

56
20j



Universidad Nacional Autónoma de México

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“ALTERACIONES DEL SISTEMA FIBRINOLITICO
Y PRUEBAS DE LABORATORIO PARA SU
EVALUACION ACTUALIZACION
MONOGRAFICA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A**

JOSE REFUGIO VILLEGAS SANCHEZ

Directora de la Tesis: QFB. IDALIA AVILA MIYAZAWA

Cuautitlán, Izcalli Estado de México 1987.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

hoja

Abreviaturas	
Introducción	1
Objetivos	3
I. GENERALIDADES	
I.A. El mecanismo de la coagulación	4
I.B. Mecanismos de control de la coagulación	6
I.C. Trombosis	16
I.D. Hemostasia y Trombosis	17
II. ENFERMEDADES ASOCIADAS A TROMBOSIS	
Introducción	18
II.A. Deficiencia de AT III	18
II.B. Enfermedad renal	21
II.C. Enfermedad hepática	21
II.D. Desordenes vasculares	22
II.E. Hiperlipidemia	23
III. PRUEBAS DE LABORATORIO	
Introducción	29
III.A. Fundamento de las pruebas	30
III.A.1. Fibrinógeno	30
III.A.2. Plasminógeno	30
III.A.3. Plasmina	32
III.A.4. Activador del plasminógeno	32
III.A.5. Antiplasmina-alfa ₂	34
III.A.6. Antiactivador	35

III.B.	Materiales	
III.B.1.	Fibrinógeno	36
III.B.2.	Plasminógeno	38
III.B.3.	Plasmina	39
III.B.4.	Activador del plasminógeno	40
III.B.5.	Antiplasmina-alfa ₂	41
III.B.6.	Antiactivador	42
III.C.	Método	42
III.C.1.	Fibrinógeno	42
III.C.2.	Plasminógeno	44
III.C.3.	Plasmina	45
III.C.4.	Activador del plasminógeno	45
III.C.5.	Antiplasmina-alfa ₂	47
III.C.6.	Antiactivador	48
	IV. DISCUSION	49
	V. CONCLUSIONES	55
	BIBLIOGRAFIA	56

ABREVIATURAS

A	absorbancia
AP-alfa ₂	antiplasmina-alfa ₂
AT-III	antitrombina III
cm	centímetro
dl	decilitro=100 ml
DVT	trombosis venosa profunda
ECLT	tiempo de lisis del coágulo de euglobulina.
EDTA	ácido etilen diamino tetra-acético.
FDP	productos de degradación de la fibrina.
FL	fosfolípido
°C	grado centígrado
g	gramo
g	gravedad
HCL	clorhidrato
H-D-Val-Leu-Lis-pNA	H-D-Valil-Leucil-Lisil-paranitroanilida.
IU	unidades internacionales para urocinasa y estreptocinasa.
KIU	unidades de inactivador de la calicreína.
lt	litro
log	logarítmica
M-alfa ₂	macroglobulina-alfa ₂
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
mM	milimolar=milimoles/litro
min	minuto

M	molar=moles/litro
nm	nanómetro
PA	activador del plasminógeno
piro-Glu-Gli-Arg-pNA	piro-Glutamil-Glicil-Arginil- paranitroanilida.
pNA	paranitroanilida
%	porciento
PU	unidades Plough
rpm	revoluciones por minuto
SK	estreptocinasa
t-PA	activador de tipo tisular del plasminógeno.
Tris (base)	Tris (hidroximetil) aminomet <u>a</u> no.
U	Unidades
ug	microgramo
UK	urocinasa
ul	microlitro
Xa	factor X activado
XIa	factor XI activado
XIIa	factor XII activado
XIIIa	factor XIII activado

INTRODUCCION

El mantenimiento de un estado normal y funcional de todos los tejidos depende de: la circulación normal de la sangre, un balance entre los fluidos intravasculares y extravasculares del cuerpo y la preservación de una concentración normal de los componentes de los fluidos corporales.

La hemostasia es el proceso mediante el cual se detiene el sangrado de un vaso sanguíneo. Por este proceso la sangre se mantiene fluida dentro de los vasos, previniendo además la pérdida excesiva de sangre en caso de lesión de los mismos. Para cumplir estas funciones el organismo requiere de la interacción íntima de tres componentes que son: vasos sanguíneos, células sanguíneas y plasma. La importancia relativa de cada componente hemostático varía en las distintas especies y en el hombre depende del vaso sanguíneo involucrado (1,2).

El sangrado de vasos pequeños dañados (arteriolas precapilares, capilares y vasos postcapilares) normalmente se detiene por la interacción espontánea de la pared vascular y las plaquetas y posteriormente por la formación de un coágulo.

Cuando un vaso sanguíneo ha sido dañado, la pared vascular se contrae y las plaquetas circulantes se adhieren a las fibras de colágena expuestas. Entonces las plaquetas liberan varias sustancias, incluyendo difosfato de adenosina (ADP), el cual promueve la adhesión y agregación de plaquetas adicionales y la producción de factor 3 plaquetario, que es esencial para el funcionamiento del sistema intrínseco de la coagulación del plasma; sigue una agregación irreversible secundaria, ayudada por la trombina, con una liberación adicional de factores plaquetarios. Por último el tapón de plaquetas es reforzado por el coágulo de fibrina; la trombostenina, otro producto de

la agregación plaquetaria, causa la retracción del coágulo de fibrina (3).

La formación de fibrina juega un papel importante no sólo en la hemostasia, sino también en: la respuesta inflamatoria, mecanismos de defensa contra infección bacteriana y la curación de heridas. Pero, por este mecanismo que siempre está listo para entrar en acción, el organismo corre el riesgo de la acumulación de microdepósitos de fibrina, los cuales constituyen un peligro potencial: la trombosis.

En contraparte a este peligro potencial, está el sistema fibrinolítico, el cual destruye los depósitos de fibrina. A este respecto la formación de fibrina puede ser considerado un mecanismo fundamental de reparación del tejido lesionado y la fibrinólisis su antítesis fisiológica. Por lo tanto existe un balance entre la coagulación y la fibrinólisis en la hemostasia, y cualquier exceso o deficiencia en los componentes de alguno de estos sistemas podría traer como consecuencia la aparición del evento trombótico y/o hemorrágico (4).

O B J E T I V O S

1. Mencionar las alteraciones del sistema fibrinolítico relacionadas a la trombosis.
2. Describir las pruebas de laboratorio comunmente disponibles para detectar estas alteraciones, así como las ventajas y limitaciones de dichas pruebas.

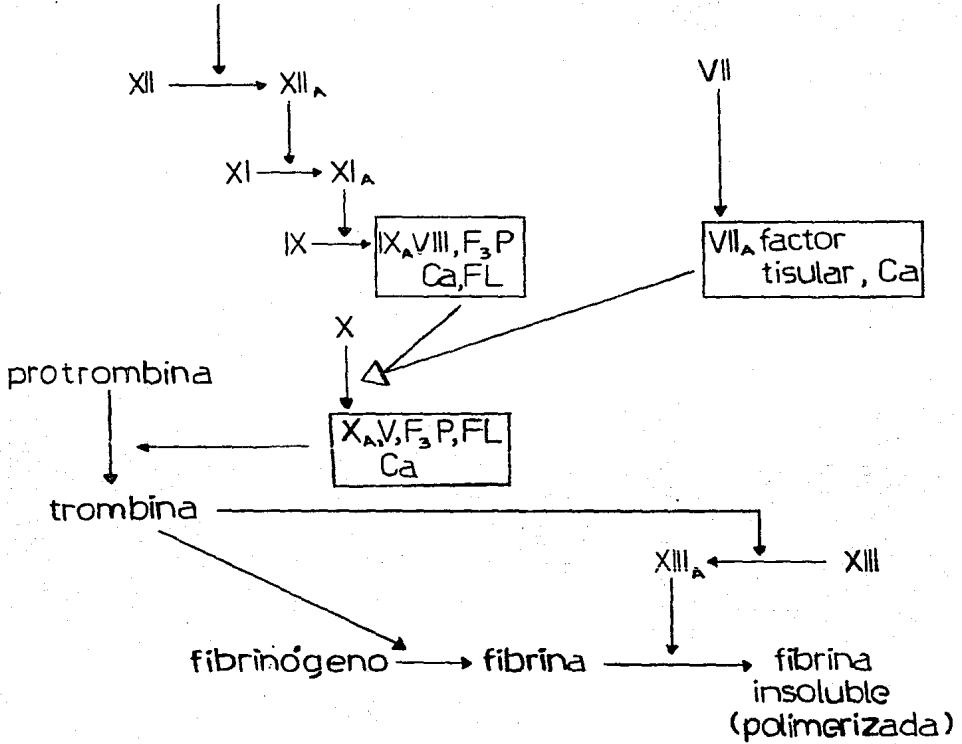
I. GENERALIDADES

I.A. EL MECANISMO DE LA COAGULACION

La coagulación involucra una serie de conversiones enzimáticas de precursores inactivos de proteasas a proteasas activas. Cuando el factor X es activado por cualquiera de las dos vías: la extrínseca, activada por los tejidos (4,5) o la intrínseca, por contacto de superficie, este factor junto con el factor V activado (6); el calcio y el factor 3 plaquetario, convierten la protrombina a trombina (7,8); entonces la trombina convierte el fibrinógeno a monómeros de fibrina y también autocataliza la reacción intrínseca induciendo la activación de los factores VIII y V; enseguida de la formación de los monómeros de fibrina, el factor XIII activado une esos monómeros solubles para formar un polímero insoluble; ésta es la estabilización de la fibrina (9,10).

EL MECANISMO DE LA COAGULACION

CONTACTO DE SUPERFICIE



I.B. MECANISMO DE CONTROL DE LA COAGULACION

Como otros procesos fisiológicos, la coagulación de la sangre está controlada por varios mecanismos inhibitorios diseñados para limitar la extensión de las conversiones enzimáticas y la posible diseminación del proceso, restringiendo la coagulación a un sitio específico.

a) El primer mecanismo lo constituye el endotelio vascular intacto, que es la única superficie no trombogénica verdadera (11), ya que las plaquetas no pueden adherirse a éste para iniciar la secuencia hemostática. Una superficie no trombogénica, además de ser compatible con las plaquetas, debe ser compatible con el sistema de coagulación del plasma (12). La compatibilidad de una superficie no trombogénica con el sistema de coagulación del plasma ha sido explicada por el hecho de que la ruta extrínseca (activada por los tejidos y aquí se habla del endotelio vascular, que es un tejido) de la coagulación no se dispara por medio de los factores XII y XI; otro aspecto de la no trombogénicidad puede ser la capacidad de la superficie de tomar parte en la inhibición de enzimas activadas de la coagulación (11).

b) El segundo mecanismo lo constituyen los inhibidores fisiológicos, que actúan sobre sustancias coagulantes y de los cuales la AT III es el inhibidor principal.

Los inhibidores de la coagulación son los siguientes:

1) ACTIVACION NO PROTEOLITICA DE LOS FACTORES XII y VII

Aunque la coagulación sanguínea es el resultado de una secuencia proteolítica, es importante hacer notar que la etapa de iniciación en ambas vías (intrínseca y extrínseca) sobre la lesión, es la "activación no proteolítica" del factor XII

y el factor VII por la colágena y el factor tisular respectivamente, donde éstos dos últimos parecen ser totalmente inertes hacia otras proteínas coagulantes y de este modo pueden estar distribuidos ampliamente sin riesgo de activación no específica de otras proteínas (13).

ii) EL FACTOR Xa COMO INHIBIDOR

Una vez activada la vía extrínseca, el producto de la reacción, el factor Xa, primero activa al factor VII y subsecuentemente destruye su actividad, limitando con eso su propia formación (13).

iii) LA TROMBINA COMO INHIBIDOR

La enzima trombina, además de su capacidad de convertir el fibrinógeno a fibrina y activar al factor XIII, tiene la capacidad de aumentar temporalmente la actividad de los factores V y VIII, seguida de la destrucción inmediata de dicha actividad (13).

iv) REQUERIMIENTOS ESTEQUIOMETRICOS

La formación de los diferentes complejos depende de una estequiometría precisa, que requiere de una concentración óptima de cada componente para una función adecuada. La reducción en la concentración de alguno de los componentes dá como resultado una activación inadecuada, así como un exceso, ocasionaría una sobreactivación (14,15).

v) GENERACION DE PROTEINA C ACTIVADA

La trombina activa a la proteína C (un factor dependiente de la vitamina K descubierto recientemente) la cual inactiva

los factores V y VIII (16,17,18,19,20,21,22,23) y estimula la liberación de activador del plasminógeno por la célula endotelial (24), limitando de esta manera la coagulación y promoviendo la fibrinólisis (25).

