

Aceleración de la coagulación por activación de la vía alternante del complemento

P. Angulo, J. Fernández, B. Cuesta y A. López Borrasca

RESUMEN

Al realizar el test de la inulina como "screening" de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), suele verse un acortamiento del tiempo de coagulación y mayor hiperretractibilidad del coagulo que en sangres carentes de inulina. Esto nos hizo sospechar una actividad procoagulante de ella.

La confirmación se realizó con tres métodos:

- 1) Tromboelastografía seriada en el tiempo, de diez plasmas frescos incubados con inulina al 10% en una proporción de 1 a 10 en volúmenes. La medición de las constantes r+k, no fue valorable.
- 2) Tiempo de recalcificación y dosificación de actividad de complemento total (CH 100) en diez muestras, con metódica similar a la anterior. Aquí a medida que se consume complemento por la incubación con inulina, se observa un progresivo alargamiento del tiempo de recalcificación.
- 3) Consumo de protrombina seriado comparativo, de diez muestras incubadas con y sin inulina. Se aprecia un mayor consumo de la protrombina y por tanto un aceleramiento en la coagulación sanguínea en el grupo incubado con dicha sustancia (acción máxima entre los 20 y 25 minutos con diferencias superiores a los 5 segundos).

Estos hallazgos permiten afirmar la influencia y participación del sistema del complemento en el proceso de la coagulación sanguínea.

INTRODUCCIÓN

La interacción del sistema del complemento con la coagulación sanguínea, ha sido sospechada hace algún tiempo. Esta sospecha fue apoyada en el hecho de que conejos, genéticamente deficientes en C6 y con tasas normales de todos los factores de coagulación, tenían un tiempo de coagulación mayor de lo normal, que se corregía con la adición de factor C6 purificado²³. Sin embargo, más recientemente parece haberse demostrado que en el hombre

su carencia no provoca tales trastornos⁷.

Las primeras observaciones que revelaban un aumento de los títulos de pro-perdina en animales que recibían endotoxina en la reacción generalizada de Schwartzman^{9,16}, modelo experimental del síndrome de coagulación intravascular diseminada, fueron confirmadas posteriormente al comprobarse que las endotoxinas bacterianas son activadoras de la vía alternante del complemento³ y sólo en raras ocasiones sobre la vía clásica¹⁵.

La aportación de Fong y Good², resalta aún más la participación del sistema del complemento en el fenómeno generalizado de Schwartzman. Observaron una marcada disminución de la intensidad de las lesiones hemorrágicas y necróticas de conejos a los que previamente a la administración de endotoxina, se les inyecta veneno de cobra purificado (Co F). Esta sustancia, estudiada previamente por Götze y Müller-Eberhard⁵, es capaz de producir la activación del sistema alternante de la properdina por unión con el proactivador del C3 (PAC3), formando una molécula compuesta capaz de activar el C3 y posteriormente la secuencia C3-C9. Esta disminución de la intensidad de la reacción de Schwartzman, por descenso de la actividad del complemento, sugeriría un papel preponderante en la fisiopatología del fenómeno¹⁴.

El tiempo de coagulación de la sangre total de conejos normales, se acorta también por complejos antígeno-anticuerpo¹⁹ y endotoxinas¹⁰, no ocurriendo así cuando el recuento de las plaquetas de las muestras de sangre estaba disminuído. El hecho de que estas sustancias, capaces de producir una activación de la vía alternante, aceleren la coagulación sanguínea, indicaría que aquel sistema puede estar relacionado con ella y, más concretamente, con las plaquetas, ya que su ausencia parece inhibir su acción. En los conejos deficientes en C6, estas sustancias no producen aceleración en la formación del coágulo, pero sí tras la adición de factor C6 purificado.

Nosotros hemos observado, que en el test de la inulina, usado como prueba «screening» para el diagnóstico de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)¹, se aprecia un acortamiento del tiempo de coagulación del tubo que contiene esta sustancia, frente al tubo control que no la tiene, así como una mayor retractibilidad del coágulo. Dado que la inulina es capaz de activar tam-

bién el camino alternante del complemento, su acción procoagulante sugiere estar relacionada con dicho sistema.

