



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



Hemostasia

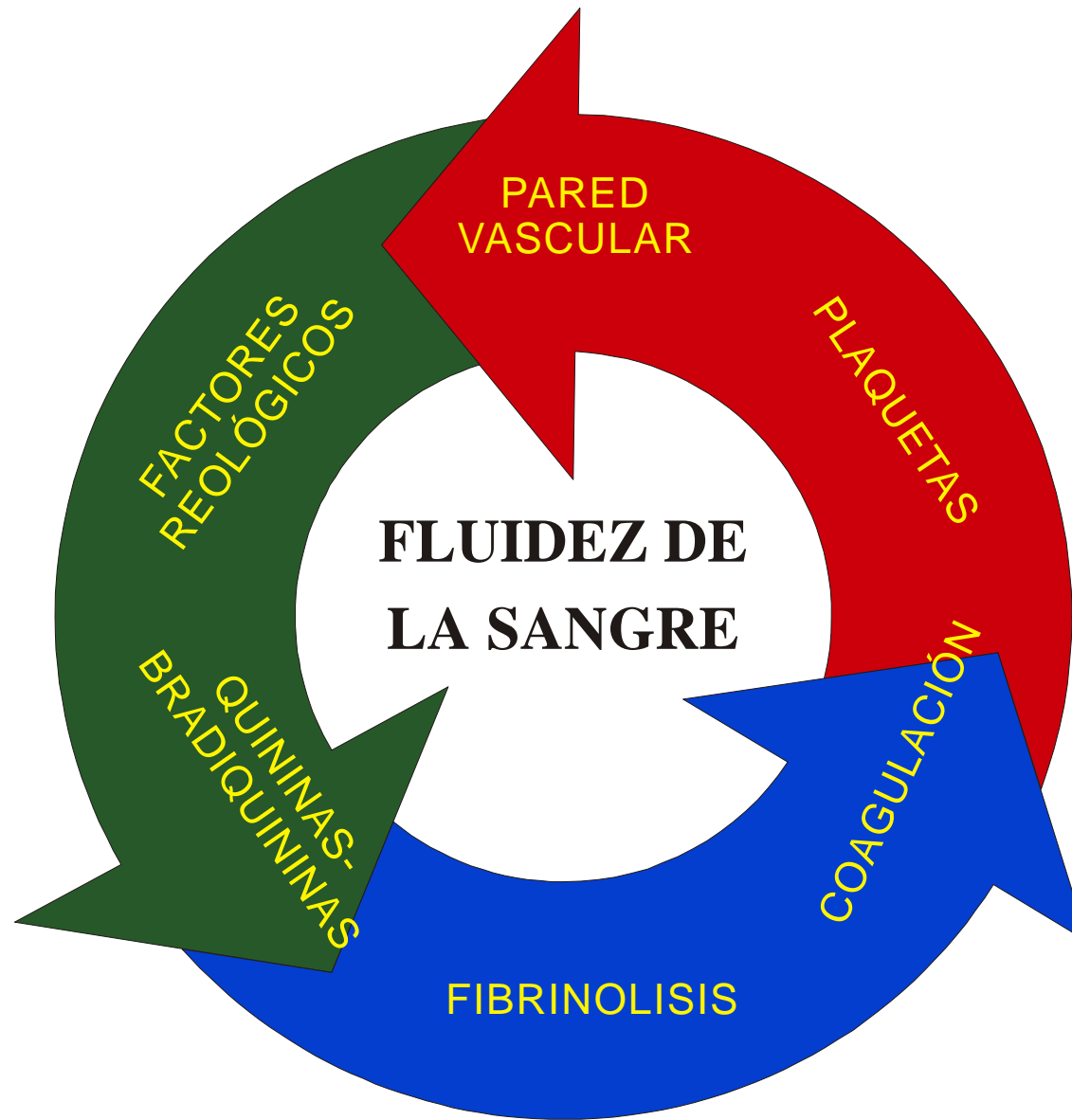
Dra. Lucía Kordich

E-mail: lht@qb.fcen.uba.ar

Tel: 4576-3300/09 int 209

Ciudad Universitaria. Pabellón II. 4 piso. Capital Federal. ARGENTINA

SISTEMA HEMOSTÁTICO



Desordenes Vasculares Hereditarios

Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

Síndrome Rendu-Osler-Weber

Autosómico dominante

Epístasis

Sangrado intestinal

Telangiectasia visible en tejido cutáneo y/o membranas mucosas

Síndrome Ehlers Danlos

Híper movilidad de articulaciones

Híper extensibilidad de la piel

Ruptura de vasos sanguíneos

Defecto en el colágeno III (Gen COL3A1)

ANTICOAGULANTES

- Glicosaminoglicanos
- Trombomodulina
- Receptor de trombina
- Proteína S
- TFPI
- Prostaciclina

PROCOAGULANTES

- Factor tisular
- Factor von Willebrand
- Factor act. plaquetaria

PROTEÍNAS VASOACTIVAS

- Prostaciclina
- Óxido nítrico (NO)
- Endotelinas

PROFIBRINOLÍTICOS

- t-PA
- scu-PA
- Receptor de Plg
- Receptor de uPA

ANTIFIBRINOLÍTICOS

- Inhibidor del t-PA

ADHESIVIDAD: PROTEÍNAS

- Factor von Willebrand
- Colágeno tipo IV
- Fibronectina
- Vitronectina
- Trombospondina
- Elastina

ADHESIÓN

LEUCOCITARIA

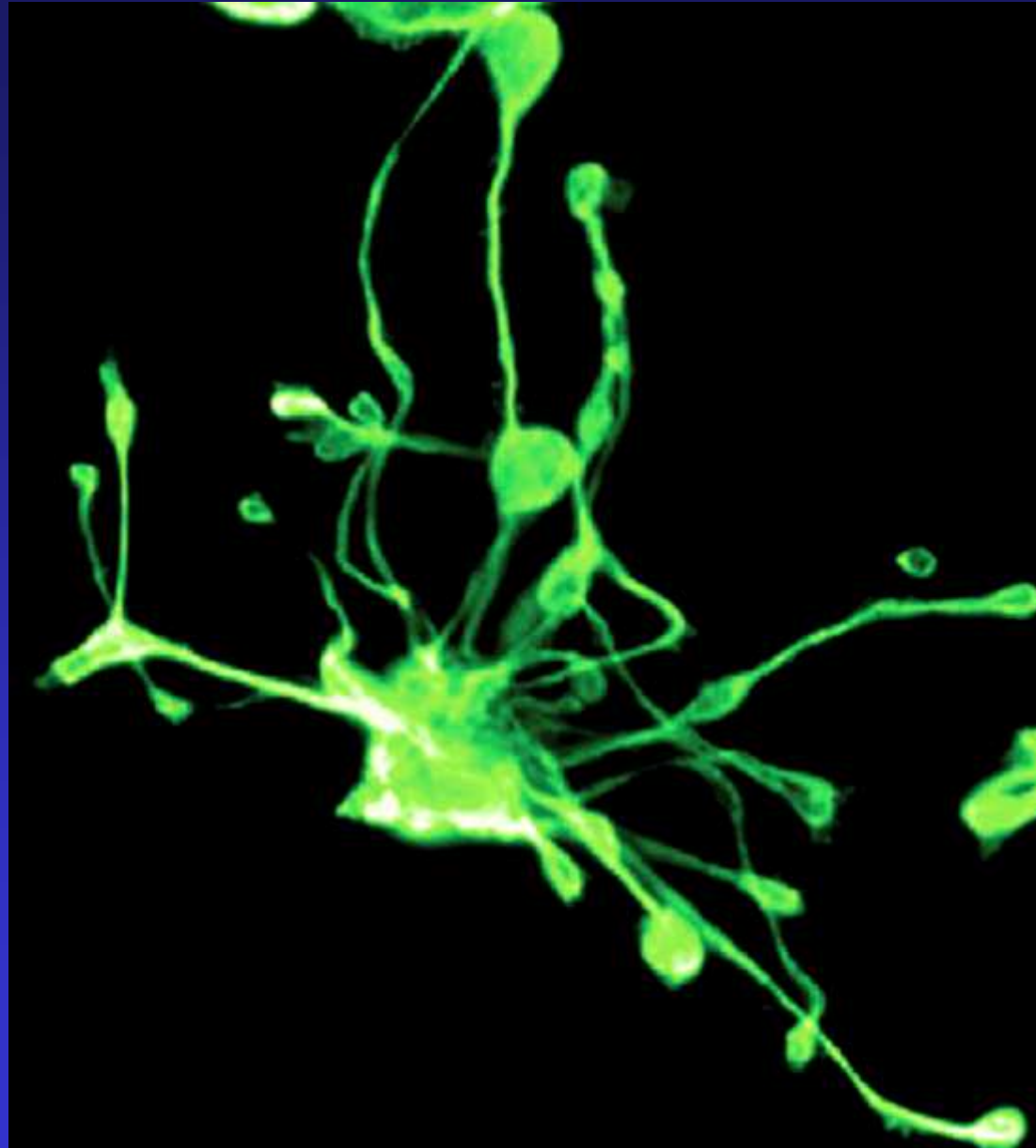
- Selectinas (P, E)
- ICAM-1
- ICAM-2
- VCAM-1

