

## Estudio de la actividad del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), en plasma de pacientes con generación de trombina disminuida.

María Lucía D'Errico<sup>1,2</sup>, Norma de Bosch<sup>3</sup>, Arlette Ruiz-Saez<sup>3</sup>, Apsara Boadas<sup>3</sup>, Carlos Ibarra<sup>1</sup>, Ana María Salazar<sup>1</sup> y Belsy Guerrero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

<sup>3</sup> Centro Nacional de Hemofilia, Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital, Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** TAFI; hemofilia; FVIII; FVIIra; fibrinólisis; generación de trombina.

**Resumen.** El inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), es una proteína de la hemostasia que enlaza la coagulación y la fibrinólisis. El objetivo de este estudio fue establecer condiciones para evaluar el TAFI activado (TAFIa), en plasma de pacientes con generación de trombina (GT) endógena disminuida. Se estudiaron plasmas de 36 controles y 28 pacientes con hemofilia A severa (HAS), 18 sin inhibidores y 10 con inhibidores anti-FVIII; a nivel basal y en respuesta al tratamiento con concentrados de FVIII recombinante y con FVII recombinante activado, respectivamente. Se evaluó el TAFIa por ensayos colorimétricos, con la adición en la mezcla de activación del sustrato 5nM hipuril-arginina y diferentes concentraciones de trombina en presencia de 8nM de trombomodulina. Los resultados evidenciaron a nivel basal, en relación a los controles en los plasmas de pacientes con HAS valores disminuidos de GT y de TAFIa (activado con 20 nM de trombina) y una correlación positiva entre ambos parámetros; luego del tratamiento, los valores fueron similares a los controles, con mejor y más duradera respuesta en los pacientes sin inhibidores. Los valores de TAFIa a nivel basal en el plasma de pacientes con HAS, se normalizaron cuando se activó con concentraciones de trombina mayores o iguales a 120 nM. En conclusión, para estudiar TAFIa en plasma de pacientes con alteraciones de la coagulación asociadas a baja GT, en el ensayo se deben evaluar diversas concentraciones de trombina, para diferenciar una actividad de TAFIa disminuida de una incompleta activación, como lo observado en el plasma de pacientes con HAS.

## **Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) activity in plasma from patients with diminished endogenous thrombin generation.**

*Invest Clin 2019; 60 (2): 128-140*

**Key words:** TAFI; haemophilia; FVIII; rFVIIa; fibrinolysis; thrombin generation.

**Abstract.** Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is a hemostasis protein that acts as a link between coagulation and fibrinolysis. The aim of this study was to establish the conditions to evaluate the TAFI activity (TAFIa) in the plasma of patients with diminished endogenous thrombin generation (GT). The plasmas from 36 controls and 28 patients with severe hemophilia A (HAS, 18 without inhibitors and 10 with anti-FVIII inhibitors, treated on-demand with recombinant factor VIII concentrates and with recombinant activated factor VII, respectively) were studied, at baseline and in response to treatment. TAFIa was evaluated by colorimetric tests, being the most relevant modifications, the addition in the activation mixture of 5nM hypuril-arginine as substrate and different thrombin concentrations in the presence of 8nM thrombomodulin. The results showed that the plasma of patients, in relation to controls, have a decreased GT and TAFIa (using 20 nM thrombin as activator) at baseline, and a positive correlation between both parameters. After treatment, the values were similar to the controls, occurring the best and most lasting response in those patients without inhibitors. At baseline, TAFIa values in the plasma of HAS patients were normalized when  $\geq 120$  nM thrombin concentrations were used as activator. In conclusion, to study TAFIa in the plasma of patients with coagulation abnormalities associated to a low GT, diverse thrombin concentrations should be evaluated, in order to differentiate a diminished TAFIa from an incomplete zymogen activation, as observed in the plasma of patients with HAS.

*Recibido 13-09-2018 Aceptado 05-04-2019*

### **INTRODUCCIÓN**

El Inhibidor de la Fibrinólisis Activable por Trombina (TAFI), una proteína que circula en sangre como una pro-carboxipeptidasa, es activado por el complejo trombina/trombomodulina y en la hemostasia tiene como función modular la fibrinólisis, al disminuir la formación de los complejos fibrina/t-PA/plasminógeno, a través de la remoción de nuevos residuos de lisina y arginina C-terminales expuestos en la fibrina parcialmente degradada por la plasmina (1-4).

Bajo condiciones fisiológicas la concentración de trombina que se genera dentro del

coágulo formado, es suficiente para activar al TAFI. En desórdenes de la hemostasia por deficiencia congénita o hereditaria de algún factor que impida la formación adecuada del complejo "Tenasa Intrínseco", como la hemofilia A, se ha reportado una deficiente generación de trombina, enzima que además de transformar el fibrinógeno en fibrina, tiene otras funciones de gran importancia, como evitar la lisis prematura del coágulo mediante la activación del TAFI (5-9).

Para estudiar la actividad del TAFIa en patologías asociadas con una deficiente formación de trombina, se debe asegurar en el ensayo una completa activación del zimóge-

no, de allí que en el presente trabajo se establecieron las condiciones experimentales para determinar esta actividad en plasmas de pacientes con hemofilia A severa (HAS), que presentasen GT disminuida, a nivel basal y luego del tratamiento con concentrados de FVII activado de origen recombinante (FVIIra) o concentrados comerciales de FVIII recombinante de segunda generación (FVIIIr), según presentasen o no inhibidores de FVIII.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes

El presente trabajo se realizó con plasma de 28 pacientes con HAS, de edades entre 2 y 25 años ( $14,2 \pm 8,2$  años), con niveles de actividad de FVIII menor a 1 UI/dL, de los cuales 18 no presentaban inhibidores anti-FVIII y 10 presentaban entre 0,75 y 72 Unidades Bethesda/mL de inhibidores anti-FVIII. Además, se estudió el plasma de treinta y seis voluntarios sanos (36), con edades entre 19 y 50 años ( $34,2 \pm 10,2$  años), que no usaban medicamentos que afectasen la hemostasia y sin antecedentes de trombosis o trastornos hemorrágicos.

