

COFACTOR II DE LA HEPARINA (HCII), UN INHIBIDOR DE TROMBINA CUYO ROL FISIOLÓGICO NO ESTA COMPLETAMENTE ESCLARECIDO

ELEONORA B. ROSSI, CRISTINA L. DUBOSCQ, LUCIA C. KORDICH

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Resumen El Cofactor II de la Heparina (HCII) es una proteína perteneciente al sistema de coagulación que inhibe específicamente trombina, proceso que es potenciado por acción de los glicosaminoglicanos dermatán sulfato y heparina. Hasta el momento las deficiencias congénitas de HCII encontradas en forma aislada no están asociadas con eventos tromboticos, sí desarrollan eventos tromboticos cuando están asociadas a otros factores predisponentes. Se observó disminución en los niveles de HCII en hepatopatías, coagulación intravascular diseminada, en anemia drepanocítica, encontrándose niveles elevados en embarazo a término y por el uso de contraceptivos orales. En el laboratorio realizamos el dosaje del HCII en la población normal de la ciudad de Buenos Aires, en diversas patologías como sepsis, quemados, anticoagulados con dicumarínicos y con heparina, diabéticos, hiperhomocisteinemia, observándose valores disminuidos principalmente en sepsis y pacientes diabéticos. El HCII es una glicoproteína que participa en la inhibición de trombina pero cuyo rol fisiológico no está completamente esclarecido. Es probable que el HCII inhiba trombina en el espacio extravascular, y esté relacionado con la regulación de procesos inflamatorios y de reparación tisular.

Abstract *Heparin cofactor II, a thrombin inhibitor with a still unclarified physiologic role.* Heparin Cofactor II (HCII) is a glycoprotein in human plasma which inactivates thrombin rapidly in the presence of dermatan sulfate. Inhibition occurs by formation of a stable equimolar complex between HCII and thrombin. HCII association with thrombotic events has not always been observed, thus decreased HCII does not appear to be a strong risk factor for thromboembolic events. Reduced HCII levels have been detected in different clinical conditions, such as hepatic failure, disseminated intravascular coagulation, thalassemia, sickle cell anemia. Increased physiological levels have been found in pregnant women and oral contraception. In our laboratory, we measured HCII plasmatic levels in the normal Buenos Aires city population and in patients under different clinical conditions, such as sepsis, diabetes, burns, oral anticoagulation and in patients treated with heparin, hyperhomocysteinemia in whom septic and diabetic patients showed decreased values. HCII thrombin inhibition possibly takes place in extravascular sites where dermatan sulfate is present. HCII activity would be important in the regulation of wound healing, inflammation, or neuronal development.

Key words: heparin cofactor II, thrombin, dermatan sulfate

El Cofactor II de la Heparina (HCII) es un inhibidor fisiológico del sistema de coagulación que inhibe específicamente trombina. La coagulación sanguínea es un sistema de defensa del organismo que mantiene la integridad del sistema vascular. Cuando se produce una injuria tisular, un daño en los capilares o vasos sanguíneos, el sistema hemostático es el encargado de impedir la extravasación de sangre.

En el sistema hemostático intervienen plaquetas, célula endotelial, sistema de coagulación (factores de coa-

gulación e inhibidores fisiológicos), sistema fibrinolítico (factores e inhibidores fisiológicos), también otros sistemas como el complemento, renina-angio-tensina, quinas-caliceínas, factores reológicos, etc. Alteraciones en alguno de los componentes de estos sistemas puede afectar al sistema hemostático y conducir a procesos hemorrágicos o estados hipercoagulables^{1, 2}.

La activación del sistema de coagulación conduce a la formación de trombina, enzima clave del sistema de coagulación. La trombina presenta múltiples funciones, transforma fibrinógeno en fibrina para formar la malla insoluble del coágulo³, colaborando en la estabilización de la malla activando al factor XIII, amplifica el sistema de coagulación activando los factores V, VIII y XI y activa plaquetas, interviene en el proceso de inhibición del sistema de coagulación ya que a través de trombo-modulina activa la Proteína C (inhibidor fisiológico del sistema de

Recibido: 14-VII-1998

Aceptado: 19-VIII-1998

Dirección postal: Dra. Eleonora Rossi, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 4to piso, Pabellón II, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina
Fax: 54-1-4576-3342; E-mail: lht@qb.fcen.UBA.ar

coagulación) y produce la activación de la célula endotelial colaborando de este modo en el proceso trombolítico⁴.

La formación de trombina en los lugares de injuria vascular se produce de manera explosiva, auto amplificada y muy regulada. Existen dos niveles de regulación, uno que modula la formación de trombina por acción del inhibidor de la vía extrínseca (TFPI) que inhibe a nivel del FXa y FVIIa-factor tisular y el sistema de la Proteína C y Proteína S (PC y PS) que actúa inhibiendo el FVa y FVIIIa. El segundo nivel de regulación está dado por la inhibición directa de la trombina formada. La vida media de la trombina en plasma está limitada por la acción de inhibidores de serino proteasas como Antitrombina III (ATIII), Cofactor II de la Heparina (HCII) y Proteasa Nexina I⁵.

En 1939 Brinkhous y col.⁶ demostraron que ATIII era la proteína plasmática necesaria para la actividad anticoagulante de la heparina. Históricamente había 6 Antitrombinas, la que actualmente se denomina ATIII era la que presentaba actividad de "antitrombina progresiva" y "cofactor de heparina".

