

La Vitamina K: Bioquímica, función y deficiencias. Revisión.

Mercedes Elena Mijares¹, Elena Nagy¹, Belsy Guerrero²
y Carmen Luisa Arocha-Piñango².

¹Banco de Sangre, Hospital Miguel Pérez Carreño, Instituto Venezolano de los Seguros Sociales, IVSS, Caracas, Venezuela e

²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Vitamina K, proteínas dependientes de la Vit K, deficiencia de Vit K, métodos de estudio de deficiencias de Vit K.

Resumen. La Vitamina K es un cofactor que actúa en la síntesis de los factores de coagulación II, VII, IX y X, de los inhibidores de la coagulación, proteínas C y S, y de proteínas de la matriz ósea. Su forma activa actúa como coenzima en la carboxilación del ácido glutámico de dichas proteínas. La función de los factores dependientes de la Vitamina K se realiza mediante la formación de complejos enzimáticos, en los cuales estas proteínas se unen sobre la membrana fosfolípídica a un cofactor proteico, en presencia de calcio. La insuficiencia de los mecanismos responsables de la gamma-carboxilación del ácido glutámico altera la función hemostática. La deficiencia hereditaria de factores dependientes de vitamina K, los antibióticos y los anticoagulantes orales disminuyen la capacidad de formación de los complejos enzimáticos, por lo que se producen síndromes hemorrágicos o trombóticos y alteraciones de la masa ósea que son fácilmente tratadas con administración de preparados de Vitamina K. Las causas principales de deficiencia son: falta de reservas hepáticas en recién nacidos, insuficiencia hepática, falta de ingesta, malabsorción, antibioticoterapia y administración de cumarínicos. Para el estudio de la Vitamina K se usan métodos indirectos, que miden las proteínas dependientes de su acción, y métodos directos que miden específicamente las quinonas.

The Vitamin K: Biochemistry, function and deficiency. Review.

Invest Clin 1998; 39(3): 213-229.

Key words: Vitamin K, Vit K dependent proteins, Vit K deficiencies, study methodology of Vit K deficiencies.

Abstract. Vitamin K is a cofactor for the synthesis of blood coagulation Factors II, VII, IX and X, and inhibitors such as Protein C and S and bone matrix protein. Its active form is a coenzyme in the glutamic acid carboxylation. Vitamin K-dependent factors form enzymatic complexes with calcium and membrane phospholipids. The insufficiency of gamma glutamic carboxylation impairs the hemostatic function. Hereditary deficiencies, antibiotics and oral anticoagulants, decrease the capacity of complex formation giving way to hemorrhage or thrombosis, or bone mass disturbances which are easily treated with administration of Vitamin K. The main causes of Vitamin K deficiency are lack of hepatic storage in newborns, liver insufficiency, malabsorption, dietetic deficiency, therapy with the antibiotics and coumarin administration. For the study of Vitamin K there are methods to measure the Vit K dependent proteins and as well methods to measure specifically the quinonas.

Recibido: 20-10-97. Aceptado: 29-4-98.

INTRODUCCIÓN

En 1929 Dam (1) describió una enfermedad hemorrágica en pollos alimentados con una dieta libre de grasas; el plasma de los pollos normales corregía el problema hemorrágico en los animales enfermos. Posteriormente se observó que en el plasma de los animales deficientes habían moléculas de protrombina similares a las normales, pero incapaces de formar trombina. Del extremo amino terminal de la protrombina normal se aisló un péptido capaz de unirse al calcio, que contenía gran cantidad de grupos prostéticos (no carbohidratos) en la posición gamma del ácido glutámico (2).

En 1935, Dam propuso el término de Vitamina K, por la palabra "Koagulation" (coagulación en alemán), a un compuesto liposoluble diferente a las Vitaminas A, D, y E, contenida en ciertos alimentos y que protegía a los pollos contra dicho síndrome hemorrágico (3).

En 1939 se aislaron, dos sustancias con actividad de Vitamina K: una de color amarillo pálido, oleosa, extraída de la alfalfa, y otra del mismo color, pero cristalina, procedente de la harina de pescado. Se usó el nombre de Vitamina K, o Fltoquinona para designar a la primera y de Vitamina K₂ o Menaquinona para la segunda. Ambas se diferencian por el número de carbonos y por el grado de insaturación (4).

Las fitoquinonas de origen vegetal, se encuentran principalmente en vegetales verdes. La menaquinona, de origen bacteriano, se encuentra en alimentos fermentados (yogurt, nata) y es producida también por las bacterias del colon; aún no se sabe si estas últimas contribuyen a mantener el nivel de Vitamina K en humanos (5).

BIOQUÍMICA

La función bioquímica de la Vitamina K fue estudiada a partir del descubrimiento del aminoácido γ -carboxiglutámico (Residuo **Gla**) presente en la protrombina bovina y de su relación con el funcionamiento anormal de moléculas de protrombina inactivas, que se identificaron en el plasma de animales tratados con cumarina (6, 7).

Después de la síntesis en los ribosomas, algunas de las proteínas de origen hepático sufren modificaciones post-traduccionales en el retículo endoplasmático rugoso, entre las que se incluyen la γ -glutamil carboxilación, reacción dependiente de la Vitamina K que actúa como cofactor de la γ -carboxilasa (8, 9, 10).

Las enzimas que intervienen en el ciclo de la Vitamina K son la epoxidasa, la epóxido-reductasa y la quinona-reductasa. La carboxilasa se encuentra localizada en la superficie luminal del retículo endoplasmático rugoso y es la enzima que cataliza la conversión post-traduccional de los residuos de ácido glutámico, en ácido γ -carboxiglutámico,

en un número limitado de proteínas maduras denominadas **Proteínas Gla** (11).