CITOQUINAS

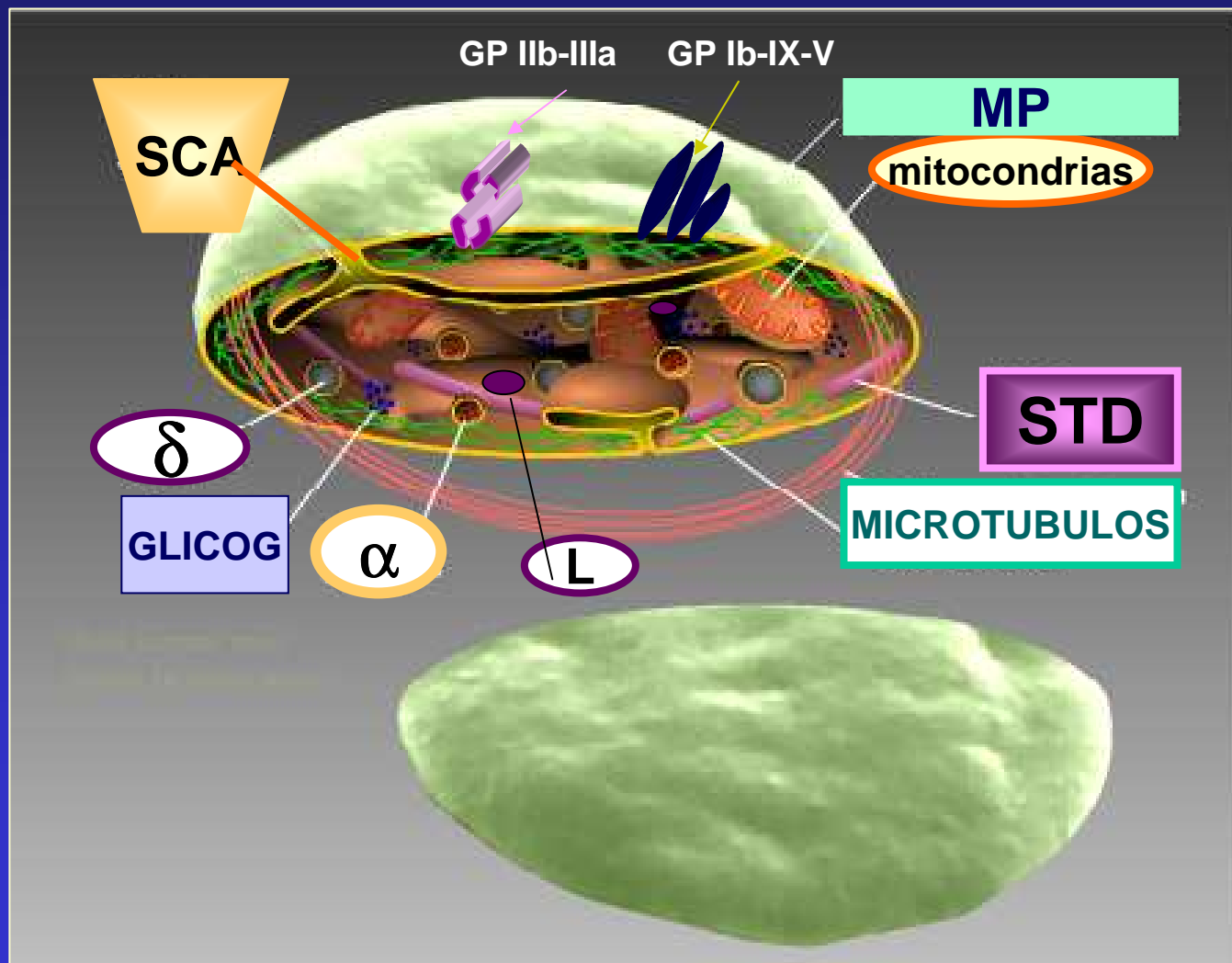
- IL-1, IL-4, IL-8
- TNF α
- Interferón γ

INTERACCIÓN CON SISTEMA COMPLEMENTO

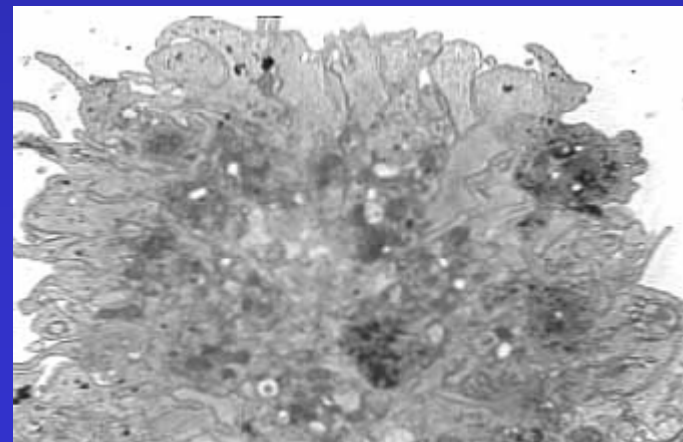
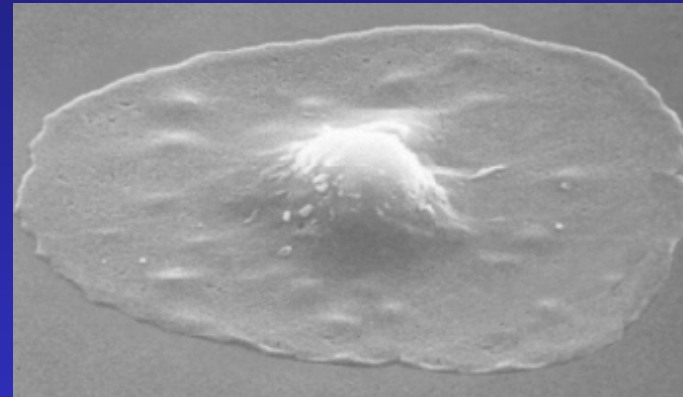
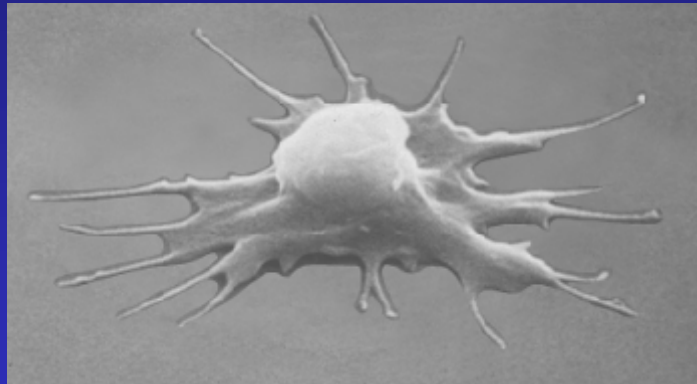
Cultivo *in vitro* de Megacariocitos (MK)



MORFOLOGIA PLAQUETARIA

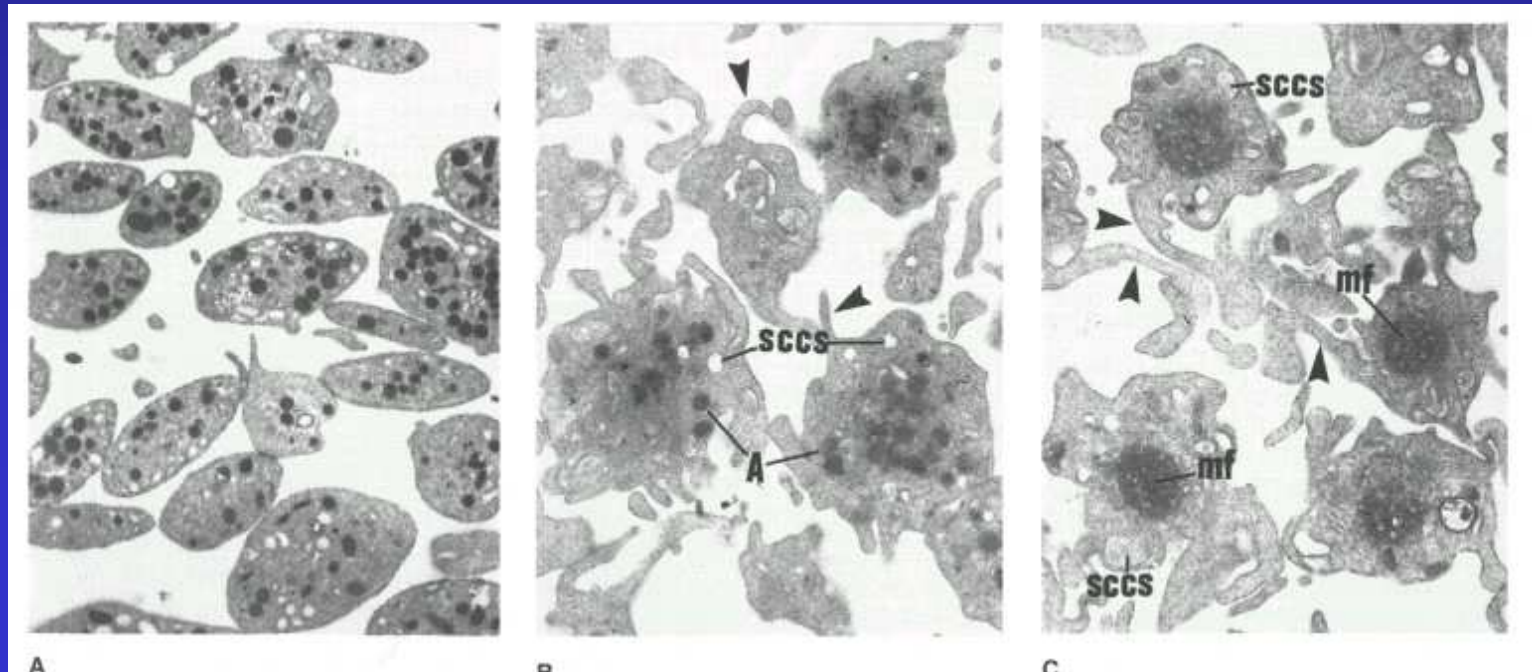


RESPUESTA PLAQUETARIA A LA INJURIA VASCULAR



FUNCION BASICA

- CAMBIO DE FORMA-ACTIVACION
- AGREGACION PLAQ-Fg-PLAQ
- LIBERACION



SUSTANCIAS DE LIBERACIÓN PLAQUETARIA

- **CITOPLASMA**

F XIII

PDEC GF

- **CUERPOS DENSOS**

ADP

ATP

SEROTONINA

CALCIO

- **LISOSOMAS**

ENZIMAS

LISOSOMALES

- **GRÁNULOS ALFA**

FIBRINÓGENO

FIBRONECTINA

FvW

TROMBOSPONDINA

VITRONECTINA

PDGF

F4P

β -TG

FV

HMGK

FXI

PAI-1

PROT S

LIBERACIÓN DE
MEMBRANA:

