
Efecto de los anticuerpos antifosfolipídicos en la formación y degradación de la malla de fibrina en pacientes con aborto recurrente.

Rita Marchi¹, Imelda Maya¹ y Jenny Garmendia².

¹Centro de Medicina Experimental, Laboratorio Biología del Desarrollo de la Hemostasia, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas e

²Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: generación de trombina, polimerización, fibrinólisis, anticuerpos antifosfolipídicos, síndrome antifosfolipídico, aborto recurrente.

Resumen. En el presente trabajo se estudió el proceso de formación y disolución de la malla de fibrina y la generación de plasmina en un grupo de pacientes con aborto recurrente (AR) debido a la presencia de anticuerpos antifosfolipídicos (N= 10), mujeres con AR sin el síndrome antifosfolipídico (SAF) (N= 6) y se comparó con un grupo de mujeres sanas (N= 8). Del grupo de pacientes estudiadas con SAF, nueve fueron positivas para anticuerpos anticardiolipina (aCL), cinco para la anti- β_2 -glicoproteína I (anti- β_2 GPI), cuatro para ambos anticuerpos, una para anticuerpos antiprotrombina (aPT) y anticoagulante lúpico (AL). El proceso de formación de la fibrina y su disolución fue estudiado por turbidimetría y la generación de plasmina mediante sustrato cromogénico S2251. Las curvas de polimerización de la(s) paciente(s) con AR sin SAF y AL presentaron un incremento en la pendiente y turbidez final, comparado con las del grupo control de mujeres sanas. La velocidad de disolución del coágulo fue mayor en la paciente con AL (21 ± 0) 10^{-4} Δ DO/seg y en las AR sin SAF ($19,6 \pm 5,7$) 10^{-4} Δ DO/seg, comparado con el grupo control ($14,5 \pm 2,8$) 10^{-4} Δ DO/seg. La generación de plasmina estuvo incrementada solamente en las AR sin SAF ($85 \pm 24\%$) comparado con $52 \pm 3\%$ en el grupo control, $p= 0,005$. Los cambios observados en el proceso de polimerización y fibrinólisis de la(s) paciente(s) con AR sin SAF y AL pudieran estar relacionados con el incremento en los niveles de fibrinógeno, mientras que los de la generación de plasmina con la entidad mórbida.

Effect of antiphospholipid antibodies on the formation and lysis of fibrin network in patients with recurrent miscarriage.
Invest Clin 2011; 52(1): 35 - 47

Key words: thrombin generation, polymerization, fibrinolysis, antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome, recurrent miscarriage.

Abstract. The present work was intended to study the process of fibrin formation and lysis and plasmin generation in a group of patients with recurrent miscarriage (RM), due to the presence of antiphospholipid antibodies (N= 10); as well as in women with RM without the antiphospholipid syndrome (APS) (N= 6), compared with those of a group of healthy women (N= 8). In the group of patients with APS, nine were positive for antibodies against cardiolipin (aCL), five for anti- β_2 -glycoprotein I (anti- β_2 GPI), four for both antibodies, and one for antibodies against prothrombin (aPT) and lupus anticoagulant (LA). Fibrin formation and lysis was followed by turbidity and plasmin generation using chromogenic substrate S2251. The polymerization curves from RM patients without APS and the LA patient showed an increased slope and maximum turbidity compared to those of the control group. The speed of lysis was higher in the LA patient (21 ± 0) 10^{-4} Δ OD/seg and the RM patients without APS (19.6 ± 5.7) 10^{-4} Δ DO/seg, compared to that of the control group (14.5 ± 2.8) 10^{-4} Δ DO/seg. Plasmin generation increased only in RM patients without APS ($85 \pm 24\%$) against the control group ($52 \pm 3\%$), $p=0.005$. The changes observed in the fibrin polymerization and lysis process of women with RM without APS and LA seem to be related to their higher fibrinogen levels, while the increased plasmin generation was related to the patients' morbidity.

Recibido: 23-06-2010. Aceptado: 02-12-2010.

INTRODUCCIÓN

El síndrome antifosfolipídico (SAF) se define como la asociación entre la presencia persistente de anticuerpos circulantes contra los fosfolípidos en plasma (aFL) y una clínica caracterizada por episodios trombóticos y/o morbilidad obstétrica, incluyendo pérdida fetal (1). El término "síndrome antifosfolipídico" se presta a confusión, ya que los anticuerpos de interés en el SAF no están dirigidos a fosfolípidos aniónicos sino a proteínas plasmáticas con afinidad a estos (2, 3). Se han descrito dos formas del síndrome, el "primario" donde no

está presente otra enfermedad basal (4) y el "secundario", principalmente acompañando a enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (5).

Según el método de detección, los anticuerpos presentes en el SAF se pueden clasificar en dos grandes categorías: aquellos que prolongan las pruebas de coagulación, dependiente de fosfolípidos, se denominan anticoagulantes tipo lúpico (AL) y aquellos que son cuantificados por pruebas de inmunoensayos tales como anticardiolipina (aCL), anti- β_2 GPI, antiprotrombina (aPT), entre otros (6-8). Las inmunoglobulinas (generalmente tipo IgM) asociadas a

infecciones, no se relacionan con procesos tromboticos (9). El mecanismo de acción de los AL es a través de una subpoblación de anticuerpos dirigidos contra la β_2 -glicoproteína I y/o protrombina (10, 11).

