



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**MONITOREO POR EL LABORATORIO DE LA TERAPIA
ANTICOAGULANTE CON HEPARINA NO FRACCIONADA. USO DE
TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO VERSUS
UNIDADES ANTI-XA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

DANIELA ADRIANA ROJAS LÓPEZ

ASESOR

Q.F.B. EVELYN CORTINA DE LA ROSA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MX., 2017



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor: Martha Leticia Jiménez Pardo**

VOCAL: **Profesor: Araceli Mendieta Rergis**

SECRETARIO: **Profesor: Evelyn Cortina de la Rosa**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Tania Angélica Ramírez Palma**

2° SUPLENTE: **Profesor: Marisol Hernández Salas**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE TROMBOSIS, FIBRINÓLISIS Y FUNCIÓN PLAQUETARIA,
DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA. INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ.

ASESOR DEL TEMA:

Evelyn Cortina de la Rosa

SUSTENTANTE:

Daniela Adriana Rojas López

Contenido

Contenido.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
Fisiología de la hemostasia.....	4
Teoría celular de la coagulación.....	8
Mecanismos regulatorios de la coagulación.....	11
La heparina no fraccionada (HNF).....	12
Antecedentes Históricos, descubrimiento y uso la heparina como anticoagulante.....	12
Características físico-químicas de la heparina.....	14
Diferencias entre las heparinas cálcicas y sódicas.....	15
Indicaciones de la HNF. Diferencias en el tratamiento de infusión continua y aplicación.....	16
Mecanismo de acción de la Antitrombina.....	19
Monitoreo del tratamiento con HNF.....	20
Prueba de Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa).....	20
Uso de la prueba de TTPa en el monitoreo de terapia con HNF.....	23
Pruebas semejantes: Titulación con protamina.....	25
Prueba anti-Xa.....	26
Uso de la prueba de TTPa vs anti-Xa en el monitoreo de la terapia anticoagulante con HNF.....	28
2. JUSTIFICACIÓN.....	34
3. HIPÓTESIS.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
OBJETIVO PRIMARIO.....	35
OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	35
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
Obtención de las muestras.....	35
Reactivos y equipo de medición.....	37

6. RESULTADOS	41
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
8. CONCLUSIONES	58
9. ABREVIATURAS.....	60
10. BIBLIOGRAFÍA.....	62

1. INTRODUCCIÓN.

Fisiología de la hemostasia.

La hemostasia es el conjunto de mecanismos que mantienen circulando a la sangre en el sistema vascular. Es un fenómeno que ocurre *in vivo*, en el que se involucran por lo menos: a los vasos sanguíneos, las plaquetas y el sistema plasmático de la coagulación.

La hemostasia se divide para su estudio en primaria y secundaria. La hemostasia primaria se caracteriza por la adhesión, activación y agregación de las plaquetas en el sitio de la lesión para formar el tapón plaquetario; mientras que la hemostasia secundaria se caracteriza por la activación de un grupo de proteínas conocidas como el sistema de coagulación con el objetivo de generar una red de fibrina estable que detiene la salida de sangre en conjunto con las plaquetas. Ambos eventos ocurren concomitantemente. Cuando no existe lesión, los mecanismos regulatorios evitan la formación de trombina no necesaria.^{1,2}

Hemostasia primaria.

Después de que ha ocurrido la lesión vascular, diversos mecanismos se desencadenan para prevenir la pérdida de cantidades excesivas de sangre y permiten la reparación de los vasos dañados. Tales mecanismos se ordenan en las siguientes fases: adhesión, activación y agregación plaquetaria (**Fig. 1**).

Las plaquetas son fragmentos de células anucleadas en forma de disco y se derivan de su célula precursora, el megacariocito. Su membrana celular se conforma por una bicapa de fosfolípidos y colesterol. La fosfatidilcolina y la esfingomielina son fosfolípidos neutros que predominan en la cara externa, mientras que el

fosfaditilinositol, la fosfaditiletalonamina y fosfaditilserina son fosfolípidos aniónicos o polares que se encuentran en la cara interna.³ La principal función de las plaquetas es asistir al sitio en donde ha ocurrido la lesión vascular y juegan un papel fundamental en la formación de un tapón que evita la pérdida de sangre en el vaso dañado.^{4,5} La apariencia exterior de la plaqueta es rugosa por las aberturas del sistema canicular abierto (SCA), una serie de túbulos revestidos de membrana que sirven de comunicación hacia el exterior, donde se libera el contenido de los gránulos cuando las plaquetas se activan. Los dos tipos de gránulos que presentan las plaquetas son:

- Gránulos densos (δ): contienen agonistas que amplifican la activación plaquetaria actuando sobre plaquetas vecinas, tales como adenosin difosfato (ADP), adenosin trifosfato (ATP), serotonina y cationes divalentes como calcio y magnesio.
- Gránulos alfa (α): contienen proteínas adhesivas tales como el Factor de von Willebrand (FvW), fibrinógeno (Fg), fibronectina, vitronectrina y trombospondina; agentes hemostáticos como el factor V, factor VIII, proteína S, inhibidor del plasminógeno tipo I (PAI-1), así como factores de crecimiento.⁶ Y proteínas exclusivas de las plaquetas cuya liberación al medio o plasma indican que la activación de las plaquetas: factor 4 plaquetario (FP4), β -trombomodulina entre otras.

Adhesión plaquetaria.

Cuando un vaso se daña, las plaquetas son reclutadas de la circulación a la matriz subendotelial expuesta. Aunque el endotelio tiene múltiples proteínas adhesivas, las

más importantes para la adhesión plaquetaria son el FvW y la colágena. La unión de las plaquetas al sitio de lesión se da por la interacción entre las proteínas de adhesión del endotelio y las glicoproteínas (GP) que se encuentran en la superficie de las plaquetas, las cuales funcionan como receptores. La unión de la plaqueta con el FvW se da por medio de su receptor, el complejo GP Ib/IX/V. En condiciones de alto flujo sanguíneo la única proteína con capacidad de unirse al sitio de lesión es la GP Ib, con la que establece una unión temporal entre el FvW y la colágena subendotelial. Esta unión temporal provoca que las plaquetas rueden sobre la superficie vascular hasta que se da una unión firme entre el colágeno y su principal receptor, la GP VI.^{3, 6}

Activación plaquetaria.

A continuación se inician los procesos de activación de la plaqueta, pasando de su forma discoide a una forma irregular con emisión de pseudópodos, la activación del mecanismo contráctil plaquetario (microtúbulos y microfilamentos), desplazamiento de los gránulos al centro y secreción de su contenido mediante su fusión con el SCA y exposición de fosfolípidos aniónicos.⁷

Múltiples agonistas contribuyen a la activación de las plaquetas. La trombina es el activador plaquetario más potente, el cual se une a los receptores activados por proteasas, los receptores PAR-1 y PAR-4 (por sus siglas en inglés), la unión de la trombina con PAR-1 activa a las plaquetas a concentraciones de trombina extremadamente bajas. Existen otros agonistas que activan a la plaqueta, entre ellos se encuentran el ADP, tromboxano A₂ y la serotonina, los cuales son

secretados por las plaquetas al microambiente y actúan sobre las plaquetas vecinas mediante sus respectivos receptores, provocando su activación.^{3,8,9}

La membrana de las plaquetas activadas también ofrece el ambiente ideal para acelerar la generación de fibrina, al proveer de fosfolípidos necesarios para la formación del coágulo definitivo, conocidos también como el factor 3 plaquetario. Además, la membrana plaquetaria activada tiene otros fosfolípidos, que permiten la unión de los factores Va, VIIIa, IXa y Xa. Acelera y localiza la activación del factor II y X en el sitio de la lesión vascular, y protege al factor Xa de la inhibición por AT.¹

Agregación plaquetaria.

Se produce finalmente por la interacción entre el Fg y la GP IIb/IIIa, receptor plaquetario del Fg que forma puentes de unión entre las plaquetas. Para poder unirse al Fg, la GP IIb/IIIa requiere de un proceso de activación que le permita transformarse en un receptor activo, esta activación se produce después de que un agonista activa a la plaqueta.³

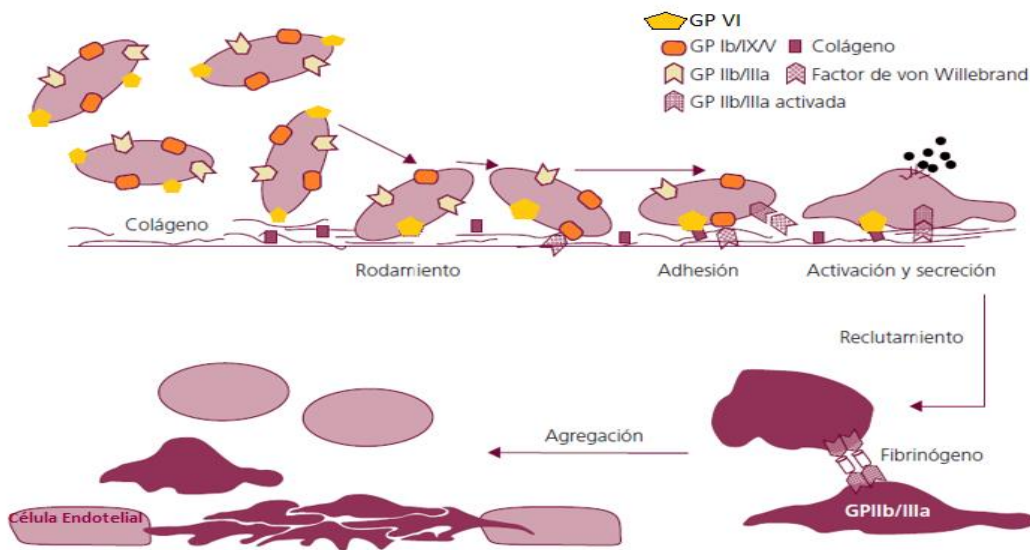


Figura 1. Formación del tapón plaquetario. Modificado de Oliver A, et. al (2010).

Teoría celular de la coagulación

En los años de 1960 se propuso el modelo de la cascada de coagulación el cual proponía una serie de reacciones proteolíticas, en donde la activación de un factor de coagulación permitía la activación del siguiente, hasta la generación de trombina.^{10,11} Con frecuencia, el proceso de coagulación se representa en un esquema en forma de “Y” con distinción en la vía intrínseca y extrínseca iniciada por el factor XIIa y por el complejo formado por el factor tisular (FT) y el factor VII activado (fVIIa): FT/fVIIa (**Fig 2**).¹²

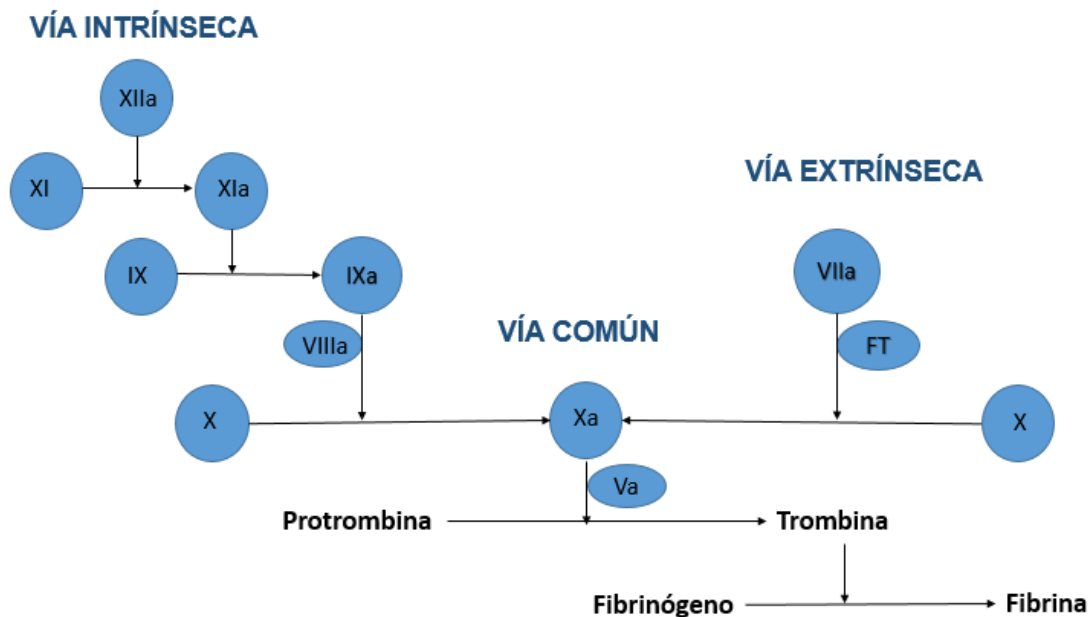


Figura 2. Vía intrínseca, extrínseca y común en el modelo de la coagulación.

El modelo original de la cascada de coagulación fue subsecuentemente modificado para incluir la observación de que algunas proteínas de la coagulación fungían como cofactores, sin poseer actividad enzimática. Actualmente se acepta que las reacciones bioquímicas de la coagulación se llevan a cabo sobre la superficie de las células, cuya capa de fosfolípidos favorece las reacciones procoagulantes, dejando

atrás el concepto de vías extrínseca, intrínseca y común. En el nuevo concepto celular, las reacciones de coagulación se dividen en tres fases: iniciación, amplificación y propagación.¹³ La primera fase o de iniciación, ocurre en las células que expresan al FT. En la fase de amplificación, las plaquetas y los cofactores son activados. Finalmente, la propagación ocurre en la superficie de las plaquetas y como resultado se producen grandes cantidades de trombina (**Fig. 3**).¹⁴

Fase de iniciación.

El FT es una proteína transmembranal que se expone en la superficie de las células dañadas, es el principal estímulo fisiológico para la iniciación de la coagulación. El FT actúa como cofactor y receptor del factor VII activado (fVIIa), única proteína de la coagulación que viaja en su forma activa en un 3%; el complejo molecular que forma el FT/fVIIa cataliza la activación de los factores X y IX.¹⁵ El factor X activado (fXa) se une a su cofactor, el factor V activado (fVa), para formar el complejo *protrombinasa* e iniciar la generación de pequeñas cantidades de trombina. La actividad del fXa se restringe a las células que expresan el FT, debido a que es rápidamente inhibido por el llamado inhibidor de la vía del factor tisular (IVFT) o por la antitrombina (AT). En contraste con el fXa, el factor IX activado (fIXa) puede difundir a la superficie de las plaquetas debido a que el IVFT no tiene efecto sobre él y sólo lo inhibe levemente la AT.

Fase de amplificación.

Las pequeñas cantidades de trombina generadas en las células que expresan el FT son responsables de (1) la activación de las plaquetas, (2) activación del fV en la superficie de las plaquetas, (3) disociación del complejo fVIII/FvW con activación del

fVIII, y (4) activación del fXI en la superficie de las plaquetas.¹⁶ Para el término de la amplificación, el escenario está listo para la generación de grandes cantidades de trombina en la fase de propagación.

Fase de propagación.

Debido a que el fXa no puede difundir hacia las plaquetas, éste debe ser provisto en la superficie de las mismas. El fIX activado por el complejo FT/fVIIa durante la fase de iniciación, difunde a la superficie de las plaquetas activadas e interactúa con su cofactor para formar el complejo *diezasa*, fIXa/fVIIIa, el cual cataliza la activación del factor X directamente en la superficie de las plaquetas. Una vez activado el fX, se asocia con el fVa para formar el complejo *protrombinasa* y convertir grandes cantidades de protrombina en trombina, y dar lugar a la generación de monómeros de fibrina.¹

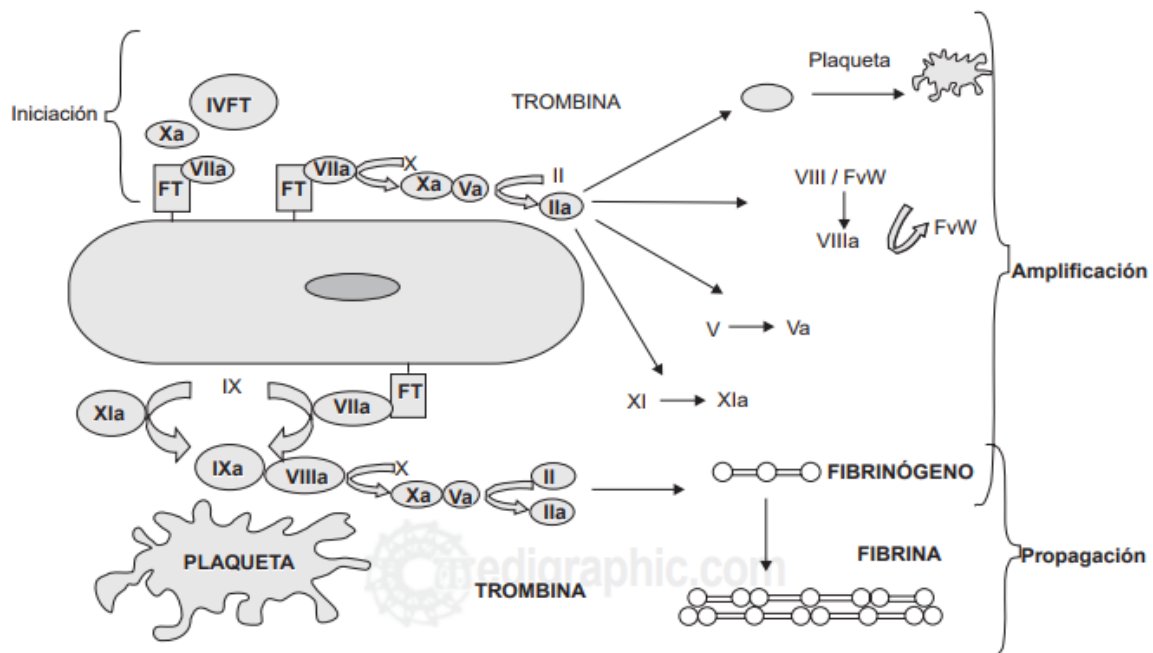


Figura 3. Modelo celular de la coagulación. FT: factor tisular, IVFT: inhibidor de la vía del factor tisular, FvW: factor de von Willebrand. Tomado de Carrillo RE, et. al (2007).