P-SELECTINA

ADHESIÓN

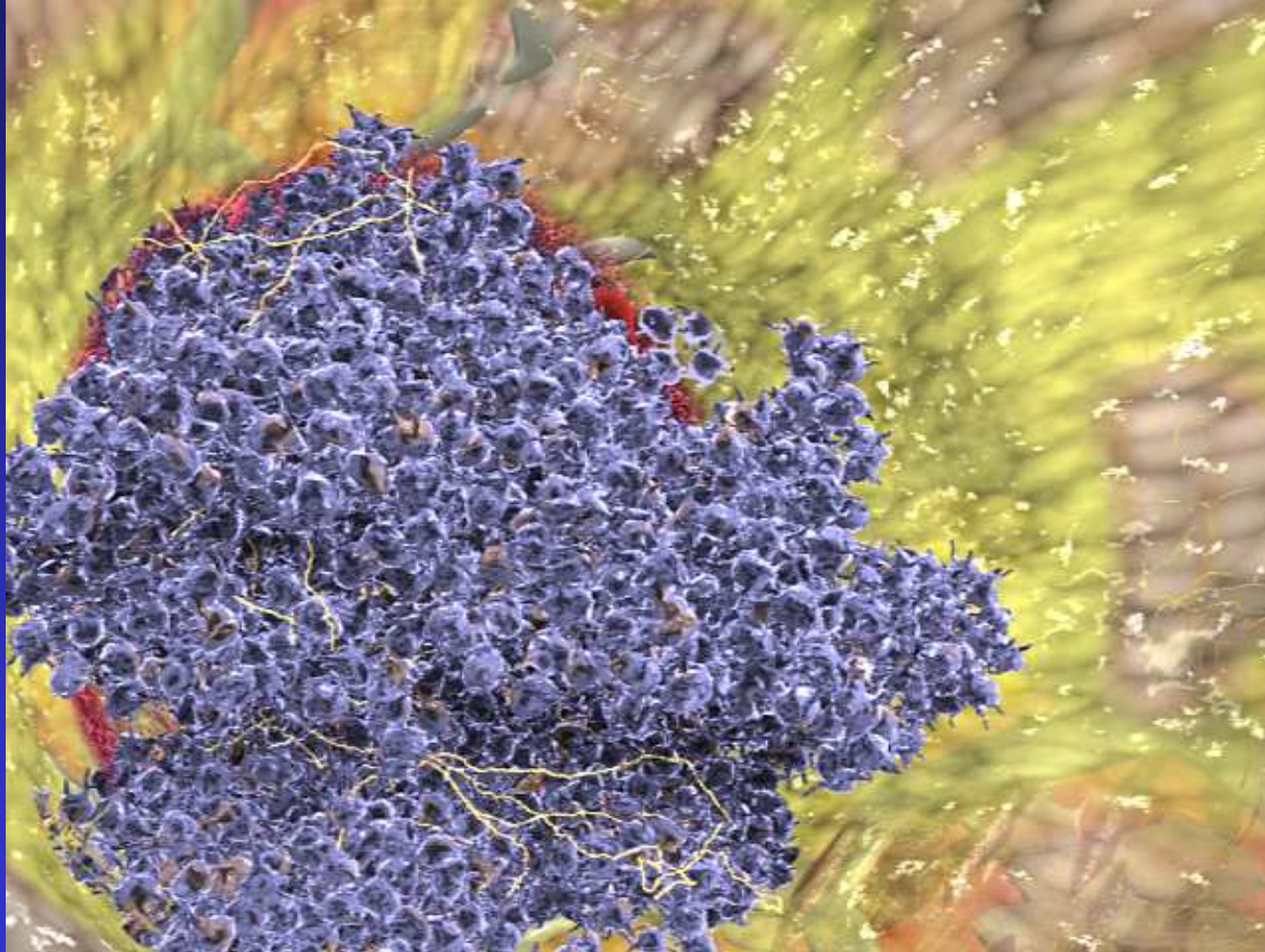
PROTEÍNAS ADHESIVAS DE LA MATRIZ

- * COLÁGENO
- * FACTOR vWillebrand
- * FIBRONECTINA
- * TROMBOSPONDINA
- * VITRONECTINA
- * LAMININA

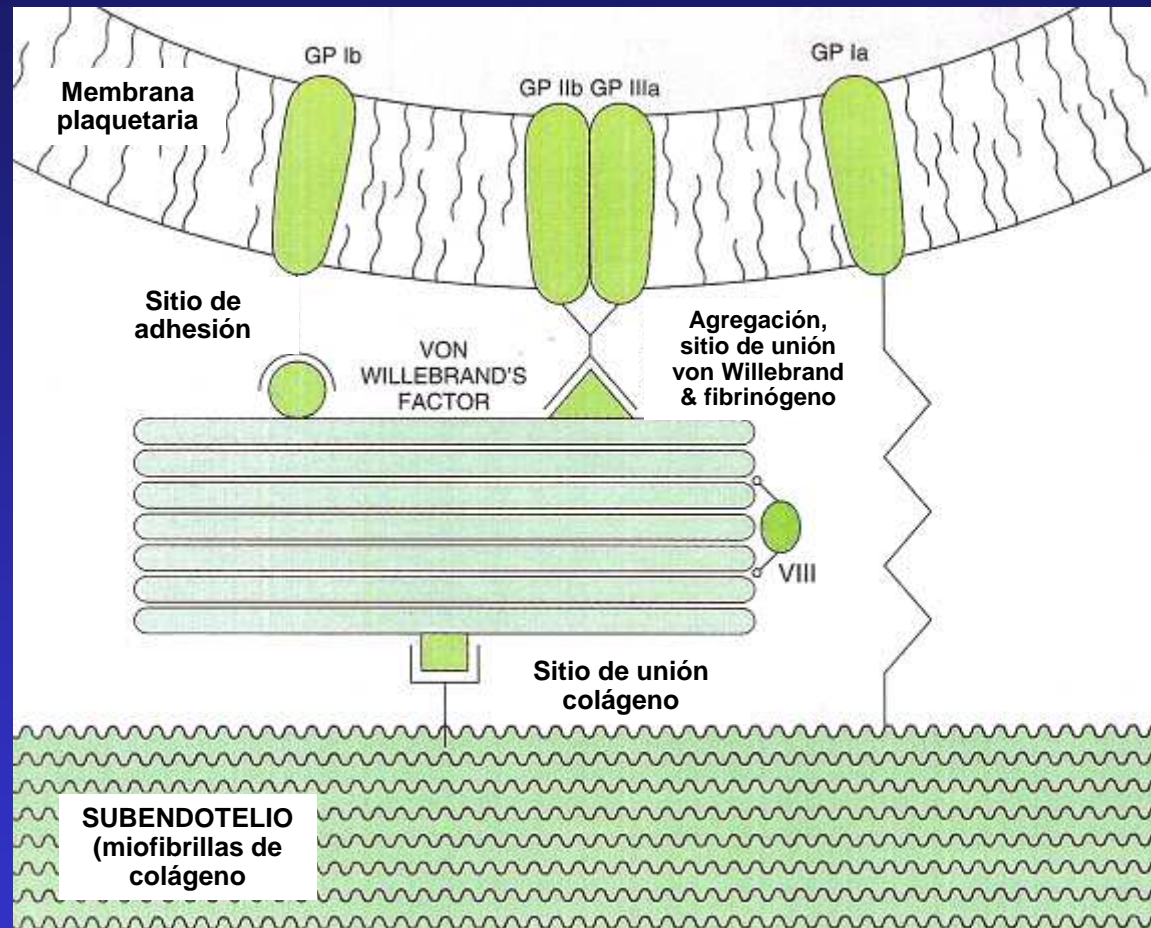
GLICOPROTEÍNAS QUE MEDIAN LA ADHESIÓN

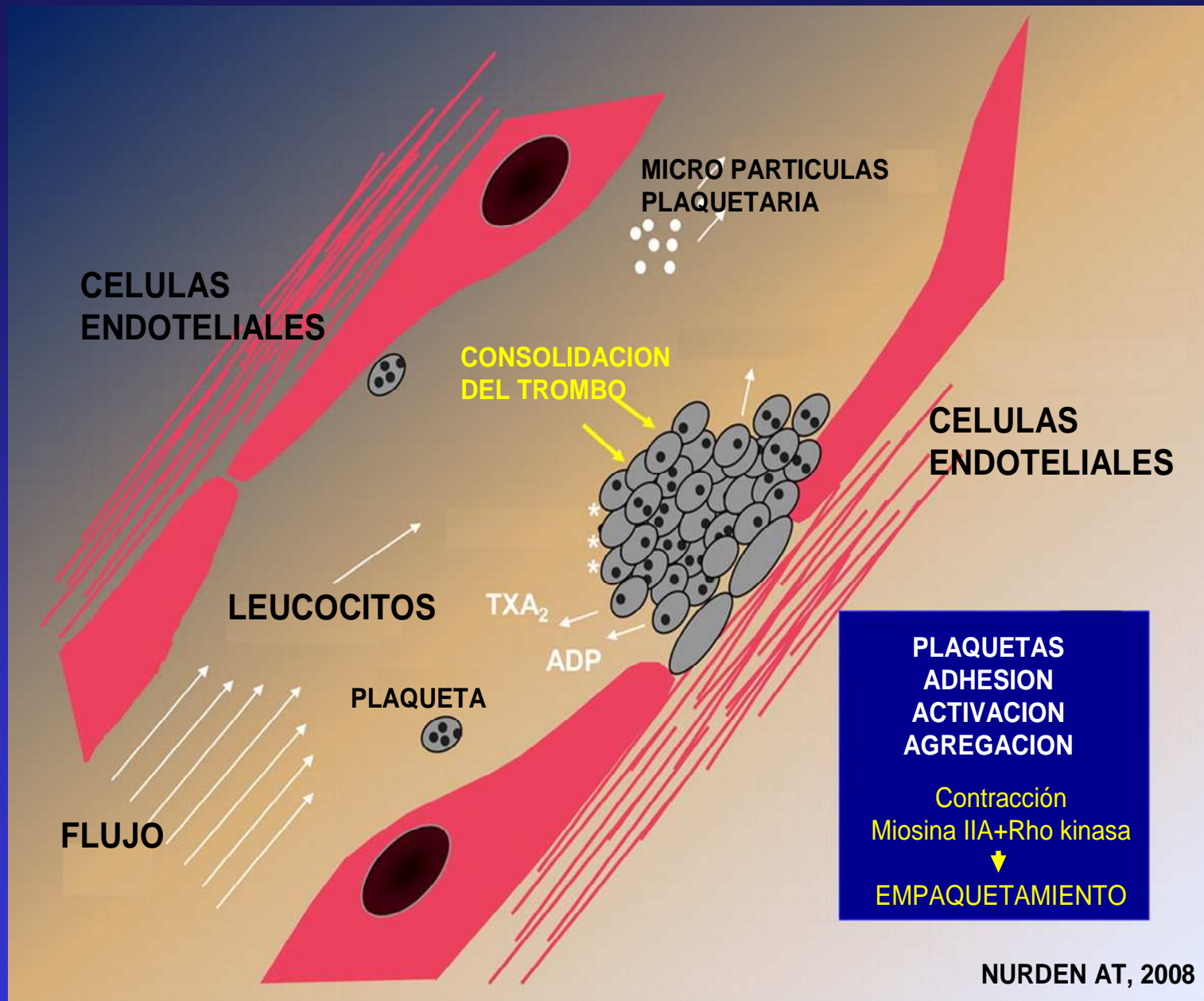
- * GPIa-IIc ($\alpha 2\text{-}\beta 1$)
- * GP IV
- * GPIb-IX-V
- * GPIc-IIa ($\alpha 5\beta 1$)
- * GPIV
- * $\alpha v\beta 3$
- * $\alpha 6\beta 1$

Secuencia



Adhesión → Activación → Agregación





TIEMPO DE SANGRIA

PLAQUETA

PARED VASCULAR

GP - vW / Col - Subendotelio

~~Duke~~ $V_n < 2 \text{ min}$

Ivy $V_N < 4.5 \text{ min}$

Simplat $V_N < 9.5 \text{ min}$

Cohibir cuando $T > 2 V_N$

TIEMPO DE SANGRIA



DROGAS ANTIAGREGANTES

- a) Inhibición de la ciclo-oxigenasa (COX-1): AAS**

- b) Antagonistas del receptor de ADP (P2Y₁₂): Tienopiridinas**
clopidogrel-ticlopidina

