

Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio.

Belsy Guerrero¹ y Mercedes López²

¹Laboratorio de Fisiopatología, Sección Coagulación, Centro de Medicina Experimental y ²Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular. Centro de Biofísica y Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.

Palabras Clave: coagulación; factores de la coagulación; modelo celular de la coagulación; trombina; pruebas de coagulación.

Resumen. En la década de los años sesenta, se describió la cascada de la coagulación como una secuencia de eventos enzimáticos iniciada por dos vías, la intrínseca y la extrínseca, las cuales convergían en una vía común para generar una enzima multifuncional, denominada trombina. La principal función de esta enzima consistía en transformar el fibrinógeno, en fibrina, una proteína que se polimeriza espontáneamente para formar la base estructural del coágulo. Posteriormente, se propuso el Modelo Celular según el cual la coagulación no es la consecuencia de vías de activación enzimáticas secuenciales, sino de una red de interacciones entre proteínas plasmáticas y transmembranas, así como, varios tipos celulares, que permiten la formación de complejos enzimáticos altamente eficientes con la finalidad de generar trombina. Esta revisión explica en detalle ambos enfoques, además, aborda las diferentes funciones que cumple la trombina dentro de la hemostasia y los mecanismos de inhibición que regulan la coagulación. Finalmente, se describen diferentes pruebas empleadas en la actualidad para evaluar la funcionalidad del sistema de coagulación, como: el tiempo de tromboplastina parcial activado, el tiempo de protrombina, el tiempo de trombina, el tiempo de reptilasa, el tiempo de coagulación por ecarina y el uso de sustratos cromogénicos para evaluar cada factor de la coagulación. Finalmente, dado a que la generación de trombina es clave dentro de la coagulación y a que el potencial de generar trombina puede indicar propensión a desarrollar eventos trombóticos o hemorrágicos, en este trabajo se presentan los métodos existentes para determinar la generación de trombina.

Overview of the Coagulation System and laboratory tests for its study

Invest Clin 2015; 56(4): 432-454

Keywords: coagulation; coagulation factors; cell-based model; thrombin; coagulation test.

Abstract. In the sixties, the clotting cascade was proposed, which describes the coagulation process as a sequence of enzymatic events initiated by two different pathways, the intrinsic and the extrinsic pathways, converging on a common pathway, to generate a multifunctional enzyme, thrombin, whose main function is to convert fibrinogen into fibrin, a protein that polymerizes spontaneously to form the building block of a hemostatic clot. Later, it was proposed a cell-based model of the hemostasis according to that coagulation does not occur as a consequence of linear sequential enzyme activation pathways, but rather via a network of simultaneous interactions between plasmatic and transmembrane proteins, as well as several cellular types, that allow the formation of highly efficient enzymatic complexes that lead to thrombin generation. In this review, we summarize these two approaches highlighting the functions of thrombin within the hemostasis and the inhibition mechanisms that regulate the blood coagulation. Moreover, we described different tests that are used to assess the function of the coagulation system, such as: activated partial thromboplastin time, prothrombin time, thrombin time, reptilase time, ecarin clotting time, and the use of chromogenic substrates to evaluate individual coagulation factors. Finally, because of thrombin generation is a fundamental part of the blood coagulation and, an estimation of how well a particular individual can generate thrombin may correlate with either a risk of bleeding or thrombosis, we also include the existing methods to evaluate the potential of thrombin generation in an individual.

Recibido: 02-10-2014 Aceptado: 29-01-2015

INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un mecanismo de defensa del organismo, necesario para mantener la integridad de la pared vascular, evitar la pérdida de sangre ante una lesión vascular y restablecer el flujo sanguíneo cuando se ha reparado la lesión. Su función involucra a cuatro componentes que actúan de manera localizada, amplificada y modulada, estos son los sistemas: vascular, plaquetario, de coagulación y fibrinolítico (1).

Ante una lesión vascular, ocurre una vasoconstricción local a nivel del endotelio, que limita el flujo de sangre a la zona lesionada. Además, se exponen a la sangre moléculas adhesivas presentes en el subendotelio como el

colágeno, el factor von Willebrand y otras proteínas que favorecen la adhesión, activación y agregación plaquetaria, con liberación de diversos mediadores y factores procoagulantes que aseguran la formación del tapón hemostático primario o tapón plaquetario. Adicionalmente, la lesión endotelial provoca la exposición del factor tisular presente en los fibroblastos del subendotelio, lo que inicia el proceso de coagulación y lleva a la formación de la malla de fibrina alrededor del tapón plaquetario, que en conjunto con otros elementos formes de la sangre y proteínas adhesivas, conforman el tapón hemostático secundario o coágulo de fibrina. En simultáneo, con la formación de fibrina se inicia la reparación del tejido lesionado y la liberación a partir del endotelio de activadores

del plasminógeno, lo que inicia la activación del sistema fibrinolítico con formación de la plasmina, enzima que limita el crecimiento de la malla de fibrina y restablece el flujo sanguíneo una vez que el tapón hemostático secundario cumple su función hemostática y ocurre la cicatrización de la lesión, evitando la formación de un trombo. Ante un desbalance de cualquiera de los componentes de la hemostasia aumenta el riesgo de manifestaciones hemorrágicas o trombóticas (2-4).

En el presente trabajo se presenta una visión detallada y actualizada, del sistema de la coagulación sanguínea y de las pruebas de laboratorio más utilizadas para su estudio.

Sistema de la Coagulación

El sistema de la coagulación está integrado por una serie de proteínas plasmáticas, a las que se les asignó un número romano según el orden en el cual fueron descubiertas. La mayoría de estas proteínas o factores de la coagulación, existen bajo condiciones fisiológicas en forma inactiva, como zimógenos, que son convertidos a enzimas activas por ruptura de una o dos uniones peptídicas. Para indicar la forma activa de los factores de la coagulación se adiciona el sufijo "a" después del número romano (5). No obstante, a algunos factores de la coagulación, entre ellos la precalicreína (PK), también llamada Factor Fletcher, y los quinínogenos de alto peso molecular (QAPM), no se les asignó ningún número, mientras que los fosfolípidos plaquetarios, componentes muy importantes del proceso, no están incluidos en esta clasificación.

La Tabla I resume el peso molecular, las concentraciones plasmáticas y el tiempo de vida media de los factores de la coagulación, agrupados en diversas categorías, según sus características bioquímicas y funcionales.

Las proteínas de la coagulación, según sus funciones o características bioquímicas, se clasifican de la siguiente forma:

Factores de Contacto: representados por los factores XI, XII, PK y QAPM. Inicialmente se relacionaron con la activación del FXII o Factor

Hageman, por contacto con superficies cargadas negativamente, como el colágeno subendotelial que se expone ante una lesión vascular. La deficiencia de alguno de estos componentes se manifiesta por un alargamiento del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), sin embargo, su deficiencia *in vivo* se ha asociado con riesgo de trombosis, lo cual se explica por la participación de estos factores en la fibrinólisis, al activar al plasminógeno, bien sea de manera directa por acción del FXIIa o indirecta por activación de la prouroquinasa mediada por la calicreína (4, 6-8).

2) Factores Dependientes de la Vitamina K: son una serie de proteínas que comparten características bioquímicas y estructurales especiales. Entre estas, la carboxilación de los residuos de ácido glutámico en el extremo amino terminal a través de la enzima glutamato-carboxilasa, en una reacción dependiente de la vitamina K. Como resultado de la carboxilación estas proteínas poseen en la región amino-terminal un dominio conocido como "Dominio Gla", compuesto por 8 a 12 residuos de ácido γ -carboxiglutámico, los cuales favorecen la formación de complejos enzimáticos por su unión a los fosfolípidos de la membrana plaquetaria mediante iones calcio. Otra característica común de estos factores es que son sintetizados en el hígado y que en todos se producen cambios post-transcripcionales como la eliminación del propéptido señal y el proceso de carboxilación. Entre estos factores se encuentran el factor II (mejor conocido como protrombina) y los factores VII, IX y X (los dos últimos también llamados Factor Christmas y Factor Stuart-Power, respectivamente) y las proteínas C, S y Z. En casos de deficiencia de vitamina K o de tratamiento con anticoagulantes que actúan como antagonistas de la vitamina K, estos factores son sintetizados, pero carecen de los residuos de ácido γ -carboxiglutámico, por lo que no son funcionales (9,10).

3) Cofactores: son componentes de los complejos enzimáticos que no poseen actividad catalítica *per se*, sino que actúan acelerando la velocidad de reacción de la enzima presente en el complejo, asegurando una eficiencia catalítica adecuada. Entre estos se encuentran los QAPM, los factores V, VIII, la proteína S, la trombomodulina y el factor tisular (6).

4) **Cimógenos o Sustratos:** están representados por las proteínas que se sintetizan como proenzimas, que en su mayoría al ser activadas se convierten en proteasas tipo serina, entre estas se encuentra la protrombina que es transformada en trombina. El FXIII y el fibrinógeno representan dos excepciones, debido a que el FXIII al ser activado se convierte en una transglutaminasa plasmática, el FXIIIa, que cataliza la reacción de entrecruzamiento de la fibrina; y el fibrinógeno que por acción de la trombina es transformado en fibrina, una proteína estructural sin función catalítica (6).

5) **Inhibidores:** la mayoría de los inhibidores de la coagulación se asocian a una superfamilia de proteínas denominada serpinas o inhibidores de proteasas de serina, que regulan además otros procesos como: angiogénesis, fibrinólisis e inflamación, entre otros. Uno de sus principales representantes es la antitrombina III (ATIII), que actúa junto al heparán sulfato para inhibir a la trombina, así como a los factores VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa y a la calicreína. El cofactor II de la heparina es otra serpina, que

inhibe a la trombina en presencia de heparán o dermatán sulfato. El inhibidor del componente C1 del complemento también conocido como inhibidor de la proteína C, es una serpina que inhibe a la trombina, la proteína Ca, la calicreína, los factores XIa y XIIa, y al componente C1 del complemento, de donde proviene su nombre. Finalmente, el inhibidor de proteasas dependiente de la proteína Z (ZPI), es otro representante del grupo de las serpinas que inhibe al FXa en presencia de la proteína Z, fosfolípidos y calcio. El ZPI también inhibe al FXIa en ausencia de cofactores.