La relación entre la clínica en el SAF (trombosis/aborto recurrente) y la presencia de anticuerpos aFL no está claramente establecida. No existe un mecanismo único de acción de los anticuerpos aFL. Ha sido descrito que los anticuerpos aFL pueden inhibir la proteína C activa (12, 13), se pueden unir a las plaquetas y promover su activación (14), interaccionar con las células del endotelio vascular e inducir la expresión de moléculas de adhesión lo cual lleva a la unión de monocitos al endotelio y a la expresión del factor tisular (15-17). También ha sido reportado que los anticuerpos aFL pueden inhibir a la antitrombina III (18). Además, estos anticuerpos son capaces de activar la vía del complemento, generando productos de degradación que conllevan a inflamación y trombosis (19). Más recientemente se ha encontrado que estos anticuerpos se unen a diversas proteasas que intervienen en la hemostasia y fibrinólisis, impidiendo la inactivación de factores procoagulantes y la disolución del coágulo (17).

En el presente trabajo se estudió la formación de la malla de fibrina (coágulo) y su disolución por turbidimetría, en un grupo de pacientes con aborto recurrente con SAF. También se estudió la activación plasmática del plasminógeno por la acción de la estreptoquinasa. Este grupo de pacientes fueron comparadas con un grupo de mujeres con AR de causa no conocida y con un grupo control conformado por mujeres sanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. La trombina bovina fue adquirida a Sigma Chemical Company (St.

Louis, USA). Los estuches para la determinación de anticuerpos aFL tipo IgG e IgM anticardiolipina (aCL-HS) y anti- β_2 -glicoproteína I (anti- β_2 GPI), antiprotrombina (aPT) y antianexina V tipo IgG, el activador tipo tisular del plasminógeno recombinante (r-tPA), plasminógeno, estreptoquinasa y el plasma comercial con actividad de anticoagulante lúpico (L-Atrol) fueron adquiridos en American Diagnostica (Greenwich, CT, USA). El estuche para la detección de anticoagulante lúpico, el reactivo de prueba (LA1) y el reactivo de confirmación (LA2) fueron adquiridos en Siemens Healthcare Diagnostics Products (Marburg, Germany). El sustrato cromogénico S2251 fue adquirido a Chromogenix (Milan, Italia). El estuche Technothrombin TGA para los estudios de la generación de trombina fue adquirido en los laboratorios Technoclone (Viena, Austria).

Selección de los grupos a estudiar

Se seleccionó un grupo de mujeres en edad reproductiva, no embarazadas, no hospitalizadas, con criterios clínicos obstétricos de síndrome antifosfolipídico, de acuerdo a los lineamientos de la última revisión de Sapporo 2006 (1). Este grupo se caracterizó por presentar simultáneamente clínica de aborto recurrente (≥ 2 abortos menores de 10 semanas) ó una o más pérdidas fetales ≥ 10 semanas de gestación y presencia de anticuerpos antifosfolipídicos (aFL) positivos, anticardiolipinas (aCL), anti- β_2 -glicoproteína I (anti- β_2 -GPI) y/o anticoagulante lúpico. Las pacientes solo tenían criterios obstétricos de SAF, como abortos recurrentes o pérdidas fetales luego de las 10 semanas de gestación. Sólo una paciente presentó adicionalmente una trombosis venosa profunda un año antes de este estudio, en miembro inferior, más dos abortos del primer trimestre. Esta paciente recibió tres meses de anticoagulación con warfarina, la cual ya había suspendido cuando fue incluida en este estudio. Para el momento de la

toma de las muestras, ya habían transcurrido más de tres meses desde el último aborto en todos los casos estudiados. Las pacientes tenían normales la ecsonografía pélvica, la histersalpingografía, los niveles hormonales (prolactina, TSH, T4L, LH, FSH, estradiol en fase folicular y progesterona en fase luteal) y su cariotipo y el de su pareja. Algunas de las pacientes estaban en tratamiento profiláctico con ácido acetil-salicílico a dosis de 81 ó 100 mg al día (cuatro de dieciséis). Se excluyeron aquellas pacientes en tratamiento con inmunosupresores u otros medicamentos que pudieran afectar los resultados de las pruebas a realizar. También se excluyeron pacientes con clínica de enfermedades autoinmunes a excepción del SAF, como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, etc. Igualmente fueron excluidas pacientes con síndrome nefrótico, enfermedades infecciosas, neoplásicas o que recibieran anticonceptivos orales. Se seleccionó también a un grupo de mujeres no embarazadas en edad reproductiva, con antecedente de aborto recurrente sin causas conocidas (hacia tres meses o más) sin criterios de SAF, ni de alteraciones endocrinas o cromosómicas (perfiles semejantes a las pacientes con SAF). Para este grupo de mujeres se emplearon los mismos criterios de exclusión del grupo de mujeres con SAF. El grupo control consistió en mujeres sanas, no embarazadas, en edad fértil, la mayoría con hijos, sin historia de abortos y sin criterios de SAF y con anticuerpos aCL y anti- β_2 -GPI negativos, con los mismos criterios de exclusión de las pacientes con AR. Al grupo control no se les descartó la presencia de AL. A tres de ocho mujeres del grupo control se les suministró una aspirina de 100 mg diaria durante 15 días, para establecer el posible efecto de la aspirina sobre algunos de los ensayos realizados. Las muestras de sangre de las pacientes fueron tomadas en la Unidad de Reproducción Hu-

mana Fertilab de la Clínica el Ávila, en el Instituto de Inmunología de la Universidad Central y en el Centro Médico Docente la Trinidad de Caracas. Las muestras de los controles sanos fueron tomadas del personal que labora en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). La distribución de los grupos étnico entre pacientes y de controles estudiados fue similar (87,5% mestizas y 12,5% blancas). Todos los individuos que participaron en el presente proyecto firmaron el consentimiento informado, el cual fue aprobado por la Comisión de Bioética del IVIC.