Mecanismos regulatorios de la coagulación.

En condiciones normales, las células endoteliales proporcionan una envoltura protectora que mantiene separado a los componentes hemostáticos de la coagulación de las estructuras reactivas del subendotelio. Las células endoteliales sintetizan y secretan una serie de moléculas que mantienen el sistema en estado de reposo y que evitan que la sangre se coagule en el interior de los vasos, entre estas moléculas, se encuentran: (1) prostaciclina (PGI_2) y óxido nítrico (ON), ambos con una potente acción vasodilatadora y antiagregante que no permite la adhesión de las plaquetas al endotelio; (2) trombomodulina (TM), una glicoproteína que se une a la trombina para formar el complejo TM-trombina, que activa a la proteína C (PCa); (3) heparán-sulfato que potencia la acción inhibidora de la AT y del cofactor II de la heparina; (4) activadores de la fibrinólisis: activador tisular del plasminógeno (tPA) y urocinasa (uPA) que actúan sobre la digestión del coágulo.^{7,17}

Una vez que ha ocurrido el daño vascular y se han desencadenado los mecanismos para la formación del coágulo, este debe ser un proceso localizado en el sitio de la lesión, autolimitado en su crecimiento y transitorio en el tiempo. Existen diversos mecanismos de regulación que limitan la actividad enzimática en el sitio y que evitan la formación generalizada de fibrina. El fXa y la trombina son inhibidos por el sistema anticoagulante asociado a la superficie de la célula endotelial, el cual incluye a la AT y al IVFT. Sin embargo, la generación de trombina se limita principalmente por la vía de la proteína C. La PCa puede interaccionar con su cofactor, la proteína S, para inactivar al fVa y al fVIIIa. Esto significa que el complejo TM/PCa/PS es

eficiente al limitar la generación de trombina en el endotelio sano, pero no para inhibir la generación de trombina en las plaquetas activadas.^{5,18}

La malla de fibrina que detiene la hemorragia se digiere por el sistema fibrinolítico en el que interviene la proenzima inactiva llamada plasminógeno, que se convierte en plasmina, la cual digiere a la fibrina generando productos de digestión de la fibrina solubles. Dos activadores del plasminógeno han sido identificados en la sangre: t-PA y u-PA. A su vez, los activadores del plasminógeno son regulados por los inhibidores del activador del plasminógeno (PAIs).¹⁹

El inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina (TAFI) es un zimógeno que puede ser activado (TAFIa) por la trombina o plasmina. TAFIa remueve los residuos de lisina terminal de la fibrina los cuales mejoran la unión del plasminógeno al coágulo (fibrina), de este modo TAFIa inhibe la actividad de la fibrina como cofactor para la activación del plasminógeno y mejora la resistencia del coágulo a la fibrinólisis.²⁰

La heparina no fraccionada (HNF).

Antecedentes Históricos, descubrimiento y uso la heparina como anticoagulante.

La historia de la heparina comienza con James McLean, un destacado estudiante de medicina de la Universidad de Johns Hopkins. En 1916 McLean comenzó a trabajar en el laboratorio del Dr. Howell, quien le asignó la tarea de purificar la cefalina o tromboplastina, un fosfátido derivado de tejido o de células de la sangre presentes en la iniciación de la coagulación. Su objetivo era determinar la pureza de las preparaciones de cefalina provenientes de extractos de diferentes órganos y

confirmar si la actividad procoagulante era debida a la fracción de fosfátidos purificados y no por la presencia de algún contaminante.²¹

Los resultados obtenidos por McLean demostraron que la cefalina extraída de hígado, corazón y pulmón era capaz de acelerar la coagulación de la sangre. Sin embargo, para su sorpresa, McLean descubrió que cierto extracto que contenía fósforo solubilizaba ligeramente diferente de los extractos con cefalina y que tal sustancia mejoraba la inhibición de la coagulación. El extracto proveniente de corazón fue designado como *cuorin* y el extracto derivado del hígado como *heparfosfátido*.²²

Howell le permitió a McLean ser el único autor de su publicación *La acción tromboplástica de la Cefalina* en 1916. Dos años después en 1918, Howell y su asistente Emmett Holt, analizaron la actividad anticoagulante del *heparfosfátido*, al cual denominaron heparina debido a su gran abundancia en el hígado.²³ La molécula aislada del extracto de hígado resultó ser un carbohidrato soluble en agua, identificado como ácido glucurónico, principal componente de lo que hoy conocemos como heparina.²¹ En 1931 Best logró extraer la heparina del hígado de buey en grandes cantidades, demostrando que era mejor que la heparina obtenida del hígado de perro. Para el año 1933, Charles y Scott crearon un método para aislar la heparina con un alto nivel de pureza, empleando como fuente el pulmón de buey. El Dr. Gordon Murray colaboró con Best y en 1935 demostraron la eficacia de la heparina sódica en la prevención de trombosis.^{22, 23} La heparina obtenida de bovinos fue reconocida por la FDA en 1934 y dos años después, la heparina porcina.

Cerca de 1940 la heparina fue empleada en el tratamiento de enfermedades trombóticas y fue hasta 1950 que se le dio el uso como profiláctico.²⁴

Características físico-químicas de la heparina.

La HNF es un polisacárido con alta carga negativa que pertenece a la clase de los glicosaminglicanos (GAG).²⁵ Es heterogénea con respecto a su peso molecular, su actividad anticoagulante y sus propiedades farmacocinéticas. Su peso molecular presenta un rango variable que va de 3,000-30,000 Da con un promedio de 15,000 Da (con 45 cadenas de monosacáridos aproximadamente).²⁶

La HNF es un producto exclusivo de los mastocitos y está constituido por secuencias de unidades de disacáridos alternadas de ácido D-glucurónico (GlcA), ácido L-idurónico (IdoA) y de una D-glucosamina (GlcN), prevalentemente N-sulfatada (GlcNSO₃) y N-acetilada (GlcNAc) en menor proporción. Todos los residuos se unen por un enlace α -1,4 al siguiente residuo de la cadena a excepción el ácido glucurónico, que se une por un enlace β -1,4.^{27, 28}

La proporción de los diferentes dominios que componen a la heparina varía dependiendo del animal y del órgano del cual procede e incluso hasta del proceso de purificación. El principal disacárido en la heparina con secuencias repetidas es un disacárido trisulfatado (TSD), el IdoA2SO₃-GlcNSO₃6SO₃, representa del 60-75% de la estructura de la heparina obtenida de mucosa de cerdo y más del 85% de la heparina proveniente del pulmón de res (**Fig. 4A**).²⁹

La actividad anticoagulante de la HNF depende de una secuencia de pentasacárido específica que se unen a la AT y que se encuentran solamente en una tercera parte de las cadenas de heparina comercial. El resto de las cadenas de heparina que

carecen de esta secuencia de pentasacárido tienen escasa o nula actividad anticoagulante.^{27,30} La región específica de unión a la antitrombina (ATBR por sus siglas en inglés), se caracteriza por la presencia de una glucosamina trisulfatada, que además del N-sulfato y el O-sulfato sobre el carbono-6, también presenta un grupo sulfato sobre el carbono-3 de la glucosamina (GlcNSO₃,3,6SO₃) y precedente a dicha secuencia se encuentra un residuo no sulfatado, el GlcA (**Fig. 4B**).^{31, 32}

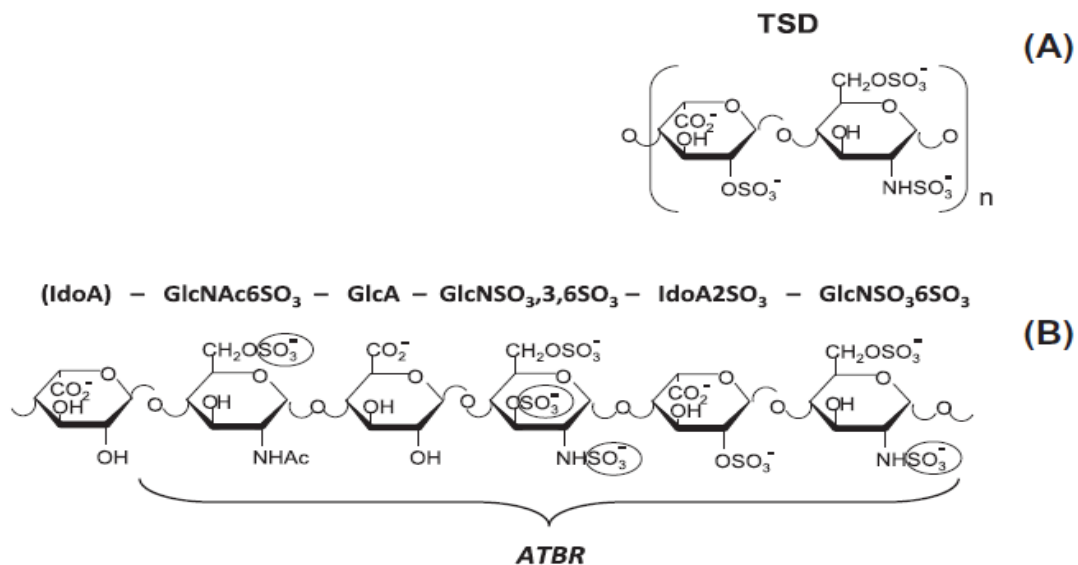


Figura 4. Estructura de la heparina. (A) Disacárido trisulfatado (TSD). (B) Hexasacárido de la secuencia de heparina que contiene el pentasacárido con la región de unión a la antitrombina (ATBR). Los grupos sulfato esenciales para la unión con alta afinidad a la AT están marcadas con un óvalo. Tomado de Casu B, et. al (2014).

Diferencias entre las heparinas cálcicas y sódicas.

En 1976, Thomas y colaboradores realizaron un estudio para evaluar la diferencia en los niveles de heparina al administrar heparina sódica y cálcica por vía subcutánea e intravenosa. Los resultados demostraron que al administrar heparina cálcica por vía subcutánea, los niveles de heparina en plasma eran menores con

respecto a los niveles de heparina sódica. En cambio, cuando las mismas sales fueron administradas por vía intravenosa, no hubo diferencia significativa. Ellos sugirieron que la heparina cálcica puede estar asociada con menores complicaciones hemorrágicas.³³ Los resultados obtenidos por Thomas coincidieron con la afirmación de Detrie y colaboradores, acerca de que la heparina cálcica administrada por vía subcutánea está asociada con un menor efecto de hemorragia local con respecto a la sal de sodio.³⁴ Otro estudio realizado por Walker demostró que la heparina cálcica es más efectiva que la heparina sódica en ayudar a lisar los trombos existentes previniendo su propagación, sugiriendo que la heparina cálcica administrada por vía subcutánea deberá ser usada como primera elección para mantener la trombosis venosa profunda en las piernas, ya sea que esté o no asociada a embolismo pulmonar.³⁵

En la actualidad no existen estudios comparativos que demuestren diferencia entre las dos sales en cuanto a eficacia y complicaciones asociadas. La vía intravenosa es la más común para la administración de la heparina sódica, mientras que la heparina cálcica se emplea comúnmente por vía subcutánea.

Indicaciones de la HNF. Diferencias en el tratamiento de infusión continua y aplicación.

Algunas de las aplicaciones clínicas de la HNF son el tratamiento y la prevención de la embolia pulmonar, la prevención de la trombosis mural luego de un infarto de miocardio, el tratamiento inicial de la trombosis venosa profunda y venosa proximal, tromboflebitis primaria y posquirúrgica, oclusión arterial súbita por trombosis o embolia, en la profilaxis de la trombosis venosa o embolia posquirúrgica, en

trombosis cerebral durante el accidente cerebro vascular en evolución, después de una operación de cirugía cardiovascular y en la prevención de la coagulación sistémica en pacientes con fibrilación atrial y válvulas mecánicas protético-cardíacas.³⁶ La HNF también está indicada en pacientes con circulación extra corpórea, cirugía vascular durante y después de angioplastia coronaria, en pacientes con *stents* coronarios y en pacientes seleccionados con coagulación intravascular diseminada (CID).³⁷

La HNF se utiliza a concentraciones bajas en soluciones de lavado de catéteres intravenosos para inyecciones intermitentes, ya que la heparina residual en el catéter evita la formación de coágulos que pueden obstruir su luz. También se utiliza para prevenir las adherencias pleurales o peritoneales.^{36, 38}

Las dos rutas de administración preferentes de la HNF son la vía intravenosa y subcutánea, la inyección intramuscular puede provocar la formación de hematomas, por lo que debe evitarse. Si la vía subcutánea es seleccionada, la dosis deberá ser lo suficientemente alta para contrarrestar la biodisponibilidad reducida que ocurre cuando la heparina se administra por esta ruta.³⁷

Las guías del Colegio Americano de Médicos del Tórax (American College of Chest Physicians, ACCP) sugieren que la terapia con HNF sea ajustada con base al peso corporal. Para el tratamiento de enfermedad tromboembólica venosa por vía intravenosa se recomienda un bolo inicial de 80 UI/kg seguido de una infusión continua de 18 UI/kg por hora. Una dosis ligeramente menor de 70 UI/kg seguido de una infusión de 15 UI/kg por hora es recomendada en pacientes cardíacos o con riesgo de evento cerebrovascular.³⁹ Para la profilaxis, se requieren dosis fijas de

5000 UI dos o tres veces al día, administradas por vía subcutánea, con estas dosis, la monitorización de la coagulación es innecesaria.³⁰

Las guías actuales no han establecido estrategias en cuanto a la dosis anticoagulante con HNF en la población con sobrepeso y obesidad. Se ha sugerido el uso de la estimación del volumen de sangre para la dosificación de HNF en pacientes obesos, sin embargo el tejido adiposo es menos vascular con respecto al tejido magro, haciendo difícil de evaluar el volumen de distribución.⁴⁰ Los pacientes con obesidad que son dosificados con base al peso corporal corren el riesgo de estar sobreanticoagulados y sufrir hemorragia debido a la inclusión del tejido adiposo a la dosis en la cual la heparina es pobremente distribuida.⁴¹ Estudios realizados por Hohner y colaboradores recomiendan infusiones de heparina menores a las recomendadas por las guías (13 unidades/kg por hora) en pacientes con más de 165 kg, mientras que en pacientes con un peso menor a 165 kg se puede emplear la tasa de infusión de heparina basada en el peso corporal normal para alcanzar los tiempos de TTPa terapéuticos.⁴²

Es necesario conocer la duración óptima de la terapia anticoagulante con el uso de HNF. El uso prolongado de la heparina está asociado con un incremento en hemorragias, con elevación de costos al cuidado de la salud y a la mortalidad, mientras que la discontinuación temprana puede dirigir a un tratamiento inadecuado con alto riesgo de trombosis.⁴³ Estudios futuros deberán identificar la duración óptima de la terapia con la cual se logren los beneficios anticoagulantes mientras se minimizan los costos y los riesgos asociados. Sin embargo, es recomendable que el paciente en tratamiento alcance las concentraciones terapéuticas lo más rápido posible.

Mecanismo de acción de la Antitrombina.

