

Tromboscopia calibrada automatizada en el estudio de los trastornos de la hemostasia

H Coenraad Hemker,* Ana Rebeca Jaloma Cruz**

RESUMEN

Por sus múltiples funciones, la trombina es la molécula "clave" del mecanismo hemostático que incluye actividades pro y anticoagulantes y efectos pro-inflamatorios. La generación de trombina es una prueba de la capacidad hemostática de la sangre como órgano aislado (el plasma). A diferencia de los tiempos de coagulación (TP, TTPa, TCST), también detecta la hiperfunción o tendencia trombótica, clínicamente mucho más relevante que la tendencia hemorrágica. La capacidad del plasma para generar trombina se refleja en la curva de generación de trombina (trombograma) y particularmente en el potencial de trombina endógeno (PTE), que corresponde al área bajo la curva de generación de trombina y medida directa de su "trabajo enzimático". El ensayo actualmente disponible, la trombografía calibrada automatizada (CAT), permite una prueba rutinaria cuantitativamente correcta (imprecisión 2.5 - 4%) de la medición de la curva de generación de trombina a bajo costo y alto rendimiento. Las aplicaciones alternativas son semicuantitativas o requieren de inhibidores de la polimerización de la fibrina con fuerte influencia en la generación normal de trombina.

El monitoreo del trombograma permite: *i)* detectar una trombosis en curso; *ii)* detectar riesgo incrementado de trombosis; *iii)* monitorear el tratamiento antitrombótico; *iv)* detectar trastornos hemorrágicos y monitorear su profilaxis y terapia. A pesar de que las trombosis arteriales y venosas muestran diferencias importantes, la generación de trombina puede cubrir todas estas indicaciones. Especialmente cuando el ensayo se realiza no solamente en plasma pobre en plaquetas, sino con plasma rico en plaquetas o sangre total, que es una técnica en desarrollo.

Palabras clave: ensayo de generación de trombina, trombograma, trombografía calibrada automatizada (CAT), ensayo global de la hemostasia, potencial de trombina endógeno (PTE), trastornos hemorrágicos, trombosis, trastornos plaquetarios congénitos, monitoreo de tratamiento de trastornos de coagulación.

ABSTRACT

Thrombin is the "key" enzyme of the haemostatic mechanism with many functions, such as pro- and anticoagulant activities and pro-inflammatory effects. Thrombin generation analysis therefore is a physiological function test of the haemostatic capacity of the isolated organ blood (plasma). Unlike clotting times (PT, aPTT, WBCT) it is able to detect hyper-function, i.e. a tendency to thrombosis, which is clinically much more relevant than bleeding tendency is. The capacity of plasma to generate thrombin is reflected in the thrombin generation curve (Thrombogram) and notably in the endogenous thrombin potential (ETP), which is the area under the thrombin generation curve and is a direct measure of the amount of "enzymatic work" that thrombin can do. The currently available thrombin generation assay, Calibrated Automated Thrombogram (CAT), allows routine quantitatively correct (imprecision 2.5 – 4%) measurement of the thrombin generation curve at low cost and high throughput. Alternative devices are semi-quantitative and/or require addition of polymerisation inhibitors of fibrin that strongly influence normal thrombin generation.

Monitoring of the thrombogram allows *i)* to detect ongoing thrombosis; *ii)* to detect increased risk of thrombosis; *iii)* to install and monitor antithrombotic treatment; *iv)* to detect bleeding disorders and monitor their prophylaxis and therapy. Although arterial and venous thrombosis show important differences it seems likely that thrombin generation can cover all these indications. Especially when the test is not only carried out in platelet-poor plasma but also in platelet-rich plasma or whole blood, which is a technique that is being developed.

Key words: Thrombin generation analysis, thrombogram, calibrated automated thrombogram (CAT), haemostasis global assay, endogenous thrombin potential (ETP), bleeding disorders, thrombosis, congenital platelet disorders, therapy monitoring in clotting disorders.

* Synapse BV, University Maastricht, EV Maastricht, Nederland.
** Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondencia: Dra. Ana Rebeca Jaloma Cruz. Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS. Sierra Mojada 800, colonia Independencia, Guadalajara 44340, Jalisco, México. Correo electrónico: arjaloma@gmail.com

Recibido: enero 2012. Aceptado: febrero 2012.

