

Test generación trombina: Utilidades clínicas y experiencia con la técnica.

Dr. Ioshvany Fernández

La Paz

Test generación trombina: Utilidades clínicas y experiencia con la técnica

Ihosvany Fernández Bello

Farmacéutico – PhD

Laboratorio de Investigación

Servicio de Hematología y Hemoterapia

Hospital Universitario La Paz. Madrid



Hospital Universitario La Paz

Hospital de Cantoblanco
Hospital Carlos III

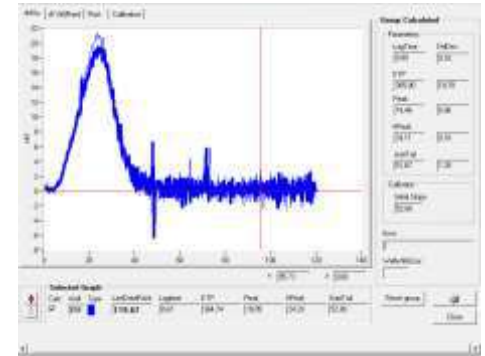


Test de generación de trombina: Aplicaciones

CAT: Trombinografía Automática Calibrada



Genesis (Stago)



CAT

- Plasma rico o pobre en plaquetas
- Evaluación de la función plaquetaria
- Estudio de la contribución de micropartículas en coagulación
- Análisis global de la coagulación
- Activación vía intrínseca
- Activación vía extrínseca
- Requiere poca muestra
- Posibilidad de evaluar efecto anti/pro-coagulante de nuevas moléculas

Aplicaciones nuestro grupo

- Enfermedad de Behçet ←
- Lupus
- Trombocitopenia inmune (PTI) ←
- Síndromes Mielodisplásicos
- Apnea del sueño ←
- Hemofilia ←

Enfermedad de Behçet

Enfermedad de Behçet

Enfermedad de Behçet:

Enfermedad rara, inflamatoria crónica

Multisistémica

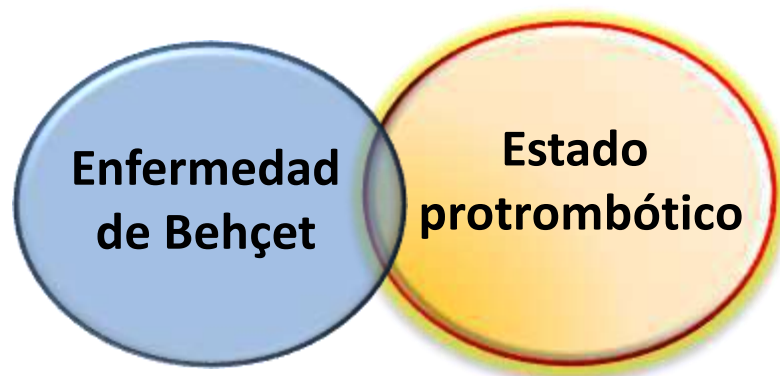
Causa desconocida

No contagiosa

- Úlceras orales
 - Úlceras genitales
 - Inflamación ocular
- Triada característica



Enfermedad de Behçet



Sintomatología trombótica variada

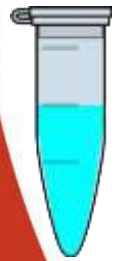
- Tromboflebitis superficial
- Trombosis venosa craneal, pulmonar, hepática o renal
- Trombosis e infarto arterial coronario y a nivel de la retina



Enfermedad de Behçet

Estudio del perfil hemostático (CAT y ROTEM)

- CAT {
- Plasma pobre en plaquetas (2500xg, 10 min, 25°C)
 - Activación con PPP-Reagent-LOW (bajas concentraciones de factor tisular)