Como criterio de exclusión de los pacientes se usaron: haber recibido 72 horas antes de la toma de muestra tratamiento con FVIIIr o FVIIra; enfermedad hepática, VIH, traumas, infección bacteriana actual, cáncer o presencia de otros trastornos de la coagulación diferentes a la hemofilia. Ningún paciente fue tratado con medicamentos anti-fibrinolíticos, ni presentó episodios de sangrado durante el tiempo de estudio.

Los pacientes fueron controlados por los médicos especialistas en hemofilia, en la consulta hematológica del Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital, sede del Centro Nacional de Hemofilia de Venezuela. Los controles fueron donantes del Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital, estudiantes y personal del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Los pacientes y controles incluidos en este estudio, firmaron el consentimiento

para la participación, luego de explicarles el proyecto aprobado por los Comités de Bioética del IVIC y del Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital.

### Muestras

La sangre fue tomada por punción venosa y anti-coagulada con citrato trisódico al 3,8% a una relación 1:9. Seguidamente, fue centrifugada a 2000 g durante 10 minutos para obtener el plasma pobre en plaquetas, empleado para la determinación inmediata de los niveles de FVIII y el resto separado en alícuotas y congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta la realización de las otras pruebas.

A los pacientes con HAS sin inhibidores, se les tomaron cuatro muestras de sangre: a nivel basal (antes de recibir tratamiento) y a las 0,5, 4 y 24 horas después de recibir concentrados de FVIIIr, a dosis entre 50 y 60 UI/Kg de peso. A los pacientes con HAS que presentaron inhibidores se les tomaron tres muestras de sangre: a nivel basal y a las 0,5 y 2 horas después de recibir FVIIra, a dosis entre 90 - 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso. A los controles se les tomaron muestras de sangre a las 0, 0,5, 2, 4 y 24 horas.

### Materiales

Equipos: Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC; Waters Massachusetts, USA). Columna Vydac C18 5  $\mu\text{m}$  (100 x 4,6 mm) de Grace Davison Discovery Sciences (Illinois, USA). Lector de micro placas SUNRISE de TECAN Group Ltd (Seestrasse, Switzerland). Coatron M2 HAEMOSYS-ECA (Alemania).

Reactivos: Plasma deficiente en FVIII de Dade Behring Inc. (Delaware, USA). Cefalina activada CK PREST de Diagnostica Stago (Asnières sur Seine, Francia). Trombomodulina de pulmón de conejo (TM), TAFI purificado estándar, estuches de IMUCLONE TAFI ELISA y ACTICHROME PLASMA TAFI ACTIVITY, de Sekisui Diagnostics (Stamford, CT, USA). Acetonitrilo grado HPLC y dioxano, de Merck (Darmstadt, Alemania). Los estuches de THROGA fueron donados por

el Prof. Götz Nowak (Universidad Friedrich Schiller de la Facultad de Medicina de Jena, Alemania). Sustrato hipuril-arginina, trombina humana, cloruro cianúrico, inhibidor de carboxipeptidasa aislado de papa (CPI), ácido *o*-metilhipúrico, ácido hipúrico y otros reactivos, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

#### Factor VIII

Para evaluar la actividad del FVIII se utilizó el método de coagulación de una sola etapa (10). La cuantificación de los inhibidores de FVIII se realizó por el método de Kasper y col. (11), y fueron expresados en Unidades Bethesda/mL.

#### Fibrinógeno

La concentración de fibrinógeno circulante en plasma se determinó por el método gravimétrico de Ingram (12).

#### Generación de Trombina

La GT se determinó por el método THROGA, siguiendo las recomendaciones del estuche (Jena, Alemania). En este ensayo, se activó el plasma con factor tisular, fosfolípidos y calcio, en presencia de una cantidad determinada de hirudina y como referencia se utilizó una muestra de plasma sin activar en presencia de la misma concentración de hirudina. La cantidad de hirudina libre se determinó utilizando el ensayo cromogénico específico conocido como Ecarin Chromogenic Assay (ECA-H). La GT se calculó mediante la diferencia entre la hirudina libre en la muestra de referencia y la presente en la muestra que contiene el activador. Una unidad de trombina (UT) se consideró equivalente a una unidad de anti-trombina (U-AT) y la GT se reportó en UT/mL (13).

#### TAFI-Ag

Los niveles de TAFI-antígeno (TAFI-Ag) se determinaron por un ELISA, a través de un estuche de la casa comercial Sekisui Diagnostics (USA). La concentración de TAFI-Ag se calculó a través de una curva de referencia

con el estándar del estuche y los resultados se reportaron en %. El rango de valores de TAFI-Ag en plasmas normales según la casa comercial está entre 40-250 % (1).

#### TAFI funcional

Para evaluar la actividad del TAFIa fueron utilizados dos ensayos que emplean hipuril-arginina como sustrato, que determinan el ácido hipúrico liberado por la acción del TAFIa, colorimétricamente o por medio de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), que utiliza el ácido *o*-metilhipúrico como estándar interno.

Como principal modificación, en ambos ensayos se adicionó el sustrato a la mezcla de activación y se estudiaron diferentes concentraciones de trombina como activador. Para distinguir entre la actividad de la carboxipeptidasa constitutiva (CPN) y la del TAFIa, los ensayos se realizaron en presencia de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CPI. La actividad de TAFIa se determinó como la actividad de la carboxipeptidasa sensible al CPI y se calculó mediante la diferencia entre la actividad total (CPN + TAFI) en ausencia y en presencia de CPI.