Los anticuerpos aCL y anti- β_2 -GPI fueron determinados por pruebas de ELISA (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA). Las muestras se consideraron positivas para aCL cuando los valores eran mayores a 15 GPL (tipo IgG) y 27 MPL (tipo IgM), en al menos dos determinaciones separadas por 12 semanas. Las muestras positivas para los anticuerpos anti- β_2 -GPI debían tener valores mayores a 25 GPL y 9 MPL.

También se determinó la presencia del anticoagulante lúpico (AL) mediante la prueba del tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (VRd) con el reactivo de prueba (LA1) y el reactivo de confirmación (LA2) (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg, Germany). Si había prolongación con el reactivo LA1 se realizaba la prueba confirmatoria con el LA2 (este reactivo posee una alta concentración de fosfolípidos); si el tiempo de VRd corregía con el LA2, entonces se consideraba un AL positivo. Se realizó el tiempo de trombo-plastina activada (TTPa) del plasma de las pacientes, con y sin mezcla (a partes iguales), con un plasma control normal, para descartar deficiencias de los factores II, V o X de la coagulación (cuando el TTPa estaba prolongado), según las recomendaciones del Subcomité para Anticoagulante Lúpico/Anticuerpos Antifosfolípidos de la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombo-

sis (20), en donde el diagnóstico de AL debe ser efectuado mediante dos ensayos de coagulación independientes. El AL debía estar positivo al menos en dos ocasiones con doce o más semanas de separación.

Adicionalmente, se determinó la presencia de anticuerpos tipo IgG anti-protrombina (aPT) y anti-anexina V, empleando pruebas de ELISA, siguiendo las instrucciones del estuche comercial (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA). Las muestras eran positivas con valores ≥ 20 unidades de absorbancia (UA)/mL. También, se les realizó la detección de anticuerpos aFL tipo IgG, en una sola oportunidad, a las mujeres sanas (grupo control).

Toma de la muestra de sangre

Se tomó la muestra de sangre en ayunas por punción venosa limpia, descartando los primeros 3 mL. A la sangre extraída se le agregó citrato trisódico al 3,8% como anticoagulante, en una relación 1:9. Se obtuvo plasma pobre en plaquetas al centrifugar la sangre durante 20 min a 3000 rpm a 4°C. Seguidamente, el plasma fue guardado en alícuotas de 400 μ L, en tubos eppendorf y se congeló de inmediato a -80°C . Se determinó la concentración de fibrinógeno por el método gravimétrico, según la técnica descrita por Ingram (21).

Generación de trombina

La generación de trombina se realizó mediante el uso del estuche de Technothrombin TGA, Technoclone (Viena, Austria). Se registró la cinética de generación de trombina durante 1 h, excitando el fluoróforo a una longitud de onda de 360 nm y registrando su emisión a 460 nm en un lector de ELISA, Tecan Infinite M200 (Viena, Austria). Cada muestra fue ensayada por duplicado. Los parámetros de la cinética de generación de trombina, fase de latencia y altura máxima de la curva de generación de trombina, fueron calculados a partir de un

programa suministrado por la casa fabricante del estuche.

Polimerización de la fibrina y fibrinólisis a partir de plasma

El proceso de formación y disolución del coágulo se efectuó según la técnica descrita por Marchi y col. (22). Se registraron los cambios de densidad óptica (DO) durante 15 min en un espectrofotómetro Genesys 6 (ThermoSpectronic, Rochester, USA). Cada muestra fue realizada por triplicado, en tres oportunidades distintas. Se efectuaron las gráficas de las curvas y se calculó la fase de latencia (seg), la pendiente (variación de la DO en función del tiempo en seg, en el segmento entre el periodo de latencia y la parte ascendente de la curva) y la turbidez máxima (máximo valor de la DO alcanzada).

En el proceso de disolución de la malla de fibrina se midió el tiempo (en seg) que tarda el coágulo en disolverse en un 50% (T50) y la velocidad de lisis del coágulo, en unidades de variación de DO/seg. El T50 fue calculado según Lisman y col. (23). La velocidad de degradación del coágulo se calculó en la parte descendente de las curvas de fibrinólisis cómo la disminución de la DO en función del tiempo, tomando el valor absoluto de la velocidad de degradación. Cada muestra fue estudiada por triplicado, repitiéndose en tres oportunidades distintas.

