

Estudio del sistema fibrinolítico en pacientes con abortos o fallos recurrentes de reproducción asistida

Dras. Viviana Ramírez,¹ Maryuri Linares,¹ Jenny Garmendia,² Rita Marchi.¹

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el proceso hemostático en mujeres con abortos recurrentes o fallos recurrentes de reproducción asistida por causas desconocidas, mediante el tiempo de tromboplastina parcial activado y la formación y disolución de la red de fibrina.

Métodos: Se seleccionaron 20 pacientes y 20 controles. Se les determinó el tiempo de tromboplastina parcial activado y la concentración de fibrinógeno por método gravimétrico. La cinética de formación de la malla de fibrina fue estudiada en plasma pobre en plaquetas. Se empleó la técnica de lisis de euglobulina para el estudio del proceso de disolución de la malla de fibrina.

Resultados: El tiempo de tromboplastina parcial activado del grupo de pacientes fue de $27,3 \pm 3,4$ segundos y el de los controles $28,6 \pm 1,7$ segundos, sin diferencia estadística (rango normal de 25 - 45 segundos). La concentración del fibrinógeno fue: $2,8 \pm 0,5$ mg/mL en los pacientes y $3,0 \pm 0,6$ mg/mL en los controles. En general, la cinética de formación de la malla de fibrina de las pacientes fue similar a la de los controles. El tiempo de lisis de euglobulina de las pacientes fue aproximadamente un 22 % más prolongado con respecto al grupo control (487 ± 203 min vs. 404 ± 241 min, respectivamente), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Conclusiones: En este grupo de pacientes no se encontraron alteraciones significativas en los parámetros evaluados que pudieran explicar las pérdidas recurrentes o los fallos de reproducción asistida.

Palabras clave: Tiempo de tromboplastina parcial activado, fibrinógeno, polimerización, lisis de euglobulina, aborto recurrente.

SUMMARY

Objective: To evaluate the hemostatic process in women with recurrent abortions or recurrent failures of assisted reproductive technology due to unknown causes, by means of activated partial thromboplastin time, and the formation and dissolution of the fibrin network.

Methods: A total of 20 patients and 20 controls were selected. The activated partial thromboplastin time was measured and fibrinogen concentration was determined by gravimetric method. The kinetic of fibrin formation was studied in platelet poor plasma. The euglobulin lysis technique was used to study the dissolution process of the fibrin network.

Results: The activated partial thromboplastin time of patients was 27.3 ± 3.4 seconds, and 28.6 ± 1.7 seconds in controls, without statistical significance (normal range of 25 - 45 seconds). The concentration of fibrinogen was: 2.8 ± 0.5 mg / mL in patients and 3.0 ± 0.6 mg / mL in controls. In general, the kinetic of patients fibrin formation were similar to those of controls. The patients euglobulin lysis time was approximately 22% higher compared to the control group (487 ± 203 min vs. 404 ± 241 min, respectively), although this difference was not statistically significant.

Conclusions: In this group of patients no significant alterations were found in the parameters studied that could explain the recurrent losses or failures of assisted reproductive technology.

Keywords: Activated partial thromboplastin time, fibrinogen, polymerization, euglobulin lysis, recurrent miscarriage.

INTRODUCCIÓN

El aborto recurrente (AR) es una complicación del embarazo durante las primeras 20 semanas de la gestación. A esta patología contribuyen diversos factores, entre ellos los inmunológicos, como el

¹Centro de Medicina Experimental, Laboratorio Biología del Desarrollo de la Hemostasia, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. ²Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

ESTUDIO DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO EN PACIENTES CON ABORTOS O FALLOS RECURRENTE DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

síndrome antifosfolípido, que produce trombosis en el lecho vascular útero-placentario, entre otros efectos (1, 2).

Los abortos recurrentes atribuidos a problemas en la hemostasia, tienen una incidencia baja. La alteración en la coagulación o en la fibrinólisis puede desencadenar problemas trombóticos o hemorrágicos (3). Entre los factores de naturaleza protrombótica se encuentran el factor V de Leiden, un polimorfismo del factor V de la coagulación que impide la inactivación del mismo, deficiencias de las proteínas C, S, y antitrombina III (1). Estas deficiencias pueden causar múltiples daños en el embarazo, por la formación de pequeños microtrombos que impiden la circulación correcta de la sangre materna hacia el feto (4, 5).