##### *a) Ensayo colorimétrico*

Se realizó mediante modificación de la técnica descrita por Bouma y col. (14). Inicialmente, el ensayo se estandarizó con una mezcla de plasmas controles. Para la activación del TAFI, se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de plasma (diluido 1/8 con suero inactivado a 56°C durante 6 horas), con 20  $\mu\text{L}$  de mezcla de activación (preincubada 15 minutos a 37°C) que asegura una concentración final de 20 nM de trombina humana, 8 nM de trombomodulina, 20 mM de CaCl<sub>2</sub> y 5 mM de hipuril-arginina, en tampón 20 mM de HEPES, pH 7,4. Después de incubar a 37°C por 30 minutos la reacción se detuvo con 20  $\mu\text{L}$  de 1M de HCl. Para la determinación de la actividad del TAFIa, a temperatura ambiente se agregaron a la mezcla anterior 60  $\mu\text{L}$  de 1 M de NaOH, 25  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato salino 0,25 M, pH 8,3 y 60  $\mu\text{L}$  de cloruro cianúrico al 3% disuelto en dioxano (previamente deshi-

dratado). Después de 15 minutos, las proteínas desnaturalizadas y el exceso de cloruro cianúrico se eliminaron por centrifugación a 7000 g durante 4 minutos; del sobrenadante se tomaron 100  $\mu\text{L}$  que se transfirieron a una microplaca de poliestireno y por medio de un lector de microplacas se determinó la absorbancia a 405 nm. La actividad de TAFIa se calculó por medio de una curva de referencia con un estándar comercial de TAFIa y se reportó en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados de este ensayo se compararon con los obtenidos con un estuche de la casa comercial Sekisui Diagnostics, que emplea el mismo método.

#### b) Ensayo por CLAR

Se modificó la técnica descrita por Schatteman y col. (15). La activación del TAFI se realizó con las condiciones establecidas para el ensayo colorimétrico. Para la determinación de la actividad del TAFIa, a la muestra activada se le adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de 150  $\mu\text{M}$  de ácido *o*-metilhipúrico (estándar interno). Seguidamente el ácido hipúrico generado y el *o*-metilhipúrico, se extrajeron con 300  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo. Luego de centrifugación a 7000 g por 4 minutos; se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, se evaporaron y se disolvieron en 150  $\mu\text{L}$  de la fase móvil (850 mL de fosfato monobásico de potasio 10 mM pH 3,5 y 150 mL de acetonitrilo grado CLAR). Finalmente, 10  $\mu\text{L}$  de esta solución se inyectaron a una columna de fase inversa (C-18). La elución se realizó de modo isocrático con la fase móvil a 1 mL/minuto y se determinó la absorbancia del eluido a 228 nm. La curva estándar se preparó con ácido hipúrico entre 9 a 180  $\mu\text{M}$  en presencia del estándar interno. Una unidad de TAFIa fue definida como la cantidad de la enzima que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto a 37°C, bajo las condiciones de ensayo antes descritas.

#### Efecto de la GT sobre la actividad de TAFIa

Para evaluar si los valores bajos de GT encontrados en el plasma de pacientes con HAS,

influyen en la actividad de TAFIa a nivel basal, en la mezcla de activación del TAFI se ensayaron diferentes concentraciones de trombina (concentración final entre 5 a 240 nM), en presencia de 8 nM de trombosmodulina.

#### Análisis Estadístico

Se utilizó el programa GraphPad InStat (GraphPad software Inc., San Diego, California, USA.), con el cual se realizó un análisis de varianza para las observaciones repetidas y la prueba de *t-Student* para comparar los valores de TAFIa encontrados por los diferentes ensayos. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado. Las correlaciones se determinaron a través del coeficiente de correlación de Pearson (*r*).

## RESULTADOS

#### Factor VIII

La actividad del FVIII en el grupo control fue de  $97,50 \pm 8,03$  UI/dL. En cuanto a los pacientes con HAS que no presentaron inhibidores, a nivel basal fue de  $0,51 \pm 0,32$  UI/dL, la cual se encontró significativamente disminuida ( $p < 0,001$ ) en relación al control. Posterior al tratamiento con concentrados de FVIIIr, los niveles aumentaron significativamente a las 0,5 ( $71,97 \pm 23,29$  UI/dL) y 4 horas ( $40,53 \pm 13,01$  UI/dL) ( $p < 0,001$ ), con disminución nuevamente a las 24 horas ( $12,44 \pm 7,72$  UI/dL), sin llegar a los niveles basales (Tabla I).

#### Fibrinógeno

Los valores de fibrinógeno en los controles se encontraron entre 1,7 y 3,4 g/L, con una media de  $2,45 \pm 0,59$  g/L. En cuanto a los pacientes con HAS se encontraron entre 1,6 y 3,4 g/L, con una media de  $2,50 \pm 0,52$  g/L. En los pacientes sin inhibidores el valor fue  $2,38 \pm 0,49$  g/L y en los pacientes con inhibidores de  $2,75 \pm 0,56$  g/L (Tabla I). No se observaron diferencias significativas entre grupos, antes o después del tratamiento (datos no mostrados).

**TABLA I**  
ACTIVIDAD DE TAFIa, NIVELES DE TAFI-Ag Y DE FVIII, EN PLASMA DE PACIENTES CON HAS.

Muestra /Ensayo	FVIII (%)	Fg (g/L)	TAFIa ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		TAFI-Ag (%)	
	Coagulante		Colorimétrico	Sekisui Diagnostics	CLAR	Sekisui Diagnostics
Controles (n=36)	97,50 $\pm$ 8,03	2,45 $\pm$ 0,59	15,78 $\pm$ 2,47	14,96 $\pm$ 2,08	13,18 $\pm$ 2,05	132,22 $\pm$ 42,32
Pacientes sin inhibidores (n=18)	0,52 $\pm$ 0,32	2,38 $\pm$ 0,49	10,03 $\pm$ 1,44	7,60 $\pm$ 2,21	9,42 $\pm$ 2,19	124,53 $\pm$ 22,99
Pacientes con inhibidores (n=10)		2,75 $\pm$ 0,56	10,66 $\pm$ 1,09	8,11 $\pm$ 1,80	9,98 $\pm$ 2,03	152,94 $\pm$ 20,07

Fg: Fibrinógeno.