Activación del plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa

Se realizó según la técnica descrita por Soria y col. (24). Se diluyó el plasma con Tris 50 mM, NaCl 12 mM, pH 7,4 a aproximadamente el 50% de concentración de plasminógeno (Pg) en plasma (200 mg/L) y se llevó a 37°C ; todos los pasos subsiguientes fueron realizados a esta temperatura. Se agregó estreptoquinasa a una concentración final de 1000 unidades/mL y se dejó incubando durante 10 min; luego se añadió

el sustrato cromogénico S2251 (0,6 mM, concentración final) durante 3 min. Se leyeron las DO a diferentes tiempos de incubación con el sustrato S2251: 5, 10, y 15 min y se calculó el promedio. Paralelamente se realizó una curva de calibración con diluciones de plasma equivalentes a 25, 50, 75, 100, 125 y 150% de Pg. Las lecturas de DO de las muestras fueron interpoladas de la curva de calibración. Se asumió que la cantidad de plasmina formada era equivalente a la concentración de plasminógeno en el plasma. Se repitieron por duplicado las determinaciones en cada muestra, en tres oportunidades distintas.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para obtener los valores promedio y de desviación estándar. Las diferencias entre los valores obtenidos en los diferentes ensayos realizados fueron analizadas mediante la aplicación de estadística no paramétrica, la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon para dos muestras independientes, se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Características de la población estudiada

En la Tabla I se resumen los aspectos más importantes de la población estudiada.

La edad promedio del grupo control fue menor a la de mujeres con aborto recurrente, tanto con SAF como sin SAF ($p = 0,015$ y $0,014$, respectivamente); también el índice de masa corporal (IMC) del grupo control fue menor comparado con el grupo de AR con SAF y sin SAF ($p = 0,012$ y $0,017$, respectivamente). La concentración de fibrinógeno del grupo control no presentó diferencias estadísticamente significativas comparadas con la de las pacientes. Se realizó un análisis de regresión entre las variables IMC, fibrinógeno y edad, el cual no arrojó relación entre las variables mencionadas, por lo que los resultados no fueron normalizados en función del IMC y edad. El número de abortos de las pacientes con SAF fue estadísticamente similar al del grupo de AR sin SAF. De las pacientes estudiadas, solamente una fue positiva para aCL, anti- β_2 GPI y antiprotrombina, siendo los títulos 455 GPL, 289 GPL y 20 UA/mL, respectivamente, y para AL, además de ser la única con antecedente de trombosis venosa profunda en miembro inferior.

A todos los controles se les realizó la determinación de anticuerpos tipo IgG contra cardiolipina, β_2 -GPI, protrombina y anexina V. Solamente un control arrojó 25 GPL para anti- β_2 GPI y fue excluido del estudio, quedando este grupo conformado por 8 mujeres.

De las 10 pacientes estudiadas con SAF, 9 fueron positivas para aCL, 5 para

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

	Controles	AR-SAF	AR sin SAF
Mujeres (N)	8	10	6
Edad (años)	27 ± 8	38 ± 7*	36 ± 5*
Fg (g/L)	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,6	3,2 ± 0,8
IMC	22 ± 2	24 ± 4*	27 ± 4*
Número de abortos	0	3 ± 1	3 ± 1

* Estadísticamente significativo para $p < 0,05$ con respecto al grupo control. IMC: índice de masa corporal. AR-SAF: abortadoras recurrentes con síndrome antifosfolipídico. L-Atrol: plasma comercial con AL. AR sin SAF: abortadoras recurrentes sin síndrome antifosfolipídico.

anti- β_2 GPI y 4 para ambos tipo de anticuerpos. El 70% de las pacientes presentó aCL tipo IgM y el 50% tipo IgG. Una frecuencia menor se encontró para los anticuerpos anti- β_2 GPI: 30% tipo IgM y 20% tipo IgG. Todas las pacientes fueron negativas para antianexina V tipo IgG. El título promedio de los anticuerpos aCL fue de 195 ± 183 GPL y 37 ± 6 MPL y 196 ± 132 GPL y 92 ± 65 MPL para los anti- β_2 GPI.

Generación de trombina

Esta prueba fue realizada en el plasma a 5 de las pacientes con SAF sin AL y en el plasma comercial con anticoagulante lúpico (L-Atrol). Los valores fueron comparados con los de dos plasmas controles incluidos en el estuche como control 1 y control 2. El control 1 era plasma humano normal y el control 2 plasma humano con generación de trombina aumentada. La altura máxima de la curva de generación de trombina fue de 241 nM para el control 1 y 358 nM para el control 2; asimismo el tiempo de latencia fue de 14,5 y 6,5 min, respectivamente. En tres de las pacientes con SAF sin AL la altura máxima de trombina fue de 444 ± 88 nM, mientras que la de las otras dos pacientes fueron consideradas normales, 294 ± 15 nM. El tiempo de latencia estuvo acertado en todas las pacientes, el cual fue de 8 ± 2 min.

Polimerización de la fibrina y fibrinólisis en plasma

Debido a que los resultados obtenidos en los estudios de polimerización y fibrinólisis en los 3 controles y en las 4 pacientes que tomaban aspirina fueron similares a los de los 5 controles y 5 pacientes con SAF sin AL que no tomaban aspirina, respectivamente, los valores obtenidos con y sin aspirina fueron promediados.