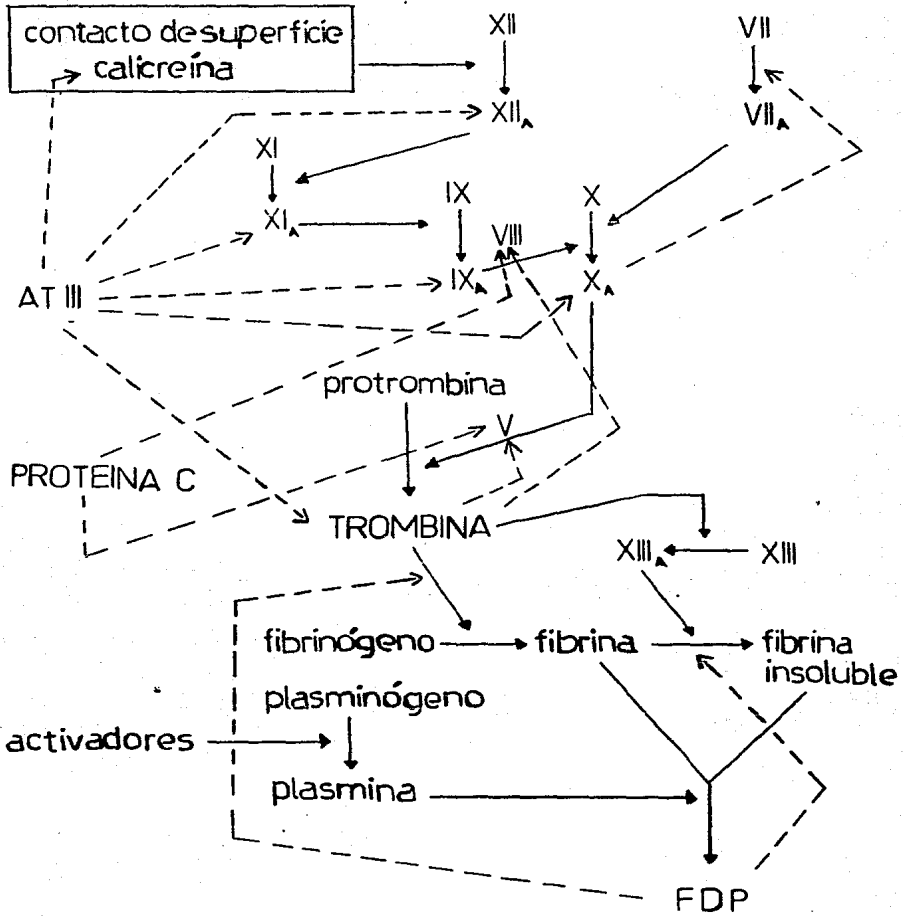
vi) LA ANTITROMBINA III

La antitrombina III (AT III) es el inhibidor principal de la coagulación sanguínea. Este inhibidor controla la actividad de las proteasas involucradas en la secuencia intrínseca de la coagulación (26) inactivándolas al formar con ellas un complejo irreversible bloqueando de esta manera el sitio activo de las mismas.

La AT III inactiva a la trombina y al factor Xa (27,28), a los factores IXa, XIa, XIIa (29) y a la calicreína (2).

vii) PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA FIBRINA

Los productos de la fibrinólisis funcionan como inhibidores, al interferir en: 1) la conversión del fibrinógeno a fibrina (por bloqueo de la reacción trombina-fibrinógeno), 2) la polimerización de la fibrina, 3) la función plaquetaria (30).



-----> mecanismos inhibitorios.

viii) EL SISTEMA FIBRINOLITICO

La formación de fibrina está asociada con la activación del sistema fibrinolítico, que previene la formación indefinida de algún coágulo (3,31).

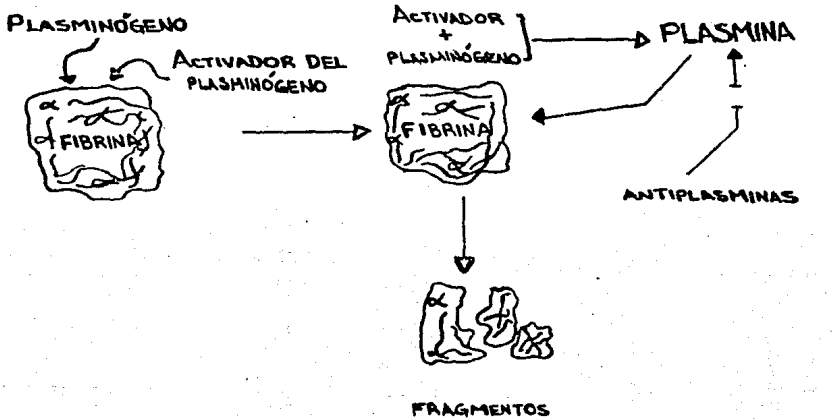
La fibrinólisis es una parte básica del mecanismo hemostático y está diseñada para controlar el depósito de fibrina en el sistema vascular y en los tejidos. Cuando la trombina actúa sobre el fibrinógeno, la fibrina se precipita y queda depositada como un polímero. Este depósito de polímero está regulado parcialmente por el sistema fibrinolítico, que actúa sobre la proteína insoluble y la rompe en fragmentos solubles (32). Este proceso de solubilización de la fibrina es el mecanismo fibrinolítico o sistema plasminógeno-plasmina.

El sistema plasminógeno-plasmina tiene cuatro componentes principales: plasminógeno, plasmina, activadores e inhibidores (33).

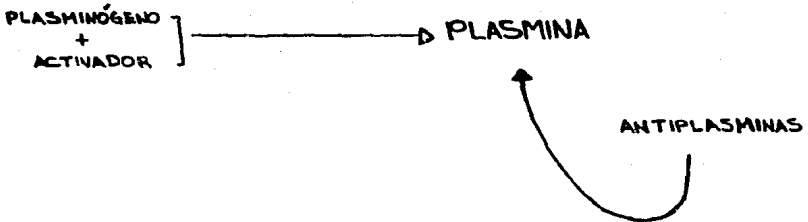
La enzima responsable de la lisis es la plasmina, la cual es derivada de su precursor inactivo el plasminógeno; la plasmina tiene especificidad para diferentes sustratos tales como el fibrinógeno, el factor VIII y el factor V (34), pero es preferentemente específica para la fibrina. La fibrina es esencial para el mecanismo de la fibrinólisis porque provee una superficie especial que permite que la conversión plasminógeno-plasmina, proceda con interferencia mínima de las antiplasminas. El plasminógeno y el activador del plasminógeno se unen selectivamente a la fibrina y reaccionan sobre la superficie de la fibrina para formar plasmina, la cual actúa directamente sobre la fibrina. Esta interacción ocupa los sitios activos de la plasmina y los deja imposibilitados para la interacción y neutralización por las antiplasminas. La participación especial de la plasmina por lo tanto protege a la plasmina de las anti-

plasminas. Si la plasmina se forma aparte de la superficie de la fibrina esta plasmina es expuesta inmediatamente a las antiplasminas y es inhibida.

Si se genera un exceso de plasmina esta pasará fuera del ambiente "protegido" de la fibrina y dentro de la circulación general, donde en circunstancias normales es inmediatamente contenida y neutralizada por las antiplasminas. De esta manera las antiplasminas ayudan a limitar la actividad fibrinolítica a la región donde se encuentra el tapón hemostático o el trombo (35,36,37).

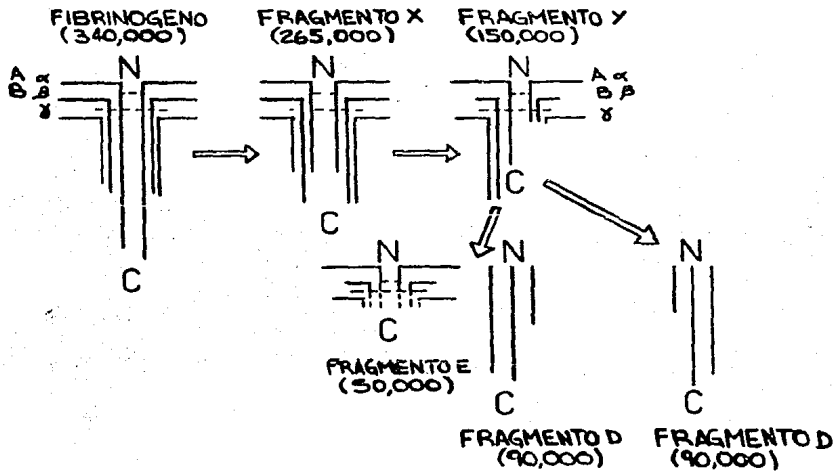


EN EL PLASMA



MECANISMO DE DISOLUCION DE LA FIBRINA

Cuando se ha formado el coágulo sanguíneo, el factor XIIIa une la antiplasmina-alfa₂ a la fibrina (38,39), la plasmina que se produce en el plasma es inactivada instantáneamente por la antiplasmina-alfa₂ y eliminada de la circulación como un complejo inactivo plasmina-antiplasmina-alfa₂; enseguida del contacto con la fibrina, el complejo inhibidor de la plasmina se disocia y la plasmina queda libre para digerir a la fibrina. La plasmina actúa sobre la fibrina insoluble y la degrada a fragmentos solubles llamados productos de degradación de la fibrina (FDP) (40,41).



Secuencia de la conversión del fibrinógeno a los fragmentos D y E por la plasmina. El peso molecular aproximado de cada fragmento está entre paréntesis.

ACTIVADORES FIBRINOLITICOS

El plasminógeno puede ser activado a plasmina mediante un proceso proteolítico semejante al de la formación de otras enzimas a partir de sus precursores inactivos por varios activadores diferentes; de los distintos activadores del plasminógeno los mejor conocidos son:

a) La urocinasa, una enzima proteolítica sintetizada por el riñón y encontrada en la orina normal; la urocinasa convierte directamente el plasminógeno a plasmina por proteólisis. Se ha obtenido una forma precursora de la urocinada semejante a la aislada de la orina y la cual es una mólécula de cadena sencilla; se encontró que la lisis por este precursor llamado activador del plasminógeno tipo urocinasa de cadena sencilla (scu-PA) o pro urocinada (pro-UK) es más efectiva y específica que con la UK y tiene la ventaja de que su activación se limita al sitio de un coágulo; esto puede explicarse por un mecanismo de activación que depende bajo condiciones fisiológicas, de la unión de la fibrina a la plasmina, y que la lisis del coágulo está acompañada por una pequeña activación de pro-UK a UK (42,43).

b) Activadores provenientes de diferentes tejidos (44,45)
Casi todos los tejidos producen activadores (46) pero el más importante de estos tejidos es el endotelio de los vasos sanguíneos, que es el productor principal del activador del plasminógeno, al cual se le llama activador del plasminógeno de tipo tisular t-PA (47,48).

c) Productos bacterianos

1) La estreptocinasa (producida por los estreptococos hemolíticos-beta), una enzima no proteolítica, primero forma un complejo con el sustrato (plasminóge-

no) o con la enzima misma (plasmina). Esto dá como resultado un activador que convierte el plasminóge no a plasmina.

- 2) La estafilocinasa (producida por los estafilococos) realiza la conversión por un mecanismo semejante al de la estreptocinasa.

REGULACION DE LA FIBRINOLISIS

La regulación de la fibrinólisis bajo condiciones fisiológicas parece que ocurre a cuatro niveles distintos: 1) a nivel de activación del plasminógeno (antiactivadores), 2) a nivel de plasmina activa (antiplasminas) (33,35), 3) la trombina y 4) el factor XIIIa.