En 1968 Abildgaard⁷ aisló una proteína plasmática que presentaba estas dos actividades. En 1974 Briginshaw y Shanberge⁸ identificaron 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, presentaba un peso molecular similar a Antitrombina III (ATIII). El cofactor de heparina A (actualmente conocido como HCII) no inhibía factor Xa y presentaba un peso molecular distinto al de ATIII.

Tollefsen y Blank⁹ en 1981 confirmaron los trabajos de Briginshaw y Shanberge al identificar inmunológicamente ATIII y HCII como dos entidades distintas pero con similitudes funcionales.

El HCII es una glicoproteína plasmática, miembro de la superfamilia de las serpinas (inhibidores de serinoproteasas) que inhibe principalmente trombina. El HCII actúa como un pseudosustrato ya que la trombina intenta escindir al HCII y queda atrapada formando un complejo 1:1 donde la trombina permanece inactiva. El Dermátán sulfato (DS), heparina y otros glicosaminoglicanos potencian aproximadamente 1000 veces, la inhibición de trombina por HCII. HCII también inhibe quimiotripsina, pero la interacción no es potenciada por glicosaminoglicanos.

Estructura proteica

El HCII es una cadena polipeptídica simple de un peso molecular de 65.600 D¹⁰. Es sintetizado en el hígado como una cadena polipeptídica de 480 aminoácidos¹¹ y su concentración plasmática es de aproximadamente 1.2 µM, con una vida media de 2.5 días¹². El gen que codifica su síntesis está ubicado en la banda 11 del brazo largo del cromosoma 22 (22q11)¹³.

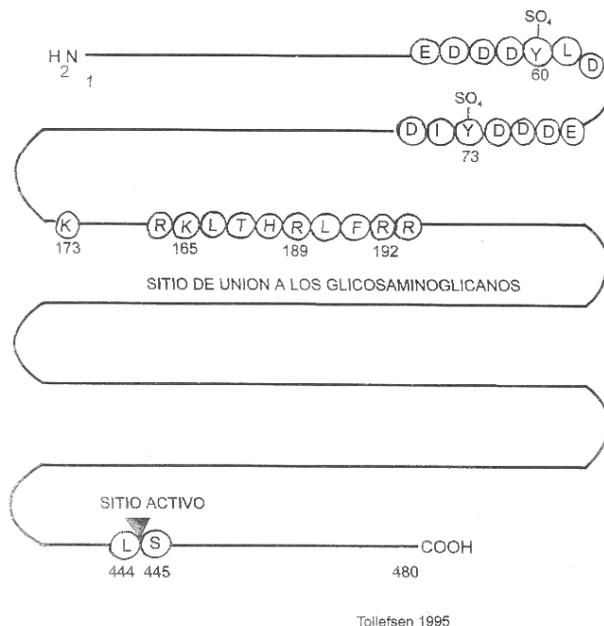


Fig. 1.— Diagrama esquemático de la molécula de HCII

El HCII presenta estructuralmente un sitio activo, un sitio de unión a los glicosaminoglicanos y un dominio ácido aminoterminal. (Fig. Nº 1).

El sitio activo del HCII, como otras serpinas, está conformado por una secuencia de aminoácidos que son accesibles al ataque proteolítico que se denomina sitio activo. La proteasa blanco (trombina) reconoce la unión peptídica llamada P₁-P₁' la cual en el HCII está constituida por Leu⁴⁴⁴-Ser⁴⁴⁵, y así la trombina queda atrapada en un complejo 1:1 altamente estable donde la trombina está inactiva.

Estudios con HCII mutado demostraron que Leu en posición P₁, hecho poco habitual para los sustratos de trombina, es el responsable de que la inhibición de trombina por HCII en ausencia de glicosaminoglicanos sea mínima¹⁴.

El dominio de unión a glicosaminoglicanos del HCII presenta distintos subsitios discretos para la unión de heparina y dermatán sulfato, los cuales se superponen parcialmente^{15, 16}.

La inhibición de trombina por HCII aumenta más de 1000 veces por acción de heparina, heparán sulfato o dermatán sulfato¹⁷ así como también por otras macromoléculas polianiónicas como policarboxilatos, polifosfatos y polisulfatos^{18, 20}. La cantidad de heparina necesaria para potenciar al HCII es 20 veces mayor que la requerida para potenciar ATIII, mientras que el DS potencia exclusivamente HCII no ejerciendo efecto sobre la potenciación de ATIII²¹.

En el extremo aminoterminal de la molécula el HCII posee una secuencia que es similar al segmento carboxiterminal de la hirudina, porción que reconoce una secuencia específica de trombina²², lo que facilitaría la formación del complejo trombina-HCII. Se comprobó que la unión de la secuencia similar a hirudina del HCII con trombina se favorece por la presencia de glicosaminoglicanos²³.

Mecanismo de inhibición de trombina

Debido a la gran similitud estructural y funcional de ATIII y HCII y a que ambos son potenciados por glicosaminoglicanos, en un principio se pensó que presentaban el mismo mecanismo de inhibición de trombina, mediante el proceso de templado. Estudios recientes postularon que la inhibición de trombina por HCII se produce mediante un mecanismo de inhibición alostérica, mientras que la inhibición de trombina por ATIII se produce mediante el mecanismo de templado²⁴.