En el presente trabajo valoramos la aceleración del proceso de coagulación producido por dicha sustancia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plasma. Muestras de plasma fresco fueron obtenidas con citrato al 3,8% en una proporción 1/9, en material de plástico, de donantes sanos que no presentaban anomalías del proceso de coagulación.

Inulina. Inulin (Merck) al 10% y 2%, disuelta en solución salina ajustada a pH 7,4, previo calentamiento de ésta a 62°.

Estudio tromboelastográfico. Diez muestras de plasmas frescos de diferentes donantes fueron estudiados con la siguiente metódica:

Se obtenían 3 cc. de plasma rico en plaquetas (PRP) por sedimentación espontánea de cada donante, repartiéndola en dos tubos de plástico. En uno de ellos se puso 1 cc. del plasma considerando basal, y en el otro los restantes 2 cc. A éste último se le añadió 0,2 cc. de la solución de inulina al 10% y tras mezclar bien, se incubó en baño María a 37° poniendo en marcha un cronómetro.

Al tubo basal se le añadió 0,1 cc. de solución salina 0,9% pH 7,4, para compensar la dilución del otro tubo. De esta manera se realizó un estudio tromboelastográfico, al igual que del tubo incubado con inulina a los 5, 10, 15, 20 y 25 minutos.

Tiempo de recalcificación. En diez muestras de plasma fresco normal, centrifugado 10 minutos a 4000 r.p.m. y con idéntica sistemática al apartado anterior, se realizaron determinaciones del

tiempo de recalcificación de Howell, basalmente y cada cinco minutos, hasta un tiempo máximo de incubación de 25 minutos.

Paralelamente se determinó en cada muestra la actividad de complemento total (CH 100), (Quantiplate, Kallestad).

Consumo de protrombina. Se extrajeron con material de plástico, 16 cc. de sangre de diez donantes sanos, vertiendo inmediatamente 1,8 cc. en cada uno de ocho tubos de plástico, preparados previamente: cuatro de ellos con 0,2 cc. de solución salina 0,9 pH 7,4 de control y otros cuatro con 0,2 cc. de solución inulina al 2%. Después de mezclados por inversión varias veces, se incubaron en baño María a 37°, a la vez que se ponía en marcha un cronómetro.

A los 15, 20, 25 y 30 minutos se extrae un tubo de cada serie, parando el proceso de coagulación sanguínea con adición de 0,2 cc. de citrato al 3,8% e introduciéndolos en baño de hielo a 4° C. Una vez terminadas las operaciones de las últimas muestras, se rompen los coágulos suavemente con un palillo de madera y se introducen durante treinta minutos nuevamente en el baño a 37°, para inactivar la trombina absorbida en el coágulo por la antitrombina III. Posteriormente se centrifugan las muestras 10 minutos a 4000 r.p.m. y se determina la protrombina residual de cada muestra, añadiendo por este orden: 0,2 cc. de Simplastin (General Diagnostics), 0,1 cc. de plasma absorbido con SO₄ Ba (100 mgr. por cc. de plasma, con T. de protrombina de la muestra superior a 120") y 0,1 cc. de cada muestra a testar.

RESULTADOS

Estudio tromboelastográfico. Las primeras observaciones realizadas mediante la valoración de la suma de las constantes r + k de estudio tromboelastográfico seriado, quedan expresadas en la figura 1.

No se aprecia, como pensamos en un principio, un acortamiento progresivo de estas constantes y nos inclinamos a pensar, que no es la metódica ideal a seguir para valoraciones finas, debido a la inexactitud que proporciona este registro.

