

INACTIVACION DEL INHIBIDOR DE LA VIA EXTRINSECA (EPI) POR EL ANTICOAGULANTE LUPICO

Roberto de Zubiria Consuegra*, LuzJaneth Bernal Ruiz** y María Yinelh Castaño Saavedra* *

El EPI es un tipo serina proteasa potente inhibidor del complejo factor VI la-Tromboplastina Tisular en presencia del factor Xa.

El mecanismo de la inhibición es complejo, envuelve en un primer paso la formación de un complejo de EPI -Factor Xa y en un segundo paso la formación de un complejo cuaternario de EPI -Factor Xa- Factor VIIa-Tromboplastina Tisular en los vasos sanguíneos.

El inhibidor de la vía extrínseca de la coagulación EPI se encuentra normalmente en el plasma, en la superficie endotelial y en las plaquetas controlando la hemostasis de esta vía.

El EPI puede inhibir el complejo del factor VIIa y tromboplastina formando in vivo para prevenir el efecto de un limitado aumento de tromboplastina. Luego el conocimiento presente del EPI indica que él funciona como un inhibidor clave para el control negativo de la coagulación sanguínea iniciado por la tromboplastina.

El estudio comprendió la determinación de los PTTA y de los tiempos de heparina en 25 sujetos normales y en 25 pacientes con anticoagulante lúpico. Se descartaron aquellos individuos que estuvieran con tratamiento hormonal, pacientes que tuvieran cáncer, septicemia o cirugías recientes.

Los tiempos de heparina fueron medidos inicialmente en plasma oxalatado y luego se realizaron tiempos de heparina a mezclas de plasmas oxalatados y tromboplastina tisular obtenida a partir de cerebro de conejo.

El objetivo de nuestro trabajo fue demostrar que el EPI está inhibido en pacientes que presentan anticoagulante lúpico, para tal fin utilizamos la determinación de los tiempos de Heparina.

Se realizaron pruebas de hipótesis para la diferencia entre los promedios de los tiempos de la tromboplastina comercial y preparada, y a un nivel de significancia del 5%, se concluyó que la di-

* Médico internista y psicoanalista. Director Medicina Interna, Hospital La Samaritana

** Estudiantes IX Semestre, Carrera Bacteriología U.J.

lución del 3% era la que más concordancia tenía con la tromboplastina comercial, la segunda prueba de hipótesis de la diferencia ante la hora inicial y la hora cero de PTTA a plasmas con tromboplastina, lo mismo que el tiempo de heparina a un nivel del 5% con la distribución normal, se comprobó que hay diferencias significativas entre los dos promedios.

Para comparar el tiempo de heparina del grupo normal con el grupo de pacientes se utilizó un modelo de regresión ajustando el comportamiento, parabólico, en este existe una variación del tiempo de heparina en un 92.6%.

PALABRAS CLAVES

Heparina, Tiempo de Heparina, Tromboplastina, Trombosis, Coagulación.

INTRODUCCION

Dada la importancia que han adquirido en los últimos años ciertas patologías clínicas como la trombosis, relacionadas directamente con la presencia del anticoagulante lúpico, anticuerpo involucrado con la actividad del inhibidor de la vía extrínseca (EPI) se han visto en aumento las investigaciones acerca de las causas de estos.

Teniendo en cuenta que los fenómenos trombóticos se encuentran muy a menudo relacionados con el anticoagulante lúpico pretendemos demostrar que son estos anticuerpos los que producen la inhibición del EPI, el cual juega un papel clave en la modulación de la coagulación sanguínea y que una vez el inhibidor de la coagulación de la vía extrínseca está inactivado da lugar a la aparición de enfermedades trombóticas. La técnica utilizada como base para esta experimentación fue el tiempo de heparina el cual se midió a una serie de mezclas de plasma y tromboplastina.

MATERIALES Y METODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIOS

Se trabajó un grupo de 25 sujetos sanos con edades entre 30 y 45 años, los cuales presentaban

tiempos de coagulación y de heparina normales. Y un grupo de 25 pacientes con edades entre 19 y 50 años positivos para anticoagulante lúpico.

Se descartaron los sujetos que estuvieron con tratamiento hormonal, pacientes que tuvieran cáncer, septicemia o cirugías recientes.

Se tomaron como controles una población de 25 sujetos normales voluntarios que cumplieron las mismas condiciones de la población de estudio.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

Las muestras para el estudio son recolectadas con oxalato de sodio al 1.38% con una proporción de 1 parte de anticoagulante y 9 partes de sangre, usando la técnica estandar de venopunción, luego se centrifuga a 2000 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Otras muestras son recolectadas con citrato de sodio al 3.8% con una proporción de 1 parte de anticoagulante y 9 partes de sangre y se centrifuga bajo las mismas condiciones.