1) ANTIATIVADORES

A pesar de las dificultades técnicas, existe buena evidencia de que el plasma humano contiene sustancias capaces de inhibir la activación del plasminógeno (33,35,49). Las células endoteliales humanas liberan dos formas de inhibidor específico del activador del plasminógeno: una forma activa que rápidamente se une a los activadores del plasminógeno y una forma inactiva o latente que no tiene actividad de antiactivador pero la cual puede ser activada por desnaturalización (50).

2) ANTIPLASMINAS

a) La mayor actividad de antiplasmina en el plasma se debe a la antiplasmina-alfa₂ de acción rápida, que ha sido identificada como el inhibidor principal de plasmina (15). Además de la inactivación inmediata de la plasmina, la antiplasmina-alfa₂ interfiere con la adsorción del plasminógeno a la fibrina, haciendo a ésta última menos susceptible a la lisis por plasmina, lo que representa una inhibición eficiente (36,38,51).

b) La macroglobulina-alfa₂ es la responsable de inhibir la actividad de la plasmina que excede la capacidad de inhibición de la antiplasmina-alfa₂ disponible y en presencia de concentraciones normales de estas dos antiproteasas, ningún otro inhibidor de proteasa del plasma tiene importancia en la inhibición de la plasmina.

3) LA TROMBINA

Otro papel de control de la actividad fibrinolítica lo ejerce la trombina al disminuir la actividad fibrinolítica en células endoteliales humanas. De este modo la trombina, además de su papel en la coagulación, puede proteger a los coágulos de la lisis prematura al aumentar la cantidad de un inhibidor fibrinolítico específico, que es el inhibidor del activador del plasminógeno (PA-I) (52,53).

4) EL FACTOR XIIIa

Se ha encontrado que el factor XIIIa, además de participar en la polimerización de la fibrina, tiene también efecto sobre la actividad fibrinolítica al unir la antiplasmina-alfa₂ a la fibrina contribuyendo a la resistencia de la fibrina a la fibrinólisis. Pero se ha mostrado que la reacción de unión es reversible y se sugiere la posibilidad de que la AP-alfa₂ podría ser liberada de la fibrina in vivo al romperse el equilibrio de la reacción de unión AP-alfa₂-fibrina y que la liberación daría como resultado una trombolisis acelerada (54).

I.C. TROMBOSIS

La trombosis es la obstrucción parcial o total de un vaso sanguíneo por la formación de un trombo.

Un trombo es una masa o depósito formado a partir de los constituyentes sanguíneos en un sitio particular sobre la pared interior de un vaso sanguíneo o del revestimiento del corazón. Los trombos pueden ocurrir en cualquier parte de la circulación: en las arterias, venas, capilares y cámaras del corazón (55).

I.D. HEMOSTASIA Y TROMBOSIS

Cuando la sangre ha sido removida del cuerpo forma rápidamente un coágulo a menos que se tomen medidas especiales para mantener su fluidez. Una masa de esta sangre coagulada se llama coágulo cuando se forma en un recipiente de laboratorio, por ejemplo un tubo de ensaye (56), la sangre también coagula en una serie de situaciones diferentes; los vasos sanguíneos dañados dejan escapar sangre dentro de sus espacios tisulares circundantes, pero en la mayoría de los individuos sanos este sangrado (o hemorragia) se detiene eventualmente por la formación de sangre coagulada en el sitio lesionado, a los coágulos que se forman bajo esas condiciones se les llama tapones hemostáticos.

Los coágulos sanguíneos se forman también en vasos sanguíneos que no han sido dañados notablemente; a los coágulos que se forman en esos sitios se les llama trombos. En contraste a los tapones hemostáticos, los cuales son necesarios para prevenir la pérdida de células sanguíneas y plasma, los trombos bloquean el flujo sanguíneo a las áreas abastecidas por el vaso trombosado y entonces deja de realizarse cualquier función útil (56).

II ENFERMEDADES ASOCIADAS A TROMBOSIS

INTRODUCCION

EVIDENCIA CLINICA DE LA ASOCIACION ENTRE LAS ANORMALIDADES SANGUINEAS Y LA TROMBOSIS

Las anormalidades asociadas a la trombosis caen dentro de dos categorías: a) anormalidades transitorias y b) anormalidades de larga duración (57).

a) Las anormalidades transitorias ocurren: 1) como una respuesta de fase aguda al trauma o inflamación ó 2) como un reflejo específico de la activación de la coagulación sanguínea o de la función plaquetaria.

b) Anormalidades de larga duración, que pueden ser de dos tipos: 1) hereditarias ó 2) en asociación con una enfermedad o desorden crónico; se ha reportado que estas anormalidades están asociadas con trombosis recurrente o idiopática (57).

De estas anormalidades, aunque están relacionadas con el proceso trombótico, sólo en algunas situaciones se ha establecido una relación causal clara, una de estas situaciones es la deficiencia de AT III.

II.A. DEFICIENCIA DE AT III.

La AT III juega un papel muy importante en el sistema de defensa fisiológico contra la trombosis, apoyado por muchos estudios clínicos que han indicado una asociación cercana de niveles bajos de AT III en el plasma, con estados hipercoagulables o alta incidencia de desordenes tromboembólicos (58).

Pueden darse varias situaciones de deficiencia de AT III y éstas son:

a) DEFICIENCIA HEREDITARIA

El primer caso de deficiencia congénita de AT III en el plasma fue descrito por Egeberg en 1965; desde entonces, ha ido aumentando el número de reportes acerca de familias afectadas por esta deficiencia.

La edad promedio de los sujetos examinados por Matsuo (29) osciló de los 16 a los 44 años con 5 meses y la distribución de sexo fue dominante para los varones (la proporción varón-mujer fue aproximadamente 2:1), encontrándose niveles disminuidos de AT III (27,58).

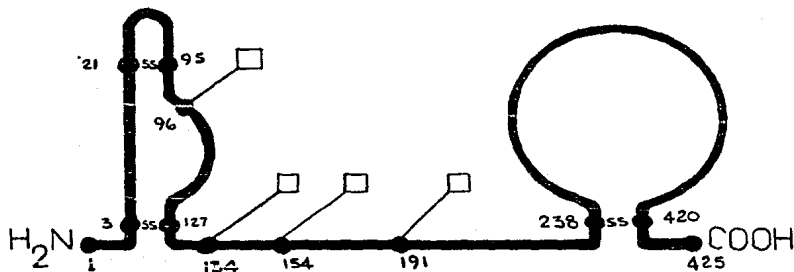
Sin embargo los resultados de los reportes analizados sugieren que la mitad de las personas en las familias con deficiencia congénita de AT III, la cual se presenta como un rasgo autosómico dominante (26,27), tuvieron deficiencia de este inhibidor y que cerca de la mitad de esas personas deficientes tuvieron episodios trombóticos, lo que significa que la deficiencia de AT III no siempre induce trombosis. Por lo tanto, hay factores adicionales que pueden estar presentes y que pueden inducir trombosis en personas deficientes de AT III (59).

AT III ANORMALES

La heterogeneidad de las deficiencias congénitas heredadas de AT III se ha puesto en evidencia al describirse el caso de diferentes familias trombofílicas con deficiencia funcional heredada de AT III, que tuvieron actividad baja de AT III pero concentración normal de este inhibidor en el plasma (60,61).

Un modelo de la molécula de AT III. (De Petersen y cols. 1979).

La secuencia primaria de la AT III ha sido reportada por Petersen y cols. La molécula es una glicoproteína de cadena sencilla compuesta de 425 aminoácidos y 4 residuos de carbohidrato; hay 3 puentes de disulfuro.



También se ha descrito el caso de un paciente con una AT III la cual tuvo un defecto en el sitio de unión serina y por lo tanto una capacidad deficiente en la unión e inhibición de la trombina y del factor Xa (62).

b) DEFICIENCIA ADQUIRIDA

Se han encontrado estados de deficiencia de AT III en otras situaciones clínicas, tal es el caso de pacientes hospitalizados que sufrieron cirugía, particularmente los que se

encontraban en cuidado intensivo y en los cuales la deficiencia fue un rasgo frecuente; también los pacientes con infecciones bacterianas postoperatorias presentaron niveles de AT III disminuidos notablemente (63,64)

El significado posible de la deficiencia de AT III inducida por cirugía para el desarrollo de DVT, especialmente en pacientes con infecciones bacterianas, todavía tiene que ser demostrado.

II.B. ENFERMEDAD RENAL

Los hallazgos en el examen histológico de los riñones de pacientes con glomerulonefritis sugieren que la coagulación intravascular local juega un papel importante en el progreso de la enfermedad renal; en esos pacientes la presencia de un estado hipercoagulable sistémico puede contribuir al deterioro de la función renal y puede estar asociada con una alta incidencia de complicaciones trombóticas (65,66).

Además se ha reportado una alta incidencia de fenómenos tromboembólicos en pacientes con síndrome nefrótico establecido (67,68).

II.C. ENFERMEDAD HEPATICA

El papel del hígado sano y enfermo en la coagulación.

El hígado sano juega un papel central en la coagulación sanguínea y la fibrinólisis. Los factores de la coagulación, componentes fibrinolíticos y los inhibidores de las enzimas se sintetizan en el hepatocito. Los defectos cuantitativos y cualitativos en la síntesis de los factores de la coagulación (70), así como la producción inadecuada de los inhibidores de

la coagulación y fibrinólisis (71), pueden ser el resultado de una enfermedad hepatocelular.

Además de su función de síntesis, el hígado elimina de la circulación factores de la coagulación activados. Estos mecanismo de depuración hepática también pueden estar afectados en situaciones de enfermedad, permitiendo la circulación de factores activados, activadores fibrinolíticos y productos de degradación de la coagulación. La insuficiencia hepática también dá como resultado defectos cualitativos y cuantitativos de las plaquetas.

Para apreciar la naturaleza de las anomalías asociadas con la enfermedad crónica del hígado se evaluó la actividad de las plaquetas, el fibrinógeno y el plasminógeno y los resultados reflejan la capacidad reducida del hígado cirrótico de aumentar la síntesis de proteínas (72).

II.D. DESORDENES VASCULARES

Enfermedad de Behcet

Desde que Behcet describió en 1937 un proceso inflamatorio sistémico con diferentes manifestaciones principalmente en la piel, las mucosas y la capa pigmentada posterior del iris, se han considerado numerosos factores etiológicos como importantes para el inicio de la enfermedad. Aunque la etiología todavía es incierta, ahora se acepta generalmente que el mecanismo patológico de este desorden involucra la pared vascular la cual es afectada sistemáticamente (74).

La supresión del sistema fibrinolítico es un fenómeno bien conocido en pacientes con enfermedad de Behcet sin considerar si ellos presentan complicaciones trombóticas. Este hallazgo

ha sido relacionado con la producción disminuida y/o liberación disminuida de activadores del plasminógeno por el endotelio vascular, las que están consideradas como factores contribuyentes en el tromboembolismo venoso y la trombosis arterial (40, 73). Por lo tanto, los datos obtenidos por Schmitz y Knop apoyan la suposición de que una disfunción más extensa del endotelio vascular es la razón de las anomalías hemostáticas encontradas en la enfermedad de Behcet (74).

Además, en los estudios llevados a cabo por Mettinger y Egeberg en pacientes con enfermedad cerebrovascular isquémica, se sugiere que la fibrinólisis defectuosa en una prueba de oclusión venosa, en la mayoría de los casos con un contenido normal de activadores del plasminógeno en la pared vascular, reflejan una función de liberación interrumpida (75).

II.E. HIPERLIPIDEMIA

Entre las numerosas causas de la trombosis, la hiperlipidemia está considerada como una condición particularmente importante porque está asociada con un estado hipercoagulable y puede conducir a la aterosclerosis (76,77). Se ha estudiado el mecanismo de la formación de trombos en la hiperlipidemia y los resultados sugieren que estos trombos se forman probablemente como resultado de la hiperfunción plaquetaria (78,79).

