

112361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY HOSPITAL

“Evaluación del Tiempo de Tromboplastina
parcial activado (TTPa) y el Tiempo de
Trombina para la determinación del efecto
atcoagulante de la Heparina No Fraccionada.

Estudio in vitro

TESIS DE POSGRADO

Que propone para obtener el título de la especialidad en
PATOLOGIA CLINICA

DRA. ALMA ROSA PEÑA MARTINEZ



ASESOR DE TESIS:
DR. JESUS I. SIMON DOMINGUEZ

México, D.F.

Septiembre 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



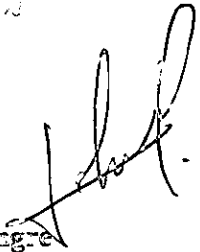
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

DIVISION DE ESPECIALIZACION
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
ESCUELA DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



DR. JESÚS I. SIMON DOMÍNGUEZ
Jefe de la División de Laboratorios y Banco de Sangre
Titular de la Especialidad de Patología Clínica
Asesor de Tesis
Hospital ABC



DR. JOSE J. ELIZALDE GONZALEZ
Jefe de Enseñanza e Investigación
Hospital ABC

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY
MEDICAL CENTER I.A.P.
13 SEP 2001
RECIBIDO
DIVISION DE EDUCACION E INVESTIGACION

AGRADECIMIENTOS

A ti Señor, que con tu gran amor y misericordia me permitiste vivir, conocerte y tener la esperanza de una vida eterna. Que me diste una familia que me ha amado y apoyado siempre y una pareja con quien he compartido los mejores años de mi vida. A tí, que me diste la oportunidad de realizar esta Especialidad y estar escribiendo este documento. A tí que me permitiste recibir el conocimiento y la experiencia de las personas que me han acompañado durante estos 3 años . A Ti, que me estás dando la oportunidad de iniciar una nueva etapa en mi vida personal y profesional.

GRACIAS POR SIEMPRE

INDICE

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
ANTECEDENTES.....	3
OBJETIVOS.....	12
HIPÓTESIS.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIÓN.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	37

**“Evaluación del Tiempo de
Tromboplastina parcial activado (TTPa)
y el tiempo de Trombina (TT) para la
determinación del efecto anticoagulante
de la Heparina No Fraccionada .
Estudio in vitro .”**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el descubrimiento de la Heparina, se han ensayado diversas pruebas de laboratorio para evaluar su efecto terapéutico. Después de muchos estudios, se ha recomendado el tiempo parcial de tromboplastina activado (TTPa) como la prueba de mayor utilidad; sin embargo, tal como lo ha hecho constar la literatura mundial, esta prueba tiene diversos factores intrínsecos que dificultan su eficiencia para determinar el efecto heparínico con la sensibilidad, precisión y exactitud deseada.

También está demostrado por estudios previos que la dosis de heparina calculada, la dosis administrada, el método de administración, la vía de administración y la patología subyacente de los pacientes, representan variables para la adecuada evaluación del efecto heparínico in vivo a través de las pruebas de laboratorio recomendadas.

Por otro lado, en los pacientes que están recibiendo anticoagulantes orales, el efecto heparínico puede ser modificado por un efecto aditivo de los dos anticoagulantes, haciendo aún más difícil su monitoreo.

Es por todo lo anterior, que es de gran importancia, la investigación de la utilidad de otras pruebas de coagulación como el tiempo de trombina (TT) y de las modificaciones necesarias a las pruebas de TTPa y TT para obtener mayor sensibilidad al efecto heparínico, que no representen un costo mayor y puedan ser accesibles para realizar en cualquier laboratorio.

ANTECEDENTES

Desde que la Heparina no Fraccionada (HNF) fue descubierta en 1916, por McLean, se sabe actualmente que por sus propiedades anticoagulantes, es efectiva para la prevención y tratamiento de la Trombosis venosa, la Tromboembolia pulmonar, la Trombosis mural después de un Infarto Agudo al Miocardio y la Re-trombosis coronaria post-trombolisis; además es también de utilidad en el tratamiento de la Angina Inestable y durante un Infarto Agudo al Miocardio, sin olvidar que es indispensable su utilización durante la Cirugía Cardiovascular. (3, 8, 10, 16).

La heparina no fraccionada (HNF) es un mucopolisacárido compuesto por la secuencia de cadenas de disacáridos que forman cadenas únicas las cuales contienen glucosamina, ácido urónico y una cantidad variable de grupos sulfatados, los cuales le confieren la característica de un ácido potente. Las cadenas de mucopolisacáridos tienen un peso molecular que varía entre 4,000 y 40,000 daltons y un peso promedio de 15,000 a 20,000.

(6). Al contrario, las heparinas fraccionadas o de bajo peso molecular, las cuales son compuestos derivados de la heparina no fraccionada, tienen un peso molecular de 1,000 a 10,000 (En promedio 4,000-5,000).

Existen diferencias entre las heparinas no fraccionadas y las de bajo peso molecular en consecuencia a sus propiedades químicas, que influyen de manera determinante en su efecto anticoagulante y antitrombótico, debido a las diferencias en cuanto a su biodisponibilidad, afinidad a proteínas plasmáticas, afinidad por las plaquetas,

inhibición por el factor 4 plaquetario , sus propiedades farmacocinéticas , su capacidad de inducir trombocitopenia, su vía de eliminación y su rapidez de depuración plasmática. (26)

Aproximadamente 20 años después de haber sido descubierta, Brinkhous y colaboradores demostraron que la heparina requería de un cofactor plasmático para lograr su actividad anticoagulante , el cual, en 1968, fue descrito por Abildgaard como actualmente se conoce: Antitrombina III (AT III) (4, 5). El término antitrombina es un tanto inespecífico, ya que como se sabe actualmente no sólo se une a trombina sino a otras proteasas de serina para ejercer su acción anticoagulante (27).

Fue en 1970, que Rosenberg y colaboradores dilucidaron los mecanismos de interacción entre la heparina y la antitrombina III con las enzimas de coagulación, con lo cual se inició el conocimiento del mecanismo por el cual la heparina tenía la capacidad de lograr la inactivación de éstas últimas y así llevar a cabo su efecto anticoagulante. En relación a esto, se conoce ahora que el mecanismo de acción de la heparina es la inhibición de la activación las proteasas de serina conocidas como factores IIa, Xa, XIIa, y IXa. Esta inhibición resulta de la interacción entre el complejo formado por la unión de la heparina y la antitrombina III (Complejo Heparina-AT III) con la proteasa de serina, lo cual provoca la inhibición de su activación.(6, 7, 14, 15, 17,).