Adicionalmente, existen otros importantes inhibidores de la coagulación que no pertenecen al grupo de las serpinas, como el inhibidor tipo "KUNITZ" denominado Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), por las siglas de su nombre en inglés *Tisular Factor Pathway Inhibitor*, que inhibe al FXa en presencia de la Proteína S y al complejo FXa/FT/FVIIa(11-15). Así como el sistema formado por la Proteína C/Trombomodulina/Trombina, que inhibe por proteólisis a los factores Va y VIIIa.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

Nombre	PM (kDa)	Concentración Plasmática (mg/dL)	Tiempo de vida media (horas)	Función
<i>Factores de contacto</i>				
Factor XI	160	0,4-0,6	45-80	En su forma activada es el activador intrínseco del FIX
Factor XII	80	1,5-4,5	50-70	Iniciador de la vía intrínseca
Precalicroeína	85	1,5-4,5	36	Precursor de la Calicroeína
Quininógenos de alto peso molecular (QAPM)	120	8 - 9	144-156	Cofactores en la activación de Precalicroeína, FXI y FXII
<i>Factores dependientes de vitamina K</i>				
Factor II	72	10-12	60-72	Precursor inactivo de la trombina
Factor VII	48-50	0,05-0,06	4-6	Junto al Factor Tisular inicia la vía extrínseca
Factor IX	55-57	0,4-0,5	18-25	En su forma activa es la enzima del complejo tenasa intrínseco
Factor X	58,9	0,7-1,2	24-40	En su forma activa es la enzima del complejo protrombinasa.

Cont... TABLA I

Nombre	PM (kDa)	Concentración Plasmática (mg/dL)	Tiempo de vida media (horas)	Función
Proteína C	62	0,39-0,59	8-14	En su forma activa inactiva al FVa y FVIIIa
Proteína S	69	2,5	40-60	Cofactor de la PCa
Proteína Z	62	0,22	60	Incrementa la inhibición del FXa por el Inhibidor de la Proteína Z
Cofactores				
Factor V	330	0,4-1,4	12-36	Cofactor del complejo protrombinasa
Factor VIII	330	0,5-1	8 - 12	Cofactor del complejo tenasa intrínseco
Trombomodulina	74	0		Cofactor de la trombina
Factor Tisular	35-46	0		Inicia la vía extrínseca al unirse al FVIIa
Cimógenos o Sustratos				
Fibrinógeno	340	200-400	90	Precursor de la fibrina
Factor XIII	320	1-2	168-288	Transaminasa que entrecruza la fibrina
Inhibidores				
Antitrombina III	58	15-20	68	Serpina que inhibe a la trombina y a los factores VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa y caliceína.
Cofactor II de la heparina	66,5	6,1-8,2	60	Serpina que inhibe a trombina
Inhibidor de la Proteína C	57	0,5	23,4	Serpina que inhibe PCa, trombina, caliceína, FXIa, FXIIa y al componente C1
Inhibidor de la proteína Z	72	0,1-0,16		Serpina que inhibe FXa y FXIa
TFPI o Inhibidor de la vía del factor tisular	40	0,006	1-2	Inhibidor tipo Kunitz de los complejos TF/ FVIIa/FXa y del PS/FXa

Mecanismos propuestos de la Coagulación Sanguínea

La coagulación de la sangre es un proceso dinámico que requiere la participación e

interacción de células y proteínas plasmáticas y/o transmembranas, que tiene como función, generar la trombina, enzima central del sistema de la coagulación que tiene como función hemostática central transformar el fibrinógeno en fibrina. Esta

polimeriza espontáneamente y junto con el tapón plaquetario, otras proteínas plasmáticas y elementos formes de la sangre, forman el tapón hemostático secundario o coágulo. Este además de evitar la pérdida de sangre, forma la matriz provisional para iniciar el proceso de cicatrización y regeneración del vaso sanguíneo lesionado.

Teoría clásica: la cascada de la coagulación

En la década entre 1960 y 1970, dos grupos propusieron el modelo de la Cascada de la Coagulación, el cual explica el funcionamiento de este mecanismo como un proceso enzimático secuencial y limitado, sobre la superficie de las plaquetas, con el cual se favorece la generación de trombina (16,17). Este modelo se explica a través de dos vías conocidas como: Intrínseca y Extrínseca.

La vía intrínseca se inicia tras un daño vascular, con la exposición de superficies cargadas negativamente que interaccionan con los factores de contacto (FXII, FXI, PK y QAPM) e inician el proceso de activación secuencial, donde el FXII funciona como verdadero iniciador, puesto que si bien es una proenzima, posee una pequeña actividad catalítica que alcanza para activar a la PK, convirtiéndola en calicreína. En segunda instancia la calicreína, potenciada por los QAPM, actúa sobre el factor XII para convertirlo en XIIa, una enzima mucho más eficiente que actúa sobre el factor XI para generar FXIa, que en presencia de iones de Ca^{++} activa al FIX. El factor IXa generado junto al FVIIIa, iones Ca^{++} y fosfolípidos conforman el complejo “Tenasa Intrínseca”, el cual asegura la eficiencia catalítica para activar al FX a la velocidad requerida en el momento de activarse el proceso de la coagulación. La vía extrínseca se inicia con la formación del complejo “Tenasa Extrínseca” conformado por el factor tisular (FT), el FVIIa circulante, iones de Ca^{++} y fosfolípidos, el cual activa tanto al FX, como

al FIX. Finalmente, en la vía común, convergen las dos vías antes mencionadas, a nivel del FXa que conforma junto con el FVa, la protrombina, iones de Ca^{++} y fosfolípidos, el complejo “Protrombinasa”, encargado de generar trombina, la cual actúa sobre el fibrinógeno transformándolo en monómeros de fibrina que se polimerizan y se estabilizan por acción del FXIIIa, formando junto con los elementos formes de la sangre, el tapón hemostático o coágulo (Fig. 1).

El modelo clásico es muy útil para describir la interacción entre las proteínas con actividad procoagulante y para interpretar las pruebas de laboratorio más utilizadas para la evaluación de desórdenes de la coagulación. Entre estas pruebas están el Tiempo de Protrombina (TP), para evaluar la vía extrínseca; el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) para la vía intrínseca y el Tiempo de Trombina (TT), que evalúa la vía común (Fig. 1). Sin embargo, este modelo falla en explicar hallazgos *in vivo*, entre estos; el hecho de que el déficit de algún factor de la vía intrínseca prolonga el TTPa, pero no cursa con riesgo hemorrágico, o cómo las deficiencias de los factores VIII y IX, asociadas a la hemofilia A y B, respectivamente, cursan con hemorragias severas, a pesar de no haber alteraciones de la vía extrínseca, por la cual también se genera trombina. Más aún, el hecho de que el complejo FT/VIIa actúa sobre los factores FX y FIX, condujo a la conclusión que *in vivo* la vía extrínseca sería la más relevante para iniciar la coagulación. Así surgió el modelo actual de este sistema, mejor conocido como el Modelo Celular de la Coagulación, desarrollado por Hoffman y Monroe (18,19), el cual resalta la importancia de la participación de diversas células, como: fibroblastos, monocitos, células endoteliales y plaquetas, que son fundamentales para el funcionamiento del sistema hemostático en condiciones normales y en diversos estados patológicos.

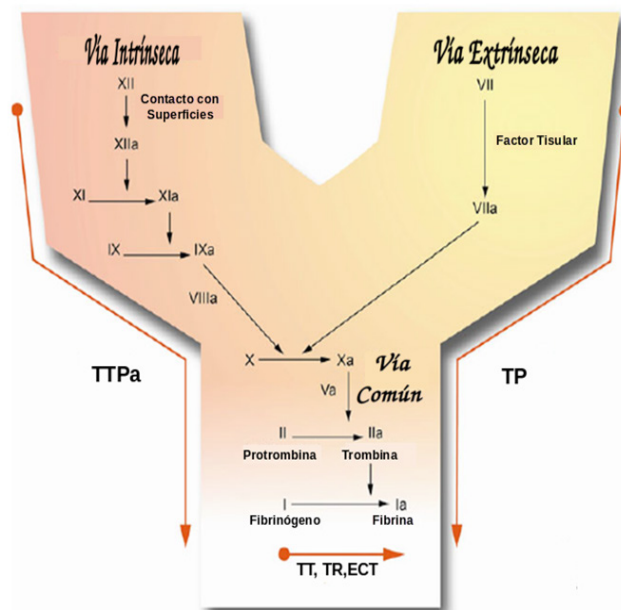


Fig. 1. Cascada de la coagulación. Consiste en la confluencia de la vía extrínseca e intrínseca en una vía común. El TP se usa como ensayo para evaluar la actividad de la vía extrínseca, el TTPa para la vía intrínseca y para la vía común se emplean el TT, TR y ECT. Los factores de la coagulación aparecen representados por números romanos, para indicar su forma activa se les adiciona el sufijo “a”. TP, Tiempo de Protrombina; TTPa, Tiempo de Tromboplastina Parcial activada; TT, Tiempo de Trombina; TR, Tiempo de Reptilasa; ECT, Tiempo de Coagulación por Ecarina.