Los estudios recientes del papel de las plaquetas en la coagulación sanguínea han mostrado que las plaquetas pueden disparar la coagulación intrínseca por dos rutas alternas: 1) protegiendo de la acción de los inhibidores del plasma a factores de la coagulación asociados a ellas y 2) catalizando las reacciones de coagulación intrínseca sobre la superficie plaquetaria para formar fibrina (35).

Por otro lado se ha encontrado que los peróxidos de lípidos tienen efecto inhibitorio sobre la actividad de la AT III; de esta manera la peroxidación de los lípidos ha sido reconocida como un factor en la patogénesis de varias enfermedades y es posible que la inhibición local de la AT III por estos peróxidos contribuya al desarrollo de un evento trombótico (80).

En resumen, los impedimentos principales para la formación de trombos son: los inhibidores de la coagulación del plasma y el sistema fibrinolítico, y los defectos de esos componentes también pueden romper el balance que existe entre las fuerzas procoagulantes y antitrombóticas y conducir a la trombosis (81). Los causantes de los trastornos en el sistema de control de la coagulación han sido encontrados entre los inhibidores y componentes fibrinolíticos y como ejemplos están las deficiencias de la antitrombina III, plasminógenos que se convierten pobremente a plasmina (82,83,84) y fibrinógenos que muestran una tendencia a formar trombos al coagular lentamente, siendo estos trombos no susceptibles a la lisis por la plasmina (85, 86,87,88).

Hasta ahora la trombosis ha sido muy poco entendida. A pesar de los avances en el laboratorio de coagulación sanguínea y en la hemostasia clínica, la etiología de la trombosis ha quedado indefinida en la mayor parte de los casos.

En general, hay tres factores primarios (89) que contribuyen a la formación de un trombo y son:

- a) cambios en el flujo sanguíneo
- b) cambios en la sangre circulante
- c) cambios en la pared vascular

Cambios en el flujo sanguíneo

Con respecto a los cambios en el flujo sanguíneo, se sabe muy poco al considerar la estasis y la iniciación de la formación del trombo. La hipótesis más conocida acerca de porque el flujo sanguíneo alterado conduce a la formación de trombos propone que durante el período de estasis, especialmente en las bolsas valvulares venosas, ocurre la activación de los factores XII, XI y IX y la formación subsecuente de los trombos. Sin embargo, no hay prueba de que esto sea determinante para la mayoría de los casos de estasis y trombosis; es muy probable que esta hipótesis sea sólo una de muchas alteraciones potenciales en la coagulación, y la función plaquetaria que lleven a la formación de trombos en el aspecto de la estasis sistémica.

Cambios en la sangre circulante

Los cambios en la sangre circulante están bien definidos antes y después de la trombosis; sin embargo, no se sabe con certeza el significado de muchos de estos cambios. La mayoría de estos cambios son muy difíciles de considerar porque han sido medidos después del hecho (la trombosis). A continuación se muestra una serie de cambios en la sangre circulante que podrían, teóricamente, conducir a la trombosis.

- a) Adhesión plaquetaria aumentada
- b) Factores de la coagulación aumentados
- c) Inhibidores de la coagulación disminuidos
- d) Actividad fibrinolítica disminuida
- e) Inhibidores fibrinolíticos aumentados
- f) Lípidos aumentados

a) Se ha reportado que la adhesión plaquetaria aumentada se detecta en muchos individuos con aterosclerosis. Sin embargo hay controversia de si existe correlación entre la adhesión plaquetaria aumentada y la incidencia actual de trombosis clínica. La única conclusión que puede obtenerse es que este cambio es un factor predisponente importante en la trombosis, especialmente cuando está acompañado de otros cambios en la coagulación. Aún falta evidencia de que la adhesión plaquetaria aumentada cause actualmente trombosis clínica.

También los cambios en los factores de la coagulación circulantes están bien documentados en relación a la trombosis y en situaciones que conducen a la trombosis. A menudo se notan los factores de la coagulación aumentados en la etapa postoperatoria, en la enfermedad cerebrovascular isquémica y en la trombosis aguda. Sin embargo, como el hallazgo de la adhesión plaquetaria aumentada, muchos aumentos en los factores de la coagulación que han sido descritos han sido medidos después del hecho y por lo tanto el significado de estos hallazgos no se entiende con claridad. Los factores de la coagulación que se encuentran más comunmente aumentados, en los desordenes mencionados arriba son: el fibrinógeno, factor VIII, factor V y el factor VII (90).

Debe recalcar sin embargo, que hay muy poca correlación entre cualquier factor de la coagulación individual aumentado y el desarrollo de la trombosis clínica (69,91,92).

Los inhibidores de la coagulación se encuentra disminuidos en muchos desordenes asociados con la formación de trombos, específicamente la AT III. Algunos de estos desordenes son familiares con trombofilia hereditaria en los cuales hay una disminución heredada en la AT III. Estos pacientes comienzan

comunmente a sufrir trombosis venosa profunda extendida en sus años de adolescencia y necesitan tratamiento de por vida. En la mayoría de los desordenes asociados con la trombosis aguda, la AT III se ha encontrado disminuída; sin embargo ésta ha sido medida después del hecho y no se entiende si esto ha jugado un papel etiológico o se debe simplemente al consumo durante el proceso de coagulación. En general, los pacientes postoperados presentan niveles disminuídos de AT III, pero no se sabe todavía la causa de esta disminución.

Las anormalidades de las moléculas de plasminógeno y fibrinógeno se han descrito en pacientes con trombosis venosa familiar o recurrente, pero estos son raros y la asociación podría ser una coincidencia.

Las actividades fibrinolítica y del activador fibrinolítico predisponen, al menos en teoría, a la formación de trombos. La hipoactividad y la predisposición a la formación de trombos pueden provenir de niveles de plasminógeno disminuídos, actividad del PA disminuída o de actividad antiplasminica aumentada.

Muchos desordenes están asociados con la inhibición del activador del plasminógeno: la inhibición de su actividad en el estado postoperatorio, en las infecciones y en los desordenes inflamatorios generales. Sin embargo no se ha detectado inhibición de su actividad en pacientes que sufren trombosis aguda (89).

Puede concluirse que en general, los procesos reactivos están asociados con la trombosis y la hipofibrinólisis y ésta última se presenta a través de varios mecanismos:

- i) Plasminógeno disminuido
- ii) Producción y/o liberación disminuida del activador por el endotelio.
- iii) Actividad disminuida del PA
- iv) Inhibidores fibrinolíticos aumentados

No se entiende el significado de estos hallazgos, como tampoco se sabe si muchos de esos cambios estuvieron presentes antes de la formación del trombo y de esta manera ser potencialmente etiológicos, o si simplemente se desarrollaron como consecuencia de la trombosis.

Se ha sugerido que los lípidos aumentados predisponen a la formación de trombos (79,93); sin embargo este hecho ha provocado confusión y no se tiene una evidencia convincente, de que realmente ocurra.

Cambios en la pared vascular

Los cambios en la pared vascular son probablemente los factores etiológicos más comunes en la formación de trombos. Esos cambios pueden ocurrir mediante numerosos mecanismos, entre ellos los cambios vasculares inflamatorios.

Debido a esto, la actividad del PA se encuentra disminuída en muchos desordenes vasculares. Es importante hacer notar que hay menos actividad del PA en las extremidades inferiores en comparación con las extremidades superiores (94); esto puede contribuir a la alta incidencia de trombosis en las extremi dades inferiores. No obstante no se sabe con certeza el signi ficado de este hecho.

III PRUEBAS DE LABORATORIO

INTRODUCCION

Desde el punto de vista clínico sería muy útil contar con pruebas de laboratorio que pudieran auxiliar en el diagnóstico de la trombosis. Se requieren pruebas que sirvan para diagnosticar la lesión establecida y también para indicar al médico si el paciente ha estado en riesgo alto de padecer trombosis; esto es, ayudar en la predicción de la trombosis.

El problema más importante a considerar en la trombosis y la embolia es desde luego la prevención, y la capacidad de prevenir estos dos estados patológicos requiere la disponibilidad de pruebas que permitan la predicción del riesgo alto de padecer el desorden clínicamente.

III.A. FUNDAMENTO DE LAS PRUEBAS

III.A.1. Fibrinógeno

El tiempo de trombina

El tiempo de trombina mide la razón en la que el fibrinógeno del plasma se convierte a fibrina después de la adición de trombina. El tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno (95).

Ensayo fotométrico funcional

El método está basado en una observación de Hemker, quien encontró que el tiempo de coagulación no es sólo función de la concentración de fibrinógeno, sino también una función de la velocidad de coagulación. En este método se usa la velocidad de coagulación como una medida de la concentración de fibrinógeno. La muestra se digiere con batroxobina, que es una enzima de veneno de serpiente, y la razón de la formación de fibrina se registra turbidimétricamente (96,97).

III.A.2. Plasminógeno

Antecedentes

El plasminógeno puede ensayarse funcional e inmunoquímicamente.

En el ensayo funcional el plasminógeno es convertido a plasmina o complejo plasminógeno-SK y su actividad amidolítica puede medirse con una serie de sustratos.

En años recientes se han desarrollado sustratos peptídicos sintéticos que imitan la estructura del sustrato natural que precede al enlace roto por la enzima y que poseen correlaciones

estructura-actividad con ciertas enzimas. Estos avances han dado como resultado la generación de sustratos peptídicos cromogénicos específicos para proteasas de serina.

Se ha desarrollado el sustrato H-D-Val-Leu-Lis-pNA(S-2251) y se ha encontrado que es sensible a la plasmina y al plasminógeno activado por la SK, pero mucho menos sensible a otras proteasas de serina. Por lo tanto el S-2251 ha sido utilizado para desarrollar un ensayo de plasminógeno (35).

Método amidolítico

En el ensayo del plasminógeno, cuando se agrega un exceso de SK a plasma humano diluido, el plasminógeno forma un complejo con la SK el cual tiene actividad enzimática. Este complejo plasminógeno-SK favorece la ruptura del sustrato S-2251 al reaccionar con éste liberando el cromóforo pNA cuya concentración de color es proporcional a la actividad del complejo y puede leerse en un espectrofotómetro a 405 nm (35).

Como la SK se agrega en exceso, el plasminógeno no libre queda activado a plasmina; bajo esas condiciones la actividad del complejo no se inhibe por los inhibidores del plasma y usando esas condiciones con el S-2251, el plasminógeno del plasma puede determinarse fácil y rápidamente con buena reproducibilidad (35).

Método inmunoquímico

Para la determinación inmunológica de plasminógeno, plasmina y AP-alfa₂ el método que se utiliza en la inmunodifusión radial simple (RID), que es una técnica inmunoquímica cuantitativa.

Inmunodifusión radial simple (98)

Antecedentes

Desarrollada inicialmente por Petrie en 1932, para propósitos comparativos cualitativos, la técnica fué usada subsecuentemente en varias formas para la medición semicuantitativa de antígenos (Ouchterlony, 1949; Feinberg, 1957; Hayward y Augustine, 1957; Crowle, 1960). Fué puesta sobre una base firme por Manchini y cols. (1964-1965), quienes mostraron que existe una relación lineal entre el área ocupada por el anillo y la concentración de antígeno, y su aportación fué indicar que a la difusión se le permite avanzar hasta la terminación.

Este tipo de reacción de precipitina se desarrolla incorporando uno de los dos reactivos (usualmente el anticuerpo) en un gel de agar extendido sobre una superficie plana y permitiendo al otro reactivo difundir dentro de éste desde un pozo. Se forman las bandas de precipitación en forma de anillo y migran hacia afuera concéntricamente alrededor de los hoyos hasta que los reactivos se encuentran en proporciones iguales

III.A.3. PLASMINA

Método inmunoquímico

El mismo que para la determinación de plasminógeno.

III.A.4. ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO

La acción del activador del plasminógeno puede ensayarse usando ya sea una prueba de lisis del coágulo de euglobulina o una prueba de la placa de fibrina. También puede ensayarse con el método del sustrato cromogénico.

