

ESTUDIO DEL INHIBIDOR DE LA FIBRINÓLISIS ACTIVADO POR TROMBINA EN PACIENTES CON HEMOFILIA B LEVE Y MODERADA.

STUDY OF THE THROMBIN ACTIVATABLE FIBRINOLYSIS INHIBITOR IN PATIENTS WITH MILD AND MODERATE HEMOPHILIA B.

José Paredes¹, Valeria Palencia¹, Belsy Guerrero², Carlos Ibarra², Ana María Salazar², Karin Pérez², María Lucía D'Errico¹

ABSTRACT

Hemophilia B is a genetic disease characterized by spontaneous bleeding due to deficiency of coagulation factor IX (FIX), producing a deficit in thrombin generation and therefore the formation of an unstable clot. In vitro studies suggest that the clot of patients with hemophilia B, is susceptible to premature lysis, which exacerbates bleeding and may contribute to the deficiency in the activation of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI), associated with decreased values of the thrombin generated in these patients. In this study, the basal levels of TAFI activity was correlated with basal levels of FIX in 11 patients with hemophilia B who attend hematology consultation of Blood Bank Central Hospital of Maracay, a subsidiary of the National Hemophilia Center, compared with 10 controls. In this sample was found a significant decrease in basal levels of activity TAFI of patients relative to control ($p < 0.01$) and correlated positively with the level of factor IX ($p < 0.01$). In conclusion, in hemophilia B there is a deficient activation of TAFI, probably associated with a decrease in thrombin generation due to a deficit in the activation of the intrinsic tenase complex associated with the concentration of FIX.

KEY WORDS: hemophilia, fibrinolysis, thrombin generation.

RESUMEN

La hemofilia B es una enfermedad genética caracterizada por sangramientos espontáneos debido a la deficiencia del factor IX (FIX) de la coagulación, lo que genera un déficit en la generación de trombina y en consecuencia la formación de un coágulo de fibrina inestable. Estudios in vitro sugieren que el coágulo de pacientes con hemofilia B, es susceptible a una lisis prematura lo que exacerba el sangrado, pudiendo estar relacionado a una deficiente activación del Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina (TAFI), asociada a valores disminuidos de la trombina generada en estos pacientes. En esta investigación se determinaron los niveles basales de la actividad de TAFI y se correlacionaron con los niveles basales de FIX. Este estudio se realizó con el plasma de 11 pacientes con hemofilia B que asisten a la consulta de hematología del Banco de Sangre del Hospital Central de Maracay, filial del Centro Nacional de Hemofilia, comparándolos con 10 controles. Se encontró en los pacientes una disminución significativa en los niveles basales de la actividad de TAFI, en relación al control ($p < 0,01$), lo que se correlacionó positivamente con los niveles de FIX ($p < 0,01$). En conclusión, en la hemofilia B debe presentarse una deficiente activación de TAFI, probablemente asociada a una disminución en la generación de trombina debida a un déficit en la activación del complejo tenasa intrínseco asociado a la concentración de FIX.

PALABRAS CLAVE: hemofilia, fibrinólisis, generación de trombina.

Recibido: diciembre 12, 2020

Aprobado: marzo 02, 2021

¹Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo.

²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

José Paredes. ORCID: 0000-0002-4086-0449

Valeria Palencia ORCID: 0000-0002-4569-4937

Belsy Guerrero. ORCID: 0000-0002-8441-0466

Carlos Ibarra. ORCID: 0000-0001-7419-7289

Ana María Salazar. ORCID: 0000-0002-3363-8137

Karin Pérez. ORCID: 0000-0003-1713-2213

Lucía D'Errico. ORCID: 0000-0001-6656-4456

Correspondencia: marialuciad@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La hemofilia B es una enfermedad hereditaria de carácter recesivo ligada al sexo, caracterizada por la aparición de hemorragias debido a la deficiencia o defecto funcional del factor IX (FIX) de la coagulación¹. Se presenta en 3 formas clínicas asociadas directamente al grado de deficiencia de dicho factor: la forma clínica severa, con niveles de factor alrededor de 1% o menos, con marcada tendencia al sangramiento espontáneo ante traumas mínimos; la forma clínica moderada, con concentraciones del factor entre 1 y 5%; y la forma clínica leve entre 6 y 40%².