La AT es una glucoproteína plasmática formada por una cadena de 432 aminoácidos con un peso molecular de 58 kDa y pertenece a la familia de los inhibidores de las proteasas de serina (serpinas).⁴⁴ La AT se encuentra circulando en plasma bajo las isoformas α y β , las cuales difieren en la cantidad de glicosilación. La α -antitrombina representa cerca del 90% de los niveles en plasma y se encuentra totalmente glicosilada, mientras que la β -antitrombina es la glicofoma que se encuentra en menor proporción y carece de un oligosacárido próximo al punto de unión con la heparina, lo que la hace más afín a la heparina.⁴⁵

La actividad neutralizante de la AT se da por formación de un complejo estequiométrico entre 2 componentes, a través de la interacción de un residuo de arginina del centro reactivo de la molécula de AT y de la unión covalente a la serina del centro activo de la trombina y de otras enzimas de la coagulación.⁴⁶

La molécula de heparina presenta sitios de unión a la AT que se encuentran distribuidos en una frecuencia variable. La formación del complejo HNF-AT se debe a interacciones electrostáticas entre los grupos sulfato de la secuencia específica de pentasacáridos presentes en la molécula de heparina y los aminoácidos de lisina en la molécula de la AT, lo que provoca un cambio conformacional en el centro reactivo de la arginina.^{47,48} La actividad inhibitoria del complejo HNF-AT es capaz de inactivar a la trombina, al fXa y en menor grado a otras enzimas de la coagulación, incluyendo a los factores IXa, XIa y el XIIIa. La trombina y el factor Xa son las enzimas más sensibles a la acción del complejo HNF-AT, ya que la heparina

incrementa la afinidad de la AT por sus sustratos hasta 10,000 veces, en el caso de la HNF, la trombina es más sensible que el fXa.²⁶

La actividad inhibitoria de la AT está directamente relacionada con el tamaño de la heparina, requiriendo heparinas con cadenas que presenten al menos 16-18 unidades de sacáridos para lograr una unión irreversible con la trombina.⁴⁹ La Heparina de Bajo Peso Molecular (HBPM) presenta cadenas más cortas que la HNF, sin embargo, sus cadenas son lo suficientemente largas para unirse a la AT e inhibir al fXa, pero son muy cortas para unirse a la trombina (**Fig.5**). La actividad de HBPM es predominantemente sobre el fXa.⁵⁰

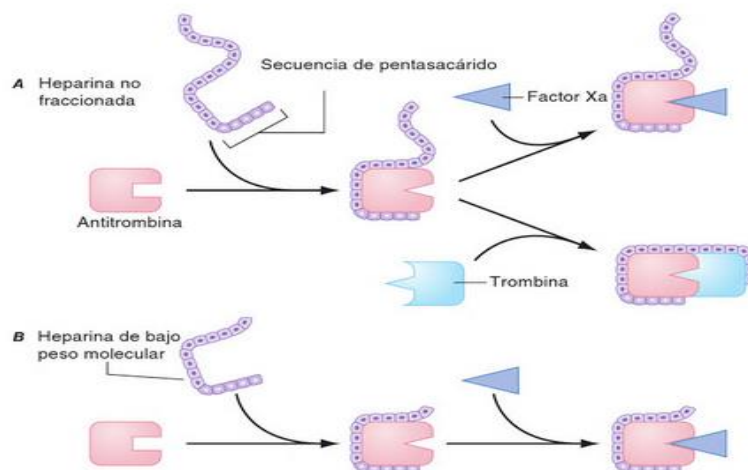


Figura 5. Mecanismo de acción de la HNF y de la HBPM. Modificado de Harrison: Principios de medicina interna (p. 993), por Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, et al. (Editores), 2012, México. McGraw Hill: Derechos de autor (2012).

Monitoreo del tratamiento con HNF.

Prueba de Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa).

Antecedentes históricos.

El tiempo de tromboplastina parcial (TTP) fue descrito por Langdell, Wagner y Brinkhous en 1953. Langdell y sus colaboradores desarrollaron una tromboplastina *parcial* proveniente de extracto de cerebro de conejo, compuesto de fosfolípidos

llamados cefalina. El término parcial fue designado debido a la reducción de la actividad del FT de la tromboplastina original, lo que redujo a su vez la actividad del fVII y por tanto del fX, lo que permite al TTPa ser sensible a la deficiencia de los factores fVIII, IX, XI, XII, e incluso al fX debido a su limitación en la generación de la trombina.⁵¹

En 1954 Bell y Alton modificaron la técnica de Biggs y Douglas para la generación de tromboplastina debido a que la prueba consumía demasiado tiempo. Bell y Alton describieron el método para preparar un extracto de tromboplastina de cerebro humano en cloroformo, lo que sustituyó a la suspensión de plaquetas del método de Biggs y Douglas. Esta preparación fue satisfactoria en el diagnóstico de hemofilias y en la enfermedad de Christmas.^{52,53}

Dos años después, Margolis desarrolló un método rápido y de un sólo paso para el diagnóstico de deficiencias en el sistema de coagulación. Su método se basó en el acortamiento del tiempo de coagulación del plasma recalcificado, bajo condiciones controladas de la fase de contacto por adición de kaolín y una dilución de plaquetas o por adición de un reactivo sustituto de plaquetas.⁵⁴ Los resultados de Margolis llevaron a Rapaport y Robert Proctor a estandarizar el TTP empleando como activador de contacto el kaolín, lo que dio origen a un ensayo simple, confiable, sensible, reproducible y rápido para diagnóstico de hemofilias.⁵⁵

De esta forma, el ensayo del TTP fue designado con el término activado (TTPa) por la adición de activadores de contacto, partículas de carga negativa tal como el kaolín, ácido elágico, sílica o celite.⁵⁶

Fundamento.

El TTPa es un ensayo que ha sido empleado para la evaluación de las llamadas vías intrínseca y vía común de la coagulación, su prolongación tiene relevancia como un indicador de la deficiencia de uno o varios de los siguientes factores: VIII, IX, XI, XII, X, II y del Fg.⁵⁷

La prueba del TTPa se inicia con la incubación del plasma, un activador de superficie y la tromboplastina parcial (fosfolípidos sin FT).⁵⁸ Durante la incubación inicial se induce la activación de los factores por exposición de las cargas negativas del activador, lo que provoca la activación del fXII. Consecuentemente el fXIIa activa al fXI en fXIa y éste último al fIX, el cual se une con su cofactor para formar el complejo diezasa fIXa+fVIIIa+Ca²⁺+fosfolípidos y activar así al fX. Una vez activado el fX, se une a su cofactor para formar el complejo protrombinasa, fXa/fVa, el cual es capaz de convertir grandes cantidades de protrombina en trombina. El ensayo de TTPa mide el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo.^{59,60}

Estandarización de la prueba del TTPa. Tipos de activadores y diferentes fosfolípidos.

Diversos reactivos están disponibles en el mercado para la prueba del TTPa, sin embargo, su composición es variable, lo cual influye en la sensibilidad de cada reactivo.⁶¹ Las variables que presentan los reactivos incluyen el origen, composición y concentración de fosfolípidos, así como el tipo de activador de superficie, lo que explica por qué los laboratorios especializados en hemostasia a menudo usan diferentes reactivos de TTPa de acuerdo a la población que estudian.⁶²

El origen de los fosfolípidos es un factor variable en los reactivos para la prueba del TTPa, los más comunes son los de origen animal, vegetal, humano y sintéticos. Los tejidos de los cuales provienen pueden ser del cerebro de conejo, bovino, de la soja y de la placenta humana.⁶³

Otro factor variable en los reactivos del TTPa es el empleo de diferentes agentes activadores. Algunas de las sustancias que inician la fase de contacto son el vidrio, caolín, el celite, el dextrán y el ácido elágico, los cuales están cargados negativamente, lo que activa al fXII de la coagulación.^{64,65,66}

Uso de la prueba de TTPa en el monitoreo de terapia con HNF.

El objetivo de la anticoagulación con HNF es alcanzar los niveles terapéuticos dentro de las primeras 24 horas para disminuir el riesgo de trombosis mientras se minimiza el riesgo de hemorragia.^{67,68}

En el año de 1972, Basu y colaboradores estudiaron 162 pacientes con trombosis venosa y evaluaron la relación entre la prueba del TTPa y su eficacia clínica. Los tiempos del TTPa fueron medidos diariamente y la dosis de heparina fue ajustada para mantener tiempos de TTPa entre 1.5 y 2.5 veces los valores del control normal del laboratorio. Cinco de los 162 pacientes, desarrollaron trombosis venosa recurrente durante su estancia en el hospital, todos ellos mantuvieron tiempos de TTPa menores a 50 segundos, lo que representa aproximadamente 1.3 veces el valor del control normal.⁶⁹ Este fue el primer estudio que apoyó el uso de un índice terapéutico de TTPa para reducir el riesgo de trombosis. Este índice se representa mediante un cálculo simple, el valor del TTPa del paciente entre la media del TTPa

de al menos 20 sujetos sanos. Sin embargo, la variabilidad en la sensibilidad de los reactivos para la prueba del TTPa hace obsoleto el uso de este rango arbitrario.

Trabajos previos han indicado que la sensibilidad de un reactivo de TTPa hacia la heparina depende del contenido de fosfolípidos y de la naturaleza del activador presente.^{70,71,72} En 1996 Kitchen y colaboradores evaluaron nueve reactivos de TTPa en 420 laboratorios, empleando plasmas de pacientes que recibían heparina (método *ex vivo*) y muestras de plasma normal a las cuales se les adicionó heparina (método *in vitro*). Para ambos métodos, los resultados demostraron una notable variabilidad en la sensibilidad de los diferentes reactivos durante la monitorización de la HNF, así como una alta influencia del coagulómetro empleado.⁷³ Otros estudios han demostrado que el método *in vitro* presenta tiempos de TTPa significativamente más prolongados con respecto al método *ex vivo*, por lo que decisiones en el incremento o disminución de la infusión con HNF basado en este método podría provocar complicaciones clínicas. El método recomendado para obtener el rango terapéutico de la HNF es el método *ex vivo*, el cual provee los datos más confiables de la concentración de heparina *in vivo* al tiempo de muestreo.⁷⁴

Para monitorizar la HNF por medio del ensayo del TTPa, el laboratorio debe emplear reactivos sensibles a la HNF y será necesario definir el índice del TTPa equivalente al rango terapéutico de la heparina, usando idealmente muestras obtenidas por el método *ex vivo* de pacientes tratados con HNF y evaluando la heparina por el ensayo del TTPa y por niveles anti-Xa.⁷⁵ El rango terapéutico debe corresponder a

una concentración de 0.3 a 0.7 UI/mL evaluado por el ensayo cromogénico anti-Xa o bien de 0.2 a 0.4 por el ensayo de titulación con protamina (**Fig. 6**).^{76,77}

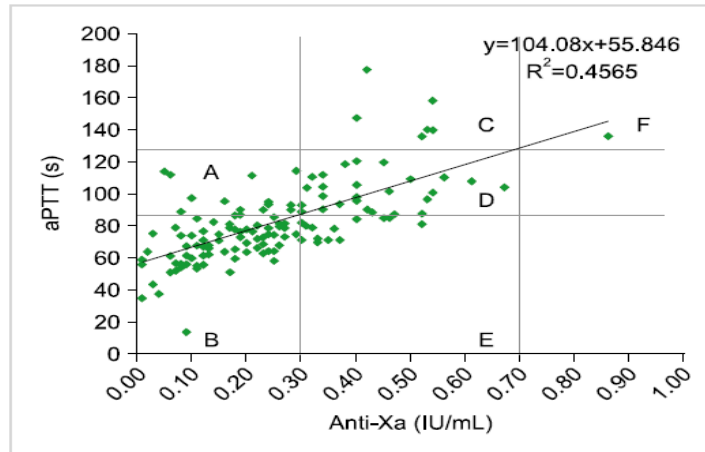


Figura 6. Correlación de los resultados de la prueba del TTPa y el ensayo anti-Xa. El rango de TTPa calculado de la ecuación de la regresión lineal que corresponde a niveles de heparina de 0.3-0.7UI/mL es de 87.1 a 128.7 segundos. Tomado de Byun et. al (2016).

Pruebas semejantes: Titulación con protamina.

La protamina es una proteína de bajo peso molecular rica en lisina, arginina y otros aminoácidos básicos. El mecanismo de la protamina se basa en la unión electrostática entre los grupos amino de la molécula de protamina y los grupos sulfato de la HNF, revirtiendo así su efecto anticoagulante.⁷⁸

El tiempo de coagulación de la Trombina (TCT) mide el tiempo de coagulación después de la adición de trombina al plasma. La presencia de HNF en plasma, produce una prolongación dosis-dependiente del TCT. El resultado del ensayo de titulación con protamina representa la cantidad de protamina requerida para regresar a los tiempos basales del TCT.⁷⁹

El método de titulación con protamina no es caro y es considerado confiable, sin embargo es un método manual, no automatizado. Debido a que el método es

limitado por la variabilidad dependiente del operador y por la que corresponde al origen y fuente de la trombina, el método de titulación con protamina es a menudo usado para propósitos de investigación y raramente para uso clínico.⁸⁰ Las recomendaciones de la ACCP sugieren un rango de TTPa para la terapia óptima con HNF que refleje concentraciones de heparina entre 0.2 a 0.4 UI/mL por el ensayo titulación con protamina.⁸¹

Prueba anti-Xa.

Fundamento de la prueba.

La utilidad clínica del ensayo anti-Xa en el monitoreo de la HNF se demostró en gran medida debido a que se observó que una proporción de los pacientes expuestos a dosis terapéuticas con HNF fallaron en alcanzar el rango terapéutico esperado en la prueba del TTPa.⁸²

El principio del ensayo consiste en evaluar la actividad de la heparina sobre la inhibición del fXa por la formación del complejo HNF-AT. La reacción se lleva a cabo al mezclar el plasma heparinizado con un exceso de fXa exógeno y un sustrato cromogénico, con secuencias de aminoácidos específicas para el fXa (CH₃OCO-D-Val-Val-Gly-Arg-pNA). Algunos de los ensayos pueden contener AT para asegurar una concentración constante en el complejo HNF-AT. A partir de la adición del fXa en exceso al plasma, se originan los siguientes procesos (**Fig. 7**):

- a) inhibición del fXa por la heparina presente en el plasma
- b) hidrólisis del sustrato cromogénico por parte del fXa residual en la secuencia adyacente al residuo de arginina.

Transcurrido el tiempo necesario para que se establezca el equilibrio de la reacción, se mide a 405 nm la liberación de la paranitroanilina (p-Na) del sustrato cromogénico.⁸³ La cantidad de color formado es directamente proporcional al fXa libre (o residual) e inversamente proporcional a la actividad de heparina presente en la muestra.⁸⁴ Para conocer la concentración de heparina en la muestra se emplean curvas de calibración de referencia y se interpolan las absorbencias del plasma.⁸⁵

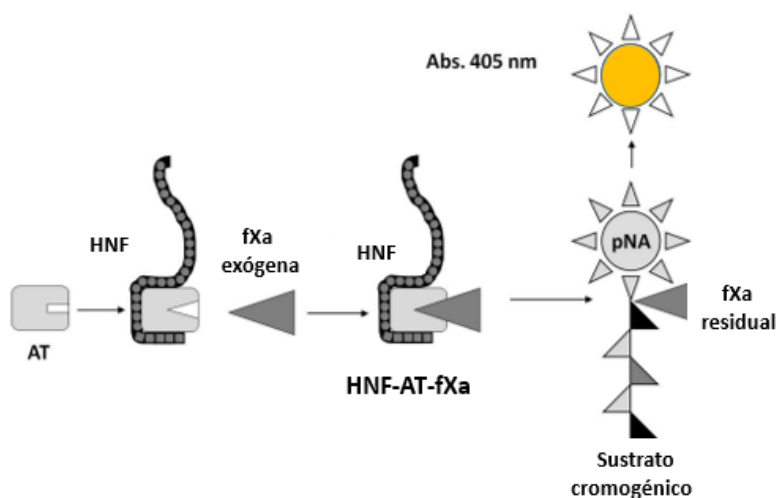


Figura 7. Ensayo cromogénico anti-FXa. HNF:heparina no fraccionada. AT:antitrombina, p-Na:paranitroanilina. Modificado de Heparin properties, uses and side effects (p. 92). In: Piyathilake DE and Liang R (Editors). 2012. New York: Nova Science Publisher.

Diferencias en las pruebas disponibles en el mercado. Uso de antitrombina suplementada.

Existen dos tipos de ensayos cromogénicos anti-Xa disponibles, el primero es un ensayo al que se le añade un reactivo con exceso de AT (exógena) y el segundo que no requiere de AT exógena.⁸⁶ En este caso, la actividad de la heparina depende de la AT presente en el plasma del paciente, lo que significa una medida más real de la cantidad de HNF que se alcanza in vivo a diferencia del ensayo con AT exógena.

Existen condiciones en las cuales se presentan niveles bajos de AT, como son las deficiencias congénitas (<60% de los niveles normales) y las adquiridas, que pueden presentarse por numerosos factores, incluyendo enfermedades del hígado, síndrome nefrótico, CID, sepsis, pre-clampsia, embarazo y cirugías. También se ha reportado que la administración de anticonceptivos orales y la terapia con heparina reducen los niveles de AT.^{87,88} Estudios realizados por Mitchell y Vegh demostraron una correlación directa entre los niveles de anticoagulante y la concentración de AT. Cuando las concentraciones de AT en plasma son menores a 1.0 μ /ml los niveles de heparina son subestimados, mientras que a concentraciones de AT por arriba de 1.0 μ /ml los niveles de heparina en plasma se sobreestiman.⁸⁹

Una de las limitaciones que presenta la adición de AT a la prueba anti-Xa, es en pacientes con deficiencia de AT, en los cuales los resultados no reflejan el estado anticoagulante *in vivo*. El ensayo anti-Xa sin AT adicional, es un mejor reflejo de la realidad del paciente, sin embargo, es incapaz de diferenciar entre deficiencias de AT y una baja dosis de heparina.^{90,86}

Uso de la prueba de TTPa vs anti-Xa en el monitoreo de la terapia anticoagulante con HNF.