Este artículo debe citarse como: Coenraad-Hemker H, Jaloma Cruz AR. Tromboscopia calibrada automatizada en el estudio de los trastornos de la hemostasia. Rev Hematol Mex 2012;13(1):25-31.

Trombinoscopia

La trombosis y la hemorragia están asociadas a tantos casos de enfermedad y muerte que, como un mecanismo patogénico, la hemostasia debe considerarse de igual importancia que el sistema inmunológico o la regulación de la división celular. Las trombosis y las hemorragias son siempre el resultado de causas locales; es decir, el daño de la pared vascular y la reacción de la sangre expuesta a la superficie trombogénica. Esa reacción varía de persona a persona. En un extremo se encuentran los que tienen tendencia a sangrar --por deficiencia funcional o ausencia de alguno de los factores procoagulantes-- por ejemplo, los pacientes con hemofilia. En el otro extremo están los que son propensos a la trombosis --pacientes con deficiencia de antitrombina-- como un ejemplo franco de deficiencia de los factores anticoagulantes.

La sangre es un tejido de fácil muestreo para investigación en el laboratorio y cabría esperar que una prueba de la función adecuada de su potencial hemostático estuviera disponible. Sin embargo, esto está lejos de ser el caso. Durante más de un siglo los clínicos se han tenido que conformar con las pruebas de tiempos de coagulación, que en sus numerosas y variadas formas de realización, sólo dan una visión parcial e insuficiente del estado de la coagulación de la sangre (plasma). Los tiempos de coagulación son incapaces de reconocer hipercoagulabilidad debido a que difícilmente el tiempo de coagulación puede ser más corto de lo normal. Además, las tendencias hemorrágicas leves no prolongan los tiempos de coagulación más allá de los límites normales o, en el mejor de los casos, producen alargamientos insignificantes. Esto se aplica a todos los tipos de ensayos de tiempos de coagulación. Se emplean diversos protocolos para una amplia variedad de propósitos. Por ejemplo, el tiempo de tromboplastina, mal llamado tiempo de protrombina (TP), es una herramienta adecuada para la monitorización del tratamiento con antagonistas de la vitamina K, pero es inadecuada para demostrar el efecto de las heparinas. Para ello, el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) es el mejor ensayo disponible, pero muy frecuentemente los valores permanecen dentro de los límites normales, aun con un tratamiento de heparina adecuado.^{1,2} El tiempo de hemorragia (TH), con su coeficiente de variación de 37%, es en realidad muy poco útil en la práctica médica.³

Parecería razonable preguntarse si es realmente necesaria una prueba global de la función hemostática, cuando

la investigación moderna es capaz de determinar el nivel plasmático y hasta la misma secuencia génica de todos los factores de coagulación y anticoagulación conocidos.

La medición de todo el espectro, o un conjunto de factores de coagulación, para la definición diagnóstica en pacientes con problemas de coagulación es costoso y tiene un uso clínico limitado porque son muy escasas las instituciones de salud que cuentan con los laboratorios para la realización de pruebas especiales de coagulación, por lo que sería deseable encontrar un abordaje más rápido, efectivo y sensible.

Las deficiencias de los componentes del sistema de la coagulación pueden reconocerse fácilmente aunque eso no indica hasta qué punto está afectado el mecanismo hemostático. El sistema de coagulación es tan complejo que el conocimiento de los niveles de todos sus componentes no permite conocer la funcionalidad de todo el conjunto. Esto se ilustra claramente por el hecho bien conocido en la clínica de la hemofilia: defecto de un solo gen que ocasiona la deficiencia de una sola proteína y, sin embargo, existe una correlación débil entre la concentración del factor deficiente y la gravedad de la tendencia hemorrágica.^{4,5}

Existe, entonces, la clara necesidad de una prueba capaz de evaluar la tendencia a la hemorragia por una parte, y el riesgo de trombosis por la otra. Especialmente es importante en esta última situación, ya que por cada paciente que muere de hemorragia hay cientos que mueren por trombosis.

