliminary characterization*. J. Biol. Chem., 1976, 251: 355-63.
25. SEEGER, W. H.; NOVOA, E.; HENRY, R. L.; HASSOUNA, H. I.: *Relationships of «new» vitamin K-dependent protein C and «old» autoprothrombin II-A*. Thromb. Res., 1976, 8: 543-52.
26. LAWRENCE, H.; CLOUSE, M. D. et al.: *The regulation of hemostasis: the protein C system*. The new Engl. J. of Med., 1986, 314: 1.298-1.304.
27. WETMORE, R.; GUREWICH, V.: *The role of fibrin monomers and in vivo thrombin-induced anticoagulant in experimental venous thrombosis*. Scand. J. Haematol., 1974, 12: 204-12.
28. ESCON, C. T.; OWEN, W. G.: *Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78: 2.249-52.
29. ESMON, C. T.; ESMON, N. L.; HARRIS, K. W.: *Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation*. J. Biol. Chem., 1982, 257: 7.944-47.
30. ESMON, C. T.; ESMON, N. L.: *Protein C activation*. Sem. Thromb. Hemost., 1984, 10: 122-130.
31. JOHNSON, A. E.; ESMON, N. L.; LAVE, T. M.; ESMON, C. T.: *Estructural changes required for activation of protein C are induced by Ca²⁺ + binding to a high affinity site that does not contain —carboxylglutamic acid. I—*. Biol. Chem., 1983, 258: 5.554-60.
32. SALEM, H. H.; BROZE, G. S.; MILETICH; MAJERUS, P. W.: *Human coagulation factor V is a cofactor for the activation of protein C*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80: 1.584-8.
33. MARUYAMA, I.; SALEM, H. H.; MAJERUS, P. W.: *Coagulation factor V binds to human umbilical vein endothelial cells and accelerates protein C activation*. J. Clin. Invest., 1984, 74: 224-30.
34. KISSIEL, W.; CANDFIELD, W. M.; ERICSSON, L. H.; DAVIE, E. N.: *Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin*. Biochem, 1977, 16: 5.824-31.
35. WALKER, F. J.: *Regulation of activated protein C by a new protein: a possible function for bovine protein S*. J. Biol. Chem., 1980, 255: 5.521-4.
36. DI SCIPIO, R. G.; HERMODSON, M. A.; YATES, S. G.; DAVIE, E. W.: *A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S*. Biochemistry, 1977, 16: 698-706.
37. SUZUKI, K.; NISHIOKA, J.; HASHIMOTO, S.: *Regulation of activated protein C by thrombin modified proteins*. S. I Biochem., 1983, 94: 699-702.
38. VAN HINSBERGH, V. W. M.; BERTINA R. M.; VAN WIJHGAARDEN, A.; VAN TILBURG, N. H. et al.: *Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell conditioned medium*. Blood., 1985, 65: 444-51.
39. SUZUKI, K.; NISHIOKA, J.; HASHIMOTO, S.: *Protein C inhibitor: purification from human plasma and characterization*. J. Biol. Chem., 1983, 258: 163-8.
40. GRIFFIN, J. H.; EVATT, B.; ZIMMERMAN, T. S.; KLEISS, A. J.; WIDEMAN, C.: *Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease*. J. Clin. Invest., 1981, 68: 1.370-3.
41. BRANSON, H. E.; KATZ, J.; MARBLE, R.; GRIFFIN, J. H.: *Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant*. Lancet, 1983, 2: 1.165-8.
42. SELIGSOHN, V.; BERGER, A.; ABEND, M. et al.: *Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn*. N. Engl. J. Med., 1984, 310: 559-62.
43. BROEKMANS, A. W.; VAN DER LINDEN, I. K.; VELTKAMP, J. J.; BERTINA, R. M.: *Prevalence of isolated protein C deficiency in patients with venous thrombotic disease and the population*. Thromb. Haemost. (A). 1983, 50: 351.
44. FRANCIS, R. B.; PATCH, M. J.: *A functional assay for protein C in human plasma*. Thromb. Res., 1983, 605-613.
45. COMP, P. C.; NIXON, P. R.; ESMON, C. T.: *Determination of functional levels of protein C, an antithrombotic protein, using thrombin thrombomodulin complex*. Blood., 1984, 63: 15-21.

46. BERTINA, R. M.; BROEKMANS, A. W.; KROMMENTOEK-VAN, E. S. C.; VAN WIJNGAARDEN, A.: *The use of a functional and immunologic assay for plasma protein C in the study of the heterogeneity of congenital protein C deficiency*. Thromb. Haemost., 1984, 51: 1-5.
47. BRANSON, H. E.; KATZ, J.; MARBLE, R.; GRIFFIN, J. H.: *Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant*. Lancet, 1983, 2: 1.165-1.168.
48. EPSTEIN, D. S.; BERGUM, P. W.; BAJAJ, S. P.; RAPAPORT, S. I.: *Radioimmunoassays for protein C and factor X: plasma antigen levels in abnormal hemostatic states*. Am. J. Clin. Pathol., 1984, 82: 573-81.
49. MANNUCCI, P. M.; VIGANO, S.: *Deficiencies of protein C. an inhibitor of blood coagulation*. Lancet, 1982, 2: 463-467.
50. COMP, P. C.; NIXON, R. R.; COOPER, M. R.; ESMON, C. T.: *Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis*. J. Clin. Invest., 1984, 74: 2.082-88.
51. BERTINA, R. M.; VAN WIJNGAARDEN, A.; REINALDA-POOT, J. *et al.*: *Determination of plasma protein S the protein cofactor of activated protein C*. Thromb. Haemost., 1985, 53: 268-72.