

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

María Navarro¹, Vanessa Nabki², José Ochoa², Esther Ostia², Gustavo Crespo³,
Luis Pérez-Ybarra⁴, Mercedes López⁵, Mildred Lupi⁶

RESUMEN: *La Artritis Reumatoide (AR) y el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), son Enfermedades Reumáticas Sistémicas (ERS), caracterizadas por trastornos inflamatorios auto-inmunitarios. Los pacientes con ERS tienen una expectativa de vida reducida, 50% de la mortalidad atribuido a las enfermedades aterotrombóticas motivado a un desequilibrio entre factores inflamatorios y hemostáticos. El objetivo del estudio fue asociar la generación de trombina con biomarcadores de inflamación y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con LES y AR que acudieron al Servicio de Reumatología del Hospital Central de Maracay, entre julio-noviembre de 2016. Investigación descriptiva de tipo transversal. La muestra estuvo conformada por 20 pacientes con LES, 20 con AR y 20 individuos aparentemente sanos. Se determinaron los índices antropométricos, perfil lipídico, biomarcadores de inflamación (fibrinógeno (Fg), proteína C reactiva (PCR), IL-6, IL-8, VSG, leucocitos) y generación de trombina (GT). La concentración de GT no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Los promedios obtenidos de los biomarcadores de inflamación, colesterol total, LDL-c, VLD-c, triglicéridos entre los grupos con AR y LES fueron estadísticamente iguales entre sí y mayores al control; y para HDL-c el grupo control presentó la mayor media, seguido de AR y LES. Se encontró en pacientes con AR una correlación negativa estadísticamente significativa entre GT y la HDL-c, y en LES una asociación directamente proporcional y estadísticamente significativa entre la generación de trombina con IL-6 y VSG. Los pacientes con AR y LES presentaban un estado inflamatorio crónico, dislipidemia, y sin incremento en la concentración plasmática de generación de trombina.*

Palabras clave: *enfermedad reumática, inflamación, riesgo cardiovascular, trombina*

ABSTRACT: *Rheumatoid Arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) are systemic rheumatic diseases (SRS) characterized by autoimmune inflammatory disorders. Patients with SRS have a reduced life expectancy, 50% of the mortality attributed to atherothrombotic diseases motivated by an imbalance between inflammatory and hemostatic factors. The aim of this study was to associate the generation of thrombin with*

inflammation biomarkers and cardiovascular risk factors in patients with SLE and RA who attended the Rheumatology Service of the Central Hospital of Maracay, July-November 2016. Descriptive research of cross-sectional type. The sample consisted of 20 patients with SLE, 20 with RA and 20 apparently healthy individuals. Were determined the anthropometric indexes, lipid profile, inflammation biomarkers (fibrinogen (Fg), C-reactive protein (PCR), IL-6, IL-8, VSG, leukocytes) and thrombin generation (TG). The concentration of TG did not show statistically significant differences between the study groups. The averages obtained from the biomarkers of inflammation, total cholesterol, LDL-c, VLD-c, triglycerides between the groups with RA and SLE were statistically equal to each other and greater than the control; and for HDL-c the control group presented the highest mean, followed by RA and LES. In patients with RA was found a statistically significant negative correlation between GT and HDL-c, and in SLE a directly proportional and statistically significant association between the generation of thrombin with IL-6 and ESR. Patients with RA and SLE presented a chronic inflammatory state, dyslipidemia and without increase in the plasma concentration of thrombin generation.

Key words: *rheumatic disease, inflammation, cardiovascular risk, thrombin*

1. Profesor Asociado. Doctor en Ciencias mención Bioquímica. Unidad de Investigación de Lípidos y Lipoproteínas. Departamento Clínico Integral. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo sede Aragua.

2. Licenciado en Bioanálisis. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo sede Aragua.

3. Licenciado en Bioanálisis. Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular. Centro de Biofísica y Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigación Científica.

4. Profesor Asociado. *Magister Scientiarum* en Estadística. Departamento de Ciencias Básicas. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo sede Aragua.

5. Licenciada en educación Mención Biología. Doctor en Ciencias mención

Bioquímica. Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular. Centro de Biofísica y Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigación Científica.

6. Profesor Instructor Contratado. Doctor en Ciencia Gerenciales. Departamento Clínico Integral. Escuela de Bioanálisis. Universidad de Carabobo sede Aragua. Hospital Central de Maracay.

Recibido: 19-03-19

Aceptado: 13-06-19

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reumáticas sistémicas (ERS) como la artritis reumatoidea (AR) y el lupus

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

eritematoso sistémicos (LES), se han asociado con aumento de la morbimortalidad cardiovascular y aterosclerosis acelerada¹. La AR afecta al 0,5-1% de la población, presenta una mortalidad de 1,3 a 3 veces superior a la población general y destaca la mortalidad de origen cardiovascular con un 40-50%². En los pacientes con LES, la prevalencia de eventos cardiovasculares es de 6-10% y la incidencia anual es de 1,2-1,5%^{3,4}.