Modelo de inhibición alostérica

El modelo de inhibición de trombina por HCII propuesto por Tollefsen se muestran en la Figura 2A. 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 similar a hirudina está bloqueado y no puede interactuar con trombina (conformación no expuesta). Cuando Dermatan Sulfato está presente compite por el sitio de unión a GAG, pro-

duce el desplazamiento del extremo aminoterminal del HCII, liberando el extremo aminoterminal del HCII que interactúa con trombina (conformación expuesta). La unión de HCII a trombina produciría el acercamiento de ambas moléculas en la orientación adecuada, o induciría un cambio conformacional en la molécula de HCII, colocando el sitio activo de HCII en una posición que facilitaría la interacción del sitio activo de trombina sobre el HCII, promoviendo la formación del complejo.

Podría haber 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^{24, 25}.

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

Modelo de inhibición por templado

El mecanismo de inhibición por templado requiere que la molécula de trombina y el inhibidor se unan simultáneamente a una misma molécula de glicosaminoglicano (Fig. 2 B).

Este modelo de templado es el propuesto para la inhibición de trombina por ATIII. La molécula de ATIII se une a un pentasacárido específico de heparina que produce un cambio conformacional en ATIII, la misma molécula de heparina se une también a trombina y como consecuencia del acercamiento de ambas moléculas y del cambio conformacional de ATIII se forma el complejo trombina-ATIII-heparina altamente estable, el que pierde su afinidad por la heparina que es liberada²⁶⁻²⁹.

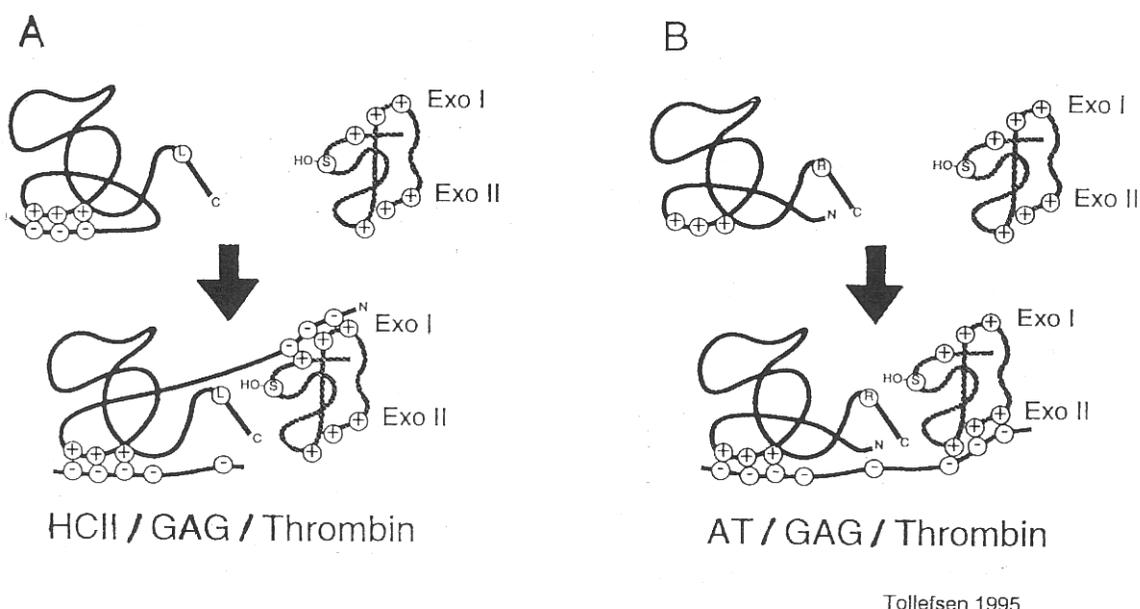


Fig. 2.- Mecanismos de inhibición de trombina. A. Modelo de inhibición alostérica. B. Modelo de inhibición por templado.

La base del modelo de "templado", "puente" o "complejo ternario" es la unión de una misma molécula de heparina a trombina y a su inhibidor.

Inhibición de meizotrombina

En el proceso de formación de trombina se forma un producto intermedio que se denomina meizotrombina³⁰. Recientemente se demostró que el HCII en presencia de Dermatán Sulfato inhibe más eficientemente meizotrombina que el complejo ATIII-heparina³¹.

Esta diferencia estaría determinada porque el HCII utiliza el mecanismo alostérico de inhibición, por lo tanto sólo HCII se une al glicosaminoglicano. En cambio ATIII utiliza el mecanismo de inhibición de templado en donde tanto la serinoproteasa como la ATIII se unen a la misma cadena de glicosaminoglicano, meizotrombina no presenta la capacidad de unirse a heparina, por lo tanto no puede formar el templado.

Esto indicaría que el HCII presenta la capacidad de inhibir un producto intermediario previo a la formación de trombina.

Por otra parte demostró que el complejo HCII-DS es más eficiente en inhibir trombina unida al coágulo que el complejo ATIII-heparina indicando un importante rol del HCII en la hemostasia³².

En circulación existen varias proteínas que modulan la acción de los glicosaminoglicanos endógenos y exógenos. 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 y proteínas básicas que unen heparina de los eosinófilos. De todas ellas se demostró que sólo el FP4 secretado por las plaquetas activadas tiene la capacidad de prevenir la inhibición de trombina por HCII en presencia de Dermatán Sulfato^{33, 34}.