El valor de la pendiente del proceso de polimerización de las AR sin SAF fue mayor con respecto a la del grupo control ($p=$

0,017), mientras que la pendiente de las AR con SAF sin AL fue estadísticamente similar a la del grupo control. El análisis estadístico del valor de la turbidez final también fue consistente a lo observado con la pendiente, los valores de la turbidez final del grupo de las AR sin SAF fueron mayores con respecto al grupo control ($p= 0,035$) y la turbidez final del grupo de AR con SAF sin AL similar a la del grupo control. El tiempo de latencia de las curvas de polimerización de las pacientes con AR fue similar a la del grupo control. El comportamiento de la cinética de polimerización de la única paciente con AL fue bastante similar a las AR sin SAF y al L-Atrol. La diferencia observada en el valor de la pendiente de la paciente con AL y el L-Atrol puede deberse al hecho de que la presentación del L-Atrol es plasma liofilizado y pierda algo de funcionalidad al resuspenderlo, ya que la concentración de fibrinógeno en ambas muestras fue elevada, 3,4 mg/mL en la paciente y 4,3 mg/mL en el L-Atrol. En la Fig. 1 se muestran las curvas de polimerización de los diferentes grupos estudiados, pudiendo observarse que el proceso de polimerización de la fibrina de las AR con SAF sin AL fue bastante semejante a la del grupo control, mientras que la turbidez final de las AR sin SAF, AL y L-Atrol fueron mucho mayores en comparación a las de los grupos antes mencionados. En la Tabla II se resumen los parámetros cuantificados del proceso de polimerización de la fibrina.

En los estudios efectuados sobre la disolución del coágulo se observó que el T50 fue mucho más variable con respecto a la velocidad de disolución del coágulo, lo cual explicaría el hecho de que no se encontraran diferencias en este parámetro entre los grupos de pacientes y los controles, mientras que la velocidad de disolución del coágulo estuvo aumentada en las AR sin SAF con respecto al grupo control ($p= 0,014$) (Tabla III). De manera similar, la paciente

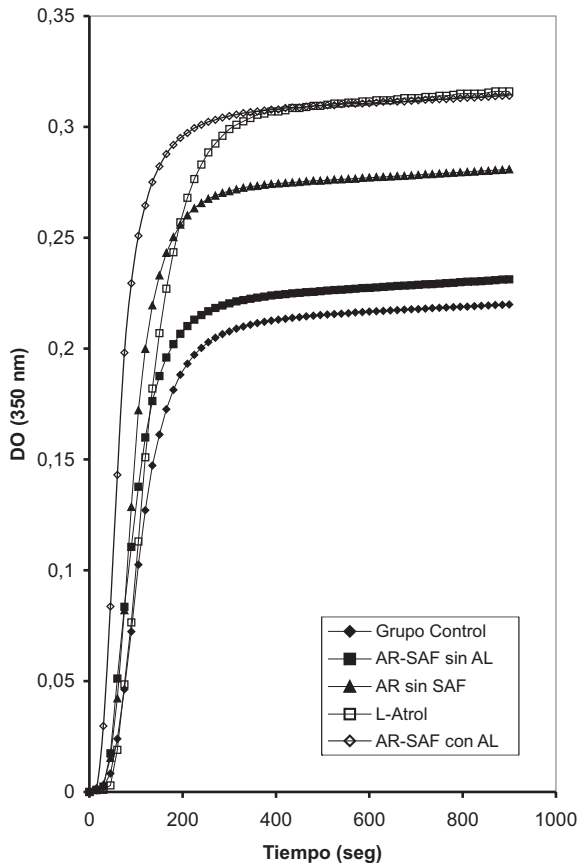


Fig. 1. Curvas de polimerización de la fibrina en plasma luego de añadir una solución de trombina bovina- CaCl_2 (0,6 unidades y 20 mM, respectivamente, concentraciones finales). El tiempo de formación de la malla de fibrina fue registrado durante 15 min. Cada curva representa el promedio de los valores obtenidos para las diferentes mujeres en cada grupo, las cuales fueron realizadas por triplicado en tres oportunidades distintas.

con AL mostró una velocidad de disolución del coágulo aumentada, comparable a la del L-Atrol y a la de las pacientes con AR sin SAF.

En las curvas de fibrinólisis (Fig. 2) se puede apreciar que el tiempo necesario para la completa disolución de la malla de fibrina fue: controles > AR-SAF sin AL > AR sin SAF > L-Atrol = SAF-AL.

Generación de plasmina

Los valores obtenidos en esta prueba se resumen en la Tabla III. De manera similar a los resultados de polimerización de la fibrina y fibrinólisis, los valores obtenidos en los individuos que tomaban aspirina no fueron diferentes a los que no la tomaban, por lo cual se promediaron los valores obtenidos en la generación de plasmina con y sin aspirina de cada grupo. La cantidad de plasmina formada fue mayor en el grupo de pacientes con AR sin SAF ($p = 0,005$), mientras que el comportamiento del grupo AR con SAF fue similar al del control. La paciente con AL presentó una generación de plasmina normal, mientras que la del L-Atrol fue similar a las AR sin SAF.

DISCUSIÓN

El SAF ocasiona trombosis en venas, arterias y en pequeños vasos; pérdida fetal y partos prematuros en pacientes con preeclampsia severa o insuficiencia de la placenta (25). En el presente estudio se incluyó a un grupo de mujeres con SAF, cuya clínica se caracterizó por abortos a repetición (≥ 2), sin preeclampsia o insuficiencia de la placenta, y se comparó con un grupo de pacientes con abortos a repetición (≥ 2), pero negativas para el SAF y con un grupo de mujeres sanas.

