

Avances en el Diagnóstico de las Alteraciones de la Hemostasis*

Dres. Juan Carlos Cazeres** y Carlos Garbino*** y Marta Klaps

RESUMEN

Los autores señalan los fundamentos básicos de las distintas técnicas diagnósticas empleadas en el laboratorio de hemostasis, subrayando las principales aplicaciones prácticas de las mismas en la evaluación de los pacientes que presentan cuadros hemorrágicos o trombóticos.

Al mismo tiempo describen cómo el avance en la tecnología, al introducir nuevos métodos diagnósticos, ha permitido una mejor comprensión de la compleja interrelación de los distintos componentes que intervienen en la hemostasis. A partir de esto, han podido ser adecuadamente caracterizadas diversas entidades clínicas que en el pasado no tenían explicación lógica.

SUMMARY

The authors point out the basic reasons of the different diagnostic techniques used in the haemostasis laboratory, emphasizing their main practical applications in the valuation of haemorrhagic or thrombotic patients. At the same time they show how the technological progress with new diagnostic methods has made possible a better understanding of the complex relationship among the different components of

haemostasis. Starting from this, it could be distinguished properly different clinical entities which had no logical explanation in the past.

RESUME

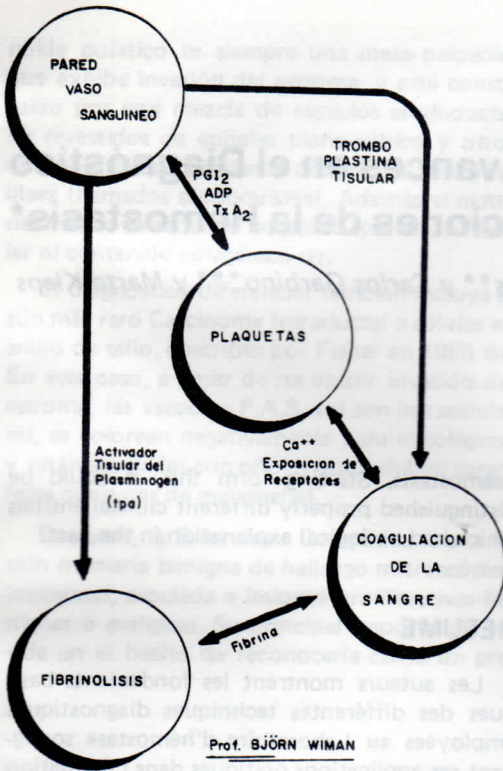
Les auteurs montrent les fondements basiques des différentes techniques diagnostiques employées au Laboratoire d'hémostase soulignant ses applications pratiques dans l'évaluation des malades présentant des tableaux hémorragiques ou thrombotiques. Au même temps, on décrit l'avancement de la technologie, en introduisant de nouvelles méthodes diagnostiques, a permis une meilleure compréhension de la complexe relation des différents composants dans l'hémostase.

A partir de là, on a pu être identifiés des entités que dans le passé n'avaient pas d'explication logique.

INTRODUCCION

La hemostasis es un mecanismo fisiológico complejo, propiedad del sistema circulatorio, cuyo objetivo es el de mantener a la sangre en estado líquido dentro de los vasos sanguíneos.

* Servicio de Hematología Especializada.
** Jefe: Equip. Cap. Dr. Juan Carlos Cazeres.
*** Equip. May. Médico Carlos Garbino.
**** Sgto. 1o. Médico Marta Klaps.



- FIGURA 1 -

- COMPONENTES DE LA HEMOSTASIS -

Los sistemas endotelial, plaquetario, de la coagulación y fibrinolítico son los integrantes de este mecanismo interrelacionándose a través de diversas vías para promover una respuesta rápida y localizada, que impida tanto la hemorragia excesiva como la trombosis generalizada. (Fig. No. 1).

La metodología diagnóstica utilizada en la detección de las alteraciones de la hemostasis ha variado con el correr de los años, modificando concomitantemente la comprensión del rol de los diversos componentes del sistema hemostático.

Así, durante mucho tiempo se estudió a la plaqueta exclusivamente mediante el microscopio óptico dándole importancia sólo a la función mecánica en la formación del tapón hemostático.

Con la introducción de los agregómetros y la adecuación de las técnicas para la preservación de plaquetas con vistas a su estudio por el

microscopio electrónico, se caracterizan mejor las distintas funciones de la plaqueta, especialmente las secretoras.