El sustrato de la enzima epoxidasa es la hidroquinona (KH₂), Vitamina K quinol. Durante el proceso de γ -glutamil carboxilación, la Vitamina K quinol (KH₂) es convertida a la forma 2,3 epóxido (KO) por la enzima Vitamina K- 2.3 epóxido reductasa. La forma epóxido (KO) es reciclada: primero, por acción de la epóxido reductasa se reduce a Vitamina K-quinona y luego ésta es reducida de nuevo a la forma activa, Vitamina K-quinol (Fig. 1). La energía libre proveniente de la oxidación de la Vitamina K 2,3 epóxido, es usada para la transformación de una base débil en una base fuerte, liberándose un protón del residuo de ácido glutámico (Glu) en posición gamma, produciéndose así la carboxilación (8, 9, 12, 13)

Sólo un 30-70% de la Vitamina K que proviene de la ingesta se absorbe por el intestino, por lo que cada molécula debe reciclarse antes de ser degradada por la vía de la lactona, con la subsecuente formación de glucurónidos (9).

Las proteínas carboxiladas, **Proteínas Gla** pueden ser hepáticas o extra hepáticas; entre las primeras (que comprenden el 1% de las proteínas sintetizadas en el hígado y secretadas en el plasma) están los Factores de Coagulación: Factores II, VII, IX X, y proteínas C, S y Z y entre las segundas, la osteocalcina, la **Proteína Gla** de la matriz ósea (PGM), algunas proteínas de la placa

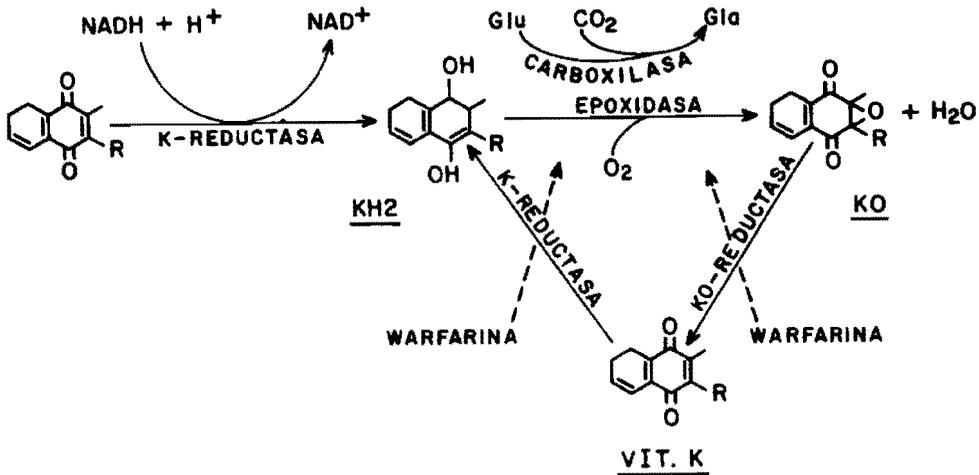


Fig. 1. Ciclo metabólico de la Vitamina K.

arterioesclerótica, de la orina y de los espermatozoides (14).

Las proteínas carboxiladas dependientes de la vitamina K funcionan como ligaduras de receptores de tirosina quinasa. Se ha demostrado la existencia de una cascada de fosforilación de proteínas tirosinadas dependientes de la Vitamina K, la cual es sensible a las alteraciones en el nivel o en el metabolismo de la Vitamina K (15).

FACTORES DE COAGULACIÓN DEPENDIENTES DE LA VITAMINA K

Las proteínas dependientes de la Vitamina K, que participan en las complejas interacciones de la hemostasia, contienen entre 10 y 12 residuos **Gla**. En un principio se pensaba que los residuos **Gla** se encontraban sólo en la Protrombina (Factor II), hoy se sabe que también

están presentes en los Factores VII, IX y X, que intervienen en diversos puntos de la Cascada de la Coagulación; en las proteínas C y S, que actúan como inhibidores de dicho mecanismo y en las proteínas Z y M, que no se sabe aún que papel desempeñan (9, 14, 16).

La función de los factores dependientes de la Vitamina K se realiza mediante la formación de una serie de complejos enzimáticos, en los cuales estas proteínas se unen por puentes de calcio a un cofactor proteico a nivel de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria. Esta unión induce una serie de reacciones sucesivas en las cuales el zimógeno, que contiene los residuos **Gla**, se convierte en una proteasa tipo serina (17). Para realizar su función, las **Proteínas Gla** de la coagulación necesitan de otros factores como son: el Factor Tisular, el Factor VIII y el Factor V, que actúan como co-

factores de los Factores VIIa, IXa y Xa, respectivamente. La Trombomodulina y la Proteína S, son cofactores de la Proteína C. Cada uno de estos cofactores tiene características distintas, así, la Trombomodulina y el Factor Tisular son proteínas de membrana y no requieren estar activados para cumplir su función. La Proteína S, los Factores V y VIII están asociados a lípidos ácidos; los dos últimos requieren ser activados por trombina o Factor Xa, para ejercer su función (18, 19).

El primer paso en la formación del complejo donde participa el Factor VIII como cofactor, lo constituye la liberación de éste del Factor von Willebrand, que es su transportador, siendo convertido a su forma activa Factor VIIIa, por trazas de trombina. En presencia de calcio, el FVIIIa, embebido en la superficie fosfolipídica, y el FIXa forman un complejo que activa al Factor X. Este complejo se ha denominado **Complejo Tenasa Intrínseca**. Por otra parte el Factor VII, el Factor Tisular, los fosfolípidos y el calcio forman otro complejo, que activa también al Factor X, llamado **Complejo Tenasa Extrínseca**. Luego el Factor Xa junto con el Factor Va, la Protrombina (FII) y el calcio, forman en la misma capa fosfolipídica el complejo denominado **Protrombinasa**, que convierte la Protrombina en trombina (Fig. 2). La formación del **Complejo Protrombinasa** contribuye a la concentración local de los reactantes (factores y cofactores) necesarios para una máxima actividad. Por otra parte, al formarse este

complejo, los Factores Va y Xa quedan protegidos de la acción de sus inhibidores fisiológicos: Proteína C activada (PCa) y Antitrombina III (ATIII), respectivamente (19, 20).