### Generación de trombina

La generación de trombina en los controles fue de 149,53  $\pm$  15,65 UT/mL. En los pacientes con HAS sin inhibidores, en condiciones basales se encontró significativamente disminuida (30,76  $\pm$  10,69 UT/mL) ( $p < 0,01$ ) en relación a los controles; posterior al tratamiento con concentrados de FVIIIr se observó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) a las 0,5 (93,29  $\pm$  45,07 UT/mL) y 4 horas (79,61  $\pm$  46,29 UT/mL); con una disminución a las 24 horas (41,62  $\pm$  8,88 UT/mL), valor que fue más elevado que el basal ( $p < 0,05$ ), (Fig. 1 A).

Los pacientes con HAS que desarrollaron inhibidores, a nivel basal presentaron una GT significativamente disminuida (16,68  $\pm$  9,99 UT/mL), en comparación a los controles ( $p < 0,001$ ) y a los pacientes sin inhibidores ( $p < 0,01$ ). Posterior al tratamiento con FVIIra se observó un aumento significativo a las 0,5 horas (38,31  $\pm$  8,02 UT/mL ( $p < 0,01$ ), con una disminución significativa a las 2 horas (29,06  $\pm$  9,02 UT/mL) ( $p < 0,05$ ), (Fig. 1 B).

### Actividad funcional de TAFIa

La Fig. 2 muestra la actividad de TAFIa por el ensayo colorimétrico. Los valores en el grupo control fueron de 15,78  $\pm$  2,47  $\mu\text{g}/\text{mL}$

mL, sin cambios significativos entre las distintas tomas de muestras. A nivel basal, en los pacientes con HAS sin inhibidores fueron de 10,33  $\pm$  1,44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y con inhibidores fueron de 10,66  $\pm$  1,09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En relación a los controles, la actividad en los plasmas de ambos grupos de pacientes se encontró significativamente disminuida ( $p < 0,01$ ).

Posterior al tratamiento, los valores de TAFIa en los pacientes con HAS sin inhibidores fueron de 13,67  $\pm$  2,57; 13,39  $\pm$  3,20 y 11,82  $\pm$  1,92  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 0,5, 4 y 24 horas, respectivamente. En los pacientes con inhibidores fueron de 14,48  $\pm$  1,25 y 14,05  $\pm$  1,36  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 0,5 y 2 horas, respectivamente. En comparación con los controles, en ambos grupos de pacientes aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ).

De esta misma manera, al emplear el estuche comercial que utiliza el mismo fundamento, en los pacientes con HAS a nivel basal se encontraron valores de 7,60  $\pm$  2,21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los que presentaron inhibidores y de 8,11  $\pm$  1,80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los pacientes sin inhibidores, actividad que se encontró disminuida en relación a los controles (16,06  $\pm$  2,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $p < 0,01$ ), (Tabla I).

Para corroborar la baja actividad de TAFIa observada en los pacientes con HAS a nivel basal, en relación a los controles,

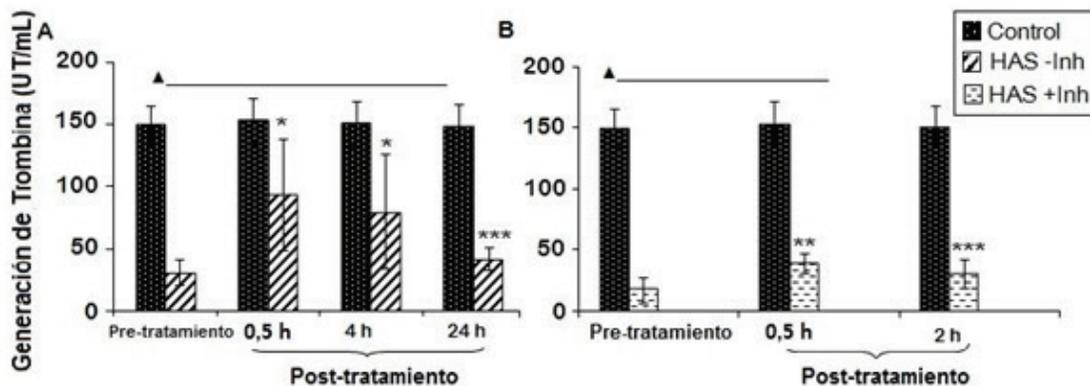


Fig. 1. Generación de trombina (GT) en plasma de pacientes con HAS. A) Sin inhibidores, n = 18; B) con inhibidores, n = 10. ▲ GT disminuida en condiciones basales, (n = 36), (p <0,01 sin inhibidores, p <0,001 con inhibidores). \* Aumento de GT, sin inhibidores a 0,5 y 4 horas después del tratamiento; \*\* con inhibidores a las 0,5 horas después del tratamiento (p <0,01); \*\*\* sin inhibidores a las 24 horas en relación a 0,5 y 4 horas después del tratamiento (p <0,05) y con inhibidores a las 2 horas en comparación a las 0,5 horas después del tratamiento

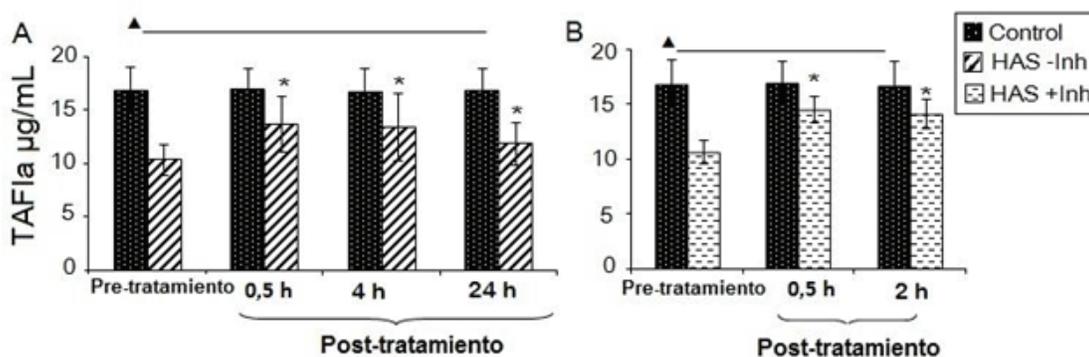


Fig. 2. Actividad de TAFIa (ensayo colorimétrico), en plasma de pacientes con HAS. A) Sin inhibidores; B) con inhibidores. TAFIa (µg/mL) en condiciones pos-tratamiento con FVIII o FVIIra. Comparación entre grupos: ▲ Actividad disminuida en condiciones basales, en relación a los controles, n = 36 (p <0,01). \* Aumento de la actividad en pacientes (p <0,01).

se realizaron las determinaciones por medio del ensayo que emplea CLAR, que utiliza equipos con sistemas de detección más sensibles. Los valores obtenidos fueron de  $14,98 \pm 2,05 \mu\text{g/mL}$  en los controles, de  $9,42 \pm 2,19 \mu\text{g/mL}$  en los pacientes sin inhibidores y de  $9,98 \pm 2,03 \mu\text{g/mL}$  en los pacientes con inhibidores. En los pacientes estos valores fueron significativamente menores en relación a los controles (p < 0,01), (Tabla I).