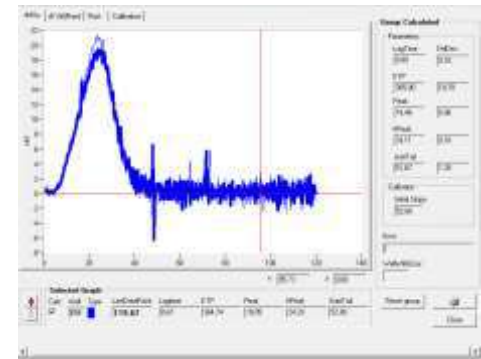
Plasma

- Sustrato de trombina
- activador (PPP-LOW)
- CaCl₂

Fluorímetro

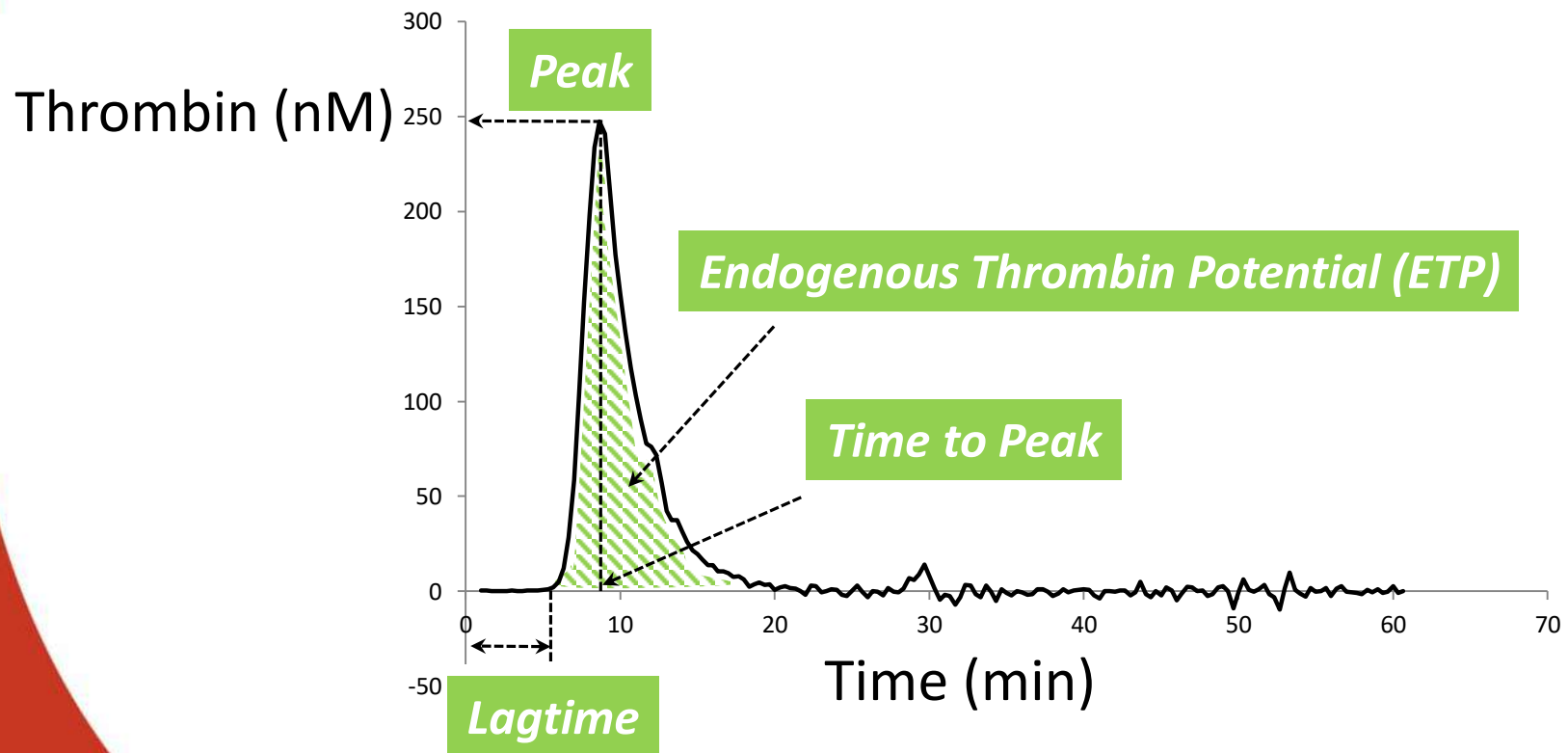


Trombograma



Enfermedad de Behçet

Thrombogram



Enfermedad de Behçet

Fernández-Bello et al. Orphanet Journal of Rare Diseases 2013

Table 2 Demographic features, ROTEM and CAT results of both groups

Characteristics		BD patients (N = 23)	Controls (N = 33)	p-value
Age at inclusion (year)		49 ± 15	43 ± 10	0.082
Female gender (%)		78	63	0.241
ROTEM	INTEM-α (degree)	77 ± 3	74 ± 2	<0.010
	INTEM-CFT (sec)	66 ± 15	80 ± 14	<0.010
	INTEM-MCF (mm)	61 ± 4	57 ± 4	<0.010
	Platelet contribution-MCF (%)	78 (69–79)	79 (77–81)	0.090
CAT	Lag-time (min)	6.7 ± 1.8	5.6 ± 1.1	0.025
	Time-to-peak (min)	9.6 ± 1.9	9.0 ± 1.4	0.240
	Peak height (nM)	292 ± 65	213 ± 67	<0.010
	ETP (nM × min)	1543 ± 331	1286 ± 292	0.010
	Velocity index (nM/min)	102 (83–127)	55 (42–90)	<0.010
	Platelet count (×10 ³ /μl)	217 (189–287)	227 (199–247)	0.785
Other parameters	Erythrocyte count (×10 ⁶ /μl)	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.4	0.244
	Fibrinogen (mg/l)	321 ± 53	280 ± 42	<0.010
	TAT (ng/l)	19 (17–21)	15 (12–17)	<0.010
	D-dimer (μg/l)	293 ± 65	270 ± 86	0.480
tPA (antigen) (ng/ml)		17.2 ± 7.2	12.4 ± 5.2	0.120
PAI-1 (antigen) (ng/ml)		19.9 ± 8.6	12.6 ± 6.0	0.032
E-selectin (μg/l)		24.2 ± 9.3	16.8 ± 8.4	0.040
C-reactive protein (mg/dl)		0.2 (0.1-0.5)	0.1 (0.1-0.4)	0.046

Results are expressed as the mean ± SD, the median and range (25th-75th percentile) or as absolute value (%).

*Hemker HC et al. Thromb Haemost 2006

Enfermedad de Behçet

Fernández-Bello *et al.* *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013, **8**:81
<http://www.ojrd.com/content/8/1/81>



ORPHANET JOURNAL
OF RARE DISEASES

RESEARCH

Open Access

Behçet's disease: new insight into the relationship between procoagulant state, endothelial activation/damage and disease activity

Ihosvany Fernández-Bello¹, Francisco J López-Longo², Elena G Arias-Salgado¹, Víctor Jiménez-Yuste^{1,3} and Nora V Butta^{1*}

Trombocitopenia inmune

Trombocitopenia inmune (PTI)

Plaquetas $\leq 20 \times 10^9/L$  \uparrow Riesgo sangrado

**Pacientes con PTI no presentan hemorragias importantes
+
Incremento eventos trombóticos***



¿Mecanismos procoagulantes compensatorios?

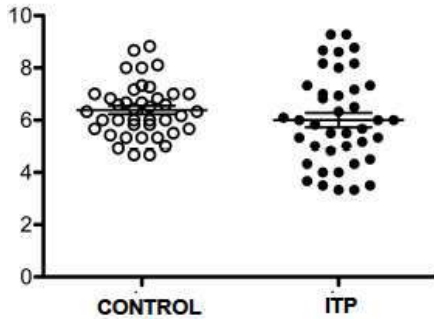


- ¿Generación de trombina incrementada?

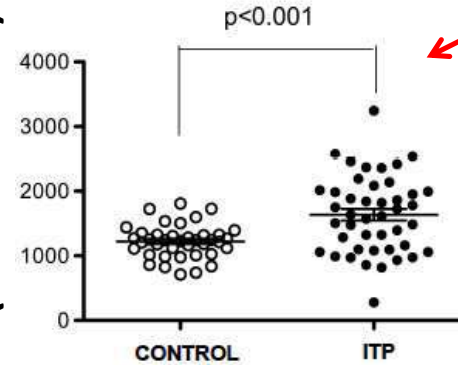
Trombocitopenia inmune (PTI)

- CAT {
- Plasma pobre en plaquetas (2500xg, 10 min, 25°C)
 - Activación con PPP-Reagent-LOW (bajas concentraciones de factor tisular)

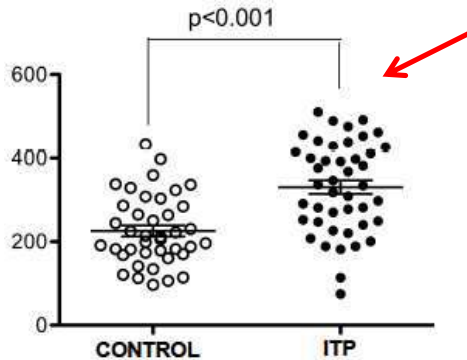
Lagtime (minutos)



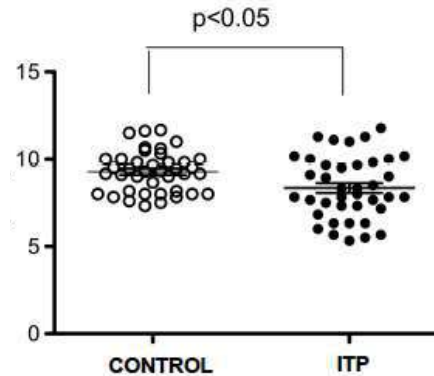
ETP (nM x minutos)



Peak (nM)



ttPeak (nM)