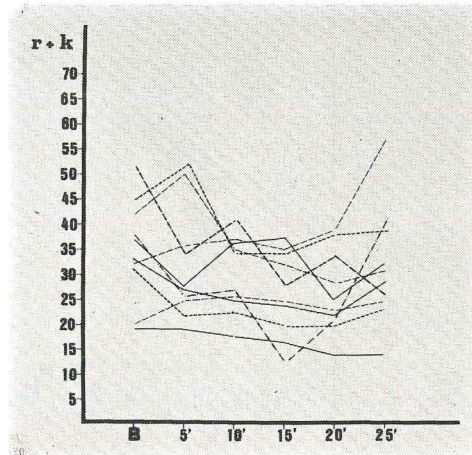


Fig. 1.— Estudio tromboelastográfico. Medición seriada de las constantes r + k, de plasmas incubados con inulina.

Medición del tiempo de Recalcificación seriado. Los resultados medios de los valores del tiempo de recalcificación de las diez muestras de plasma, así como la determinación media de los valores de actividad de complemento total (CH 100), quedan recogidos en la figura 2. En ella puede apreciarse un alargamiento progresivo del tiempo de recalcificación de los plasmas, a la vez que paralelamente se observa una clara disminución de la actividad del complemento.

Consumo de la Protrombina. Esta prueba, única de las tres en la cual el proceso de coagulación está actuando paralelamente con la activación del complemento por la inulina, nos sirvió para comparar la acción procoagulante de la secuencia de la vía alternante, con

respecto al proceso basal de la coagulación sanguínea, representado por la serie a la que no se añade esta sustancia.

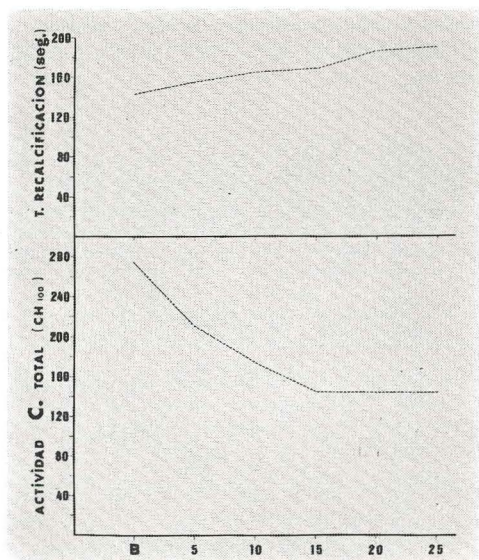


Fig. 2.— Valores medios de T. de Recalcificación y actividad de complemento de plasmas incubados con Inulina.

Los resultados globales de las diez muestras estudiadas, quedan representadas en la figura 3. Se aprecia una similar concentración de protrombina residual en las muestras de los 15 minutos, observándose por otra parte un mayor consumo de protrombina en las muestras de los 20 y 25 minutos y por tanto un proceso de coagulación más acelerado, con diferencias superiores a los 5 segundos. Llama sin embargo la atención la acción de frenado de las muestras de los 30 minutos, comprobándose un enlentecimiento de la serie incubada con inulina frente al grupo control. Este hecho paradójico, observado en todas las muestras, se escapa a nuestra comprensión y no hallamos en la actualidad una explicación convincente para su interpretación. Cabría admitir, siempre en un terreno hipotéti-

co, que un consumo excesivo del complemento condicionaría un mayor enlentecimiento de los procesos de coagulación, indicando una evidente interrelación de ambos sistemas.

DISCUSION

Las observaciones de Müller-Eberhard y col.^{11,12}, Oliveira y Sandberg y col.^{13,20}, fueron las primeras comprobaciones que revelaban la existencia de una nueva vía para la activación del complemento, al observar un consumo de los últimos componentes (C3-C9), sin afectar aparentemente la tasa de los primeros (C1, C4, C2) pertenecientes a la vía clásica. En esta nueva vía, una proteína sérica denominada proactivador del C3 (PA C3), puede ser activada transformándose en un enzima activo por fragmentación de su molécula en dos partes: una de ellas, la mayor, posee movilidad electroforética de gammaglobulina y es denominada activador del C3 (A C3), por ser la que verdaderamente activa la molécula del C3, de modo similar a la convertasa del C3 (C4, 2), de la vía clásica de activación del complemento. El factor PA C3 se ha comprobado, que es funcionalmente idéntico a la fracción B del sistema de la properdina⁴, descrito previamente por Pillemer y col^{17,18}. La inulina, por su capacidad de escindir la molécula del C3 PA en C3A, se ha mostrado como activador de la vía alternante⁶.