Depuración del complejo trombina-HCII

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-elastasa. Se propone que este receptor hepático sería la Proteína Relacionada con el Receptor de la Lipoproteína de Baja Densidad (LRP)³⁵.

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 vitronectina, una proteína plasmática adhesiva, formando complejos ternarios serpina-trombina-vitronectina³⁶. La unión de vitronectina al complejo trombina-serpina se realiza a través de 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 vitronectina se une a conformaciones alteradas de trombina.

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 desempeña la función depuradora de los complejos trombina-serpina³⁷.

La unión de trombina-serpina (trombina-HCII) a vitronectina induce un cambio conformacional en el plegamiento de la molécula de vitronectina de manera que expone sitios de unión a heparina y se produce la adhesión a células endoteliales mediada por heparina, ya que vitronectina no pierde sus propiedades como proteína adhesiva³⁸. 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 degradarlos³⁹.

El Dermatán Sulfato como droga antitrombótica

El Dermatán Sulfato es un glicosaminoglicano sintetizado por los fibroblastos y se localiza en las paredes vasculares⁴⁰.

Normalmente este glicosaminoglicano no se encuentra en circulación, ya que los niveles de DS plasmáticos en personas sanas son casi nulos⁴¹. Se encontraron niveles plasmáticos de DS elevados en mujeres embarazadas y en pacientes con hemodiálisis crónica^{42, 43}.

Se realizaron estudios en animales y en pacientes utilizando Dermatán Sulfato que confirmaron su capacidad como droga antitrombótica. El DS presenta la ventaja de presentar menor tendencia al sangrado que la heparina de bajo peso molecular, pero el DS presenta baja biodisponibilidad después de la administración subcutánea e intramuscular. Se desarrollaron Dermatán Sulfatos de bajo peso molecular (LMWDS) que presentan mejor biodisponibilidad pero mayor depuración plasmática, aún no se realizaron ensayos clínicos con LMWDS.

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 fraccionada⁴⁴. También se comprobó que 300 mg de DS es efectivo en prevenir la trombosis venosa profunda en paciente con fractura de cadera⁴⁵.

La mejor indicación para la administración de Dermatán 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 diseminada⁴⁶.

La determinación de HCII en el laboratorio

En el plasma se puede medir la actividad y el nivel antigénico del HCII.

La actividad se mide por métodos amidolíticos utilizando sustratos cromogénicos. En una primera etapa se agrega trombina humana en exceso y Dermatán Sulfato a una dilución del plasma en estudio, se forma el complejo trombina-HCII y se mide la actividad amidolítica de la trombina residual sobre el sustrato cromogénico que desarrolla color y se lee espectrofotométricamente a 405 nm. El desarrollo del color es inversamente proporcional a la concentración de HCII^{47, 48}.

Para diferenciar el dosaje de HCII del de ATIII se utiliza trombina humana ya que el HCII presenta especificidad de especie y el Dermatán Sulfato como potenciador específico para HCII; mientras que para la medición de ATIII se utiliza trombina bovina y heparina a concentraciones que no potencian al HCII⁴⁹.

El nivel antigénico de HCII se mide mediante electroinmunodifusión.

Los valores de referencia obtenidos para la actividad plasmática de HCII son de 75 a 110% y los valores antigénicos de HCII son de 70 a 130%.

Como se observa el rango de normalidad de este inhibidor es considerablemente amplio, cuando se lo compara con el valor de referencia de otros inhibidores (ATIII 80-120%).

Estados deficitarios de HCII

Los estados deficitarios de HCII pueden ser congénitos o adquiridos.

La trombofilia es la tendencia a la trombosis. Trombofilia hereditaria es la tendencia al tromboembolismo venoso genéticamente determinada. Anormali-

dades dominantes o combinaciones de defectos menos severos pueden presentarse clínicamente desde edad temprana, recurrencia frecuente o historia familiar. Alteraciones más leves sólo pueden ser descubiertas por investigaciones de laboratorio⁵⁰.

La deficiencia hereditaria de algún inhibidor fisiológico de la coagulación (ATIII, PC, PS) está asociada con riesgo trombótico, pero cuando se estudian familias con igual genotipo y se observa que no todos los miembros desarrollan trombosis, se considera 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 actualmente se considera a la trombofilia como un desorden multigénico combinado⁵¹.

Deficiencia congénita de HCII

La siguiente clasificación se realizó para las mutaciones de ATIII y actualmente se utiliza también para las alteraciones del HCII.

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^{47, 52, 53}, pero otros autores sostienen que la prevalencia de la deficiencia de HCII es similar en personas sanas que en pacientes trombóticos⁵⁴.

En la actualidad se la considera como una causa potencial de trombofilia hereditaria pero sin evidencia firme⁵⁰.