La evaluación de la hemostasia se realiza mediante diversas pruebas de laboratorio. El tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), evalúa todos los factores de la coagulación, a excepción del factor VII (FVII), y puede predecir, en cierto grado, posibles complicaciones trombóticas o sangrado excesivo (2, 6).

En el presente estudio, se evaluó el TTPa, la formación y disolución del coágulo, en un grupo de mujeres con abortos recurrentes o fallos en procedimientos de reproducción asistida (sin causa aparente), y se comparó con un grupo de mujeres fértiles normales.

MÉTODOS

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico, comprados mayormente a la casa comercial Sigma Chemical Company® (St. Louis, USA).

Selección de los grupos a estudiar

Se seleccionaron 20 mujeres procedentes de la consulta externa del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, con edades comprendidas entre 29 y 46 años, con 2 o más abortos recurrentes, o con historia de infertilidad, tres o más fallos en inseminación artificial o fertilización *in vitro*; y 20 mujeres sanas (personal del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Caracas), en edades similares a la de las pacientes, sin

historia personal o familiar de aborto o infertilidad, con uno o más hijos a término y sin complicaciones. Se excluyeron de ambos grupos, mujeres con tratamiento farmacológico como anticoagulantes, ingesta de anticonceptivos o cualquier otro tipo de terapia hormonal, que pudieran alterar las pruebas del presente estudio, o en tratamiento de fertilidad, mujeres que practicaran deporte a diario, con diagnóstico de enfermedad autoinmune, o cualquier otra patología, y mujeres embarazadas. Este proyecto fue aprobado bajo la resolución 0182/1610/2018 del Comité de Bioética del IVIC. Las mujeres que participaron en el presente trabajo firmaron el respectivo consentimiento informado.

El tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) fue realizado en el Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital, en un equipo automatizado ACL-Elite Pro® (Instrumentation Laboratory).

Toma de la muestra de sangre

Se tomó una muestra de 20 mL de sangre en ayunas por punción venosa, con citrato de sodio al 3,8 % como anticoagulante (9:1), descartando los tres primeros mL de sangre. Se centrifugó la sangre dos veces por 10 min a 2000 g a 4 °C, con el fin de separar el plasma de los elementos celulares. Se tomó el sobrenadante y se guardó en alícuotas de 400 µL en tubos eppendorf de 1,5 mL y se congeló de inmediato a -80 °C.

Determinación de fibrinógeno por pesada

La concentración de fibrinógeno plasmático se determinó por el método gravimétrico, según la técnica descrita por Ingram (7), con algunas modificaciones.

Polimerización de la fibrina

El proceso de formación de la malla de fibrina se efectuó mediante el registro continuo de los cambios de densidad óptica (DO) durante la formación incipiente del coágulo, en un espectrofotómetro TECAN Infinite® 2M, controlado con el software i-control (Viena, Austria). Se realizó según la técnica descrita por Marchi y col. (8). Brevemente, se registraron los cambios de absorbancia a 350 nm, cada 15 s, a 37 °C, durante 90 min. Los experimentos fueron realizados por triplicado,

mínimo en tres experimentos independientes. Los valores de densidad óptica fueron multiplicados por 1000 (mDO) y se calcularon los siguientes parámetros: tiempo de latencia (s), pendiente (mDO/s) y la turbidez máxima (mDO).