- c) Antagonistas de la GPIIb-IIIa ($\alpha_2\beta_3$):**
 - 1) Anticuerpo monoclonal: abciximab**
 - 2) Inhibición de la unión del fibrinógeno:**
heptapéptido cíclico: Integrelin
 - 3) Inhibición de la secuencia RGD:**
desintegrinas

COMPONENTES DEL SISTEMA DE COAGULACIÓN

- ✓ **PROTEÍNA INTEGRAL DE MEMBRANA** → Factor tisular
- ✓ **FACTORES DE CONTACTO** → XII - PK - HMWK
- ✓ **SERINO PROTEASAS**
 - Vitamina K dependientes → Factores II – VII – IX - X
 - No vitamina K dependientes → Factores PK - XII – XI
- ✓ **COFACTORES** → Factores V y VIII (vW)
- ✓ **SUSTRATO** → Fibrinógeno
- ✓ **TRANSPEPTIDASA** → Factor XIII
- ✓ **FOSFOLÍPIDOS**
- ✓ **IONES Ca²⁺**
- ✓ **INHIBIDORES**

Proteína	Nombre	P.M. (KD)	Concentración Plasmática/ml	Nivel Hemostático (%)	Vida Media (hs)
Factor I	Fibrinógeno	330	3 mg	50	72-120
	Cadena α	66			
	Cadena α	52			
	Cadena γ	46.5			
Factor II	Protrombina	72	100μg	40	67-106
Factor III	Factor Tisular	37	0		
Factor V	Proacelerina	330	10 μg	10-20	12-15
Factor VII	Proconvertina	50	0.5 μg		3-4
Factor VIII	Factor Antihemofílico A	330	0.1 μg	25	10-16
Factor vW		1200		22-40	
Factor IX	Factor Antihemofílico B	55	5 μg	20-25	18-40
Factor X	Stuart-Prower	59	10 μg	20	20-60
Factor XI		160	5 μg	15-20	48-80
Factor XII	Hageman	160	30 μg		
Factor XIII	Fibrinolisasa	320		3-5	72-200
HMWK		110			1
Precalicroína		85			?
Proteína C		63			6-12
Proteína S		75			60
Proteína Z		62			48-72
C4bBP		570			?
Trombomodulina		75			?
EPCR		46			?

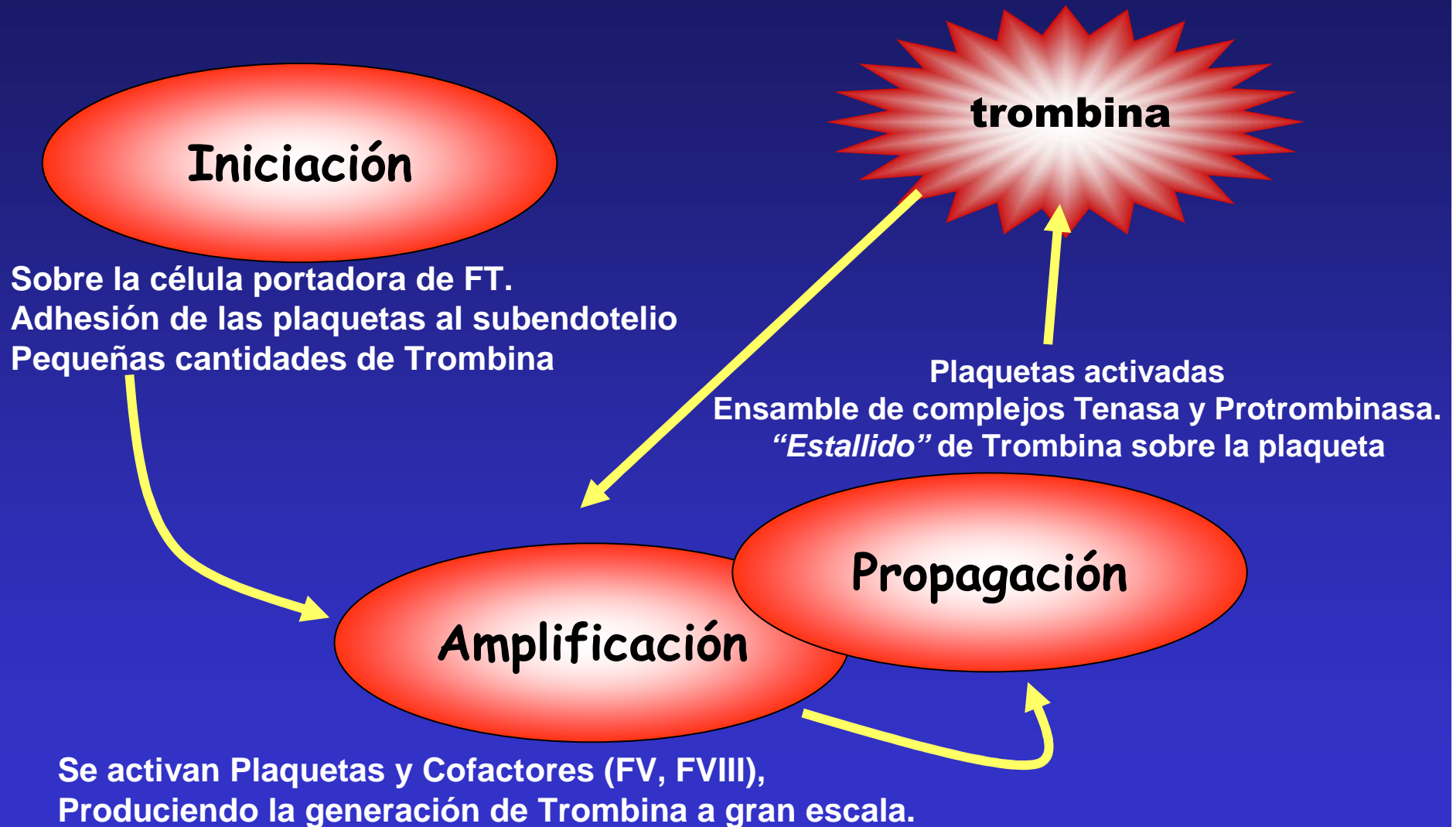
ACTIVACION DEL SISTEMA DE COAGULACION

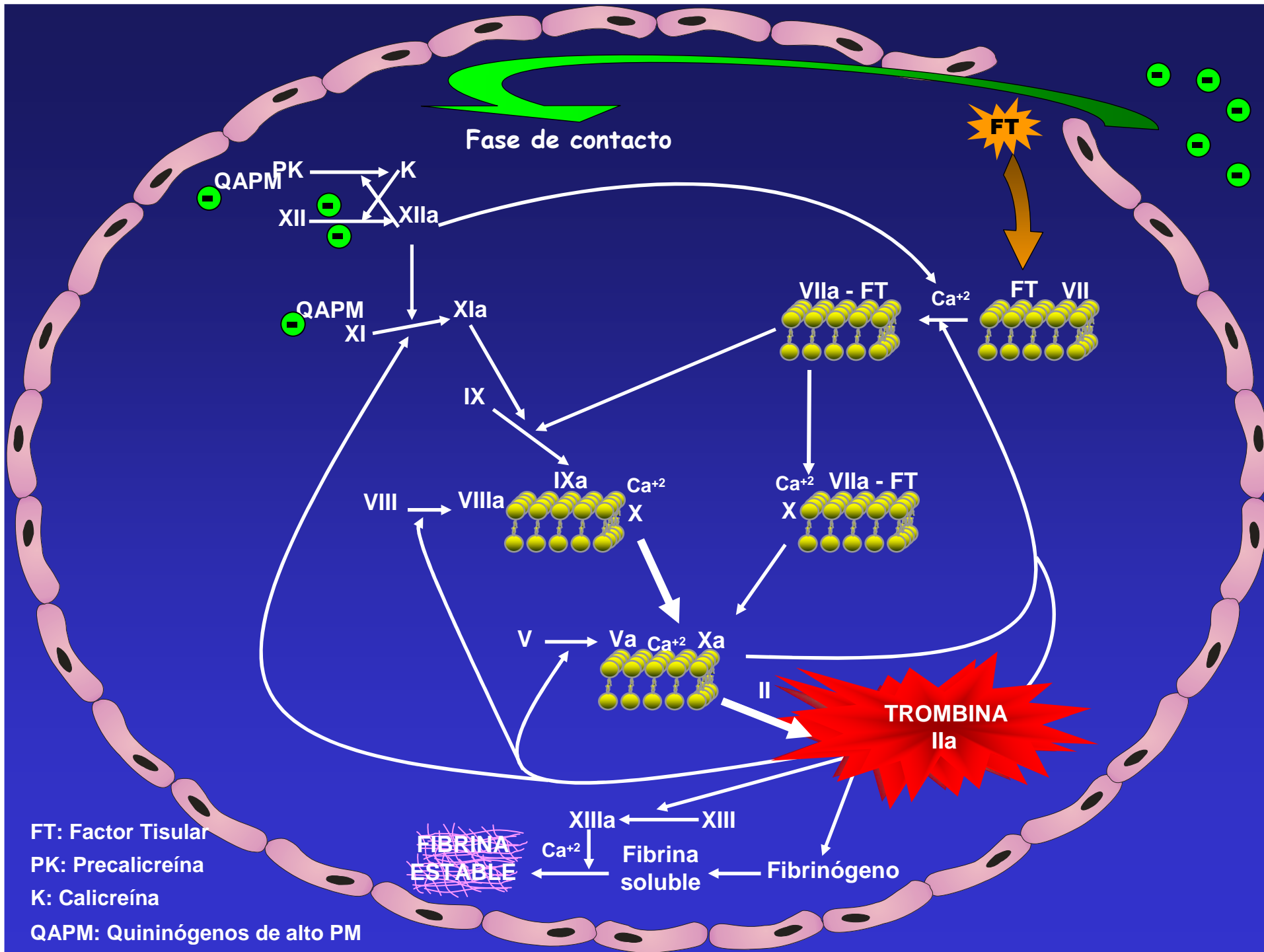
Modelo celular

- Incorpora las células a la activación del sistema de coagulación:
El proceso requiere la participación de al menos 2 células distintas: una célula fuente de factor Tisular y las plaquetas.
- Tienen en cuenta que la trombina actúa diferente de acuerdo a la concentración en que este presente. La cantidad y el perfil de generación de trombina deben ser correctos.
- La activación del SC ocurre en tres etapas diferentes en el tiempo pero que se solapan entre si: iniciación, propagación y amplificación.
- La proteínas del SC son necesarias para la respuesta fisiológica a la injuria pero las células son las que regulan su duración, la intensidad y la localización.