Si tenemos en cuenta las mutaciones del HCII identificadas hasta el momento (Tabla 1): HCII Oslo⁵⁵, HCII Awaji⁵⁶ y HCII Rimini⁵⁷ en donde la primera se identificó

TABLA 1.- Clasificación de las deficiencias congénitas de HCII encontradas hasta el momento

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	Inserción 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

TABLA 2.- Niveles de HCII plasmáticos en diversas patologías

	n	UI/ml	Valor de referencia	ATIII	Ref
Hepatopatías	21	0.42 ± 0.15	1.00 ± 0.16	-	59
CID	95	0.40 ± 0.12	1.18 ± 0.45	-	58
HIV	96	0.75 ± 0.24	0.99 ± 0.17	1.02 ± 0.12	63
Drepanosistosis	61	0.63 ± 0.13	1.0 ± 0.23	0.96 ± 0.15	60
Renal crónico	33	0.85	0.75 ± 1.8	0.80 ± 0.24	64
Anticoag dicum	28	1.17 ± 0.24	1.10 ± 0.21		47
Anticoag Hep	10	1.09 ± 0.25	1.11 ± 0.26	0.81 ± 0.15	65
Diabetes	40	0.83 ± 0.7	0.95 ± 0.17		66

en dadores de sangre donde no estaban asociadas a eventos tromboticos, el HCII Rimini se encontró en dos pacientes con trombofilia pero que además de presentar la deficiencia de HCII, un paciente tenía asociado factor V Leiden y el otro deficiencia de PC del tipo I; el HCII Awaji en un paciente con angina pectoris severa y enfermedad arterial coronaria. Podemos coincidir que la deficiencia congénita de HCII representa un ligero riesgo de trombosis, que se manifiesta clínicamente cuando se presentan asociadas otras condiciones trombogénicas hereditarias o adquiridas⁵¹.

Deficiencia de HCII adquirida

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

La concentración de HCII está marcadamente disminuida en neonatos por la inmadurez hepática, en pacientes con hepatopatías que lleva a una disminución de la síntesis y en coagulación intravascular diseminada donde ocurre un aumento en el consumo, pero en todos estos casos los niveles de HCII y ATIII disminuyen en forma conjunta^{58, 59}.

Se demostró también que la concentración de HCII está ligeramente disminuida (0.68 ± 15 U/ml) en pacientes que presentan anemia drepanocítica no observándose en estos casos la disminución paralela de ATIII, también 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 HCII⁶⁰.

Se observó que el HCII se encuentra elevado en el embarazo a término y en mujeres con contracepción oral^{61, 62} (Ver Tabla 2).

Nuestra experiencia en la determinación del HCII en población normal de Buenos Aires y en pacientes con distintas patologías

Valor de referencia del HCII en Capital Federal

Se midieron los niveles de HCII en 150 muestras de 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 Clínica⁶⁷.

En esta población de Capital Federal se determinó los niveles plasmáticos de actividad y antigenicidad del HCII. Los intervalos de referencia definidos por fractiles y determinados por métodos no paramétricos fueron 75-110% de actividad y 70-130% de antigenicidad. Se puede observar que esta referencia coincide con lo descripto por la literatura para otras poblaciones. El rango de referencia de este inhibidor es amplio comparado con otros inhibidores fisiológicos como ATIII⁶⁸. (Ver Tabla 3).

HCII en pacientes sépticos

Dado que los pacientes sépticos presentan un estado hipercoagulable, nos pareció interesante estudiar cómo se comportaba el HCII con respecto al resto de los inhibidores del sistema de coagulación (PC, PS, ATIII).

Se dosaron la actividad plasmática del HCII en 45 pacientes sépticos (25 hombres y 32 mujeres) de acuerdo al diagnóstico de sepsis propuesto por el Conference Committee of The American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine⁷⁵. Se determinó los niveles de HCII en un grupo control formado por 17 pacientes de la misma unidad de terapia intensiva con problemas traumatológicos o accidente cerebrovascular. Los pacientes no presentaron evidencia clínica de coagulación intravascular diseminada.

TABLA 3.— Valores de referencia de HCII plasmáticos de la literatura

Autor	n	media SD	rango	Ref
Tran y Duckert	40	-	0.70-1.15	69
Andersson y col	197	09.95 ± 0.17	0.43-1.46	70
	182	0.92 ± 0.15	0.44-1.50	
Sie y col	70	1.10 ± 0.21	0.75-1.80	47
Abilgaard y Larsen	50	1.00 ± 0.15	0.75-1.39	71
Tollefsen y Petska	34	1.18 ± 0.22	0.62-1.40	58
Toulon y col	80	1.05 ± 0.22	0.58-1.92	72
Griffith y col	140	-	0.60-1.40	73
Proyecto VITA	4000	0.93 ± 0.18	0.65-1.28	68
Kordich y col	150	-	0.70-1.30	74

La muestra estudiada fue de plasma citratado con 10 UI/ml de aprotinina del día 1 del diagnóstico de sepsis.

Los niveles plasmáticos de HCII encontrados en la población séptica fueron de 29% (15-120) mediana y rango con un grupo control de terapia de 85% (80-110). Mientras que los valores de ATIII encontrados en los pacientes sépticos fueron de 71% (25-140) y los controles de terapia de ATIII fueron de 90% (70-110).

En estos pacientes sépticos se observaron niveles descendidos de HCII, los que no correlacionan con los niveles de ATIII.

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 local de una variedad de enzimas proteolíticas principalmente elastasa leucocitaria liberada por degranulación de los polimorfonucleares. La degradación de ATIII por la elastasa leucocitaria está ampliamente comprobada⁷⁶ y existen trabajos in vitro de Sie y colaboradores que corroboran que la elastasa leucocitaria liberada de los polimorfonucleares degradan HCII más rápidamente que ATIII⁷⁷. Este hecho nos hace pensar que el descenso de los niveles de HCII en pacientes sépticos podría ser la resultante de dos fenómenos, por un lado el consumo y por otro lado la degradación proteolítica por acción de las elastasas leucocitarias.