Lisis de euglobulina

Se obtuvo la fracción de euglobulina (FEG) mediante la acidificación del plasma 1:9,5 con ácido acético frío al 0,016 % en hielo por 10 min. Luego se centrifugó por 15 min, a 1500 g y 4 °C, y se guardó el precipitado (FEG) a -80°C hasta su uso. La FEG fue descongelada a temperatura ambiente y resuspendida en 500 µL de tampón Tris-salino (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4). Se colocaron 150 µL FEG en una placa de 96 pozos y se activó la reacción con 150 µL de CaCl₂ (25 mM, concentración final). Cada muestra fue analizada por duplicado, con su respectivo blanco (150 µL FEG y 150 µL tampón Tris). El proceso de disolución de la malla de fibrina se efectuó mediante el registro continuo de los cambios de densidad óptica (DO) a 405 nm, cada 3 min, durante 12 h, a 37 °C, en un lector de Elisa, TECAN Infinite® 2M, controlado con el software i-control (Viena, Austria). Se midió el tiempo que tarda en disolverse el coágulo en un 50 % (T50) (min), la velocidad de lisis (valor absoluto; variación de la DO/s) y el área bajo la curva (lo cual refleja el balance entre la formación del coágulo y su disolución, DO x min), mediante el uso del programa Origin 8.1. Los ensayos se realizaron por triplicado en al menos 3 experimentos independientes.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para obtener los valores promedio y de desviación estándar. Se aplicó la prueba F-Snedecor y t-Student. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre el TTPa y la concentración de fibrinógeno.

RESULTADOS

En la tabla 1 se resumen las características de la población. La edad promedio fue similar en ambos grupos, así como la concentración de fibrinógeno plasmático ($p > 0,05$).

Tabla 1
Características de la muestra

Parámetros	Controles	Pacientes
Mujeres	20	20
Edad (años)	37	37
X (mín-máx)	(29 – 46)	(29 – 46)
Número de abortos	0	>1
Número de hijos	>1	0
Fibrinógeno (mg/mL)		
X ± DE	3,0 ± 0,6	2,8 ± 0,5
Tiempo parcial de tromboplastina activada		
X ± DE	28,6 ± 1,7	27,7 ± 3,4

El estudio de la vía intrínseca fue evaluado mediante la medición del TTPa, donde los valores normales oscilan entre 25 a 45 s, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y controles ($p > 0,05$); aunque el grupo de pacientes fue más heterogéneo, con una mayor desviación estándar.

Dieciséis pacientes poseían estudios del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa para las variantes C677T y A1298C. Cinco pacientes fueron homocigotos y una heterocigota para C677T, un homocigoto y cuatro heterocigotos para A1298C. Cinco pacientes no tuvieron ninguna mutación. Dieciséis de las pacientes tenían reportes de la razón de Russel ($1,0 ± 0,1$).

Formación de la malla de fibrina

La cinética de formación de la malla de fibrina de los pacientes fue similar a la del grupo control (tabla 2, figura 1). Aunque el tiempo de latencia (TL), fue significativamente más corto en las pacientes ($p = 0,05$).

Disolución de la malla de fibrina

El tiempo de lisis de euglobulina de las pacientes tendió a ser más prolongado con respecto al grupo control, aunque sin alcanzar significancia estadística.

ESTUDIO DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO EN PACIENTES CON ABORTOS
O FALLOS RECURRENTE DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Tabla 2

Resumen del proceso de formación de la malla de fibrina

Parámetros	Controles X±DE	Pacientes X±DE	Prueba t (p)
Pendiente (mDO/s)	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,8	0,47
TMáx (mDO)	844 ± 109	837 ± 91	0,80
TL (s)	70,8 ± 12,5	68,1 ± 11,5	0,05

TMáx: turbidez máxima; TL: tiempo de latencia

Tabla 3

Resumen del proceso de la disolución de la malla de fibrina

Parámetros	Controles X±DE	Pacientes X±DE	Prueba t (p)
T50 (min)	404 ± 241	487 ± 203	0,29
[VL] (DO/s) x 10-5	8,31 ± 7,43	4,41 ± 5,21	0,09
ADC (DO/min) (DO x min)	153 ± 124	226 ± 152	0,13

T50: tiempo de lisis al 50 %. [VL]: valor absoluto de la velocidad de lisis. ADC: área bajo la curva.

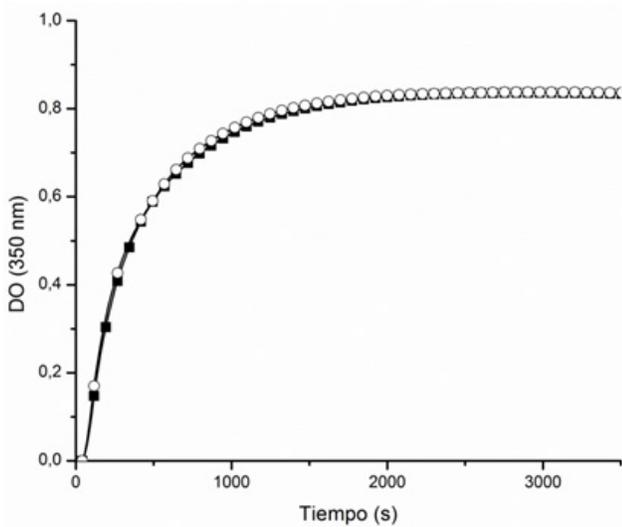


Figura 1.