El trombograma

Un buen candidato para una prueba de función global del sistema hemostático es la curva de generación de trombina (GT) o trombograma (Figura 1). Es una prueba que se desarrolló, como una herramienta de investigación, en el decenio de 1950 y que afortunadamente ha superado el paso del tiempo. La producción de trombina durante la coagulación de la sangre o plasma se medía tomando submuestras a intervalos cortos y midiendo la rapidez con la que éstas coagulaban una solución de fibrinógeno.

Un operador con destreza y buen adiestramiento requería alrededor de una hora-hombre de trabajo por curva,⁶ por lo que no es sorprendente que no se generalizó su uso en el laboratorio de coagulación y se aplicó poco en el diagnóstico clínico. Sin embargo, demostró que era una herramienta valiosa de investigación. Se utilizó para

resolver el modo de acción de las heparinas^{7,8} y ayudó a desentrañar la interacción entre las plaquetas de la sangre y el sistema de la coagulación.⁹ Así, fue evidente que a través del trombograma se podía obtener mucha información que de otra manera no era posible.

Por lo anterior, concluimos que el trombograma podría ser una herramienta valiosa para el diagnóstico clínico y nos dispusimos a encontrar un camino que permitiera usarlo de rutina en el laboratorio hematológico. Después de varios desarrollos intermedios,¹⁰⁻¹³ difíciles de aplicar o insuficientemente precisos, finalmente desarrollamos la “trombinografía calibrada automatizada” (CAT, por sus siglas en inglés).¹⁴ En esta técnica se añade al plasma un sustrato fluorogénico que, al ser escindido por la trombina, libera un producto fluorescente. El objetivo es obtener el curso temporal de la concentración de trombina a partir del curso de la intensidad de la fluorescencia. Esto requiere métodos especiales de cálculo y programas apropiados de adquisición y manipulación de datos.

En su forma más sencilla, el experimento se ejecuta en una microplaca de 96 pocillos, en un fluorómetro comercial equipado con el *software* necesario. Durante el experimento, el trombograma aparece en la pantalla en tiempo real (Figura 2). Pueden realizarse en paralelo 24 experimentos y es posible ejecutar 100 determinaciones por hora. Por lo tanto, la obtención de un trombograma no es más difícil que hacer un electrocardiograma y promete ser clínicamente igual de útil.

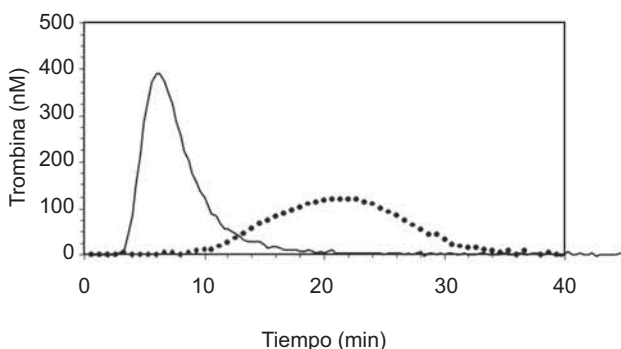


Figura 1. Trombogramas. Línea continua: plasma pobre en plaquetas (PPP) al que se ha añadido factor tisular y fosfolípidos, tiempo de coagulación 3.5 min. Línea punteada: plasma rico en plaquetas (PRP) al que sólo se ha añadido factor tisular; tiempo de coagulación 9.5 min.

La curva de la generación de trombina siempre muestra una fase de latencia, después de la que se inicia una generación de trombina más o menos explosiva. Durante la fase de latencia, un mecanismo relativamente ineficiente produce los primeros vestigios de trombina, que activa ciertos factores de coagulación (V y VIII). Sólo a través de esta retroalimentación positiva es que se puede iniciar la formación “explosiva” de trombina.

De manera sorprendente, los coágulos aparecen en el plasma cuando sólo se ha producido entre 1 y 2% del total de la trombina. Así, la coagulación tiene lugar al final de la fase de latencia y el tiempo de coagulación es una medida de ésta.⁶ Por lo tanto, el tiempo de coagulación mide el mecanismo ineficiente de generación de trombina que ocurre durante la fase de latencia. No es sorprendente, entonces, que el trombograma proporcione información esencialmente diferente a la del tiempo de coagulación.