En pacientes con hemofilia B, el déficit de FIX de la coagulación no permite la formación del complejo tenasa intrínseco, por lo tanto, no se generan cantidades suficientes de factor X activado (FXa), las cuales son necesarias para la formación del complejo protrombinasa. Ésto afecta la generación de trombina y directamente la estructura del coágulo de fibrina. Estudios *in vitro* sugieren que la tendencia hemorrágica en hemofilia no solo se debe a una deficiencia en la formación del coágulo, sino también a una lisis prematura del mismo por una fibrinólisis aumentada^{3,4}. Los niveles bajos de trombina limitan la activación del Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina (TAFI), lo que conduce a coágulos más susceptibles a la lisis⁵.

El TAFI es una metalocarboxipeptidasa sintetizada en el hígado, la cual es activada fisiológicamente por el complejo trombina/trombomodulina a la forma activa TAFIa. Ésta modula la fibrinólisis al remover residuos de lisina C-terminal expuestos por la fibrina parcialmente degradada, regulando negativamente la posterior generación de plasmina, lo que atenúa la lisis del coágulo. Estos residuos de lisina son necesarios para la unión de plasminógeno y t-PA a la malla de fibrina⁶.

En una investigación *in vitro*, Broze y Higuchi estudiaron el papel de TAFI en la regulación de la fibrinólisis en presencia y ausencia de FIX. Los resultados evidenciaron que la deficiencia de este factor genera coágulos más susceptibles a la lisis prematura, efecto que fue revertido en presencia del factor y de trombomodulina. Estos resultados los relacionaron a un aumento en la generación de trombina y a la activación de TAFI. Adicionalmente, cuando agregaron anticuerpos policlonales IgG anti-TAFI observaron un aumento en la lisis del coágulo³.

En estudios previos D'Errico, evaluó en plasmas de pacientes con hemofilia A severa, leve y moderada, los niveles basales de factor VIII (FVIII) y la generación de trombina, encontrando una correlación positiva con la actividad de TAFIa^{7,8}. Adicionalmente, se observó que el aumento en la concentración de trombina en la mezcla de activación del TAFI, normalizaba los valores de la actividad, lo que llevó a deducir que la trombina intrínseca que se genera en el plasma de los pacientes con hemofilia A no es suficiente para garantizar una completa activación de la enzima en las condiciones de ensayo establecidas para plasmas normales⁸. Con base a las consideraciones anteriores, en la presente investigación se evaluó en plasma de pacientes con hemofilia B leve y moderada los niveles basales de FIX y de la actividad de TAFIa, además de la correlación entre ambos parámetros.

MATERIALES Y MÉTODOS

La población estuvo constituida por pacientes con hemofilia B, que asistieron a la consulta de Hemofilia del Banco de Sangre del Hospital Central de Maracay, filial del Centro Nacional de Hemofilia, de los cuales fue seleccionada una muestra de 11 individuos de sexo masculino con edades comprendidas entre 5-62 años, que asistieron a la consulta de dicho centro. Estos pacientes se clasificaron de acuerdo al grado de severidad: 6 pacientes con hemofilia B leve y 5 pacientes con hemofilia B moderada. Se excluyeron del estudio, pacientes que recibieron tratamiento con FIX en los 7 días previos a la toma de muestra, con enfermedad hepática, VIH, traumas, infección bacteriana en curso, cáncer o presencia de otros trastornos de la coagulación diferentes a la hemofilia.

El grupo control estuvo representado por 10 individuos, con edades comprendidas entre 18-60 años que no presentaban trastornos de coagulación ni de manera clínica ni en las pruebas de laboratorio rutinarias que evalúan la coagulación sanguínea, sin antecedentes de trombosis o trastornos hemorrágicos, procedentes de la población de Maracay, Edo. Aragua. Los pacientes y controles, firmaron el consentimiento para la participación, previa aprobación por el Comité de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Procedimiento Experimental

Toma de Muestra:

A cada paciente y cada control se le tomó una muestra de sangre, mediante punción venosa. Dicha muestra fué anti-coagulada con citrato trisódico al 3,8% a una relación anticoagulante/sangre 1:9. Seguidamente, se centrifugó a 2000 g durante 10 min a 4 °C para obtener el plasma pobre en plaquetas, que fue separado en alícuotas y congelado a -80 °C, hasta la realización de las diferentes pruebas.