Polimerización de la fibrina. Cada curva representa el promedio de valores obtenidos para 20 muestras por cada grupo. (■) Grupo control (○) Grupo de pacientes.

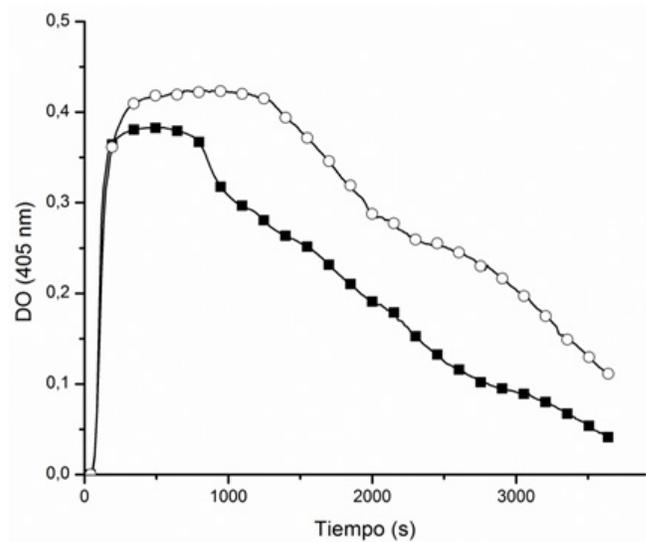


Figura 2.

Lisis de euglobulinas. Cada curva representa el promedio de valores obtenidos para 20 mujeres por cada grupo. (■) Grupo control (○) Grupo de pacientes.

De manera similar, la velocidad de disolución de la malla de fibrina promedio del grupo de las pacientes fue aproximadamente 2 x más lenta con respecto al grupo control, y el área bajo la curva 1,5 x mayor con respecto al grupo control, aunque estas diferencias no alcanzaron significancia estadística (0,09 y 0,13 respectivamente) (tabla 3). En la figura 2 se muestran las curvas de disolución del coágulo.

No se encontró ninguna correlación entre el TTPa y la concentración de fibrinógeno (Fg) de las pacientes y los controles (-0,29 y 0.06, respectivamente).

DISCUSIÓN

Las alteraciones en la coagulación o fibrinólisis pueden conducir a sangrados excesivos o problemas trombóticos (2). En estudios preliminares se encontró que algunas mujeres con AR sin causa aparente, tenían un TTPa acortado (Garmendia, comunicación personal). En el presente trabajo se quiso determinar si la alteración en el TTPa, la formación y disolución de la malla de fibrina, pudieran explicar las pérdidas recurrentes o los fallos en procedimientos de fertilización asistida.

Marchi y col. (9), en 2011, encontraron que en abortadoras recurrentes sin síndrome antifosfolipídico (AR-SSA), la velocidad de polimerización y turbidez final estuvieron aumentadas significativamente con respecto al grupo control; a diferencia de las mujeres con síndrome antifosfolipídico (SAF), en las cuales estos parámetros fueron similares a los del grupo control (mujeres sanas). En cambio, las concentraciones de Fg entre las abortadoras recurrentes (con SAF y sin SAF) y los controles fueron similares. En este estudio, en general, la cinética de formación de la malla de fibrina y la concentración de Fg de las pacientes, las cuales fueron seleccionadas con AR pero sin SAF, fue similar con respecto al grupo control. No obstante, en las pacientes, el tiempo de latencia resultó significativamente menor.