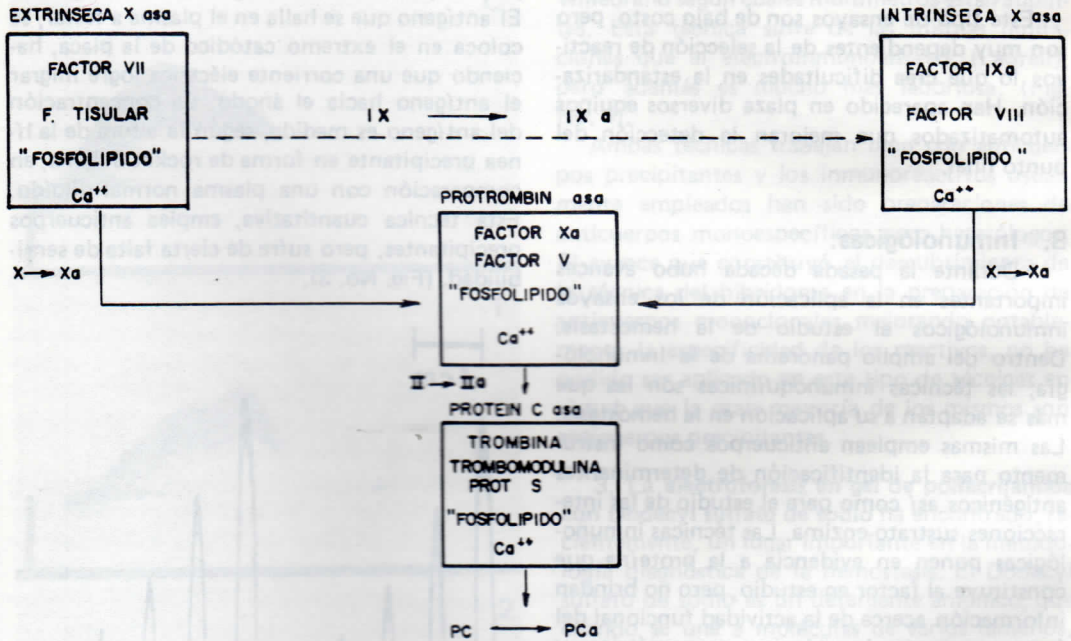
Ultimamente, empleando técnicas bioquímicas conjuntamente con las ultraestructurales, se han identificado numerosas sustancias que son liberadas por las plaquetas y el endotelio vascular, estableciéndose una estrecha relación entre ambos, tendientes a brindar una respuesta rápida y localizada frente a la injuria vascular.

Paralelamente, el desarrollo de la metodología de diagnóstico en los sistemas de coagulación y fibrinolítico atravesó por varias etapas. Hasta hace poco tiempo, el estudio de las alteraciones de estos sistemas eran principalmente de tipo fenomenológico. Los factores de la coagulación fueron descubiertos mezclando plasmas normales con plasmas de pacientes deficitarios en algún factor. Mediante este proceso empírico, las proteínas de la coagulación fueron identificadas y denominadas con números romanos.

Se ideó el mecanismo de la cascada y a partir de allí las técnicas de laboratorio que exploran la coagulación (basadas en cronometrar el tiempo que se tarda en alcanzar el punto final: la formación de fibrina) fueron arbitrariamente divididas en sistemas intrínseco y extrínseco. El tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (KPTT) y el tiempo de Protrombina respectivamente, son los métodos globales empleados aún hoy día, en la exploración de ambas vías. Hasta que los bioquímicos comenzaron a estudiar las proteínas de la coagulación minuciosamente, muy poco se conocía acerca de las complejas interacciones en la cascada de la coagulación. Durante la última década, sin embargo, dichas proteínas han sido purificadas, y caracterizadas en detalle en base a la aplicación de nuevas metodologías.

Así uno de los más excitantes descubrimientos lo constituyó la identificación del ácido gamma-carboxiglútamico en las proteínas vitamino K dependientes (Factores II, VII, IX, X, proteínas C y S) (Fig. No. 2). La importancia de este aminoácido para la formación del complejo macromolecular integrado por varios factores (tales como IXa-VIII-Ca⁺⁺X), sobre la superficie

COMPLEJOS ENZIMATICOS VIT. K DEPENDIENTES DE LA COAGULACION



- FIGURA 2 -

de la plaqueta activada, fue rápidamente apreciado. Como consecuencia, la clásica cascada de la coagulación que fue propuesta originalmente como una serie secuencial de etapas enzimáticas fue modificada. De este modo, se concluyó que la coagulación es un sistema dependiente de una superficie y requiere enzimas, cofactores y sustratos.