Debido a que los coágulos aparecen al final del tiempo de latencia, la mayor parte de la trombina en la hemostasia se utiliza en la formación del tapón hemostático o en el trombo. Esta trombina tiene un gran número de funciones en la coagulación de la sangre, activación plaquetaria y fibrinólisis. Por ejemplo, la activación del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), hace que el coágulo sea más resistente a la fibrinólisis. Al estar disminuida la generación de trombina en los pacientes con hemofilia, también está reducida la actividad del TAFI y en consecuencia, hay una inhibición deficiente de la fibrinólisis. Esa es la razón por la cual en pacientes con hemofilia, la hemorragia se reinicia frecuentemente después de haberse detenido durante algún tiempo. La trombina también se difunde en los alrededores y por lo tanto contribuye al crecimiento del tapón hemostático o del trombo; también tiene una serie de acciones diferentes en los tejidos contiguos a la lesión (herida o trombo).

La trombina en plasma se inactiva por acción de las antitrombinas. La velocidad de inactivación es aproximadamente proporcional a la cantidad de trombina. Así, el curso temporal de la trombina en el plasma puede ser comparado con el nivel de agua en un lavabo sin tapón en el que se está vaciando un recipiente. Inicialmente, el nivel sube, pero cuanto más alto sea el nivel mayor es la presión y más rápido se vacía el agua. En un cierto momento, la entrada y la salida son iguales, pero, cuando la entrada disminuye o se detiene, el agua en el lavabo se vacía gradualmente hasta desaparecer.

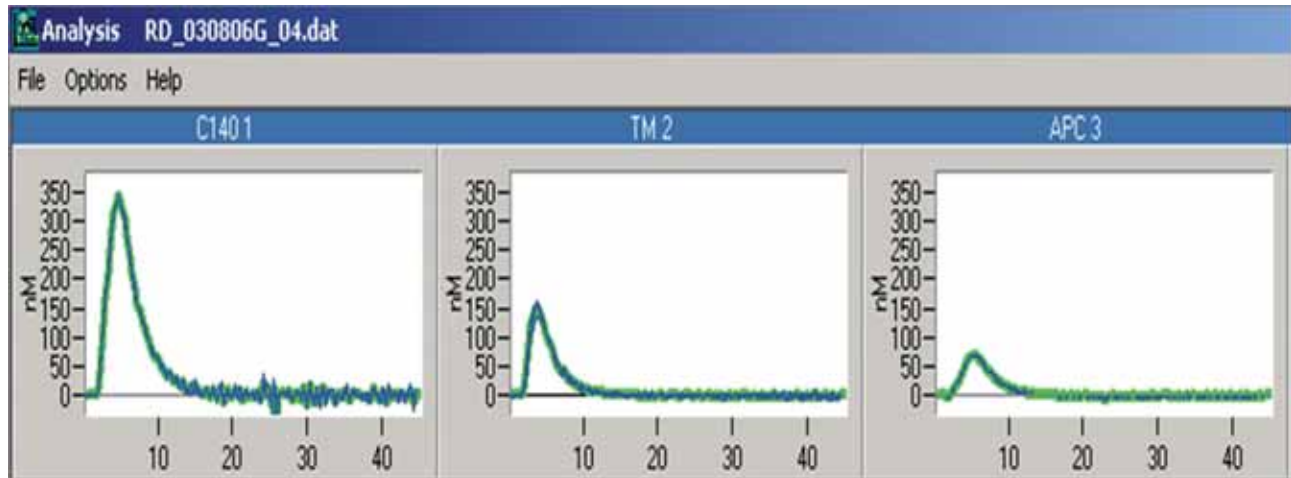


Figura 2. Trombogranas automáticos computarizados. De izquierda a derecha: plasma normal (control, C); plasma normal al que se añadió trombomodulina (TM) y plasma normal al que se le añadió proteína C activada (APC). Experimentos por triplicado, la línea verde representa el promedio. Las proteínas adicionadas sirven para probar la función del sistema fisiológico que modula y limita la generación de trombina.