PROTEÍNAS EXTRAHEPÁTICAS DEPENDIENTES DE LA VITAMINA K.

Proteínas con residuos γ -carboxilados, carboxilasas y epoxi-reductasas dependientes de la Vitamina K, han sido localizadas en diversos tejidos extrahepáticos incluyendo hueso, cartílago, riñones, placenta, páncreas, bazo, pulmones y testículos, lo cual sugiere que el ciclo de la Vitamina K puede realizarse en todos aquellos tejidos capaces de sintetizar proteínas dependientes de ella (9, 21, 22). Algunas de las **Proteínas Gla** extrahepáticas tienen función reguladora en el metabolismo del calcio, como son: la osteocalcina, la PGM y la **Proteína Gla** de la placa (13). La expresión de la PGM es regulada por varios factores de crecimiento, hormonas esteroideas y el ácido retinoico (21). La Vitamina K juega un importante efecto en el desarrollo y mantenimiento del hueso a través de la carboxilación de la PGM y la osteocalcina (23).

La osteocalcina es una proteína de bajo peso molecular con tres residuos **Gla**, producida por los osteoblastos durante la formación de la matriz ósea; su concentración en el hueso es directamente proporcional a la concentración de calcio. En la mayoría de los vertebrados esta proteína es muy abundante, constitu-

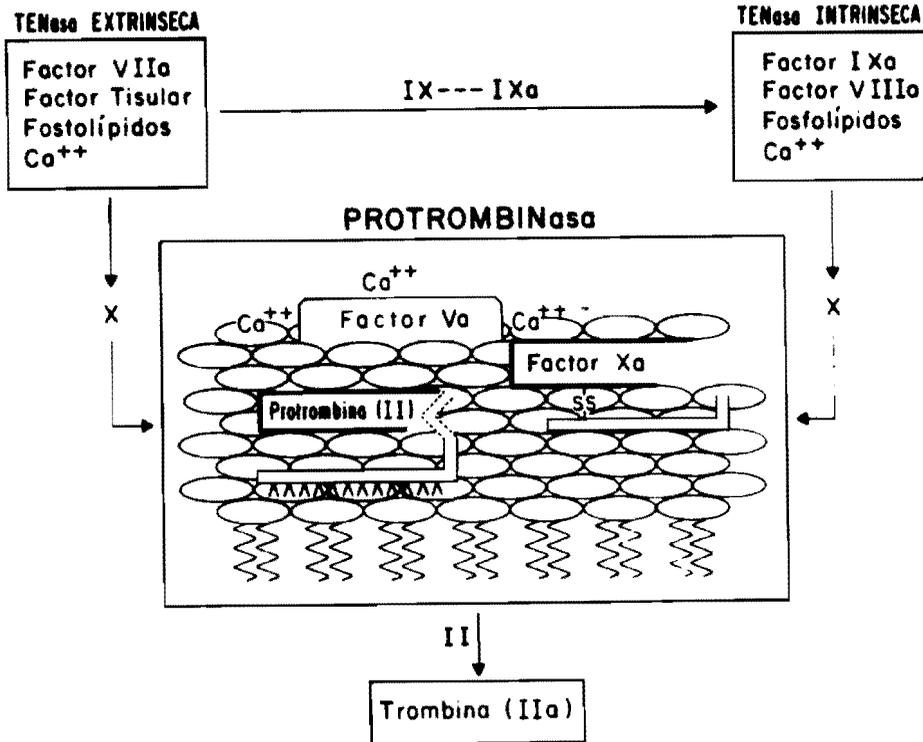


Fig. 2. Complejos enzimáticos formados por los factores dependientes de la Vitamina K que intervienen en el mecanismo hemostático.

yendo entre 15 y 20% de las proteínas óseas distintas al colágeno. Diversos estudios relacionados con la Vitamina K y el metabolismo óseo han demostrado que la capacidad de la osteocalcina de unirse a fosfato de calcio depende del grado de carboxilación, que es a su vez determinado por la concentración de Vitamina K (24, 25). La Vitamina K causa un incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina y del contenido de calcio en las metástasis óseas (26).

La PGM es una proteína de 79 aminoácidos que contiene 5 residuos **Gla**, sus niveles son elevados

en huesos y cartílagos; su principal función fisiológica puede estar asociada a la restricción de la mineralización de los tejidos. Pareciera que la **PGM** juega un papel importante en la mineralización del hueso en crecimiento, por lo que es frecuente observar defectos óseos, similares a los que se presentan en la deficiencia congénita de la epóxido-reductasa, en fetos de madres que reciben terapia anticoagulante oral durante el primer trimestre del embarazo (27-29). La importancia del metabolismo de la Vitamina K, su disfunción en la embriopatía producida por warfarina y la deficiencia de la

enzima epóxido-reductasa, sugiere que las vías dependientes de la Vitamina K son requeridas para la embriogénesis normal (15).

En las placas ateroscleróticas se encuentra otra proteína Gla denominada **Proteína Gla de la placa**, la cual parece que evita el endurecimiento y mineralización de la pared arterial (30).

Carboxilasas dependientes de la Vitamina K y proteínas γ -carboxiladas como la nefrocalcina, se han encontrado en células del túbulo renal. **Proteínas Gla** descarboxiladas también se han detectado en la litiasis renal y en la orina de pacientes con calculosis idiopática, éstas han sido relacionadas con la excreción urinaria de calcio y la pérdida de masa ósea post-menopáusica (31, 32).