Del grupo de pacientes con SAF, solamente una presentó trombosis en miembros inferiores, la cual fue también la que presentó los títulos más altos de anticuerpos contra la cardiolipina y $\beta_2\text{GPI}$ y la única con anticuerpos contra la protrombina, aunque bajos, y con AL. Diversos estudios han demostrado que la triple positividad de anticuerpos aFL confiere un mayor riesgo para el desarrollo de eventos trombóticos (26, 27) y que de los anticuerpos antifosfolípidicos, el AL es el predictor más fuerte de las características relacionadas con el SAF (25).

TABLA II
RESUMEN DE LOS PARÁMETROS CUANTIFICADOS DEL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN DE LA FIBRINA

	Control (N= 8)	AR-SAF		L-Atrol	AR sin SAF (N=6)
		Sin AL (N= 9)	con AL (N= 1)		
Fase de Latencia (seg)	23 ± 7	24 ± 6	15 ± 0	52 ± 32	23 ± 8
Pendiente × 10 ⁻⁴ (ΔDO/seg)	37,1 ± 5,5	38,9 ± 7,8	55,6 ± 5,0	30 ± 0	48,3 ± 9,8*
Turbidez final (DO)	0,226 ± 0,031	0,231 ± 0,054	0,314 ± 0,016	0,340 ± 0,007	0,285 ± 0,008*

Los resultados son expresados como media aritmética ± desviación estándar. El número de individuos incluidos en cada grupo (n) se muestra entre paréntesis. * Estadísticamente significativo para p < 0,05 con respecto al grupo control. AR-SAF: abortadoras recurrentes con síndrome antifosfolipídico. AL: anticoagulante lúpico. L-Atrol: plasma comercial con AL. AR sin SAF: abortadoras recurrentes sin síndrome antifosfolipídico.

TABLA III
RESUMEN DEL PROCESO DE FIBRINÓLISIS Y GENERACIÓN DE PLASMINA

	Control (N= 8)	AR-SAF		L-Atrol	AR sin SAF (N=6)
		Sin AL (N= 9)	con AL (N= 1)		
T50 (seg)	326 ± 56	326 ± 37	303 ± 4,0	285 ± 21	317 ± 27
[V] × 10 ⁻⁴ (ΔDO/seg)	14,5 ± 2,8	15,5 ± 5,2	21 ± 0	19,0 ± 1,4	19,6 ± 5,7*
Pg%	52 ± 3,0	54 ± 10	49 ± 5,0	77 ± 4,0	85 ± 24*

Los resultados son expresados como media aritmética ± desviación estándar. El número de individuos incluidos en cada grupo (N) se muestra entre paréntesis.

En general, se ha encontrado que los niveles de fibrinógeno aumentan con la edad y se correlacionan positivamente con el IMC (28, 29), en el presente trabajo no se encontraron dichas asociaciones, tal vez debido al tamaño de los grupos, aunque en un trabajo publicado recientemente los autores no encontraron relación entre los niveles de fibrinógeno y la edad (30).

La presencia persistente de anticuerpos aFL en los pacientes con SAF se considera como una de las causas más comunes de trombofilia adquirida (1). Diversos estudios han encontrado una alta incidencia en el aumento en la generación de trombina en estos pacientes (31, 32), lo cual fue co-

roborado por nuestros estudios, en donde el 60% de las pacientes con SAF a las cuales se les realizó el ensayo, presentaron una generación de trombina aumentada. Algunos autores atribuyen este hecho a la presencia de anticuerpos contra el inhibidor de la vía del factor tisular (31), aspecto no explorado en el presente trabajo pero que sería interesante realizar a futuro.

El estudio del proceso de polimerización de la fibrina por espectrofotometría suministra información indirecta sobre la estructuración del coágulo y el grosor de las fibras que lo componen. El proceso de polimerización de la fibrina fue normal en las AR con SAF, por el contrario, en las AR