¿Cuánto “trabajo enzimático” potencial puede realizar la trombina durante su vida útil? Eso depende de su concentración y del tiempo que esté activa. Cien nanomoles de trombina durante dos minutos pueden hacer tanto como doscientos nanomoles durante un minuto. Así que el trabajo que potencialmente puede hacer (si el sustrato no se agota) es proporcional al área bajo la curva de generación de trombina, la cual se ha denominado potencial endógeno de trombina (de sus siglas en inglés, *Endogenous Thrombin Potential*, ETP). Su valor normal es de alrededor de $1 \mu\text{M} \cdot \text{min}$,¹⁴ esto quiere decir que la trombina que se produce durante la coagulación normal puede convertir tanto sustrato (cualquier sustrato) como lo haría $1 \mu\text{M}$ de trombina activa durante 1 minuto.

Durante el proceso de la coagulación sanguínea, la trombina generada no sólo incrementa directamente su propia formación por la activación de los factores V y VIII (retroalimentación positiva), sino que también atenúa indirectamente la conversión de protrombina, por su unión a la trombomodulina (TM) con lo cual, puede convertir a la proteína C (una proenzima) a su forma activa, PCa, e inhibir a los factores Va y VIIIa (retroalimentación negativa). Cuando el mecanismo inhibitorio se altera, ya sea por causas congénitas (por ejemplo, en el caso de la mutación del factor V_{Leiden}¹⁵) o adquiridas (como por ejemplo, en la anticoncepción oral¹⁶), se desarrolla un estado protrombótico. Por esa razón, medir la generación de trombina en presencia de TM es una excelente manera de detectar ciertos estados protrombóticos.

La generación de trombina en plasma rico en plaquetas (PRP) se ve claramente diferente de la de plasma pobre en plaquetas (PPP) (Figura 1): el tiempo de latencia es más largo y la curva se desarrolla a un ritmo más lento. De hecho, en el plasma libre de plaquetas, no se observa coagulación a menos que se agreguen fosfolípidos procoagulantes. En el plasma rico en plaquetas estos fosfolípidos no son añadidos inicialmente, sólo aparecen cuando las plaquetas se activan, lo que requiere de un cierto tiempo. Las plaquetas son activadas por los primeros vestigios de la trombina, así como también por la fibrina formada. La fibrina por lo tanto, no es un producto final inerte, sino que por sí misma favorece la activación plaquetaria. En enfermedades congénitas como la trombostenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard-Soulier se observa una clara disminución de la generación de trombina.¹⁷ Todos los inhibidores de plaquetas con propiedades antitrombóticas, conocidos como antiagregantes, inhiben la generación de trombina en el plasma rico en plaquetas, lo que subraya la estrecha relación entre las plaquetas y la coagulación.

El ensayo de generación de trombina tiene una imprecisión de 2.5 - 4%. La variabilidad individual (inter-diaria) en sujetos normales es de 5%. La variabilidad dentro de la población es bastante grande: ~16%.¹⁴ Es muy probable que el riesgo trombótico sea mayor en individuos sanos, con una generación de trombina en los límites superiores, pero la evidencia epidemiológica no ha sido aún establecida.

¿Para qué puede usarse el trombograma?

La medición automática de la generación de trombina es una técnica reciente y su papel exacto en el diagnóstico, la vigilancia terapéutica y la investigación farmacológica aún no se ha definido en detalle. Sin embargo, se han publicado suficientes resultados de investigación, que permiten formular la primera ley de la hemostasia y la trombosis:

“A mayor generación de trombina, mayor será el riesgo de trombosis y menor será el riesgo de sangrado. A menor generación de trombina, menor será el riesgo de trombosis y mayor el riesgo de sangrado”.

De hecho, la técnica ha demostrado ser útil en:

- La determinación del riesgo trombótico.
- La medición y comparación del efecto de antitrombóticos.
- El desarrollo de nuevos fármacos antitrombóticos.
- La determinación del riesgo de hemorragia y el ajuste de la terapia sustitutiva en pacientes con hemofilia.
- La detección de los efectos secundarios de los medicamentos.