Equipos:

Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) Waters Massachusetts, USA). Columna Vydac C18 5 µm (100 x 4,6 mm) de Grace Davison Discovery Sciences (Illinois, USA). Coagulómetro STA4 de Diagnostica Stago (Asnières sur Seine, France).

Reactivos:

Plasma deficiente en FIX de Siemens Healthineers (Alemania). Cefalina activada CK PREST de Diagnostica Stago (Asnières sur Seine, Francia). Trombomodulina de pulmón de conejo (TM) de Sekisui Diagnostics (Stamford, CT, USA). Acetonitrilo grado HPLC y dioxano, de Merck (Darmstadt, Alemania). Sustrato hipuril-arginina, trombina humana, inhibidor de carboxipeptidasa aislado de papa (CPI), ácido o-metilhipúrico, ácido hipúrico y otros reactivos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Determinación de Factor IX

Se empleó el método coagulante de una etapa⁹, que consiste en la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activado (PTTa), utilizando un plasma deficiente en FIX, el cual aporta todos los demás factores; y diluciones crecientes, con tampón Owren-Koller de un estándar o del plasma problema. El tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración plasmática de FIX de la muestra. La concentración de factor en la muestra problema, se calculó extrapolando el tiempo de coagulación, en una curva de calibración realizada a partir de un pool de plasmas normales y se expresó en porcentaje de actividad.

Determinación de TAFIa

Se utilizó la técnica descrita por D'Errico *et al.*, basada en la cuantificación del ácido hipúrico liberado del sustrato hipuril-arginina por la acción del TAFIa, empleando CLAR con una columna de fase inversa, usando como estándar interno el ácido o-metilhipúrico⁸.

Veinte (20) μ L del plasma en estudio (diluido 1/20 con HEPES 50 mM, pH 8,0) fueron activados con 20 μ L de una mezcla de concentración final trombina humana 20 nM, trombomodulina 8 nM, CaCl₂ 40 mM, HEPES 20 mM pH 7,4 y Tween 80 0,1 mL/L, en presencia de 20 μ L del sustrato (24 mM hipuril-arginina en tampón HEPES 50 mM pH 8,0) y se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con 20 μ L de HCl 1M a temperatura ambiente, luego se adicionó 5 μ L de ácido o-metilhipúrico 150 μ M (estándar interno). El ácido hipúrico generado y o-metilhipúrico, se extrajeron con 300 μ L de acetato de etilo. La muestra se centrifugó a 7000 g por 4 min; seguidamente se tomaron 200 μ L del sobrenadante de esta solución, se evaporaron y el residuo se resuspendió en 150 μ L de la fase móvil (850 mL de fosfato monobásico de potasio 10 mM, pH 3,2 y 300 mL de acetonitrilo grado HPLC). Finalmente, 10 μ L de esta solución se inyectaron

a una columna de fase inversa (C18), realizando la elución en modo isocrático con la fase móvil a 1 mL/min y se determinó la absorbancia a 228 nm. La curva estándar se construyó a partir de una solución de ácido hipúrico 4,5 mM, se emplearon concentraciones entre 9 y 180 μ M, en presencia de 5 μ L del estándar interno. Para distinguir entre la actividad de la carboxipeptidasa N (CPN) y la de TAFIa, los ensayos se realizaron en presencia de 50 μ g/mL CPI, el cual se ha descrito como un inhibidor *in vitro* de TAFIa. Una unidad de TAFIa fue definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μ mol de sustrato por minuto a 37 °C, bajo las condiciones de ensayo antes descritas.

Análisis Estadístico

Se utilizó el programa GraphPad InStat (GraphPad software Inc., San Diego, California, USA), con el cual se efectuó la prueba t de Student para comparar promedios de muestras independientes. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado. Las correlaciones se obtuvieron a través del coeficiente de correlación de Pearson (r).