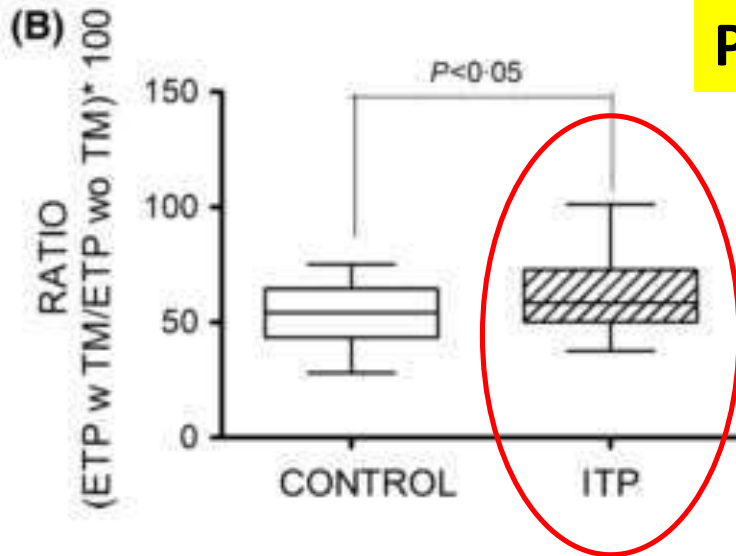


Parameter	Controls	PTI	p
ttPeak (minutos)	9.3 ± 1.2	8.3 ± 1.7	< 0.05
ETP (nM x min)	1224 ± 258	1696 ± 524	< 0.01
Peak (nM)	226 ± 83	330 ± 106	< 0.01

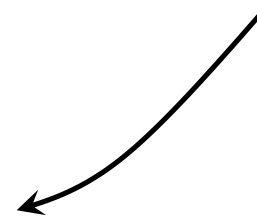


Trombocitopenia inmune (PTI)

- ✓ Comparación de CAT con /sin adición de trombomodulina



Posible resistencia a la proteína C



Trombocitopenia inmune (PTI)

bjh research paper

Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia

María T. Álvarez-Román,¹
Ihosvany Fernández-Bello,¹
Víctor Jiménez-Yuste,^{1,2}
Mónica Martín-Salces,¹ Elena G.
Arias-Salgado,³ María I. Rivas Pollmar,¹
Raúl Justo Sanz¹ and Nora V. Butta¹

¹Haematology and Haemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, ²Universidad Autónoma de Madrid, and ³Advanced Medical Projects Madrid, Madrid, Spain

Received 21 June 2016; accepted for publication 11 August 2016

Summary

Despite their low platelet count some immune thrombocytopenia (ITP) patients seldom bleed, indicating the presence of factors to compensate thrombocytopenia. Moreover, ITP patients may have an increased risk for thrombosis. These facts suggest the presence of procoagulant mechanisms that have not been clarified yet. The aim of this study was to identify these possible factors. Moreover, the utility of rotational thromboelastometry (ROTEM[®]) to test haemostasis in these patients was also evaluated. Patients with ITP presented a procoagulant profile due to an increased amount of platelet- and red cell-microparticles, an increased resistance to protein C and the formation of a clot more resistant to fibrinolysis due to augmented levels of plasminogen activator inhibitor-1, which might reflect

Apnea Obstructiva del Sueño

Apnea del sueño

Síndrome de apnea obstructiva del sueño

- Trastorno frecuente
- Interrupción respiración nocturna por colapso de la vía aérea superior
- Hipoxia intermitente ←
- Estrés oxidativo, daño endotelial ←
- Mortalidad asociada con la incidencia de eventos trombóticos.

¿Activación de células endoteliales?



¿Activación plaquetas?



¿Incremento de micropartículas?

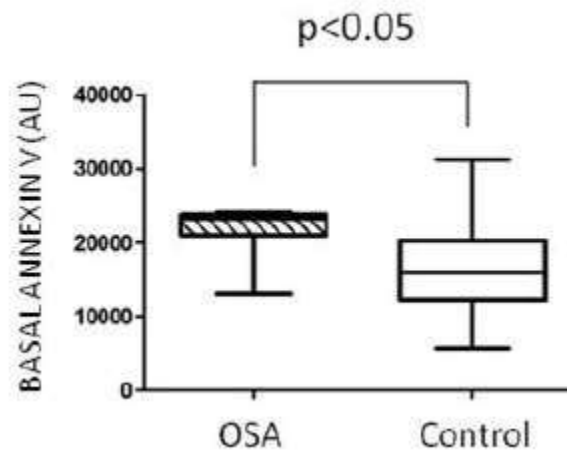
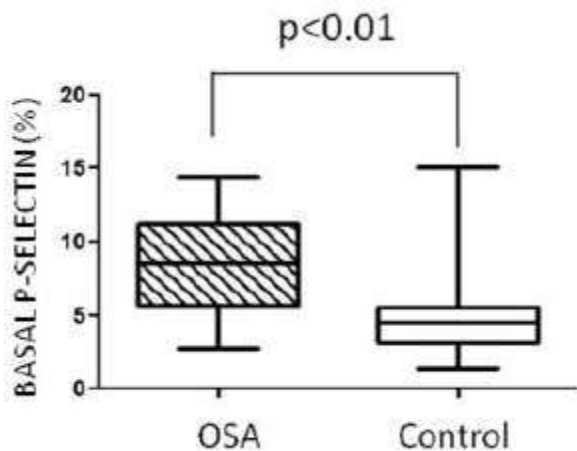


¿Incremento de la generación de trombina?

→ ¿Trombosis?
Stago

Apnea del sueño

Alteración función plaquetaria



- Caspasas normales
- Receptor de fibrinógeno no activado



Daño endotelial

+

Alteración función plaquetaria



¿Micropartículas ricas en factor tisular?



Incremento activación plaquetaria



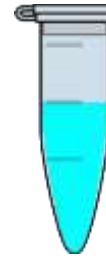
¿Micropartículas pobres en factor tisular origen plaquetario?

Apnea del sueño

Trombinografía Automática Calibrada (CAT)

- Activación de la coagulación
 - Factor tisular (PRP-Reagent)
 - Fosfolípidos (MP-Reagent)
 - Factor tisular + fosfolípidos (PPP-Reagent LOW)

Doble centrifugación
2/3 superiores del plasma



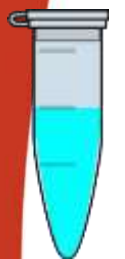
Plasma libre de plaquetas

- ✓ MP pobres en FT (eritrocitos y plaquetas)
- ✓ MP ricas en FT (células endoteliales, leucocitos)

Apnea del sueño

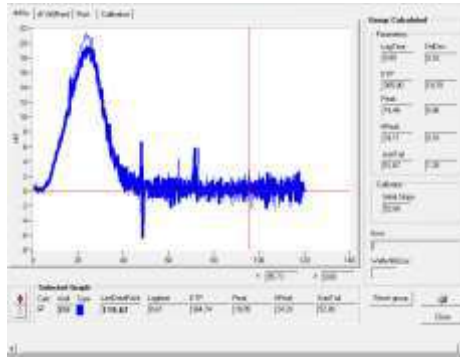
Coagulación: Fosfolípidos + factor tisular (FT)

- ✓ MP pobres en FT (eritrocitos y plaquetas)



PFP

+ FT
(PRP-Reagent)



