


MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Utilidad diagnóstica del ensayo de generación de trombina

 9 min.


La trombina proveniente de la activación de la coagulación es la principal enzima del sistema hemostático. Tiene un rol fundamental en la hemostasia y en la trombosis. Los ensayos globales tales como el tiempo de protrombina para evaluar la vía extrínseca de la coagulación y el tiempo de tromboplastina parcial activado que evalúa la vía intrínseca, así como los dosajes de factores de coagulación en forma individual se usan en la rutina de los laboratorios de hemostasia. En el siguiente trabajo realizado por el Área de Hemostasia de Laboratorios MANLAB nos describen un ensayo de generación de trombina (GT) automatizado que utiliza un software para obtener la curva de GT denominada Trombograma. Esta prueba promete ser más fisiológica en la evaluación de la hemostasia.



Leonardo Bello*, Ricardo Raúl Forastiero**

Área Hemostasia – MANLAB

*Técnico del área Hematología y Hemostasia

**Dr. Bioquímico Especialista en Hemostasia



E-mail: ricardo.forastiero@manlab.com.ar



La trombina proveniente de la activación de la coagulación es la principal enzima del sistema hemostático. Tiene un rol fundamental en la hemostasia y en la trombosis. Los ensayos globales tales como

el tiempo de protrombina para evaluar la vía extrínseca de la coagulación y el tiempo de tromboplastina parcial activado que evalúa la vía intrínseca, así como los dosajes de factores de coagulación en forma individual se usan en la rutina de los laboratorios de hemostasia. Sin embargo, hay que considerar que estos ensayos miden el tiempo al cual se forma el coágulo de fibrina que se produce muy tempranamente cuando solo el 1-5% de la protrombina ha sido activada. Por ese motivo, desde hace muchos años se ha intentado evaluar la generación completa y la inhibición de la trombina más allá del tiempo de formación del coágulo de fibrina. La evaluación completa en el tiempo de la generación de trombina (GT) podría ser de utilidad en estudiar los estados de hipo y de hipercoagulabilidad. Un exceso de trombina indicaría riesgo trombotico y una disminución en la cantidad de trombina generada indicaría riesgo de sangrado.

Hasta no hace mucho tiempo la única manera de estudiar la generación de trombina en sangre entera o plasma era por el método manual de determinar la trombina formada a lo largo del tiempo tomando muestras de la reacción a diferentes tiempos e intervalos(1). Sin embargo, esta prueba es muy laboriosa, variable y consume mucho tiempo lo cual hizo que solo fuera útil en laboratorios de investigación.

Generación de trombina automatizada

Actualmente existe la posibilidad de estudiar la GT en forma automatizada evaluando el curso en el tiempo de la trombina con todos los componentes hemostáticos naturales presentes(2,3). Con

la ayuda de un software se obtiene la curva de GT que se denomina Trombograma que contiene varios parámetros como se ilustra en la figura 1. Ellos son el tiempo de latencia que indica el tiempo hasta el comienzo de la generación de trombina, el pico máximo de cantidad de trombina generada, la velocidad de la misma o el tiempo en que se alcanza ese pico máximo y también el área bajo la curva que se conoce como potencial endógeno de trombina o ETP. Los métodos actuales usan inhibidores de la formación de fibrina para evitar el coágulo de fibrina y puede usarse tanto en plasma pobre (PPP) como en plasma rico en plaquetas (PRP). La trombina generada es evaluada a través de sustratos cromogénicos (ensayo automatizado en el coagulometro BCS, Behring Coagulation System) o fluorogénicos (ensayo conocido como CAT, Calibrated Automated Thrombography)(4).

En ambos métodos existen diferencias en la población adulta y en pediatría con valores más bajos en la edad infantil(5). Esto está en concordancia con la menor concentración de algunos factores de la coagulación en la infancia. Es muy importante establecer el rango de referencia en cada centro que se utilice y la calidad y conservación de las muestras a analizar es fundamental para una correcta evaluación del trombograma(6,7).