ACTIVACION DEL SISTEMA DE COAGULACION

Modelo celular





Fase de contacto

QAPM^{PK} → K
 XII → XIIa

QAPM^{XI} → XI → XIa

IX → IXa

VIII → VIIIa

IXa + VIII + Ca²⁺ → X

V + Xa + Ca²⁺ → Va

Va + II → TROMBINA IIa

FT + VII → VIIa + Ca²⁺

VIIa + FT + Ca²⁺ → X

XIII → XIIIa
 XIIIa + Fibrinógeno + Ca²⁺ → Fibrina soluble
 Fibrina soluble → FIBRINA ESTABLE

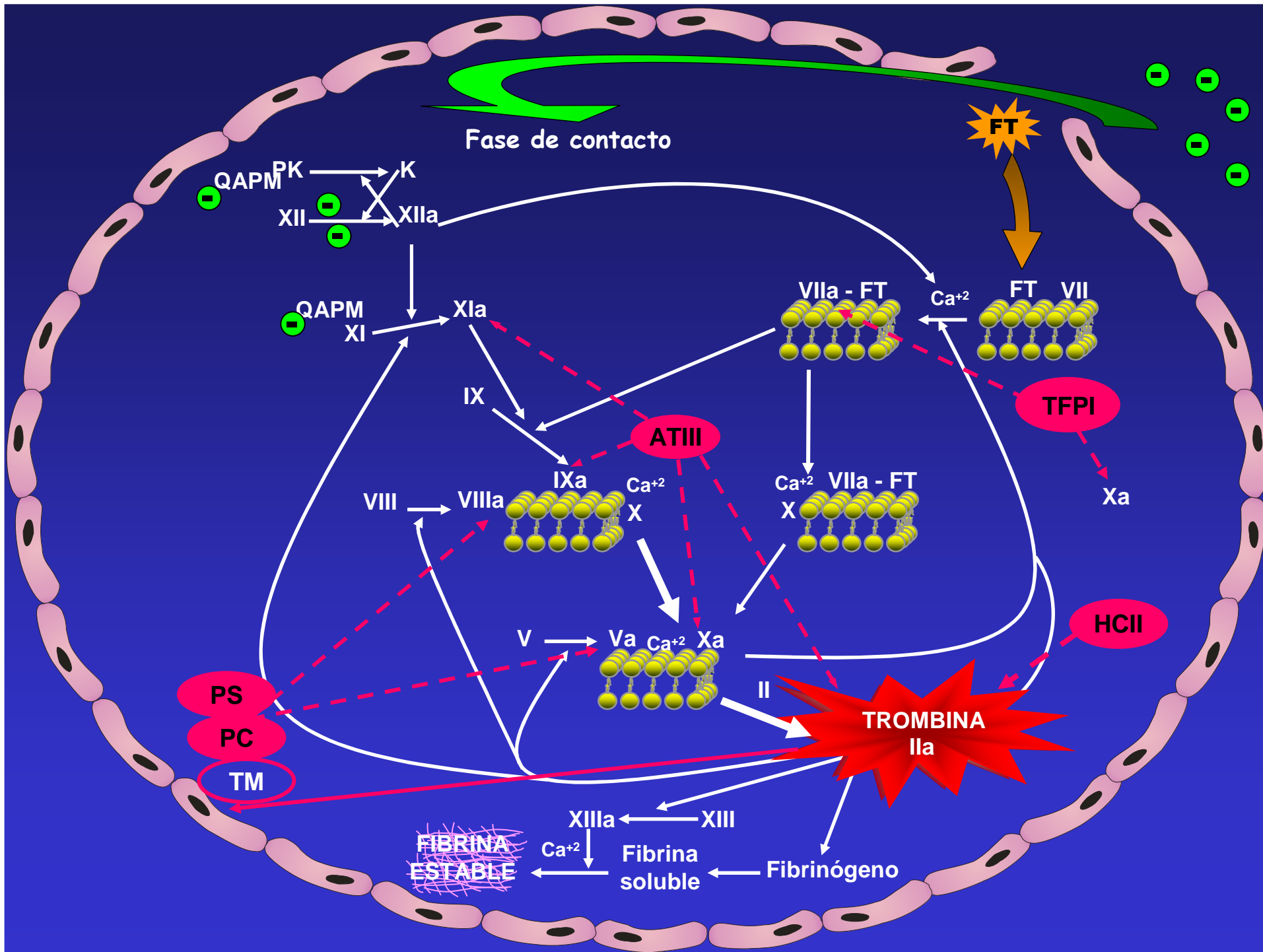
FT: Factor Tisular
 PK: Precalicroína
 K: Calicroína
 QAPM: Quininógenos de alto PM

INHIBIDORES SERPINAS

- Antitrombina (Antitrombina III)
 - Cofactor II de la heparina
 - Inhibidor de la proteína C

INHIBIDORES NO SERPINAS

- Sistema de la proteína C
- Inhibidor de la vía del factor tisular
 - α_2 - Macroglobulina



TROMBOFILIA

CAUSAS GENETICAS BIEN ESTABLECIDAS

Deficiencia de Antitrombina (AT III)

Deficiencia de PC

Deficiencia de PS

Factor V Leiden

Protrombina 20210

TROMBOFILIA

CAUSAS RARAS O NO BIEN ESTABLECIDAS

Deficiencia de CH II
TM anormal (receptor de TM)
Alteración de TFPI
Alteración de EPCR

Alteraciones de los
inhibidores de la
coagulación

Aumento de FVIII
Disfibrinogenemia
Alteración de FVII
Deficiencia de FXII
Altos niveles de FXI y FIX
Alteración de FXIII

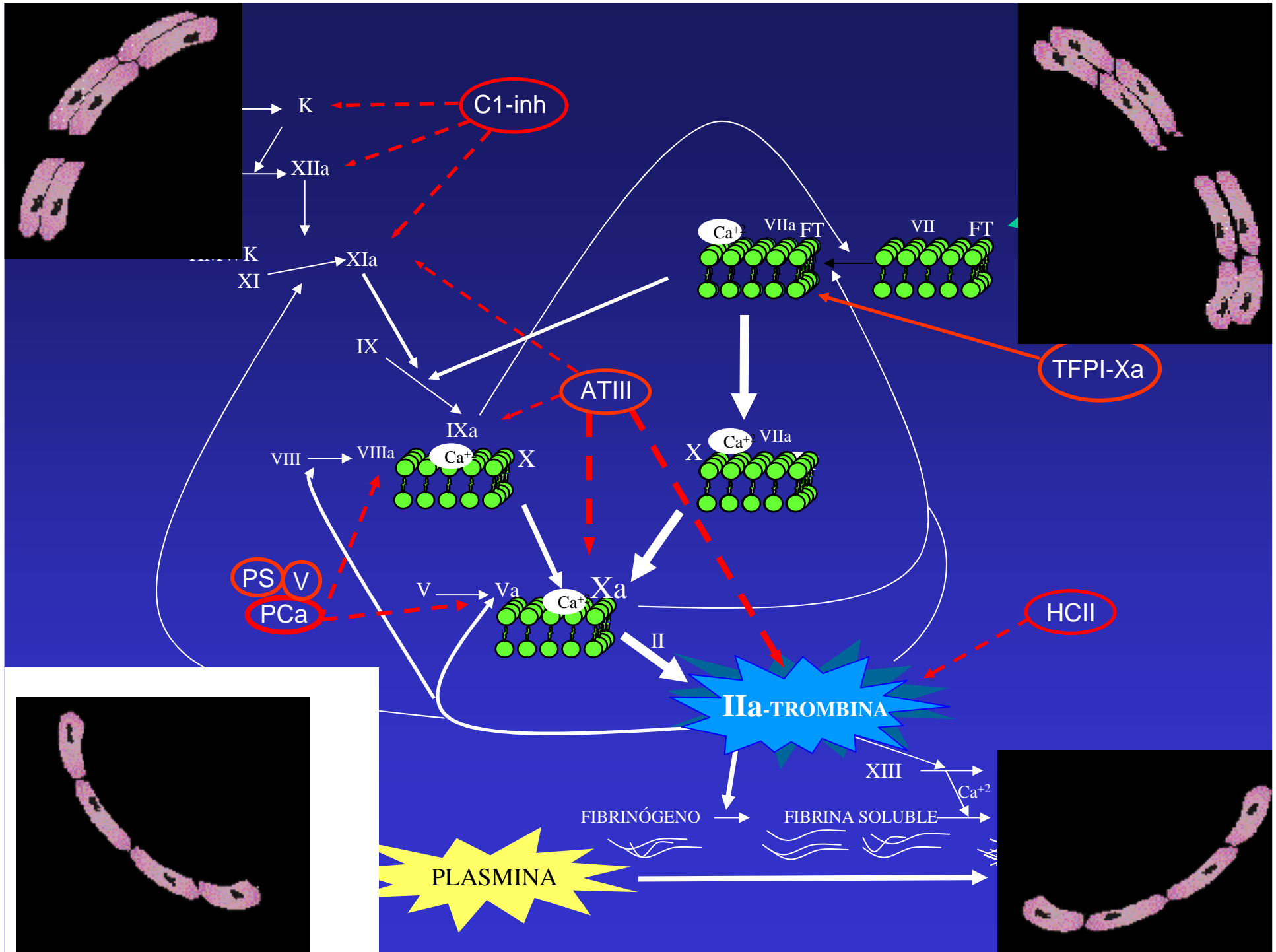
Alteraciones de
factores de la cascada
de coagulación

Hipo-Displasminogenemia
Altos niveles de PAI y TAFI
Deficiencias de t-PA
Lp (a)