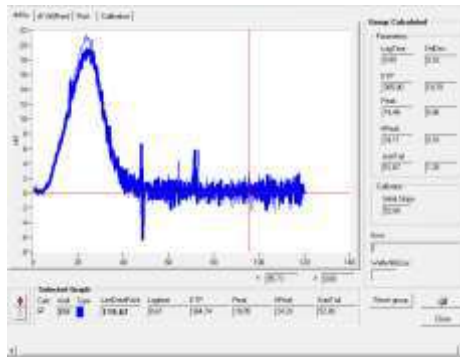
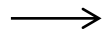
G. trombina dependiente de niveles de fosfolípidos

- ✓ MP ricas en FT (células endoteliales, leucocitos)



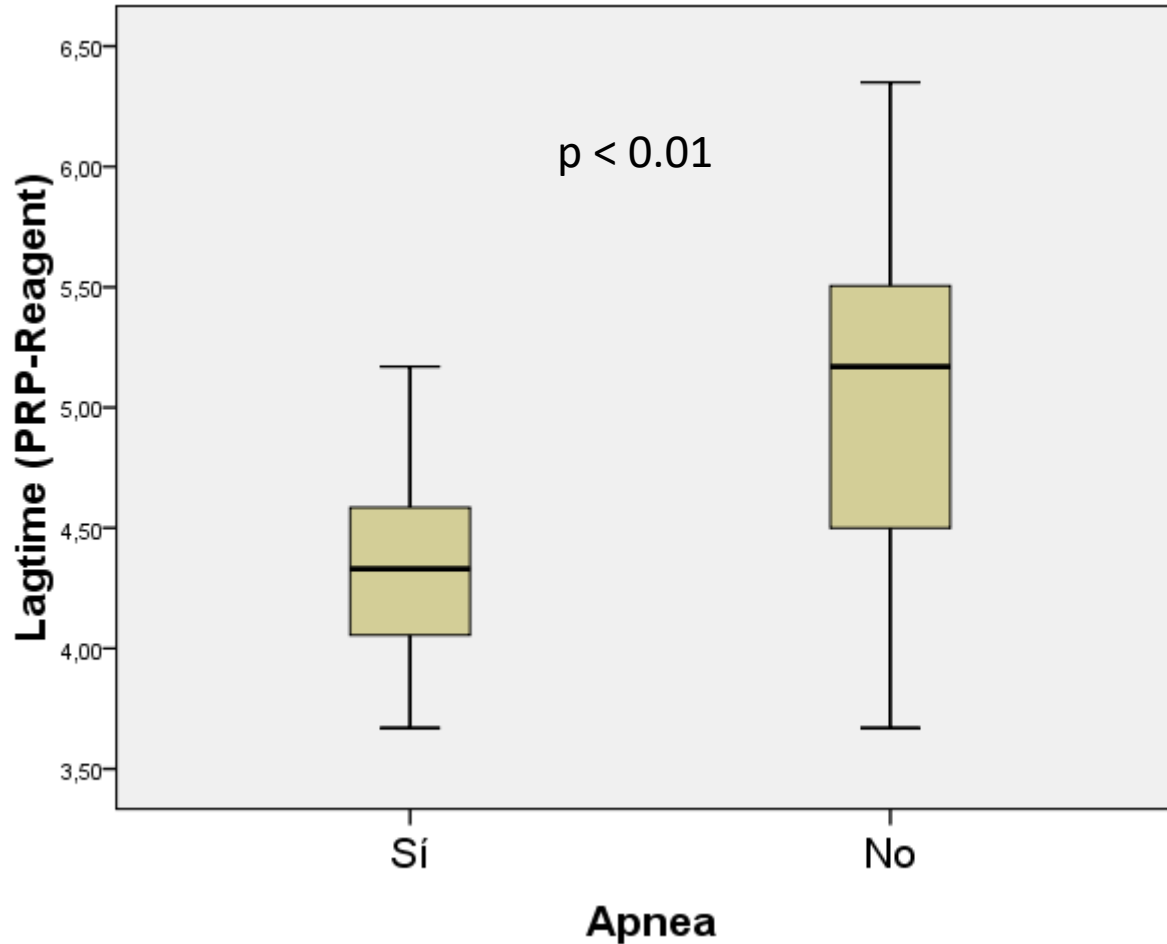
PFP

+ Fosfolípidos
(MP-Reagent)



G. trombina dependiente de niveles de FT

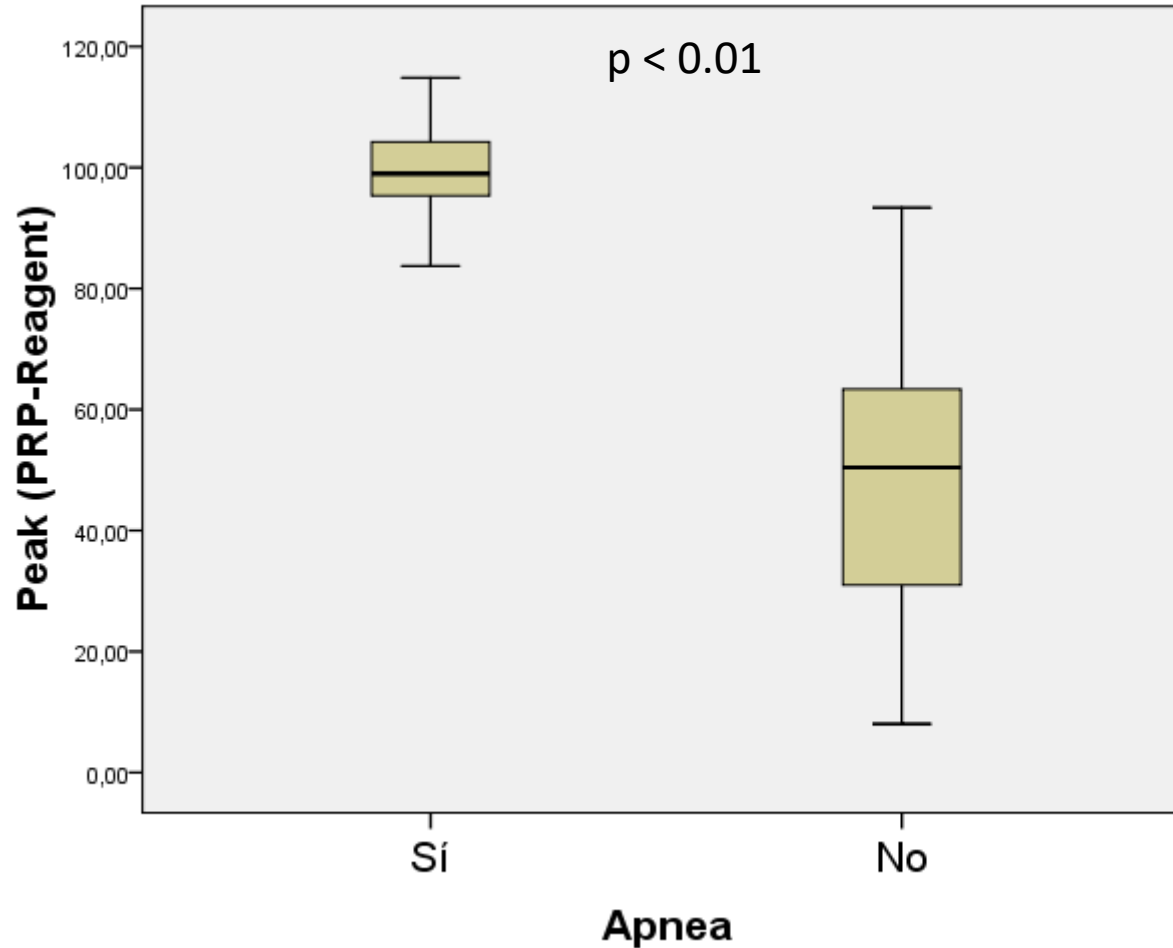
Apnea del sueño



MP pobres en FT (eritrocitos y plaquetas)