Las muestras deben ser procesadas durante las 2 horas siguientes a la extracción de la sangre.

OBTENCIÓN DE TROMBOPLASTINA TISULAR

Se sacrificaron por degollamiento, 10 conejos de 6 a 8 libras de peso, colocando la cabeza hacia abajo hasta que el animal se desangre completamente.

La cabeza se separa del cuerpo para que la manipulación sea más fácil. Se pela la cabeza del conejo para exponer la parte ósea y con varias incisiones se levanta ésta, se obtiene el cerebro, el cual se deposita en un recipiente estéril y se lava con solución salina estéril. Se retiran todas las membranas y se pasa a un mortero donde se macera hasta obtener un material homogéneo, se pasan a tubos de ensayo, luego se lavan de 5 a 7 veces consecutivas con acetona centrifugando cada una a 3000 revoluciones por minuto durante 15 minutos.

La muestra finalmente se distribuye en alícuotas para llevar a liofilizar con un previo coagulamiento a -72 °C durante 15 días. Una vez liofilizado se debe conservar a 4 °C.

PREPARACIÓN DE LA HEPARINA

Se prepara a partir de Liquemine el cual viene en una ampolla de 5 ml y contiene 5000U-USSp/ml. en tubos de hemolisis, se midieron 50 lambdas de heparina y se incubó por 1 minuto luego se agregaron 250 lambdas del plasma problema y se mezcló sin sacar del baño de maria. Se dejó incubar de 3 a 5 minutos, luego se adicionaron 250 lambdas de cloruro de calcio al 0.025 M, se mezcló y homogenizó, se activó el cronómetro y se dejó en reposo durante 7 minutos, se observó la formación del coágulo.

La prueba se debe realizar por duplicado con plasma oxalatado.

VALOR DE REFERENCIA

De 12 a 14 minutos

DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE HEPARINA A LA MEZCLA DE TROMBOPLASTINA Y PLASMA OXALATADO EN SUJETOS NORMALES Y PACIENTES

Se realizaron diluciones de la tromboplastina tisular y plasma problema 1:1 mezclando 5ml de plasma problema con 5ml de tromboplastina tisular, a esta mezcla se le realizó tiempo de heparina inmediatamente, el resto se dejó incubando a 37°C y se continuó haciendo tiempos de heparina a la 1, a las 2, a las 3 y a las 4 horas de incubación, el mismo procedimiento se llevó a cabo pero haciendo otra dilución 1:9 se mezcló 0.7 de tromboplastina tisular y 6.3 de plasma oxalatado de sujetos sanos y de plasma de pacientes.

DETERMINACIÓN DE PTTA DE LA MEZCLA DE TROMBOPLASTINA Y PLASMA CITRATADO DE SUJETOS SANOS Y PACIENTES.

Se midieron 0.2ml de tromboplastina tisular y 1.8 ml de plasma citratado, se montó el PTTA inmediatamente a la 1 y a las 2 horas.

DISCUSION

Por las características de los datos obtenidos y para facilitar la comprensión de los valores de los tiempos de heparinacomo la única prueba de laboratorio que nos valora la presencia de cantidades elevadas de tromboplastina tisular (factor III) en la sangre, esto podría tener muchísima importancia en el diagnóstico de enfermedades en las cuales hay aumento de la tromboplastina. Ejemplo: embolia de líquido amniótico, desprendimiento prematuro de la placenta, muerte fetal intrauterina, traumatismos múltiples, intervenciones quirúrgicas extensas, embolias grasosas, incompatibilidad sanguínea. Cuando se adiciona material tromboplastínico a un plasma sanguíneo, se produce una reacción en cadena de coagulación que se va incrementado paulatinamente durante las primeras 6 horas, esto podría explicar porqué cuando entra material tromboplastínico a la placenta se produce una embolia.

CONCLUSIONES

1. El único examen de laboratorio que permite demostrar la presencia de tromboplastina en el plasma es el tiempo de heparina.
2. El PTTA no varía luego de adicionar tromboplastina al plasma e incubar durante dos horas.
3. La tromboplastina tisular preparada a partir del cerebro de conejo tiene una excelente actividad, comparable a la comercial, especialmente en la dilución al 3%.
4. Con este estudio se comprobó que a partir de las 6 horas de incubación, se prolongaron los tiempos de heparina, lo que sugiere que entra en actividad la acción del EPI inactivando la tromboplastina y deteniendo la coagulación.