RESULTADOS

Determinación de Factor IX

Los resultados de la determinación de FIX en pacientes con hemofilia B leve y moderada se muestran en la Tabla 1. En comparación al control (93,3 $\pm$ 6,2%), el porcentaje de FIX se encontró significativamente disminuido ($p < 0,01$) en ambos grupos de pacientes; leves (22,6 $\pm$ 16,8%) y moderados (2,3 $\pm$ 1,0%), con diferencias significativas del nivel de FIX ($p < 0,05$) entre los distintos grados de severidad.

Niveles basales de TAFIa

La determinación de la actividad de TAFIa se realizó posterior a la conversión de la proenzima a su forma activa TAFIa, mediante la adición del complejo trombina-trombomodulina, a través de un ensayo que emplea CLAR. Los resultados de la determinación de TAFIa en pacientes con hemofilia B leve y moderada se muestran en la Figura 1.

En comparación al control (12,35 $\pm$ 1,25 μ g/mL), la actividad de TAFIa se encontró significativamente disminuida ($p < 0,01$) en los plasmas de ambos grupos de pacientes; leves (9,07 $\pm$ 0,63 μ g/mL) y moderados (8,62 $\pm$ 1,32 μ g/mL), sin diferencias significativas entre los distintos grados de severidad.

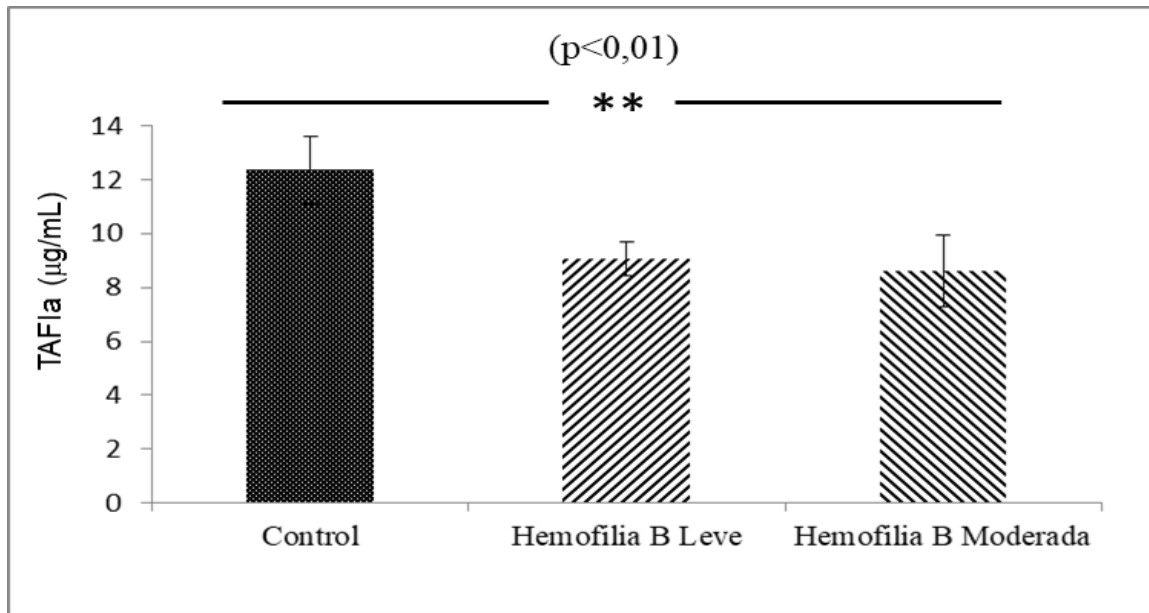


Figura 1. Niveles basales de TAFIa en plasmas de pacientes con hemofilia B.

Tabla 1. Actividad del factor IX en plasma de pacientes con hemofilia B.

Determinación de FIX (%)	
Control	93,3 ± 6,2
(n = 10)	
Hemofilia B leve	22,6 ± 16,8**
(n = 6)	
Hemofilia B moderada	2,3 ± 1,0**
(n = 5)	

**Disminución significativa de la actividad de FIX (%) en relación al control ($p < 0,01$)

Correlaciones

Al comparar los resultados obtenidos de los parámetros determinados se encontró una correlación positiva entre el FIX y los niveles basales de la actividad de TAFIa en los pacientes con hemofilia B leve ($r=0,813$, $p<0,01$) y moderada ($r=0,851$, $p<0,01$) (Figura 2 y 3).