HCII en pacientes anticoagulados

Se estudió los niveles de actividad y antigenicidad plasmática de HCII en 30 pacientes anticoagulados con dicumarínicos, estabilizados en rango terapéutico con un RIN entre 2 y 3 y 26 pacientes anticoagulados con heparina no fraccionada por vía endovenosa continua en dosis terapéutica con valores de TTPA de 55-65 segundos. Las muestras fueron obtenidas al tercer día de comenzada la administración de heparina.

Se obtuvieron valores de HCII actividad en pacientes con dicumarínicos de $97.5 \pm 9.7\%$ y antigénicos de $91 \pm 6.9\%$ y en los pacientes heparinizados una actividad de HCII de $95.6 \pm 7.4\%$ y antigenicidad de $94.8 \pm 6.5\%$.

En los pacientes heparinizados los valores de ATIII fueron de $93.0 \pm 15.1\%$ y el de los pacientes con anticoagulación oral de $98.1 \pm 5.2\%$.

El tratamiento con anticoagulantes orales no modifica los niveles plasmáticos de HCII, lo que concuerda con lo descrito en la literatura⁴⁷.

HCII en pacientes quemados

Debido a que está ampliamente demostrado que los pacientes quemados sufren un gran proceso de activación debido a la injuria térmica se decidió estudiar los niveles plasmáticos de HCII en pacientes quemados y compararlos con los niveles plasmáticos del resto de los inhibidores fisiológicos de la coagulación.

Se determinó la actividad de HCII en 15 pacientes quemados cuya superficie corporal quemada fue de 42% (30-75) mediana y rango con un 20% (2-55) de superficie quemada tipo AB y un 23% (2-44) de tipo B.

Las muestras estudiadas fueron obtenidas dentro de las 10 horas de haberse producido la quemadura.

Los valores de la actividad de HCII encontrados en los pacientes quemados fueron de 80% (70-95) con valores de HCII antigénico de 83% (70-98); mientras que los niveles de ATIII plasmático encontrados fueron de 20% (17-52).

Los niveles plasmáticos de HCII en los pacientes quemados se encontraron en el límite inferior normal, mientras que los niveles plasmáticos de ATIII estaban marcadamente disminuidos (17-52%) lo cual indicaría que la ATIII es la primera en reaccionar frente a un proceso agudo de activación del sistema de coagulación.

La bibliografía no relata otros valores de HCII en pacientes quemados.

TABLA 4.— Valores de HCII actividad y antigenicidad en el Laboratorio de Hemostasia y Trombosis. UBA. Buenos Aires

	n	HCII actividad	HCII antigénico	ATIII (%)
Valor de ref	150	75-110	70-130	-
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 ± 15.1
Quemados	15	80 (70-95)	83 (70-98)	20 (17-52)
Diabéticos I	20	87 (80-100)	90 (87-110)	-
Diabéticos II	40	82 (79-94)	98 (80-120)	-
Hiperhomoc.	20	94 (42-115)	-	110 (56-134)

HCII en pacientes diabéticos

Debido a que está comprobado que ATIII sufre un proceso de glicosilación en los pacientes diabéticos que disminuye su funcionalidad, se decidió estudiar el comportamiento de este inhibidor en pacientes diabéticos.

Se estudió la actividad y antigenicidad del HCII en pacientes diabéticos, 20 diabéticos de tipo I con niveles normales de glucemia y hemoglobina glicosilada y 40 diabéticos de tipo II con niveles elevados de glucemia y hemoglobina glicosilada.

Los valores de HCII para los diabéticos tipo I fue de 90 ± 9% actividad y 94 ± 14% antigenicidad. Para los diabéticos de tipo II fue de 83 ± 7 para la actividad y de 98 ± 13 para la antigenicidad.

La actividad de HCII disminuye sólo cuando se observan altos niveles de glicemia y hemoglobina glicosilada (Diabéticos tipo II). La diferencia entre los niveles disminuidos de HCII actividad y los niveles normales de HCII antigénicos sugieren que la molécula de HCII es glicosilada no enzimáticamente, lo que concuerda con los perfiles electroforéticos bidimensionales alterados que presentan estos pacientes⁴⁸.

HCII en hiperhomocisteinemia

Se determinó la actividad de HCII en 20 pacientes con elevados valores de hiperhomocisteinemia 20.5 (14-40) µM (mediana y rango).

Los valores de HCII actividad obtenidos fueron de 94% (42-115) y los niveles de ATIII fueron de 110% (56-134). Como se puede observar los niveles elevados de homocisteína en plasma no modifican los niveles ni actividad de HCII ni de ATIII.

No se encontraron datos en la bibliografía que indiquen los valores de HCII en hiperhomocisteinemia. (Ver Tabla 4).

Los niveles de HCII plasmáticos no se modifican en pacientes anticoagulados con heparina o con dicu-

marínicos. La concentración de HCII está marcadamente disminuida en adultos con coagulación intravascular diseminada, en estas condiciones ATIII disminuye en grado similar. En pacientes sépticos con leucocitosis el HCII disminuye más marcadamente que la ATIII, debido probablemente a una degradación proteolítica.

De esta manera observamos que el HCII sería una glicoproteína que participa en la inhibición de trombina, pero su rol fisiológico aún no está plenamente establecido.