Los valores de TAFIa en los pacientes a nivel basal encontrados con los diferentes ensayos (colorimétrico, estuche comercial y CLAR), no mostraron diferencias significativas.

#### Efecto de la GT sobre la actividad de TAFIa

Para determinar si la baja actividad de TAFIa en los pacientes a nivel basal, es debida a una incompleta activación del zimógeno, fueron ensayadas diferentes concentraciones de

trombina en la mezcla de activación, sin modificar la concentración de trombomodulina. Los valores de TAFIa obtenidos en una mezcla de plasmas de pacientes con HAS a una concentración de trombina de 120 nM ( $15,03 \pm 2,12$  y  $14,16 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$ , en pacientes sin y con inhibidores, respectivamente) fueron similares a los observados en el plasma control ( $15,78 \pm 2,47 \mu\text{g/mL}$ ) en presencia de 20 nM trombina ( $p < 0,05$ ). La actividad de TAFIa en los controles fue similar con las diferentes concentraciones de trombina evaluadas (Fig. 3).

### Correlaciones

Los resultados obtenidos en condiciones basales para los diferentes parámetros fueron comparados. En los pacientes con HAS sin inhibidores se encontró una correlación positiva entre FVIII y TAFIa ( $r = 0,4176$ ,  $p < 0,01$ ). Adicionalmente, se observó una correlación positiva entre GT y TAFIa ( $r = 0,5742$ ,  $p < 0,01$  en pacientes sin inhibidores; y de  $r = 0,5025$ ,  $p < 0,005$  en pacientes con inhibidores), (Fig. 4).

### DISCUSIÓN

El balance entre los sistemas de la coagulación y la fibrinólisis asegura una hemo-

stasia normal. Durante el proceso de la coagulación, suficientes cantidades de trombina son generadas, lo que asegura la formación de una malla de fibrina estable y la regulación de la fibrinólisis vía el TAFI (3,7,16,17). En patologías asociadas a una deficiente formación de trombina donde existan evidencias de una defectuosa activación del TAFI, el estudio de su actividad puede ayudar a entender mecanismos que expliquen la evolución de los pacientes.

En el presente trabajo se establecieron las condiciones para evaluar la actividad de TAFIa en muestras de plasmas de pacientes con deficiencia en las fases de propagación y amplificación de la coagulación, tomando como modelo a un grupo de pacientes con HAS con y sin inhibidores, a nivel basal y después del tratamiento con FVIIra o FVIIIr, respectivamente, así como los niveles de TAFI-Ag, y la correlación de los resultados con la GT y los niveles de FVIII.

La GT se evaluó por el método THROGA, que determina la trombina mediante la utilización de hirudina, un inhibidor de alta afinidad por esta enzima que forma un complejo estequiométrico 1:1 (13). En el presente estudio, los valores de GT en el plasma de los controles fueron similares a los reporta-

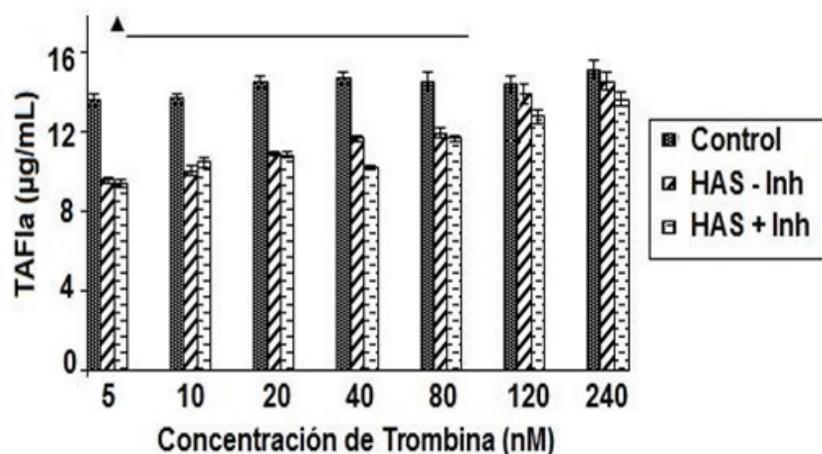


Fig. 3. Influencia de la concentración de trombina en la actividad de TAFIa (ensayo colorimétrico). TAFIa ( $\mu\text{g/mL}$ ) vs concentraciones de trombina. Comparación entre grupos:  $\blacktriangle$  Actividad disminuida en plasmas del paciente en relación con los controles (activación con 20 nM de trombina), ( $p < 0,05$ ). \* Actividad en plasmas de pacientes (trombina  $\geq 120$  nM) similar a los controles),  $p < 0,05$ ).