La trombosis venosa

Ya en 1997 encontramos que en los pacientes con una trombosis venosa establecida, el ETP fue de $30 \pm 12\%$ mayor que en pacientes comparables, sin trombosis.¹⁸ Una demostración excelente del uso de la medición de GT se encuentra en la publicación de Hron y sus colaboradores, 2006,¹⁹ quienes demostraron que en un grupo de pacientes recuperados de una primera trombosis venosa, aquellos con una generación de trombina por encima de la media normal, tenían una posibilidad de 1:5 de trombosis recurrente mientras sólo 1:20 de quienes tenían valores de generación de trombina inferiores a la media normal tuvieron una recurrencia. Otras publicaciones confirman la relación entre la trombosis y la generación de trombina.^{20,21,22}

La trombosis arterial

En los pacientes que sobrevivieron a un infarto de miocardio sufrido entre 6 y 12 meses previos, encontramos la generación de trombina de $110 \pm 2\%$ semejante a la del grupo control.¹⁸ De tres a once meses después de un infarto coronario agudo se encontró una generación de trombina significativamente mayor que los pacientes de la misma edad y sexo y con signos clínicos con los que

se esperaría desarrollaran un infarto coronario pero sin haberlo presentado.²³ Estudios aún no publicados muestran que la medición de la generación de trombina es un indicador relevante de complicaciones isquémicas (recurrentes) en pacientes que sufrieron un infarto coronario (H ten Cate, observaciones no publicadas). Los pacientes con hiperlipoproteinemia tipo II muestran una generación de trombina (GT) alta en PRP, que fue disminuida por las estatinas, mientras que no hubo correlación con los niveles plasmáticos de triglicéridos y lipoproteínas.²⁴ Dado el reflejo de las condiciones fisiológicas individuales que permiten los estudios en PRP, es muy probable que puedan esperarse más resultados sobre el papel de la generación de trombina en la trombosis arterial con estos ensayos.

Tendencias hemorrágicas

En todas las deficiencias congénitas de los factores de coagulación se observa una tendencia al sangrado clínicamente relevante, tan pronto como el ETP es inferior al 20% de lo normal.²⁵ Cuando se controlan las variables preanalíticas, el ETP parece reflejar el cuadro clínico de la hemofilia más apropiadamente que el nivel de factor VIII o IX.²⁶ La respuesta del ETP a la infusión de una dosis estándar de factor VIII difiere considerablemente entre los pacientes. Usando el valor de ETP como una guía, es posible adaptar la terapia sustitutiva en estos pacientes y así evitar el uso excesivo de preparaciones de factor VIII o IX.²⁶ Particularmente en el caso de los pacientes con hemofilia que desarrollan inhibidores y que requieren tratamientos costosos, ya sea sustitutivos de factor VIII/IX o terapias alternas, el ahorro podría ser importante.²⁷ Hace poco se demostró que existe una relación entre la baja generación de trombina y los eventos hemorrágicos durante las operaciones en pacientes con hemostasia esencialmente normal.²⁸

Antitrombóticos

El modo de acción de las diversas clases de agentes antitrombóticos es muy variable. Los antagonistas de la vitamina K disminuyen la síntesis de factores de coagulación en el hígado, las heparinas potencian la inactivación de la trombina por la antitrombina, fondaparinux, un agente antitrombótico sintético, potencia la inactivación del factor Xa, la hirudina inhibe directamente y de forma irreversible a la trombina, otros fármacos inhiben la trombina o

el factor Xa directamente, pero de forma reversible. Con independencia de su distinta naturaleza y punto de acción, todos los fármacos con acción antitrombótica disminuyen la generación de trombina. De ahí a proponer que todos los medicamentos que disminuyen la generación de trombina son, *ipso facto*, antitrombóticos, no es un razonamiento descabellado.