Hipertensión, diabetes mellitus, obesidad y dislipidemia (factores clásicos de riesgo cardiovascular) tienen un rol importante en la aterogénesis y en el desarrollo de ECV. Sin embargo, estos factores por sí solos, no explican la patogenia de los trastornos cardiovasculares en LES y AR, debido a sus caracteres multifactoriales. Existen factores de riesgo cardiovascular propios de la enfermedad que en conjunto favorecen una mayor incidencia de desarrollar ECV en estos pacientes (duración del tratamiento con glucocorticoides, mayor edad en el momento del diagnóstico y tiempo de

evolución de la enfermedad)⁵. Además, el estado inflamatorio crónico asociado a estas patologías, es considerado un factor determinante en la patogénesis de la aterotrombosis, en donde interviene una compleja red de mediadores inmunológicos, procoagulantes (generación de trombina, fibrinógeno) componentes inflamatorios (IL-6, IL-8, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular) y el estrés oxidativo, todos ellos conducentes a la activación del complemento, el daño endotelial y a la leucocitosis, favoreciendo el desarrollo de trombosis y aterosclerosis en pacientes diagnosticados con estas enfermedades^{6,7}.

El proceso inflamatoria en curso de los pacientes con ERS favorece la expresión del factor tisular (FT) en las células endoteliales, promoviendo la generación de trombina, proteasa de serina que actúa como mediador en la fisiopatología de las enfermedades vasculares, ya que en condiciones patológicas como en las enfermedades reumáticas pasa de ser un regulador fisiológico de la

hemostasia a ser un mediador inflamatorio, dando como resultado cambios proinflamatorios y protrombóticos que están involucrados en el desarrollo y la progresión de la enfermedad arterial. El papel de la trombina en las lesiones vasculares y la aterosclerosis se ha atribuido no solo a la formación de trombos, sino también a su capacidad para actuar como potente activador de plaquetas, estimula la proliferación de células musculares lisas vasculares, escisión de proteínas del complemento C3 y C5a, entre otros. Mencionados efectos son mediados por la trombina a través de la activación de los receptores activados por trombina, los cuales son expresados en células endoteliales, células musculares lisas vasculares, neuronas del sistema nervioso central y periférico bajo condiciones fisiológicas, como también, se activan bajo condiciones patológicas (formación de trombos, inflamación, lesión tisular, cáncer, entre otras) ⁸.

Los ensayos de generación de trombina, que evalúan el potencial de

un plasma para formar trombina, pueden proporcionar información útil sobre la tendencia protrombótica de un paciente. Hasta ahora, solo un número limitado de estudios ha investigado la relación entre la generación de trombina y las enfermedades cardiovasculares, sin embargo, se observan efectos sobre la generación de trombina que se conectan con la aterosclerosis y aterotrombosis ⁹.

Sobre la base de las consideraciones anteriores y teniendo en cuenta que en Venezuela no se han realizado estudios previos sobre la generación de trombina, se realizó la presente investigación con el objetivo de asociar generación de trombina con biomarcadores de inflamación y factores de riesgo cardiovascular en individuos con lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

MÉTODOS

La investigación fue de tipo descriptiva con un diseño transversal. La población estuvo constituida por pacientes que acudieron al Servicio

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

de Reumatología del Hospital Central de Maracay, entre julio y noviembre de 2016. La muestra estuvo conformada por 20 pacientes diagnosticados con LES, 20 pacientes diagnosticados con AR y 20 individuos aparentemente sanos (grupo control). El muestreo fue no probabilístico, ya que los participantes cumplieron con criterios de inclusión (diagnóstico previo de LES y AR, edades comprendidas entre 18 y 55 años de edad) y de exclusión (mujeres embarazadas, con tratamiento oral con anticoagulantes, enfermedades cardiovasculares, renales y/o hepáticos, con periodos trombóticos menor a tres meses e infecciones recientes). Los pacientes seleccionados fueron contactados e informados de la investigación. Aquellos que manifestaron su deseo a participar voluntariamente, se les incluyó en el estudio y firmaron un consentimiento informado escrito, avalado por el comité de bioética del centro hospitalario. Adicionalmente, a estos pacientes se les realizó una encuesta clínica-epidemiológica con

el objetivo de obtener datos clínicos relevantes para la investigación.