IV Foro de Usuarios Stago Academy

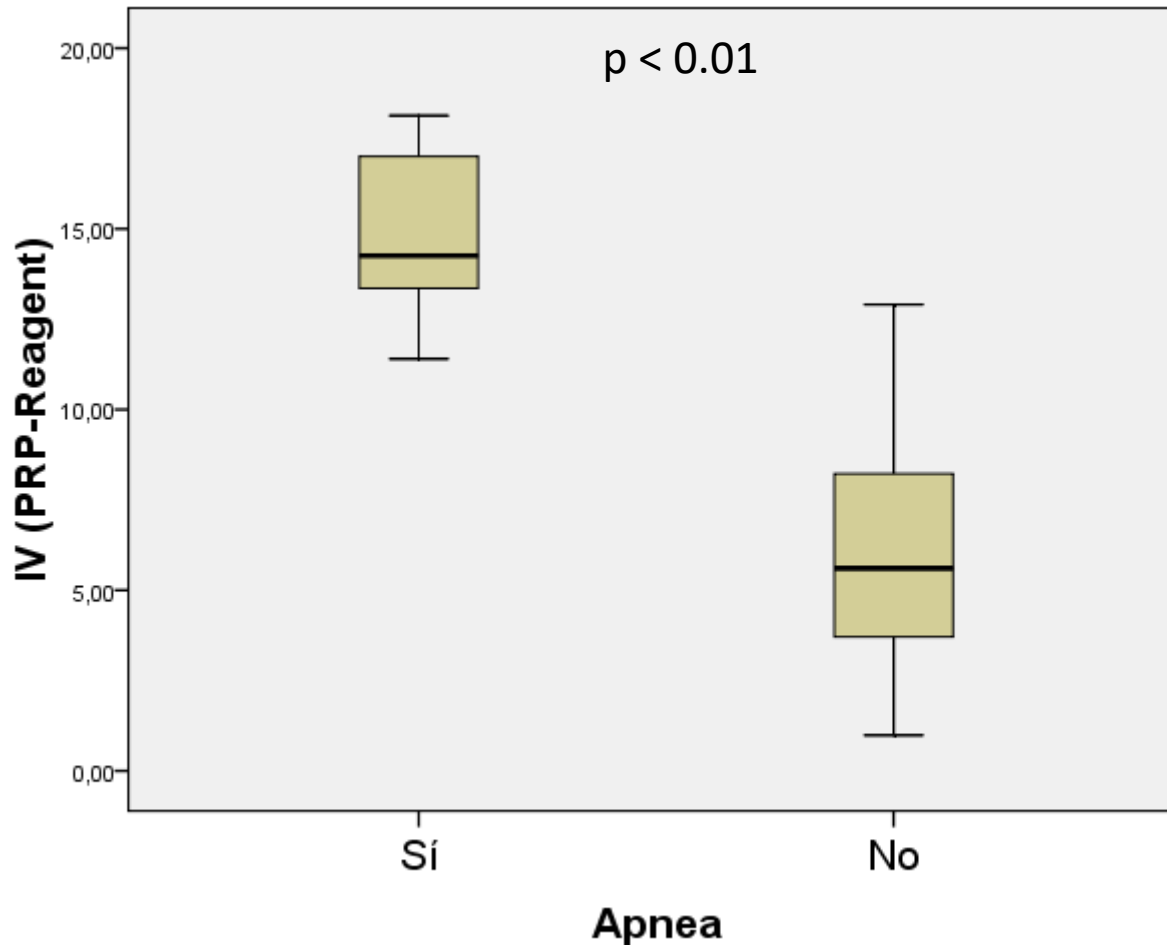
Apnea del sueño



MP pobres en FT (eritrocitos y plaquetas)

IV Foro de Usuarios Stago Academy

Apnea del sueño



MP pobres en FT (eritrocitos y plaquetas)

IV Foro de Usuarios Stago Academy

Apnea del sueño

You have submitted the following abstract to 60th Annual Meeting and Exposition (December 1-4, 2018).
Receipt of this notice does not guarantee that your submission was complete or free of errors.

Platelet Dysfunction and Cellular Microparticles May be Involved in the Hipercoagulable State Observed in Obstructive Sleep Apnea Syndrome

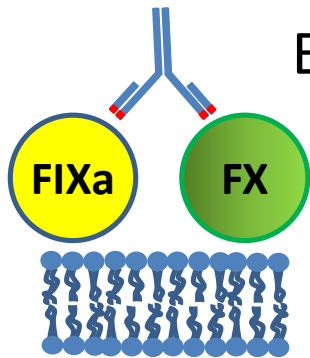
Ihosvany Fernandez-Bello^{1*}, Raul Justo Sanz^{1*}, Elena Monzón Manzano^{2*}, Francisco García Río, PhD^{3*}, Carolina Cubillos, PhD^{3*}, Cristina Balbás-García^{3*}, Teresa Álvarez-Roman^{1*}, Mónica Martín^{1*}, María Isabel Rivas Pollmar^{1*}, Miguel A. Canales⁴, Victor Jimenez-Yuste^{5*} and **Nora Butta, PhD^{2*}**

¹Hospital Universitario La Paz-Idipaz, Madrid, Spain; ²Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain;
³Pneumonology Unit, Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, MADRID, Spain; ⁴Hospital Univesitario La Paz, Madrid, Spain; ⁵La Paz University Hospital-IdiPaz, Madrid, Spain

Hemofilia

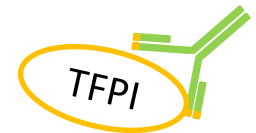
Hemofilia

Futuros/nuevos tratamientos (no FVIII/FIX)



Emicizumab
(Hemlibra®)

Anti-TFPI



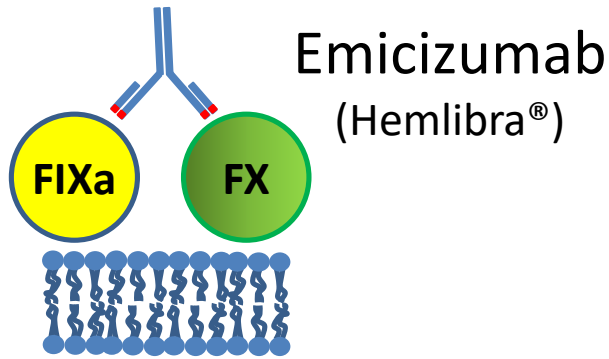
ARN interferencia
(diana anti-trombina)