Estudios in vitro han demostrado que las células del músculo liso y los fibroblastos aumentan la inhibición de trombina por el HCII, lo cual sugiere que el HCII podría inhibir trombina en el espacio extravascular.

Es probable que el HCII inhiba trombina en situaciones no relacionadas con el sistema de coagulación. La capacidad del HCII de bloquear esas otras actividades de trombina (activar la célula endotelial, activar fibroblastos, promover la adhesión de neutrófilos, proliferación de fibroblastos) podría ser importante en la regulación de procesos inflamatorios y reparación tisular.

Será necesario realizar mayores estudios para establecer la verdadera función fisiológica del Cofactor II de la Heparina.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con el financiamiento económico de la Universidad de Buenos Aires a través del subsidio EX 192 (CS) 1411/94.

Bibliografía

1. Furie B, Furie BC. The molecular bases of blood coagulation. *In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H Ed. Hematology basic principles and practice.* 3rd ed. London: Churchill; 1991; p. 1213.
2. Sánchez Avalos JC. Fisiología de la hemostasia. *En Manual de Hemostasia y Trombosis.* Kordich L, et al. (eds) Buenos Aires: 000; 1990 p. 3-17.
3. Hemker HC. Thrombin generation, an essential step in haemostasis and thrombosis. *In: Haemostasis and Thrombosis.* A. Bloom et al (eds) Edinburg: Churchill

- Livingstone 1993; p 477-90.
4. Fenton JW II. Thrombin functions and antithrombotic intervention. *Thromb Haemost* 1995; 74 (1): 493-8.
 5. Guillin MC, Bezeaud A, Bouton MC, Jandrot-Perrus M. Thrombin specificity *Thromb Haemost* 1995; 74 (1): 129-33.
 6. Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. The inhibition of blood clotting. An unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent conversion of prothrombin to thrombin. *Am J Physiol* 1939; 125: 683-7.
 7. Abildgaard U. Purification of two progressive antithrombins of human plasma. *Scand J Lab Clin Invest* 1967; 19: 190-5.
 8. Briginshaw GF, Shanberge JN. Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. Separation and partial purification. *Arch Biochem Biophys* 1974; 161: 683-90.
 9. Tollefsen DM, Blank MK. Detection of a new Heparin-dependent inhibitor of Thrombin in human plasma *J Clin Invest* 1981; 68: 589-96.
 10. Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem* 1982; 257: 2162-9.
 11. Blinder MA, Marasa JC, Reynolds CH, 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.
 12. Sié P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B. Turnover study of Heparin Cofactor II in healthy man. *Thromb Haemost* 1985; 54 (3): 635-8.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Ragg H, Ulshofer T, Gerewitz J. On the activation of human leuseperin 2. A thrombin inhibitor by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1990; 265: 5211-8.
 16. Tollefsen DM. The interaction of Glycosaminoglycans with heparin cofactor II. *Annals New York Academy of Sciences* 1994; 714: 21-31.
 17. 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.
 18. Church FC, Pratt CW, Treanor RE, Whinna HC. Antithrombotic action of phosvitin and other phosphate containing polyanions is mediated by heparin cofactor II. *FEBS Lett* 1988; 237: 26-30.
 19. 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.
 20. 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 Coag Fibrinol* 1995; 6: 643-9.
 21. Tollefsen DM. Activation of heparin cofactor II by heparin and dermatan sulfate. *Nouv Rev Fr Hematol* 1984; 26: 233-7.
 22. Rydel TJ, Ravichandran KG, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roistsch C, Fenton JWII. The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha thrombin. *Science* 1990; 249: 277-80.
 23. Sheehan JP, Wu Q, Tollefsen DM, Sadler JE. Mutagenesis of thrombin selectively modulates inhibition by serpins Heparin Cofactor II and Antithrombin III. *J Biol Chem* 1993; 268: 3639-45.
 24. Tollefsen DM. Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. *Thromb Haemost* 1995; 74 (5): 1209-14.
 25. Sheehan JP, Tollefsen DM, Sadler JE. Heparin Cofactor II is regulated allosterically and not primarily by templates effects: studies with mutant thrombins and glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 1994; 269: 32747-51.
 26. Thumberg L, Backstrom G, Lindahl U. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydr Res* 1982; 100: 393-410.
 27. Olson ST, Björk I. Role of protein conformational changes, surface approximation and proteins cofactors in heparin-accelerated antithrombin-proteinase reactions. In: Lane D.A., Björk I, Lindahl U., eds. Heparin and related poly-saccharides. Vol 313. New York: Plenum Press, 1992; p 155-65.
 28. Prat CW, Whinna HC, Church FC. A comparison of three heparin-binding serine protease inhibitors. *J Biol Chem* 1992; 267: 8795-801.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Han JH, Coté HCF, Tollefsen DM. Inhibition of meizothrombin and meizothrombin (desF1) by Heparin Cofactor II. *J Biol Chem* 1997; 272: 28660-5.
 32. Bendayan P, Boccalon H, Dupouy D, Bomeau B. Dermatan sulfate is a more potent inhibitor of clot-bound thrombin than unfractionated and low molecular weight heparins. *Thromb Haemost* 1994; 71: 567-82.
 33. Tollefsen DM, Pestka CA. Modulation of heparin cofactor II activity by histidinerich glycoprotein and platelet factor 4. *J Clin Invest* 1985; 75: 496-501.
 34. 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. *Thromb Haemost* 1988; 60 (3): 399-406.
 35. Kounnas MZ, Church FC, Argraves WS, Strickland DK. Cellular internalisation and degradation of Antithrombin III-Thrombin, Heparin Cofactor II-Thrombin, and α_1 Antytryp-sin-Trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-relates protein. *J Biol Chem* 1996; 271: 6523-9.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 275-310.
 39. 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. *Thromb Haemost* 1995; 73 (3): 405-12.