Correlación de los valores de TTPa y la concentración plasmática de HNF.

El valor del índice del TTPa se usa como un intervalo de referencia terapéutica para la monitorización de la heparina, que debe encontrarse entre 1.5 a 2.5; sin embargo, el valor obtenido depende de muchos factores, principalmente de la sensibilidad del reactivo hacia la heparina y del instrumento empleado para la prueba.⁹¹

La pobre correlación entre los valores de la heparina en plasma (UI/mL) y el TTPa también puede deberse a factores tales como: terapia con warfarina, inhibidores directos de la antitrombina, enfermedades del hígado, deficiencia de la vitamina K, deficiencia de factores, respuesta de fase aguda con incremento de las concentraciones del fVIII, síndrome antifosfolípidos, elevación del PF4, entre otros.⁸³

Shannon y colaboradores realizaron un estudio donde evaluaron los cocientes del TTPa a los cuales se obtenían niveles terapéuticos con HNF por medio del ensayo anti-Xa, probando diferentes reactivos y coagulómetros. Los resultados demostraron que el uso del cociente del TTPa entre 1.5 a 2.5 veces con respecto a los valores normales, presenta variabilidad con respecto al ensayo anti-Xa para alcanzar los niveles terapéuticos de la HNF, encontró una mayor diferencia al probar los diferentes reactivos en el mismo coagulómetro que al usar el mismo reactivo en diferentes coagulómetros. Shannon recomendó establecer el intervalo del cociente del TTPa con base al reactivo y al coagulómetro empleado.⁹²

La estandarización de la prueba del TTPa requiere establecer un intervalo terapéutico para cada reactivo e instrumento, para ello se utilizan muestras de plasma de al menos 30 pacientes que hayan recibido terapia con heparina. Se realiza la prueba del TTPa y se determinan los niveles de heparina por medio del ensayo anti-Xa o por el ensayo de titulación con protamina. Por una análisis de regresión lineal se calcula el cociente del TTPa que corresponda al intervalo terapéutico de la heparina.^{93,76}

Ventajas y desventajas de usar la prueba del TTPa para monitorizar el efecto de la HNF en el paciente

La principal ventaja que tiene el uso del TTPa es que es una prueba de rutina en el laboratorio de coagulación y es sensible a la presencia de HNF. Esta prueba ha sido usada para este propósito por décadas.^{94, 56}

A diferencia del ensayo anti-Xa, el TTPa no presenta limitaciones en las muestras con hiperbilirubinemia (niveles de bilirrubina >6.6 mg/dL), e hipertrigliceridemia (niveles de triglicéridos >3 60 mg/dL) si se usa el método mecánico en la lectura.⁹⁵

En términos de variables biológicas, en donde la prolongación del TTPa no está relacionada con la HNF, la terapia es impredecible e insegura. La prolongación del TTPa por el AL se debe a una neutralización parcial del reactivo con fosfolípidos, los que son requeridos para la formación del coágulo. La prolongación del TTPa secundaria al AL en pacientes con heparina puede interferir en la interpretación de los resultados, al sobreestimar los niveles de la terapia anticoagulante. Se recomienda que el reactivo del TTPa para el monitoreo de la terapia con anticoagulantes se realice con un reactivo que presente baja respuesta al AL.⁵⁶

Debido a que la mayoría de los factores de coagulación se sintetizan en el hígado, los pacientes con hepatopatía presentan una reducción en la concentración de los factores de coagulación, lo que provoca una prolongación en los tiempos del TTPa.⁹⁶ Contrario a esta situación, el fVIII, el Fg y el FvW se incrementan durante episodios de enfermedades agudas o en procesos inflamatorios, lo que provoca un acortamiento en el TTPa.^{97,98, 99, 100}

Entre los errores pre-analíticos más comunes que pueden alterar al TTPa se encuentran los tubos mal aforados y las muestras de sangre con hematocritos mayores al 55%, donde la concentración del citrato que se usa como anticoagulante en los tubos, se encuentra incrementada con respecto a la proporción del plasma, provocando que el exceso de citrato que no se unió al calcio libre en la sangre se una al calcio adicionado para las pruebas de coagulación, teniendo como resultado una prolongación artificial en los tiempos de coagulación.¹⁰¹ Otro error pre-analítico común que interfiere con el TTPa son las muestras hemolisadas, con niveles elevados de Hemoglobina (Hb) libre y de bilirrubina; los altos niveles de Hb libre son capaces de unirse a la HNF y neutralizar su actividad anticoagulante, provocando valores de TTPa cortos de entre 5 a 20 segundos, mientras que la hiperbilirrubinemia provoca TTPa prolongados.¹⁰² Errores debido a la hiperlipidemia deben ser eliminados con una centrifugación adicional.⁹⁵

Además de la variabilidad biológica que altera los resultados de la prueba del TTPa, la mayor problemática es la variabilidad en la sensibilidad de los diferentes reactivos de TTPa hacia la HNF y la metodología de los instrumentos empleados. Para monitorizar la HNF por medio del TTPa, cada laboratorio deberá establecer un índice de TTPa equivalente a un rango terapéutico, usando el método *ex vivo* evaluado por ambos ensayos: TTPa y el ensayo anti-Xa.⁷⁵

Ventajas y desventajas de usar la prueba de anti-Xa para monitorizar el efecto de la HNF en el paciente.

Entre las principales ventajas que tiene el ensayo anti-Xa es que la tecnología para su uso, se encuentra disponible en muchos analizadores automatizados de

coagulación. No es susceptible a interferencias por la presencia de AL, enfermedades en el hígado, deficiencias de factores o por incremento en los niveles de proteínas de la fase aguda tales como el fVIII y el Fg.^{103,104} Aun cuando el costo del ensayo anti-Xa es mayor que el del TTPa, los costos pueden ser equivalentes debido a que el número de muestras para el ajuste de las dosis, suele ser menor que con el uso de TTPa.⁹⁵ Finalmente, la principal desventaja del ensayo anti-Xa en hospitales con bajos recursos sigue siendo el costo del mismo y en laboratorios pequeños, la presencia de equipos que sólo realizan pruebas coagulométricas.¹⁰⁵

La heparina tiene alta afinidad por el PF4, una proteína de carga positiva que se encuentra en los gránulos de las plaquetas y en la superficie de plaquetas activadas.¹⁰⁶ La unión del PF4 a la heparina provoca una potencial neutralización de la HNF, por lo que las muestras deben ser transportadas al laboratorio y centrifugadas dentro de la primera hora posterior a la colección; las muestras que no puedan recibirse dentro de la primera hora, deben ser centrifugadas y el plasma debe ser removido del componente celular. La HNF de las muestras que no sean separadas del paquete celular, será neutralizada por el PF4, provocando bajas concentraciones de la HNF medidas por el ensayo anti-Xa y su efecto no se podrá evidenciar en el TTPa.¹⁰⁷

Los ensayos anti-Xa que contienen AT no son recomendados en la monitorización de la HNF, debido a que la concentración de heparina se subestima en pacientes con deficiencias severas de AT, en los cuales no se reflejan los niveles actuales de HNF,¹⁰⁸ sin embargo, en la actualidad, en México sólo existen reactivos suplementados con AT.

Aunque la ACCP recomienda que el ensayo anti-Xa debe alcanzar un rango terapéutico de 0.3 a 0.7 UI/mL, publicaciones en la literatura demostraron una diferencia significativa (>0.2 UI/ml) en los niveles de HNF al comparar diferentes instrumentos y ensayos cromogénicos disponibles, lo que se relaciona sobre todo a la falta de apego al cuidado pre-analítico de las muestras.^{109,110}

2. JUSTIFICACIÓN.

Tradicionalmente la heparina no fraccionada ha sido el anticoagulante de elección indicado para el tratamiento o prevención de trombosis venosa, en numerosas situaciones. Los niveles de HNF deben alcanzarse rápidamente, mantenerse en el intervalo terapéutico y al mismo tiempo, debe evitarse elevar el riesgo de hemorragia de los pacientes. La prueba para el monitoreo de la HNF ha sido por décadas el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado, sin embargo, diversos estudios han demostrado que el TTPa es una prueba de laboratorio cuyos resultados varían significativamente dependiendo del reactivo. El ensayo Anti-Xa es la mejor prueba de laboratorio para su monitorización, ya que mide la concentración del fármaco directamente en el plasma del paciente, sin embargo, tiene varias limitantes, como el costo y su baja implementación en los laboratorios de rutina.

Debido a que no se conoce la correlación entre los valores del reactivo de TTPa utilizado en el laboratorio de rutina de Hematología del INCICH para evaluar a los pacientes anticoagulados con HNF y los valores anti-Xa, se propone el presente trabajo en el que además, se evaluarán los resultados obtenidos con otros reactivos de TTPa y su relación con otras variables hemostáticas.

3. HIPÓTESIS.

La correlación entre los valores de TTPa con respecto a los niveles plasmáticos de HNF medida por UI/mL de anti-Xa, es alta.

4. OBJETIVOS.

OBJETIVO PRIMARIO.

Demostrar la variabilidad en los resultados del Tiempo de tromboplastina parcial activado, versus la determinación de la concentración de HNF por método cromogénico en pacientes tratados con HNF.

OBJETIVOS SECUNDARIOS.

- Determinar la variabilidad en los resultados de tres reactivos diferentes de TTPa en la valoración de muestras de pacientes con HNF.
- Evaluar el efecto de la concentración de fibrinógeno y fVIII:c sobre los valores de TTPa de los pacientes tratados con HNF.
- Determinar qué reactivo de TTPa es más sensible entre: el Pathromtin®SL de Siemens, TTPa-SP liquid® de HemosIL y TTP-STA Automate 5 de Stago para el monitoreo de la terapia anticoagulante con HNF de acuerdo al ensayo anti-Xa de Stago.
- Determinar si el intervalo 1.5-2.5 del índice de TTPa corresponde a los niveles terapéuticos de HNF en plasma.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

Obtención de las muestras

En un periodo de tres meses, se seleccionaron 70 muestras, de las recibidas en el laboratorio de Hematología para la realización de tiempos de coagulación de pacientes provenientes del servicio de hospitalización. Por la revisión del expediente

electrónico, se seleccionaron aquellas provenientes de pacientes que estuvieran recibiendo HNF. Como es usual, las muestras fueron colectadas en tubos con citrato de sodio al 3.2%, manteniendo una relación de nueve partes de sangre por una parte de anticoagulante (9:1). Se obtuvo el plasma desprovisto de plaquetas con menos de 10,000 plaquetas/ μ L por centrifugación a 2190g por 20 minutos a temperatura ambiente, en un plazo no mayor a una hora a partir de la extracción. El plasma se separó del paquete celular y fue transferido a tubos de polipropileno. Debido a que las muestras incluidas en el estudio fueron obtenidas a partir de solicitudes con requerimiento de tiempos de coagulación y a que ningún paciente fue intervenido o modificado su tratamiento durante este trabajo, aplicado alguna cuota extraordinaria o uso individual de sus datos personales, lo que pudiera violar su derecho a la privacidad, no se aplicó consentimiento informado.

Las pruebas de hemostasia como tiempo de protrombina (TP), TTPa con el reactivo Pathromtin SL de Siemens® (reactivo de uso en el laboratorio de coagulación del INCICH), así como el tiempo de trombina (TT) se midieron en fresco en un equipo BCS-XP de Siemens®, que es un coagulómetro con lectura óptica de formación del coágulo. El remanente de cada plasma se congeló a -70°C en alícuotas de 1.2 mL y se descongelaron en un solo bloque para la determinación de la actividad del factor VIII coagulante (fVIII:c) y fibrinógeno (Fg), en el mismo equipo de Siemens®, el remanente se utilizó para los tiempos de TTPa con el reactivo de TTPa-SP liquid® de HemosIL y TTP-STA Automate 5 de Stago, que se midieron en un equipo STA Compact Max de Stago®, así como la determinación del ensayo anti-Xa.

Para obtener el índice de TTPa para cada reactivo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice TTPa} = \frac{\text{TTPa}_{\text{paciente}}}{\text{TTPa}_{\text{media 20 donadores.}}}$$

Donde:

$\text{TTPa}_{\text{paciente}}$ = TTPa del paciente obtenido con cada reactivo de TTPa que se probó.

$\text{TTPa}_{\text{media 20 donadores}}$ = media del TTPa de 20 sujetos sanos donadores del banco de sangre del INCICH a los que se les midió con cada reactivo de TTPa.

Se rechazaron aquellas muestras que estuvieran hemolisadas, lipémicas o aquellas que no mantuvieran la relación de sangre:anticoagulante 9:1.

Reactivos y equipo de medición.

Tiempo de protrombina (TP). Es una prueba sensible para la detección de alteraciones en el sistema extrínseco de la coagulación, mide el efecto global de los factores II, V, VII, X y Fg. El proceso de coagulación se desencadena por la incubación del plasma desprovisto de plaquetas al que se le agrega la cantidad óptima de tromboplastina y calcio. Se mide el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo. El reactivo de TP es una tromboplastina de placenta humana (Thromborel® S de Siemens) y se realizó en el equipo Dade Berhring BCS-XP®.

Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa). Es una prueba para la detección de alteraciones en el sistema intrínseco de la coagulación, mide el efecto global de los factores XII, XI, IX, X, VIII, V, II y Fg. La muestra se incuba con cantidades óptimas de fosfolípidos y un activador de superficie que actúa sobre el fXII principalmente; el proceso de coagulación se desencadena al añadir iones de calcio y se mide el tiempo transcurrido hasta la formación del coágulo. El TTPa se determinó con el reactivo Pathromtin®SL de Siemens, al que denominaremos:

TTPa-Path, está compuesto por partículas de dióxido de silicio, fosfolípidos vegetales y cloruro de sodio; el segundo reactivo de TTPa fue el TTPa-SP liquid® de HemosIL, al que denominaremos: **TTPa-SP**, compuesto por sílica coloidal en dispersión con fosfolípidos sintéticos. El último reactivo probado fue el TTP-STA Automate 5 de Stago que denominaremos: **TTPa-A5**, compuesto por sílica micronizada y cefalina extraída de tejidos cerebrales de conejo; ambos se midieron en el equipo ^{Sta}Compact Max.

Tiempo de trombina (TT). Es una prueba que se utiliza para la búsqueda de anomalías en la formación de fibrina. La trombina exógena elimina los fibrinopéptidos A y B del Fg, dando lugar a la formación de fibrina en un tiempo aproximado de 15-18 segundos. El TT se determinó con el reactivo Thrombin® utilizando el equipo Dade Berhring BCS-XP.

Fibrinógeno (Fg). Se realizó con la incubación del plasma y un exceso de trombina. El tiempo de coagulación depende de la cantidad de Fg en la muestra y su concentración se determina a partir de una curva de referencia. El reactivo utilizado fue Multifibren®U y se determinó mediante una técnica coagulométrica utilizando el equipo Dade Berhring BCS-XP.

Factor VIII coagulante (fVIII:c). El porcentaje de actividad coagulométrica del factor VIII se determinó por la mezcla de un plasma deficiente en factor VIII con el plasma del paciente mediante la prueba del TTPa. El resultado se interpretó utilizando una curva de referencia obtenida a partir de diluciones de plasma humano estándar mezclado con el plasma deficiente, sobre la que se interpolaron los datos de cada

paciente. El porcentaje de actividad del factor VIII se determinó en el equipo Dade Berhring BCS-XP.

Heparina. A partir de la adición del fXa en exceso al plasma, se producen dos reacciones, la primera es la inhibición de fXa por la HNF presente en el plasma y la segunda es la hidrólisis del sustrato cromogénico por parte del fXa residual. Transcurrido el tiempo necesario para que se establezca el equilibrio de la reacción, se mide a 405 nm la liberación de la paranitroanilina (p-Na) del sustrato cromogénico. La cantidad de color formado es directamente proporcional al fXa libre (o residual) e inversamente proporcional a la actividad de heparina presente en la muestra. Para conocer la concentración de heparina en la muestra se emplean curvas de calibración de referencia y se interpolan las absorbencias del plasma. Para este ensayo se utilizó el reactivo Liquid Anti-Xa de Stago® en el equipo StaCompact Max de Stago®.