Modelo Celular de la Coagulación

Según este modelo, la coagulación ocurre en tres fases (Fig. 2). La primera de ellas, denominada Fase de Iniciación, comienza tras la exposición del FT, una proteína transmembrana que se expresa constitutivamente en los fibroblastos expuestos luego de una lesión vascular, en células musculares lisas y que puede ser inducida en células endoteliales, monocitos y macrófagos, entre otros tipos celulares, por acción de diversos estímulos proinflamatorios (20-22). El FT se une al FVII, que circula en pequeñas cantidades (cerca del 1 %) en

su forma activada, formando junto con iones calcio y fosfolípidos el complejo “Tenasa Extrínseca”, que genera más FVIIa y activa a los factores X y IX. El FXa generado se une sobre una superficie fosfolípida con su cofactor, el FVa (liberado en su forma activa de los gránulos plaquetarios o activado por el FXa u otras enzimas), para producir pequeñas cantidades de trombina, que serán insuficientes para completar el proceso de formación de la fibrina, pero que sirven para estimular la sobreexpresión del FT y activar a las plaquetas y al FV, así como para disociar al FVIII del Factor von Willebrand y activar al FVIII (23).

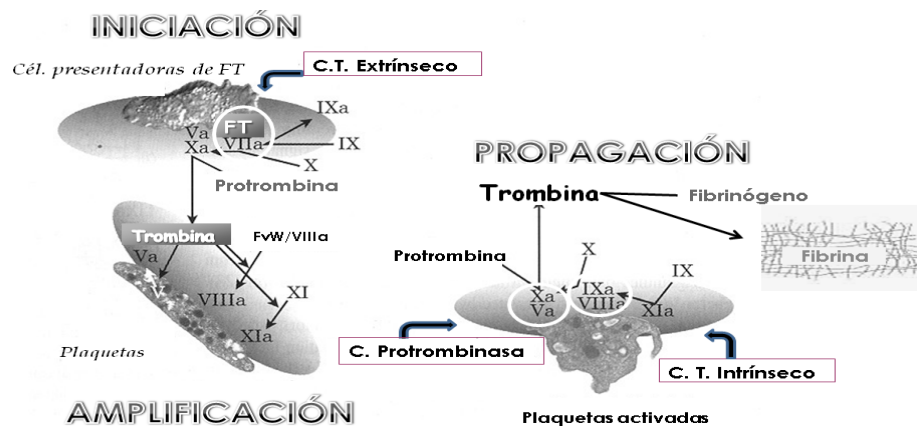


Fig. 2. Modelo Celular de la coagulación: consiste de 3 Fases o etapas: Iniciación: La exposición de FT conlleva a la formación del complejo tenasa extrínseco, en esta etapa se forman trazas de trombina. Amplificación: la trombina activa a las plaquetas y otros factores, como el FV, el FVIII y el FIX. Propagación: La formación de los complejos “Tenasa intrínseco” y “Protrombinasa”, aseguran la generación de grandes cantidades de trombina. Esta fase culmina con la formación de fibrina entrecruzada, resultando en un coágulo estable. FT, Factor Tisular; FvW, Factor von Willebrand; C., Complejo; C.T., Complejo Tenasa

Luego, se inicia la Fase de Amplificación, que es dependiente de la adhesión de las plaquetas al colágeno sub-endotelial y su activación por las trazas de trombina que se forman durante la fase de iniciación. Las plaquetas activadas experimentan un cambio morfológico, con la subsecuente exposición de fosfolípidos cargados negativamente y además, liberan el contenido de sus gránulos, los cuales almacenan sustancias que inician el proceso de la agregación y por ende, la formación del tapón hemostático primario. Más aún, otros factores procoagulantes, como el FV y el FIX, se liberan de los gránulos plaquetarios. Los factores XI, VIII y V son activados por la trombina generada para formar los complejos enzimáticos requeridos en la siguiente fase (25,26).

En la Fase de Propagación, el FIXa generado en la fase de iniciación, forma junto con el FVIIIa, sobre una superficie fosfolípida y en presencia de iones de calcio, el complejo “Tenasa Intrínseco”. Este complejo produce grandes cantidades de FXa, el cual a su vez, al unirse al FVa sobre una superficie celular en presencia de iones de calcio, forma el complejo “Protrombinasa” que activa a la protrombina y asegura la generación de grandes cantidades de trombina, fenómeno denominado “explosión

de trombina”. Estas cantidades de trombina son suficientes para liberar los fibrinopéptidos A y B de los extremos N-terminales de las cadenas A α y B β del fibrinógeno y generar monómeros de fibrina, que luego se polimerizan y entrecruzan por acción del FXIIIa, lo que genera un coágulo de fibrina estable y resistente a una lisis prematura. Una vez cumplida su función hemostática, la generación de trombina es atenuada y neutralizada por la acción de inhibidores, como: la antitrombina III, el TFPI y el sistema de la Proteína C activada (PCa) (4, 27,28).

El modelo celular de la coagulación asegura que la hemostasia se localice en el sitio donde ocurre la lesión vascular y que este proceso ocurra sobre superficies celulares esenciales para el ensamblaje de las diversas reacciones enzimáticas que modulan la formación del coágulo.

Formación de fibrina

La malla de fibrina es esencial para estabilizar el tapón hemostático primario o tapón plaquetario. La formación de fibrina estable depende de la habilidad de la trombina para liberar adecuadamente los fibrinopéptidos A y B de la molécula del fibrinógeno e inducir la formación del polímero de fibrina, el cual

se estabiliza por el FXIII activado por la trombina. El fibrinógeno está constituido por tres pares de cadenas: dos $A\alpha$, dos $B\beta$ y dos γ , que se enrollan formando una hélice alfa. La estructura terciaria del fibrinógeno está representada por tres dominios: un nódulo central o dominio E, constituido por los extremos N-terminales de las cadenas y dos nódulos laterales o dominios D, formados por los extremos C-terminales (Fig.3). Los fibrinopéptidos A y B ubicados en el dominio central E son ricos en residuos de ácido glutámico y ácido aspártico que le confieren una alta densidad de cargas negativas

inducen la repulsión entre moléculas de fibrinógeno adyacentes. La formación de fibrina estable depende de la habilidad de la trombina para escindir los enlaces $\text{Arg}_{16}\text{-Gly}_{17}$ y $\text{Arg}_{14}\text{-Gly}_{15}$, en los extremos N-terminales de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ del fibrinógeno y liberar los fibrinopéptidos A y B, respectivamente. Esto causa la pérdida de las cargas negativas presentes en los dominios E y favorece la formación de los monómeros de fibrina que se asocian entre sí por uniones electrostáticas débiles, para formar los polímeros de fibrina, que se estabilizan por el FXIII activado (29).

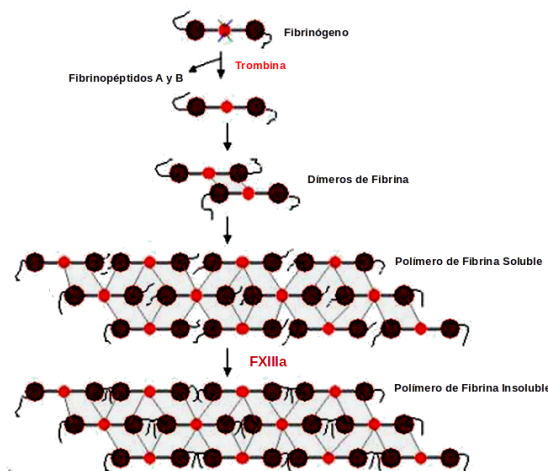


Fig. 3. Formación de fibrina. El Fibrinógeno está compuesto por 3 dominios globulares, uno central denominado Dominio E (en rojo) y dos dominios D (en negro) a cada lado. Luego de la liberación de los fibrinopéptidos A y B por la trombina. Los monómeros de fibrina polimerizan formando un polímero de fibrina soluble, el cual será estabilizado gracias a la acción del FXIIIa, formando un polímero insoluble o coágulo estable.

El FXIII es activado por la trombina en presencia del fibrinógeno, que sirve de cofactor, y de iones de calcio. El FXIIIa actúa como una transglutaminasa al inducir la formación de enlaces covalentes entre: las cadenas α de moléculas de fibrina adyacentes formando los polímeros α ; entre las cadenas γ formando los dímeros γ ; y entre las cadenas α y γ formando los heteropolímeros α/γ , lo que origina una estructura de fibrina estable y resistente a la lisis prematura por la plasmina. Además, el FXIIIa entrecruza a las cadenas α de la fibrina con la $\alpha 2$ -antiplasmina, principal inhibidor de la plasmina y con la fibronectina, una proteína adhesiva importante, que actúa como cofac-

tor de la fibrina, en el proceso de cicatrización del tejido lesionado. Las cadenas γ de la fibrina también se entrecruzan con la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta 3$ lo que favorece la retracción del coágulo (29).

Funciones de la Trombina

La trombina tiene numerosas funciones dentro de la hemostasia, las cuales pueden ser clasificadas como: procoagulantes, anticoagulantes, profibrinolíticas y antifibrinolíticas (Fig. 4). Esta enzima posee también una gran cantidad de efectos pleiotrópicos sobre una gran variedad de células, tales como:

células endoteliales, monocitos, fibroblastos, células de músculo liso, etc. Estos efectos celulares son mediados por la activación de los receptores PARs e incluyen entre otros, efectos quimiotácticos directos, regulación de la expresión genética, secreción de citoquinas y otros mediadores bioquímicos de interés para el proceso de la hemostasia (21, 29, 30). En esta revisión se han enfocado únicamente los efectos de la trombina sobre la hemostasia. Los efectos

procoagulantes de la trombina incluyen la conversión del fibrinógeno en fibrina, así como la activación de los factores X, XI y XIII y de los cofactores V y VIII. La trombina también induce la agregación plaquetaria, por su acción sobre los receptores PAR₁ y PAR₄. Estos efectos procoagulantes representan un sistema de retroalimentación positiva que favorece la generación de más trombina (27, 31-33).