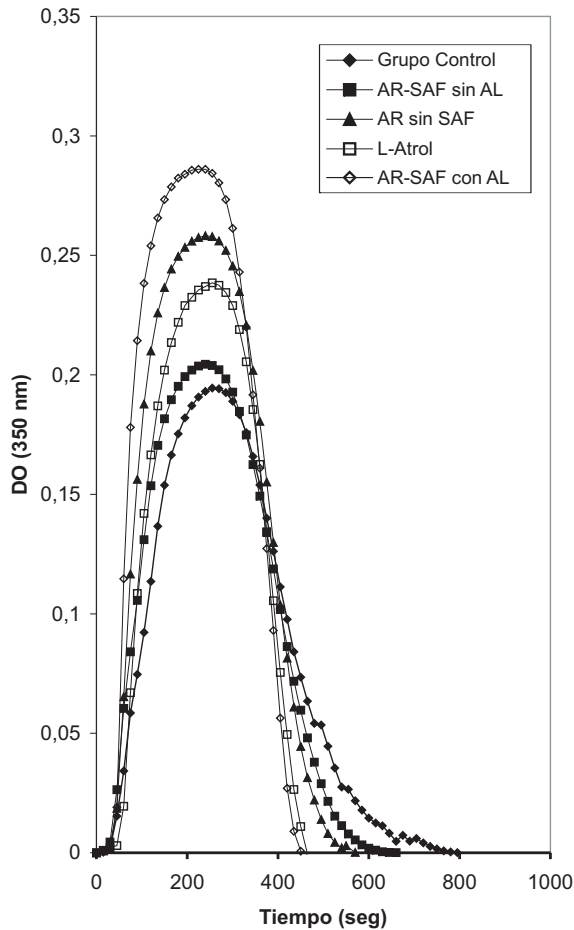


Fig. 2. Disolución de la malla de fibrina en plasma. El plasma fue incubado durante 1 min con $0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$ de tPA (concentración final) y luego coagulando con una solución de trombina bovina- CaCl_2 (0,6 unidades y 20 mM, respectivamente, concentraciones finales). El proceso de disolución de la malla de fibrina se registró hasta que la densidad óptica alcanzara un valor de cero.

sin SAF la velocidad de polimerización y la turbidez final estuvieron aumentadas. Esta diferencia puede atribuirse a que este grupo presentó los valores más altos de fibrinógeno, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de fibrinógeno entre los grupos estudiados, su efecto fue observado en el proceso de polimerización, ya que esta prueba es muy sensible a la concentración

de este. Cabe destacar que en un estudio anterior efectuado por Marchi y col. (22) en 20 mujeres con AR sin SAF, no se encontraron diferencias en el proceso de polimerización con respecto al grupo control. Estas discrepancias pueden atribuirse a la diferencia en la concentración de fibrinógeno de las pacientes reclutadas para ambos estudios.

En el trabajo de De Pablo y col. (33) se estudió el proceso de polimerización de la fibrina en plasma en un grupo de 16 pacientes con SAF primario, 13 con lupus eritematoso sistémico (LES) y 10 pacientes con SAF y LES, y se encontró que solamente en este último grupo la velocidad de polimerización estuvo incrementada significativamente, donde los valores de fibrinógeno fueron más altos en los pacientes que cursaron con SAF más LES.

Se han realizado diversos estudios para evaluar el efecto de los anticuerpos aFL sobre el proceso fibrinolítico. Cuando se empleó la técnica de oclusión venosa, diversos autores no encontraron una asociación entre el potencial fibrinolítico y la presencia de anticuerpos aFL (34, 35). Mientras que otros autores empleando la técnica de fibrinólisis interna, ya sea añadiendo tPA o plasmina al plasma (en el presente estudio se indujo la fibrinólisis interna añadiendo tPA), encuentran un retardo en la disolución de la malla de fibrina en un grupo de pacientes con SAF (36). En ninguno de los pacientes del presente estudio con SAF se encontró un retardo en la velocidad de degradación del coágulo, mientras que en los pacientes con AR pero sin SAF la velocidad de disolución de la malla de fibrina estuvo acortada significativamente, lo cual corroboró resultados anteriormente obtenidos (22).

La diferencia encontrada en el presente estudio y el de Kolev y col. (36), pudiera deberse a que los pacientes estudiados por este grupo tuvieran anticuerpos contra el

tPA o plasmina. Se han reportado en la literatura diversos trabajos en donde una subpoblación de aFL está dirigida contra componentes del sistema fibrinolítico, como tPA y plasmina (37-39). En el trabajo de Koley y col. (36) no se mencionó la determinación de la presencia de anticuerpos contra componentes del sistema fibrinolítico.

Otro aspecto del sistema fibrinolítico evaluado en el presente trabajo fue la activación del plasminógeno por la estreptoquinasa. La estreptoquinasa es una proteína de origen bacteriano, secretada por cepas hemolíticas de *Streptococci*, que activa el plasminógeno sin requerir de la fibrina como cofactor, mediante un mecanismo no enzimático (40).

Sorpresivamente se encontró que la cantidad de plasmina fue significativamente mayor en las pacientes con AR sin SAF, mientras que en las pacientes con SAF fue similar al control, lo cual fue consistente con el acortamiento del tiempo de disolución del coágulo (T50) de estas pacientes. Hasta el presente no hay una explicación a este hallazgo y se necesitan mayores estudios para dilucidar el mecanismo por el cual se acelera la conversión del plasminógeno a plasmina en estas pacientes con AR sin SAF.

En conclusión, en el grupo de pacientes estudiados con SAF, el proceso de polimerización y disolución de la fibrina aparentemente no se ve afectado por la presencia de los anticuerpos aCL y anti- β_2 GPI. Mientras que, por mecanismos que se desconocen, en el grupo de pacientes con AR, negativas para los anticuerpos aFL estudiados, se encontró aumentada la formación de la enzima responsable de la disolución de la malla de fibrina.

AGRADECIMIENTOS

A todas las pacientes de este estudio, que con su colaboración han hecho posible

la realización del presente trabajo. A la Lic. Daniela Kanzler por su asistencia técnica en la realización de los ELISAs para la determinación de los anticuerpos aFL.

REFERENCIAS

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.
3. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335:1544-1547.
4. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, Outt HH, Harris EN, Vilardell-Torres M, Hughes GR. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68:366-374.
5. Alarcón-Segovia D, Delezé M, Oria CV, Sánchez-Guerrero J, Gómez-Pacheco L, Cabiedes J, Fernández L, Ponce de León S. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68:353-365.
6. Wong RC, Favaloro EJ. A consensus approach to the formulation of guidelines for laboratory testing and reporting of antiphospholipid antibody assays. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34:361-372.