Al mismo tiempo del avance en el conocimiento acerca de la formación del coágulo estabilizado de fibrina, se investigaron aspectos reguladores del sistema hemostático. Un número de inhibidores fisiológicos de las serino-proteasas fueron caracterizados, de las cuales el más importante es la antitrombina (ATIII). El sistema de la Proteína C de la coagulación, con su cofactor la proteína S es descubierto más tarde, explicando la degradación de los cofactores V y VIII activados y la estimulación de la fibrinolisis. Tanto las deficiencias congénitas o adquiridas de Antitrombina III, Prot. C. o Prot. S se acompañan de complicaciones tromboticas, lo

que ha permitido correlacionar aspectos bioquímicos concretos con hechos clínicos que no tenían explicación hasta hace algunos años.

El objetivo de esta presentación es destacar los novedosos métodos de diagnóstico empleados en el laboratorio de hemostasis y sus aplicaciones prácticas para el estudio de las alteraciones hemorrágicas o tromboticas.

TECNICAS EMPLEADAS EN EL LABORATORIO DE HEMOSTASIS

- A. Cronométricas.
- B. Inmunológicas.
- C. Sustratos Sintéticos.

A. Cronométricas:

Se basan en el tiempo que demora en formarse el coágulo. Son clásicas, pero aún se siguen aplicando, teniendo permanente vigencia

como método de screening en el estudio inicial de los pacientes.

Este tipo de ensayos son de bajo costo, pero son muy dependientes de la selección de reactivos lo que crea dificultades en la estandarización. Han aparecido en plaza diversos equipos automatizados que mejoran la detección del punto final.

B. Inmunológicas:

Durante la pasada década hubo avances importantes en la aplicación de los ensayos inmunológicos al estudio de la hemostasis. Dentro del amplio panorama de la Inmunología, las técnicas inmunoquímicas son las que más se adaptan a su aplicación en la hemostasis. Las mismas emplean anticuerpos como instrumento para la identificación de determinantes antigénicos así como para el estudio de las interacciones sustrato-enzima. Las técnicas inmunológicas ponen en evidencia a la proteína que constituye al factor en estudio, pero no brindan información acerca de la actividad funcional del factor en juego. Las técnicas cronométricas y las de sustratos sintéticos, por el contrario miden la capacidad funcional del o los factores involucrados. Como en patología puede darse el caso que el factor (antígeno o proteína) pueda estar presente, pero no tenga actividad funcional, siempre es obligatorio realizar las técnicas que determinen actividad funcional.

Las técnicas inmunológicas pueden ser subdivididas en tres grupos:

- a) Técnicas de anticuerpos en Gel.
- b) Técnicas inmunoenzimáticas (Elisa).
- c) Técnicas inmunoradiométricas (RIA).

a) De las múltiples variaciones técnicas empleando anticuerpos suspendidos en agarosa o en otro soporte en gel, para la detección del antígeno, los que han mostrado mayor aplicación en la hemostasis son:

1. Electroinmunoensayo por Rocket (Técnica de Laurell).
2. Inmunolectroforesis cruzada o bidimensional.
3. Electroforesis en gel de Poliacrilamida con dodecyl sulfato de sodio.

1. La **técnica de Laurell** utiliza un anticuerpo precipitante en una delgada placa de agarosa. El antígeno que se halla en el plasma a testar, se coloca en el extremo catódico de la placa, haciendo que una corriente eléctrica logre migrar el antígeno hacia el ánodo. La concentración del antígeno es medida, según la altura de la línea precipitante en forma de rocket o llama, en comparación con una plasma normal diluido. Esta técnica cuantitativa, emplea anticuerpos precipitantes, pero sufre de cierta falta de sensibilidad. (Fig. No. 3).

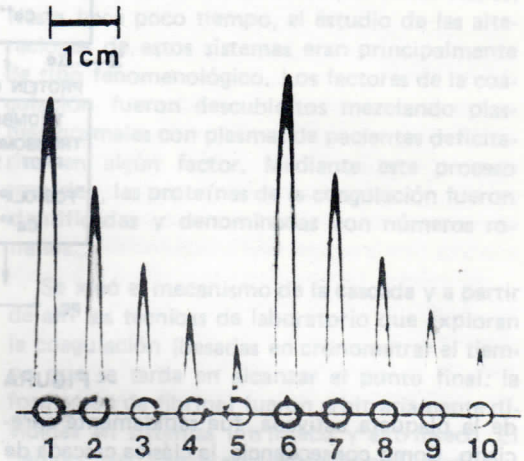


Fig. 3.: Técnica de electroinmunoensayo por Rocket para la determinación de Factor VIII: Antigénico.