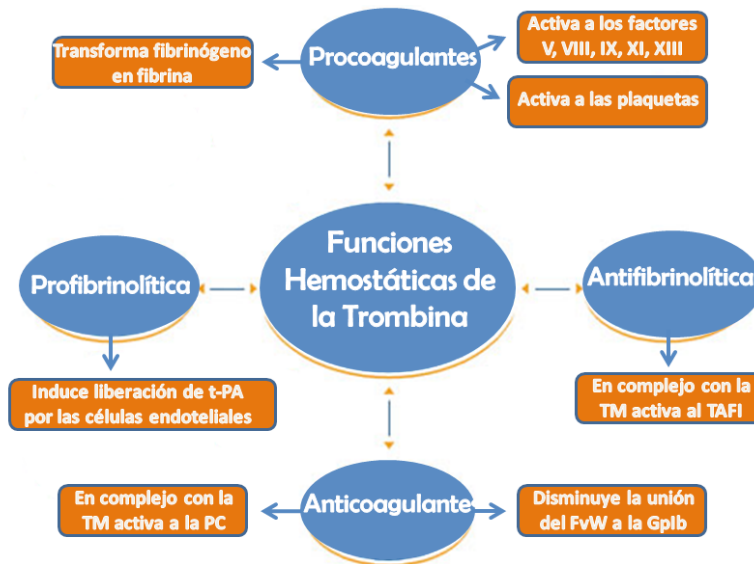


Fig. 4. Funciones de la trombina. La trombina tiene numerosas funciones dentro de la hemostasia, las cuales pueden ser clasificadas como: procoagulantes, anticoagulantes, profibrinolíticas y antifibrinolíticas. TM, Trombomodulina; PC, Proteína C; FvW, Factor von Willebrand; GPIb, Glicoproteína Ib de las plaquetas; t-PA, activador de plasminógeno tisular; TAFI, Inhibidor de la Fibrinólisis Activable por Trombina.

Por otra parte, la principal función anticoagulante de la trombina ocurre, tras su unión a un receptor de membrana presente en las células endoteliales, la trombomodulina (TM), para formar el complejo trombina-TM. Cuando la trombina se une a la TM, ocurre un cambio en su conformación, que frena su acción sobre el fibrinógeno y las plaquetas y facilita su acción sobre la Proteína C, la cual en su forma activa, en presencia de la Proteína S, regula negativamente el sistema de la coagulación por degradación de los cofactores FVa y FVIIIa (34). Esto se explica con más detalle en la sección correspondiente a Inhibición de la coagulación.

Otra función anticoagulante de la trombina es disminuir la unión del Factor von Willebrand (FvW) a la glicoproteína Ib (GPIb) de las plaquetas (35).

La acción profibrinolítica de la trombina consiste en inducir la secreción del activador de plasminógeno tisular (t-PA) por las células endoteliales (36), mientras que su principal efecto antifibrinolítico viene dado por la activación del Inhibidor de la Fibrinólisis Activable por Trombina (TAFI, por las siglas de su nombre en inglés *thrombin-activable fibrinolysis inhibitor*). El TAFI activado modula negativamente la fibrinólisis al remover residuos de

lisina expuestos en la fibrina, parcialmente degradada por la plasmina, los cuales son requeridos para la formación del complejo Fibrina/Plasminógeno/t-PA, lo que asegura que la fibrinólisis ocurra a una velocidad adecuada y de manera localizada (4, 28, 37).

Inhibición de la Coagulación

El sistema de la coagulación en condiciones normales es finamente regulado por diversos mecanismos que aseguran que la generación de trombina y la posterior formación de la fibrina, sean procesos localizados. Bajo condiciones fisiológicas, el mantenimiento del flujo sanguíneo adecuado y la actividad anticoagulante del endotelio vascular, limitan la acumulación local de factores de la coagulación activados y la formación de los complejos procoagulantes, evitando así que se active el sistema de la coagulación y ocurra la oclusión de algún vaso sanguíneo (38).

Entre los mecanismos anticoagulantes naturales, el más importante es el constituido por la Antitrombina III (ATIII), una glicoproteína plasmática perteneciente a la familia de las serpinas (Fig.5). La ATIII inhibe a

la trombina y al FXa y en menor extensión también a los factores FIXa, FXIa, calicreína, plasmina y uroquinasa, entre otras proteasas de la hemostasia. El mecanismo de inhibición involucra la formación de un complejo estable 1:1 entre la ATIII y la proteasa blanco. La velocidad de inhibición es incrementada en presencia de glicosaminoglicanos, tales como las moléculas de heparán sulfato presentes en la superficie de las células endoteliales, o la heparina usada frecuentemente como anticoagulante. La ATIII posee un dominio de unión a la heparina, que se fija específicamente a una secuencia pentasacárida presente en esta molécula, lo que induce un cambio conformacional en la ATIII, que acelera la inhibición del FXa. Sin embargo, la inhibición de la trombina requiere que la ATIII se una tanto a la heparina como a la trombina, para formar un complejo ternario. La secuencia de eventos propuesta, describe que primero la ATIII interacciona con el dominio pentasacárido y luego, la trombina se une a la heparina; de esta manera, la orientación de estas moléculas en el complejo, favorece la inhibición de la trombina por la formación de un complejo enzima-inhibidor irreversible y muy estable, el cual será finalmente removido de la circulación (38-41).

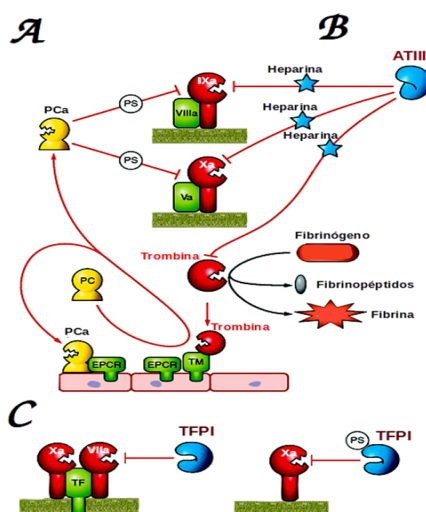


Fig. 5. Inhibición de la coagulación. Los tres principales mecanismos que regulan la coagulación son: A) El complejo trombina-TM-EPCR, que transforma a la PC en PCa, la cual junto a la PS inactiva a los factores Va y VIIIa. B) La ATIII que inhibe a la trombina, al FIXa, y al FXa en presencia de heparina. C) El TFPI, que se une al complejo TF-FVIIa-FXa. La PS también puede unirse al TFPI para inhibir la actividad del FXa. TM, Trombomodulina; EPCR, Receptor endotelial de la PC; Proteína C; PS, Proteína S; ATIII, Antitrombina III; TFPI, Inhibidor de la vía del factor tisular; TF, Factor Tisular.

Otro de los mecanismos anticoagulantes que controlan la coagulación sanguínea es el Sistema de la Proteína C, el cual se inicia por la formación del complejo Trombina/TM a nivel de las células endoteliales. En este complejo, la trombina pierde la mayoría de sus funciones procoagulantes y asume funciones anticoagulantes al activar a la Proteína C (PC) a Proteína C activada (PCa), en una reacción que se incrementa en presencia del receptor endotelial de la PC (EPCR; por las siglas de su nombre en inglés *Endothelial cell Protein C Receptor*) (42,43). Una vez que la PCa se disocia del EPCR, se une a la proteína S y este complejo "PCa-PS" inactiva por proteólisis, a las formas activadas (unidas a la membrana) de los cofactores V y VIII, mientras que tiene poco efecto sobre los cofactores nativos circulantes. En el caso del FVIIIa, su inactivación aumenta en presencia del FVa (44). En pacientes con deficiencia de PC o con resistencia a la PCa, como en los casos de Factor V Leiden, una mutación en el FV, que lo hace resistente a la proteólisis por la PCa, se ha observado un incremento en el riesgo de sufrir trombosis (45). Además, la unión de la trombina a la TM hace que esta proteasa sea más sensible a la inhibición por la ATIII, en comparación con la trombina libre. La PCa también tiene una importante función en los procesos inflamatorios y en la fibrinólisis (4, 46).

La fase de iniciación del proceso de la coagulación se encuentra regulada por el Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), el cual se sintetiza principalmente en las células endoteliales y circula unido a lipoproteínas que incluyen las LDL, las HDL y la Lp(a) (47). El TFPI bloquea al complejo FT/FVIIa inmediatamente después que se genera FXa, formando un complejo cuaternario TFPI/FXa/FT/FVIIa. Inicialmente, el TFPI se une al FXa y lo inhibe de manera reversible en un proceso que no requiere de Ca^{++} , sin embargo, en presencia de superficies fosfolípídicas, este ión potencia la inhibición del FXa por el TFPI. Posteriormente, el complejo TFPI/FXa se une al complejo FT/FVIIa en un proceso dependiente de Ca^{++} , formando el complejo cuaternario inactivo TFPI/FXa/FT/FVIIa (48-50). La proteína S también muestra actividad anticoagulante en ausencia de PCa por varios mecanismos, uno de ellos es facilitando la interacción FXa-TFPI.