Hemofilia

Futuros/nuevos tratamientos

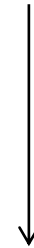
(no FVIII/FIX)



ARN interferencia
(diana anti-trombina)



Preocupación por incidencia
de eventos trombóticos
en combinación con agentes baipás



MONITORIZACIÓN
TRATAMIENTO CON AGENTES BAIPÁS

Novoseven®
Feiba®

Hemofilia

Emicizumab

(Hemlibra®)

CAT

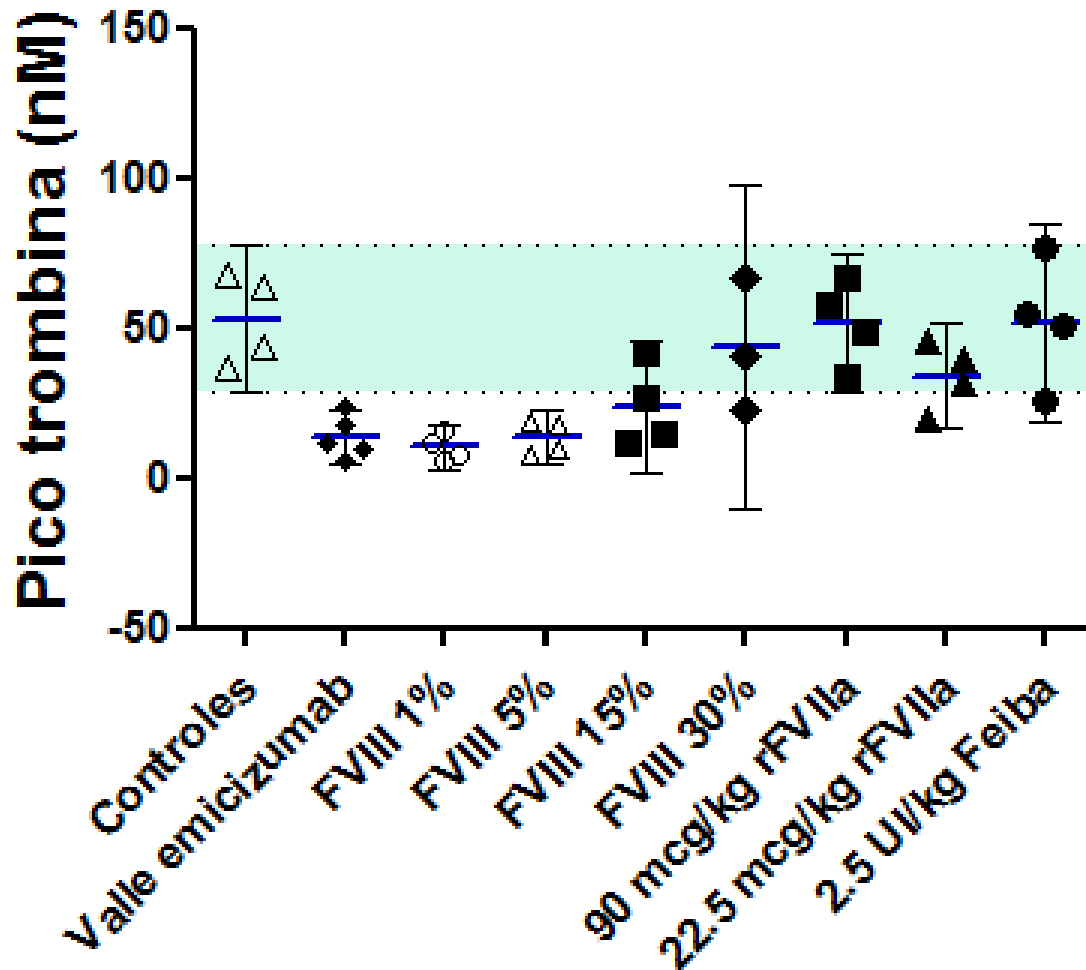
- Muestra en CTI
- Plasma libre de plaquetas (1x2.500 xg + 1x 15.000 xg, 10 min, 25°C)
- Adición de FVIII y rFVIIa *in vitro*
- Activación con PPP-Reagent-LOW (bajas concentraciones de factor tisular)

Hemofilia

Emicizumab
(Hemlibra®)

PICO CAT

CAT
(CTI)