En el método descrito por Gyzander se presenta otra forma de separar el activador de los inhibidores en el plasma, por

adsorción sobre gel de sefarosa de lisina el cual remueve la mayoría de las otras proteínas del plasma (99).

Tiempo de lisis del coágulo de euglobulina

Antecedentes

Milstone, en 1941, demostró que la estreptocinasa no lisaba de manera considerable la fibrina humana purificada; pero si se añadía una pequeña cantidad de euglobulina de suero humano, la lisis se presentaba rápidamente.

Cristensen, en 1945, halló que la fracción euglobulina del suero humano debía su efecto a que contenía una sustancia inactiva, llamada actualmente plasminógeno, que se convierte en plasmina mediante la acción de diversos activadores, uno de los cuales es la estreptocinasa.

Se han descrito varios métodos para preparar la fracción euglobulina pero todos son básicamente similares (100,101,102). La fracción euglobulina precipitada se separa, se resuspende con amortiguador y se coagula con trombina o calcio o ambos. Se mide el tiempo que tome el coágulo para lisarse.

Método de la placa de fibrina

La actividad del activador del plasminógeno puede ensayar se midiendo la cantidad de lisis producida por un volumen conocido de la fracción de euglobulina sobre una placa estandarizada de fibrina que contiene plasminógeno (35,103).

Método del sustrato cromogénico

En este método el sustrato sintético reacciona con la fracción euglobulina del plasma liberando el cromóforo pNA que se determina a 405 nm y 37°C (75)

III.A.5. ANTIPLASMINA-ALFA₂

La antiplasmina-alfa₂ puede ensayarse con un método amidolítico y con un método inmunoquímico (35)

Método amidolítico

El método amidolítico utiliza un sustrato cromogénico para determinar la plasmina residual después de agregar un exceso de plasmina al plasma de prueba. Se utiliza el sustrato cromogénico S-2251 que tiene tiempo de reacción corto para este ensayo de la antiplasmina-alfa₂ de acción muy rápida. La amidólisis del sustrato puede seguirse en un registrador (método de la razón inicial) o leerse después de un período establecido de tiempo (método de punto final). La concentración de antiplasmina se calcula de una curva estándar preparada a partir de una dilución de plasma normal humano (35).

Método amidolítico selectivo

En la determinación de la actividad antiplasminica de la antiplasmina-alfa₂ usando un método amidolítico, la macroglobulina-alfa₂ (M-alfa₂) en concentraciones presentes en el plasma normal inhibe la ruptura de los sustratos cromogénicos por la plasmina; por lo tanto se requiere que el tiempo de reacción entre la muestra y la plasmina se acorte lo más posible porque se ha mostrado que la M-alfa₂ representa de 25 a 33% de las actividades de antiplasmina de acción rápida en el plasma humano normal. Debido a la importancia clínica de la AP-alfa₂, debe eliminarse el efecto de la M-alfa₂ especialmente cuando la AP-alfa₂ está muy reducida en el plasma o la M-alfa₂ está muy aumentada.

Se ha desarrollado este nuevo método para ensayar la AP-alfa₂ selectivamente con el sustrato cromogénico S-2251 usando

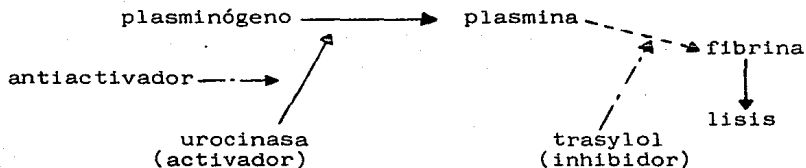
un método de punto final. La actividad antiplasminica de la M-alfa₂ se destruye por la adición de clorhidrato de metilamina (104).

Método inmunológico

La AP-alfa₂ puede medirse inmunológicamente por medio de la inmunodifusión radial simple.

III.A.6. ANTI-ACTIVADOR

El método amidolítico está basado en el principio siguiente:



donde la urocinasa se usa para activar al plasminógeno y el Trasylol (inhibidor de proteasa) se usa para inhibir a la plasmina. El sustrato peptídico se usa para determinar la actividad residual de la urocinasa y/o del activador de tejido, la cual es una medida inversa del antiactivador del plasma de prueba (75).

III.B. MATERIALES

III.B.1. FIBRINOGENO

El tiempo de trombina

La técnica que utiliza este principio se conoce como el método de Clauss y se lleva a cabo con plasma diluido con un exceso de trombina. Como es difícil registrar el punto final (la formación del coágulo) manualmente, debe usarse un coagulómetro automático.

Material:

- plasma pobre en plaquetas
- reactivo de trombina (3-4 unidades NIH de trombina/ml). Se calienta previamente a 37°C en baño de agua durante por lo menos dos minutos antes de su uso.
- solución de citrato de sodio 0.13 M
- solución de cloruro de sodio al 0.85%

- plasma control. Se utilizan para cada corrida de muestras
- pool de plasma normal. El plasma de 10 donadores sanos sin historia conocida de desorden hemostático se almacena y se etiqueta como "pool normal"
 - plasma control normal. Se adquiere en el comercio y se maneja según las indicaciones del fabricante.

Notas

1. La trombina debe trabajarse en recipientes de plástico por que en presencia de vidrio se desnaturaliza.
2. La preparación de trombina debe tener actividad baja (de 2 a 10 unidades NIH/ml).
3. Una unidad NIH de trombina se define como aquella cantidad de trombina que en 15 segundos coagulará 1 ml de fibrinógeno

que ha sido estandarizado con el estándar de referencia de trombina. De este modo la actividad de la muestra de trombina está definida en términos de su potencia relativa a aquella del estándar de referencia de trombina (105).

Ensayo fotométrico funcional

Material:

- plasma pobre en plaquetas. Se prepara por centrifugación a 13000 X g durante cuatro minutos a temperatura ambiente. Se deja a temperatura ambiente para usarse enseguida, o si se usa después se congela a -20°C durante un periodo menor de dos semanas. Las muestras descongeladas se calientan a 37°C durante cinco minutos antes de usarlas en el ensayo.
- fibrinógeno humano purificado (grado de investigación L), o como el obtenido por Vila y cols. (106).
- batroxobina (reactivo de reptilasa) 10 unidades/vial
- aprotinina (6700 KIU/mg)
- heparina
- estándar calibrado para fibrinógeno
- base Tris (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5)
- cloruro de calcio dihidratado
- brij 35, 10 g/l
- polietilenglicol 6000, 20 g/l
- fotómetro

Condiciones óptimas para la medición

Para ejecutar la medición cinética tiene que lograrse un aumento lineal en la absorbancia. Con este método se logra la cinética lineal; por lo tanto, las condiciones de reacción quedan optimizadas.

Al agregar el polietilenglicol a la mezcla se obtienen dos efectos benéficos: aumentando la concentración de PEG se

acorta considerablemente la fase log de la reacción y se aumenta la sensibilidad del ensayo.

El Brij 35 se usa como detergente para reducir la precipitación inespecífica de proteínas plasmáticas inducida por el PEG y prevenir la formación de trombina endógena generada en presencia de iones calcio libres.

El calcio se usa para aumentar la sensibilidad y estabilizar los filamentos de fibrina.

La aprotinina 6700 KIU/l se agrega para prevenir la interferencia de posible fibrinólisis inducida por la muestra.

Longitud de onda. 334 nm se considera como óptima; con una longitud de onda mayor la sensibilidad del ensayo disminuye rápidamente, de manera que cuando se use una longitud de onda más grande debe considerarse una precisión más baja.

Con dos lecturas después de 3 y 4 minutos del comienzo bajo condiciones de rutina se obtiene un intervalo de medición de 80-700 mg/dl de fibrinógeno. Pueden aplicarse volúmenes de muestra más grandes o más pequeños, si el intervalo de medición se extiende más allá de los límites del intervalo de rutina. Cerca de 20 mg/dl puede considerarse como el límite de detección con una sensibilidad de cerca de 5 mA/min (0.005 A/min) cuando se usan 100 ul de volumen de muestra (96).

III.B. PLASMINOGENO

Método funcional (103)

- plasma pobre en plaquetas
- plasminógeno humano puro, para preparar una curva estándar hasta 40 mg/dl de plasma.

- estreptocinasa, 100,000 IU/mg de proteína
- el sustrato S-2251; este sustrato se disuelve en agua desionizada a una concentración 0.01 M (solución stock)

Micrométodo funcional (107)

En este método se considera el uso de los sustratos cromogénicos para determinar el plasminógeno por medio de una técnica microanalítica, en situaciones en las que sólo es posible obtener cantidades pequeñas de sangre. Este microensayo espectrofotométrico puede aplicarse sobre muestras de sangre capilar y venosa.

- Las muestras de sangre capilar y venosa se colectan en tubos de plástico que contengan previamente la sal dipotásica del EDTA (K_2 EDTA) sólida, 1.5 mg/ml de sangre y con un máximo de capacidad de sangre de 4 ml en el caso de la sangre venosa y de 1 ml para la sangre capilar.
- plasma pobre en plaquetas. Se usa para el ensayo automatizado del sustrato cromogénico.
- plasma diluido. 70 ul de plasma y 490 ul de solución salina amortiguada con Tris, de pH 7.4. Es una dilución 1:8 (uno en ocho)
- el sustrato S-2251
- estreptocinasa

Método inmunoquímico

- placas de inmunodifusión obtenidas en el comercio, las cuales tienen el antisuero específico para el plasminógeno (35).

III.B.3. PLASMINA

Método inmunoquímico

- Existen disponibles en el comercio las placas de inmunodifusión con antisuero específico para la plasmina, y el método que se sigue es la RID (35)

III.B.4. ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO

Tiempo de lisis del coágulo de euglobulina (108)

Se ejecuta por el método descrito por Buckell.

- plasma pobre en plaquetas
- cloruro de calcio 0.025 M
- solución de borato
- precipitado de euglobulina. Se prepara de acuerdo al método de Millar y Smith (100)

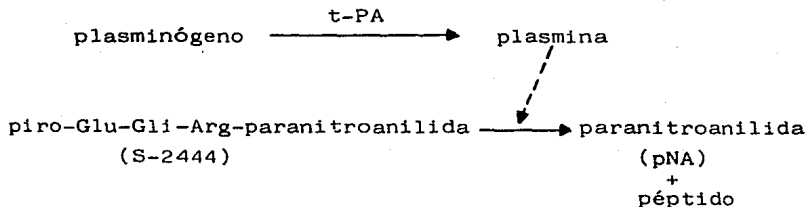
Método de la placa de fibrina modificada (109)

El activador se determina de placas de fibrina modificadas con agar-agar. Para este método las euglobulinas se precipitan a pH 5.9 (100) y se reconstituyen con amortiguador al volumen de plasma original. Para la preparación de las placas de fibrina se agregan plasminógeno (25 Cu/ml) y trombina a fibrinógeno bovino al 0.2% (peso/volumen), y agar-agar al 2% (peso/volumen) ambos en amortiguador de veronal de pH 7.35 y fuerza iónica de 0.15.

Método del sustrato cromogénico (75)

Este método se lleva a cabo usando el sustrato peptídico S-2444 (piro-Glu-Gli-Arg-pNA) que es sensible principalmente a la urocinasa y parcialmente sensible al activador vascular del plasminógeno (t-PA).

La secuencia de reacciones es:



El sustrato se utiliza en concentración 2 mM en agua destilada.

NOTA. Cuando se habla del activador del plasminógeno debe entenderse que se habla del activador extrínseco, vascular o de tipo tisular (t-PA) como uno mismo (99,110).

III.B.5. ANTIPLASMINA-ALFA₂

Método amidolítico

La medición de la velocidad inicial de la ruptura del sustrato S-2251 0.0001 M, en 1 ml de amortiguador Tris 0.05 M en cloruro de sodio 0.1 M de pH 7.4, por 4 ug de plasmina (30IU/ mg de proteína) se lleva a cabo a 37°C y 405 nm.

- Se utiliza una solución que contenga 200 ug de plasmina/ml (solución stock en un amortiguador de pH 7.4 que contenga glicerol al 25%) (103).