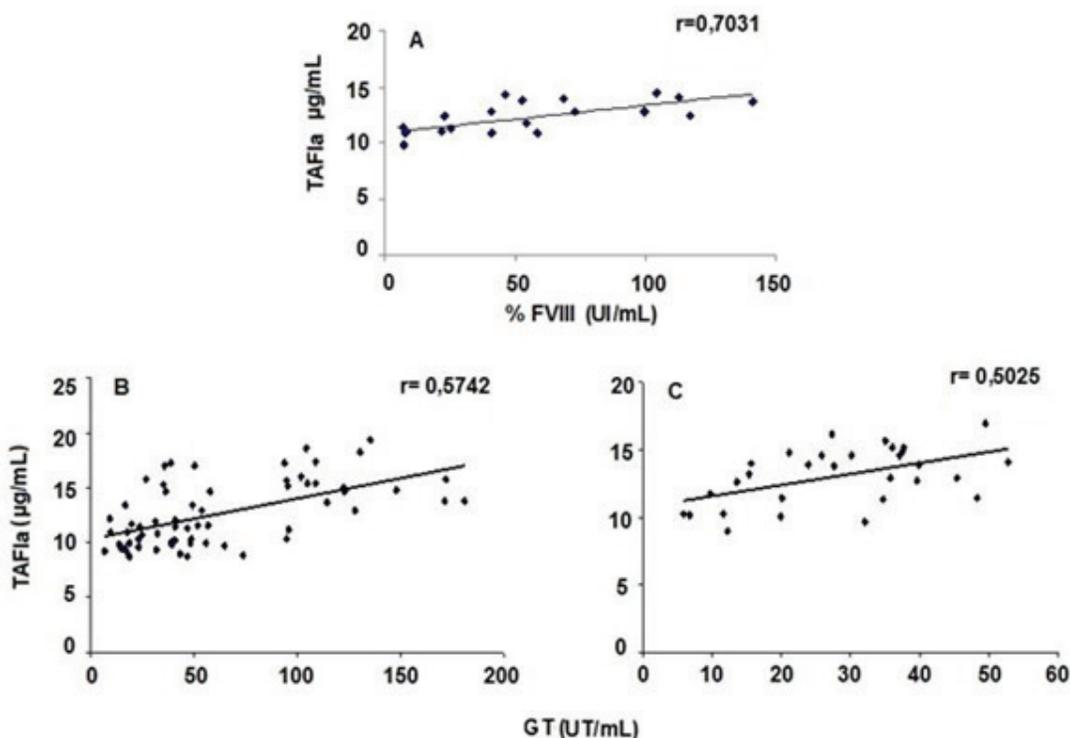


Fig. 4. Correlaciones. TAFIa y FVIII (A), TAFIa y GT en pacientes con HAS sin inhibidores (B), con inhibidores (C).

dos por Nowak y col. (13) ( $126,4 \pm 23,7$  UT/mL), al emplear el mismo método en plasmas de 50 controles con edades comprendidas entre 19 y 65 años.

En los pacientes con HAS, a nivel basal la GT se encontró disminuida en relación al grupo control, con valores más bajos en el grupo que presentaban inhibidores. A este respecto, un estudio reciente de Mancuso y col. (18), reportó en pacientes con hemofilia A severa con inhibidores, una capacidad muy reducida de GT en comparación a los pacientes sin inhibidores, evaluada por el método fluorogénico de Hemker y col. (19), que es ampliamente utilizado.

En respuesta al tratamiento, en el presente estudio se evidenció en los pacientes con HAS sin inhibidores que la infusión de FVIIIr aumentó significativamente la GT a las 0,5 y 4 horas; con los valores más altos a las 0,5 horas, los cuales decayeron a las 24 horas, sin llegar a los niveles basales, lo que

se correlacionó con los niveles de FVIII. En los pacientes con inhibidores, el tratamiento con FVIIra indujo un menor incremento en la GT, en comparación a los controles.

En estudios previos, Brummel-Ziedins y col. (20), reportaron una baja GT en pacientes con hemofilia A, evaluada por un ELISA. Por su parte, Dargaud y col. (9), evaluaron la GT por un método fluorogénico y encontraron que se correlacionó positivamente con los niveles de FVIII/FIX; en los pacientes con hemofilia A, 3 horas después del tratamiento con FVIII, la GT era normal con disminución de los valores a las 24 horas, sin llegar al nivel basal. Eichinger y col. (22), en pacientes con hemofilia A que presentaban inhibidores, evaluaron la GT también por un método fluorogénico, y encontraron a nivel basal valores muy bajos en relación a los controles [ $0,12$  ( $0,0-0,6$ ) vs.  $186,9$  ( $116,0-254,4$ ) nM]; los cuales se incrementaron a  $40,7$  ( $28,3-51,6$ ) nM 30 minutos después del tratamien-

to con FVIIra, valores que se mantuvieron por un periodo de 4 horas. Estos hallazgos muestran que el método de THROGA usado en el presente estudio para evaluar la GT, al igual que los métodos empleados en la literatura, fue capaz de detectar la baja GT en plasma de pacientes con hemofilia.

El presente trabajo muestra los primeros valores de actividad y niveles antigénicos de TAFI en la población venezolana, los cuales se encontraron dentro del rango reportado en la literatura (1, 15, 22-34) y pueden servir de referencia para trabajos posteriores.

Los resultados aquí presentados, así como los reportados en trabajos previos, mostraron en plasma de pacientes con HAS una disminuida actividad del TAFIa a nivel basal. Se ha sido sugerido que el sangrado en pacientes con hemofilia es debido a un defecto en la activación de la protrombina así como a una fibrinólisis aumentada. A este respecto, Foley y col. (35, 36), evidenciaron que la activación de TAFI en pacientes con hemofilia está relacionada con la GT; y demostraron que en sangre total se requieren entre 5 y 11% de actividad coagulante del FVIII para normalizar la activación del TAFI, en contraste al 50% requerido en plasma. Adicionalmente, evidenciaron que el sangrado en los pacientes con hemofilia A severa se relacionó con la actividad de TAFI. A este respecto, recientemente en un trabajo de Wyseure y col. (37), reportaron que, en ratones con hemofilia A congénita, el sangrado en articulaciones está asociado a la generación de trombina requerida en el sitio de la lesión, para una adecuada activación del TAFI.