DISCUSIÓN

En el sistema hemostático debe existir un balance adecuado entre las vías de la coagulación y la fibrinólisis, con la finalidad de mantener la fluidez de la sangre dentro del sistema vascular posterior a una lesión de los vasos sanguíneos, para así evitar un excesivo sangrado o manifestaciones trombóticas, tal como se presenta en la hemofilia¹⁰⁻¹².

La hemofilia es una enfermedad hereditaria caracterizada por la aparición de hemorragias debido a la deficiencia o defecto funcional de los factores de la coagulación FVIII o FIX. Adicionalmente, el plasma de los pacientes presenta una lisis prematura de coágulos, en comparación con los controles^{13,14}, lo que pudiese estar asociado a una deficiente activación del TAFI. Por ello, en el presente estudio se determinaron en pacientes con hemofilia B leve y moderada los niveles basales de FIX y su relación con la actividad de TAFIa.

El FIX forma parte del complejo tenasa intrínseco (FVIIIa/FIX/calcio y fosfolípidos) que activa

al FX requerido para conformar el complejo protrombinasa, el cual, al actuar sobre la protrombina, genera trombina en el sitio de daño vascular, lo que es vital para lograr un buen tapón hemostático, así como para regular al sistema fibrinolítico, el cual se encarga de disolver la fibrina y mantener el flujo sanguíneo¹⁵. En el presente estudio, la determinación de los niveles de FIX en pacientes con hemofilia B leve y moderada se realizó mediante el método coagulante en una etapa⁹. En estos pacientes con hemofilia B leve y moderada, se evidenció una disminución significativa de los niveles de FIX, en comparación al grupo control.

El sistema fibrinolítico es un importante regulador de la hemostasia. Está conformado por el sustrato; el plasminógeno, así como por los activadores, inhibidores y moduladores encargados de controlar dicho sistema¹⁶. El TAFI es una proteína que constituye una conexión entre el sistema de la coagulación y la fibrinólisis. La activación proteolítica del zimógeno por la trombina, la plasmina o el complejo trombina/trombomodulina, genera una enzima con actividad antifibrinolítica, a través de la remoción de los residuos de arginina o lisina de la fibrina parcialmente degradada por plasmina, inhibiendo la activación del plasminógeno y en consecuencia la lisis del coágulo¹⁷.

Se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación de TAFI en plasma, basadas en dos principios: la cuantificación antigénica de la proteína circulante y la determinación de la actividad posterior a