Método amidolítico selectivo (104)

- oxalato de sodio 0.1 M como anticoagulante
- plasma pobre en plaquetas
- antiplasmina-alfa₂ purificada usando el método descrito por Moroi y cols. (111)
- macroglobulina-alfa₂ purificada
- clorhidrato de monometilamina
- el sustrato cromogénico S-2251
- plasmina

La actividad de la antiplasmina de acción rápida se determina con un método espectrofotométrico que utiliza el S-2251. Es necesario decidir la cantidad de metilamina que se requiere para inhibir la capacidad antiplásminica de la M-alfa₂.

Valores normales: de 12.2 a 15.8 segundos

Ensayo fotométrico funcional

1. Se disuelve un vial de reactivo de reptilasa en 1 ml de agua destilada.
2. Se mezclan 90 ul de la solución de la enzima con 100 ml de amortiguador Tris-HCl 0.1 M de pH 7.5, que contenga polietilenglicol 6000 20 g/l, Brij 35 10 g/l y cloruro de calcio 5 mM para formar una mezcla de reacción.
3. Se colocan 50 ul de la muestra de plasma en una celda (1 cm de longitud de paso de luz, en baño de agua y mantenida a 25°C).
4. Se agrega 1 ml de la mezcla de reactivos y se mezcla bien. Es esencial un buen mezclado.
5. Se lee la absorbancia a 334 nm (o a 340 nm) exactamente después de 3 y 4 minutos del comienzo o, alternativamente, cuando se use un registrador se lee el cambio de absorbancia por minuto de la parte lineal del diagrama del registrador.

Tiene que correrse un estándar con concentración conocida de fibrinógeno en cada serie de experimentos. Cuando se usen volúmenes de muestra más pequeños o más grandes para una escala de medición extendida el volumen del estándar debe ser ajustado adecuadamente. El cálculo del resultado se hace por medio del estándar.

Cuando se emplee 37°C, como temperatura de prueba, la concentración de polietilenglicol debe ajustarse a 25 g/l.

III.C.2. PLASMINOGENO

Método funcional

En un tubo de prueba se mezclan 20 ul de plasmina y 40 ul de estreptocinasa 50,000 IU/ml (exceso 9 M de estreptocinasa al plasminógeno) y se incuban a 37°C. Al cabo de 15 minutos se retira una muestra de 30 ul y se agrega a una semimicrocelda en un espectrofotómetro, y se mide el cambio neto de absorbancia por minuto (A/min).

Se colocan en una celda 960 ul de amortiguador Tris 0.05 M en cloruro de sodio 0.1 M de pH 7.4 y 10 ul del sustrato S-2251 0.01 M a 37°C. Enseguida se agrega la mezcla plasma-SK como se indica en el párrafo anterior.

Una velocidad de $v=0.125$ A(a 405 nm) por minuto equivale a 20 mg de plasminógeno/dl de plasma.

El factor de conversión de la velocidad inicial se calcula de las constantes cinéticas de las especies de enzima y sustrato (112).

Micrométodo funcional

Se toman 50 ul de la dilución del plasma y se incuban en 350 ul de amortiguador Tris 0.05 M de pH 7.4, que contenga estreptocinasa 3000 IU/ml, a 37°C durante seis minutos.

Después se agrega 0.1 ml del sustrato S-2251 1.5 mM y se mide la A/min a 405 nm después de 30 segundos.

Para este método se construye una curva estándar de un pool de plasma normal donde la dilución 1:8 se define como 1 U/ml. Estos ensayos se ejecutan automáticamente usando un analizador enzimático cinético.

Método inmunoquímico

Procedimiento

Siguiendo las instrucciones del fabricante se coloca la cantidad recomendada de solución de prueba o estándar, diluido adecuadamente si es necesario, en cada pozo; se cubre la placa y se deja permanecer a temperatura ambiente hasta que la difusión sea completa.

Usando iluminación oblicua debajo y viendo la placa contra fondo negro mate, medir los diámetros de los anillos tan exactamente como sea posible. Sobre papel semilogarítmico se trazan las concentraciones de los estándares verticalmente en la escala logarítmica contra los diámetros de precipitina en la escala lineal.

III.C.3. PLASMINA

Método inmunoquímico

Este método también es la RID y se lleva a cabo de la misma manera que para el plasminógeno.

III.C.4. ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO

Tiempo de lisis del coágulo de euglobulina

Se recoge sangre y se mantiene en hielo. La prueba se ejecuta en los veinte minutos siguientes a la obtención de la sangre. La sangre se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

Trabajando la muestra por duplicado, se mezclan en tubos de centrifuga 9 ml de agua destilada y 0.5 ml de plasma. El pH se lleva a 5.3 agregando 0.1 ml de ácido acético al 1% a cada tubo; se dejan los tubos durante 30 minutos a 4°C para que precipite la fracción euglobulínica del plasma y se centrifugan durante cinco minutos. Se decanta el sobrenadante.

Se añaden 0.5 ml de solución de borato a los tubos y se colocan a 37°C agitando suavemente el contenido con una varilla de vidrio. A la solución resultante de euglobulina en borato se le añaden 0.5 ml de cloruro de calcio 0.025 M y se mide el tiempo en el cual coagula la mezcla. Se dejan los tubos a 37°C y se revisan a intervalos, registrando el tiempo de lisis. Cuando la lisis parece estar casi finalizando se revisan los coágulos cada cinco minutos.

Normalmente el tiempo que toma la lisis excede los 150 minutos, pero en hiperfibrinólisis aguda el tiempo de lisis puede ser menor de 30 minutos.

La actividad de PA medida con el ECLT se expresa en unidades arbitrarias derivadas de la fórmula: $1000/T$, donde T representa el tiempo de lisis del coágulo en minutos.

Método de la placa de fibrina modificada

Las soluciones de fibrinógeno y agar se mezclan en proporción 1:1 y se vierten 15 ml de esta mezcla en cajas de Petri (con diámetro de 9 cm)

El fibrinógeno se coagula con trombina en una concentración final de 0.7 unidades NIH/ml.

Después de la solidificación, se cortan dentro de la placa seis pozos con diámetro de 5 mm. Haciendo este paso por triplicado, dentro de los pozos se colocan 25 μ l del precipitado de euglobulina resuspendido y se incuban a 37°C durante 24 horas.

La actividad de PA medida sobre las placas de fibrina se expresa como el área de fibrina lisada después de la incubación. Estas áreas de lisis se expresan en milímetros cuadrados como

producto de dos diámetros perpendiculares del área de lisis. El contenido de PA en la solución de prueba debe ser relacionado con una curva estándar que se traza para cada lote de placas.

Método del sustrato cromogénico

Se toman 0.2 ml de precipitado de euglobulina resuspendido y se diluyen con 0.6 ml de amortiguador Tris-HCl 0.05 M de pH 9.0 (sugerido por P. Wallén, Umea). Se agregan 0.2 ml del sustrato peptídico 2 mM. La razón de la reacción se determina por espectrofotometría a 405 nm y 37°C.

Los resultados se calculan de acuerdo al cambio neto en la absorbancia por unidad de tiempo (A/min).

III.C.5. ANTIPLASMINA-ALFA₂

Método amidolítico

El ensayo del inhibidor se ejecuta agregando 20 ul de plasma a 950 ul de amortiguador pH 7.4 en una semimicrocelda a 37°C, seguida por la adición consecutiva de 10 ul de solución del sustrato S-2251 0.01 M y 20 ul de plasmina (4.0 ug) y se mide la velocidad inicial o cambio neto de adsorbancia por minuto.

Para convertir los datos de porcentaje de plasmina inhibida a concentración de AP-alfa₂, el porcentaje de plasmina inhibida se multiplica por un factor de 0.132 que es igual a 0.2 x peso molecular de la AP-alfa/peso molecular de la plasmina. El factor convierte ug de plasmina inhibida por 25 ul de plasma a mg de AP-alfa₂/dl de plasma.

El intervalo normal para este inhibidor del plasma es: 5.3-6.6 mg/dl.

Método amidolítico selectivo

Después de incubar el plasma diluido y el S-2251, se agrega plasmina en exceso a la mezcla y se incuba a 37°C. La cantidad residual de plasmina se determina midiendo la concentración de pNA liberada del S-2251 a 405 nm.

Método inmunológico

El mismo que para la determinación de plasminógeno y plasmina.

III. .6. ANTIATIVADOR

Método amidolítico

La urocinasa, 20 PU en 0.1 ml de amortiguador Tris-HCl-50 mM que contenga cloruro de sodio 38 mM, 0.1% de albúmina bovina y 10,000 KIU de Trasylol/1, se incuba a 37°C durante una hora con 0.4 ml de plasma citrato diluido 1:4 con el mismo amortiguador.

Como estándar interno se usa un pool de plasma estandarizado del laboratorio, no diluido y diluido 3:4, 1:2 y 1:4.

La actividad residual de la urocinasa y/o del activador se determina agregando 0.3 ml del sustrato cromogénico 0.75 mM en el mismo amortiguador ya descrito pero con el pH ajustado a 8.8. La reacción se determina por espectrofotometría a 405 nm y 37°C.

Los resultados se expresan en porcentaje del estándar de plasma interno del laboratorio, el cual se considera que contiene el 100 porcentaje/ml.

IV DISCUSION

FIBRINOGENO

El tiempo de trombina

La prueba es sencilla y rápida. Es el método usado con más frecuencia en la rutina clínica y representa un proceso más fisiológico que los métodos del peso del coágulo, los cuales miden todo el fibrinógeno coagulable independientemente de su velocidad de coagulación (35).

La prueba es sensible a la presencia de anticoagulantes (del tipo de la heparina) que interfieren con la conversión del fibrinógeno a fibrina, así como de los productos de degradación de la fibrina.

Si se usa un sistema automatizado los tiempos de coagulación resultan mucho más cortos.

Aunque es una prueba muy útil, el procedimiento carece de uniformidad en las técnicas. Las razones de la considerable variación interlaboratorios en los resultados del tiempo de trombina incluyen: a) las diferentes fuentes de trombina, humana o bovina; b) las diferentes técnicas usadas, c) la inestabilidad de la trombina diluida (95,113).

A menudo se lleva a cabo el control de calidad ajustando la concentración del reactivo de trombina para obtener un tiempo de coagulación predeterminado para plasma normal o para plasma control.

Ensayo fotométrico funcional

Los métodos de tiempo de coagulación aunque bien establecidos en la rutina clínica, sufren de varios inconvenientes como la calibración no lineal, la necesidad de prediluciones

de la muestra y variaciones del sistema de detección del coágulo que se use (96).

En vez de medir el tiempo de coagulación puede usarse como alternativa la razón de formación de fibrina para determinar la concentración de fibrinógeno. Esta observación abre la posibilidad de desarrollar un método que puede ser ejecutado en cualquier dispositivo fotométrico incluyendo instrumentos automatizados.

La optimización de las condiciones de reacción llevan al uso exclusivo de bajas concentraciones de la enzima lítica. En concentraciones bajas de trombina no puede usarse como tal porque sufre inhibición por la M-alfa₂ y la AT III plásmaticas; esta puede ser la razón por la que otros autores han descrito ensayos cinéticos y un principio turbidimétrico, porque con el uso de trombina no se encuentra una curva de calibración lineal (114,115).

La batroxobina no es atacada por ninguno de los inhibidores plamáticos conocidos y tampoco es sensible a la heparina; su especificidad para el fibrinógeno está bien documentada (116). De esta manera puede obtenerse una dosis-respuesta lineal dentro de una escala de medición de 80-700 mg/dl con el uso de un estándar sencillo. Esta escala cubre más del 90% de las muestras de pacientes en la rutina clínica.

Comparando este método con el de Clauss, que es el método más usado para el ensayo de fibrinógeno, se encuentra que hay buena correspondencia y esto resalta las ventajas del ensayo fotométrico.

Este método, como también depende de la velocidad de polimerización de la fibrina, también es sensible a los productos de degradación de la fibrina; pero en experimentos con

muestras de plasma digeridas con estreptocinasa (96), se observó que esa interferencia es menor que usando el método de Clauss. Sin embargo, cuando hay grandes cantidades de FDP en la muestra, se retarda el aumento en la absorbancia. Este fenómeno puede usarse para la estimación adicional del contenido de FDP en la muestra.