Por otra parte, en el estudio del proceso fibrinolítico, empleando la técnica de lisis de euglobulina, las pacientes tenían una tendencia a disolver más lento los coágulos y a presentar un área bajo la curva (ADC) (la cual representa el balance entre la formación del coágulo y su disolución) mayor con respecto a los controles, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este hecho se atribuye a la gran variabilidad de los resultados y al número de sujetos incluidos en el presente estudio. En cambio, Marchi y col. (9), empleando una técnica de fibrinólisis diferente, disolviendo el coágulo con el activador del plasminógeno tipo tisular (tPA), encontraron que la velocidad de disolución de la malla de fibrina fue más rápida en las AR sin SAF con respecto al grupo control y AR-SAF.

Se ha reportado en la literatura alargamiento del TTPa en pacientes con AR debido a la presencia del SAF (10), al igual que una elevada tasa de abortos espontáneos relacionados con un TTPa acortado (11). En este estudio, aunque el promedio de TTPs fue similar entre pacientes y controles, sus valores variaron más en las pacientes.

En un estudio reciente, se evaluó el fenotipo trombofílico en abortadoras recurrentes, encontrando que la frecuencia del polimorfismo del FXIII Val34Leu puede tener una contribución importante en las pérdidas (12).

En conclusión, no se encontraron alteraciones mayores en los diversos estudios efectuados en las pacientes con abortos o fallos recurrentes de reproducción asistida que pudieran explicar la patología. Sería recomendable aumentar el número de pacientes y controles a fin de establecer si las diferencias observadas en algunos parámetros llegan a tener significancia estadística.

Las autoras expresan su más sincero agradecimiento a todas las mujeres, tanto pacientes como controles, las cuales han hecho posible la realización del presente proyecto.

REFERENCIAS

1. Mateo HA, Mateo E, Hernández L, Rivera P, Mateo M, Mateo V, *et al.* Pérdida recurrente del embarazo: revisión bibliográfica. *Ginecol Obstet Mex.* 2016; 84 (8): 523 - 534.
2. Manzur Y. Aborto recurrente. *Rev Med Clin Condes.* 2010; 21 (3): 416 - 423.
3. Hood J, Eby C. Evaluation of a prolonged prothrombin time. *Clin Chem.* 2008; 54 (4): 765-768.
4. Murillo C, Murillo O. Una actualización en abortos recurrentes. *Rev Med Costa Rica Centroam.* 2011; 599: 423 - 433.
5. Hijona JJ. Factores asociados al aborto espontáneo [tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2005.
6. López-Santiago N. Pruebas de coagulación. *Acta Pediatr Mex.* 2016; 37 (4): 241 - 245.
7. Ingram IC. The determination of plasma fibrinogen by clot-weight method. *Biochem J.* 1952; 51 (5): 583 - 585.
8. Marchi R, López Y, Nagaswami S, Masova L, Pulido A, López Mora J, *et al.* Hemostatic changes related to fibrin formation and fibrinolysis during the first trimester in normal pregnancy and recurrent miscarriage. *Thromb Haemost.* 2007; 97 (4): 552 - 557.
9. Marchi R, Maya I, Garmendia J. Efecto de los anticuerpos antifosfolipídicos en la formación y degradación de la malla de fibrina en pacientes con aborto recurrente. *Invest Clin.* 2011; 52 (1): 35 - 47.
10. Bustos HH, Huber R, Baptista H, Izquierdo H, Sánchez J. [Presence of inhibitors of activated partial thromboplastin time (TTPA). Clinical repercussion in obstetric patients]. *Ginecol Obstet Mex.* 1992; 60: 22 - 26. Español.

ESTUDIO DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO EN PACIENTES CON ABORTOS
O FALLOS RECURRENTE DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

11. Ogasawara M, Aoki K, Katano K, Aoyama T, Ozaki W, Suzumori K. Activated partial thromboplastin time is a predictive parameter for further miscarriages in cases of recurrent fetal loss. *Fertil Steril.* 1998; 70 (6): 1081 - 1084.
12. Diaz-Nuñez M, Rabanal A, Expósito A, Ferrando M, Quintana F, Soria JM, *et al.* Recurrent Miscarriage and Implantation Failure of Unknown Cause Studied by a

Panel of Thrombophilia Conditions: Increased Frequency of FXIII Val34Leu Polymorphism. *J Reprod Infertil.* 2019; 20 (2): 76 - 82.

Recibido 14 de agosto de 2019
Aprobado 10 de noviembre de 2019