7. **Galli M.** Clinical utility of laboratory tests used to identify antiphospholipid antibodies and to diagnose the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34:329-334.
8. **Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T.** Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34:335-339.
9. **Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA.** A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992; 1:75-81.
10. **Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF.** Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipid only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66:629-632.
11. **Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM.** Anticoagulant activity of β_2 -glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992; 68:297-300.
12. **Malia RG, Kitchen S, Greaves M, Preston FE.** Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990; 76:101-107.
13. **Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K, Koike T.** β_2 -glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum* 1999; 42:167-174.
14. **Chambell AL, Pierangeli SS, Wellhausen S, Harris EN.** Comparison of the effects of anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome and with syphilis on platelet activation and aggregation. *Thromb Haemost* 1995; 73:529-534.
15. **Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL.** Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; 96:2211-2219.
16. **Cuadrado MJ, López-Pedrerá C, Khamashta MA, Camps MT, Tinahones F, Torres A, Hughes GR, Velasco F.** Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression. *Arthritis Rheum* 1997; 40:834-841.
17. **Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, Palomo I, Harris EN, Meroni PL.** Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 34:236-250.
18. **Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS.** Inhibition of heparin/antithrombin III cofactor activity by anticardiolipin antibodies: a mechanism for thrombosis. *Thromb Res* 1993; 71:103-111.
19. **Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J.** Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2120-2124.
20. **Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I.** Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1185-1190.
21. **Ingram G.** The determination of plasma fibrinogen by clot weight. method. *Biochem J* 1952; 51:583-585.
22. **Marchi R, López RY, Nagaswami S, Masova L, Pulido A, Mora LJ, Muller A, Arocha-Piñango C, Weisel JW.** Hemostatic changes related to fibrin formation and fibrinolysis during the first trimester in normal pregnancy and recurrent miscarriage. *Thromb Haemost* 2007; 97:552-557.
23. **Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR.** Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2005; 105:1102-1105.
24. **Soria J, Soria C, Samama M.** Plasminogen determination using a chromogenic tripeptidic substrate. *Pathol Biol (Paris)* 1976; 24:725-729.
25. **Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA.** Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376:1498-1509.

26. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 93:1147-1152.
27. Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L, Bonaccorso S, Aversa L. A prospective study of antibodies to β_2 -glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1231-1238.
28. Fu A, Nair KS. Age effect on fibrinogen and albumin synthesis in humans. *Am J Physiol* 1998; 275:E1023-E1030.
29. Ramírez MM, Sánchez C, Pérez A, Millán E. Evaluación del efecto de la ingesta de una alta carga de ácidos grasos saturados sobre los niveles séricos de la proteína C reactiva, 1-antitripsina, fibrinógeno y 1-glicoproteína ácida en mujeres obesas. *Nutr Hosp*. 2010; 25:72-79.
30. Tessari P, Million R, Vettore M, Cecchet D, Puricelli L. Middle age is not associated with altered fibrinogen concentration and production in males. *Acta Diabetol* 2010; 47:155-159.
31. Lean SY, Ellery P, Yvey L, Thom J, Oostryck R, Leahy M, Baker R, Adams M. The effects of tissue factor pathway inhibitor and anti- β_2 -glycoprotein-I IgG on thrombin generation. *Haematologica* 2006; 91:1360-1366.
32. Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2457-2467.
33. de Pablo P, Ramirez A, Cortina E, de la Peña A, Zamora J, Izaquirre R, Amigo MC. Increased fibrin polymerization rate in patients with primary antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Appl Thromb Haemost* 2003; 9:221-225.
34. Patrassi GM, Sartori MT, Ruffatti A, Viero M, Di Lenardo L, Cazzanello D, Ghirardello A, Boeri G, Saggiorato G, Girolami A. Fibrinolytic pattern in recurrent spontaneous abortions: no relationship between hypofibrinolysis and antiphospholipid antibodies. *Am J Hematol* 1994; 47:266-272.
35. Keeling DM, Campbell SJ, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA. The fibrinolytic response to venous occlusion and the natural anticoagulants in patients with antiphospholipid antibodies both with and without systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 1991; 77:354-359.
36. Kolev K, Gombás J, Váradi B, Skopál J, Mede K, Pitlik E, Nagy Z, Machovich R. Immunoglobulin G from patients with antiphospholipid syndrome impairs the fibrin dissolution with plasmin. *Thromb Haemost* 2002; 87:502-508.
37. Cugno M, Cabibbe M, Galli M, Meroni PL, Caccia S, Russo R, Bottasso B, Mannucci PM. Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients. *Blood* 2004; 103:2121-2126.
38. Cugno M, Domínguez M, Cabibbe M, Bisiani G, Galli M, Angles-Cano E, Agostoni A. Antibodies to tissue-type plasminogen activator in plasma from patients with primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 108:871-875.
39. Yang CD, Hwang KK, Yan W, Gallagher K, Fitzgerald J, Grossman JM, Hahn BH, Chen PP. Identification of anti-plasmin antibodies in the antiphospholipid syndrome that inhibit degradation of fibrin. *J Immunol* 2004; 172:5765-5773.
40. Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, Zhang XC. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* 1998; 281:1662-1665.