Se han observado concentraciones bajas de Vitamina K en la osteoporosis; el tratamiento con calcio, en estos casos, produce incremento de la osteocalcina del suero, reducción de la excreción urinaria de calcio y disminución de riesgo a fracturas. Se ha demostrado que la administración de un miligramo de Vitamina K a mujeres post-menopáusicas, normaliza la osteocalcina sérica y disminuye la pérdida de calcio urinario. El verdadero papel de las **Proteínas Gla** extrahepáticas no ha sido aclarado, es posible que la deficiencia de Vitamina K contribuya a la patogénesis de las fracturas osteoporóticas (17). Futuras investigaciones podrán establecer definitivamente su función a este nivel (28, 33-37).

DEFICIENCIAS DE VITAMINA K

La principal fuente de Vitamina K en la dieta es la fitoquinona presente en vegetales, frutas, aceites, grasas y microorganismos; el consumo promedio de 1-2 mg/Kg por día de Vitamina K es suficiente para mantener la hemostasia normal (38, 39). Se puede hablar de déficit de Vitamina K en los casos donde se corrige el defecto hemostático con una terapia sustitutiva de esta vitamina. Las deficiencias se manifiestan por una disminución en la actividad biológica de la Protrombina, Factores VII, IX y X lo que conlleva a alteraciones hemorrágicas debido a la formación anormal o ausencia de los complejos enzimáticos en los cuales estén involucrados. En el caso de disminución de las proteínas C y S, que son inhibidores del sistema de la coagulación, se producen episodios trombóticos (9, 22, 29, 40) y en el caso de falta de proteínas **Gla** extrahepáticas se observa disminución de la masa ósea o de los niveles de hormonas calciotrópicas (17).

Las causas principales de deficiencia de Vitamina K son: falta de reservas hepáticas en recién nacidos, insuficiencia hepática, falta de ingesta, absorción deficiente e ingestión de ciertos antibióticos o antagonistas de la Vitamina K (13).

La concentración de osteocalcina no carboxilada y fitoquinona plasmática y del ácido gamma carboxiglutámico urinario son indicativos del estado nutricional de Vitamina K (41).

Hemorragia Neonatal y anomalías fetales

La enfermedad hemorrágica del recién nacido consiste en un cuadro caracterizado por sangramiento a través del cordón umbilical, tracto gastrointestinal y cerebro, en los primeros días del nacimiento. Este síndrome se debe a la falta de madurez hepática y a un déficit de Vitamina K, y por ende, de síntesis de los factores procoagulantes (42). Parece además, que existe una limitada transcripción de ARNm de dichos factores a nivel hepático (43). La deficiencia de Vitamina K en el neonato es debida además, a su ausencia en la leche materna, falta de menaquinona intestinal por la esterilidad del colon, elevado requerimiento para el crecimiento óseo fetal y escaso transporte con bajas concentraciones en el cordón umbilical (44, 45). La incidencia de enfermedad hemorrágica del neonato y la de aparición tardía (entre la tercera y octava semana) han aumentado debido a la tendencia a estimular la lactancia materna sin haberse administrado Vitamina K como profilaxis al momento del nacimiento; estos niños pueden morir por hemorragia intracraneal y los que sobreviven, presentan severas secuelas neurológicas, microcefalia y retardo mental debido a microhemorragias cerebrales o intraventriculares (45 - 47).

La enfermedad hemorrágica ha venido siendo prevenida con la administración de Vitamina K por vía parenteral. Recientemente se ha sugerido que en niños alimentados con leche materna la administración oral

de 1-2 mg de Vitamina K al nacer, seguido de 25 µg diarios o 1 mg semanal durante los 3 primeros meses de vida puede ser tan efectivo como la vía parenteral (48, 49). También se ha señalado que el nivel de Vitamina K en los niños que la han recibido por vía intramuscular al nacer, puede ser mantenido indicándole a la madre 5 mg diarios de fitoquinona por vía oral durante las primeras 12 semanas postparto (50, 51). Hasta ahora no hay consenso en la vía de administración, dosis, número de dosis y frecuencia (48-50, 52, 53).

Los niveles de osteocalcina en el feto están entre un 30 y 40% menor con respecto a los del adulto, por lo que es frecuente observar alteraciones óseas en niños de madres que reciben anticoagulantes orales durante el primer trimestre del embarazo, debido al descenso marcado de la osteocalcina (27, 54).

Insuficiencia hepática

En la enfermedad hepática se produce una disminución del depósito de Vitamina K; ya que el hígado, como se dijo anteriormente, es capaz de captar entre el 80 y 90% de esta vitamina circulante, y es además el sitio de síntesis de los factores de la coagulación. Sin embargo, las anormalidades hemostáticas en la insuficiencia hepática son frecuentemente subclínicas, lo que constituye un problema en los casos de traumas (55 - 58).

Falta de ingesta

Una causa de deficiencia de Vitamina K es su inadecuada ingesta

en la dieta diaria (59), pero debido a que el hígado capta la mayor parte de la Vitamina K circulante y la recicla antes de metabolizarla a productos inactivos, en las dietas pobres en esta vitamina, el proceso de coagulación es uno de los últimos en afectarse (60). La biodisponibilidad de la Vitamina K ingerida está influenciada por la ingesta de grasa alimentaria (61).

Absorción deficiente

La Vitamina K es un compuesto liposoluble. Para la absorción intestinal de la fitoquinona y probablemente de la menaquinona, se requiere de su solubilización en micelas compuestas de sales biliares, productos de la lipólisis pancreática y de los nutrientes altamente liposolubles. Así, en los pacientes con obstrucción biliar y pancreatitis crónica, la absorción de Vitamina K se ve seriamente afectada (22). Deficiencias de Vitamina K se observan también en pacientes ancianos, con malabsorción, enfermedad celíaca, "sprue" tropical, fibrosis quística del páncreas con esteatorrea, resección intestinal, fistula intestinal e ictericia obstructiva (13, 42, 62).