5. En los pacientes con anticoagulante lúpico no pudimos llegar a una conclusión definitiva, aunque encontramos un patrón diferente donde a las 24 horas los plasmas continuaban coagulándose, esto sugiere la inactivación del EPI por los anticuerpos pero dentro de la muestra examinada, se presentaron resultados que se salen del patrón por lo que se hace necesario nuevos estudios para confirmar lo anterior con un mayor número de muestras.
6. Los tiempos de heparina realizados a la mezcla de tromboplastina y plasma 1:1 nos dió resultados satisfactorios debido a que el plasma quedó muy diluido, a esto se debió el hecho de que se prolongaron los tiempos de heparina una vez adicionada la tromboplastina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. ABILAARD, V. Lindahl Ak. Sandeset P.M. Heparin reuies botli antithrombinand extrinsicpathway inhibitor for its anticoagulant effect in human blood. Haemostasis 1991. 21(4)254-7.
2. COLBORN, Il Crabb JW. Bounassisi V. Enhanced inhibición de tissur factor by the extended from of a endothelial, gell glycoprotein (an extrinsic partway inhibitor). J. Calll-Physical. 1992.148 (2). 320-6
3. CALLANDER NS, Rao LC, Nordfang O, Sandeset PM. Mechanismsofbrindingofrecombinant extrinsic patliway inhibitor (EPI) to cultured cellsurfacs. Evidence that EPI can bind to and inhibit factorVlla-tissue-factorcomplxcs in the absence of factor Xa. J-Biol-chem. 1992.267 (2) 876-82.
4. PRAGER, David, Cari D. Marci. Determinación de heparina plasmatica. American Journal ofClinical Pathol. 1993,99. 546-550
5. FLECK.R.A. Rapaport Si. Rao U.N. Anti prothiomnim antibodies and lupus anticoagulant. Bood Vol. 72. 512-519. 1989
6. HANSEN JB. Olsen J.O. Osterud.B. Physical exercise enhances plasma levels of extrinsic pathway inhibitor (EPI) Throm-Haemost. 1990. 64 (1) 124-6.
7. JOHN T BRAND. douglas a. Triplett. Efect of lupus anticoagulantsandhetalhealth, Rheumatol 1987.Vol. 14. 259-262. 1987
8. LINDAHL, AK. Abildgaord V. Stadescen R. The anticoagulant effect in heparinized blood and plasma resulting from interactions with extrinsic pathway inhibition. Thromb-Res 1991.64(2): 155-68
9. LINDAHL AK, Abildgaar, V; Larsen ML. Extrinsic pathway inhibitor (EPI) and the post-heparin anticoagulant effect in tissue thromboplastin induced coagulation. Thromb-Res - Suppl. 1992,14,39-48
10. MICHAEL, D. Lackshin, Tasneen Gamar. Antibodies to cardiolipin Lupus anticoagulant and hetal health. Rheumatol. 1987.Vol. 14.259-262. 1987
11. MAKAGAKI, T. Foster DC, Beriener KL, Initiation of tie extrinsic pathway of blood caogulation: evidancia for the tissue factor dependen autoactivation of human coagulation factor VII. Biochemistry. 1992. 30(45). 10819-24
12. NORDFANG D; valentin S. Beck TC; Hedner V. Inhibition of extrinsic pathway inhibitor shortens the coagulation time of normal plasma and of hemophilia plasma. Tromb-Haemost. 1991. 6(4)464-7.
13. SANDESET, P.M.jBildgaar V. Extrinsic pathway inhibition the key to freedbock control of blood coagulation initiated by tissue thromboplastin. Haemostasis 1991.21(4). 219-39.
14. SANDESET, PM, Larsen ML; Abildgaard U, LindhalAK. Chromogenic substrate assay of extrinsic pathway inhibition (EPI) Levels in tile normal populadon and relation to cholesterol Blood-Coagul. Fibrinolysis. 1991. 2(3). 425-33.
- 15- SANDEST PM.; Warn. Cramer B.J. Rag LV. Depletion of extrinsic pathway inhibitor (EPI) sesitizes rabbits to disseminate intrvascular coagulation induce widi tissue factor, evidence supporting a physiologia role for EPI as a natural, anticoagulante.
16. WARN, CRAMER BJ; MakiSL; Rapaport SI, A sulfated rabbit endothelial cell glycoprotein die inhibits factor Villa/tissue factor is finctionally and immunologialy idéntica! to rabbit extrinsic pathway inhibitor (EPI). Thromb. Res 1991. 61 (5-6). 515-27.
17. WARRTA, Rao LV; Rapaport SI. A sensitive accuarte assay for extrinsic pathway inhibitor (EPI), activity in rabbit plasma: paradoxical effect of excess exogenous factor X, Thromb Res. 1990- 54 (4). 773-82.