Pruebas de Coagulación

Las pruebas de coagulación son ensayos funcionales que tienen como objetivo replicar *in vitro* la activación del sistema de la coagulación y evaluar la funcionalidad del mismo, lo que permite fundamentar y orientar el diagnóstico clínico. Las pruebas clásicas son: el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa) que evalúa la vía intrínseca; el Tiempo de Protrombina (TP) el cual evalúa la vía extrínseca y el Tiempo de Trombina (TT) que evalúa la vía común. Estas pruebas de laboratorio son útiles para detectar deficiencias congénitas o adquiridas de factores de la coagulación, de allí que se usen para estudiar pacientes con manifestaciones hemorrágicas. En contraste, la deficiencia congénita de la mayoría de las proteínas anticoagulantes como ATIII, PC y PS está asociada a la aparición de un estado de hipercoagulabilidad, protrombótico o trombofílico, sin embargo, en estos casos no se observan alteraciones en las pruebas clásicas, por lo que estas no se emplean en el estudio de pacientes con trombofilias primarias (51-54).

Las pruebas para evaluar la coagulación emplean plasma fresco citratado, el cual debe ser procesado lo más rápidamente posible y mantenerse en frío, sin ser expuesto a contacto directo con hielo. Para la obtención de plasma citratado se extrae sangre por punción venosa, de voluntarios aparentemente sanos, con agujas de 21 G. La sangre se mezcla suavemente en tubos de plástico con citrato de sodio al 3,8% en una proporción 1:9 e inmediatamente se centrifuga a 4°C a 1400 g durante 15 ó 20 minutos para obtener Plasma Pobre en Plaquetas (PPP). Las pruebas se deben realizar lo más rápido posible, sobre todo si se evalúan factores lábiles como el FVIII o FV. Los plasmas no deben almacenarse por más de dos semanas a -20°C o de 6 meses a -70°C (55-56).

Los resultados obtenidos en las diversas pruebas de coagulación de una muestra de plasma en estudio, se comparan con los tiempos de coagulación obtenidos con un plasma control, el cual se prepara mezclando el plasma de al menos tres personas aparentemente sanas, cuyos tiempos de coagulación individuales estén dentro de los valores normales

establecidos por cada laboratorio. Los ensayos con ambas muestras se deben realizar en paralelo y por el mismo operador. La sensibilidad de estas pruebas está vinculada al reactivo y a la técnica utilizada, de allí que es importante establecer los rangos de referencia de cada laboratorio e indicar la fuente de los reactivos empleados (55-56).

Cuando el tiempo de coagulación de la muestra en estudio es muy prolongado debe realizarse la corrección con plasma control, es decir, mezclar plasma del paciente con plasma control en una proporción 1:1. Si la alteración en el tiempo de coagulación se corrige, se está ante la deficiencia de algún factor de la coagulación, mas si no se corrige, se está ante la posible presencia de algún inhibidor.

Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

El TTPa evalúa el funcionamiento de la vía intrínseca de la coagulación y emplea como activadores ácido elálgico, celite, sílica o caolín, en presencia de fosfolípidos. Esta prueba detecta la deficiencia de los factores VIII, IX, XI y XII. Adicionalmente, el TTPa se prolonga por deficiencia de los factores de la vía común como V, X, II y el fibrinógeno en menor grado. El TTPa no se altera cuando las deficiencias de los factores son moderadas (>40%). Esta prueba también es muy útil para evaluar el tratamiento con anticoagulantes no orales tipo heparina y para rastrear el anticoagulante lúpico (56,57).

El TTPa también resulta prolongado ante la deficiencia de los factores que intervienen en la fase de contacto, como la precalicreína o los QAPM, a menos que la prueba utilice un reactivo que contenga ácido elálgico como activador. En ese caso, esta prueba será normal, incluso ante la ausencia total de dichos factores (57).

Entre los métodos reportados para medir el TTPa están:

a) Tiempo de Tromboplastina con cefalina: Este método fue descrito inicialmente por Langdell y col. en 1953 (58). El procedimiento es el siguiente: Se incuban 0,1 mL de PPP fresco citratado del paciente o del control y 0,1 mL de solución de cefalina a 37°C

durante el tiempo recomendado por el fabricante de este reactivo, luego se agregan 0,1 mL de CaCl_2 25 mM preincubado a 37°C y se determina el tiempo de coagulación.

b) Tiempo de Tromboplastina con caolín: tiene como finalidad unificar la activación por contacto, teniendo en cuenta que los tiempos de incubación cortos son más sensibles para detectar defectos de los factores de contacto. En este método descrito por Proctor y Rapaport en 1961 (59), se sigue el procedimiento siguiente: 0,1 mL de PPP fresco citratado se incuba a 37°C; luego se agregan 0,1 mL de una mezcla de caolín (5%) y cefalina (1/10), se mantiene a 37°C, finalmente se agrega 0,1 mL de CaCl_2 25 mM, se mezcla y se determina el tiempo de coagulación. Este método es sensible para seguir tratamientos con anticoagulantes (cumarínicos o heparina) y para evaluar los niveles de los factores de la vía intrínseca, pero no para diagnosticar deficiencias de fibrinógeno y protrombina (55).

Tiempo de protrombina (TP)

El TP evalúa el funcionamiento de la vía extrínseca de la coagulación. Esta prueba mide el tiempo de formación de un coágulo en presencia de un exceso de factor tisular (FT), representado por la tromboplastina o una mezcla comercial que contiene FT recombinante o de origen tisular, con diferente composición de fosfolípidos y cuya heterogeneidad determina diferentes respuestas ante la disminución en los niveles de algún factor. Es una prueba empleada para la evaluación prequirúrgica, para el seguimiento de pacientes con hepatopatías o con deficiencias de factores de la coagulación. Además, es muy usada para evaluar la terapia anticoagulante con cumarínicos, para lo cual se debe determinar el Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) de la tromboplastina a emplear para poder unificar los resultados. El fabricante de la tromboplastina calcula el valor ISI comparado con una tromboplastina de origen humano estándar internacional a la cual se le asigna un ISI de 1,0; lo que garantiza compensar las distintas sensibilidades de los reactivos disponibles en el mercado (55, 60).

El TP en una etapa reportado por Arocha Piñango y col. (60), fue modificado del método originalmente descrito por Quick en 1935 (61) y es sensible para determinar la deficiencia de los factores VII, X, V y en menor medida las deficiencias de protrombina. Sin embargo, no detecta deficiencias de fibrinógeno, incluso cuando estas son moderadas.

Para realizar el TP se aplica el siguiente procedimiento: se mezclan 0,1 mL de PPP fresco citratado con 0,1 mL de tromboplastina tisular y 0,1 mL de CaCl_2 25 mM (estos últimos preincubados a 37°C), se agita y se determina el tiempo de coagulación. Las variaciones entre los duplicados no deben ser mayores a 0,5 seg en tiempos cortos y no más de 2 a 3 seg en tiempos mayores a 30 seg. Los resultados deben expresarse como la relación o cociente entre el tiempo de coagulación obtenido con el plasma del paciente y el plasma control (60).

En pacientes tratados con cumarínicos, el resultado debe expresarse como INR o *International Normalized Ratio*, en español Razón Internacional Normalizada, que se obtiene elevando la relación (r) obtenida entre el paciente y el control al ISI ($\text{INR} = r^{\text{ISI}}$), lo que permite comparar los resultados obtenidos con diferentes tromboplastinas comerciales. La OMS recomienda emplear tromboplastinas con un ISI menor a 2,5. El valor del INR tomado como rango terapéutico depende de la patología que motive el tratamiento (60).

Tiempo de trombina (TT)

El TT mide el tiempo de formación de fibrina a partir del fibrinógeno presente en el plasma, en presencia de una cantidad estandarizada de trombina. Esta prueba es muy útil para determinar la presencia de fibrinógenos anormales (disfibrinogenemias) o bajos niveles de fibrinógeno circulante (hipofibrinogenemias); también da tiempos prolongados en cuadros de coagulación intravascular diseminada, así como también en presencia de heparina, en hiperfibrinólisis primaria y en presencia de productos de degradación de fibrinógeno/fibrina (56, 62).

Para el ensayo, inicialmente se debe preparar una solución de trombina estándar entre 2-3 UI/mL, que debe dar un tiempo de coagulación con un plasma control entre 18 y 22 seg. Con tiempos de coagulación menores a 15 seg debe hacerse una mayor dilución de la trombina (54). En general, se aplica el siguiente procedimiento: se mezclan 0,1 mL de PPP fresco citratado y 0,1 mL de la solución de trombina y se determina el tiempo de coagulación a 37°C .

Tiempo de reptilasa (TR)

Es una prueba especial que emplea la reptilasa, una enzima similar a la trombina obtenida del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, que actúa directamente sobre las cadenas α del fibrinógeno lo que libera el fibrinopéptido A, sin que su acción sea inhibida por la antitrombina, por lo que esta prueba no es afectada por la presencia de heparina. Si el TT está prolongado y el TR es normal, probablemente el plasma evaluado contiene heparina. Si ambos tiempos dan prolongados, pero en mayor proporción el TT, debe sospecharse de la presencia de productos de degradación del fibrinógeno/fibrina. En casos de disfibrinogenemias, esta prueba es más sensible que el TT.

Los valores de TR normales deben encontrarse similares a los obtenidos con una muestra de plasma control, con diferencias dentro de los 3 seg, de allí que deben informarse los valores obtenidos con el plasma del paciente y con el plasma control. La prueba se realiza de manera similar al TT, ajustando el TR del control entre 15 y 18 seg (56).

Tiempo de coagulación por ecarina (ECT)

El ECT (por las siglas de su nombre en inglés *Ecarin Clotting Time*) es una prueba de coagulación basada en la activación de la protrombina por acción de la ecarina, una enzima aislada del veneno de la serpiente *Echis carinatus*, generando meizotrombina, un precursor catalíticamente activo de la trombina capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina (63).

Esta prueba de coagulación, descrita originalmente por Nowak y Bucha en 1993 (64), exhibe una correlación lineal entre la concentración de inhibidores directos de trombina presentes en el plasma y su tiempo de coagulación. Por esta característica favorable en comparación a los métodos descritos anteriormente, el ECT ha sido ampliamente usado en la caracterización bioquímica y farmacológica de inhibidores directos de trombina y para controlar los niveles de éstos compuestos en la terapia anticoagulante (65-68).