Plasminógeno

Método funcional

Ver "El uso de los sustratos cromogénicos".

Micrométodo funcional

Se ha demostrado que este micrométodo puede aplicarse en muestras de sangre capilar.

ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO

El tiempo de lisis del coágulo de euglobulina

La mayoría de los métodos (35) para medir el activador del plasminógeno en el plasma son inespecíficos y están afectados por los niveles de fibrinógeno, plasminógeno e inhibidores. La preparación de la fracción de euglobulina a partir de la muestra de prueba reduce la concentración de los inhibidores y así puede determinarse la acción del activador.

El ECLT es una prueba sencilla, rápida y clínicamente útil porque puede detectar hiperfibrinólisis aguda. Comparando este método con el de la placa de fibrina, se ha encontrado una correlación bastante buena.

Método de la placa de fibrina

Este método no es afectado por los niveles de plasminógeno ni de fibrinógeno en el plasma de prueba. Como este método emplea la misma fracción euglobulina que en el ECLT, tiene

también la ventaja de contar con la concentración disminuida de los inhibidores.

Además, con la adición del agar a las placas se tiene la ventaja de medir de manera más sencilla las áreas de lisis, por su forma más regular, con lo que se logra una mayor reproducibilidad en las determinaciones.

Debido al tiempo y al cuidado en la preparación de las placas y por el tiempo que tiene que dejarse en incubación, este método está limitado probablemente a la situación de búsqueda o para la investigación de problemas clínicos crónicos. Tiene poco uso en la investigación de hiperfibrinólisis aguda.

Método del sustrato cromogénico

Ver "el uso de los sustratos cromogénicos".

Para ensayar el activador del plasminógeno existen otros métodos como el que utiliza anticuerpos anti activador del plasminógeno humano (117), la determinación con el empleo del yodo radiactivo (118), usando placas de microtitulación (119) y utilizando fibrinógeno marcado con fluoresceína (120), pero los cuales emplean células cultivadas y por lo tanto son más largos y complicados y por el momento sólo pueden utilizarse para propósitos de investigación.

ANTIPLASMINA-ALFA₂

Método amidolítico

En la determinación de la antiplasmina-alfa₂ el ensayo utiliza el método de la razón inicial y los procedimientos son difíciles de seguir a menos que se utilice un analizador cinético. Además, los resultados de este método reflejan la actividad antiplasminica de la M-alfa₂, especialmente cuando la AP-alfa₂ está disminuida considerablemente.

Método amidolítico selectivo

Está basado en el hecho de que la metilamina neutraliza la actividad antiplasminica de la M-alfa₂.

Otra ventaja en este método, es el cambio del orden al mezclar la plasmina, el plasma diluido y el sustrato cromogénico. La adición de plasmina a la mezcla de plasma diluido y S-2251 acorta el tiempo de reacción de la plasmina y el plasma.

Este método no sólo es sencillo y rápido, sino además tiene otra ventaja en el uso de la determinación de punto final.

NOTA. Los métodos para determinar la antiplasmina-alfa₂, para el ensayo de antiactivador y los llamados métodos funcionales (excepto el de la determinación de fibrinógeno), así como uno de los usados para medir el activador del plasminógeno, son todos métodos amidolíticos que se basan en el uso de sustratos cromogénicos.

El uso de los sustratos cromogénicos

La mayoría de los ensayos funcionales son muy consumidores de tiempo y esto ha limitado su utilidad clínica. La llegada de los sustratos cromogénicos ha cambiado esta situación y los métodos que los utilizan son mucho más simples, menos consumidores de tiempo y se prestan por sí mismos a la automatización o semiautomatización. Con estos métodos se mide la actividad amidolítica y debe tenerse en mente que la actividad amidolítica no siempre representa lo mismo que la actividad proteolítica sobre el sustrato natural, que es la fibrina.

Los ensayos con sustratos cromogénicos, en general, usan el método de la razón inicial y como ya se mencionó (107), los procedimientos son difíciles de seguir y requieren el uso de equipo especial.

PLASMINOGENO, PLASMINA Y AP-ALFA₂Método inmunoquímico

Se utiliza la inmunodifusión radial simple porque es un método sencillo, rápido y reproducible. Con estas ventajas y contando con el antisuero específico, también se podría llevar a cabo la determinación del activador del plasminógeno.

V CONCLUSIONES

1. Hasta ahora ninguno de los ensayos disponibles confirma la trombosis. Por lo tanto deben usarse criterios aceptables para establecer una relación entre la trombosis y las pruebas de laboratorio, para que al llevarlas a la práctica estas pruebas ayuden a detectar el fenómeno tromboembólico antes de que éste se manifieste clínicamente.
2. Para que los ensayos se realicen de manera satisfactoria se deben cuidar aspectos como: que la prueba que se utilice sea estandarizada adecuadamente, que el efecto de los factores como la extracción de la sangre, la velocidad y temperatura de centrifugación también esté estandarizado; y que los procedimientos que se utilicen sean sensibles y específicos para el fenómeno tromboembólico.
3. Se empleen sustratos más específicos para las determinaciones.
4. El uso de sustancias para remover los inhibidores presentes en los fluidos biológicos.
5. Llevar a cabo estudios epidemiológicos para evaluar la función fibrinolítica.

BIBLIOGRAFIA

1. Hägroth, M.L. y cols., "Inhibition of the human tissue plasminogen activator in plasma from different species". Thromb Res. 33,6; pp. 583-594; 1984
2. Murano G., The three hemostatic compartments. In: Basic concepts in hemostasis and thrombosis. Murano, Bick (editors). Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 1982; p.3
3. Swanson J.O. "Preoperative coagulation testing" Laboratory medicine. 9; pp.28-34. 1978
4. Marljar y cols. "An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation". Blood 60,6; pp.1353-1358. 1982
5. Silverberg y cols. "Kinetics of the activation of bovine coagulation factor X by components of the extrinsic pathway". J. Biol. Chem. 252; pp.8481-8488. 1977
6. Chesney y cols. "The role of platelet factor V in prothrombin conversion". Thromb Res. 29; pp.75-84. 1983
7. Triantaphyllopoulos L. "Thrombin generation in normal plasma enriched with purified coagulation factors". Thromb Res. 29; pp.355-369. 1983
8. Jackson C.M., Biochemistry of prothrombin activation. In: Haemostasis and Thrombosis. Bloom, Tomas (editors). London Churchill Livingstone. 1981. p.140

9. Harfenist E.J. y cols. "An investigation into the role of coagulation factor XIII in ADP-induced aggregation and fibrinogen binding with rabbit platelets". Blood 60, 4; pp.906-911. 1982
10. Esnouf M.P. La reacción trombina-fibrinógeno y la estabilización de la fibrina. En: Coagulación sanguínea, hemostasia y trombosis. Rosemary Biggs (editor). Barcelona. Editorial JIMS 1975. pp.27-29.
11. Oryjski y cols. "Uptake and inhibition of thrombin by the vascular wall". Thromb. Res. 27; pp.467-475. 1982
12. Larsson y cols. "Platelet and plasma compatibility of heparinized and sulphated surfaces". Thromb. Res. 15; pp. 157-167. 1979
13. Murano G. Plasma protein function in hemostasis. In: Basic concepts in hemostasis and thrombosis. Murano, Bick (editors). Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 1982. pp.59-65.
14. Thaler, E. y col. "Antithrombin III deficiency and thromboembolism". Clinics in Haematology. 10; pp.369-390. 1981.
15. Booth y col. "Plasmin-alfa₂-antiplasmin complex as an indicator of in vivo fibrinolysis". Brit. J. Haematol. 50; pp.537-541. 1982
16. Kisiel y cols. "Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin". Biochemistry. 16; pp.5824-5831. 1977

17. Marljar y cols. "Mechanism of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme". Blood. 59; pp. 1067-1072. 1982
18. Gardiner y col. "Studies of human protein C inhibitor in normal and factor V/VIII deficient plasmas". Thromb. Res. 36; pp.197-203. 1984
19. Bern y cols. "Response of protein C and protein C inhibitor to warfarin therapy in patient with combined deficiency of factors V y VIII". Thromb. Res. 36; pp.485-495. 1984
20. Francis y col. "A comparative study of comercial PTT reagents in a PTT based functional protein C assay". Thromb. Res. 36; pp.481-483. 1984
21. Francis y col. "A functional assay for protein C in human plasma" Thromb. Res. 32; pp.605-613. 1983.
22. Boyer y cols. "A new method for the estimation of protein C by ELISA". Thromb. Res. 36; pp.579-589. 1984
23. Bertina y cols. "Protein C deficiency in a Dutch family with thrombotic disease". Thromb. Haemostas. 48; pp.1-5. 1982.
24. Comp. y col. "Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs". J. of Clin. Invest. 68; pp.1221-1228. 1981
25. Conard y cols. "The fibrinolytic system in patients with congenital protein C deficiency". Thromb. Res. 36; pp.363-367. 1984.

26. Richard y cols. "Surgical implications of Antithrombin III deficiency" Surgery. 89; pp. 429-432. 1981
27. Pitney y cols. "Antithrombin III deficiency in an australian family". Brit. J. Haematol. 46; pp.147-149. 1980
28. Brandt y col. "Clinical laboratory determination of Antithrombin III". Am. J. Clin. Pathol. 73, 5; pp.687-691. 1980
29. Matsuo O. Letter to the editors in chief "Incidence of thrombosis in inherited antithrombin III deficiency" Thromb. Res. 21; pp.73-80. 1981
30. Belitsr y cols. "Quantitation of the inhibitory effect of fibrinogen and its degradation products on fibrin polymerization". Thromb. Res. 27, 3; pp. 261-269. 1982
31. Wiman y cols. "The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis". Laboratory and Clinical Medicine. 105, 2. pp.265-270. 1985
32. Winjgaards y cols. "Demonstration of urokinase related fibrinolytic activity in human plasma". Brit. J. Haematol. 51; pp.165-169. 1982
33. McNicol y col. EL sistema enzimático fibrinolítico. En: Coagulación sanguínea, hemostasia y trombosis. Rosemary Biggs (editor) 1a. edición española. Barcelona. Edit. JIMS. 1975. pp. 318-326
34. Brunson. Transtornos de la coagulación. En: Tratado de patología. 1a. edición en español. México. Interamericana S.A. 1975. pp. 320-322

35. Davidson y col. Assessment of the fibrinolytic system. In: Haemostasis and Thrombosis. Bloom, Thomas (editors). London, Churchill Livingstone. 1981. pp. 796-808
36. Kumada y col. "Purification and some properties of rat α_2 -plasmin inhibitor". Thromb. Res. 36; pp.143-152. 1984.
37. Kumada y col. "Physiological role of α_2 -plasmin inhibitor in rats". Thromb. Res. 36; pp. 153-163. 1984
38. Sakata y col. "Significance of crosslinking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis". J. Clin. Invest. 69; pp.536-542. 1982
39. Sakata y col. "Cross-linking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin by fibrin stabilizing factor" J. Clin. Invest. 65; pp.290-297. 1980.
40. Collen D. "On regulation and control of fibrinolysis". Edward Kowalski Memorial Lecture. Thromb. Res. 43. pp. 77-89. 1980.
41. Matsuo y cols. "Determination of α_2 -plasmin inhibitor in body fluids". Thromb. Res. 27, 5; pp.555-562. 1982
42. Gurewich y cols. "Effective and fibrin-specific clot lysis by a precursor form of urokinase (pro-urokinase)." A study in vitro and in two animal species".J. Clin. Invest. 73; pp.1731-1739. 1984
43. Pannell y col. "Pro-urokinase: A study of its stability in plasma and of a mechanism for its selective fibrinolytic effect" Blood. (J. Am. Soc. Hem.) 67, 5; pp.1215-1223 1986.