2. La **Inmunolectroforesis cruzada** también depende de la precipitación de complejos antígeno-anticuerpos sobre un soporte de agarosa. Aquí, sin embargo, el antígeno es previamente separado en moléculas de acuerdo al tamaño y migración de las mismas en un campo eléctrico. Luego de efectuada la electroforesis exclusiva del antígeno, la placa es rotada 90°, y una segunda corrida electroforética mueve al antígeno hacia un block de agarosa contiguo que contiene al anticuerpo. Esta técnica es un instrumento de gran valor como método cualitativo, en la detección de la distribución anormal de moléculas de diversos tamaños que contienen epítopes comunes. La determinación de los multímetros que componen al factor VIII Von Willebrand (WF) es una de las principales aplica-

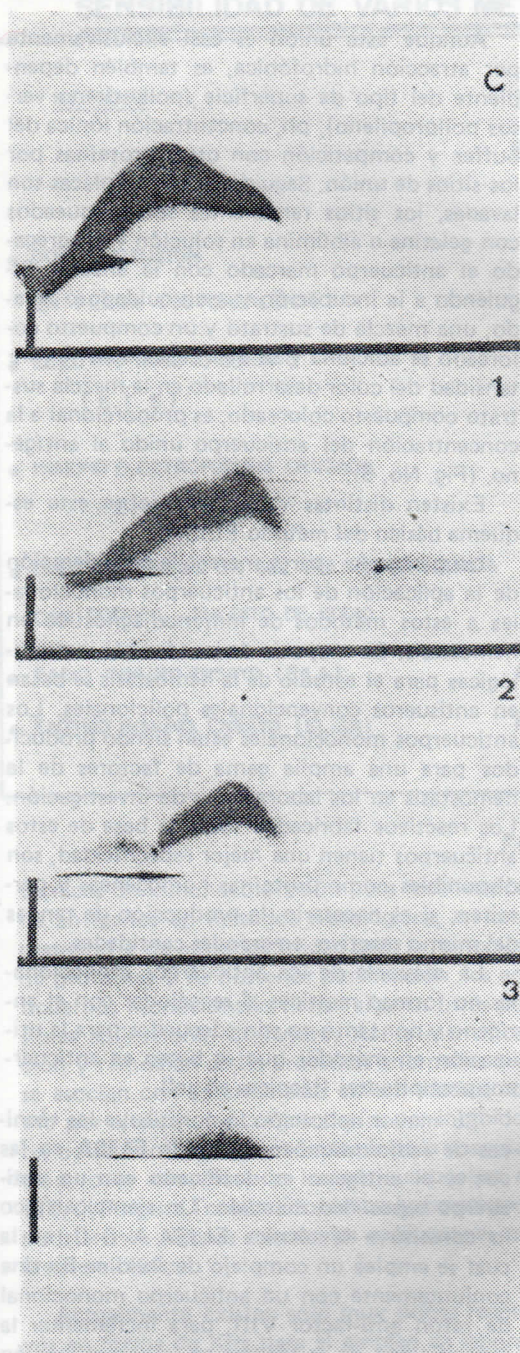


Fig. 4.: Anomalías heterogéneas del Factor VIII-WF en la enfermedad de Von Willebrand. En C testigo normal 1, 2 y 3 muestra diferentes alteraciones de la estructura multimérica del Factor VIII-WF.

ciones de esta técnica, permitiendo distinguir las distintas variedades de la enfermedad de Von Willebrand según cuales multímeros están ausentes. Esta técnica sufre de las mismas limitaciones que el electroinmunoensayo, (Laurell), pero además es mucho más laboriosa. (Fig. No. 4).

Ambas técnicas trabajan bien con anticuerpos precipitantes y los inmunoreactivos usualmente empleados han sido preparaciones de anticuerpos monoespecíficos pero heterólogos. El avance que constituyó el descubrimiento de la técnica del hibridoma en la preparación de anticuerpos monoclonales mejorando notablemente la especificidad de los reactivos, no ha podido ser aplicado en este tipo de técnicas en virtud que la gran mayoría de los mismos son anticuerpos precipitantes.

3. La electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecyl sulfato de sodio ha encontrado, recientemente, un lugar importante en la metodología diagnóstica de la hemostasis. El Dodecyl sulfato de sodio es un detergente aniónico, que cuando se une a moléculas de varios tamaños, les permite ser separados por electroforesis fundamentalmente por su tamaño molecular, más que por el efecto combinado de tamaño y carga eléctrica. La electroforesis es llevada a cabo con tres buffers de diferente pH lo que incrementa la capacidad del sistema en la separación de las moléculas por su tamaño.