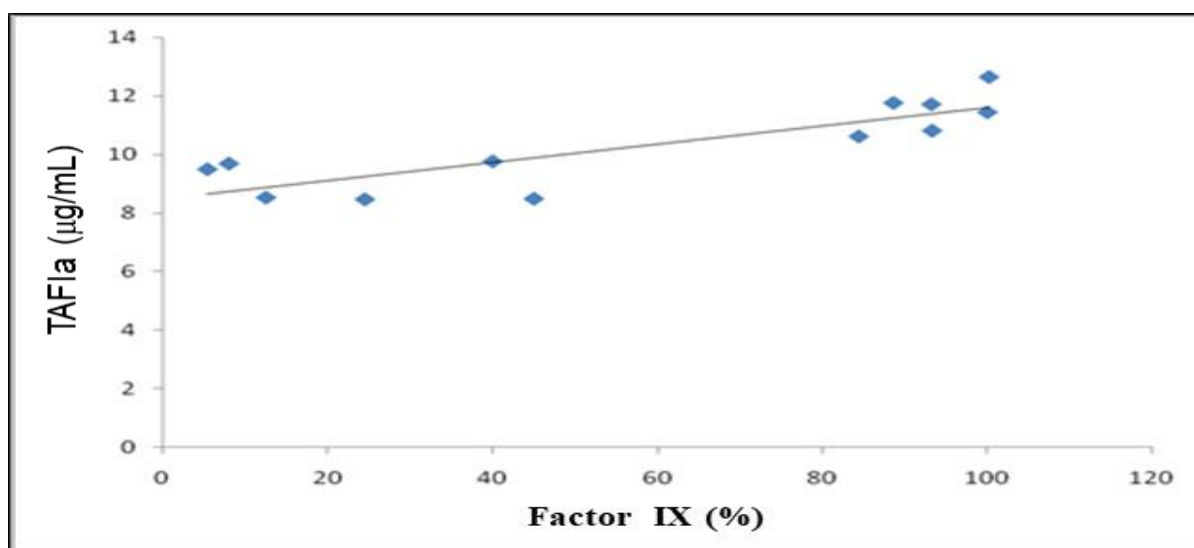


Figura 2. Correlación entre los niveles de factor IX y actividad de TAFIa en plasma de pacientes con hemofilia B leve.

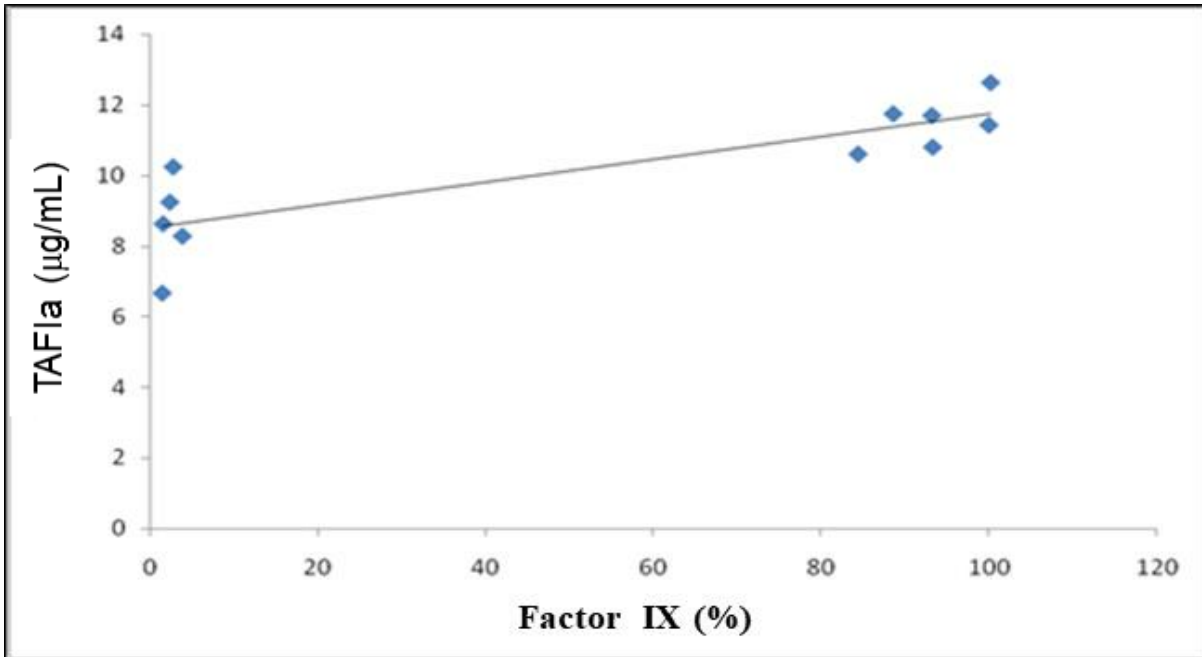


Figura 3. Correlación entre los niveles de factor IX y actividad de TAFIa en plasma de pacientes con hemofilia B moderada.

la conversión del zimógeno en su forma activa¹⁸. En el presente trabajo se determinó la actividad de TAFIa mediante la cuantificación del ácido hipúrico liberado del sustrato hipuril-arginina por la acción del TAFIa, utilizando la técnica CLAR, siendo este uno de los ensayos más sensibles para su determinación⁸. Para ello se usó el ácido hipúrico como estándar externo y el ácido o-metilhipúrico como estándar interno, el cual permite normalizar las posibles pérdidas de material como consecuencia del proceso de extracción. Debido a que el sustrato hipuril-arginina utilizado en el ensayo no es selectivo para la determinación de la actividad de TAFIa, ya que adicionalmente es sustrato de la CPN; los ensayos se realizaron en presencia de CPI un inhibidor específico de TAFIa que no afecta la actividad constitutiva de la CPN, permitiendo así distinguir entre la actividad CPN y el TAFI¹⁹.