44. Ljungnéer y cols. "Human ureter, a source of tissue plasminogen activator". Thromb. Res. 34, 3.pp. 217-224. 1984
45. Wong y col. "Demonstration of the presence of plasminogen activator in human small intestine".Thromb. Res. 33, 4; pp. 389-399. 1984
46. Mackie, "Comparative studies on human activators of plasminogen". Brit. J. Haematol. 47. pp.77-90. 1981
47. Tran-Thang y cols. "Tissue-type plasminogen activator increases the binding of glu-plasminogen to clots". J. Clin. Invest. 74; pp. 2009-2016. 1984
48. Dunn y cols. "Importance of the interaction between plasminogen and fibrin for plasminogen activation by tissue plasminogen activator". Thromb. Res. 36; pp.345-351. 1984
49. Chimielewska y cols."Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma". Thromb. Res. 31; p.427.. 1983
50. Levin Eugene. "Quantitation and properties of the active and latent plasminogen activator inhibitors in cultures of human endothelial cells". Blood. 67, 5; pp. 1309-1313. 1986.
51. Aoki. "Influence of alpha₂-plasmin inhibitor or adsorption of plasminogen to fibrin" Thromb. Res. 19; pp.145-155. 1980.
52. Levin y cols. "Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from human endothelial cells in culture" J. Clinn. Invest. 74; pp.1988-1995. 1984

53. Gelehrter, "Thrombin induction of plasminogen activator-inhibitor in human endothelial cells in culture". J. Clin. Invest. 77; pp.165-169. 1986
54. Mimuro, "Release of alpha₂-plasmin inhibitor from plasma fibrin colts by activated coagulation factor XIII". J. Clin. Invest. 77; pp.1006-1013. 1986
55. Mustard, Packham. Mechanism in thrombosis. In: Haemostasis and Thrombosis. Bloom. Thomas (editors). 1st. published, London Churchill Livingstone. 1981. p.503
56. Marchesi. Disturbances in body water and circulation of blood. In: Pathology. Anderson. Kissane (editors). Vol.1 Saint Louis. The CV Mosby Company. 1977. 148. pp. 163-176
57. "Blood tests for diagnosis of venous and arterial thrombosis". J. Am. Soc. Haematol. 57. 1; pp. 1-5. 1981
58. Kumada. "Comparative study on heparin and synthetic thrombin inhibitor No. 805". Thromb. Res. 24; pp. 285-298 1981.
59. Knot y cols. "Purified radiolabeled antithrombin III metabolism in three families with antithrombin III deficiency: application of a three compartment model". Blood. (Am. Soc. Hematol). 67, 1; pp. 93-98. 1986
60. Sgrensen y cols. "Distinction of two pathologic antithrombin III molecules: antithrombin III "Aalborg" and antithrombin III "Budapest". Thromb. Res. 26, 3; pp. 211-219. 1982

61. Girolami y cols. "Antithrombin III Trento: A "new" congenital AT III abnormality with a peculiar crossed immunoelectroforetic pattern in the absence of heparin". Acta Haematológica. 72; pp. 73-82. 1984
62. Sembrano y cols. "Abnormal antithrombin III "Denver")". J. Clin. Invest. 77; pp. 887-893. 1986
63. Schipper y cols. "Antithrombin III deficiency in surgical intensive care patients" Thromb. Res. 21; pp.73-80. 1981
64. Mortensen y cols. "AT III as a predictor of postoperative pulmonary embolism". Thromb. Res. 37; pp. 555-559. 1985
65. Salem y cols. "Hypercoagulation in glomerulonephritis" Brit. Med. J. 282; pp. 2083-2085. 1981.
66. Weinstein y cols. "Abnormal factor VIII coagulant antigen in patients with renal dysfunction and in those with disseminated intravascular coagulation". J. Clin. Invest. 76, 4; pp. 1406-1411. 1985
67. Kauffman y cols. "Acquired antithrombin deficiency and thrombosis in the nephrotic syndrome". Am. J. of Med. 65; pp. 607-613. 1978.
68. Walter y cols. "Platelet hyperaggregability as a consequence of the nephrotic syndrome". Thromb. Res. 23, 6. pp. 473-479. 1981
69. Goldsmith y cols. The role of the normal and diseased liver in blood coagulation. In: CRC Handbook series in clinical lab science. Vol. III. Hematology. Seligson (editor in chief) Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 1980. p. 275

70. Girolami y col. (correspondence). "Thromboembolism and factor VII defect". Acta haematologica. 72, 5; pp.357-358 1984.
71. Marongio. "Alpha₂-antiplasmin and disseminated intravascular coagulation in liver cirrhosis". Thromb. Res. pp.287-294. 1985
72. Stein y col. "Kinetic and functional studies of platelets, fibrinogen and plasminogen in patient with hepatic cirrhosis". J. Lab. Clin. Med. 99, 2; pp.217-230. 1982
73. Hedner y col. "The role of fibrinolysis". Clinical Haematology. 10. pp. 327-342. 1981
74. Schultz. y col. "Incidence of an endothelial cell dysfunction in association with Behcet's disease". Thromb. Res. 34, 4; pp.277-285. 1984
75. Mettinger, K.L. y col. "A study of hemostasis in ischemic cerebrovascular disease" III. Thromb. Res. 26, 3; pp. 203 210. 1982.
76. Aviram y col. "The effect of human plasma on platelet function in familial hypercholesterolemia". Thromb. Res. 26, 2; pp. 101-109. 1982
77. Johnston y cols. "Prevention of lipid induced platelet aggregation by aspirin". Thromb. Res. 27, 2. pp. 235-239. 1982.
78. Suehiro y cols. "The role of the platelet hyperfunction on thrombus formation in hyperlipidemia". Thromb. Res. 25, 4. pp. 331-339. 1982

79. Bradlow y cols. "Platelet function in familial hypercholesterolemia in South Africa and effects of probucol". Thromb. Res. 26, 2; pp. 91-99. 1982
80. Gray. "Inhibition of antithrombin III by lipid peroxides" Thromb. Res. 37: pp. 241-250. 1985
81. Marder. "Molecular bad factors in thrombosis". The New England. J. of. Med. 310. pp. 588-589. 1984
82. Kazama y cols. "Abnormal plasminogen, a case of recurrent thrombosis". Thromb. Res. 21. pp. 517-522, 1981
83. Wohl y cols. "Physiological activation of the human fibrinolytic system: isolation and characterization of human plasminogen variants, Chicago I and Chicago II". J. Biol. Chem. 254. pp. 9063-9069. 1979
84. Aoki y cols. "Abnormal plasminogen. A hereditary molecular abnormality found in patient with recurrent thrombosis" J. Clin. Invest. 61. pp. 1186-1195. 1978.
85. Carrell y cols. "Hereditary dysfibrinogenemia in a patient with thrombotic disease" Blood, 62. pp. 439-447. 1983
86. Ebert "Fibrinogen Baltimore IV; Congenital dysfibrinogenemia with delayed fibrin monomer polymerization". Thromb. Res. 38. pp. 121-128. 1985
87. Soris y cols. "Episodes of increased fibronectin level observed in a patient suffering from recurrent thrombosis related to congenital dysfibrinogenemia (fibrinogen Malmo)" Brit. J. Haematol. 61, 4. pp. 727-738. 1985

88. Schriber y col. "Fibrinogen Seattle II: defective release of fibrinopeptide A in a slow clotting fibrinogen" Thromb. Res. 37. pp. 45-52. 1985
89. Murano G. Hypercoagulability and Thrombosis. In: Basic concepts in hemostasis and Thrombosis. Murano, Bick (editors). Boca Raton, Florida. The CRG Press Inc. 1982. pp.238-242.
90. "Haemostatic factors and coronary heartdisease". The Lancet. 3. pp.22-23. 1981
91. Mettinger KL. "A study of hemostasis in schemic cerebrovascular disease". Thromb. Res. 27, 2. pp.155-160. 1982
92. Dyerberg y col. "Recurrent thormbosis in a patient with factors XII deficiency" Acta Haemat. 63. pp. 278-282. 1980.
93. Jiménez y cols. "Thrombotic risk: a study in obese chil dren". Thromb. Res. 33. pp.445-450. 1984
94. Ljungnér y col. "Comparison of the plasminogen activator activity of superficial hand and foot veins". Thromb. Res. 28. pp. 617-623. 1982.
95. Saleem y col. "Evaluation of a reagent". Laboratory Medicine. 12, 5. pp.290-292. 1981.
96. Becker y cols. "A functional photometric assay for plasma fibrinogen". Thromb. Res. 35. pp. 478-484. 1984.
97. Hemker y cols. "The relation between clotting time and clotting velocity" Thromb. Haemost (Stuttgart) 41. pp.309-313. 1979.

98. Radial Immunodiffusion. Appendix 12. In: Human plasma proteins. Keyser. JW. Bath Avon. The Pitman Press. John Wiley and sons. 1979. pp. 289-291.
99. Gyzander "A sensitive assay for tissue plasminogen activator activity in plasma, using adsorption on lysine-sephasore". Thromb. Res. 35. pp. 547-558. 1984
100. Millar y col. "The rapid separation and assay of previously unreported plasminogen activators in human euglobulin fractions". 35. Thromb. Res. pp.291-299. 1984
101. Buckell M. "The effect of citrate on euglobulin methods of estimating fibrinolytic activity". J. Clin. Pathol. 11. pp. 403-404. 1958
102. Astrup y col. "The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity" Arch. Biochem. 10. pp. 346-351. 1952
103. Wohl. "Methods for studying fibrinolytic pathway components in human plasma" Thromb. Res. 27. pp. 523-535. 1982
104. Matsuda y cols. "Selective determination of alpha₂-plasmin inhibitor activity in plasma using chromogenic substrate" Thromb. Res. 33. pp. 379-388. 1984.
105. Lewis y col. "A thrombin assay based upon the release of fibrinopeptide a from fibrinogen: definition of a new thrombin unit". Thromb. Res. 34. pp. 111-120. 1984
106. Vila y cols. "A rapid method for isolation of fibrinogen from human plasma by precipitation with polyethylene glycol 6000". Thromb. Res. 39. pp. 651-656. 1985.

107. Peters y cols. "Rapid microanalysis of coagulation parameters by automated chromogenic substrate methods". Thromb. Res. 28. pp. 773-781. 1982
108. Biggs RM (editor). Apéndice 2. En: Coagulación sanguínea hemostasia y trombosis. 1a. edición Edit. JIMS. Barcelona 1975. p. 574
109. Keber. "Exhaustation of a arm fibrinolytic potential after repeated venous occlusions and local exercise". Thromb. Res. 28. pp. 693-704. 1982
110. Brommer EJP. "The level of extrinsic plasminogen activator (t-PA) during clotting". Thromb. Res. 34. pp, 109-115. 1984
111. Moroi y col. "Isolation and characterization of alpha₂ - plasmin inhibitor from human plasma". J. Biol. Chem. 251. pp. 5936-5965. 1976
112. Wohl y cols. "Kinetics of the activation of human plasminogen by different activator species at ph 7.4 and 37°C". J. Biol. Chem. 255. pp. 2005-2013. 1980
113. Mihalyi E. y col. "Letter to the editors in chief. Mislabeling of commercial fibronogen preparations: Bovine or human?". Thromb. Res. pp.725-728. 1984
114. Siefiring GE. y cols. "Development and analytical performance of a functional assay for fibrinogen on the Du Pont aca TM analizer". Clin. Chem. 28. pp. 614-617. 1983

115. Devegi E. y col. "Kinetic determination of fibrinogen with a centrifugal analyzer". Clin. Chem. 28. pp.1502-1505 1982.
116. Stocker y col. "The coagulant enzyme from bothrops atrox venom (batroxobin)" Methods in enzymology. 45. pp. 214-223. 1976.
117. Ranby y cols. "A sensitive assay for tissue plasminogen activator" Thromb. Res. 27, 6. pp. 743-749. 1982
118. Mussoni y cols. "A direct, plasmin independent assay for plasminogen activator" Thromb. Res. 34. pp.241-254. 1984
119. Wai-Pan-Chan. "An improved microtiter plate method to measure the potency of plasminogen activator". Thromb. Res. 36. pp. 467-474. 1984
120. Smith y cols. "A sensitive and specific assay for plasminogen activators" Thromb. Res. 37. pp. 533-541. 1985