Antagonistas de la Vitamina K

Muchos compuestos tienen propiedades antagónicas a la Vitamina K, tales como 4-hidroxicumarina, salicilatos, sulfaquinoxalina y ciertos antibióticos (33).

a) Cumarínicos:

Los cumarínicos fueron descubiertos en 1922, cuando se observó una enfermedad hemorrágica en el

ganado vacuno que ingería trébol dulce fermentado (63). En 1931 Roderick (64) descubrió que esta enfermedad se debía a una disminución de la Protrombina plasmática y en 1939 Campbell y Link (65, 66) identificaron el agente causal de la hemorragia como bishidroxycumarina o dicumarol, la cual tiene una estructura muy parecida a la Vitamina K. Desde entonces, muchos análogos fueron usados como raticidas y el más conocido de ellos fue preparado en 1944 recibiendo el nombre de **Warfarina** (Wisconsin Admuni Research Foundation y el sufijo "arina" de cumarina) (67). A partir de ese momento se comenzaron a usar estos compuestos en el tratamiento de las trombosis.

Las cumarinas actúan rompiendo el ciclo metabólico de la Vitamina K, produciendo disminución de la Vitamina K quinol (KH₂) y detención de la carboxilación, lo cual trae como resultado la disminución de los residuos gammacarboxiglutámicos en las proteínas involucradas (68 - 70). Estos compuestos inhiben las reductasas tiol-dependientes del ciclo de la Vitamina K, bloqueando el reciclaje de KO a KH₂, (Fig. 1) por lo cual el suplemento de este último se agota; en estas condiciones, la KH₂ se utiliza una sola vez, formándose altos niveles de epóxido (KO) por lo que se considera éste como un marcador de la respuesta terapéutica. El bloqueo del reciclaje de la Vitamina K por acción de los cumarínicos, puede interrumpirse con la administración de altas dosis de Vitamina K (22, 69). Recientemente

se han encontrado evidencias de la existencia de un receptor microsomal para la warfarina, que en humanos parece ser la epoxi-reductasa (8, 13).

Los cumarínicos no solo inhiben las reductasas hepáticas; entre el 11 y el 20% de la Vitamina K de la sangre es requerida para la producción de **Proteína Gla** de la matriz ósea. Parece ser que la Proteína Gla del hueso es más sensible a la warfarina que las proteínas de la coagulación (71). El grado de carboxilación de las Proteínas a se altera de acuerdo a la dosis de cumarínicos y la función disminuye proporcionalmente con el número de grupos **Gla** presentes (39).

En los pacientes bajo anticoagulación oral, la concentración de osteocalcina desciende entre un 30 a 50% a los dos días de iniciado el tratamiento. La alteración más pronunciada es el incremento en osteocalcina y protrombina no carboxiladas y una disminución de la excreción de ácido gamma-carboxi glutámico urinario (72). En los casos de tratamiento prolongado, aumenta la excreción de calcio y, por consiguiente, se afecta la masa ósea, observándose una marcada disminución de la densidad ósea especialmente en la región distal del radio y en la columna lumbar sin relación entre la dosis, el INR y la duración de la terapia (24, 33, 70, 73-76).

En los pacientes que reciben terapia anticoagulante, además de presentarse un estado de hipocoagulabilidad por la alteración de la función de los factores procoagulan-

tes: II, VII, IX y X; también al inicio de la terapia se pueden presentar trastornos trombóticos, debido a la disminución de las Proteínas C y S, que son inhibidores del mecanismo de la coagulación. La Proteína C, además tiene una actividad profibrinolítica al neutralizar directamente los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs). En los pacientes heterocigotos, de déficit de Proteína C, es frecuente observar, cuando se instala el tratamiento anticoagulante, necrosis de piel por trombosis en la microcirculación debido a una disminución brusca de la concentración de Proteína C, que de por sí, ya estaba baja (77, 78). La anticoagulación con warfarina, como habíamos mencionado anteriormente, aumenta el riesgo de embriopatía sobre todo cuando se administra entre las 6 y 12 semanas de gestación y además puede producir microcefalia y retardo mental debido a microhemorragias cerebrales y hemorragias intraventriculares fetales, por lo que el tratamiento con cumarínicos debe ser evitado durante el embarazo, aún en mujeres con reemplazo de válvulas cardíacas. En estas pacientes se recomienda indicar heparina durante el curso del embarazo (46).

b) Antibióticos:

Los antibióticos disminuyen la flora intestinal la cual es importante para mantener el nivel de Vitamina K. No obstante hoy se sabe que sólo los antibióticos que contienen una cadena lateral N-metil-tiol-tetrazol(NMITT), como las cefalosporinas, actúan mas por inhibición directa

de la epóxido-reductasa hepática, que por la disminución de la flora intestinal (13, 79-81).

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS DEFICIENCIAS DE VITAMINA K

La poca información nutricional en relación a la Vitamina K se debe a la falta de técnicas analíticas sensibles para detectar las bajas concentraciones y a la falta de un criterio para definir y detectar los estados de deficiencias subclínicas de Vitamina K relacionadas con la coagulación (8).

Las pruebas para determinar una deficiencia de Vitamina K pueden ser indirectas y directas.

Indirectas

El Tiempo de Protrombina, la cuantificación específica de la Protrombina carboxilada plasmática (22, 82) y de otras **Proteínas Gla** carboxiladas y no carboxiladas. Las dos primeras son las de mayor uso. El tiempo de Protrombina es una prueba rápida pero no es muy sensible, por lo que no permite detectar deficiencias muy leves (22).

Una prueba rápida y simple es la razón entre la activación con tromboplastina y la activación con veneno de la serpiente *Echis carinatus* o con estafilocagulasa, que miden la concentración de Protrombina, ya que la activación con tromboplastina sólo actúa sobre la protrombina carboxilada, en cambio, el veneno de la *E. carinatus* y la estafilocagulasa, son indiferentes a la cantidad de carboxilación, por lo

tanto la razón da una idea de la proporción de grupos carboxilados existentes en el plasma (22).