La separación es también potenciada por la acción de tamiz de las moléculas sobre el gel de base. La agarosa, la acrilamida y una combinación de ambas sustancias han sido utilizadas para lograr que la mencionada acción tamiz pueda cumplirse. Una vez separada las moléculas de distintos tamaños que llevan los determinantes antigénicos, pueden ser precipitados usando anticuerpos marcados con Iodo 125 (^{125}I), y el gel revelado por autorradiografía después del lavado para la renovación de moléculas extrañas. Este sistema electroforético basado en buffers discontinuos para la separación de proteínas con elevada resolución en comparación con los sistemas habituales, tiene su mayor aplicación al estudio de los multímeros que componen al factor VIII y en la detección de variantes de la enfermedad de Von Willebrand.

b) Técnicas Inmunoenzimáticas. (ELISA)

c) Técnicas Inmuno Radiométricas (RIA).

Estas técnicas empleadas para la determinación cualitativa y cuantificación de antígenos de interés en hemostasis, comparten mucho en común. El paso inicial, en ambos métodos, es el marcado o conjunción del anticuerpo deseado. Para los ensayos Isotópicos el marcado más común es el 125 . La forma de fijación al anticuerpo puede ser por el método de la cloramina o por el de la lactoperoxidasa.

Una gran variedad de técnicas están disponibles para la fijación de la enzima marcada al anticuerpo. En plaza existen muchos Kits comerciales con preparaciones de anticuerpos marcados.

En su forma más simple el método ELISA depende de la unión del antígeno a ser ensayado a una fase sólida, usualmente una placa de microtitulación.

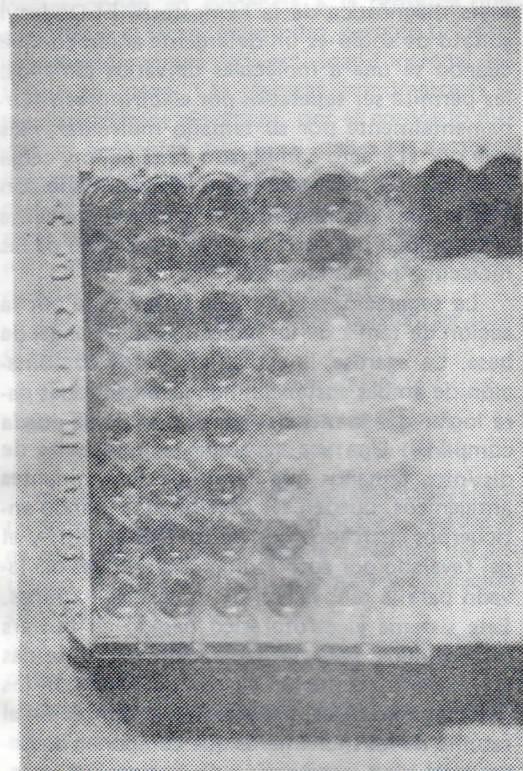


Fig. 5.: Determinación de Factor VII: Antigénico mediante Enzimoimmunoensayo (Elisa).

Aunque esta unión es casi exclusivamente por atracción hidrofóbica, es también dependiente del tipo de superficie (poliestireno versus polipropileno), pH, concentración iónica del buffer y competición con otras proteínas por los sitios de unión. Seguidamente, las placas son lavadas, los sitios remanentes son bloqueados con gelatina o albúmina en solución y es agregado el anticuerpo marcado con la enzima. Siguiendo a la incubación y a un cuidadoso lavado, una mezcla de sustrato y un compuesto coloreado se adiciona y se deja reaccionar. La intensidad del color desarrollado en la mezcla sustrato compuesto coloreado, es proporcional a la concentración del anticuerpo unido al antígeno. (Fig. No. 5).

Existen distintas variaciones sobre este esquema básico del método ELISA.

Un párrafo aparte merece la consideración de la aplicación de los anticuerpos monoclonales a estos métodos de inmunodiagnóstico en hemostasis. La mayoría de las técnicas inmunológicas para el estudio de la hemostasis se basan en antisueros convencionales policlonales. Los anticuerpos monoclonales están siendo producidos para una amplia gama de factores de la hemostasis en los laboratorios de investigación. Los reactivos fabricados sobre la base de estos anticuerpos tienen una mejor especificidad, son disponibles como proteínas homogéneas y permiten, si es necesario, la producción de tandas del mismo reactivo, en grandes cantidades.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales no forman matrices al reaccionar con el antígeno y por tanto no son adecuados para la utilización en métodos que se basen en anticuerpos precipitantes (técnicas en gel).