Análisis Estadístico: Se realizó un análisis descriptivo de las variables de acuerdo al tipo de distribución (*normal* o *no normal*). Los resultados de las variables con distribución *normal* se expresaron en términos de media \pm desviación estándar ($M \pm D.E.$), mientras que los resultados de las variables con distribución *no normal* se expresaron en términos de mediana (Me) e intervalos (percentilas 5-95%). La diferencia entre grupos de variables *normales* se analizó por la prueba de ANOVA y para las variables con distribución *no normal* por la prueba U de Mann Whitney. La relación entre los valores de TTPa y valores de HNF (anti-Xa) se determinó por la obtención del coeficiente de correlación de Spearman y la concordancia entre métodos por el coeficiente *kappa*. Se obtuvieron los parámetros de Valor Predictivo

Positivo, Valor Predictivo Negativo para cada reactivo de TTPa, así como su sensibilidad y especificidad para determinar si un paciente se encuentra anticoagulado o no de acuerdo a las concentraciones de HNF por anti-Xa. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. El análisis se realizó con el programa SPSS, versión 17.0.

6. RESULTADOS.

Resultados demográficos. Se obtuvieron y analizaron un total de 70 muestras de pacientes del INCICH que recibieron tratamiento con HNF, de las cuales 30 provenían de mujeres. Sólo se trabajaron 55 muestras con el reactivo TTPa-A5. Los resultados obtenidos totales y por género se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. Resultados de variables hemostáticas analizadas por género

	Total	Hombre	Mujer	p
Edad (años) (M±D.E.)	53.1 ± 18.9	55.9 ± 20.0	49.3 ± 16.9	0.15*
TP (seg)	12.9 (11.0-21.0)	12.9 (11.3-23.9)	12.9 (10.6-16.8)	0.442
INR	1.1 (1.0-1.8)	1.1 (1.0-2.1)	1.1 (0.9-1.4)	0.462
TT (seg)	144.3 (23.0-151.0)	90.9(24.5-151.0)	151.0 (20.6-151.0)	0.027
Fg (mg/dL) (M±D.E.)	390.6 ± 104.8	391.7± 106.8	389.2 ± 103.8	0.922*
fVIII:c (% actividad)	151.6 (103.9-202.1)	145.6 (105.1-198.4)	166.2 (126.0-209.0)	0.057
TTPa-Path (seg) (N=70)	53.3 (39.3-151.0)	53.1 (39.1-98.3)	53.5 (36.9-151.0)	0.976
TTPa-SP (seg) (N=70)	60.8 (40.7-161.0)	61.4 (41.6-116.4)	59.6 (40.3-181.0)	0.700
TTPa-A5 (seg) (N=55)	72.5 (49.8-181.0)	70.1 (50.0-101.6)	78.1 (46.1-181.0)	0.521
HNF (UI/mL)	0.16 (0.10-0.57)	0.12 (0.10-0.49)	0.21(0.10-1.1)	0.007

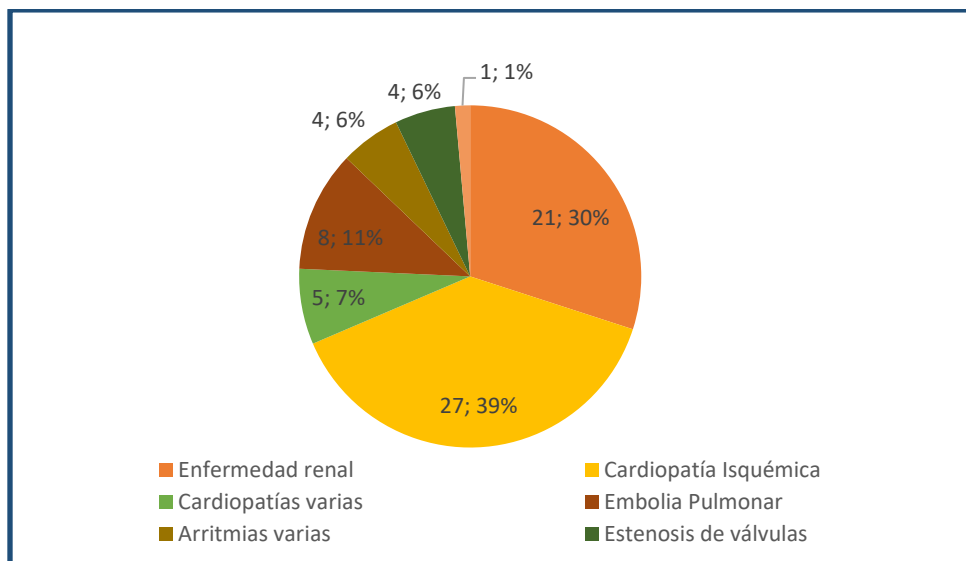
TP: Tiempo de Protrombina, INR: Índice Internacional Normalizado, TT: Tiempo de Trombina, Fg: Fibrinógeno, fVIII:c: factor VIII coagulante, TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado, HNF: heparina no fraccionada. Los valores se expresan en media ± desviación estándar (M±D.E.) y medianas (Me) e intervalos (p5-95%). *Pruebas estudiadas por ANOVA. El resto de las pruebas se estudiaron por la Prueba U de Mann Whitney.

La edad de los pacientes fue ligeramente mayor en hombres que en mujeres (**tabla 1**). Las pruebas del TP/INR, Fg y los tiempos del TTPa con los tres reactivos: TTPa-Path, TTPa-SP, TTPa-A5 fueron similares en hombres y mujeres, en contraste con

los valores del TT y de heparina, los cuales fueron significativamente más altos en mujeres. Los valores del fVIII:c fueron más altos en mujeres, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

En la **figura 8** se muestra la distribución de las diferentes patologías que presentaron los pacientes que estuvieron bajo el tratamiento con HNF. Como puede apreciarse, la cardiopatía isquémica representa la principal patología en los pacientes anticoagulados con HNF.

Figura 8. Distribución de pacientes por patologías.



Correlaciones simples. Para determinar la asociación del TTPa y las variables hemostáticas, se obtuvieron los coeficientes de correlación de Spearman. En la **tabla 2** se muestran los coeficientes obtenidos entre los resultados de los tres reactivos de TTPa y otras variables estudiadas.

Tabla 2. Coeficientes de Correlación de Spearman entre diferentes métodos de TTPa y otras variables.

Prueba	TTPa-Path	TTPa-SP	TTPa-A5
Edad (años)	0.137	0.174	0.119
TP (seg)	0.206	0.054	0.052
INR	0.253*	0.078	0.096
TT (seg)	0.707**	0.679**	0.624**
Fg (mg/dL)	-0.003	0.004	0.122
fVIII:c (% actividad)	-0.580**	-0.666**	-0.539**
HNF (UI/mL)	0.536**	0.652**	0.554**

TP: Tiempo de Protrombina, INR: índice internacional normalizado, TT: Tiempo de Trombina, Fg: Fibrinógeno, fVIII:c: factor VIII coagulante, TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activado, HNF: heparina no fraccionada. *p<0.05, **p<0.01

Los parámetros que presentaron una asociación directa y significativa con los diferentes reactivos de TTPa fueron el TT y la heparina; la asociación con el fVIII:c, tal como se esperaba, fue indirecta y significativa. Los resultados no muestran una asociación significativa entre los niveles de Fg y la prueba del TTPa por ninguno de los tres reactivos probados.

Efecto del FVIII:c en el TTPa. La relación de los valores de fVIII:c sobre los resultados de TTPa se determinó primero por una correlación simple de Spearman (**tabla 2**), para determinar si la relación es verdadera e independiente, se realizó un análisis de regresión múltiple en el que se introdujo por el método de estimación por pasos como variable independiente al fVIII:c, considerando como variable dependiente los valores de TTPa con los diferentes reactivos. En la **tabla 3** se muestran los resultados del análisis de regresión múltiple con los niveles de fVIII:c. Aunque se esperaba que el Fg presentara una influencia semejante sobre los resultados de TTPa, se encontró que no existía una relación bivariada (**tabla 2**), por

lo que al introducir al Fg como variable en el análisis de regresión lineal, su influencia fue rechazada directamente por el programa.

Tabla 3. Resultados del análisis de regresión múltiple entre los niveles de fVIII:c sobre la prueba del TTPa.

Reactivo	% R corregida	F	Significancia	B	Beta
TTPa-Path	42.5	53.50	<0.001	143.24	-0.658
TTPa-SP	51.5	75.20	<0.001	185.18	-0.722
TTPa-A5	48.2	52.14	<0.001	166.95	-0.701

% R corregida: porcentaje del valor de TTPa explicado por la variable independiente; F: valor de la varianza no atribuida al azar; B: constante en la ecuación de la regresión, Beta: coeficiente estandarizado del valor de fVIII:c sobre el valor del TTPa.

Los resultados del análisis de regresión lineal muestran que los valores del fVIII:c tienen una influencia significativa sobre los valores de TTPa con cualquier reactivo de los probados. El reactivo TTPa-SP presentó mayor influencia, con un coeficiente estandarizado Beta=-0.722, después el TTPa-A5 y al final el TTPa-Path; con los tres reactivos la relación fue inversa: a mayor fVIII:c, los valores de TTPa fueron menores.

Grados de anticoagulación. Se establecieron tres grados de anticoagulación, usando los criterios más ampliamente conocidos: sub-anticoagulado, anticoagulado y sobre-anticoagulado, de acuerdo al intervalo de 1.5-2.5 del índice de TTPa:

	Sub-anticoagulado	Anticoagulado	Sobre-anticoagulado
Índice TTPa	<1.5	1.5-2.5	>2.5
HNF (UI/mL)	<0.3	0.3-0.7	>0.7

En la **tabla 4** se muestra la distribución de los pacientes por grado de anticoagulación de acuerdo a cada reactivo de TTPa (intervalo de índice 1.5-2.5) y a la concentración de heparina por UI/mL de anti-Xa.

Tabla 4. Pacientes por grado de anticoagulación por los tres reactivos de TTPa y ensayo anti-Xa (**Intervalo 1.5-2.5**).

	N (%) Sub-anticoagulados < 0.3 UI/mL	N (%) Anticoagulados 0.3-0.7 UI/mL	N (%) Sobre-anticoagulados >0.7 UI/mL	N (%)
TTPa-Path	18 (25.7)	43 (61.4)	9 (12.9)	70 (100)
TTPa-SP	21 (30.0)	36 (51.4)	13 (18.6)	70 (100)
TTPa-A5	2 (3.6)	42 (76.4)	11 (20.0)	55 (100)
anti-Xa	55 (78.6)	13 (18.6)	2 (2.9)	70 (100)

Por HNF: Anticoagulado=0.3-0.7 UI/mL, Sub-anticoagulado <0.3 UI/mL y Sobre-anticoagulado>0.7UI/mL. Por todos los reactivos de TTPa: Anticoagulado Índice= 1.5-2.5, Sub-anticoagulado Índice <1.5 y Sobre-anticoagulado Índice>2.5.

Se observa que sólo el 18.6% de los pacientes alcanzaron la concentración terapéutica de HNF (anti-Xa = 0.3-0.7 UI/mL), mientras que guiados por el Índice de TTPa, el porcentaje de pacientes anticoagulados va de 51.4-76.4% por los diferentes reactivos de TTPa.

Coincidencia de resultados entre la prueba del TTPa y la HNF.

En la **tabla 5** se muestran los pacientes que considerando el intervalo de 1.5-2.5, del índice de TTPa para cada reactivo, **coinciden** con las concentraciones terapéuticas de HNF.

De acuerdo a la **tabla 5**, el reactivo que mayor porcentaje de coincidencia muestra con la concentración de HNF es el TTPa-SP con un 44.3% de coincidencia (31/70).

Tabla 5. Coincidencia del grado de anticoagulación entre el TTPa y el ensayo anti-Xa (**Intervalo 1.5-2.5**).

	N (%) Sub-anticoagulados < 0.3 UI/mL	N (%) Anticoagulados 0.3-0.7 UI/mL	N (%) Sobre-anticoagulados >0.7 UI/mL	N (%) de coincidencia total	N total (%)***
TTPa-Path	18 (32.7)	9 (69.2)	2 (100)	29 (41.4)	70 (100)
TTPa-SP	21 (38.2)	8 (61.5)	2 (100)	31 (44.3)	70 (100)
TTPa-A5	2 (4.5)	5 (55.6)	2 (100)	9 (16.4)	55 (100)

Porcentajes de coincidencia por grado de anticoagulación son con respecto al número de pacientes que se asignaron a cada categoría de acuerdo a la concentración de heparina. *** Es la N total de sujetos evaluados.

Otra forma de visualizar la coincidencia se muestra en las **figuras** de la **9-11** donde se presentan la correlación entre los índices del TTPa y los niveles de heparina. En cada figura se señala el área que abarca al índice del TTPa (1.5-2.5), así como la correspondiente a los niveles terapéuticos de HNF medidos por unidades de anti-Xa (0.3-0.7 UI/mL). En todos los casos, son pocos los resultados de TTPa dentro de valores terapéuticos que coinciden con el área de efecto terapéutico de la HNF.

Figura 9. Índices TTPa-Path versus niveles de heparina.

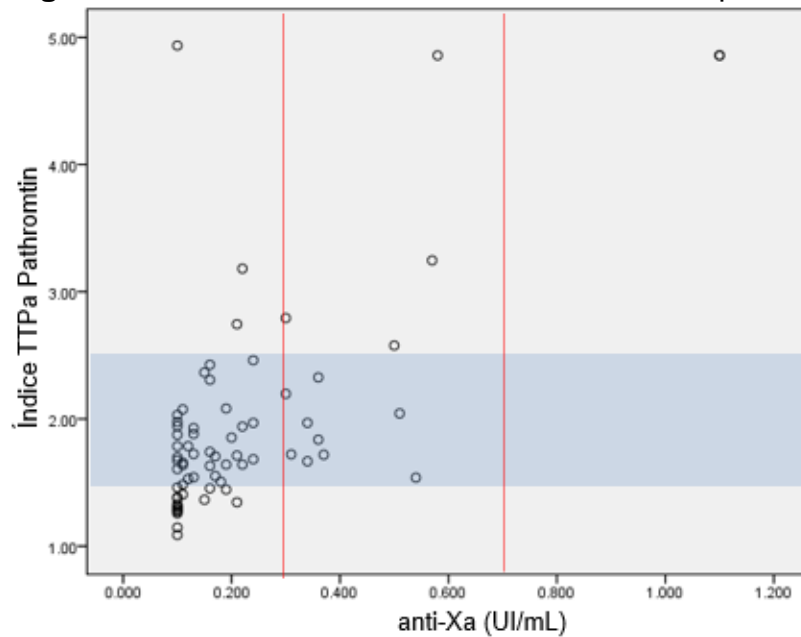


Figura 10. Índices del TTPa-SP versus niveles de heparina.

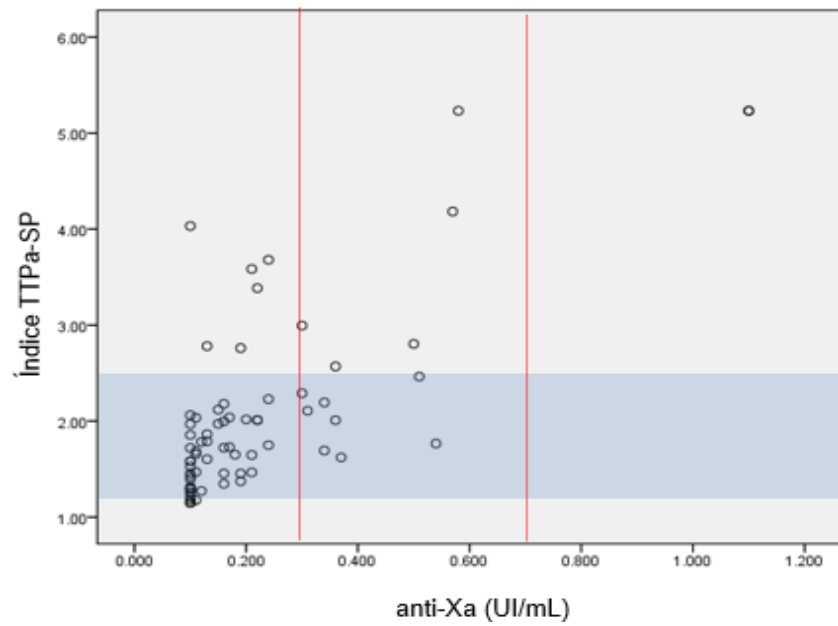
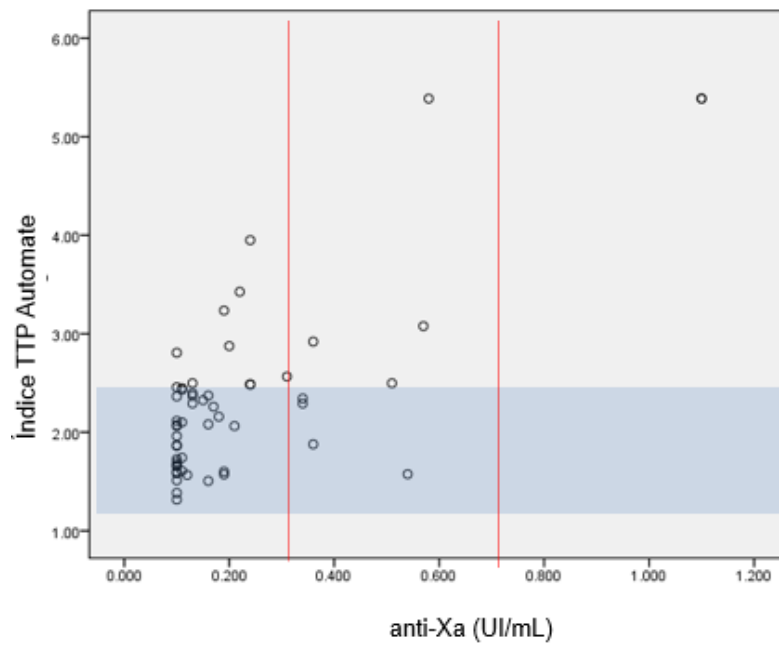


Figura 11. Índices del TTPa-A5 versus niveles de heparina.