La GT en PRP es la situación in vitro más cercana a lo que sucede in vivo y una evaluación parcial es la que se obtiene con PPP. En el trombograma una vez se alcanza el pico máximo de GT lo que sucede es la evaluación de los sistemas inhibitorios con acción de antitrombina. En ambos métodos automatizados el comienzo de la GT se



Figura 1. Parámetros del trombograma. A: Tiempo de latencia (min), B: pico máximo (nM), C: potencial endógeno de trombina (ETP) (área bajo la curva en nM/min), D: pendiente máxima (nM/min), E: tiempo para alcanzar el pico máximo (min)

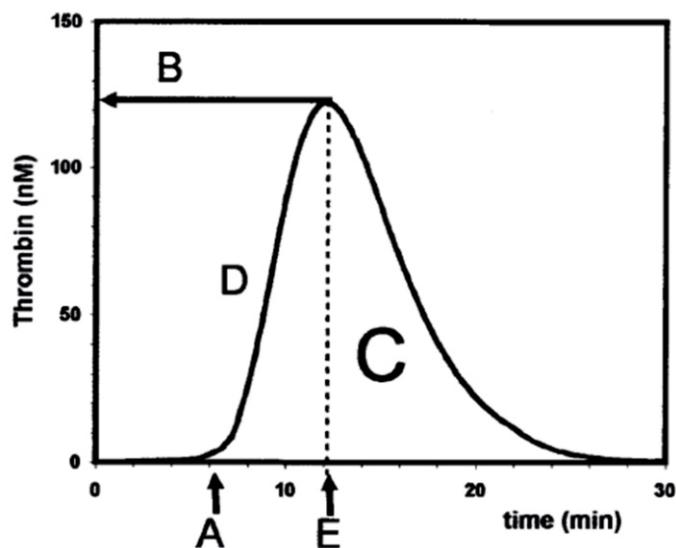
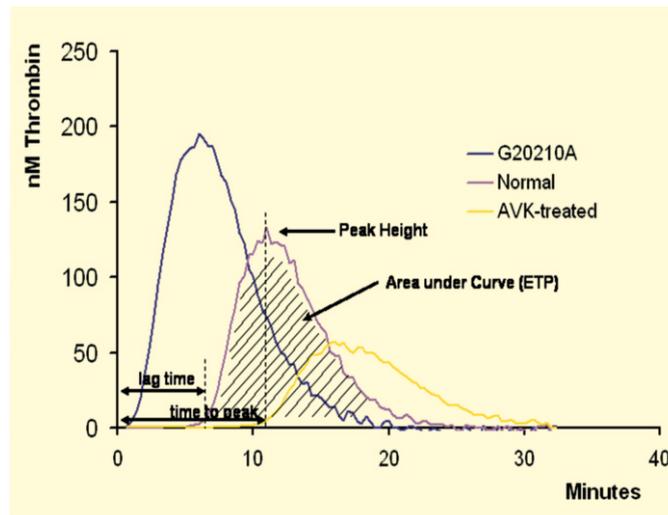


Figura 2. Ejemplos de trombogramas en individuos normales, con defecto trombotico (ej: polimorfismo del gen de la protrombina 20210AG) o con alteración con tendencia hemorrágica o estado de hipocoagulación (ej: terapia con anticoagulantes orales AVK)



BD Vacutainer® Soluciones de Valor

BD Vacutainer®, sistema líder en toma de muestra, cuenta con una exclusiva línea de tubos con tecnología de avanzada para realizar pruebas específicas de biología molecular y proteómica.

Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escribanos a:
vacutainer@bd.com



induce por la adición de factor tisular a la mezcla de reacción. Simultáneamente a la mezcla de activador y plasma a estudiar se realiza otra mezcla de reacción con un calibrador interno de trombina. El objetivo es realizar la comparación en simultáneo para disminuir las variables propias del ensayo.