En la molécula de trombina hay varios residuos de arginina en su región aminoterminal los cuales representan el sitio de unión con la secuencia de pentasacáridos específicos localizada en la molécula de heparina . Este sitio de unión de

trombina a heparina es totalmente diferente al sitio de unión que la trombina tiene para unirse con la antitrombina III.

La actividad anticoagulante de la heparina depende de su propiedad para acelerar la formación de un complejo molecular entre la antitrombina III y las proteasas de serina de la coagulación.(27)

Los mecanismos para inhibir a los factores IIIa y Xa parecen ser diferentes y varían dependiendo del tipo de heparina utilizada. (27).

La relación de la inhibición sobre los factores IIIa y Xa es de 1:1 con la heparina no fraccionada, a diferencia de 2:1 - 4:1 para las heparinas de bajo peso molecular, lo cual significa que la heparina no fraccionada tiene un efecto inhibitorio sobre la trombina mucho mayor que las heparinas de bajo peso molecular. Esto lo que le confiere la particularidad de tener un alto poder anticoagulante y antitrombótico. Al contrario, las heparinas de bajo peso molecular tienen un menor efecto anticoagulante con un alto poder antitrombótico (26).

Después de su administración por vía subcutánea o intravenosa, sólo una tercera parte de la heparina se liga a antitrombina III (ATIII) y es responsable del efecto anticoagulante. (18,19). Este fenómeno contribuye a su reducción bio-disponibilidad con bajas concentraciones plasmáticas y a la variabilidad de la respuesta anticoagulante a dosis estándar calculadas por kilo para pacientes diferentes; también es responsable del fenómeno de "Resistencia a Heparina" en pruebas de laboratorio, el cual se hace evidente cuando a pesar de estar administrando dosis muy altas de heparina por vía intravenosa, el TTPa no se prolonga en la proporción esperada. (20,21)

La heparina tiene una vida media biológica que puede variar desde 30 min hasta 150 minutos dependiendo de la dosis administrada y la vía de administración, debido a que a mayores dosis además de la tercera parte que se une a antitrombina III, otra parte de la heparina se une a una molécula conocida como Cofactor II de la heparina, lo cual contribuye a mantener durante más tiempo el efecto anticoagulante (6).

El efecto anticoagulante de la heparina se incrementa en intensidad y duración de manera proporcional a la dosis administrada.

De la misma manera, el riesgo de sangrado se incrementa proporcionalmente con el incremento de la dosis, por lo cual se requiere un monitoreo continuo del efecto anticoagulante de la heparina, para lo cual otros autores han propuesto algunos esquemas de dosificación y evaluación a través de pruebas de laboratorio como el TTPa (22,23,24).

Una amplia variedad de pruebas de laboratorio han sido propuestas para evaluar la terapia heparínica con el objetivo de determinar un efecto anticoagulante óptimo y prevenir el riesgo de sangrado. Entre estas se han incluido a través de la historia: el Tiempo de Coagulación en Sangre Total (WBCT), el Tiempo de Coagulación Activado en Sangre Total (ACT), el Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado (TTPa), el Tiempo de Trombina y la Determinación de los Niveles de Heparina en Plasma. (10)

El efecto anticoagulante de la heparina es usualmente evaluado según la medición del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), una prueba sensible a los efectos de la heparina sobre los factores IIa, Xa y IXa. (25).

Desafortunadamente los diferentes reactivos (Tromboplastinas) comerciales para medir TTPa varían considerablemente en su respuesta (sensibilidad) a la heparina. Para la

mayoría de reactivos, un efecto terapéutico es alcanzado con un rango de 1.5-2.5 (el cual representa el cociente del TTPa en segundos observado entre el plasma problema y el promedio del laboratorio obtenido de un pool de plasmas de pacientes sanos). Así, con reactivos de tromboplastina muy sensibles a la heparina, el rango terapéutico del TTPa sería mayor que con reactivos menos sensibles. Por ello es recomendable estandarizar los reactivos de tromboplastina comerciales calibrándolos contra el nivel terapéutico de heparina, el cual puede ser de 0.2 - 0.4 U de Heparina /ml utilizando el Método de Titulación de Protamina o de 0.3 - 0.6 U /ml utilizando el Método Cromogénico de Medición de Anti- factor Xa). (7, 10,11,13,14).

Algunos estudios han encontrado que a niveles terapéuticos de heparina (0.3-0.6U/ml), el rango de TTPa se encuentra entre 70-100 seg., según el reactivo de tromboplastina utilizado. (8)

Se ha demostrado que la sensibilidad de la tromboplastina a la heparina está relacionada con la naturaleza del activador, el tipo de fosfolípido presente en el reactivo, el tiempo de incubación de la prueba y la concentración de Cloruro de Calcio utilizada; además de que está bien demostrado por otros estudios que los reactivos de TTPa que contienen Sílice como activador son más sensibles a la heparina que los que contienen Acido Elálgico. (10,12)

Se han establecido métodos para determinar la sensibilidad de las tromboplastinas a la heparina. Uno de ellos es determinar la relación semi-logarítmica entre la concentración de heparina y el TTPa en segundos a través del método de Regresión Lineal ($r > 0.97$, $p < 0.01$). La inclinación del trazo logarítmico TTPa-heparina es una

medida de la sensibilidad del sistema a la heparina. Otra medida de la sensibilidad del sistema a la heparina es la relación entre TTPa obtenido con 0.0 y con 0.2 U heparina/ml, el cual será diferente según la tromboplastina utilizada. Esto quiere decir que el rango de TTPa recomendado de 1.5 - 2.5 veces sobre el promedio del testigo, puede resultar en sobre-heparinización cuando se utilizan tromboplastinas poco sensibles. (10)

Por otro lado, se ha demostrado que un sistema de evaluación de la terapia heparínica debe ser capaz de distinguir entre el rango normal (0.3-0.6U/ml) y los niveles sub-terapéuticos de heparina (menor de 0.2U/ml). De la misma manera, una tromboplastina también debe ser capaz de distinguir entre el rango terapéutico y los niveles "tóxicos" de heparina.

La relación entre la concentración de Heparina y el TTPa es de tipo semi-logarítmica, de manera que en presencia de altas concentraciones de heparina hay grandes diferencias en el TTPa en relación a sólo pequeñas diferencias en la concentración de heparina.