La generación de trombina *in vivo* depende de las plaquetas, por muchas razones, no sólo porque proporcionan fosfolípidos procoagulantes, sino también porque los agregados de plaquetas actúan como un nicho en el que la trombina formada no se diluye por el flujo sanguíneo y porque las plaquetas activadas incorporan factor tisular de los leucocitos circulantes y micropartículas.²⁹ De hecho, a la luz de investigaciones recientes, la distinción habitual entre la función plaquetaria y la coagulación es cada vez más difícil de sostener.³⁰ Los inhibidores plaquetarios impiden que las plaquetas se activen y liberen sustancias procoagulantes y así disminuyen la generación de trombina en el plasma rico en plaquetas. Esto se ha demostrado *ex vivo* para abciximab, clopidogrel y aspirina. Todos los inhibidores de agregación y adhesión plaquetaria ensayados *in vitro*, también inhiben la generación de trombina en el plasma rico en plaquetas.

Por lo tanto, si la generación de trombina es el denominador común de todos los parámetros antitrombóticos, entonces el trombograma debe ser la prueba universal para el control de la terapia antitrombótica. De hecho la determinación de la generación de trombina permite medir el efecto anticoagulante de antitrombóticos que no prolongan el tiempo de coagulación, o lo hacen de manera poco significativa.

A menudo se sostiene que los antitrombóticos modernos, como las heparinas de bajo peso molecular y los inhibidores directos de la trombina (dabigatran por ejemplo) o del factor Xa (rivaroxaban por ejemplo) pueden ser administrados en dosis estándar y no requieren de vigilancia. Por ensayos clínicos se sabe que las dosis estándar utilizadas en pacientes “estándar” resultan en cifras aceptables de retrombosis, sangrado o ambos. Si cada paciente individual, reaccionara como el paciente “promedio” en el estudio, no habría necesidad de ajustar las dosis a los requerimientos personales. Sin embargo, la gran variabilidad de la capacidad de generación de trombina en la población (CV ~ 16%) hace que no haya ninguna razón *a priori* para suponer que todos los pacientes son

comparables. En efecto, en el caso de las heparinas de bajo peso molecular, se observó una enorme variación interindividual de la respuesta dosis-efecto.³¹ Lo mismo sucede con un inhibidor directo de la trombina³² y de inhibidores directos del factor Xa (observaciones no publicadas). Esto sugiere que la dosificación personalizada de estos agentes antitrombóticos será significativamente más eficaz que el uso indiscriminado de una dosis estándar. Debemos considerar también que hasta el advenimiento de la generación de trombina, la medición del efecto anticoagulante leve pero eficaz de estos antitrombóticos modernos no se había podido cuantificar. Convertir esto en argumento para apoyar la idea de que no hay necesidad de cuantificar, es una política de *marketing* inteligente pero no sustentada en un razonamiento científico.

El trombograma y los efectos secundarios de los medicamentos

Debido a que no existían pruebas confiables de los efectos sutiles de los medicamentos y la dieta en la coagulabilidad de la sangre, esos factores pasaron inadvertidos hasta la actualidad. La aspirina (AINE) es una excepción notable. Un ejemplo más son las estatinas, que también parecen disminuir la generación de trombina.²⁴ Los agentes de contraste iónicos son otro ejemplo.³³ Hasta ahora, el ejemplo más ilustrativo de la influencia inesperada de una clase de fármacos en el sistema de coagulación son los anticonceptivos orales. Al parecer, la “píldora” aumenta la generación de trombina en paralelo con la aparición de una tendencia trombótica, debido a que las influencias hormonales debilitan el mecanismo de inhibición por retroalimentación de la generación de trombina.³⁴

En conclusión: ahora que la medición del trombograma es factible en la rutina clínica, aparecen nuevas posibilidades para el diagnóstico, la terapia de control y la evaluación del riesgo de trastornos hemostáticos y trombóticos, que exceden con mucho lo que antes era posible. La magnitud de estas posibilidades está lejos de ser explorada en su totalidad, por lo que el ensayo de generación de trombina ofrece perspectivas muy interesantes en la investigación y diagnóstico clínico de la hemostasia.

REFERENCIAS

1. Eikelboom JW, Hirsh J. Monitoring unfractionated heparin with the aPTT: time for a fresh look. *Thromb Haemost* 2006;96:547-552.