Utilidad clínica

El ensayo de GT automatizado ha sido evaluado en distintas situaciones clínicas y en pacientes con diferentes factores de riesgo Tromboembólico (8). Las alteraciones en el sistema antitrombina, proteína C/proteína S, así como también defectos genéticos protrombóticos como Factor V Leiden o polimorfismo 20210 del gen de protrombina inducen un incremento en el ETP y en otros parámetros de la curva de GT (Figura 2). También se observan resultados similares en pacientes con factores de riesgo transitorios como el uso de anticonceptivos orales. Pacientes con anticuerpos antifosfolípidos muestran incrementos pronunciados en casi todos los parámetros de la curva de GT. Los individuos con trombosis venosa presentan mayor alteración en el trombograma que aquellos con trombosis arterial. Sin embargo, hay estudios que indican que pacientes con infarto cerebral también muestran incrementos en el ETP.

Por el contrario, individuos con enfermedades hemorrágicas tales como hemofilias (deficiencias de VIII, IX u XI) y otros desordenes más raros (deficiencias de II, V, VII, X o XII) tienen disminución de la GT y la tendencia al sangrado se ve cuando la GT disminuye más allá del 20% del rango normal(9). En el caso de la hemofilia A se ha demostrado que el descenso de la GT es más sensible para evaluar el riesgo de sangrado que la evaluación de los niveles de factor VIII.

Los defectos plaquetarios como trombocitopenias severas, trombocitopatías, enfermedad de Bernard-Soulier, tromboastenia de Glanzmann o la enfermedad de von Willebrand solo muestran disminución de la GT si se evalúa en PRP.

Otra utilidad del ensayo de GT es la evaluación de eficacia de las drogas que se

usan para terapias de enfermedades tromboticas o hemorrágicas (10). Tanto en pacientes bajo tratamiento con heparinas convencionales o de bajo peso molecular como en aquellos con inhibidores directos de trombina o de factor Xa, estatinas o antivitaminas K (acenocumarol, warfarina) se obtienen curvas de GT donde la reducción de trombina es más importante en el pico máximo y el ETP. Se propone la evaluación de la GT como marcador de la eficacia de la acción de estas drogas antitromboticas. En el caso de evaluar la acción de agentes antiplaquetarios se debe realizar la GT en PRP.

Conclusiones

El ensayo de GT promete ser una prueba más fisiológica en la evaluación de la hemostasia, pero al día de hoy aun hacen faltan más estudios a largo plazo y con mayor número de pacientes para sacar conclusiones definitivas. La posibilidad de automatización hace más factible su uso en laboratorios y la aplicabilidad en un grupo mayor de pacientes. Sin embargo, deben tenerse en cuenta las variables que afectan esta prueba y minimizar los errores para su correcta interpretación.

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

Referencias bibliográficas

1. Macfarlane RG *et al.* A thrombin generation test. *J Clin Pathol* 1953; 6: 3–7.
2. Hemker HC *et al.* Thrombin Generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 170-175.
3. Hemker HC *et al.* Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006; 96: 553–561.
4. Hemker HC *et al.* The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 249-253.
5. Devreese K *et al.* Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: Chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost* 2007; 98: 600–613.
6. Luddington R *et al.* Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost* 2004; 11: 1954-1959.
7. Hemker HC *et al.* Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiol. Haemost Thromb* 2002; 33: 4-15.
8. Regnault V *et al.* Phenotyping the haemostatic system by thrombography-potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 2004; 114: 539-545.
9. Al Dieri R *et al.* The Thrombogram in Rare Inherited Coagulation Disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost* 2002; 88: 576-582.
10. Campo G *et al.* Thrombin generation assay: a new tool to predict and optimize clinical outcome in cardiovascular patients? *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23: 680–687.