Con un reactivo de tromboplastina muy sensible al efecto heparínico, puede ser difícil distinguir entre pequeños pero significativos cambios en las concentraciones de heparina, debido a que un gran cambio en el TTPa se corresponderá con sólo un pequeño cambio en la concentración de la heparina y esto no debe ser interpretado como indicativo para modificar la dosificación establecida de heparina. (10)

En conclusión, los reactivos muy sensibles al efecto heparínico, pueden distinguir muy bien entre el rango terapéutico y niveles sub-terapéuticos de heparina, pero pueden presentar problemas para distinguir entre niveles supra-terapéuticos de heparina y

niveles tóxicos de éste. En cambio, los reactivos poco sensibles pueden tener problemas para distinguir entre niveles sub-terapéuticos de heparina y los niveles terapéuticos, pero pueden distinguir con facilidad entre niveles supra-terapéuticos y niveles tóxicos.

Por lo anterior es necesario que cada laboratorio estandarize su TTPa según la sensibilidad de su tromboplastina a la heparina y la de a conocer a los clínicos para que pueda darse una interpretación adecuada a los resultados obtenidos, lo que contribuirá a una óptima evaluación del nivel de anticoagulación de sus pacientes. (10)

Por otro lado, otros estudios han encontrado que hay pacientes en los que a pesar de estar recibiendo dosis altas de heparina por día (mayores de 35,000 U/día) tienen rangos bajos de TTPa y este fenómeno conlleva a la probabilidad de que el clínico incremente aún más la dosis de heparina en un intento de incrementar el rango de TTPa a los niveles deseados, lo que a su vez, elevará el riesgo de sangrado en el paciente. Este fenómeno puede suceder cuando existe en la circulación un exceso de precoagulantes como el factor VIII que es un reactante de fase aguda, los cuales pueden interferir en la respuesta del TTPa a la heparina obteniéndose una prolongación de éste a niveles muy por debajo de los esperados. En estos casos, algunos autores han recomendado utilizar para el monitoreo del nivel de anticoagulación, la determinación directa de los niveles de heparina en plasma, y evaluar los cambios en la dosificación de la heparina según los niveles plasmáticos encontrados en el paciente y los niveles terapéuticos recomendados (entre 0.3-0.6 U/ml) . (11)

En relación a las diferencias entre los instrumentos y métodos utilizados en la medición del TTPa, se ha encontrado que los métodos foto - ópticos demuestran mayor precisión en la obtención de los resultados. (10)

Por último, pero considerado como un aspecto de gran importancia, para la adecuada evaluación de la terapia heparínica, es indispensable recordar que las pruebas de coagulación son interferidas de manera determinante por fenómenos Pre-Analíticos relacionados con la calidad de las muestras obtenidas para el análisis, y por factores Analíticos relacionados con el procesamiento de las pruebas. Es por ello que la NCCLS ha emitido algunas recomendaciones que se encuentran disponibles para todos los laboratorios con el objeto de optimizar los métodos de colección, transporte y procesamiento de las muestras para pruebas de coagulación. Entre estas recomendaciones pueden citarse las siguientes:

1.- Para la obtención de muestras: Deberá obtenerse sangre total en un tubo con citrato a una concentración de 10.9-12.9 mol/L, manteniendo una relación 1:9 entre la cantidad de anticoagulante y la de sangre, mediante una única punción con aguja calibre 21-19 para adultos o 23 para niños, en la cual el torniquete sea retirado una vez que comienza el flujo de sangre dentro del tubo para evitar la activación de factores de contacto.

En el caso de que la muestra sea obtenida a través de un catéter, éste deberá ser lavado con solución salina y deberán desecharse los primeros 5 ml de sangre obtenida.

2.- Transporte de muestras: Estas deberán ser remitidas al área de procesamiento del laboratorio de manera inmediata conservándolas frescas pero no refrigeradas después de haber agitado suavemente el tubo por lo menos 3 veces para lograr una adecuada mezcla entre el anticoagulante y la sangre para evitar la formación de coágulos indeseables.

3.- Centrifugación: Esta deberá realizarse dentro de los primeros 30 minutos después de la obtención, a 1500 g durante 15 minutos. Posteriormente es recomendable separar el

plasma en tubos de plástico si no va a ser procesado dentro de las primeras 2 hrs de la separación .

4.- Aceptación de muestras: No deberán aceptarse muestras cuyo plasma obtenido después de la centrifugación se encuentren con hemólisis o lipemia visible ya que esto puede interferir en la lectura obtenida por los instrumentos de medición.

5.-Procesamiento: Deberá realizarse dentro de las primeras 2 hrs después de la obtención si el plasma se conserva a temperatura ambiente, dentro de las primeras 4 hrs si es conservado en temperatura de refrigeración, dentro de las 2 primeras semanas si es conservado a -22°C de temperatura y dentro de los 6 meses si fue rápidamente congelado y mantenido a -60°C después de obtenerse.

Las muestras que requieran ser procesadas después de haberse mantenido en congelación, deberán descongelarse rápidamente a 37°C para evitar la alteración química de los factores de coagulación.

6.- La NCCLS tiene recomendaciones específicas para que el laboratorio pueda ofrecer un resultado óptimo, entre las que se encuentran: control de calidad de equipos, reactivos, refrigeradores, control de calidad interno y externo que valide la precisión y exactitud de los resultados , así como la determinación de los intervalos de referencia obtenidos por cada laboratorio. (13)

OBJETIVOS

Objetivo General:

* Evaluar, bajo condiciones controladas en el laboratorio, el comportamiento del TTPa y TT, en plasmas heparinizados con Heparina no Fraccionada, para optimizar su utilidad en la determinación del efecto anticoagulante y el monitoreo del nivel de anticoagulación.

Objetivos específicos:

*Determinar cuál es la prueba de coagulación más sensible para asegurar efecto heparínico .

*Determinar el rango de TTPa alcanzado con niveles terapéuticos de heparina, con la tromboplastina utilizada en nuestro laboratorio.

*Determinar la utilidad del TT y el TTPa para determinar niveles sub-terapéuticos, terapéuticos y supra-terapéuticos de heparina.

*Determinar cómo se afecta el TTPa y el TT al adicionar heparina en diferentes concentraciones a los plasmas de pacientes que están recibiendo anticoagulantes orales y tienen INR diferentes.