Recientemente se han preparado anticuerpos monoclonales específicos para Protrombina no carboxilada y se están produciendo otros anticuerpos monoclonales que identifican la osteocalcina carboxilada, los cuales parecen ser útiles para descartar deficiencias incipientes en recién nacidos, embarazadas, ancianos y pacientes sometidos a nutrición parenteral (36, 82, 83).

Directas

Medición del nivel de Vitamina K en suero o tejidos, lo cual es difícil y las pruebas disponibles hasta ahora sólo detectan fitoquinona. Se realizan en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y usan detectores con luz ultravioleta, fluorescentes o electroquímicos (84). Se ha descrito un método espectrofluorométrico para determinación de menadiona (85). Se están desarrollando métodos para detectar la distribución de las quinonas en tejidos y plasma (5, 82, 83).

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Olivetti de Venezuela por el soporte técnico, al Dr. W. Escobar, a la Sra. Amparo Gil por la búsqueda bibliográfica y a la Sra. L. Rybak por el trabajo secretarial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAM H.: Cholesterinstoffwechsel in Huhnereiern und

- Huhnchen. *Biochem Z* 1929; 215: 475-492.
2. NELSESFUEN G.L., ZYTKOVICS T.H., HOWWARD J.B.: The mode of action of vitamin K: identification of gamma carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem* 1974; 249:6347-6350.
 3. DAM H.: Antihemorrhagic vitamin of the chick: occurrence and chemical nature. *Nature* 1935; 135:652-653.
 4. MC KEE R.W., BINKLEY S.B., MACCORQUADALE D.W., THAYER S.A., DOISY E.A.: The isolation of Vitamin K₂. *J Biol Chem* 1939; 131:327-344.
 5. SHEARER M.J., MCCARTHY P.T., CRAMPTON O.E., MATTOCK M.B.: The assessment of human vitamin K status from tissue measurements. En: *Current advances in vitamin K research* Suttie JW, (Ed). Elsevier, New York. 1988; pp 437-452.
 6. NELSESTVEN G., ZYTKOVICZ T., HOWARD J.: The mode of action of Vitamin K. *J Biol Chem* 1974; 249:6347-6350.
 7. SHAH D.V., SWANSON J.C., SUTTIE J.W.: Abnormal prothrombin in the vitamin K-deficient rat. *Thromb Res* 1984; 35:451-458.
 8. SHEARER M.J.: Vitamin K and Vitamin K-dependent proteins. *Brit J Haemost* 1990; 751: 156-162.
 9. VERMEER C.: Gammacarboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J* 1990; 266:625-636.
 10. WU W., BANCROFT J.D., SUTTIE J.W.: Differential effects of warfarin on the intracellular processing of Vitamin-K dependent proteins. *Thromb Haemostas* 1996; 7, 46-52.
 11. SUTTIE J.W.: Synthesis of vitamin K-dependent proteins *FASEB J* 1993; 7:445-452.
 12. DOWD P., HERSHLINE R., WOOK HAM S., NAGANATHAN S.: Vitamin K energy transduction: A base strength amplification mechanism. *Science* 1995; 269:1684-1691.
 13. SHEARER M.J.: Vitamin K metabolism and nutrition. *Blood Rev* 1992; 6:93-104.
 14. FURIE B., FURIE B.C.: The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; 53: 505-518.
 15. SAXENA S.P., FAN T., LI M., ISRAELS E.D., ISRAELS L.G.: A novel role of Vitamin K₁ in a tyrosine phosphorylation cascade during chick embryogenesis. *J Clin Invest* 1997; 15(99): 602-607.
 16. SUTTIE J.W.: Carboxylation of glutamyl residues. En: RB Freedman and HC Hawkins, (Eds) *The enzymology of post-translational modification of proteins*. Academic Press, London. 1980; pp: 213-218.
 17. JIE K.G., BOTS M.L., VERMEE C., WITTEMAN J.C., GROBEE D.E.: Vitamin K status and bone mass in women with and without atherosclerosis a

- population-based study. *Calcif Tissue Int* 1996; 59:352-356.
18. JACKSON C.M., NEMERSON Y.: Blood coagulation. *Ann Rev Bioch* 1980; 49: 765-811.
 19. TUDDENHAM E.G.D., COOPER D.N.: The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders. Oxford Medica Pub, 1994; pp:3-6.
 20. SCAZZIOTA A., ALTMAN R.: El mecanismo de la hemostasia normal. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 1994; 7:95-109.
 21. KIRFEL J., KELTER M., CANCELA L.M., PRICE P.A., SCHULE R.: Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene. *Prod Nat Acad Sci USA* 1997; 94:2227-2232.
 22. VERMMEER C., HAMULAYK K.: Pathophysiology of Vitamin K-deficiency and oral anticoagulants. *Thromb Haemostas* 1991; 66: 153-159.
 23. ANDERSON J.J., RONDANO P., HOLMES A.: Roles of diet and physical activity in the prevention of osteoporosis. *Scand J Rheumatol* 1996; Suppl 103:65-74.
 24. PRICE P.A.: Role of vitamin K-dependent proteins in bone metabolism. *Ann Rev Nutr* 1988; 8:565-583.
 25. PRICE P.A., WILLIAMSON M.K.: Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 1985; 260:14971-14975.
 26. EHARA Y., TAKAHASHI H., HANAHAISA Y., YAMAGUCHI M.: Effect of Vitamin K₂ (menaquinona-7) on bone metabolism in the femoral metaphyseal tissues of normal and skeletal unloaded rats: enhancement with zinc. *Res Exp Med Berl* 1996; 196:171-178.
 27. PETTIFOR J.M., BENSON R.: Congenital malformations associated with the administration of oral anticoagulants during pregnancy. *J Pediatr* 1975; 86:459-462.
 28. PRICE P.A.: Vitamin K nutrition and postmenopausal osteoporosis. *J Clin Invest* 1993; 91:1268.
 29. ZHAO J., NISHIMOTO S.K.: Matrix Gla protein gene expression is elevated during postnatal development. *Matrix Biol* 1996; 15: 131-140.
 30. GJJSBERS B.L.M.G., VAN HAARLEM L.J.M., SOUTE B.A.M., EBBERINK R.H.M., VERMEER C.: Characterization of a Gla-containing protein from calcified human atherosclerotic plaques. *Artherosclerosis* 1990; 10:991-995.
 31. HAUSCHKA P.V., FRIEDMAN P.A., TRAVERSO H.P., GALLOP P.M.: Vitamin K-dependent gammacarboxyglutamic acid formation by kidney microsomes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71:1207-1213.
 32. NAKAGAWA Y., ABRAM V., KZDY F.J., KAISER E.T., COE F.L.: Purification and charac-