López y Nowak en el año 2008 (68) describieron una modificación a este método que permite cuantificar inhibidores directos de trombina en sangre. Para ello se prepara una solución de ecarina a una concentración final de 1 U/mL en tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,5 con NaCl 0,154 M y CaCl₂ 10 mM, que se preincuba por 5 min a 37°C. Para determinar el ECT, se incuban 0,1 mL de sangre citratada con 0,1 mL de la solución de ecarina, se agita y se determina el tiempo de coagulación. La concentración del inhibidor se determina por comparación con una curva de calibración realizada usando concentraciones conocidas del compuesto en estudio.

Determinación de factores de la coagulación

La cuantificación de un factor específico del sistema de la coagulación se puede realizar por medio de la evaluación de su actividad funcional por métodos cromogénicos o más comúnmente, por algún método coagulante antes mencionado. También, se puede evaluar el nivel de proteína circulante por métodos inmunológicos como: ELISA, pruebas de aglutinación, inmunoelectroforesis, entre otros.

Metodos cromogénicos

Estos métodos evalúan la actividad enzimática del factor en estudio, por medio del uso de sustratos cromogénicos. Estos sustratos son péptidos sintéticos cuya secuencia de aminoácidos es similar a la que precede al sitio de corte del

sustrato natural de la enzima en estudio, a la cual se le ha acoplado un cromóforo como la paranitroanilina (pNA). Cuando la enzima escinde el enlace amida libera el cromóforo que puede ser detectado por cambios en la absorbancia a una determinada longitud de onda, en el caso de la pNA, se detecta a 405 nm. Los sustratos cromogénicos muestran una alta selectividad por las enzimas que los activan. Existen diversos sustratos cromogénicos para los distintos factores activados del sistema de la coagulación y de la fibrinólisis y se pueden elaborar curvas de calibración empleando estándares comerciales. Los sustratos cromogénicos son utilizados también para evaluar algunas sustancias terapéuticas, como niveles de heparina no fraccionada y de bajo peso molecular (69). Estos ensayos requieren un volumen de muestra bajo, lo que facilita el estudio en pacientes pediátricos.

Los sustratos cromogénicos también permiten detectar la presencia de inhibidores de factores de la coagulación de manera indirecta y evaluar su actividad funcional. En el caso de la ATIII, esta prueba se basa en la función antitrombínica de este inhibidor en presencia de heparina (70,71). La ATIII presente en el plasma en estudio se pone en contacto con una cantidad fija y en exceso de trombina en un tampón heparinizado. Una parte de la trombina en el medio se neutraliza por la ATIII presente en el plasma en estudio y la cantidad residual de trombina se determina por medio de su actividad amidolítica sobre un sustrato cromogénico específico. La concentración de ATIII se determina a partir de una curva de calibración empleando estándares comerciales o diluciones de un plasma control en tampón heparinizado (71).

La Proteína C puede ser dosificada por el método cromogénico descrito por Bertina y col. en 1984 (72), que consiste en adsorber la PC con hidróxido de aluminio, luego activar esta proteína con trombina y medir la actividad de la PCa generada con un sustrato cromogénico. Brevemente, se mezclan 0,4 mL de plasma pobre en plaquetas con 40 µL de una suspensión acuosa de Al(OH)₃ a temperatura ambiente y se agita por 15 minutos; luego se centrifuga a 4°C por 15 minutos a 3000 g

y se descarta el sobrenadante. Al precipitado se le agrega 0,2 mL de tampón citrato trisódico (0,313 %; pH 7,4) y se agita durante 15 minutos, luego se agrega 40 µL de una solución de trombina (20 UI/mL en agua destilada) y se incuba por 1 h a 37 °C con agitación continua. Al cabo de este tiempo, la trombina se neutraliza con 100 µL de heparina a 25 UI/mL en NaCl 0,15 M y se incuba por 15 minutos más y luego se centrifuga a 3000 g por 5 minutos a 4°C. Finalmente, se toma 50 µL del sobrenadante y se le agrega 50 µL de sustrato cromogénico S-2366 (1 mg/mL en agua destilada), se mezcla e incuba por 20 minutos a 37°C, luego se detiene la reacción agregando 200 µL de ácido acético glacial y se determina la densidad óptica a 405 nm. Para determinar la actividad de la PC en la muestra del paciente, se emplea una curva de calibración que se realiza con un plasma control a diferentes diluciones. Las determinaciones deben realizarse por triplicado.

Métodos Coagulantes

La actividad coagulante para determinar la concentración de factores de la coagulación se realiza generalmente por el método en una etapa, el cual es rápido, sencillo y cuyos resultados muestran una buena correlación con la clínica y la respuesta a tratamientos.

En el caso de deficiencia en algún factor de la vía de intrínseca o la presencia de algún inhibidor de estos, se emplea el TTPa. Para la cuantificación se emplea un plasma deficiente del factor en estudio, el cual aporta la actividad coagulante de los demás factores. Por ejemplo, en el caso de pacientes donde se sospeche la presencia de una patología como la hemofilia, se emplea un plasma deficiente de FVIII, un plasma control a diferentes diluciones en tampón imidazol salino, pH 7,4, por ejemplo: 1/2, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/200, una mezcla de cefalina-caolín o “cefalina activada”, una solución de cloruro de calcio y el plasma en estudio. El procedimiento es el siguiente: se incuban 0,1 mL del plasma deficiente de FVIII con 0,1 mL de la dilución del plasma en estudio o de las diferentes diluciones del plasma control y

0,1 mL del reactivo de cefalina activada, se incuba por 3 min a 37°C. Posteriormente, se agregan 0,1 mL de CaCl₂ 25 mM, se mezcla suavemente y se determina el tiempo de formación del coágulo. Las determinaciones se realizan por duplicado y la concentración del factor en el plasma en estudio se calcula extrapolando su tiempo de coagulación a una curva estándar realizada con el tiempo de coagulación de las diferentes diluciones del plasma control (73,74).

La cuantificación de los inhibidores, por ejemplo del FVIII, se realiza mediante la prueba Bethesda, en la cual, se incuba el plasma en estudio con plasma control a una relación 1:1 y luego de 2 h a 37 °C se determina la actividad residual del FVIII en la mezcla. Paralelamente, se incuba un control consistente de plasma control diluido con tampón de coagulación para considerar el deterioro del FVIII durante el tiempo de incubación. La diferencia entre ambas muestras, tomando en cuenta el factor de dilución, se utiliza para calcular las unidades del inhibidor. El porcentaje de FVIII residual (FVIIIIR) se expresa en Unidad Bethesda (UB), que se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%FVIIIIR = \frac{FVIII_{Mezcla\ plasma\ paciente-Plasma\ control}}{FVIII_{Plasma\ control\ incubado\ con\ tampón}} \times 100$$

El plasma del paciente que presenta una actividad residual del FVIII de 50% equivale a una UB de inhibidor (75).

En el caso de deficiencia en algún factor de la vía de extrínseca, se emplea el TP en una etapa, el cual utiliza tromboplastina como fuente de factor tisular. Para la cuantificación se emplea un plasma deficiente del factor en estudio, el cual aporta la actividad coagulante de los demás factores, por ejemplo; para la determinación de protrombina, se emplea plasma deficiente en este factor, diluciones del plasma control y del plasma en estudio con tampón imidazol salino, pH 7,4; tromboplastina y solución de cloruro de calcio. El procedimiento que se emplea es el siguiente: se incuban 0,1 mL del plasma deficiente de protrombina, 0,1 mL de la dilución del plasma en estudio o del plasma control y 0,1 mL de tromboplastina, se incuba por 1 min a

37°C. Posteriormente, se añaden 0,1 mL de CaCl₂ 25 mM, se mezcla suavemente y se determina el tiempo de formación del coágulo. Los ensayos se realizan por duplicado y la concentración del factor en la muestra problema se calcula extrapolando el tiempo de coagulación del plasma en estudio en una curva estándar realizada con el plasma control (76,77).

Determinación de fibrinógeno

El nivel de fibrinógeno circulante en plasma se puede determinar por varios métodos, entre estos: el método gravimétrico, el método coagulante de Clauss y el método derivado del Tiempo de Protrombina empleado ampliamente en equipos automatizados, así como por métodos turbidimétricos e inmunológicos (78).

El método gravimétrico descrito por Ingram (79), se basa en la conversión de fibrinógeno en fibrina mediante una solución de trombina/calcio. Una vez que el coágulo se ha formado se seca, se pesa y se deduce la concentración de fibrinógeno según el peso del coágulo y el volumen del plasma utilizado. El procedimiento empleado es el siguiente: se mezclan 0,5 mL de plasma y 0,5 mL de una solución de trombina/calcio (2,5 UI de trombina/mL CaCl₂ 25 mM), luego, se coloca dentro un aplicador de madera o vidrio y se incuba en baño de María a 37 °C, por 30 min. El coágulo formado se enrolla sobre el aplicador y se incuba por 15 min adicionales a 37 °C; luego se lava con agua destilada durante 30 min, se desprende del aplicador y se coloca en acetona por 10 min. Posteriormente, el coágulo se coloca en una estufa a 37°C durante 24 h y finalmente, se pesa en una balanza de precisión analítica. La concentración de fibrinógeno se determina aplicando la fórmula:

$$\text{Concentración de Fibrinógeno(mg/L)} = \frac{\text{Peso del coágulo(mg)}}{0,5} \times 1000$$

El método coagulante de Clauss (80) se fundamenta en la coagulación del plasma en estudio, con un exceso de trombina, lo que asegura que la concentración de fibrinógeno es el único factor limitante del tiempo de coagulación observado.