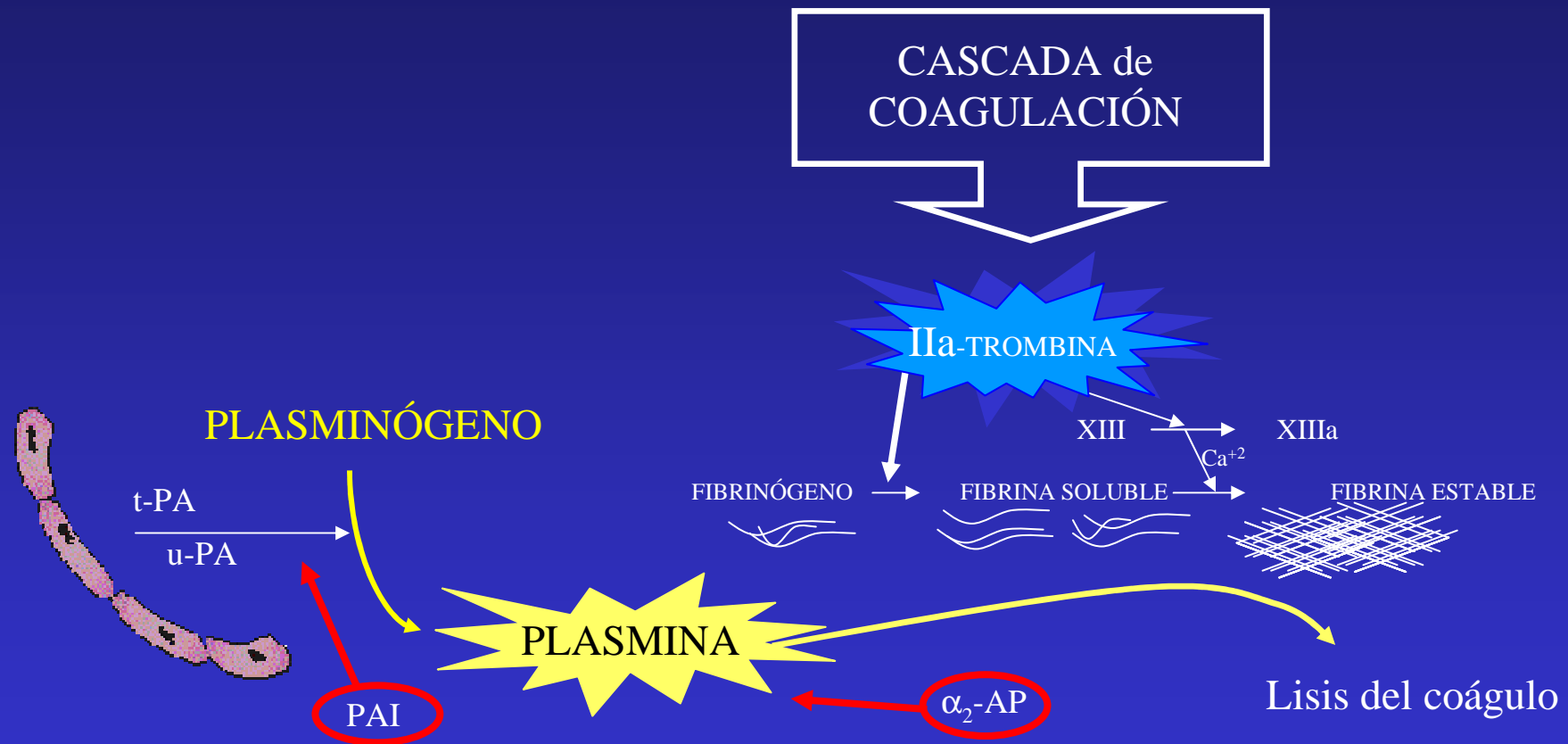
Alteraciones del
sistema fibrinolítico

Polimorfismos para receptores plaquetarios (Gp IIb/IIIa, complejo Gp Ib-IX-V, complejo Gp Ia/IIa)

Otros: Glicoproteína rica en histidina, Deficiencia de β_2 glicoproteína



Sistema Fibrinolítico



PLASMINÓGENO

ACTIVADORES del Plg

VÍA EXTRÍNSECA
(t-PA, u-PA)

VÍA INTRÍNSECA
(sistema de contacto, u-PA)

VÍA EXÓGENA
(SK, UK, t-PA recomb)

← INHIBIDORES de los
ACTIVADORES del Plg
(PAI-1, PAI-2, PAI-3)

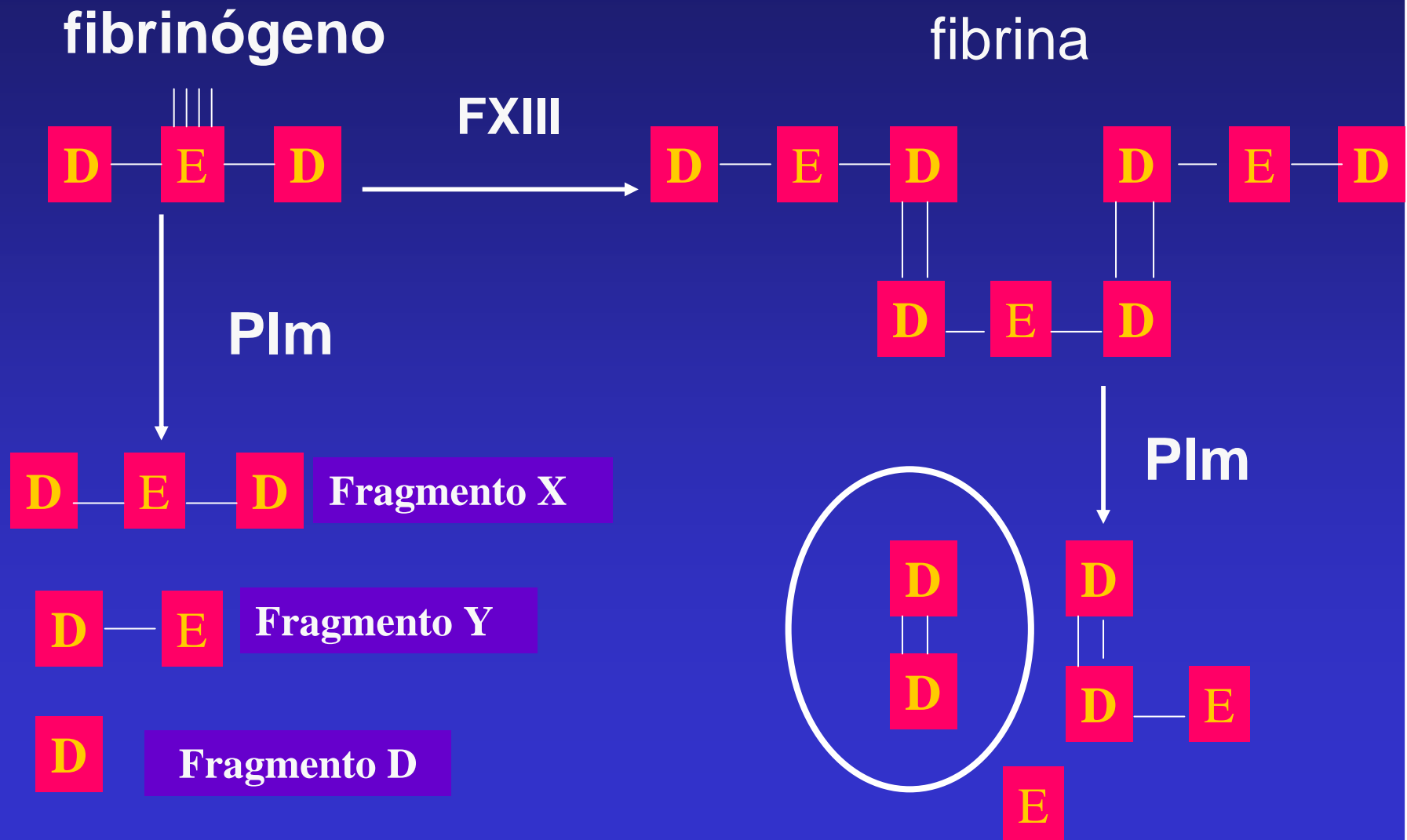
← C₁ INHIBIDOR
(sobre XIIa y Calicreína)

← TAFI

← INHIBIDORES
de la PLASMINA
(α_2 -AP, α_2 -MG)

PLASMINA

ACCIÓN FIBRINOLITICA DE LA PLASMINA

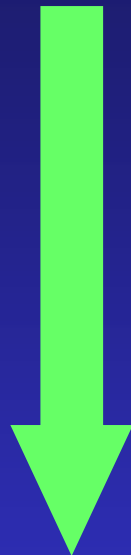


Dímero D-D

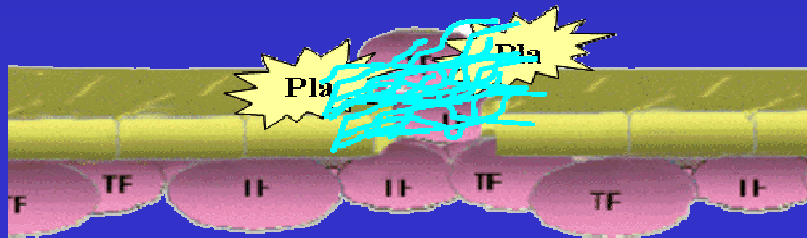
- Descrito por primera vez por Gaffney en 1972.
- Fragmento 182 kd que se obtiene por acción de la plasmina sobre la fibrina, que contiene dos dominios D juntos entrecruzados en las cadenas γ .
- El tiempo de vida media es 4 - 6 hs.
- Niveles elevados indican activación de fibrinólisis secundaria a un evento trombótico.(es un marcador mixto)

Coagulación

PROTROMBINA



TROMBINA

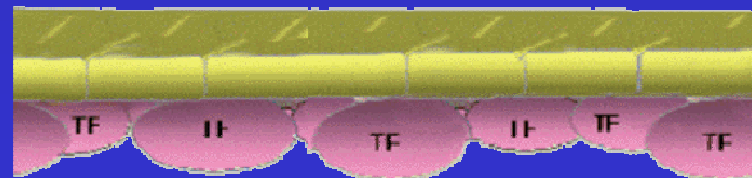


Fibrinolisis

PLASMINÓGENO



PLASMINA



Paciente:

Médico:

Fecha: ___ / ___ / ___

Grupo sanguíneo:

Edad:

Hijos: SI/NO N° _____

Antecedentes personales

Infancia:

Recientes:

Epistaxis SI/NO

Hematomas fáciles SI/NO

Gingivorragia SI/NO

Asociados a medicación SI/NO

Sangrado en:

Extracciones dentarias SI / NO

En operaciones SI / NO

¿Cuáles?

En parto, cesárea SI / NO

¿A cuántas horas/días de la operación?