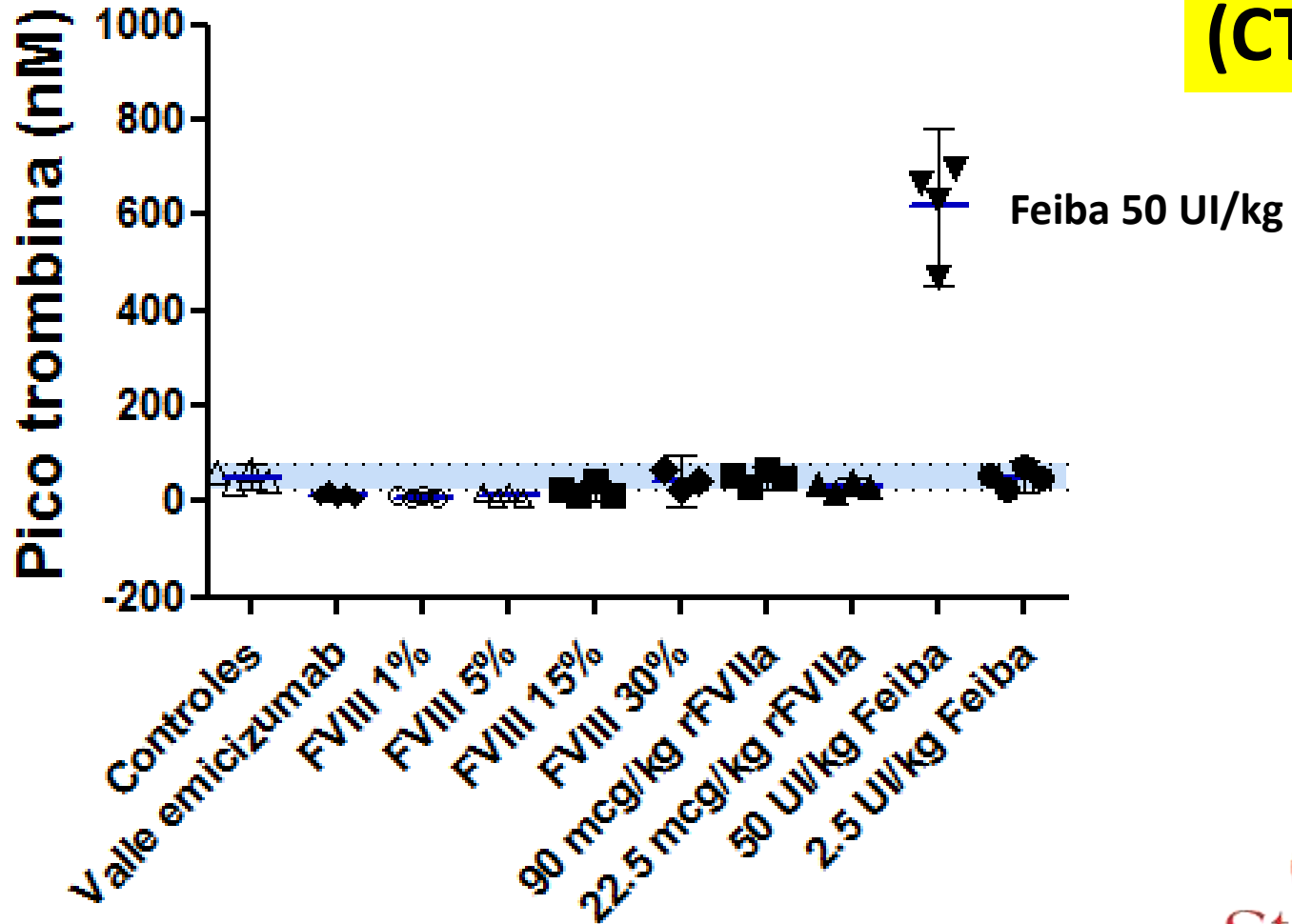


Hemofilia

Emicizumab
(Hemlibra®)

PICO CAT

CAT
(CTI)

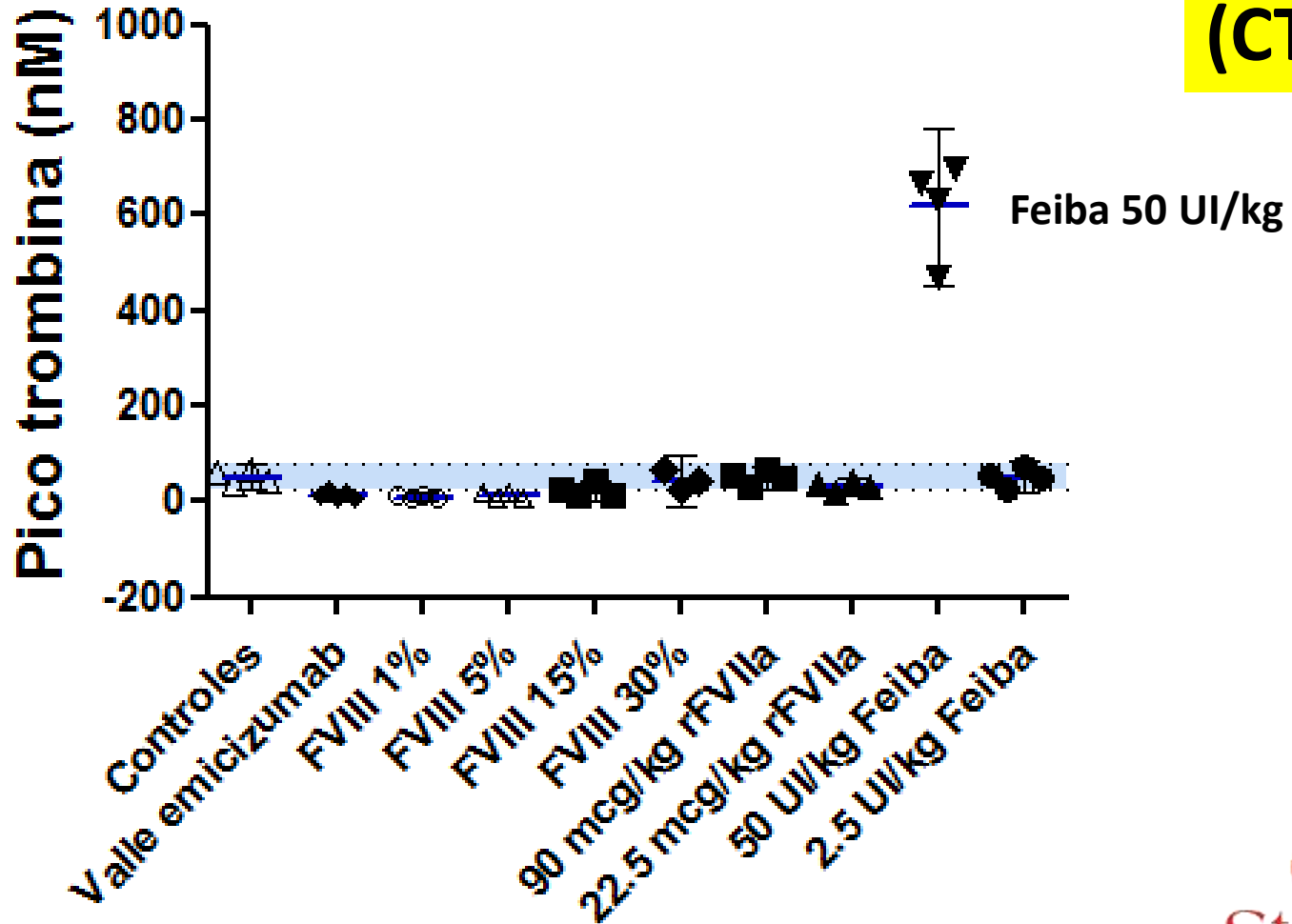


Hemofilia

Emicizumab
(Hemlibra®)

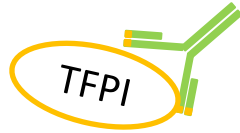
PICO CAT

CAT
(CTI)



Hemofilia

Anti-TFPI

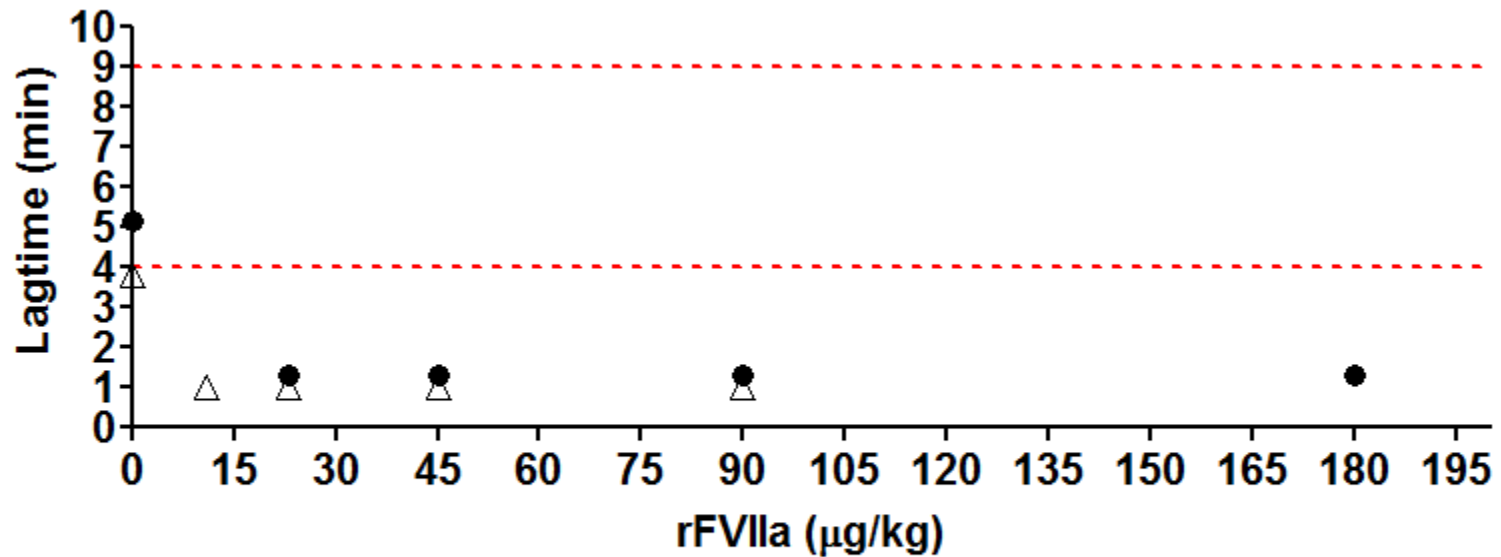
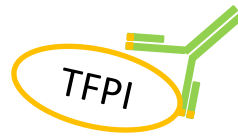