HIPÓTESIS

Nula:

El TTPa y el TT no son pruebas útiles para determinar el efecto heparínico ni para evaluar el nivel de anticoagulación cuando se utiliza Heparina No fraccionada.

Alternativa:

El TTPa y el TT son pruebas útiles para determinar el efecto heparínico y para evaluar el nivel de anticoagulación cuando se utiliza Heparina No Fraccionada.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Este fue un Estudio Prospectivo y Experimental realizado en el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital ABC.

REACTIVOS Y EQUIPO DE MEDICION

Se utilizó como reactivo para la medición del TTPa Tromboplastina activada (Actin) de Dade Behring y Cloruro de Calcio 0.02 Molar ; para la medición del TT , la Trombina bovina de Dade Behring, y para la medición del TP, la Tromboplastina humana de Dade Behring.

Se utilizó Heparina Sódica de origen porcino (Inhepar) 1000 U/ml para preparar las diferentes concentraciones de heparina en el pool de plasmas .

Se utilizó Solución salina isotónica al 0.9 % para realizar las diluciones de los plasmas.

La medición del TTPa , TP, TT y niveles de fibrinógeno se realizó en el equipo CA SYSMEX-DADE a través de un método foto-óptico

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

1.-Se utilizaron para el estudio plasmas pobres en plaquetas obtenidos por centrifugación a 1500 g durante 15 minutos de sangre total citratada que mantuviera una relación anticoagulante plasma de 1:9 y una concentración de citrato de sodio de

3.8% , los cuales se separaron en tubos de plástico siguiendo los requerimientos de la NCCLS. (13)

2.-Se estandarizó como método para obtener un pool de plasmas normales el siguiente: plasmas pobres en plaquetas obtenidos bajo las condiciones especificadas en el inciso (2) de un mínimo de 10 donadores sanos del Banco de Sangre que no estuvieran recibiendo medicamentos , obtenidos bajo los lineamientos de la NCCLS.

PRUEBAS REALIZADAS

3.- Se midieron TP, TTPa y TT en pool de plasmas normales y con diluciones con solución salina 0.9% 1:2, 1:4 y 1:8.

4.-Se midieron TP, TTPa y TT en pool de plasmas adicionado con heparina no fraccionada a concentraciones de 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, y 0.9 U/ml . Se realizaron diluciones 1:2, 1:4, 1:8 con solución salina 0.9% y se volvieron a medir los mismos tiempos de coagulación. Se realizaron correcciones con pool de plasmas normales cuando el valor de la prueba excediera en 2 o más segundos el del basal sin heparina y se volvieron a realizar las mismas pruebas.

5.- Se preparó reactivo para TT a concentraciones de trombina de 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 U/ml y la concentración convencional de trombina utilizada en el laboratorio (4.1 U/ml) y se midió TT en el pool de plasmas normales. Se realizaron diluciones con solución salina al 0.9% 1:2, 1:4 y 1:8 y se midió nuevamente TT para cada una.

6.- Se midió TT en los plasmas heparinizados con las diferentes concentraciones de heparina mencionadas en el inciso (4) a cada una de las concentraciones de trombina preparadas (inciso 5) . Se realizaron correcciones 1:2, 1:4 y 1:8 con pool de plasmas

normal cuando el TT obtenido excedió en 2 o más segundos del basal sin heparina y se volvió a medir TT para cada una.

7.- Se obtuvieron plasmas al azar de pacientes que estaban recibiendo anticoagulantes orales y tuvieran INR entre 1.5-3.5 y se adicionaron con las concentraciones de heparina no fraccionada mencionadas en el inciso (4) a los cuales se les midió TP, TTPa y TT.

8.- Se midió TTPa y TT (con 5 U de trombina / ml) en plasmas heparinizados a dosis supra-terapéuticas de 1-4 U de heparina/ml y se realizaron correcciones con plasma normal a las diluciones necesarias si el resultado obtenido era igual o mayor de 2 segundos en relación con el basal, y se volvieron a realizar las mismas pruebas.

9.- Se midieron TTPa y TT (con 5 U de trombina / ml) en plasmas heparinizados a dosis sub-terapéuticas de 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20 U de heparina /ml y se realizaron correcciones con plasma normal a las diluciones necesarias si el resultado obtenido era igual o mayor a 2 segundos por arriba del basal y se volvieron a realizar las mismas pruebas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se definió como "Diferencia Significativa" para cualquier tiempo de coagulación medido, si el cociente obtenido entre el valor en el plasma problema y el pool de plasmas normales era igual o mayor de 1.2, lo cual representó una diferencia mayor del 20% (a este resultado se le denominó Índice = Problema / Basal).

Se definió como "Corrección" cuando el cociente del resultado obtenido entre el plasma probado y el basal fuera menor de 1.2.

RESULTADOS

1.- Al realizar las pruebas de TP, TTPa, TT y Fibrinógeno basales y con diluciones con solución salina 0.9% 1:2 (50% de factores), 1:4 (25% de factores) y 1:8 (12.5% de factores) se encontró que el TTPa fue la prueba más alterada, ya que no se obtuvo coagulación a partir de la dilución 1:4 en comparación con el TP, el cual sólo se alteró significativamente con respecto al basal a partir de la dilución 1:2 (15.8/12.5 seg. Índice 1.26) y el TT que sólo se prolongó significativamente hasta la dilución 1:8 (18/14 seg. Índice 1.28) . (Tabla No. 1)

Tabla No. 1. BASAL Y DILUCIONES SALINAS EN POOL DE PLASMAS NORMAL

	TP (seg) / Índice	TTPa (seg) / Índice	TT (seg) / Índice	FIB (mg/dl)
BASAL	12.5	25	14	271
DIL 1:2	15.8 / 1.26	29 / 1.16	14 / 1.00	193
DIL 1:4	24.6 / 1.98	> 200	15 / 1.01	122
DIL 1:8	> 80	> 200	18 / 1.28	< 90

Nota: Índice = Problema/Basal

2.- Cuando se midieron TP, TTPa y TT en plasmas heparinizados a diferentes concentraciones de heparina (0.1-0.9 U/ml) se encontró que:

- a): Para el TP no hubo alteraciones significativas aún con concentraciones de 0.9 U/ml.
- b): Para el TTPa, se encontró prolongación significativa del TTPa a partir de la concentración 0.2 U de heparina /ml (35/25 Seg. Índice 1.40).
- c): Con respecto al TT, se encontró prolongación significativa desde la concentración de 0.1 U de heparina/ml (23/14 Seg. Índice 1.84) y a partir de la concentración 0.2 U/ml no se obtuvo coagulación. (Tabla No. 2)