En el presente trabajo usando esta sustancia, comprobamos que efectivamente ejerce esta acción, observándose un descenso gradual de la actividad del complemento (fig. 2). El hecho de que paralelamente se produzcan alargamientos del tiempo de recalcificación, parece indicar que el consumo de factores de la secuencia del complemento provoca este alargamiento, induciendo a pensar que su normal concentración plasmática es capital para el correcto

desarrollo de la coagulación sanguínea.

Con la prueba de aceleramiento del consumo de protrombina, observamos que la activación de la vía alternante provoca un acortamiento de los tiempos de coagulación, confirmando las descripciones de Zimmerman y Müller-Eberhard²².

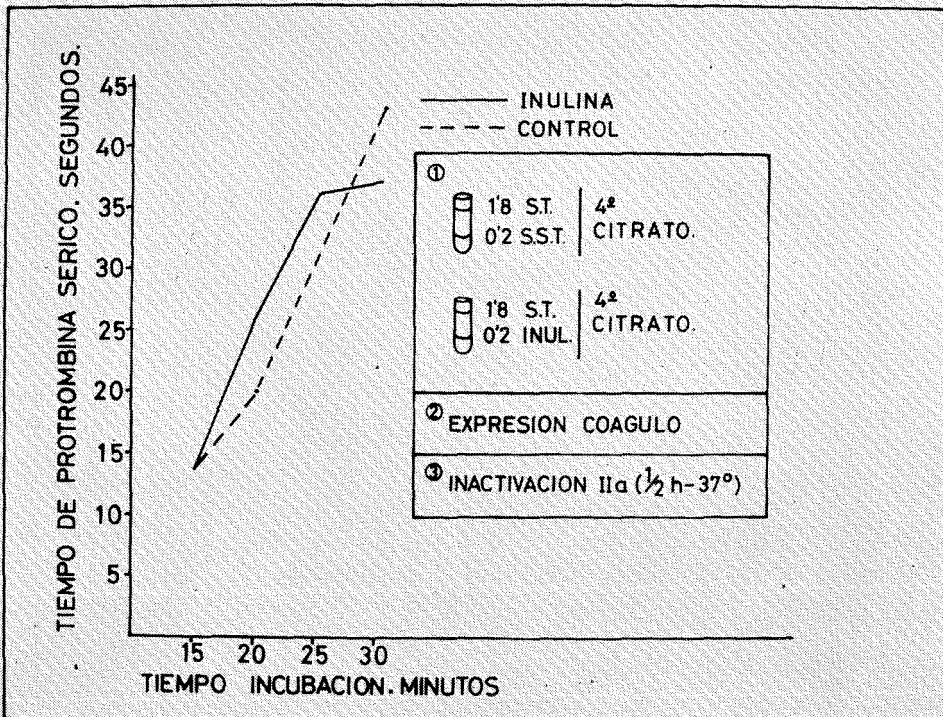
Siraganian comprueba además, que la acción del complemento activado produce liberación de factor 3 plaquetario, histamina, serotonina y potasio de las plaquetas dañadas, afirmando que son las plaquetas el punto en común de los sistemas de coagulación y del complemento. El daño plaquetario causado por la endotoxina, agregados antígeno-anticuerpo e inulina, es medido por la acción del complemento. La trombina, colágeno y caolín, dañarían las plaquetas sin mediación de factores plasmáticos.

Sin embargo no es sólo el sistema alternante el que participa en el daño celular. Otras observaciones⁸ parecen

indicar que también la vía clásica juega algún papel, ya que cuando la endotoxina es dada en cobayas deficientes en C4, no se observa descenso del número de plaquetas, a pesar de tener evidencia de producirse activación de la vía alternante y observarse consumo de los componentes terminales C3 C9. La trombopenia aparece si se corrige su nivel de C4. Por otra parte, estos animales privados de C4, tienen un tiempo de coagulación similar a los normales, a diferencia de los deficientes en C6. Su tiempo de coagulación no se acorta con la inyección de endotoxina, pudiendo indicar quizás que el acortamiento del tiempo de coagulación sea secundario al daño de las plaquetas⁹.