- terization of the principal inhibitor of calcium monohydrate crystal growth in human urines. *J Biol Chem* 1983; 258:12594-12600.
33. BINKLEY N.C., SUTTIE J.W.: Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr* 1995; 125: 1812-1821.
 34. HART J.P., CATTERALL A., DODDS R.A., KLENERMAN L., SHEARER M.J., BITENSKY L., CHAYEN J.: Circulating vitamin K1 levels in fractured neck of femur. *Lancet* 1984; ii: 283, 1984.
 35. HART J.P., SHEARER M.J., KLENERMAN L., CATERALL A., REEVE J., SAMBROOK P.N., DODDS R.A., BITENSKY L., CHAYEN J.: Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K1 in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:1268-1269.
 36. KNAPEN M.H.J., HAMULYK K., VERMEER C.: The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla-protein) and urinary calcium excretion. *Ann Int Med* 1989; 111: 1001-1005.
 37. NAKAGAWA Y., ACHMED M., HALL S.L., DEGANELLO S., COE F.L.: Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. *J Clin Invest* 1987; 79:1782-1787.
 38. BOOTH S.L., PENNINGTON J.A., SADOWSKI J.A.: Dihydro-Vitamin K₁, primary food sources and estimated dietary intakes in the American diet. *Lipids* 1996; 31:715-720.
 39. KINDBERG C.G., SUTTIE J.W.: Effect of various intakes of phylloquinone on signs of vitamin K deficiency and serum and liver phylloquinone concentrations in the rat. *J Nutr* 1989; 119:175-180.
 40. KALAFATIS M., EGAN J.O., VANT VEER C., MANN K.G.: Regulation and regulatory role of gamma-carboxyglutamic acid containing clotting factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996; 6:87-101.
 41. SHEARER M.J., MCBURNEY A., BARKHAN P.: Studies on the absorption and metabolism of phyloquinone (vitamine K1) in man. *Vitamins and Hormones* 1974; 32: 513-542.
 42. LANE P.A., HATHAWAY W.E.: Vitamin K in infancy. *J Pediat* 1985; 106:305-309.
 43. YAO S.N., DESILVA A.H., KURACHI S., SAMUELSON L.C., KURACHI K.: Characterization of a mouse Factor IX cDNA and developmental regulation of the Factor IX gene expression in liver. *Thromb Haemostas* 1991; 65:52-58.
 44. HAMULYÁK K., DE BOER-VAN DEN BERG M.A.G., THIJSEN H.H.W., HEMKER H.C., VERMEER C.: The placental transport of [3H] vitamin K1 in rats. *Brit J Haematol* 1987; 65:335-338.

45. SHEARER M.J., RAHIM S., BARKHAN P., STIMMLER L.: Plasma vitamin K in mothers and their newborn babies. *Lancet* 1982; ii:460-463.
46. ASTEDT B.: Antenatal drugs affecting Vitamin K status of the fetus and the newborn. *Sem Thromb Hemost* 1995; 21:364-370.
47. VON KRIES R., SHEARER M.J.G., OBEL U.: Vitamin K in infancy. *J Pediatr* 1985; 106: 305-331.
48. CORNELISSEN M., von KRIES R., LONGHMAN P., SCHUBIGER G.: Prevention of vitamin K deficiency bleeding: efficacy of different multiple oral dose schedules of Vitamin K. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 126-130.
49. HANSEN K.N., EBBESEN F.: Neonatal Vitamin K prophylaxis in Denmark: three years experience with oral administration during the first three months of life compared with one oral administration at birth. *Act Paediatr* 1996; 85:1137-1139.
50. GREER F.R., MARSHALL S.P., FOLEY A.L., SUTTIE J.W.: Improving the vitamin K status of breastfeeding infants with maternal vitamin K supplements. *Pediatrics* 1997; 99:88-92.
51. NISHIGUCHI T., SAGA K., SUMIMOTO K., OKADA K., TERAOKA T.: Vitamin K deficient intracranial haemorrhage in Shizuoka prefecture. *Br J Obstet Gynecol* 1996; 103:1078-1084.
52. AUTRET E., JONVILLE-BERA A.P.: Modalités d'utilisation de la Vitamine K en France chez le nouveau-né. *Arch Pediatr* 1996; 3:675-680.
53. COUGHNAN P.M., MC DOUGALL P.N.: Does intramuscular Vitamin K₁ act as an unintended depot preparation? *J Paediatr Child Health* 1996; 32:251-254.
54. KON-SIONG G.J., HAMULYAK K., GIJSBERS B.L., *et al.*: Serum osteocalcin as a marker for vitamin K-status in pregnant women and their newborn babies. *Thromb Haemostas* 1992; 68:388-391.
55. BLANCHARD R.A., FURIE B.C., JORGENSEN M., FRUGER S.F., FURIE B.: Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N Engl J Med* 1981; 305:242-248.
56. DONALDSON G.W.K., DAVIES S.H., DARG A., RICHMOND J.: Coagulation factors in chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1969; 22:199-204.
57. RAPAPORT S.I., AMES S.B., MIKKELSEN S., GOODMAN J.R.: Plasma clotting factors in chronic hepatocellular disease. *N Engl J Med* 1960; 263:278-282.
58. RATNOFF S.I.: Hemostatic mechanisms in liver disease. *Med Clin North Am* 1963; 47: 721-736.
59. SOKOLL L.J., BOOTH S.L., O'BRIEN M.E., DAVIDSON K.W., TSAIOUN K.C., SADOWSKI J.A.: Changes in serum os-