40. Linhart R, Hakim A, Liu, Kim YS and Fareed J. Molecular profile and mapping of Dermatan sulfates from different origins. *Sem in Thromb and Hemostas* 1991; 71: 15-22.
41. Hampson IN, Gallagher JY. Separation of radiolabelled glycosaminoglycan oligosaccharides by poliacrilamide-gel; electrophoresis. *Biochem J* 1984; 221: 697-705.
42. Delorme MA, Saees N, Sevic A, Mitchell L, Berry L, Johnston M, Andrew M. Plasma Dermatan sulfate proteoglycan in a patient on chronic hemodialysis. *Blood* 1993; 82: 3380-5.
43. Andrew M, Mitchel L, Berry L, Paes B, Delorme M, Ofosu 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.
44. Pradoi P, Meduri F, Cuppini S, Toniato A, Zangrandi F, Polistena P, Gianese F, Maffei Faccioli A. Dermatan sulfate: a safe approach to prevention of postoperative deep vein thrombosis. *Br J Surg* 1992; 79: 505-9.
45. Agnelli G, Cosmi B, Di Filippo P, Ranucci V, Veschi F, Lobgetti M, Renga C, Barzi F, Gianese F, Lupattelli L, Rinonpoli E, Nancy GG. AR. 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.
46. Boneu B. Glycosaminoglycans: Clinical use. *Sem in Thromb Hemost* 1996, 22: 209-12.
47. Sié P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B. Constitutional heparin cofactor II deficiency associated with recurrent thrombosis. *Lancet* 1985; II: 414-6.
48. Duboscq C, Quintana I, Barrios J, Kordich L. Heparin Cofactor II in diabetic patients. *Blood Coag Fibrinol* 1994; 5: 201-4.
49. Conard J, Bara L, Horellou MH, Samama MM, Bobine or human thrombin in amidolytic ATIII assays. Influence of heparin cofactor II. *Thromb Res* 1986; 41: 873-8.
50. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76 (5): 651-62.
51. Seligsohn U, Zivelin A. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Thromb Haemost* 1997; 78: 297-301.
52. Tran TH, Marbet GA, Duckert F. Association of hereditary heparin cofactor II deficiency with thrombosis. *Lancet* 1985; II: 413-4.
53. 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.
54. 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.
55. Blinder M, Anderson TR, Abildgaard U, Tollefsen DM. Heparin Cofactor II Oslo. *The Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 5128-33.
56. 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.
57. 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.
58. Tollefsen DM, Pestka C. Heparin Cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. *Blood* 1985;66: 769-74.
59. Vinazzer H, Stocker K. Heparin Cofactor II: Experimental approach to a new assay and clinical results. *Thrombosis Research* 1991; 61: 235-41.
60. 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.
61. 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: 665-70.
62. 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 Coag Fibrinol* 1990, 1:647-51.
63. Toulon P, Lamine M, Lejev 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.
64. Sie P, Meguir B, Boissou F, Boneu B, Barthe P. Plasma levels of Heparin Cofactor II in nephrotic syndrome of children. Tesis doctoral de Pierre Sie. Université Paris VII. Uer Medicine St Louis. Lariboisière.
65. 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. Tesis doctoral de Pierre Sie. Université Paris VII. Uer Medicine St Louis. Lariboisière.
66. Matsuo T, Kobayashi H, Kadowaki S. Diabetes mellitus as a prethrombotic state: both heparin cofactor II (HCII) and antithrombin III (ATIII) were depressed in diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 1989; 62: 1442 (abstract).
67. Recomendación aprobada sobre teoría de los valores de referencia *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 1988, XXII (3): 443.
68. Rodeghiero F, Tosetto A. The VITA proyect: 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: 226-33.
69. Tran TH, Duckert F. Heparin cofactor II determination levels in normal and patients with hereditary antithrombin III deficiency and disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1984; 52: 112-6.
70. 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.
71. Abildgaard U, Larsen ML. Assay of dermatan sulfate cofactor (heparin cofactor II) activity in human plasma. *Thromb Res* 1984; 35: 257-66.
72. Toulon P, Jacquot C, Capron L, Frydman MO, Vignon D, Aiach M. Antithrombin III and Heparin Cofactor II in patients with chronic renal failure undergoing regular hemodialysis. *Thromb Haemost* 1987.
73. Griffith MJ, Thompson GF, McNeely TB, Marbet GA, White GC. Measurement of Heparin Cofactor II levels in human plasma. *Circulation* 1984; 70: 361.
74. 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.
75. ACCP/SCCM consensus conference. Definition for sepsis an organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644.
76. Kordich L, Sasseti B, Lago O. Modificación de los factores de coagulación y ATIII por acción de enzimas leucocitarias. *Medicina (Buenos Aires)* 1978; 38: 840-4.
77. Sie P, Dupouy D, Dol F, Boneu B. Inactivation of heparin cofactor II by polymorphonuclear leukocytes.