Es un método donde el tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración del fibrinógeno funcional en el plasma en estudio. En caso de muestras con elevadas concentraciones de fibrinógeno, los tiempos de coagulación son muy cortos, por lo que deben hacerse diluciones de la muestra problema. La determinación de fibrinógeno se realiza por medio de curvas de calibración con un fibrinógeno de referencia y los valores se reportan en mg/dL.

Los métodos turbidimétricos miden la cantidad de fibrinógeno que precipita por acción de sales como sulfato de amonio y su concentración se determina a una longitud de onda determinada, tras comparar con el grado de turbidez producida por un patrón de fibrinógeno de concentración conocida tratado en iguales condiciones que el plasma. Por otra parte, en los métodos inmunológicos se detectan determinantes antigénicos en presencia de anticuerpos antifibrinógeno mediante inmunoelectroforesis o ELISA (78).

Actualmente, una de las metodologías disponibles y frecuentemente empleada es el método derivado del tiempo de protrombina, este no mide directamente la concentración de fibrinógeno, la calcula a través de una curva de coagulación a partir del TP en coagulómetros fotoópticos. No obstante, diferentes estudios han demostrado que sus resultados varían ampliamente según los analizadores y reactivos, por lo que se observan discrepancias con otros ensayos empleados para determinar la concentración de fibrinógeno (78, 81,82).

Determinación de factor XIII

El polímero de fibrina formado por acción de la trombina sobre el fibrinógeno, es entrecruzado por acción del factor XIIIa o transglutaminasa plasmática. El Factor XIIIa introduce enlaces covalentes entre los grupos e-amina y g-glutamina de determinados aminoácidos en las cadenas α y γ de los monómeros de fibrina. La prueba clásica que permite medir la actividad funcional del FXIIIa se fundamenta en la solubilidad de

coágulos de fibrina en soluciones de ácidos mono o tricloroacético al 1% o en solución de urea 5 M. Sin embargo, esta prueba resulta anormal solo con niveles inferiores al 2 ó 3% de la proteína, donde aparecen manifestaciones clínicas hemorrágicas. Esta prueba se realiza induciendo la coagulación del plasma en estudio, con una solución de cloruro de calcio al 25 mM. El coágulo formado se deja estabilizar por 30 min a 37°C y luego se coloca en una solución de urea 5 M o ácido mono o tricloroacético al 1%. Se observa durante 24 h para evaluar si hay disolución. La prueba se considera normal cuando el coágulo no se disuelve en este tiempo (83).

Existen otros métodos cuantitativos para determinar la actividad funcional del FXIII, que se fundamentan en la incorporación de aminos fluorescentes a sustratos como la caseína, así como métodos basados en la liberación del amonio producido en la reacción de transglutaminación inducida por el FXIIIa. Es importante resaltar que cada laboratorio debe tener los valores de referencia normales para cada grupo poblacional, según el método de estudio empleado (84).

Ensayos de generación de trombina:

Estos ensayos miden la capacidad del plasma de generar trombina luego de que el proceso de coagulación sea activado por el FT o algún otro activador. Dado que la trombina es el mayor efector del proceso de coagulación, los ensayos de generación de trombina muestran mayor potencial para evaluar la tendencia de un individuo a desarrollar eventos trombóticos o hemorrágicos.

Los principales ensayos de generación de trombina descritos hasta el momento son los siguientes:

a) Trombografía calibrada automática: En un inicio, la generación de trombina inducida por FT era determinada en muestras de PPP, usando un sustrato cromogénico (85). Este ensayo requería la remoción del fibrinógeno del plasma, lo que lo hacía un sistema muy distinto al proceso fisiológico de la coagulación. La sustitución del

sustrato cromogénico por un sustrato fluorescente, cuya señal no es afectada por la turbidez del plasma, permitió la determinación continua de generación de trombina en plasma rico en plaquetas (PRP). En este ensayo, la concentración de trombina puede ser calculada a partir de curvas de calibración. Sin embargo, este método tiene la desventaja que la señal fluorescente generada por escisión del sustrato no es lineal a la concentración del producto, debido al llamado “efecto de filtro interno” del sustrato fluorescente. Para compensar esto, se desarrolló el trombograma automatizado calibrado (CAT por *Calibrated Automated Thrombography*) que compara continuamente la señal de muestras experimentales a una actividad de trombina conocida (86). Las curvas de generación de trombina pueden ser descritas en términos de tiempo de latencia, tiempo para llegar al pico, altura del pico y área bajo la curva; este último parámetro define el Potencial endógeno de trombina (ETP por *endogenous thrombin potential*). En contraste con el TP, TTPa, TT, que solo evalúan la fase inicial de la coagulación (pues solo son necesarias trazas de trombina para inducir la coagulación de un plasma), estos ensayos de generación de trombina evalúan también las fases de amplificación y propagación, así como la inhibición de la trombina por las diferentes vías anticoagulantes. Recientemente, este método fue adaptado para medir generación de trombina en muestras de sangre total (87).

b) THROGA (por **THRO**mbin **Generation Assay**): Es un método que se basa en inducir la coagulación por activadores de la vía extrínseca e intrínseca en una muestra de sangre o plasma citratado que contiene una cantidad definida de hirudina. Dado que la trombina formada se unirá a la hirudina formando un complejo con estequiometría de 1:1, es posible calcular las unidades de trombina generadas en función de las unidades de hirudina consumidas en la muestra activada, es decir, al determinar la diferencia de hirudina libre remanente en la muestra estudiada, en comparación con una muestra control preparada en las mismas condiciones pero donde no se indujo el proceso de coagulación (88). Para esto, se debe

emplear un método que permita la determinación precisa de hirudina en muestras de sangre y plasma, como el ECT, descrito anteriormente (64).

En conclusión, es importante resaltar la importancia actual de ambos modelos; la cascada de la coagulación que facilita la interpretación *in vitro* de las pruebas de laboratorio más utilizadas para orientar y fundamentar el diagnóstico clínico, así como, el modelo celular que explica el proceso fisiológico *in vivo*, donde interactúan además de los factores solubles, diversas células y mecanismos reguladores altamente eficientes, que garantizan que la coagulación sea un proceso localizado y bien controlado. Finalmente, el uso de las diferentes pruebas de coagulación y de métodos más sofisticados y completos como los cromogénicos y los ensayos de generación de trombina, permiten establecer deficiencias de factores de la coagulación específicos, así como la existencia de alguna anomalía en el sistema de la coagulación que incrementa la tendencia a sufrir eventos trombóticos o hemorrágicos. El oportuno análisis del sistema de la coagulación de un individuo permitirá tomar medidas preventivas o correctivas, según cada caso particular.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su gratitud al Lic. Jesús Valero por su colaboración en la preparación de las figuras de este trabajo.

REFERENCIAS

1. **Furie B, Furie BC.** Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008; 359:938-949.
2. **Galiani D, Renne T.** The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease?. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1106-1112
3. **Páramo JA, Panizo E, Pegenaute C, Lecumberri R.** Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Rev Med Univ Navarra* 2009; 53:19-23.
4. **Schmaier AH, Miller JL.** Coagulation and fibrinolysis. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 22nd ed. Philadelphia: Saunders; 2011.
5. **Turgeon ML.** *Clinical Hematology Theory and Procedures*. 2005. Volume 936.
6. **Nemerson Y, Furie B, Jackson CM.** Zymogens and cofactors of blood coagulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1980;9:45-85.
7. **Vogler EA, Siedlecki CA.** Contact activation of blood plasma coagulation: *Biomaterials* 2009; 30:1857-1869.
8. **Girolami A, Candeo N, De Marinis GB, Bonamigo E, Girolami B.** Comparative incidence of thrombosis in reported cases of deficiencies of factors of the contact phase of blood coagulation. *J Thromb Thrombolysis* 2011;31:57-63.
9. **Furie B, Furie BC.** Molecular basis of vitamin K-dependent γ -carboxylation. *Blood* 1990; 75:1753-1762.
10. **Ferland G.** The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr Rev* 1998; 56:223-230.
11. **Olson ST, Bjork I.** Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Sem Thromb Hemost* 1994;20:373-409.
12. **Liu L, Dewar L, Song Y, Kulczycky M, Blajchman MA, Fenton JW 2nd, Andrew M, Delorme M, Ginsberg J, Preissner KT, Oforu FA.** Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II *in vivo*. *Thromb Haemost* 1995;73: 405-412.
13. **Davis AE.** Biological effects of C1 inhibitor. *Drug News Perspect* 2004; 17:439-446.
14. **Han X, Fiehler R, Broze GJ.** Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000; 96:3049-3055.
15. **Lwaleed BA, Bass PS.** Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol* 2005; 208:327-339.
16. **Macfarlane RG.** An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature* 1964; 202:498-499.
17. **Davie EW, Ratnoff OD.** Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145:1310-1312.
18. **Hoffman M, Monroe DM.** A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85:958-965.