Tabla No. 2. POOLDE PLASMAS NORMAL CON HEPARINA 0.0-0.9 U / ml

HEPARINA U / ml	TP (seg) / Indice	TTPa (seg) / Indice	TT (seg) / Indice	FIB mg/dl
0.0 (Basal)	12.5	25	14	271
0.1	12.7 / 1.01	29 / 1.16	23 / 1.84	278
0.2	13.3 / 1.06	35 / 1.40	> 120	244
0.3	12.5 / 1.00	39 / 1.56	> 120	280
0.4	12.7 / 1.01	43 / 1.72	> 120	286
0.5	12.9 / 1.03	53 / 2.12	> 120	292
0.6	13.1 / 1.04	58 / 2.32	> 120	280
0.7	13.3 / 1.06	68 / 2.72	> 120	286
0.8	13.5 / 1.08	85 / 3.40	> 120	278
0.9	13.9 / 1.11	102 / 4.08	> 120	280

Nota: Indice = Problema / Basal

3.- Cuando se realizaron diluciones salinas de estos mismos plasmas, el fenómeno fue más evidente :

a): Para el TP, se encontró prolongación significativa con un índice de 1.36 (17.1/12.5 seg.), desde la dilución 1:2 con concentración de 0.1 U/ml de heparina .

b): Para el TTPa a la dilución 1:2 y con concentración de heparina de 0.1 U/ml el índice fue de 1.88. (17/25 seg.).

c): Para el TT a la dilución 1:2 y con concentración de 0.1 U/ml de heparina, el índice fue de 1.64 (23/16 seg.). (Tabla No. 3)

**TABLA No. 3 POOL DE PLASMAS HEPARINIZADOS CON DILUCIONES
SALINAS**

HEPARINA U/ml	TP (seg) / Indice 1:2	TTPa (seg) / Indice 1:2	TT (seg) / Indice 1:2
0.0 (Basal)	12.5	25	14
0.1	17.1 / 1.36	47 / 1.88	23 / 1.64
0.2	18.3 / 1.46	66 / 2.64	108 / 7.71
0.3	16.3 / 1.30	59 / 2.36	> 120
0.4	16.9 / 1.35	71 / 2.84	>120
0.5	17.2 / 1.37	86 / 3.44	>120
0.6	17.2 / 1.37	117 / 8.68	>120
0.7	18.0 / 1.44	140 / 5.60	>120
0.8	17.9 / 1.43	130 / 5.20	>120
0.9	18.5 / 1.48	154 / 6.16	>120

Nota: Indice = Problema / Basal

4.-El rango de TTPa encontrado con la tromboplastina utilizada con niveles terapéuticos de heparina (0.3-0.6 U/ml) fue de 1.56-2.32, que corresponde a 39-58 segundos . (Tabla 2).

5.- Cuando se midió TT con pool de plasmas normales (Basal) y con diluciones con solución salina 1:2, 1:4, 1:8 con las diferentes concentraciones de trombina preparadas se encontró que la concentración óptima para detectar niveles iguales o menores de 100 mg/dl de fibrinógeno es de 4-5 U de trombina/ml. (Tabla No. 4).

**Tabla No. 4. TT CON CONCENTRACIONES 1-6 U DE TROMBINA /ml EN POOL
DE PLASMAS NORMAL Y CON DILUCIONES**

TROMBINA	TT Basal	TT 1:2	TT 1:4	TT 1:8
U / ml	(seg) / Indice	(seg) / Indice	(seg) / Indice	(seg) / Indice
1	46	49 / 1.06	53 / 1.15	60 / 1.30
2	28	30 / 1.07	33 / 1.17	41 / 1.46
3	27	29 / 1.07	31 / 1.14	39 / 1.44
4	15	17 / 1.13	20 / 1.33	26 / 1.73
5	14	16 / 1.14	19 / 1.35	27 / 1.92
6	12	13 / 1.08	14 / 1.16	20 / 1.66
FIB	288	144	72	36

Nota : Indice = Problema / Basal

6.- No se obtuvo coagulación al medir TT en plasmas heparinizados a partir de la concentración de 0.2 U de Heparina /ml con concentraciones entre 1-6 U de trombina.

(Tabla No. 5)

7.- Al medir TT utilizando la concentración de trombina de 5 U /ml, al realizar las correcciones con plasma normal en los plasmas heparinizados , se encuentra lo siguiente:

a): Corrección en plasmas con concentraciones de 0.1 U de heparina /ml desde la dilución 1:2 (10/17 seg. Índice 1.05), y con concentraciones de 0.2 U de heparina /ml desde la dilución 1:4 (15/17 seg. Índice 1.11). (Tabla No. 5)

b): Corrección en plasmas con concentraciones entre 0.3-0.6 U de heparina /ml hasta la dilución 1:8 (16/17, 17/17, 18/17 y 20/17 seg. Índices de 0.94, 1.00, 1.05 y 0.17 respectivamente). (Tabla No. 5).

c): No se obtuvo corrección en plasmas con concentraciones de 0.7 U- 1 U de heparina /ml a la dilución 1:8. (23/17, 29/17, 31/17 y 37/17 seg. Índices de 1.35, 1.70, 1.82 y 2.17 respectivamente. (Tabla No. 5)

Tabla No. 5. TT CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TROMBINA EN
 POOL HEPARINIZADO A CONCENTRACIONES DE 0.1 - 1.0 U / ml