Desempeño de las pruebas.

En la **tablas 6** se muestra la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) que presentó cada reactivo de TTPa con respecto al ensayo de referencia. En este caso se agruparon los pacientes sub y sobre anticoagulados en uno solo denominado de *no-anticoagulación*.

Tabla 6. Desempeño de los reactivos de TTPa vs HNF (anti-Xa) en cuanto al estado de **anticoagulación** y **no-anticoagulación (Intervalo 1.5-2.5)**.

Reactivo	(%) Sensibilidad	(%) Especificidad	(%) VPP	(%) VPN
TTPa-Path (N=70)	69.2	40.3	20.9	85.2
TTPa-SP (N=70)	61.5	50.9	22.2	85.3
TTPa-A5 (N=55)	55.5	19.6	11.9	69.2

VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo.

Los tres reactivos de TTPa presentan un *VPN* alto con respecto a la concentración de HNF, ya que tienen una alta probabilidad de categorizar como *no anticoagulado* a pacientes que no presentan niveles terapéuticos de heparina, sin embargo, tienen una *sensibilidad* media, con *especificidad* baja y muy pobre *VPP*.

Concordancia. Para determinar la **concordancia entre los métodos**, se sugiere el uso del cálculo del coeficiente kappa (*k*), que no considera la correlación atribuida al azar y permite obtener una estimación más precisa de la concordancia genuina. En la **tabla 7** se muestran las concordancias entre los dos métodos según el reactivo de TTPa.

Al emplear los reactivos TTPa-Path y TTPa-SP se obtiene una *concordancia leve* con respecto a los niveles de heparina, mientras que el valor de la *Kappa* del

reactivo TTPa-A5 no alcanza significancia estadística, lo que se considera una concordancia prácticamente *pobre*.

Tabla 7. Fuerza de concordancia entre la prueba del TTPa y los niveles de heparina (anti-Xa), **Intervalo 1.5-2.5.**

Reactivo	K estadística	p
TTPa-Path (N=70)	0.139	0.020*
TTPa-SP (N=70)	0.160	0.012*
TTPa-A5 (N=55)	0.003	0.936

Se acepta que una K estadística de 0 tiene un grado de concordancia *pobre*, entre 0.01 y 0.20 tiene un grado de concordancia *leve*, entre 0.21 y 0.60 tiene un grado de concordancia *moderado*, entre 0.61 y 0.80 tiene un grado de concordancia *bueno* y valores mayores a 0.81 tienen un grado de concordancia *casi perfecto*¹¹¹. *Se consideró una concordancia entre las pruebas cuando p<0.05.

Índice terapéutico de TTPa 2.0-3.5. Debido a que se ha propuesto que el intervalo de anticoagulación por el índice de TTPa entre 2.0-3.5 muestra una mejor correlación con los valores plasmáticos de HNF, se hicieron los cálculos considerando este intervalo teórico. En la **tabla 8** se muestra la distribución por grado de anticoagulación y en la **tabla 9** la coincidencia entre el TTPa y el ensayo anti-Xa.

Tabla 8. Pacientes por grado de anticoagulación por tres reactivos de TTPa y anti-Xa (**Intervalo 2.0-3.5**).

	N (%) Sub-anticoagulados	N (%) Anticoagulados	N (%) Sobre-anticoagulados	N (%)
TTPa-Path	48 (68.6)	18 (25.7)	4 (5.7)	70 (100)
TTPa-SP	40 (57.1)	23 (32.9)	7 (10)	70 (100)
TTPa-A5	20 (36.4)	31 (56.4)	4 (7.3)	55 (100)
anti-Xa	55 (78.6)	13 (18.6)	2 (2.9)	70 (100)

Por HNF: Anticoagulado = 0.3-0.7 UI/mL, Sub-anticoagulado <0.3 UI/mL y Sobre-anticoagulado>0.7UI/mL. Por todos los reactivos de TTPa: Anticoagulado Índice= 2.0-3.5, Sub-anticoagulado Índice <2.0 y Sobre-anticoagulado Índice>3.5.

Con el intervalo de 2.0-3.5, la clasificación de sub-anticoagulados y sobre-anticoagulados se acerca más a la que se hace en función de la HNF en plasma, es decir, sube la proporción de sub-anticoagulados y disminuye la proporción de pacientes sobre-anticoagulados (**tabla 4 vs 8**).

Tabla 9 Coincidencia del grado de anticoagulación entre el TTPa y el ensayo anti-Xa (Intervalo 2.0-3.5).

	N (%) Sub-anticoagulados < 0.3 UI/mL	N (%) Anticoagulados 0.3-0.7 UI/mL	N (%) Sobre-anticoagulados >0.7 UI/mL	N (%) de coincidencia total	N total (%) ***
TTPa-Path	43 (78.2)	7 (53.8)	2 (100)	52 (74.3)	70 (100)
TTPa-SP	37 (67.3)	8 (61.5)	2 (100)	47 (67.1)	70 (100)
TTPa-A5	18 (40.9)	6 (66.7)	2 (100)	26 (47.3)	55 (100)

Porcentajes de coincidencia por grado de anticoagulación son con respecto al número de pacientes que se asignaron a cada categoría de acuerdo a la concentración de heparina. *** Es la N total de sujetos evaluados.

Al establecer este nuevo intervalo, la coincidencia entre los resultados del TTPa con las UI/mL de HNF aumentó con respecto al índice de 1.5-2.5 (**tabla 5 vs tabla 9**), por el reactivo de TTPa-Path la coincidencia aumentó a un 74.3% (52/70), para el TTPa-SP a 67.1% (47/70) y en el caso del TTPa-A5 la coincidencia aumentó a 47.3% (26/55).

La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del intervalo 2.0-3.5 se presentan en la **tabla 10**.

Tabla 10. Desempeño de los reactivos de TTPa vs HNF (anti-Xa) en cuanto al estado de **anticoagulación y no-anticoagulación (Intervalo 2.0-3.5)**.

Reactivo	(%) Sensibilidad	(%) Especificidad	(%) VPP	(%) VPN
TTPa-Path (N=70)	53.8	80.7	38.8	88.5
TTPa-SP (N=70)	61.5	73.7	34.8	89.7
TTPa-A5 (N=55)	66.7	45.6	19.4	87.5

VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo.

En la **tabla 10**, se observa que al cambiar el intervalo a 2.0-3.5, los tres reactivos aumentan la *especificidad*, manteniendo el valor del *VPN* alto; es decir, aumenta la probabilidad de que un paciente que se encuentre en este intervalo, realmente esté anticoagulado.

La fuerza de concordancia entre las pruebas de TTPa con el índice 2.0-3.5 y la concentración de HNF se presentan en la **tabla 11**.

Tabla 11. Fuerza de concordancia entre la prueba del TTPa y los niveles de heparina (anti-Xa), **Intervalo 2.0-3.5**.

Reactivo	<i>K</i> estadística	<i>p</i>
TTPa-Path (N=70)	0.376	<0.001*
TTPa-SP (N=70)	0.326	<0.001*
TTPa-A5 (N=55)	0.142	0.072

*Se consideró una concordancia entre las pruebas cuando $p < 0.05$

Los valores de *K* que se obtienen con el intervalo teórico de 2.0-3.5, muestran que la concordancia mejora significativamente, ya que dos reactivos subieron al grado de *concordancia moderada*, y el TTPa-A5 alcanzó el grado de concordancia *leve* (**tabla 7 vs 11**).¹¹¹

Valores terapéuticos de TTPa para los tres reactivos. Considerando los valores del intervalo 2.0-3.5, se encontraron que los siguientes valores de TTPa, son los que mejor reflejan la concentración de HNF dentro del intervalo terapéutico.

TTPa (segundos)	TTPa-Path 60-100	TTPa-SP 68-85	TTPa-A5 62-115
--------------------	----------------------------	-------------------------	--------------------------

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Resultados demográficos. Las muestras evaluadas provenían de un grupo de enfermos donde predominó la población masculina con edad similar a las mujeres. En cuanto a las variables hemostáticas, los valores de TP y por consiguiente el INR, tal como lo muestran nuestros resultados, no suelen ser diferentes entre hombres y mujeres, dado que el TP refleja principalmente la funcionalidad de los factores vitamino-K dependientes, cuya síntesis no tiene relación con el género. El TT por su parte evalúa la capacidad del Fg endógeno para coagular, no es una medida del Fg, sino sólo una muestra de su funcionalidad. El TT es una prueba sensible a la HNF por lo tanto, los valores elevados de TT se relacionan directamente con la presencia de HNF.⁷⁵ La mayor concentración de HNF en mujeres se ha encontrado previamente y se sugiere que se debe a que las mujeres tienen menor peso corporal y contenido total de agua, lo que provoca diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre hombres y mujeres quienes alcanzan más rápido niveles terapéuticos.¹¹²

Los valores de Fg y fVIII:c son más elevados en mujeres y además, aumentan con la edad. En el caso específico de esta muestra, es posible que la concentración del Fg esté falsamente disminuida, debido a la presencia de HNF en los plasmas y a que el reactivo Multifibrin-U no es capaz de eliminar el efecto de la heparina como sería si incluyera heparinasa entre sus componentes. En el caso de la medición del fVIII:c, se realiza una dilución del plasma problema con el plasma deficiente en fVIII, lo que disminuye el efecto de la heparina en la determinación coagulométrica del mismo.

Los valores elevados en ambos géneros son esperados dado que se trata de una población de enfermos que posiblemente se encuentran bajo situación de inflamación. El fVIII:c no fue mayor en las mujeres con respecto a los hombres como se ha encontrado en otros trabajos,^{113,114} entre las razones que explican niveles altos en las mujeres se encuentran: el uso de anticonceptivos orales y el embarazo, ambos factores aumentan los niveles de estrógenos; sin embargo, en este caso, se trata de una población de mujeres enfermas (**fig. 8**), de una edad similar a la de los hombres, posiblemente en menopausia lo que explica que los niveles de fVIII:c en las mujeres no sean significativamente más altos que en los hombres.

Correlaciones simples. Los coeficientes de correlación de Spearman (**tabla 2**) entre los diferentes reactivos de TTPa y las variables hemostáticas, no mostraron una relación inversa con el Fg, como esperábamos, lo que consideramos se debe a una influencia directa de la HNF sobre la prueba coagulométrica de dosificación de Fg. Por su parte, los valores de fVIII:c mostraron una relación inversa y significativa, es decir, que entre más altos son los niveles del fVIII:c, más cortos son los tiempos del TTPa. Estos resultados son consistentes con casos reportados, donde se ha demostrado que a niveles elevados de fVIII:c existe un acortamiento relativo del TTPa.^{97,115} Los niveles elevados de fVIII:c constituyen una de las causas más importantes para la baja correlación entre la prueba del TTPa y los niveles de heparina, por lo que en pacientes con fVIII:c alto pueden ser necesarias dosis mayores de HNF para alcanzar valores de TTPa terapéuticos, esta situación a menudo es referida como *resistencia aparente a la heparina* y también ha sido atribuida a niveles elevados del Fg,^{97,98} efecto que no se reprodujo en este trabajo.

El reactivo TTPa-SP mostró mayor sensibilidad al efecto del fVIII:c alto, de acuerdo al **análisis de regresión lineal (tabla 3)**. Nuestros resultados sugieren que en circunstancias donde el fVIII:c se encuentra elevado, como durante la fase aguda ó en procesos inflamatorios, el uso del TTPa para la monitorización de la HNF podría requerir de un ajuste para corregir el efecto del fVIII:c, o mejor aún, debería medirse la concentración de HNF directamente.

Coincidencia de resultados entre el TTPa y la HNF. Con base a los resultados, se agruparon a los pacientes en tres categorías de anticoagulación: sub-anticoagulados, anticoagulados y sobre-anticoagulados, tanto por el método de TTPa tradicional que utiliza los valores de los índices de anticoagulación en el intervalo de 1.5-2.5 como por el intervalo recomendado para la concentración de HNF en plasma (0.3-0.7 UI/mL). De acuerdo a la **tabla 4**, la prueba del TTPa muestra una discrepancia significativa con los resultados del ensayo anti-Xa lo que se ha reportado en numerosos estudios.^{116,117,118,119} Recientemente Arachchilage y colaboradores evaluaron la prueba del TTPa para la monitorización de la HNF por el ensayo anti-Xa, de 3,543 muestras obtenidas de 475 pacientes: infantes (n=165), niños (n=60) de 1-15 años y adultos (n=250), quienes recibieron tratamiento con HNF. Los resultados demostraron que de acuerdo a su criterio de coincidencia, los valores de TTPa coincidieron con el 51.8% del total de los resultados (1,466/2,836) al estimar los niveles de heparina en los pacientes adultos. Y considerando las subclasificaciones, únicamente el 38% de los pacientes coincidió con niveles terapéuticos de heparina (0.3–0.7 IU/mL).¹¹⁶ Po su parte en un estudio con 569 muestras de 149 pacientes se encontró que los resultados del TTPa coincidieron en

un 54% con el ensayo anti-Xa.¹⁷⁷ Una coincidencia menor se reportó en el estudio realizado por Adatya y colaboradores, que en 340 muestras de 38 pacientes, los resultados de TTPa coincidieron en un 25.6% (87/340).¹¹⁸ En este trabajo los porcentajes de coincidencia obtenidos en el intervalo 1.5-2.5 para los reactivos probados, fueron semejantes: TTPa-Path=41.4%, TTPa-SP=44.3%, aunque para el TTPa-A5, se encontró una muy baja coincidencia: 16.4% (**tabla 5**). Cabe mencionar que ninguno de estos trabajos calculó la constante de concordancia entre métodos llamada *Kappa* y que ayuda a determinar si la diferencia en los resultados de los diferentes métodos tiene impacto en el criterio clínico.

Desempeño de las pruebas de TTPa para clasificar al paciente anticoagulado

con HNF. Considerando que en este caso, la *sensibilidad* (**tabla 6**) de la prueba de TTPa es la capacidad para detectar al paciente anticoagulado, se encontró que al usar el *intervalo terapéutico* de 1.5-2.5, ninguno de los tres reactivos es capaz de categorizar a todos los pacientes verdaderamente anticoagulados (de acuerdo a la HNF en plasma). Según trabajos previos, la sensibilidad en la respuesta de los reactivos del TTPa depende del contenido de fosfolípidos y de la naturaleza del activador presente.^{120,121,122} En nuestro caso, los tres reactivos de TTPa probados contienen sílica como activador de superficie y varían en la fuente de fosfolípidos: el reactivo del TTPa-Path tiene de origen vegetal, el TTPa-SP de origen sintético y el TTPa-A5 de cerebro de conejo, lo que nos permite suponer que la diferencia en la sensibilidad de los reactivos estuvo directamente influida por el contenido y origen de los fosfolípidos, aunque ninguno presentó una sensibilidad aceptable. Es importante mencionar que el reactivo TTPa A5, es muy sensible a la presencia del

anticoagulante lúpico, por lo que su uso no es recomendable para dar seguimiento a personas tratadas con HNF.

Con respecto a la *especificidad*, que determina la capacidad para distinguir a los no-anticoagulados, se confirma la baja capacidad de la prueba para reconocer a los pacientes cuando no están anticoagulados, dando como resultado un alto índice de falsos positivos (**tabla 6**) con los tres reactivos.

Los resultados obtenidos para el *VPP* indican que usando el *intervalo terapéutico* de TTPa de 1.5-2.5, la probabilidad de determinar que un paciente está verdaderamente anticoagulado, es muy baja. El principal riesgo que esto representa es que aquellos pacientes clasificados erróneamente como anticoagulados no reciben las dosis adecuadas para alcanzar los niveles terapéuticos de HNF. Por su parte, el *VPN* de cada uno de los reactivos en general, permite clasificar con alto grado de certeza que los pacientes calificados como fuera del intervalo terapéutico, efectivamente se encuentran fuera de este intervalo.