En respuesta al tratamiento, la actividad de TAFIa en el plasma de los pacientes aquí evaluados, se incrementó significativamente, sin alcanzar los valores de los controles. En los pacientes con HAS sin inhibidores, a las 24 horas post-tratamiento la actividad decayó sin llegar a los valores basales, lo que se correlacionó con los niveles de FVIII. Este

aumento de TAFIa post-tratamiento se correlacionó con el aumento en la GT.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los concentrados de FVIIIr o FVIIra mejoran la GT y pueden influir en la respuesta fibrinolítica o en la actividad/niveles de TAFI (9, 17, 34, 38-41). Los niveles de FVIII alcanzados en los pacientes con HAS tratados a demanda con concentrados de FVIIIr podrían ser suficientes para normalizar la generación trombina a concentraciones que mejoren la estructura del coágulo de fibrina y aumenten la actividad del TAFI (34,40). Por su parte, el FVIIra empleado para el tratamiento de pacientes con hemofilia que desarrollen inhibidores contra FVIII, induce un aumento de la GT que asegura la formación de un coágulo de fibrina resistente a la lisis prematura (41).

En la literatura existen grandes variaciones de la actividad de TAFIa, debido probablemente al origen de la población, a los estándares usados para reportar la actividad, así como a los diferentes ensayos utilizados. La activación de TAFI es un proceso que requiere concentraciones adecuadas de trombina, que varían en presencia de trombomodulina, cofactor requerido para una adecuada activación (42-44). Otra de las limitantes en los ensayos, incluye la inestabilidad de la actividad enzimática del TAFIa, que es inactivado por proteólisis y principalmente por cambios de conformación inducidos por un proceso espontáneo dependiente de la temperatura; esta enzima tiene una vida media de 10 minutos a 37°C y de 2 horas a temperatura ambiente (44-48).

En el presente estudio la actividad de TAFIa se evaluó por ensayos que utilizan hipuril-arginina como sustrato y su cuantificación colorimétrica con cloruro cianhídrico o por CLAR. Debido a la inestabilidad del TAFIa, la modificación más relevante fue la incorporación del sustrato a la mezcla de activación antes de la formación del coágulo, para asegurar que la enzima actúe antes de ser inactivada.

La correlación positiva entre TAFIa y GT en los pacientes con HAS a nivel basal, llevó a evaluar el papel de la GT endógena en la determinación de la actividad de TAFIa, para lo cual se ensayaron diferentes concentraciones de trombina en la mezcla de activación. Los resultados evidenciaron que la completa activación del TAFI, en el plasma de los controles se alcanzó con 20 nM de trombina y 8 nM de trombomodulina, tal y como está reportado en la literatura. En contraste con el plasma de los pacientes con HAS fueron requeridas concentraciones iguales o mayores a 120 nM de trombina en presencia de 8 nM de trombomodulina. A este respecto, en un estudio realizado por Bouma y col. (14), con plasma deficiente de protrombina, encontraron que para lograr una actividad de TAFI semejante al plasma normal, era necesario adicionar 640 nM de trombina, en contraste con los 20 nM requeridos en el método estandarizado para controles.

Los presentes hallazgos sugieren que en los ensayos para evaluar la actividad de TAFIa, en plasmas de pacientes con deficiencias en las fases de amplificación/propagación de la coagulación, para asegurar una completa activación del zimógeno, se requieren concentraciones de trombina similares a la generada en plasmas normales, para así diferenciar entre una baja actividad de TAFIa de una parcial activación asociada a una GT endógena disminuida, como es el caso de la hemofilia, modelo utilizado en el presente estudio.

#### AGRADECIMIENTO

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

#### REFERENCIAS

1. Mosnier LO, von dem Borne PA, Meijers JC, Bouma BN. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Haemost* 1998; 80:829-835.
2. Nesheim M, Leurs J, Hendriks D. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and procarboxipeptidase U. En: Colman RW. Eds. *Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practice*. Fifth Edition 2006. P 381-394.
3. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev* 2007; 21:131-142.
4. Vereauteren E, Gils A, Declercq PJ. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: a putative target to enhance fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39:365-372.
5. Butenas S, Brummel KE, Branda RF, Paradis SG, Mann KG. Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood* 2002; 99:923-930.
6. Knecht W, Willemsse J, Stenhamre H, Andersson M, Berntsson P, Furebring C, Harryson A, Hager AC, Wissing BM, Hendriks D, Cronet P. Limited mutagenesis increases the stability of human carboxipeptidase U (TAFIa) and demonstrates the importance of CPU stability over proCPU concentration in down-regulating fibrinolysis. *FEBS J* 2006; 273:778-792.
7. Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2445-2453.
8. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 2009; 108:1433-1446.
9. Dargaud Y, Lienhart A, Negrier C. Prospective assessment of thrombin generation test for dose monitoring of bypassing therapy in hemophilia patients with inhibitors undergoing elective surgery. *Blood* 2010; 116:5734-5737.
10. Giddings JC. Hereditary coagulation disorders: laboratory techniques. En Thomson JM *Blood Coagulation and Haemostasis*. Eds. Churchill Livingstone, London, Edinburgh; 1980. P 117-157.
11. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Levine P, Lazerson J, McMillan C, Penner J,