(Seg) / Indice

TROMBINA	BA- SAL	0.1 U	0.2 U	0.3 U	0.4 U	0.5 U	0.6 U	0.7 U	0.8 U	0.9 U	1.0 U
TT 1 U TR	50	> 120	>120	>120	>120	120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:2	56	57/ 1.14	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:4	56	56/ 1.12	>120	>120	>120	>120	120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:8	51	52/ 1.04	57/1.14	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
TT 2 U TR	25	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:2	25	43/ 1.84	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:4	25	28/ 1.16	46/ 1.84	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:8	24	26/ 1.00	28/ 1.12	38/ 1.56	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
TT 3 U TR	22	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:2	24	35/ 1.59	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:4	24	26/ 1.09	35/ 1.59	36/ 1.59	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:8	22	23/ 0.95	26/ 1.18	31/ 1.40	43/ 1.85	53/ 2.40	111/ 5.0	>120	>120	>120	>120
TT 4 U TR	23	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:2	22	22/ 1.00	38/ 1.66	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:4	19	19/ 0.86	22/ 0.95	26/ 1.13	33/ 1.43	71/ 3.08	117/ 5.0	>120	>120	>120	>120
CORR 1:8	18	17/ 0.77	18/ 0.78	20/ 1.18	20/ 1.18	23/ 1.27	28/ 1.21	34/ 1.47	44/ 1.91	52/ 2.26	126/ 5.4
TT 5 U TR	17	32/ 1.88	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:2	16	18/ 1.06	35/ 2.23	66/ 3.29	134/ 7.8	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:4	16	17/ 1.00	19/ 1.11	21/ 1.23	23/ 1.36	32/ 1.88	59/ 3.47	125/ 7.3	>120	>120	>120
CORR 1:8	15	15/ 0.88	16/ 0.88	16/ 0.94	17/ 1.00	18/ 1.06	20/ 1.17	33/ 1.59	39/ 1.70	31/ 1.32	37/ 2.17
TT 6 U TR	15	22/ 1.46	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:2	13	16/ 1.00	18/ 1.20	28/ 1.86	56/ 3.66	112/ 7.4	>120	>120	>120	>120	>120
CORR 1:4	13	14/ 0.93	15/ 1.00	16/ 1.06	18/ 1.20	21/ 1.40	26/ 1.73	34/ 2.26	45/ 3.00	129/ 8.6	>120
CORR 1:8	13	13/ 0.86	13/ 0.86	14/ 0.93	16/ 1.00	16/ 1.00	16/ 1.06	17/ 1.13	19/ 1.26	108/ 7.2	>120

Nota : Indice (I) = Problema / Basal

8.- Al realizar correcciones con plasma normal y medir TT utilizando la concentración de trombina de 5 U/ml y TTPa en plasmas con concentraciones de heparina de 2-4 U/ml, se encontró corrección del TT a partir de la dilución 1:32 (14/12, 13/12, 13/12 seg. Indices de 1.16, 1.08, y 1.08 respectivamente) y para el TTPa con 2 U de heparina a la dilución 1:16 (31/27 seg. Índice 1.14) y a partir de la dilución 1:32 para concentraciones 3-4 U de heparina/ml (29/27, 31/27 seg. Índice 1.07 y 1.14 respectivamente. (Tabla No. 6)

9.- Al realizar correcciones con plasma normal y medir TTPa y TT en plasmas con concentraciones de heparina de 0.05-2.0 U/ml, se encontró que el TTPa no mostró modificaciones y el TT se prolongó significativamente a partir de la concentración de 0.10 U/ml, no hubo coagulación con 0.20 U heparina/ml y hubo corrección con plasma normal a la dilución 1:2 en todas ellas. (Tabla No. 7)

TABLA No. 6 . TT CON CONCENTRACIÓN 5 U /ml DE TROMBINA EN PLASMAS

HEPARINIZADOS CON 2.0-4.0 U /ml

HEPARINA	YTPa (seg) / Indico	TT (seg) / Indico
BASAL	27	12
2 UH	> 200	> 120
CORR 1:2	94 / 3.48	> 120
CORR 1:4	53 / 1.96	> 120
CORR 1:8	36 / 1.33	31 / 2.58
CORR 1:16	31 / 1.14	16 / 1.33
CORR 1:32	28 / 1.03	14 / 1.16
CORR 1:64	29 / 1.07	12 / 1.00
CORR 1:128	13 / 0.48	13 / 1.08
3 UH	> 200	> 120
CORR 1:2	177 / 6.56	> 120
CORR 1:4	77 / 2.85	> 120
CORR 1:8	46 / 1.70	> 120
CORR 1:16	34 / 1.25	34 / 2.83
CORR 1:32	29 / 1.07	16 / 1.33
CORR 1:64	27 / 1.00	13 / 1.08
CORR 1:128	27 / 1.00	13 / 1.08
CORR 1:256	26 / 0.96	13 / 1.08
CORR 1:512	26 / 0.96	13 / 1.08
4 UH	> 200	> 20
CORR 1:2	> 200	> 120
CORR 1:4	119 / 4.40	> 120
CORR 1:8	66 / 2.07	> 120
CORR 1:16	38 / 1.40	138 / 11.5
CORR 1:32	31 / 1.14	18 / 1.50
CORR 1:64	28 / 1.03	15 / 1.25
CORR 1:128	27 / 1.00	13 / 1.08
CORR 1:256	26 / 0.96	13 / 1.08
CORR 1:512	26 / 0.96	13 / 1.08

**Tabla No. 7 TTP_a Y TT EN POOL DE PLASMAS HEPARINIZADOS CON
CONCENTRACIONES DE HEPARINA ENTRE 0.05-2.0 U/ml**

HEPARINA U / ml	TTP _a (seg) / Índice		TT (seg) / Índice	
	Base:	Corr 1:2	Base:	Corr 1:2
Base:	27		12	
0.05	27/1.00		13/1.00	
0.10	29/1.07	27/1.00	16/1.33	14/1.16
1.15	34/1.25	27/1.00	31/2.38	13/1.00
0.20	36/1.33	30/1.11	3/120	14/1.16

9.- Al medir TP, TTPa y TT con plasmas de pacientes que estaban recibiendo cumarínicos a los cuales se les adicionó heparina a diferentes concentraciones, se encontró que:

a): El TT tuvo el mismo comportamiento que con los plasmas no heparinizados, prolongándose significativamente a partir de 0.1 U Heparina /ml y no coagulando a partir de 0.2 U /ml, independientemente del INR del plasma.

b): El TTPa se prolongó de manera significativa en pacientes con TP con INR mayores de 1.5 cuando se adicionaron concentraciones iguales o mayores de 0.2 U/ml de heparina.

c): El TTPa se prolongó en rangos mayores cuanto mayor fue el TP basal del paciente

d). El TP se prolongó significativamente a partir de concentraciones de 0.3 U de heparina de forma independiente al INR basal. (Tabla No. 8)

**Tabla No. 8. TP, TTP y TT EN PLASMAS DE PACIENTES EN TRATAMIENTO
CON CUMARINICOS ADICIONADOS CON HEPARINA A CONCENTRACIONES
0.1-0.7 U / ml**