En nuestra experiencia, los hallazgos descritos revelan una íntima conexión de ambos sistemas y apoyan el hecho de que la activación de la vía alternante del complemento, ejerce una acción «facilitadora» del proceso de la coagulación sanguínea.

Fig. 3.— Aceleración de la coagulación sanguínea de plasmas incubados con Inulina, comparativamente con muestras basales.



BIBLIOGRAFÍA

1. ANGULO, P.; RECIO, M.; ARRATÍBEL, A.; CUESTA, B.; NJENGA, G., y LÓPEZ BORRASCA, A.: *Sangre* 18: 519, 1973.
2. FONG, J. S. C., y GOOD, R. A.: *J. Exp. Med.* 134: 642, 1971.
3. GEWURZ, H.; SHIN, H. S., y MERGENHAGEN, S. E.: *J. Exp. Med.* 128: 149, 1968.
4. GOODKOFKY, I., y LEPOW, I. H.: *J. Immunol.* 107: 1200, 1971.
5. GÖTZE, O., y MÜLLER-EBERHARD, H. J.: *J. Exp. Med.* 134: 90s, 1971.
6. GÖTZE, O., y MÜLLER-EBERHARD, H. J.: *N. Eng. J. Med.* 286: 180, 1972.
7. HEUSINKUELD, R. S.; LEDDY, J. P.; KLEMOERER, M. R., y BRECKENRIDGE, R. T.: *J. Clin. Invest.* 53: 554, 1974.
8. KANE, M. A.; MAY, J. E., y FRANK, M. M.: *J. Clin. Invest.* 52: 370, 1973.
9. LANDY, M., y PILLEMER, L.: *J. Exp. Med.* 104: 383, 1956.
10. MC KAY, D. G.; SAPHIRO, S. S., y SHANBERGE, M.: *J. Exp. Med.* 107: 369, 1958.
11. MÜLLER-EBERHARD, H. J.; NILSSON, V. R.; DALMASSO, A. P.; POLLEY, M. J., y CALCOT, M. A.: *Arch. Pathol.* 82: 205, 1966.
12. MÜLLER-EBERHARD, H. J.: *Fed. Proc.* 26: 744, 1967.
13. OLIVEIRA, B.; OSLER, A. G.; SIRAGANIAN, R. P., y SANDBERG, A. L.: *J. Immunol.* 104: 320, 1970.
14. OSLER, A. G., y SANDBERG, A. L.: *Progr. Allergy*: 17, 51, 1973.
15. PHILLIPS, J. K.; SYNDERMAN, R., y MERGENHAGEN, S. E.: *J. Immunol.* 109: 334, 1972.
16. PILLEMER, L.; SCHOENBERG, M. D.; BLUM, L., y WURZ, L.: *Science* 122: 545, 1955.
17. PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I. H.; ROSS, O. A.; TODD, E. W., y WARDLAW, A. C.: *Science* 120: 279, 1954.
18. PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I. N.; WURZ, L., y TODD, E. W.: *J. Exp. Med.* 103: 1, 1956.
19. ROBBIN, J., y STETSON, C. A. JR.: *J. Exp. Med.* 109: 1, 1959.
20. SANDBERG, A. L.; OSLER, A. G.; SHIN, H. S., y OLIVEIRA, B.: *J. Immunol.* 104: 329, 1970.
21. SIRAGANIAN, R. P.: *Nat. new Biol.* 239: 208, 1972.
22. ZIMMERMAN, T. S., y MÜLLER-EBERHARD, H. J.: *J. Exp. Med.* 134: 1601, 1971.
23. ZIMMERMAN, T. S.; ARROYAVE, C. M., y MÜLLER-EBERHARD, H. J.: *J. Exp. Med.* 134: 1591, 1971.