Su mayor aplicación lo constituye las técnicas de **radioinmunoensayo** y de **ELISA** en las cuales el **antígeno es dosificado con un anticuerpo específico marcado**. Un ejemplo típico lo constituye la técnica ELISA-A B C, en la cual se emplea un complejo de Avidina-Biotina conjuntamente con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-factor VIII, para incrementar la especificidad de la técnica en la determinación del factor VIII: Antígeno.

Además de utilizarse en otros métodos de investigación en hemostasis, tales como son las

SENSIBILIDAD DE VARIOS METODOS DE INMUNO ENSAYO

<u>METODOS</u>	<u>MAXIMO DE SENSIBILIDAD</u> <i>ug/ml</i>	<u>APLICACION PRINCIPAL</u>
● DOBLE DIFUSION EN PLACA (OUTCHERLONY)	10 - 40	CUALITATIVO, PUEDE SER SEMICUANTITATIVO
● ELECTRO INMUNO ENSAYO (E. I. E.)	100	CUANTITATIVO
● INMUNO ELECTROFORESIS CRUZADA (I. E. C.)	100	CUALITATIVO
● ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL - SULFATO DE SODIO	0,02	CUALITATIVO
● RADIO INMUNO ENSAYO (RIA)	RANGO DE <i>ug - ng/ml</i>	CUANTITATIVO
● ENZIMO INMUNO ENSAYO (ELISA)	RANGO DE <i>ug - ng/ml</i>	CUANTITATIVO

- FIGURA 6 -

técnicas de inmunocoloración para localización de antígenos en métodos histológicos, en cromatografía de inmunoafinidad para la remoción de proteínas y su posterior purificación, los anticuerpos monoclonales tienen algunas otras posibles aplicaciones de futuro. Así la identificación y remoción de las proteínas anormales que se asocian con determinadas enfermedades, como por ejemplo las coagulopatías por inhibidores adquiridos de algunos factores de la coagulación, o la remoción de los anticuerpos en el (PTA), Purpura Trombocitopénico Autoinmune, podrían ser algunas eventuales aplicaciones en la esfera clínica.

Actualmente existen sólo muy pocos reactivos en forma de Kits para el empleo en laboratorio clínico. Sin embargo, el Comité Internacional de Hemostasis y Trombosis está efectuando controles de calidad sobre anticuerpos mo-

noclonales para la determinación de: **glicoproteínas de la superficie plaquetaria, factores VIII y IX.**

Volviendo a las técnicas de enzimo y radioinmunoensayo señalemos que ambas son muy similares en sus fundamentos, estando la diferencia en el marcaje del anticuerpo. En el RIA el marcado se efectúa con un isótopo radioactivo por lo que se requieren precauciones especiales de seguridad, entrenamiento adecuado al personal, contadores gama y además los isótopos tienen una vida media corta. Las técnicas de ELISA superan muchos de estos problemas y su sensibilidad se aproxima bastante a las de RIA. (Fig. No. 6).

Aplicación de las Técnicas Inmunológicas en Hemostasis.

Las aplicaciones principales de estas técnicas son:

- 1) La identificación cualitativa de factores.
- 2) Los ensayos cuantitativos de factores de la coagulación.
- 3) La determinación de sustancias neoantigénicas formadas como resultado de la coagulación.
- 4) La dilucidación de hechos estructurales de las proteínas que intervienen en la hemostasis.
- 5) La preparación, mediante la remoción selectiva de factores específicos, de reactivos concentrados y compuestos purificados.

El campo de aplicación es tan amplio que dichas técnicas son utilizadas para la determinación tanto de fenómenos hemorrágicos como trombóticos.

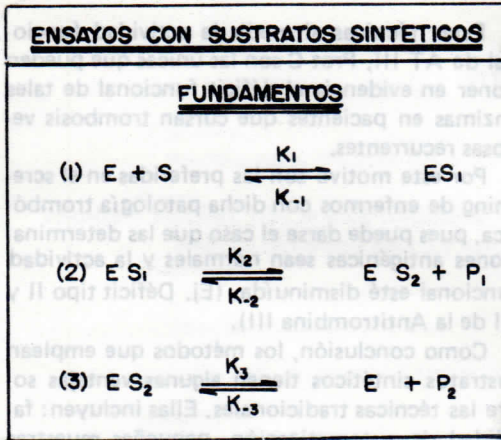
En el primer caso, se han hecho grandes progresos en la detección de variantes de la enfer-

medad de Von Willebraund, así como empleando en conjunto técnicas inmunológicas y funcionales ha mejorado el despistaje en las mujeres portadoras de hemofilia.