**Concentración de heparina relacionada con
prolongaciones significativas**

INR BASAL	TP	TTP_a	TT
1.5	0.3 U/ml	0.3 U/ml	0.1-0.2 U/ml
2.0	0.3 U/ml	0.2 U/ml	0.1-0.2 U/ml
2.5	0.3 U/ml	0.2 U/ml	0.1-0.2 U/ml
3.0	0.3 U/ml	0.2 U/ml	0.1-0.2 U/ml
3.5	0.3 U/ml	0.1 U/ml	0.1-0.2 U/ml

DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos al medir TP, TTPa y TT basales y con diluciones con solución salina al 0.9% del pool de plasmas normales, se encontró que el TTPa fue la prueba más alterada al disminuir la concentración de factores de coagulación como consecuencia de la dilución, ya que no se obtuvo coagulación con concentraciones iguales o menores del 25%. En cambio, el TP y el TT sólo presentaron prolongaciones significativas al disminuir las concentraciones de factores a 50% y 12.5 % respectivamente, lo que sugiere que el reactivo de tromboplastina utilizado en este estudio es de sensibilidad similar a la reportada en otros estudios para detectar este nivel de deficiencia de factores de coagulación. (Tabla No. 1).

Cuando se midieron TP, TTPa y TT en plasmas heparinizados con concentraciones de 0.1-0.9 U de heparina /ml, se observa que el TT es la prueba más afectada , ya que presenta prolongación significativa desde la concentración 0.1 U heparina/ml y a partir

de la concentración 0.2 U de heparina /ml no se obtiene coagulación, lo que significa que esta es la prueba más sensible al efecto heparínico cuando se utiliza heparina o fraccionada, y por lo tanto, es la prueba recomendada para detectar niveles sub-terapéuticos de heparina. (Tabla No. 2 y 3)

El TTPa se prolongó significativamente a partir de que se utilizaron concentraciones iguales o mayores de 0.2 U/ml, lo que significa que esta prueba es sensible para detectar desde niveles de sub-terapéuticos de 0.2 U / ml, lo cual se demuestra también observando los resultados del TTPa obtenidos cuando se realizaron diluciones salinas de estos plasmas y los obtenidos utilizando concentraciones desde 1.15 U de heparina/ml.

(Tabla No. 2, 3 y 7)

En relación al rango de TTPa encontrado con concentraciones terapéuticas de Heparina (0.3-0.6 U/ml) se observa que éste se encuentra entre los límites reportados en la literatura revisada (1.56-2.32 en nuestro estudio y 1.5-2.5 en la literatura respectivamente), lo que significa que la tromboplastina utilizada tiene adecuada sensibilidad a la heparina no fraccionada (Tabla No. 2).

Los resultados presentados en la tabla No. 5 muestran que si se utiliza la medición de TT con una concentración de trombina de 5 U /ml , es posible detectar y diferenciar mediante correcciones con plasma normal entre niveles sub-terapéuticos (iguales o menores de 0.2 U/ml) , terapéuticos (0.3-0.6 U/ml) y supra-terapéuticos (iguales o mayores de 7 U /ml) de heparina no fraccionada. Como se observa, los plasmas con concentraciones sub-terapéuticas corrigen a las diluciones 1:2-1:4, los plasmas con concentraciones terapéuticas corrigen a la dilución 1:8 y los plasmas con concentraciones supra-terapéuticas no corrigen a la dilución 1:8.

Los resultados mostrados en la Tabla 5 y 6 muestran que a mayores concentraciones de heparina en plasma, se necesitarán mayores diluciones para obtener corrección de TT y TTPa con plasma normal.

Los resultados encontrados cuando se midieron TT y TTPa en plasmas con concentraciones de heparina de 0.05-2.0 U/ml demuestran que el TT no es capaz de detectar efecto heparínico a concentraciones de 0.05 U/ml. Muestra también que el TTPa se prolonga significativamente a partir de concentraciones de 0.15U/ml, lo cual significa que el reactivo de tromboplastina utilizado sí puede detectar concentraciones sub-terapéuticas de heparina, obteniéndose corrección a la dilución 1:2 con plasma normal, lo que significa que ésta tromboplastina tiene alta sensibilidad al efecto heparínico. (Tabla No.7)

Los resultados presentados en la Tabla No. 8 muestran como se prolonga significativamente el TTPa y el TP en los plasmas de los pacientes que están recibiendo cumarínicos y se les adicionó heparina. El TTPa se prolonga significativamente a partir de concentraciones de 0.1 U de heparina /ml y el TP se prolonga significativamente el relación al basal con concentraciones a partir de 0.3 U de heparina/ml según el INR del paciente. Esto demuestra que el TTPa sí es afectado significativamente con el uso previo o concomitante de cumarínicos, por lo que en estos casos, deberá evaluarse la terapia anticoagulante con heparina no fraccionada utilizando como basal el TTPa encontrado en el paciente antes de la administración de la heparina y no el Testigo que proporcione el laboratorio; de no ser así, existe la alta probabilidad de sobre-anticoagular a los pacientes.

Finalmente, según los resultados presentados en la tabla No. 4, cuando se midió TT utilizando diferentes concentraciones de trombina en plasmas heparinizados, se observa que pueden detectarse deficiencias de fibrinógeno iguales o menores de 100 mg/dl utilizando la concentración de trombina de 4-5 U/ml.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que las mediciones de TP, TTPa y TT realizadas en el Laboratorio del Hospital ABC cuentan con las siguientes propiedades:

El reactivo utilizado para la medición de TTPa tiene la sensibilidad recomendada por la literatura internacional y es capaz de detectar niveles terapéuticos de heparina no fraccionada con rangos entre 1.56-2.32. Así, podemos intuir que los plasmas con rangos de TTPa mayores de 2.32 tienen niveles supra-terapéuticos y los plasmas con rangos de TTPa menores de 1.5, tienen niveles sub-terapéuticos.

La medición del TT por sí sola es la prueba más sensible para detectar Efecto Heparínico, ya que se prolonga significativamente con concentraciones de heparina desde 0.1 U/ml. Sin embargo, con concentraciones mayores de 0.2 U/ml no es capaz de diferenciar entre niveles sub-terapéuticos, terapéuticos y supratrapéuticos de heparina no fraccionada, porque no se obtiene coagulación con ninguna de ellas.