Schatteman *et al.*, estandarizaron la metodología que emplea la técnica CLAR para la determinación de la actividad del TAFIa, que aplicaron en 490 individuos sanos, donde encontraron una actividad promedio de 964 U/L, definiendo 1 unidad de actividad de la enzima como la cantidad requerida para hidrolizar 1 µmol de sustrato (hipuril-arginina) por min, a 37 °C. Esta actividad corresponde a una actividad de TAFI de 223 nmol/L o de 13,4 µg/mL¹⁸. En el presente trabajo, la actividad de TAFIa, usando la técnica CLAR, siguiendo las modificaciones reportadas por D'Errico *et al.*, en el plasma de los pacientes con hemofilia B, a nivel basal se

encontró significativamente disminuida ($p < 0,05$) en comparación a los controles ($888,89 \pm 90,53$ U/L), siendo en los pacientes leves de $652,58 \pm 45,82$ U/L y en moderados de $620,10 \pm 94,96$ U/L.

En una investigación previa, donde evaluaron la actividad de TAFIa en 32 pacientes con hemofilia A (12 severos, 8 moderados y 12 leves) ($10,72 \pm 4,57$ mg/L) y en 4 pacientes con hemofilia B (1 severo y 3 leves) ($8,00 \pm 2,35$ mg/L), también encontraron niveles significativamente disminuidos en relación a los controles ($17,85 \pm 4,61$ mg/L), sin diferencias significativas entre los distintos grados de severidad. En este trabajo adicionalmente se determinaron los niveles antigénicos de TAFI a través de la técnica de ELISA, encontrando niveles muy similares entre pacientes y controles²⁰.

En otro estudio Antovic *et al.*, en 17 pacientes con hemofilia A y 13 controles determinaron los niveles de antígeno total y la actividad de TAFIa. En relación al control, la actividad de TAFIa la encontraron significativamente disminuida en los pacientes, sin diferencias significativas en el nivel antigénico total entre controles y pacientes²¹. Por su parte, en una investigación realizado por Foley *et al.*, en 28 pacientes con hemofilia A y 5 controles, determinaron la actividad de TAFI y la generación de trombina a través del complejo trombina-antitrombina (TAT), donde encontraron una correlación positiva entre el TAFI, el grado de severidad y los niveles de TAT⁴.

Un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo, con 28 pacientes con hemofilia A severa y niveles de actividad de FVIII menores a 1 UI/dL (18 que no presentaban inhibidores anti-FVIII y 10 que presentaban entre 0,75 y 72 Unidades Bethesda/mL de inhibidores anti-FVIII), se determinó la actividad de TAFIa a nivel basal y post-tratamiento, utilizando el ensayo colorimétrico y la técnica de CLAR empleada en el presente trabajo. Los resultados mostraron a nivel basal, en todos los pacientes (sin inhibidores $9,42 \pm 2,19 \mu\text{g/mL}$ y con inhibidores $9,98 \pm 2,03 \mu\text{g/mL}$), una disminución significativa ($p < 0,01$) en la actividad en comparación a los controles ($14,98 \pm 2,05 \mu\text{g/mL}$)⁸. Adicionalmente, en este mismo grupo de pacientes se determinó la generación de trombina, encontrando una correlación positiva con la actividad de TAFIa, lo que llevó a sugerir que, en el seguimiento de pacientes con hemofilia, para evaluar el fenotipo de la enfermedad, ambos parámetros, el TAFI y la generación de trombina, deben ser usados⁸.

En el presente estudio se encontró una correlación positiva entre los niveles basales de la

actividad de TAFIa y de FIX, en ambos grupos de pacientes; leves ($r=0,845$, $p<0,01$) y moderados ($r=0,851$, $p<0,01$). Estos resultados sugieren que en los pacientes con deficiencia de FIX, debe estar disminuida la activación de TAFI debido al déficit en la generación de trombina asociada a esta patología.