2. Al Dieri R, Alban S, Béguin S, Hemker HC. Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost* 2004;2:1395-1401.
3. Kessels H, Kester AD, Hemker HC. Intrinsic and method-induced variation of the bleeding time and related parameters [letter]. *Thromb Haemost* 1994;71:798-799.
4. Bohn RL, Schramm W, Bullinger M, van den Berg M, Blanchette V. Outcome measures in haemophilia: more than just factor levels. *Haemophilia* 2004;10 Suppl 1:2-8.
5. Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia* 2005;11:326-334.
6. Biggs R, Macfarlane RG. Human Blood Coagulation and its Disorders. Blackwell, Oxford, 1953.
7. Béguin S, Lindhout T, Hemker HC. The mode of action of heparin in plasma. *Thromb Haemost* 1988;60(3): 457-62.
8. Béguin S, Mardiguian J, Lindhout T, Hemker HC. The mode of action of low molecular weight heparin preparation (PK10169) and two of its major components on thrombin generation in plasma. *Thromb Haemost* 1989; 61(1):30-34.
9. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2008;6:219-226.
10. Hemker HC, Willems GM, Béguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost* 1986;56(1):9-17.
11. Béguin S, Lindhout T, Hemker HC. The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin. *Thromb Haemost* 1989;61(1):25-29.
12. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 1993;70(4):617-624.
13. Hemker HC, Giesen PLA, Ramjee M, Wagenvoort R, Béguin S. The Thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet rich plasma. *Thromb Haemost* 2000;83(4):589-591.
14. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, *et al*. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:4-15.
15. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, *et al*. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
16. Rosing J, Tans G, Nicolaes GA, *et al*. Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives. *Br J Haematol* 1997;97:233-238.
17. Béguin S, Keularts I, Al Dieri R, Bellucci S, Caen J, Hemker HC. Fibrin polymerization is crucial for thrombin generation in platelet-rich plasma in a VWF-GPIIb-dependent process, defective in Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost* 2004;2:170-176.
18. Wielders S, Mukherjee M, Michiels J, *et al*. The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability. *Thromb Haemost* 1997;77:629-636.
19. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA* 2006;296:397-402.
20. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost* 2008;6:1720-1725.
21. ten Cate-Hoek AJ, Dielis AW, Spronk HM, *et al*. Thrombin generation in patients after acute deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2008;100:240-245.
22. Tripodi A, Legnani C, Chantarangkul V, Cosmi B, Palareti G, Mannucci PM. High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2008;6:1327-1333.
23. Orbe J, Zudaire M, Serrano R, *et al*. Increased thrombin generation after acute versus chronic coronary disease as assessed by the thrombin generation test. *Thromb Haemost* 2008;99:382-387.
24. Puccetti L, Bruni F, Bova G, *et al*. Effect of diet and treatment with statins on platelet-dependent thrombin generation in hypercholesterolemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11:378-387.
25. Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, *et al*. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost* 2002;88:576-582.
26. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, *et al*. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 2005;93:475-480.
27. Dargaud Y, Bordet JC, Lienhart A, Negrier C. Use of the thrombin generation test to evaluate response to treatment with recombinant activated factor VII. *Semin Hematol* 2008;45:S72-73.
28. Schols SE, van der Meijden PE, van Oerle R, Curvers J, Heemskerk JW, van Pampus EC. Increased thrombin generation and fibrinogen level after therapeutic plasma transfusion: relation to bleeding. *Thromb Haemost* 2008;99:64-70.
29. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, *et al*. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2311-2315.
30. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359:938-949.
31. Hacquard M, Perrin <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049384810004330> - af0010#af0010 J, Lelievre N, Vigneron C, Lecompte T. Inter-individual variability of effect of 7 low molecular weight antithrombin-dependent anticoagulants studied in vitro with Calibrated Automated Thrombography. *Thrombosis Research* 2011; 127(1):29-34.
32. Bostrom SL, Hansson GF, Kjaer M, Sarich TC. Effects of melagatran, the active form of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran, and dalteparin on the endogenous thrombin potential in venous blood from healthy male subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:457-462.
33. Al Dieri R, Béguin S, Hemker HC. The ionic contrast medium ioxaglate interferes with thrombin-mediated feedback activation of factor V, factor VIII and platelets. *J Thromb Haemost* 2003;1:269-274.
34. Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, *et al*. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study. *Lancet* 1999;354:2036-2040.