La medición del TT utilizando concentraciones de trombina de 5 U/ml y realizando correcciones 1:2-1:8 con plasma normal, permite establecer que aquellos plasmas que corrigen a diluciones 1:2-1:4, tienen concentraciones sub-terapéuticas; los plasmas que corrigen a diluciones 1:8, tienen concentraciones terapéuticas; y los plasmas que no corrigen a la dilución 1:8 tienen concentraciones supra-terapéuticas.

La medición conjunta de TTPa, TT con concentraciones de 5 U/ml de trombina y las correcciones con plasma normal de ambos permiten asegurar la detección de niveles sub-terapéuticos, terapéuticos y supra-terapéuticos de heparina no fraccionada in vitro, pruebas que pueden realizarse con facilidad en cualquier laboratorio clínico sin significar un mayor costo.

El TTPa se ve significativamente prolongado en los plasmas de pacientes que reciben cumarínicos, de la misma manera que los TP de estos pacientes se ven prolongados de manera significativa con la adición de heparina no fraccionada; por tanto, en estos pacientes es recomendable calcular el rango de TTPa utilizando el TTPa del paciente antes de la administración de heparina como basal en lugar del basal o testigo que utiliza el laboratorio para evitar la sobre-anticoagulación.

Es posible detectar deficiencias cuantitativas de fibrinógeno iguales o menores de 100 mg/dl utilizando la medición del TT con concentraciones de 5 U de trombina/ml.

Se propone que las observaciones encontradas en este estudio in-vitro sean utilizadas para evaluar la terapia heparínica en Estudios Prospectivos realizados a largo plazo en plasmas de pacientes anticoagulados con heparina no fraccionada, monitorizando otras variables como relacionadas con Vía de administración, Método de infusión, Estado patológico subyacente del paciente, y otras variables, para poder validar estos resultados in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Casu B, Creste P, Torri G, Choccy J, Lomerman JC, Petitou M, Sincy P. The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti- (factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence: chemical and ¹³C nuclear magnetic-resonance studies. *Biochem J.* 1981;197:599-609.
- 2.- Ofosu FA, Sic P, Modi GJ, et al. The inhibition of thrombin-dependent positive-feedback reactions is critical to the expression of the anticoagulant effect of heparin. *Biochem J.* 1987;243:579-586.
- 3.- Mc Lean J. The Thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol.* 1916;61:250-257.
- 4.- Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WE. The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. *Am J Physiol.* 1939;125:683-687.
- 5.- Abildgaard J. Highly purified antithrombin 3 with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;21:89-91.
- 6.- Rosenberg RD, Bauer KA. The Heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical practice.* 3rd ed. Philadelphia, Pa: JB Lippincott Co; 1994;837-860.
- 7.- Rosenberg RD, Lam L. Correlation between structure and function of heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:1218-1222.
- 8.- Hull RD, Raskob GE, Hirsh J, Jay RM, Leclerc JR, Geerts W, Rosenbloom D, Sackett DL, Anderson C, Harrison L, Gent M. Continuous intravenous heparin compared with intermittent subcutaneous heparin in the initial treatment of proximal-vein thrombosis. *N Engl J Med.* 1986;315:1109-1114.

- 9.- Basu D, Gallus A, Hirsch J, Gade J. A prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N Engl J Med.* 1972;287:324-327.
- 10.- Brandt JT, Triplett DA. Laboratory monitoring of heparin. Effect of reagents and instruments on the activated partial thromboplastin time. *AJCP Oct.* 1981;76(4):530-537.
- 11.- Edwards, PB, Grinsberg JS, Johnston M, Hirsch J. Establishing a therapeutic range for heparin therapy. *Ann Int Med.* July 1993;119(2): 104-109.
- 12.- Levine MN, Hirsch J, Gent M, Turpie AG, Cruickshank M, Weitz J, Anderson D, Johnson M. A randomized trial comparing activated thromboplastin time with heparin assay in patients with acute venous thromboembolism requiring large daily doses of heparin. *Arch Int Med.* 1994;154:49-56.
- 13.- NCCLS. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. *NCCLS December 1991.* H2A2;11(23):1-2
- 14.- Haushofer A, Halbmayr WM, Radeck J, Fischer M. Monitoring of high-dose intravenous heparin therapy. A contribution of the safety of heparin monitoring. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis.* 1996; 2(3):177-184.
- 15.- Béguin S, Lindhout T, hemker HC. The mode of action of heparin in plasma. *Thromb haemost.* 1988;60:457-462.
- 16.- Jawed F, Debra AE, And Rodger LB. An Update on heparins at the beginning of the new millennium. *Semin Thromb and hemost.* 2000;26:5-21.
- 17.- Ofose FA, Hirsch J, Esmon CT, et al. Unfractionated heparin inhibits thrombin-catalysed amplification reactions of coagulation more efficiently than those catalysed by factor Xa. *Biochem J.* 1989;257:143-150.
- 18.- Lam LE, Silbert JE, Rosenberg RD. The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;69:570-577.

- 19.-Anderson LC, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Sims GE. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. *Thromb res.* 1976;9:575-583.
- 20.-Hirsh J, Van Aken WG, Gallus AS, DolleryCT, Cade JF, Yung WL. Heparin kinetics in venous thrombosis and pulmonary embolism. *Circulation.* 1976;53:691-695.
- 21.- Young E, Prins M, Levine MN, Hirsh J. Heparin binding to plasma proteins an important mechanism for heparin resistance. *Thromb Haemost.* 1992;67:639-643.
- 22.- de Swart CA, Nijmeyer B, Roelofs JM, Sixma JJ. Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans. *Blood.* 1982;60:1251-1258.
- 23.- Olsson P, Lagergren E, Ek S. The elimination from plasma of intravenous heparin: an experimental study on dogs and humans. *Acta Med Scand.* 1963;173:619-630.
- 24.- Bjornsson TD, Wolfram KM, Kitchell BB. Heparin kinetics determined by three assay methods. *Clin Pharmacol Ther.* 1982;31:104-113.
- 25.-Cruickshank MK, Levine MN, Hirsh J, Roberts R, Siguenza M. A Standar heparin nomogram for the management of heparin therapy. *Arch Intern Med.* 1991;151:333-337.
- 26.- Soto A, Frias J. Farmacología clínica de las heparinas de Bajo peso molecular. *Rev Ibero Ther Man.* 1995;8:3-10.
- 26.- Yin E. Effect of heparin on the neutralization of Factor Xa and thrombin by the plasma alpha-2-globulin inhibitor. *Thromb Diast Hemorr.* 1975;33:43.