En la trombosis, estas técnicas han puesto en evidencia déficit de los sistemas anticoagulantes naturales. (Antitrombina III y Proteína C y S) que explican episodios trombóticos reiterados, en pacientes jóvenes con deficiencia congénita de algunos de estos inhibidores. En el mismo sentido y en la búsqueda afanosa de lograr marcadores que sean predictores de estados pre-trombóticos, estas técnicas han permitido detectar proteínas de secreción específica plaquetaria (Beta-tromboglobulina-Factor Plaquetario 4), péptidos de clivaje del fibrinógeno (Fibrinopéptidos A y B) y complejos de activación del sistema de la coagulación (trombina-antitrombina; fragmentos F 1 + 2) o de la fibrinólisis (plasmina - ALFA2 - antiplasmina) (Fig. No. 7).

APLICACION DE LOS ENSAYOS INMUNOLOGICOS EN HEMOSTASIS

- PLAQUETAS : - PROTEINAS ESPECIFICAS (βTG - FP4)
- ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS EN P.T.A.
- COAGULACION : - FACTORES PRO - COAGULANTES (VIII)
- ANTICOAGULANTES NATURALES (AT III - PROT. C y PROT. S)
- FIBRINOLISIS : - PLASMINOGENO
- MARCADORES DE ACTIVACION "IN VIVO"
- FIBRINOPEPTIDO A
- COMPLEJOS TROMBINA - ANTITROMBINA, - PLASMINA - α₂ ANTIPLASMINA
- FRAGMENTOS F₁₊₂
- PEPTIDO LIBERADO POR ACTIVACION DE LA PROTEINA C



- FIGURA 8 -

C. Técnicas con sustratos sintéticos.

El uso de sustratos sintéticos para la determinación de los componentes de los sistemas de coagulación y fibrinolítico ha introducido conceptos revolucionarios y nuevas metodologías al laboratorio de hemostasis. A partir de su empleo se comprendió mejor la fisiología de la coagulación identificándose **enzimas, cofactores y sustratos**.

El funcionamiento de estos métodos se sustentan en reacciones enzimáticas que siguen las teorías básicas de la cinética enzimática. Las serino-proteasas hidrolizan uniones peptídicas en tres etapas: En la primera, se asiste a la formación de un complejo no covalente enzima-sustrato (E-S 1). En la segunda, se produce un compuesto intermedio covalente acyl-enzima, liberándose el grupo amino P₁. La última etapa conduce a la liberación de un segundo producto P₂ y de la enzima libre, debido a la hidrólisis del acyl-enzima. (Fig. No. 8).

Los sustratos sintéticos tienen dos componentes: un oligopéptido y un grupo indicador (cromóforo o fluoróforo). La secuencia del oligopéptido es específica y está diseñada para imitar el sitio del clivaje del sustrato natural de la enzima proteolítica que se está midiendo. El grupo indicador (ya sea cromogénico o fluorogénico) debe estar unido al grupo carboxyl de la secuencia amino terminal del oligopéptido. La liberación del grupo indicador, que para los sustratos cromogénicos muchas veces es la p-ni-

troanilina (PNA), es proporcional a la actividad enzimática y puede ser fácilmente medido mediante un espectrofotómetro a la longitud de onda apropiada (400 nanómetros). Los fluorocromos utilizados son el 4-metoxibeta-naftilamida (MNA), el aminoisoftálicoácido dimetiléster (AIE) y el 7-amino 4 metilcoumarin (MGA). Si se usa un indicador fluorométrico, entonces se hace necesario un fluorómetro para medir la acción enzimática sobre el sustrato.

Los sustratos sintéticos empleados para determinar la actividad enzimática proteolítica deben llenar los siguientes requisitos:

- a) el clivaje debe ocurrir en un sólo lugar;
- b) El indicador liberado debe tener una absorbancia a una porción del espectro donde la absorbancia del sustrato no sea significativa;
- c) en caso de sustratos cromogénicos, el cromógeno liberado debe poseer un gran coeficiente de extinción molar, haciendo posible la realización de los ensayos con pequeños volúmenes finales;
- d) la hidrólisis enzimática debe seguir la ley de Michaelis-Menton.