¿Necesitó transfusión? SI / NO

Medicaciones:

Anti-inflamatorios(tipo acetilsalicílico) SI / NO

Homeopática SI / NO

Otras:

Facilidades para:

Hacer gimnasia SI / NO

Laxitud de tejidos SI / NO

Laxitud articular SI / NO

Dislocar articulaciones SI / NO

Luxaciones/esguinces SI / NO

Trombosis:

Venosa SI / NO

Arterial SI / NO

Perdidas fetales SI / NO

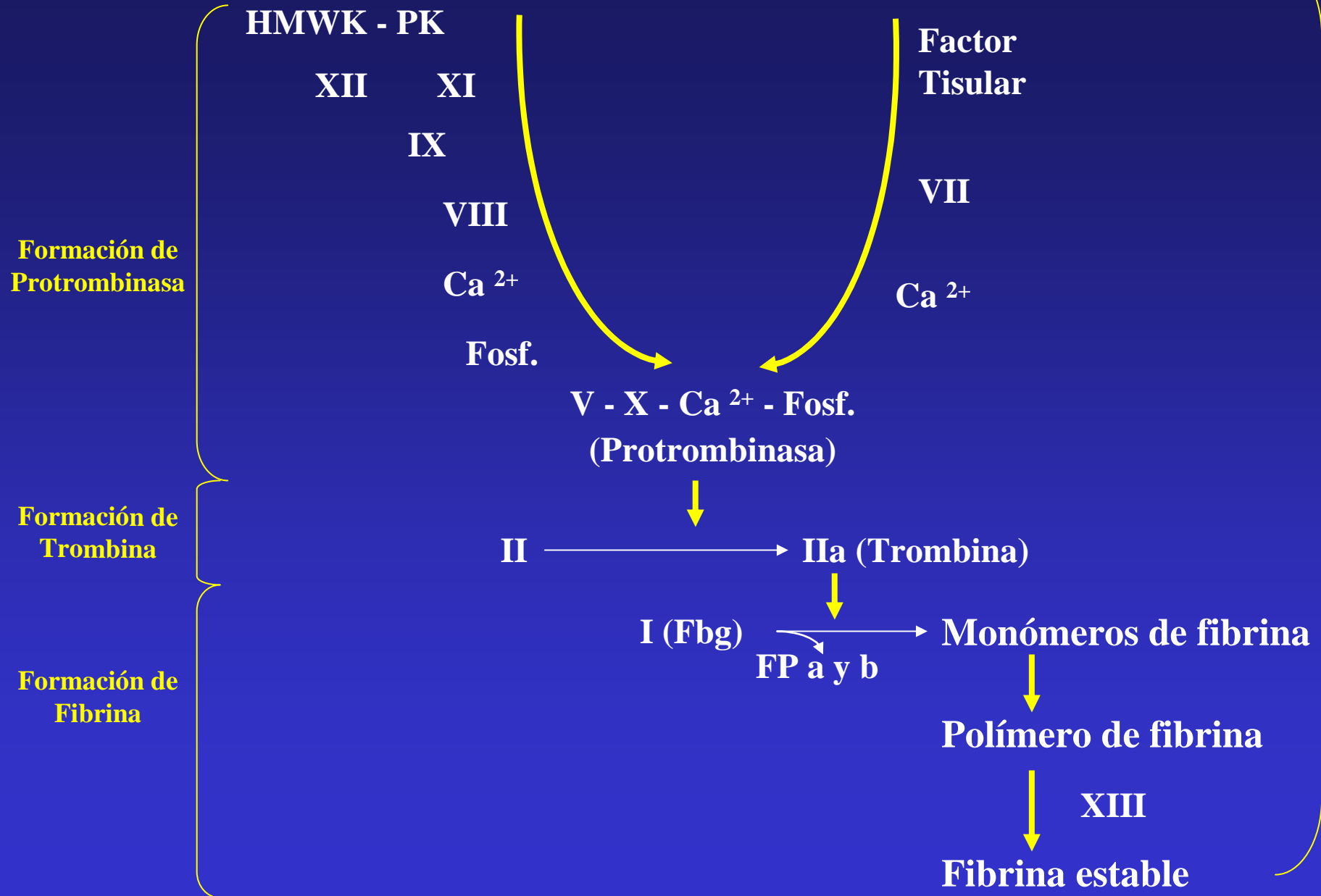
Abortos SI / NO

Antecedentes familiares:

Resultados de estudios anteriores:

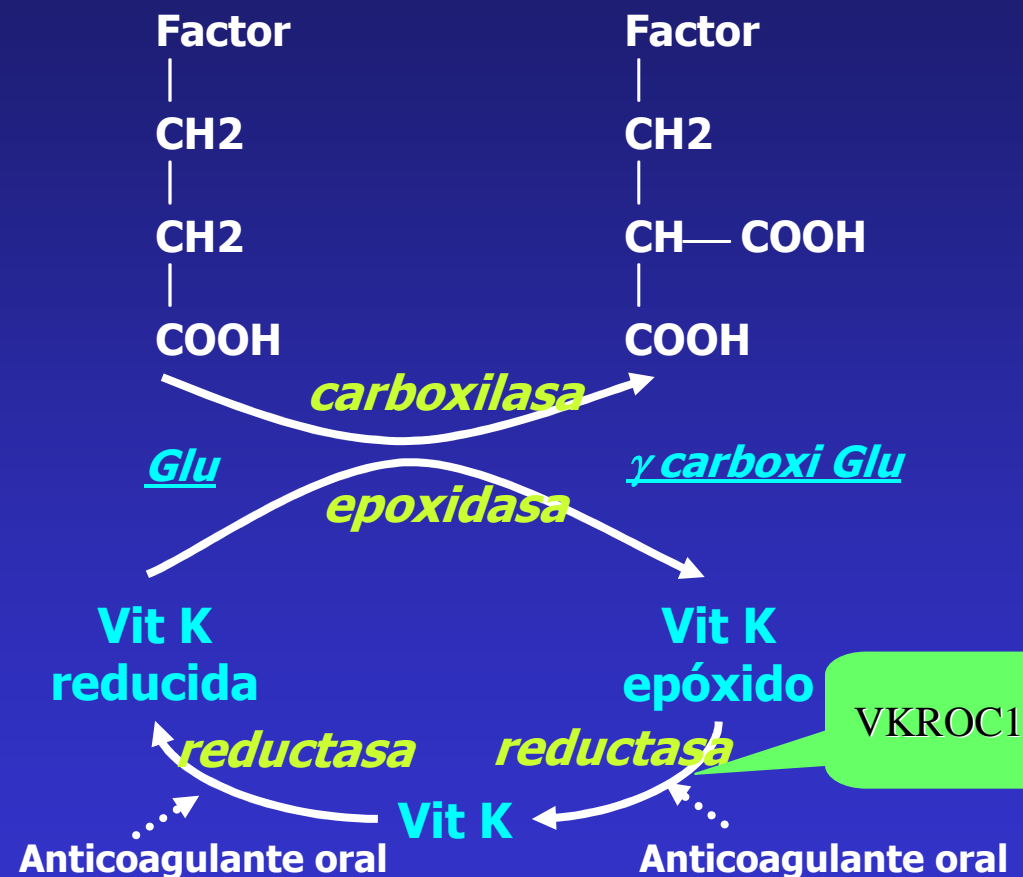
VÍA INTRÍNSECA

VÍA EXTRÍNSECA



Factores dependientes de vitamina K

- Factor II
- Factor VII
- Factor X
- Factor IX
- Proteína C
- Proteína S
- Proteína Z



Ciclo de la vitamina K y γ -carboxilación

TIEMPO DE PROTROMBINA (Quick)

Evalúa factores: VII - X - V - II - (I)

PLASMA CITRATADO 1' a 37 °C

Tromboplastina cálcica (FT + CaCl₂)

Formación de fibrina 

Expresión de resultados

Tiempo (seg)

%

Razón = $TP_{pac} / TP_{media normal}$

Valores de Referencia

70 - 120 %

TIEMPO DE PROTROMBINA (Quick)

Pruebas de corrección con Plasma Normal

1 vol. Plasma Normal + 1 vol. Plasma Paciente

Corrección → Deficiencia de factor

No corrección → Inhibidor

Causas de valores alterados

- Deficiencia congénita de los factores, cuali o cuantitativa
- Hepatopatías
- Deficiencia de Vitamina K
- Anticoagulación por vía oral
- Heparina no fraccionada (No a dosis terapéuticas)
- Deficiencia de Fbg < 50 mg/dl
- Disfibrinogenemia
- Inhibidor Lúpico
- Inhibidor específico de factores

Diferencias entre la Warfarina y el Acenocumarol

	Warfarina	Acenocumarol
Vida media	40-70hs	3-10 hs
Bibliografía	+++	+
Niveles terapéuticos estables	4-7 días	3-5 días
Variabilidad de nivel plasmático	+	+++
Estabilidad en rango	+++	++
Tiempo para suspender	+++	+
Dosis en mg	+++	++
Costo	+++	++

ESTANDARIZACION INTERNACIONAL DEL TIEMPO DE PROTROMBINA (Modelo WHO)

- **El RIN o Razón Internacional Normalizada es una “corrección” matemática (de la tasa de TP) que permite ajustar la diferente sensibilidad de los reactivos de tromboplastina**
- **RIN es la razón de TP que uno podría obtener si una tromboplastina de “referencia” hubiera sido usada.**
- **Permite la comparación de resultados entre laboratorios y reportes estandarizados de TP**

APTT

Evalúa factores: XII - XI - IX - VIII - X - V - II - (I)

Pruebas de corrección con Plasma Normal

1 vol. Plasma Normal + 1 vol. Plasma Paciente

Δ (seg) ($APTT_{Pac} - APTT_{Media Normal}$) \rightarrow Deficiencia de factor
 \rightarrow Inhibidor

< 5 seg Corrección

\geq 5 seg No corrección

Causas de Valores Alterados

- Def. congénita de factores
- Def. de Vit K
- Hepatopatías
- Heparina
- Hirudina
- Inhibidor específico de factores
- Inhibidor Lúpico
- Fbg < 50 mg/dl
- Disfibrinogenemia

TIEMPO DE TROMBINA

Plasma citratado

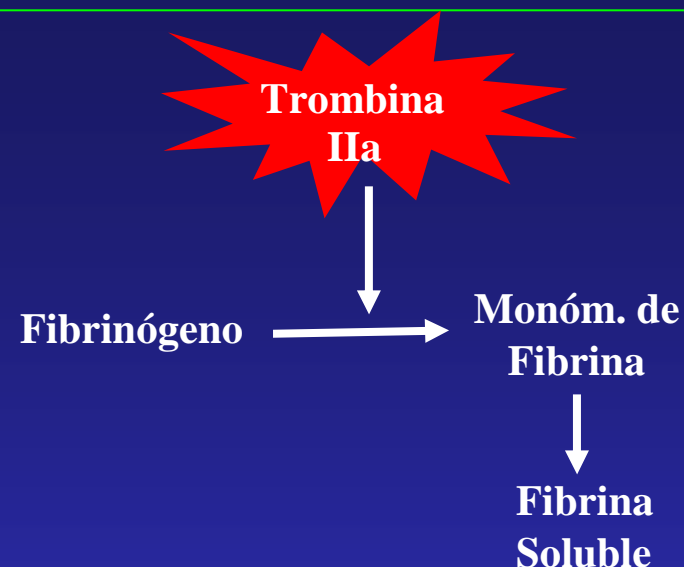
Trombina (10 UI/ml) 

Valores de Referencia

15 a 20 seg (12 seg)

Causas de Valores Alterados

- Hipofibrinogenemia (congénita o adquirida)
- Disfibrinogenemia (Fbg fetal)
- Heparina, heparinoides
- Inhibidores adquiridos específicos o inespecíficos
- Hirudina
- Dabigatran



SPECIAL ARTICLE

International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)