Concordancia. Aun cuando la correlación de Spearman muestra una asociación significativa del TTPa con los niveles de heparina, los resultados para el estudio de concordancia (**tabla 7**) demostraron que la correlación simple no implica que los métodos se pueden usar indistintamente, ya que una clasificación errónea entre anticoagulado y no anticoagulado tiene implicaciones en el criterio clínico. Hasta donde sabemos, el análisis estadístico con el cálculo de la constante de concordancia entre métodos llamada *kappa*, no se ha realizado en trabajos publicados. Estos resultados confirman que aunque el TTPa ha sido la prueba de elección empleada para el monitoreo de la terapia anticoagulante de la HNF, en

realidad no refleja los niveles de heparina plasmática terapéuticos determinados por el ensayo anti-Xa.

Índice terapéutico de TTPa 2.0-3.5. Se ha sugerido que el intervalo de índices de TTPa al cual se suelen alcanzar con mayor certeza los niveles terapéuticos de heparina es de 2.0-3.5.⁹⁸ Al establecer este nuevo índice de TTPa como el intervalo terapéutico, nuestros resultados demostraron que la coincidencia entre los pacientes anticoagulados por TTPa y por HNF aumenta (**tabla 5 vs tabla 9**). Por otra parte, la constante de concordancia (k) entre los tres reactivos de TTPa y los niveles de heparina también mejoraron (**tabla 7 vs 11**), lo que implica una mejor clasificación con este índice de los pacientes anticoagulados versus no-anticoagulados.

Alcanzar las dosis terapéuticas de HNF es de importancia clínica, una revisión de 604 pacientes pediátricos que fueron sometidos a tratamiento con oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) demostró que la supervivencia de los pacientes aumenta con dosis de HNF en intervalo terapéutico.¹²³ También, se ha demostrado que los pacientes que son monitorizados con el ensayo anti-Xa alcanzan los niveles terapéuticos más rápido y requieren menos mediciones que un grupo de pacientes donde se manejó el tratamiento con base al TTPa.^{97,124} Sin embargo, a pesar de la evidencia de que el incremento en las dosis de HNF facilita la recuperación del paciente en general, el médico prefiere mantenerlo en niveles bajos de anticoagulación y disminuir el riesgo de hemorragia. Por otra parte, el acceso a la prueba de HNF en plasma, es limitado. De ahí que a raíz de este trabajo de tesis, en los resultados de TTPa para el paciente hospitalizado en el Instituto Nacional de

Cardiología, se mostrarán los valores en segundos de TTPa del intervalo terapéutico usando el reactivo de Pathromtin®SL de Siemens que encontramos con base al ensayo de anti-Xa en valores de 0.3-0.7 UI/mL.

8. CONCLUSIONES

- Existe una correlación de Spearman significativa entre los valores del TTPa y los niveles plasmáticos de HNF medida por el método cromogénico (UI/mL), sin embargo los resultados de concordancia determinaron que a pesar del valor de la correlación, el impacto de la diferencia entre los resultados obtenidos por un método (TTPa con diferentes reactivos) y concentraciones de heparina en plasma, son tan diferentes sobre todo con el uso del índice 1.5-2.5, que determinan un comportamiento clínico diferente del que se tomaría al conocer la verdadera concentración de heparina en plasma.
- En este trabajo, los niveles elevados de fibrinógeno no presentaron efecto sobre la prueba del TTPa, ya que el reactivo carece de heparinasa y el resultado final se afecta por la presencia de heparina en el plasma.
- Niveles elevados de fVIII:c provocaron acortamiento en los tiempos del TTPa, lo que contribuye a la discrepancia entre los resultados de la prueba y los niveles de HNF determinados por el ensayo anti-Xa.
- Usar un intervalo terapéutico del TTPa con un índice de 1.5-2.5 no asegura que se alcancen los niveles terapéuticos de HNF. Nuestros resultados sugieren que la concordancia entre los niveles de la HNF y la prueba del TTPa mejora con el uso del intervalo de TTPa de 2.0-3.5.

- Existe una variabilidad importante en los resultados de TTPa dependiendo del reactivo (origen de fosfolípidos). En este trabajo, el reactivo TTP-SP de IL mostró el mejor valor de concordancia con respecto a la HNF plasmática.
- A raíz de este trabajo, en el INCICH se usará el intervalo de TTPa de 60-100 segundos (Pathromtin®SL de Siemens) como intervalo terapéutico de HNF.
- Dar seguimiento al paciente anticoagulado con HNF mediante su dosificación por el método cromogénico proporciona valores exactos de la concentración plasmática del medicamento; sin embargo, es una prueba de poco manejo en los laboratorios clínicos debido a su costo. Las ventajas de alcanzar un valor terapéutico adecuado rápidamente puede ser un beneficio real a pesar de la diferencia del costo con la prueba del TTPa, ya que se harían menos mediciones y el paciente recibiría el beneficio del tratamiento más tempranamente.
- Es necesario dar a conocer entre médicos y personal de laboratorios, los mejores criterios para la evaluación del paciente anticoagulado con HNF.

9. ABREVIATURAS.

ACCP	American College of Chest Physicians
ACV	Accidentes Cerebro Vascular
ADP	Adenosin difosfato
AL	Anticoagulante lúpico
AT	Antitrombina
ATP	Adenosin trifosfato
CID	Coagulación intravascular diseminada
Fg	Fibrinógeno
FT	Factor tisular
FvW	Factor de von Willebrand
GAG	Glicosaminglicanos
GlcA	Ácido D-glucurónico
GlcN	D-glucosamina
GP	Glupotreínas
Hb	Hemoglobina
HBPM	Heparina de Bajo Peso Molecular
HNF	Heparina no fraccionada
IdoA	Ácido L-idurónico
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez
IVFT	Inhibidor de la vía del factor tisular
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo I
PAIs	Inhibidores del activador del plasminógeno
PAR	Receptores activados por proteasas
PCa	Proteína C activada
PF4	Factor 4 plaquetario
PGI ₂	Prostaciclina
p-Na	Para-nitroanilina
ON	Óxido nítrico

SCA	Sistema canicular abierto
TAFI	Inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina
TCT	Tiempo de coagulación de la trombina
TM	Trombomodulina
TP	Tiempo de protrombina
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
TTPa	Tiempo de tromboplastina parcial activado
TSD	Disacárido trisulfatado
TT	Tiempo de trombina
u-PA	Activador del plasminógeno tipo urocinasa
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

10. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Flores O, Ramírez K, Meza J, et al. Fisiología de la coagulación. *Rev Mex Anestes* 2014; 37(2):S382-86.
- ² Páramo J, Panizo E, Pegenaute C, et al. Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Rev Med Univ Navarra* 2009;53:19-23.
- ³ Fritsman G. Focus: antiplatelet drugs and platelet function testing. *Clin Lab Sci* 2015;28(2):125-31.
- ⁴ Ribeiro M, Barbosa B, Cunha D, et al. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon* 2017;133:33-47.
- ⁵ Cardenas JC, Rein-Smith CM, Church FC. Overview of Blood Coagulation and the Pathophysiology of Blood Coagulation Disorders. *Encyclopedia Cell Biology* 2016;714-722.
- ⁶ Vargas AG, Hernández D, Villa R. Evaluación de la función plaquetaria con agregometría. *Rev Hemost Tromb* 2010;3(2):29-38.
- ⁷ Oliver A, Sierra P. Fisiología de la hemostasia. En: Llau J.V, Moral V, Gómez A and Basora M. *Tratado de Medicina Transfusional Perioperatoria (Autores)*. España. Elsevier. 2010. 49-65.
- ⁸ Furie B, Furie BC. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med* 2008;359:938-49.
- ⁹ Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009; 102: 248–257.
- ¹⁰ Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature* 1964;202:498–9.
- ¹¹ Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964;145:1310–2.
- ¹² Monroe DM, Hoffman M. What Does It Take to Make the Perfect Clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:41-8.
- ¹³ Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews* 2003;17:s1-5.
- ¹⁴ Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85(6):958-65.
- ¹⁵ Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA et al. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* 1995;86(5):1794-801.
- ¹⁶ Hoffman M and Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:1-11.
- ¹⁷ Colman RW, Clowes AW, George J, Goldhaber S, Marder V. Overview of Hemostasis. In: Colman RW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder V (Editors). *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 3-16.
- ¹⁸ Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg and Crit Care* 2009;19:3–10.
- ¹⁹ Lijnen H and Collen D. Molecular and cellular basis of fibrinolysis. In: Hoffman R (Author). *Hematology: Basic Principles and Practice*, 4th ed, Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

-
- ²⁰ Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:14477–84.
- ²¹ Handin RI. The History of Antithrombotic Therapy: The Discovery of Heparin, the Vitamin K Antagonists, and the Utility of Aspirin. *Hematol Oncol Clin N Am* 2016;30:987–93.
- ²² Baird RJ. Give us the tools... "The story of heparin-as told by sketches from the lives of William Howell, Jay McLean, Charles Best, and Gordon Murray. *J Vasc Surg* 1990;11:4-18.
- ²³ Couch NP. About heparin, or... whatever happened to Jay McLean? *J Vasc Surg* 1989;10:1-8.
- ²⁴ Hemker HC. A century of heparin: past, present and future. *J Thromb Haemost* 2016;14:1-10.
- ²⁵ Yates EA, Rudd TR. Recent innovations in the structural analysis of heparin. *Int J Cardiol* 2016; 212S1:S5-9.
- ²⁶ Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, et al. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest* 2001;119:64S-94.
- ²⁷ Casu B, Lindahl U. Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 2001;57:159-206.
- ²⁸ Courtney LJ, Jian L, Ding X. Structure, biosynthesis, and function of glycosaminoglycans. Elsevier Ltd 2010;6:407-427.
- ²⁹ Casu B. Structure and Active Domains of Heparin. In: Garg H.G, Linhardt R.J. and Hales C.A. (Editors). *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Elsevier Ltd. Kidlington Oxford. 2005.1-28.
- ³⁰ Weitz JI. Antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes y fibrinolíticos. En: Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, et al. (Editores). *Harrison: principios de medicina interna*. Vol. 1. 18ª ed. México. McGraw Hill. 2012. 998-1004.
- ³¹ Casu B, Naggi A and Torri G. Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydr Res* 2014;403:1-9.
- ³² Naggi A, Gardini C, Pedrinola G, et al. Structural peculiarity and antithrombin binding region profile of mucosal bovine and porcine heparins. *J Pharm Biomed Anal* 2016;118:52–63.
- ³³ Thomas DP, Sagar S, Stamatakis JD, et al. Plasma heparin levels after administration of calcium and sodium salts of heparin. *Thromb Res* 1976;9(3): 241-8.
- ³⁴ Detrie P, Frieleux C, Dreux C, Vairel EG, Leger L. L'heparinate de calcium, ses propriétés et ses indications. *Presse Medicale* 1962;13:627.
- ³⁵ Walker MG, Shaw JW, Thomson GJ, et al. Subcutaneous calcium heparin versus intravenous sodium heparin in treatment of established acute deep vein thrombosis of the legs: a multicentre prospective randomised trial. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 294(6581):1189-92.
- ³⁶ Callahan KS. Sangre, líquidos, electrolitos y drogas hematológicas. En: Gennaro AR (Editor). *Remington farmacia*. Vol 2. 20ª Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 2003.1461-500.

-
- ³⁷ Hirsh J, Raschke R, Warkentin T, et al. Heparin: Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest* 1995;108(4):258S–75.
- ³⁸ Fischer KG. Essentials of anticoagulation in hemodialysis. *Hemodial Int* 2007;11:178-89.
- ³⁹ Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, et al. Executive summary: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2010;141(2): 7S–47.
- ⁴⁰ Safani M, Hill SE, Winters R, et al. The Use of Average Body Weight in Dosing Unfractionated Heparin. *Chest* 2013;143(6):1840-1
- ⁴¹ Medico CJ, Walsh P. Pharmacotherapy in the critically ill obese patient. *Crit Care Clin* 2010;26(4):679–88.
- ⁴² Hohner EM, Kruer RM, Gilmore VT, et al. Unfractionated heparin dosing for therapeutic anticoagulation in critically ill obese adults. *J Crit Care* 2015;30(2):395–9
- ⁴³ Riaz IB, Asawaer M, Riaz H and et al. Optimal anticoagulation duration of unfractionated and low molecular weight heparin in non-ST elevation acute coronary syndrome: A systematic review of the literature. *Int J Cardiol* 2014;177(2):461–6
- ⁴⁴ Pol-Fachin L, Franco C, Almeida J, et. al. Effects of glycosylation on heparin binding and antithrombin activation by heparin Proteins. 2011;79(9):2735-45.
- ⁴⁵ Muedra V, Baretinob D y D'Ocón P. Papel de la antitrombina III en cirugía cardiaca. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 2013;60(9):519-27.
- ⁴⁶ Olson ST, Richard B, Izaguirre G, et al. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitor. *Biochimie* 2010;92(11):1587-96.
- ⁴⁷ Guerrini M, Mourier PA, Torri G, et al. Antithrombin-binding oligosaccharides: structural diversities in a unique function? *Glycoconj J* 2014;31(6-7):409-16.
- ⁴⁸ Rosenberg RD, Bauer KA. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, et al. (Editors). *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 3rd Ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott. 1994;837–60.
- ⁴⁹ Fu L, Sufflita M, Linhardt RJ. Bioengineered heparins and heparan sulfates. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;97:237-49.
- ⁵⁰ Ng VL. Anticoagulation Monitoring. *Clin Lab Med* 2009;29(2):283–304.
- ⁵¹ White GC 2nd. The Partial Thromboplastin Time: defining an era in coagulation. *J Thromb Haemost* 2003;1(11):2267-70.
- ⁵² Bell WN, Alton HG. A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test. *Nature* 1954;174:880-1
- ⁵³ Biggs R, Douglas A.S. The Thromboplastin Generation Test. *J Clin Pathol* 1953;6:23-9.
- ⁵⁴ Margolis J. The kaolin clotting time a rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects. *J Clin Path* 1958;11:406-9.
- ⁵⁵ Robert RP, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin a simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 1961;36:3:212-19.

-
- ⁵⁶ Fritsma GA, Dembitzer FR, Randhawa A, et al. Recommendations for appropriate activated partial thromboplastin time reagent selection and utilization. *Am J Clin Pathol* 2012;137:904-8.
- ⁵⁷ Nguyen AD, Dasgupta A, Wahed A. Coagulation-Based Tests and Their Interpretation. In: Nguyen AD, Dasgupta A and Wahed A (Authors). *Management of Hemostasis and Coagulopathies for Surgical and Critically Ill Patients*. Elsevier Inc. 2016.1–16.
- ⁵⁸ Schmaier AH, Miller JL. Coagulation and Fibrinolysis. In: McPherson RA and Pincus MR (Authors). *Henry's Clinical Diagnostic and Management by Laboratory Methods*. 23rd Ed. St. Louis, Missouri: Elsevier. 2017. 785-804.
- ⁵⁹ Mikhail R. Activated Partial Thromboplastin Time. In: Shaz BH, Hillyer CD, Abrams CS and Roshal M (Editors). *Transfusion Medicine and Hemostasis*. 2^a Ed. Elsevier Inc. 2013. 805-807
- ⁶⁰ Herrewegen F, Meijers JC, Peters M, et al. Clinical practice: The bleeding child. Part II: Disorders of secondary hemostasis and fibrinolysis. *Eur J Pediatr* 2012;171(2):207–14.
- ⁶¹ Arruda VR, High KA. Trastornos de la coagulación. En: Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, et al. (Editores). *Harrison: principios de medicina interna*. Vol. 1. 18^a ed. México. McGraw Hill. 2012. 973-82.
- ⁶² Pouplard C, Trossaert M, Querrec A, et al. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. *Haemophilia* 2009;15:365-8.
- ⁶³ Detarsio GA, Soler C, Paredes A, et al. Anticoagulante lúpico: sensibilidad de 19 reactivos comerciales de tiempo de tromboplastina parcial activado. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41(4):533-9.
- ⁶⁴ Marfil LJ. Fisiología de la coagulación II: Fases plasmática y fibrinolítica. In: Jaime JC y Gómez D. *Hematología: La sangre y sus enfermedades*. 2^a Ed. México: McGraw-Hill. 2009. 145-154
- ⁶⁵ Vogler EA, Siedlecki CA. Contact activation of blood plasma coagulation. *Biomaterials* 2009;30:1857e69
- ⁶⁶ Sperling C, Fischer M, Maitz MF. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials* 2009;30:4447–56.
- ⁶⁷ Weitz JI. Blood Coagulation and Anticoagulant, Fibrinolytic, and Antiplatelet Drugs. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC (Editors). *Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 12th Ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
- ⁶⁸ Hull RD, Raskob GE, Rosenbloom D, et al. Optimal therapeutic level of heparin therapy in patients with venous thrombosis. *Arch Intern Med* 1992.;152:1589-1594.
- ⁶⁹ Basu D, Gallus A, Hirsh J, et al. A prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N Eng J Med* 1972;287:324–27.
- ⁷⁰ Shapiro GA, Huntzinger SW, Wilson JE II. Variation among commercial activated partial thromboplastin time reagents in response to heparin. *Am J Clin Pathol* 1997;67:477-80.
- ⁷¹ Babson AL, Babson SR. Comparative evaluation of partial thromboplastin reagent containing nonsettling particulate activator. *Am J Clin Pathol* 1974; 62:856-60.
- ⁷² Slater PJ, Stevenson KJ, Poller L. Procoagulant activity of partial thromboplastin reagent and its phospholipid composition. *Thromb Res* 1980;18:831-38.