Estas técnicas pueden ser llevadas a cabo por determinaciones de punto final o de velocidad inicial (ensayos cinéticos). Los ensayos de punto final permiten que la reacción enzimática ocurra en un período específico de tiempo. Entonces, la reacción es finalizada con el agregado del ácido acético, y la concentración del indicador liberado es medida por un fotómetro. Este método es válido sólo dentro de límites muy estrechos y los mismos por supuesto, deben ser conocidos a partir de determinaciones experimentales.

Para la mayoría de este tipo de ensayos, se prefieren las determinaciones cinéticas. Estas miden la velocidad del cambio en densidad óptica por lo que requieren el uso de un espectrofotómetro con registrador. Como en cualquier reacción enzimática, las otras variables a ser controladas incluyen la temperatura, el tipo y concentración del buffer, influencia de inhibidores, potenciadores (iones metálicos o quelantes) y la posible aparición de reac-

ciones cruzadas, todos factores que contribuirán, si están presentes, a resultados inexactos.

Los resultados en los ensayos cromogénicos son expresados de varias maneras, usualmente dependiendo de la enzima que está siendo determinada. Corrientemente, la forma más común es expresar la **ACTIVIDAD** como por ciento del normal (comparando el plasma problema con un pool de plasmas normales), o en unidades plasmáticas equivalentes. Una unidad plasmática equivalente se define como la **cantidad de una sustancia presente en un mililitro de un pool de plasma standar**. Una alternativa a esto, es expresar los resultados como Katal por mol de enzima, o en nanokatal por mol de enzima. Un nanokatal (nkat) es la unidad internacional definida como la concentración de actividad enzimática que convierte un nanomol de sustrato por segundo.

Aplicación de los Sustratos Cromogénicos en Hemostasis.

Gracias a los esfuerzos de los grupos Kabi y Blomback existen hoy día numerosos sustratos sintéticos que abarcan prácticamente a todos los factores que intervienen en la hemostasis. Además, modificando algunas variables en el sistema a testar, un mismo sustrato cromogénico puede ser adaptado para varios ensayos. Así por ejemplo, el sustrato llamado S-2222, sensible al factor X activado, puede ser empleado en la determinación de los factores X, VIII, IX, factor plaquetario 4 y aún para la estandarización de la Heparina.

El gran impacto de su utilización lo constituye, sin duda, la medición de los componentes del sistema fibrinolítico, hasta ahora explorado por técnicas tediosas y escasamente sensibles. Con el advenimiento de la terapia trombolítica, estas técnicas brindan un apoyo considerable al monitoreo de factores claves, como lo son el plasminógeno y sus activadores, la plasmina y la Alfa 2-antiplasmina.

Asimismo, los sustratos cromogénicos han sido empleados con gran éxito, además de la determinación de la actividad funcional de los factores procoagulantes, en la medición de los inhibidores naturales de la coagulación.

Estas técnicas al medir la actividad funcional de AT III, Prot C son las únicas que pueden poner en evidencia el déficit funcional de tales enzimas en pacientes que cursan trombosis venosas recurrentes.

Por este motivo son las preferidas en el screening de enfermos con dicha patología trombótica, pues puede darse el caso que las determinaciones antigénicas sean normales y la actividad funcional esté disminuída. (Ej. Déficit tipo II y III de la Antitrombina III).

Como conclusión, los métodos que emplean sustratos sintéticos tienen algunas ventajas sobre las técnicas tradicionales. Ellas incluyen: facilidad de automatización, pequeñas muestras de plasma a utilizar (20 microlitros), sensibilidad aumentada, no es necesario el uso de plasmas deficientes en un factor y potencialmente tienen un mejor grado de estandarización.

Las mayores desventajas son el costo muy elevado y la falta de correlación de los resultados frente a los ensayos tradicionales en la detección de algunas patologías congénitas, como lo es por Ej. la disprotrombinemia.

Sin embargo, la fácil adaptación de las técnicas con sustratos sintéticos, a los analizadores químicos existentes, ofrece un medio de establecer paneles para estudio de la coagulación, brindando un **máximo de información de un modo rápido, sensible y específico**.

Así por ejemplo, un panel empleando sustratos sintéticos para las determinaciones de KPTT, tiempo de protrombina, factor VIII: coagulante, factor X, proteína C y antitrombina III podrá efectivamente realizar un adecuado despistaje tanto de enfermedades hemorrágicas como trombóticas.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWN G. D. — Application of immunologic assays to the coagulation laboratory. Clin. Lab. Med. 1984, 4 (2): 345-361.
2. CHRISTENSEN, U. — Requirements for valid assays of clotting enzymes using chromogenic substrates. Thromb. Haemost. 1980, 43: 169-174.