- Shapiro S, Shulman NR.** Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34:612.
12. **Ingram IC.** The determination of plasma fibrinogen by the clot-weight method. *Biochem J* 1952; 51: 583-585.
  13. **Nowak G, Lange U, Wiesenbürg A, Bucha E.** Measurement of maximum thrombin generation capacity in blood and plasma using the thrombin generation assay (THROGA). *Semin Thromb Haemost* 2007; 33:508-514.
  14. **Bouma BN, Mosnier LO, Meijers JC, Griffin JH.** Factor XI dependent and independent activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in plasma associated with clot formation. *Thromb Haemost* 1999; 82:1703-1708.
  15. **Schatteman KA, Goosens FJ, Scharpé SS, Neels HM, Hendriks DF.** Assay of procarboxypeptidase U, a novel determinant of the fibrinolytic cascade, in human plasma. *Clin Chem* 1999; 45:807-813.
  16. **Broze GJ Jr, Higuchi DA.** Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma. *Blood* 1996; 88:3815-3823.
  17. **Wolberg AS, Campbell RA.** Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci* 2008; 38:15-23.
  18. **Mancuso ME, Chantarangkul V, Clerici M, Fasulo MR, Padovan L, Scalabrino E, Peyvandi F, Tripodi A, Santagostino E.** The thrombin generation assay distinguishes inhibitor from non-inhibitor patients with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2016; 22:286-291.
  19. **Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S.** Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33:4-15.
  20. **Brummel-Ziedins KE, Whelihan MF, Gissel M, Mann KG, Rivard GE.** Thrombin generation and bleeding in haemophilia A. *Haemophilia* 2009; 15:1118-1125.
  21. **Eichinger S, Lubczyk B, Kollars M, Traby L, Zwiauer K, Gleiss A, Quehenberger P, Kyrle PA.** Thrombin generation in haemophilia A patients with factor VIII inhibitors after infusion of recombinant factor VIIa. *Eur J Clin Invest* 2009; 39:707-713.
  22. **Antovic JP, Schulman S, An SS, Greenfield RS, Blombäck 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; 64:745-751.
  23. **Cetinkalp S, Tobu M, Karadeniz M, Buyukkeçeci F, Yilmaz C.** The effect of hormone replacement treatment on thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activity levels in patients with Hashimoto thyroiditis. *Inter Med* 2009; 48:281-285.
  24. **Frère C, Morange PE, Saut N, Tregouet DA, Grosley M, Beltran J, Juhan-Vague I, Alessi MC.** Quantification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene polymorphism effects on plasma levels of TAFI measured with assays insensitive to isoform-dependent artefact. *Thromb Haemost* 2005; 94:373-379.
  25. **Willemse J, Leurs J, Verkerk R, Hendriks D.** Development of a fast kinetic method for the determination of carboxypeptidase U (TAFIa) using C-terminal arginine containing peptides as substrate. *Anal Biochem* 2005; 340:106-112.
  26. **Leurs J, Hendriks D.** Carboxypeptidase U (TAFIa): a metalloprotease with a distinct role in haemostasis and a possible risk factor for thrombotic disease. *Thromb Haemost* 2005; 94:471-487.
  27. **Bajzar L, Morser J, Nesheim M.** TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996; 271:16603-16608.
  28. **Juhan-Vague I, Renucci JF, Grimaux M, Morange PE, Gouvernet J, Gourmelin Y, Alessi MC.** Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2156-2161.
  29. **Chetaille P, Alessi MC, Kouassi D, Morange PE, Juhan-Vague I.** Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2000; 83:902-905.
  30. **Antovic J, Schulman S, Eelde A, Blombäck M.** Total thrombin-activatable fibrino-

- lysis inhibitor (TAFI) antigen and pro-TAFI in patients with haemophilia A. *Haemophilia* 2001; 7:557-560.
31. **Antovic JP, Yngen M, Ostenson CG, Antovic A, Wallen HN, Jorneskög G, Blombäck M.** Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and hemostatic changes in patients with type I diabetes mellitus with and without microvascular complications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14:551-556.
  32. **van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM.** Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95:2855-2859.
  33. **Mikovic D, Woodhams BJ, Holmström M, Elezovic I, Antovic A, Mobarrez F, Elfvinge P, Antovic JP.** On-demand but not prophylactic treatment with FVIII concentrate increase thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation in severe haemophilia A patients. *Int J Lab Hematol* 2012; 34:35-40.
  34. **Gebhart J, Kepa S, Hofer S, Koder S, Kaider A, Wolberg AS, Haslacher H, Quehenberger P, Eigenbauer E, Panzer S, Mannhalter C, Pabinger I.** Fibrinolysis in patients with a mild-to-moderate bleeding tendency of unknown cause. *Ann Hematol* 2017; 96:489-495.
  35. **Foley JH, Nesheim ME, Rivard GE, Brummel-Ziedins KE.** Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation and bleeding in haemophilia A. *Haemophilia* 2012; 18:e316-322.
  36. **Foley JH, Nesheim ME.** Soluble thrombomodulin partially corrects the premature lysis defect in FVIII-deficient plasma by stimulating the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* 2009; 7:453-459.
  37. **Wyseure T, Cooke EJ, Declercq PJ, Behrendt N, Meijers JCM, von Drygalski A, Mosnier LO.** Defective TAFI activation in hemophilia A mice is a major contributor to joint bleeding. *Blood* 2018; 132:1593-1603.
  38. **Mosnier LO, Lisman T, von den Berg HM, Nieuwenhuis HK, Meijers JC, Bouma BN.** The defective down regulation of fibrinolysis in haemophilia A can be restored by increasing the TAFI plasma concentration. *Thromb Haemost* 2001; 86:1035-1039.
  39. **Lewis SJ, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway LS, Knipping J, Collins PW.** Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *Br J Haematol* 2007; 138:775-782.
  40. **Antovic A, Mikovic D, Elezovic I, Zabezyk M, Huttenby K, Antovic JP.** Improvement of fibrin clot structure after factor VIII injection in haemophilia A patients treated on demand. *Thromb Haemost* 2014; 111:656-661.
  41. **Hedner U.** Recombinant factor VIIa: its background, development and clinical use. *Curr Opin Hematol* 2007; 14:225-229.
  42. **Wang W, Nagashima M, Schneider M, Morser J, Nesheim M.** Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombin-activable fibrinolysis inhibitor activation. *J Biol Chem* 2000; 275:22942-22947.
  43. **Mosnier LO, Bouma BN.** Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2445-2453.
  44. **Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, Meijers JC.** Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxipeptidase B, procarboxipeptidase R, procarboxipeptidase U). *Thromb Res* 2001; 101:329-354.
  45. **Hendriks D, Scharpé S, van Sande M, Lomaert MP.** Characterisation of a carboxypeptidase in human serum distinct from carboxypeptidase N. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27:277-285.
  46. **Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME.** Plasma and recombinant thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J Biol Chem* 1998; 273:2127-2135.
  47. **Boffa MB, Koschinsky ML.** Curiouser and curiouser: recent advances in measurement of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding its molecular genetics, gene regulation, and biological roles. *Clin Biochem* 2007; 40:431-442.
  48. **Plug T, Meijers JC.** Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost* 2016;14:633-644.