-
- ⁷³ Kitchen S, Jennings I, Woods TA, et al. Wide variability in the sensitivity of APTT reagents for monitoring of heparin dosage. *J Clin Pathol* 1996;49:10–4.
- ⁷⁴ Gausman JN, Marlar RA. Inaccuracy of a “Spiked Curve” for Monitoring Unfractionated Heparin Therapy. *Am J Clin Pathol* 2011;135:870-6.
- ⁷⁵ Favaloro EJ, Lippi G, Koutts J. Laboratory testing of anticoagulants: the present and the future. *Pathology* 2011;43(7):682-92.
- ⁷⁶ Levy JH, Szlam F, Wolberg AS, et al. Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: a review of the literature and current guidelines for testing. *Clin Lab Med* 2014;34(3):453-77.
- ⁷⁷ Hirsh J, Guyatt G, Albers GW, et al. Antithrombotic and Thrombolytic Therapy; American College of Chest Physicians Evidence-Based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest* 2008;133(6):110S-12S.
- ⁷⁸ Teng C, Yang VA. Facile colorimetric protamine titration method. *J Lab Clin Med* 1989;113:498–504.
- ⁷⁹ O’Shea M, Flute P, Pannell G. Laboratory control of heparin therapy. *J Clin Pathol* 1971;24:542–6.
- ⁸⁰ Newall F. Protamine titration. *Methods Mol Biol* 2013;992:279-87.
- ⁸¹ Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Chest* 2004;126(3):188S–203S
- ⁸² Newall F. Anti-factor Xa (anti-Xa) assays. *Methods Mol Biol* 2013;992:265-72.
- ⁸³ Rosenberg AF, Zumberg M, Taylor L, et al. The Use of Anti-Xa Assay to Monitor Intravenous Unfractionated Heparin Therapy. *J Pharm Pract* 2010;23(3):210-6.
- ⁸⁴ Toschi V, Lettino M. Inhibitors of propagation of coagulation: Factors V and X. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72:563–80.
- ⁸⁵ Harris L.E, Killard AJ. Heparin monitoring: from blood tube to microfluidic device. In: Piyathilake DE and Liang R (Editors). *Heparin properties, uses and side effects*. New York: Nova Science Publisher. 2012. 83-108.
- ⁸⁶ Wool GD, Lu CM. Pathology Consultation on Anticoagulation Monitoring: Factor X–Related Assays. *Am J Clin Pathol* 2013;140(5):623-34.
- ⁸⁷ Schwartz RS, Bauer KA, Rosenberg RD, et al. Clinical experience with antithrombin III concentrate in treatment of congenital and acquired deficiency of antithrombin. The Antithrombin III Study Group. *Am J Med* 1989;87(3B):53S-60S.
- ⁸⁸ Franchi F, Biguzzi E, Martinelli I, et al. Normal reference ranges of antithrombin, protein C and protein S: Effect of sex, age and hormonal status. *Thromb Res* 2013;132(2):e152-7.
- ⁸⁹ Mitchell LG, Vegh P. Conventional chromogenic heparin assays are influenced by patient’s endogenous plasma antithrombin levels. *Klin Padiatr* 2010;222(3):164-7.
- ⁹⁰ Gehrie E, Laposata M. Test of the Month: The chromogenic antifactor Xa assay. *Am J Hematol* 2012; 87(2):194-6.
- ⁹¹ Shojania AM, Tetreault J, Turnbull G. The variations between heparin sensitivity of different lots of activated partial thromboplastin time reagent produced by the same manufacturer. *Am J Clin Pathol* 1988;89:19-23.
- ⁹² Bates SM, Weitz JI, Johnston M, et al. Use of a fixed activated partial thromboplastin time ratio to establish a therapeutic range for unfractionated heparin. *Arch Intern Med* 2001;161:385-91.
- ⁹³ Brill E, Ginsberg JS, Johnston M, et al. Establishing a therapeutic range for heparin therapy. *Ann Intern Med* 1993;119(2):104-9.

-
- ⁹⁴ Gehrie E, Laposata M. Test of the Month: The chromogenic antifactor Xa assay. *Am J Hematol* 2012; 87(2):194-6.
- ⁹⁵ Vandiver JW, Vondracek TG. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin. *Pharmacotherapy* 2012;32(6):546-58.
- ⁹⁶ Ng VL. Liver Disease, Coagulation Testing, and Hemostasis. *Clin Lab Med* 2009;29(2):265-82.
- ⁹⁷ Levine MN, Hirsh J, Gent M, et al. A randomized trial comparing activated thromboplastin time with heparin assay in patients with acute venous thromboembolism requiring large daily doses of heparin. *Arch Intern Med* 1994;154:49-56.
- ⁹⁸ Uprichard J, Manning RA, Laffan MA. Monitoring heparin anticoagulation in the acute phase response. *Br J Haematol* 2010;149(4):613-9.
- ⁹⁹ Abdullah WZ, Moufak SK, Yusof Z, et al. Shortened activated partial thromboplastin time, a hemostatic marker for hypercoagulable state during acute coronary event. *Transl Res* 2010;155(6):315-19.
- ¹⁰⁰ Eikelboom JW, Hirsh J. Monitoring unfractionated heparin with the aPTT: time for a fresh look. *Thromb Haemost* 2006;96:547-52.
- ¹⁰¹ Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol* 2006;126(3):400-5.
- ¹⁰² Kostousov V, Nguyen K, Hundalani SG, et al. The influence of free hemoglobin and bilirubin on heparin monitoring by activated partial thromboplastin time and anti-Xa assay. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1503-6.
- ¹⁰³ Bates SM, Weitz JI. Coagulation assays. *Circulation* 2005;112:e53-60.
- ¹⁰⁴ Lehman CM, Frank EL. Laboratory monitoring of heparin therapy: partial thromboplastin time or anti-Xa assay? *Lab Medicine* 2009;40:47–51.
- ¹⁰⁵ Handeland GF, Abildgaard U, Holm HA, et al. Dose adjusted heparin treatment of deep venous thrombosis: a comparison of unfractionated and low molecular weight heparin. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 39:107-12.
- ¹⁰⁶ Jang IK, Hursting MJ. When heparins promote thrombosis review of heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 2005;111:2671-83.
- ¹⁰⁷ Funk DM. Coagulation assays and anticoagulant monitoring. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:460-5.
- ¹⁰⁸ Byun JH, Jang IS, Kim JW, et al. Establishing the heparin therapeutic range using aPTT and anti-Xa measurements for monitoring unfractionated heparin therapy. *Blood Res* 2016;51(3):171-4.
- ¹⁰⁹ Kitchen S, Theaker J, Preston FE. Monitoring unfractionated heparin therapy: relationship between eight anti-Xa assays and protamine titration assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11:137–44.
- ¹¹⁰ Kovacs MJ, Keeney M, MacKinnon K, et al. Three different chromogenic methods do not give equivalent anti-Xa levels for patients on therapeutic low molecular weight heparin (dalteparin) or unfractionated heparin. *Clin Lab Haem* 1999;21:55–60.
- ¹¹¹ Cerda JI y Villarreal L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr* 2008; 79: 54-8.

-
- ¹¹² Vincent PD, Albert M, Champagne MC, et al. Factors influencing enoxaparin anti-Xa activity in surgical critically ill patients. *J Crit Care* 2011; 26 (4):347-351.
- ¹¹³ Dossenbach, Trotsenburg, Krugluger, et al. Elevated coagulation factor VIII and the risk for recurrent early pregnancy loss. *Thrombin Haemost* 2004; 4:694-9.
- ¹¹⁴ Olivia Wu, Lindsay Robertson, Peter Langhorne, et al. Oral contraceptives, hormone replacement therapy, thrombophilias and risk of venous thromboembolism: a systematic review. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (Treats) Study. *Thromb Haemost* 2005;94:17-25.
- ¹¹⁵ Ten Boekel E, Bartels P. Abnormally short activated partial thromboplastin times are related to elevated plasma levels of TAT, F112, D-dimer and FVIII: C. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32(3):137-142.
- ¹¹⁶ Arachchillage DRJ, Kamani F, Deplanoa S, W. et al. Should we abandon the APTT for monitoring unfractionated heparin? *Thromb Res* 2017;157:157-161.
- ¹¹⁷ Takemoto CM, Streiff MB, Shermock K, et al. Activated partial thromboplastin time and anti-Xa measurements in heparin monitoring: biochemical basis for discordance. *Am J Clin Pathol* 2013;139:450–56.
- ¹¹⁸ S. Adatya, N. Uriel, H. Yarmohammadi, C.T. Holley, A. Feng, S.S. Roy, et al., Anti-factor Xa and activated partial thromboplastin time measurements for heparin monitoring in mechanical circulatory support, *JACC Heart Fail* 2015;3(4):314–22.
- ¹¹⁹ Price EA, Jin J, Nguyen HM et al. Discordant aPTT and anti-Xa values and outcomes in hospitalized patients treated with intravenous unfractionated heparin, *Ann Pharmacother* 2013;47:151–8.
- ¹²⁰ Slater PJ, Stevenson KJ, Poller L. Procoagulant activity of partial thromboplastin (cephalin) reagent and its phospholipid composition. *Thromb Res* 1980;18831- 38.
- ¹²¹ Lincz LF, Scorgie FE, Johnston CI, et al. Comparative sensitivity of commercially available aPTT reagents to mulga snake (*Pseudechis australis*) venom. *Pathology* 2014;46(5):444-9.
- ¹²² Kitchen S, Cartwright I, Woods, TAL, et al. Lipid composition of seven APTT reagents in relation to heparin sensitivity. *British Journal of Haematology* 1999;106: 801–8.
- ¹²³ Baird CW, Zurakowski D, Robinson B, et al. Anticoagulation and Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation: Impact of Activated Clotting Time and Heparin Dose on Survival. *Ann Thorac Surg* 2007; 83(3):912-20.
- ¹²⁴ Guervil DJ, Rosenberg AF, Winterstein AG. Activated partial thromboplastin time versus antifactor Xa heparin assay in monitoring unfractionated heparin by continuous intravenous infusion. *Ann Pharmacother* 2011;5:861-8.

11. ANEXO.

Tabla 12. Grado de anticoagulación por el reactivo TTPa-Path versus vs el ensayo anti-Xa (**Intervalo 1.5-2.5**), por SPSS 17.0.

			Gdo. Anticoagulación TTPa-Path			Total
			Anticoagulado	Sub Anticoagulado	Sobreanticoagulado	
GdoAnticHeparina	Anticoagulado	Count	9	0	4	13
		% within GdoAnticHeparina	69.2%	.0%	30.8%	100.0%
		% of Total	12.9%	.0%	5.7%	18.6%
	SubAnticoagulado	Count	34	18	3	55
		% within GdoAnticHeparina	61.8%	32.7%	5.5%	100.0%
		% of Total	48.6%	25.7%	4.3%	78.6%
	Sobreanticoagulado	Count	0	0	2	2
		% within GdoAnticHeparina	.0%	.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	.0%	.0%	2.9%	2.9%
Total		Count	43	18	9	70
		% within GdoAnticHeparina	61.4%	25.7%	12.9%	100.0%
		% of Total	61.4%	25.7%	12.9%	100.0%

Tabla 13. Grado de anticoagulación por el reactivo TTPa-SP versus vs el ensayo anti-Xa (**Intervalo 1.5-2.5**), por SPSS 17.0.

			Gdo. Anticoagulación TTPa-SP			Total
			Anticoagulado	Sub Anticoagulado	Sobreanticoagulado	
GdoAnticHeparina	Anticoagulado	Count	8	0	5	13
		% within GdoAnticHeparina	61.5%	.0%	38.5%	100.0%
		% of Total	11.4%	.0%	7.1%	18.6%
	SubAnticoagulado	Count	28	21	6	55
		% within GdoAnticHeparina	50.9%	38.2%	10.9%	100.0%
		% of Total	40.0%	30.0%	8.6%	78.6%
	Sobreanticoagulado	Count	0	0	2	2
		% within GdoAnticHeparina	.0%	.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	.0%	.0%	2.9%	2.9%
Total		Count	36	21	13	70
		% within GdoAnticHeparina	51.4%	30.0%	18.6%	100.0%
		% of Total	51.4%	30.0%	18.6%	100.0%

Tabla 14.Grado de anticoagulación por el reactivo TTPa-A5 versus vs el ensayo anti-Xa (**Intervalo 1.5-2.5**), por SPSS 17.0.

			Gdo. Anticoagulación TTPa-A5			Total
			Anticoagulado	Subanticoagulado	Sobreanticoagulado	
GdoAnticHeparina	Anticoagulado	Count	5	0	4	9
		% within GdoAnticHeparina	55.6%	.0%	44.4%	100.0%
		% of Total	9.1%	.0%	7.3%	16.4%
	SubAnticoagulado	Count	37	2	5	44
		% within GdoAnticHeparina	84.1%	4.5%	11.4%	100.0%
		% of Total	67.3%	3.6%	9.1%	80.0%
	Sobreanticoagulado	Count	0	0	2	2
		% within GdoAnticHeparina	.0%	.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	.0%	.0%	3.6%	3.6%
Total	Count	42	2	11	55	
	% within GdoAnticHeparina	76.4%	3.6%	20.0%	100.0%	
	% of Total	76.4%	3.6%	20.0%	100.0%	

Tabla 15.Grado de anticoagulación por el reactivo TTPa-Path versus vs el ensayo anti-Xa (**Intervalo 2.0-3.5**), por SPSS 17.0.

			Gdo. Anticoagulación TTPa-Path			Total
			Anticoagulado	Subanticoagulado	Sobreanticoagulado	
GdoAnticHeparina	Anticoagulado	Count	7	5	1	13
		% within GdoAnticHeparina	53.8%	38.5%	7.7%	100.0%
		% of Total	10.0%	7.1%	1.4%	18.6%
	SubAnticoagulado	Count	11	43	1	55
		% within GdoAnticHeparina	20.0%	78.2%	1.8%	100.0%
		% of Total	15.7%	61.4%	1.4%	78.6%
	Sobreanticoagulado	Count	0	0	2	2
		% within GdoAnticHeparina	.0%	.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	.0%	.0%	2.9%	2.9%
Total	Count	18	48	4	70	
	% within GdoAnticHeparina	25.7%	68.6%	5.7%	100.0%	
	% of Total	25.7%	68.6%	5.7%	100.0%	

Tabla 16. Grado de anticoagulación por el reactivo TTPa-SP versus vs el ensayo anti-Xa (**Intervalo 2.0-3.5**), por SPSS 17.0.

			Gdo. Anticoagulación TTPa-SP			Total
			Anticoagulado	Subanticoagulado	Sobreanticoagulado	
GdoAnticHeparina	Anticoagulado	Count	8	3	2	13
		% within GdoAnticHeparina	61.5%	23.1%	15.4%	100.0%
		% of Total	11.4%	4.3%	2.9%	18.6%
	SubAnticoagulado	Count	15	37	3	55
		% within GdoAnticHeparina	27.3%	67.3%	5.5%	100.0%
		% of Total	21.4%	52.9%	4.3%	78.6%
	Sobreanticoagulado	Count	0	0	2	2
		% within GdoAnticHeparina	.0%	.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	.0%	.0%	2.9%	2.9%
Total	Count	23	40	7	70	
	% within GdoAnticHeparina	32.9%	57.1%	10.0%	100.0%	
	% of Total	32.9%	57.1%	10.0%	100.0%	

Tabla 17. Grado de anticoagulación por el reactivo TTPa-A5 versus vs el ensayo anti-Xa (**Intervalo 2.0-3.5**), por SPSS 17.0.

			Gdo. Anticoagulación TTPa-A5			Total
			Anticoagulado	Subanticoagulado	Sobreanticoagulado	
GdoAnticHeparina	Anticoagulado	Count	6	2	1	9
		% within GdoAnticHeparina	66.7%	22.2%	11.1%	100.0%
		% of Total	10.9%	3.6%	1.8%	16.4%
	SubAnticoagulado	Count	25	18	1	44
		% within GdoAnticHeparina	56.8%	40.9%	2.3%	100.0%
		% of Total	45.5%	32.7%	1.8%	80.0%
	Sobreanticoagulado	Count	0	0	2	2
		% within GdoAnticHeparina	.0%	.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	.0%	.0%	3.6%	3.6%
Total	Count	31	20	4	55	
	% within GdoAnticHeparina	56.4%	36.4%	7.3%	100.0%	
	% of Total	56.4%	36.4%	7.3%	100.0%	