CAT

- Muestra en CTI
- Plasma libre de plaquetas (1x2.500 xg + 1x 15.000 xg, 10 min, 25°C)
- Activación con PPP-Reagent-LOW (bajas concentraciones de factor tisular)

Hemofilia

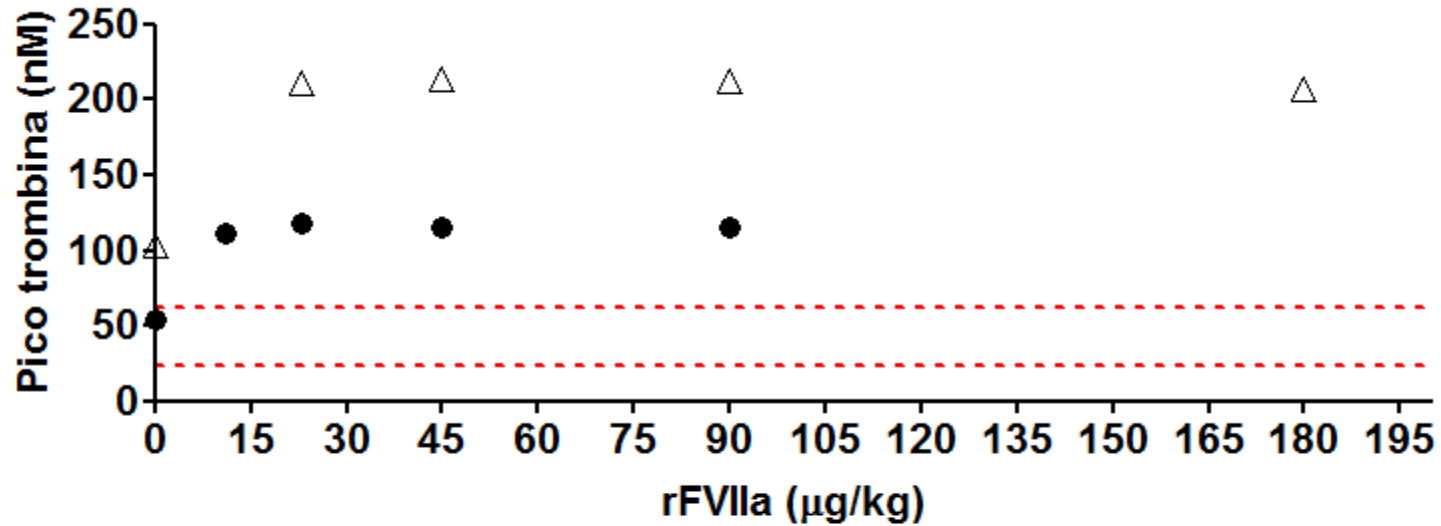
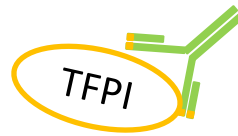
Anti-TFPI



△ Paciente 1
● Paciente 2

Hemofilia

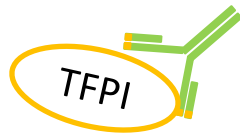
Anti-TFPI



- △ Paciente 1
- Paciente 2

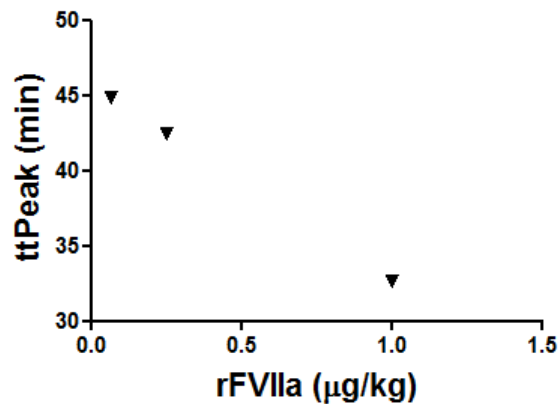
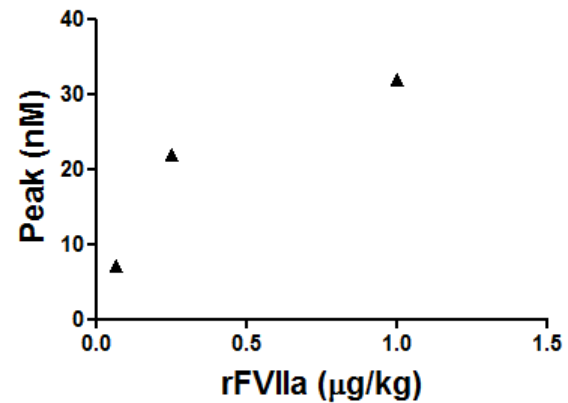
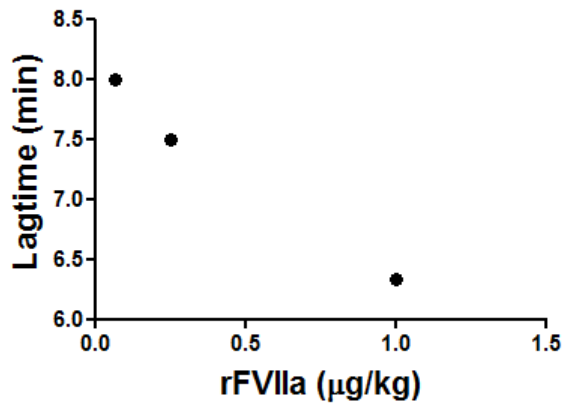
Hemofilia

Anti-TFPI



Modificación CAT

Paciente hemofilia B grave con inhibidor



Conclusiones

CAT: Trombinografía Automática Calibrada

1. Técnica muy versátil (fácil traslación a situaciones clínicas)
2. Requiere poca muestra (positivo sobre viabilidad del estudio)
3. Útil en la caracterización del estado hipercoagulable en enfermedades pro-inflamatorias
4. Útil en el estudio del efecto del emicizumab y agentes baipás en pacientes con hemofilia
5. Requiere modificaciones para estudiar el efecto de moléculas con actividad anti-TFPI en pacientes con hemofilia

Gracias por su atención