S. MIYAKIS,* M. D. LOCKSHIN,† T. ATSUMI,‡ D. W. BRANCH,§ R. L. BREY,¶ R. CERVERA,** R. H. W. M. DERKSEN,†† P. G. DE GROOT,†† T. KOIKE,‡ P. L. MERONI,‡‡ G. REBER,§§ Y. SHOENFELD,¶¶ A. TINCANI,*** P. G. VLACHOYIANNOPOULOS††† and S. A. KRILIS*

Laboratorio

1. **aCL (IgG y/o IgM)**, título moderado o alto (>40 GPL o MPL, o >99th percentilo), en al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas, por ELISA estandarizado para medir aCL dependientes de β_2 -GPI
2. **Anticoagulante lúpico**, en al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas (ISTH guidelines)
3. **Anti- β_2 GPI (IgG y/o IgM)**, (>99th percentilo) en al menos 2 oportunidades separadas más de 12 semanas, por ELISA estandarizado

Categorizar pacientes de acuerdo al tipo de aPL presente:

- I cualquier combinación de aPL
- IIa sólo AL
- IIb sólo aCL
- IIc sólo anti- β_2 GPI

Official Communication of the Scientific and Standardization Committee on
Lupus Anticoagulant / Phospholipid-dependent antibodies

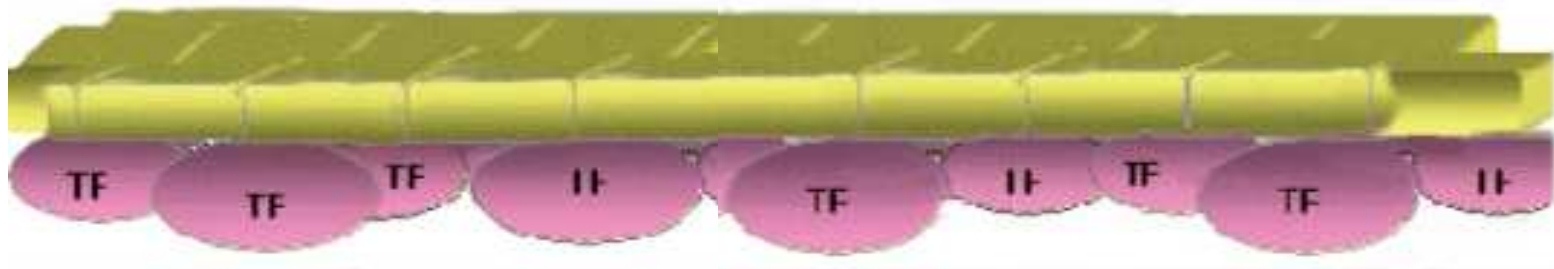
Update of the guidelines for Lupus Anticoagulant detection (2009)

V. Pengo*, **A. Tripodi†**, **G. Reber‡**, **J.H. Rand§**, **T.L. Ortel¶**, **M. Galli****, **P.
G. de Groot††**

No estudiar pacientes

- Bajo anticoagulación con HNF o LMWH
- ACO (INR > 3.00)
- Bajo tratamiento con hidroxicloroquina

*Mis mejores deseos de un **endotelio sano***



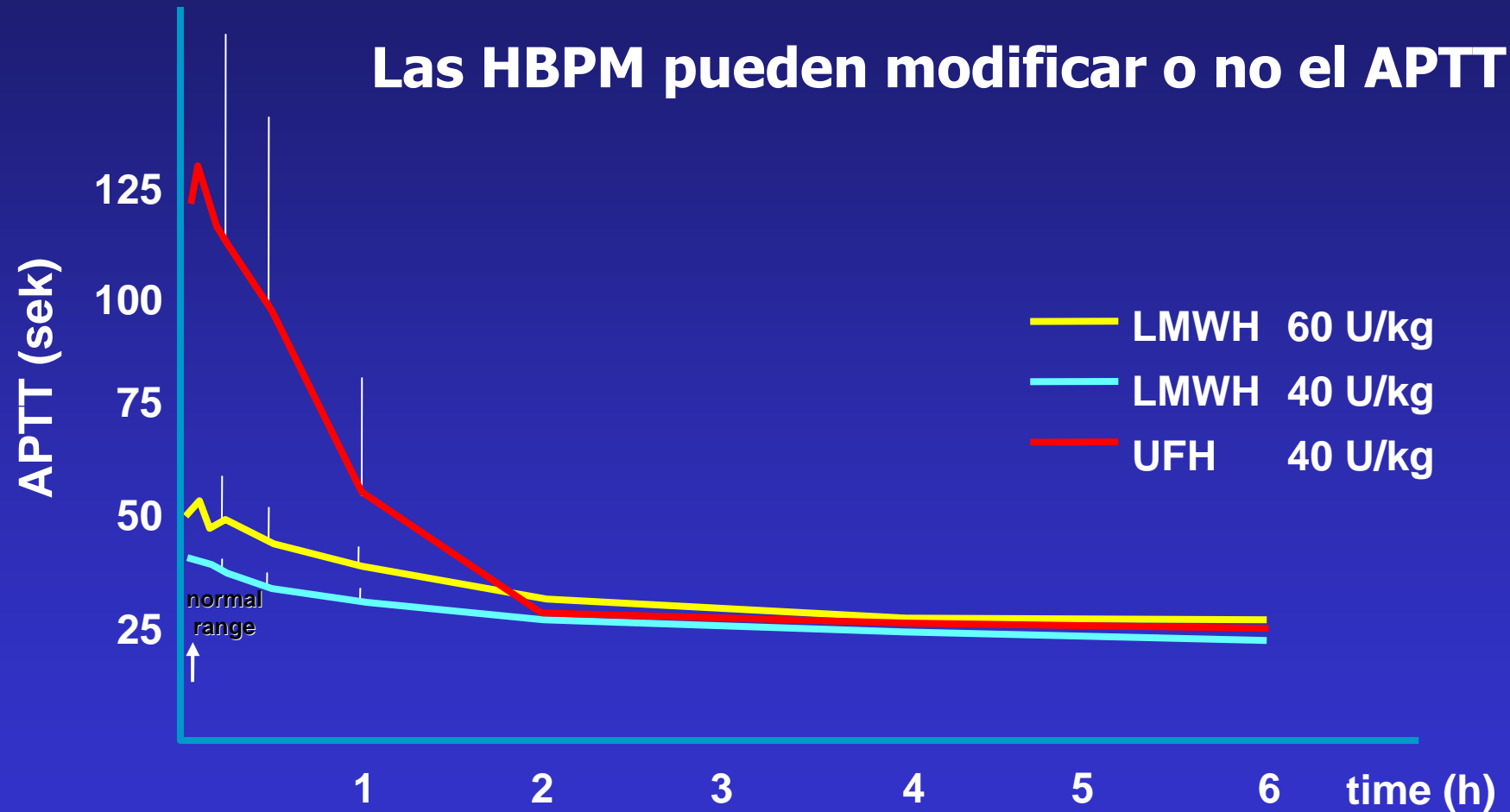
Muchas Gracias







HBPM: ¿cómo monitorear su efecto?



APTT luego de la infusión de un bolo de UFH 40 U/kg y LMWH 40 and 60 U/kg. Media \pm SD. n = 8

HBPM: ¿como monitorear su efecto?

- **Ensayos anti Xa cronométrico**

AT- HBPM (plasma) + FXa \longrightarrow FXa residual

La actividad de FXa se mide con un ensayo de punto final coagulable

- **Ensayo anti Xa cromogénico**

AT- HBPM (plasma) + FXa \longrightarrow FXa residual

La actividad del FXa residual se mide por su acción sobre un sustrato específico

- **Generación de trombina (no hay datos suficientes todavía)**

HBPM ¿es necesario su monitoreo?

- **Recomendaciones XXXI Conferencia del CAP,1998**

- ✓ **Pacientes con clearance de creatinina reducido**
- ✓ **Pacientes obesos o con bajo peso**
- ✓ **Embarazo**
- ✓ **Terapia prolongada con HBPM (cáncer)**
- ✓ **Pacientes pediátricos**

El target en ptes con 2 inyecciones debería ser 0.5-1.1 IU/ml y para una única dosis diaria debería ser 0.8 a 1.6 IU/ml

- ✓ **El monitoreo utilizando el ensayo de anti Xa calibrado contra un estándar internacional de HBPM.**
- ✓ **Extraer la muestra 4 hs después de la inyección subcutánea**

HBPM ¿es necesario su monitoreo?

- Subcomité de Anticoagulación del ISTH, 2002

La actividad anti Xa representa la cantidad de heparina presente pero no necesariamente la función antitrombótica de las HBPM

✓ **Los ensayos deben ser aquellos desarrollados para HBPM, método y equipo específico y calibrados con un estándar internacional de HBPM**

✓ **Es importante el tiempo al cual se toma la muestra**

Los niveles de anti Xa no han demostrado ser un buen predictor de sangrado ni de la eficacia hemorrágica en tromboprofilaxis con HBPM

El monitoreo de las HBPM no es indicado de rutina, pero si en pacientes seleccionados (obesos, infantes, enfermos renales, ptes con riesgos de sangrado)

HBPM ¿es necesario su monitoreo?

Boumameaux, Moerloose. Is laboratory monitoring of low molecular weight heparin therapy necessary ? No

- **Variabilidad de las farmacocinéticas de las HBPM (tiempo de la toma de muestras)**
- **Pobre correlación entre los distintos ensayos anti Xa**
- **La actividad anti Xa no correlaciona con el riesgo de sangrado**
- **Esperanza en pruebas globales con el tiempo de generación de trombina**
- **Monitorear en situaciones especiales**

JTH2004,2:551-4

Harenberg J. Is laboratory monitoring of low molecular weight heparin therapy necessary ? Yes

- **Sugiere el método cromogencio con Xa bovino porque es el método que presenta menor variabilidad en ensayos multicentricos, no descarta los coagulables**
- **La curva estándar debe prepararse con la misma HBPM que recibe el pte o con el estándar de la WHO que tiene una relación anti Xa/anti IIa 2.5**
- **Toma de muestras a las 4hs post inyección**
- **Pacientes seleccionados acorde a CAP 1998**

JTH2004,2:547-550

HBPM ¿es necesario su monitoreo?

- No monitoreo en pacientes con dosis profilácticas
- Pacientes seleccionados
 - Pacientes con clearance de creatinina reducido**
 - Pacientes obesos o con bajo peso**
 - Embarazo**
 - Terapia prolongada con HBPM (cáncer)**
 - Pacientes pediátricos**
 - Pacientes de alto riesgo de sangrado**

HBPM: ¿Cómo monitorear ?

- Con ensayo anti Xa (método –equipo específico)
- Tiempo estandarizado en la toma de la muestra (4 hs)
- Calibración con estándar internacional de la WHO Relación anti Xa/anti IIa= 2.5 o la misma heparina que recibe el paciente