19. **Hoffman M, Monroe DM.** Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep* 2005; 4:391-396.
20. **Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV.** Cellular localization and trafficking of tissue factor. *Blood* 2006; 107:4746-4753.
21. **Lopez M, Bruges G, Crespo G, Salazar V, Deglesne PA, Schneider H, Cabrera-Fuentes H, Schmitz ML, Preissner KT.** Thrombin selectively induces transcription of genes involved in inflammation and wound healing in human monocytes. *Thromb Haemost* 2014; 112. Epub ahead of print <http://dx.doi.org/10.1160/TH14-01-0034>
22. **Lopes-Bezerra LM, Filler SG.** Endothelial cells, tissue factor and infectious diseases. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:987-991.
23. **Mackman N, Tilley RE, Key NS.** Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1687-1693.
24. **Coughlin SR.** Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 1999; 82:353-356.
25. **Mann KG, Butenas S, Brummel K.** The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;12:17-25.
26. **Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA.** The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2007; 5:95-101.
27. **Mann KG.** Thrombin formation. *Chest* 2003;124:4S-10S.
28. **Hoffman M, Monroe DM.** Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21:1-11.
29. **Mosesson MW.** Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1894-1904.
30. **Siller-Matula J, Schwameis M, Blann A, Mannhalter C, Jilma B.** Thrombin as a multifunctional enzyme. *Thromb Haemost* 2011; 106:1020-1033.
31. **Lundblad RL, White GC, 2nd.** The interaction of thrombin with blood platelets. *Platelets* 2005; 16:373-385.
32. **Bode W.** The structure of thrombin: a janus-headed proteinase. *Semin Thromb Haemost* 2006; 32:16-31.
33. **Walker FJ, Sexton PW, Esmon CT.** The inhibition of blood coagulation by activated protein C through the selective inactivation of activated factor V. *Biochim Biophys Acta* 1979; 571: 333-342.
34. **Esmon CT, Owen WG.** Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalysed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2249-2252.
35. **George JN, Torres MM.** Thrombin decreases von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. *Blood* 1988; 71:1253-1259.
36. **Levin EG, Marzec U, Anderson J, Harker LA.** Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1984; 74: 1988-1995.
37. **Valnickova Z, Christensen T, Skottrup P, Thøgersen IB, Højrup P, Enghild JJ.** Post-translational modifications of human thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): evidence for a large shift in the isoelectric point and reduced solubility upon activation. *Biochemistry* 2006; 45:1525-1535.
38. **Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH.** New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 2013; 93: 327-358.
39. **Rosenberg RD, Rosenberg JS.** Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 1984; 74:1-6.
40. **Olson, S.T.** Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. *J Biol Chem* 1999; 266: 6342-6352.
41. **Li W, Johnson DJ, Esmon CT, Huntington JA.** Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 857-862.
42. **Esmon CT.** The protein C pathway. *Chest* 2003; 124: 26S-32S.
43. **Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT.** Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001; 97: 1685-1688.
44. **Dahlbaek B.** Factor V and protein S as cofactors to activated protein C. *Haematologica* 1997; 82: 91-95.
45. **Koeleman BP, van Rump D, Hamulyák K, Reitsma PH, Bertina RM.** Factor V Leiden:

- an additional risk factor for thrombosis in protein S deficient families? *Thromb Haemost* 1995;74:580-583.
46. **Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO.** Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* 2012; 95: 333–345.
 47. **Lesnik P, Vonica A, Guerin M, Moreau M, Chapman MJ.** Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a). *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1066–1075.
 48. **Crawley JTB, Lane DA.** The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 233-242.
 49. **Broze Jr.G.** Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med* 1995; 46: 103–112.
 50. **Breitenstein A, Camici GG, Tanner FC.** Tissue factor: beyond coagulation in the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* 2009; 118: 159–172.
 51. **Tripodi A.** The history of phenotypic testing in thrombosis and hemostasis. *Sem Thromb Haemost* 2008; 34: 585–592.
 52. **Tripodi A, Chantarangkul V, Mannucci PM.** Acquired coagulation disorders: revisited using global coagulation/anticoagulation testing. *Br J Haematol* 2009; 147: 77-82.
 53. **Dahlbäck B.** Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest* 1994; 94: 923-927.
 54. **Martínez-Murillo C, Quintana-González S, Ambriz-Fernández R, Hernández PM.** El problema trombótico. *Hematología* 2000; 1: 17-20.
 55. **Austen D, Rhymes I.** A laboratory manual of blood coagulation. Osney Mead, Oxford, London: Blackwell Scientific Publications. 1975.
 56. **Kitchen S, AnMcCraw A, Echenagucia M.** Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación. *Manual de Laboratorio. Federación Mundial de Hemofilia, 2da edición. Canada* 2010.
 57. **McCraw A, Hillarp A, Echenagucia M.** Considerations in the laboratory assessment of haemostasis. *Haemophilia* 2010; 16: 74-78.
 58. **Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM.** Effect of anti-hemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for haemophilia and a simple one stage anti-hemophilic factor assay procedure. *J Lab Clin Med* 1953; 41: 637–47.
 59. **Proctor RR, Rapaport SI.** The partial thromboplastin time with faolin : simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiency . *Am J Clin Pathol* 1961; 36: 212-219.
 60. **Arocha Piñango CL, De Bosch NB, Curiel D, Goldstein C.** Tiempo de Protrombina en una Etapa (Modificado de Quick, 1935). En: *Manual de Hemostasia y Trombosis, Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLATH). Pruebas Globales de Orientación en Coagulación, 2da edición. Argentina. 1990; 151-154.*
 61. **QuickAJ.** The prothrombin time in haemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem* 1935; 109: 73-74.
 62. **Cunningham MT, Brandt JT, Laposata M, Olson JD.** Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 499–505.
 63. **Stocker K, Fischer H, Brogli M.** Chromogenic assay for the prothrombin activator ecarin from the venom of the saw-scaled viper (*Echis carinatus*). *Toxicon* 1986; 24: 81–89.
 64. **Nowak G, Bucha E.** A new method for the therapeutical monitoring of hirudin. *Thromb Haemost* 1993;69:1306.
 65. **López M, Nowak G.** Special pharmacokinetics of dipetarudin suggests a potential antitumor activity of this thrombin inhibitor. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 145-149.
 66. **Van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wiene W, Feuring M, Clemens A.** Dabigatran etexilate – a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 2010; 103: 1116–1127.
 67. **Hafner G, Roser M, Nauck M.** Methods for the monitoring of direct thrombin inhibitors. *Sem Thromb Hemost* 2002; 28: 425-430.
 68. **Lopez M, Nowak G.** Influence of renal and hepatic failure on the pharmacokinetics of

- argatroban. An experimental study in rats. *Sem Thromb Hemost* 2008; 34: 103-107.
69. **Rosen S.** Chromogenic methods in coagulation diagnostics. *Hämostaseologie* 2005; 25: 259-266.
70. **Kahlé LH, Schipper HG, Jenkins CS, ten Cate JW.** Antithrombin III. I. Evaluation of an automated antithrombin III method. *Thromb Res* 1978; 12: 1003-1014.
71. **Sassetti B, Kordich L.** Determinación de Antitrombina III. En: Manual de Hemostasia y Trombosis, Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLATH). Pruebas Globales de Orientación en Coagulación, 2da edición. Argentina. 1990; 314-316.
72. **Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-van Es 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.
73. **Giddings F.** En: Thomson J. Hereditary coagulation disorders. *Blood Coagulation and Haemostasis*. 2nd edition 1980:117-157.
74. **Blanco AN, Martínez CA, Copani R.** Determinación del factor VIII C: método en una etapa. En: Manual de Hemostasia y Trombosis, Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLATH). Pruebas Globales de Orientación en Coagulación, 2da edición. Argentina. 1990; 213-216.
75. **Kasper CK, Aledort LM, Counts RB, Edson JR, Fratantoni J, Green D, Hampton JW, Hilgartner MW, Lazerson J, Levine PH, McMillan CW, Pool JG, Shapiro SS, Shulman NR, van Eys J.** A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Hemost* 1975; 34:869-872.
76. **Sánchez Avalos JC, Kordich LC, Blanco AN.** Determinación de Factores de la Vía Extrínseca. En: Manual de Hemostasia y Trombosis, Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLATH). Pruebas Globales de Orientación en Coagulación, 2da edición. Argentina. 1990; 249-251.
77. **Blanco AN, Kordich LC, Martínez Canavari A.** Determinación del Factor II. En: Manual de Hemostasia y Trombosis, Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLATH). Pruebas Globales de Orientación en Coagulación, 2da edición. Argentina. 1990; 255-257.
78. **Echenagucia ME, Higuera D, Ruiz M, Bustamante Y.** Comparación de los valores de fibrinógeno obtenidos por el método derivado del tiempo de protrombina (dPT) con el método de referencia gravimétrico. *Academia Biomedica Digital*, Vol. 0, No. 40. 2009, 18-26.
79. **Ingram GI.** The determination of plasma fibrinogen by the clot weight method. *Biochem J* 1952; 51:583-585.
80. **Clauss A.** Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. *Acta Haematol* 1957;17:237-246.
81. **Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM.** Inaccuracy of the 'derived' fibrinogen measurement. *Blood Coagul Fibrinol* 1994; 5: 955-957.
82. **Llamas P, Santos ABm Outeriño J, Soto C, Tomás JF.** Diagnostic utility of comparing fibrinogen Clauss and prothrombin time derived method. *Thromb Res* 2004; 114:73-74.
83. **Blanco AN, Martínez Canavari A.** Determinación de Factor XIII (Factor Estabilizador de la fibrina). En: Manual de Hemostasia y Trombosis, Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis (Grupo CLATH). Pruebas Globales de Orientación en Coagulación, 2da edición. Argentina. 1990; 302-303.
84. **Vívenes M, Castro de Guerra D, Rodríguez-Larralde A, Arocha-Piñango CL, Guerrero B.** Activity and levels of factor XIII in a Venezuelan admixed population: association with rs5985 (Val35Leu) and STR F13A01 polymorphisms. *Thromb Res* 2012;130:729-734.
85. **Hemker HC, Willems GM, Beguin S.** A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost* 1986; 56: 9-17.

-
- 86. Hemker HC, Al Dieri R, Béguin S.** Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol* 2004; 11:170–175.
- 87. Ninivaggi M, Apitz-Castro R, Dargaud Y, de Laat B, Hemker HC, Lindhout T.** Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin Chem* 2012; 58:1252–1259.
- 88. Nowak G, Lange U, Wiesenburg A, Bucha E.** Measurement of maximum thrombin generation capacity in blood and plasma using the thrombin generation assay (THROGA). *Sem Thromb Haemost* 2007; 33:508-514.