Durante la revisión bibliográfica y antecedentes referidos a esta investigación no se pudo encontrar estudios realizados en nuestro país que aporten datos sobre la actividad de una proteína antifibrinolítica como es el TAFI, en pacientes con hemofilia B, donde hay una falla en la generación de trombina, hallazgo que puede orientar a un mejor pronóstico de la evolución de la enfermedad y ajuste de tratamientos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Msc Zoila Carvajal y Amparo Gil (IVIC), así como al personal médico y técnico del Banco de Sangre del Hospital Central de Maracay, por la asistencia y apoyo para realizar este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Butenas S, Brummel K, Branda R, Paradis S, Mann K. Mechanism of factor VIIa- dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood* 2002; 99: 923-930.
- 2) Blumenfeld de Bosch N, Ruiz de Sáez A. Hemofilias. En: Pérez J, Eds. *Hematología*. Caracas: Disinlimed; 1999. p 963-992.
- 3) Broze G, Higuchi D. Coagulation dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma. *Blood* 1996; 88: 3815-3823.
- 4) Foley J, Nesheim M, Rivard G, Brummel-Ziedins K. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation and bleeding in haemophilia A. *Haemophilia* 2012; 18:316-322.
- 5) Incampo F, Carrieri C, Galasso R, Scaraggi FA, Di Serio F, Woodhams B, et al. Effect of warfarin treatment on thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) activation and TAFI-mediated inhibition of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 315-324.
- 6) Plug T, Meijers JCM. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 633-644.
- 7) D'Errico M. Estudio del inhibidor de la fibrinolisis activado por trombina (TAFIa) en pacientes con hemofilia A y el efecto de diferentes tratamientos antihemofílicos sobre el TAFIa y la fibrinólisis. (Tesis Doctoral). San Antonio de los Altos: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas; 2011.
- 8) D'Errico M, Bosch N, Ruiz-Saez A, Boadas A, Ibarra C, Salazar A, et al. Estudio de la actividad del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), en plasma de pacientes con generación de trombina disminuida. *Invest Clin* 2019; 60: 128-140.
- 9) Austen D, Rhymes L. Factor IX assay (one stage method). En: Biggs R, Eds. *A laboratory manual of blood coagulation*. Oxford: Blackwell Scientific; 1975. p 59.
- 10) Schatteman K, Goosens F, Leurs J, Verkek R, Scharpe S, Michiels J, et al. Carboxipeptidase U at the interface between Coagulation and Fibrinolysis. *Clin Appl Thromb Haemost* 2001; 7: 93-101.
- 11) Hoover-Plow J. Does plasmin have anticoagulant activity? *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 199-205.
- 12) Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2013; 110: 761-768.

- 13) Kaufmann R. Factor VIII and Hemophilia A. En: Colman R, Eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2000. p 151-157.
- 14) Dolan G, Benson G, Duffy A, Hermans C, Jimenez-Yuste V, Lambert T, et al. Haemophilia B: Where are we now and what does the future hold?. Blood Rev 2018; 32: 52-60.
- 15) Hoffman M, Monroe D. A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost 2001; 85: 958-965.
- 16) Draxler D, Medcalf R. The fibrinolytic system-more than fibrinolysis?. Transfus Med Rev 2015; 29: 102-109.
- 17) Foley J, Kim P, Mutch N, Gils A. Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. J Thromb Haemost 2013; 11: 306-315.
- 18) Schatteman K, Goossens F, Scharpé S, Neels H, Hendriks D. Assay of procarboxypeptidase U, a novel determinant of the fibrinolytic cascade, in human plasma. Clin Chem 1999; 45: 807-813.
- 19) Willemse J, Hendriks D. Measurement of procarboxypeptidase U (TAFI) in human plasma: a laboratory challenge. Clin Chem 2006; 52: 30-36.
- 20) Antovic An S, Schulman S, Greenfield S, Blomback M. Does an enzyme other than thrombin contribute to unexpected changes in the levels of the different forms of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in patients with hemophilia A, hemophilia B and von Willebrand disease?. Scand J Clin Lab Invest 2004; 64: 745-752.
- 21) Antovic J, Schulman S, Eelde A, Blomback, M. Total thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen and pro-TAFI in patients with haemophilia A. Haemophilia 2001; 7: 557-560.