- teocalcin, plasma phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:779-784.
60. SUTTIE J.W., MUIAH-SCHENDEL L.L., SHAH D.Y., LYLE B.J., GREYER J.L.: Vitamin K deficiency from dietary Vitamin K restriction in human. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 475-480.
 61. UEMATSU T., NAGASHIMA S., NIWA M., KOHNO K., SASSA T., ISHII M., TOMONO Y., YAMATO C., KANAMARU M.: Effect of dietary fat content on oral bioavailability of menatrenone in humans. *J Pharm Sci* 1996; 85:1012-1016.
 62. HOLLANDER D.: Intestinal absorption of vitamins A, E, D and K. *J Lab Clin Med* 1981; 97:449-462.
 63. SCHOFIELD F.W.: Damaged sweet clover: the cause of a new disease in cattle simulating hemorrhagic septicemia and blackleg. *J Am Vet Assoc* 1924; 64:553-575.
 64. RODERICK L.M.: Problems in the coagulation of the blood. *Am J Physiol* 1931; 96: 413-425.
 65. CAMPBELL H.A., LINK K.P.: Studies on the hemorrhagic sweet clover disease, IV: the isolation and crystallization of the hemorrhagic agent. *J Biol Chem* 1941; 138:21-33.
 66. LINK K.P.: The discovery of dicumarol and its sequels. *Circulation* 1959; 19:97-107.
 67. FERNANDEZ M.A.: Anticoagulantes orales: su manejo. *Rev Iberoamer Tromb Hemostas* 1990; 1:7-18.
 68. BECHTOLD H., TRENK D., JAHNCHEN F., MEINERTZ T.: Plasma vitamin K1 2,3-epoxide as diagnostic aid to detect surreptitious ingestion of oral anticoagulant drugs. *Lancet* 1983; 1:596-597.
 69. PALARETI G., LEGNANI C.: Warfarin withdrawal. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokin* 1996; 30:300-313.
 70. WALLIN R., MARTIN L.F.: Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. *J Clin Invest* 1985; 76:1879-1884.
 71. CHO-K., WU S.M., STANLEY T., STAFFORD D.E., HIGH K.A.: A mutation in the propeptide of Factor IX leads to warfarin sensitivity by a novel mechanism. *J Clin Invest* 1996; 98:1619-1625.
 72. BACH A.U., ANDERSON S.A., FOLEY A.L., WILLIAMS E.C., SUTTIE J.W.: Assessment of Vitamin K status in human subjects administered "mini-dose" warfarin. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:894-902.
 73. FIORE C.E., TAMBURINO C., FOTI R., GRIMALDI D.: Reduced bone mineral content in patients taking an oral antico-

- agulant. *South Med J* 1990; 83:538-542.
74. MENON R.K., GILL D.S., THOMAS M., KERNOFF P.B.A., DANDONA P.: Impaired carboxylation of osteocalcin in warfarin treated patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 59-61.
75. PHILLIO W.J., MARTIN J.C., RICHARDSON J.M., REID D.M., WEBSTER J., DOUGLAS A.S.: Decreased axial and peripheral bone density in patients taking long-term warfarin. *Q J M* 1995; 88:635-640.
76. VAN HARLEM L.J.M., KNAPEN M.H.J., HAMULYAK K., VEREER C.: Circulating osteocalcin during oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemostas* 1988; 60: 79-82.
77. FAY W., OWEN W.G.: Platelet plasminogen activator inhibitor: Purification and characterization of interaction with plasminogen activators and activated protein C. *Biochemistry* 1989; 28:5773-5778.
78. SAKATA Y., LOSKUTOFF D.J., GLADSON C.L., HEKMAN C.M., GRIFFIN J.H.: Mechanism of Protein C-dependent clot lysis: Role of plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1986; 68:1218-1223.
79. BANDROWSKY T., VOKONO A.A., BORRIS T.J., MARCANTONI H.W.: Amoxicillin-related postextraction bleeding in an anticoagulated patient with tranexamic acid rinses. *Oral surg Oral Med-Oral Pathol-Oral Radiol Endod* 1996; 82:610-612.
80. GUILOV A.L., KOEFOED B.G., PETERSEN P.: Interaktion mellem warfarin og naldixinsyre. *Ugeskr-Laeger* 1996; 158: 5174-5175.
81. LIPSKY J.J.: Antibiotic-associated hypoprothrombinaemia. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21:281-300.
82. MOTOHARA K., KUROBI Y., KAN H., ENDO F., MATSUDA I.: Detection of vitamin K by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating abnormal prothrombin. *Pediatr Res* 1985; 19:354-357.
83. WIDDERSHOVEN J., VAN MUNSTER P., DE ABREU R., BOSMAN H., VAN LITH T., VAN DER PUTTEN MEYEL M., MOTOHARA K., MATSUDA I.: Four methods compared for measuring de-carboxy-prothrombin (PIVKA II). *Clin Chem* 1987; 33:2074-2078.
84. UENO T., SUTTIE J.W.: High-pressure liquid chromatographic reductive electrochemical detection analysis of serum trans-phyloquinone. *Anal Biochem* 1983; 133: 62-67.
85. GIL-TORRO I., GARCÍA-MATEO J.V., MARTÍNEZ-CALATAYUD J.: Spectrofluorimetric determination of Vitamin K₃ by a solid-phase zinc reactor immobilized in a flow injection assembly. *Analyst* 1997; 122: 139-142.