A cada paciente se le extrajeron 10 mL de sangre en condiciones de ayuno de 8 horas, mediante punción endovenosa con previa asepsia de la región antebraquial. La distribución de la muestra de sangre se realizó de la siguiente manera: 1) 3 mL de la sangre se mezclaron con citrato de sodio al 3,8% p/v en una proporción 1:9. Luego, a fin de obtener plasma la muestra fue centrifugada a 3.500 revoluciones por 15 minutos, empleando una centrifuga refrigerada a 4°C. Esta muestra de plasma fue utilizada para determinar la concentración de generación de trombina y de fibrinógeno (Fg). 2) 3 mL de sangre se mezclaron con EDTA-K₂ en una proporción 1:4 para la determinación de conteo total de glóbulos blancos y determinar la velocidad de sedimentación globular (VSG). 3) El volumen de sangre restante se recolectó en un tubo de ensayo sin anticoagulante. Una vez ocurrida la retracción del coagulo, la muestra fue centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue

separado del paquete globular una vez finalizado el proceso de centrifugación. En la muestra de suero obtenida fue determinada la concentración de colesterol total, triglicéridos, lipoproteína de alta densidad (HDL-c, por sus siglas en inglés *High Density Lipoprotein cholesterol*), proteína C reactiva ultrasensible (PCRus), IL-6 e IL-8.

Para calcular el índice de masa corporal (IMC), se determinó el peso con una balanza Health-Meter, previamente calibrada, con el paciente descalzo y en ropa ligera; los valores obtenidos se expresaron en kilogramos (Kg). Para obtener la talla se empleó el tallímetro y las medidas obtenidas se expresaron en metros cuadrados (m²). Se calculó el IMC por la fórmula peso/talla (Kg/m²), considerándose déficit <18,5 Kg/m²; normal 18,5 a 24,9 Kg/m²; sobrepeso 25 a 29,9 Kg/m² y obesidad > 30 Kg/m² ¹⁰.

El índice cintura/cadera (ICC), se obtuvo midiendo el perímetro de la cintura a la altura de la última costilla flotante y el perímetro máximo de la cadera a nivel de los glúteos. Se

consideraron valores de 0,71 a 0,85 normales para mujeres y de 0,78 a 0,94 normales para hombres ¹¹.

Para la medición de la tensión arterial, se utilizó el método indirecto de auscultación de la arteria braquial con un estetoscopio y un esfigmomanómetro anerode (Lumiscop), efectuándose dos mediciones posteriormente promediadas; la primera fue con un descanso previo de 5 minutos y la segunda 5 minutos después. Se consideró estado de hipertensión arterial (HTA) valores de presión arterial sistólica (PAS) > 140 mmHg o presión arterial diastólica (PAD) >90 mmHg ⁵.

La determinación del colesterol total (CT) se realizó por el método enzimático acoplado colorimétrico de punto final Colesterol esterasa/ Colesterol oxidasa (Bioscience). Se consideró como riesgo un valor ≥200 mg/dL. Para determinar el HDL-c la muestra de suero fue sometida a una técnica de precipitación de lipoproteínas por polianiones, seguida de un proceso separación mediante centrifugación a 3.500 rpm por 10

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

minutos. El HDL-C fue aislado del sobrenadante y determinado por método enzimático acoplado colorimétrico de punto final Colesterol esterasa/ Colesterol oxidasa (Bioscience). Se consideró como riesgo un valor < 50 mg/dL. El valor de LDL-c y el VLDL-c se obtuvo mediante la aplicación de la fórmula de Friedewald. Se consideraron como valores de referencia ≤ 130 mg/dL y ≤ 30 mg/dL, respectivamente. Los triglicéridos fueron determinados mediante el método enzimático acoplado colorimétrico de punto final Triglicérido lipasa/ Glicerol quinasa (Trinder) (Bioscience). Se consideró como riesgo un valor > 150 mg/dL³.

El conteo total de glóbulos blancos se realizó a través de un equipo automatizado (Coulter AcT8), considerando como referencia valores de 4.000 a 11.000 células por milímetros cúbicos (cel/mm³).

La VSG se determinó por el método de Westergren. Para ello, se enrasó la pipeta de Westergren con la muestra de sangre anticoagulada, luego se colocó en un tubo ($300 \pm 1,5$ mm de longitud y $2,55 \pm 0,15$ mm de

diámetro, con escala graduada en mm de 0 a 200), en posición vertical durante 1 hora, y se procedió a la lectura en milímetros (mm)¹². Se consideraron como valores de referencia para la 1era hora de 0 a 20 mm para mujeres y de 0 a 15 mm para hombres ¹³.

La concentración de Fg se determinó por el método de Ratnoff y Menzie ³. Se consideraron como referencia valores de 200-400 mg/dL.

La concentración sérica de PCRus se determinó mediante un estuche comercial de ELISA específico para PCR en humanos, de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante (*DRG International*, Alemania). Se consideró como valores de referencia de 1,0 a 3,0 mg/L y como riesgo alto valores $>3,0$ mg/L.

La determinación de la concentración de IL-6 e IL-8 se realizó mediante un inmunoensayo enzimático específico para cada interleuquina, de acuerdo al protocolo recomendado por los fabricantes (RayBio®, Norcross, GA). Se consideraron como valores de

referencia < 1,60 pg/mL y < 150 pg/mL, respectivamente.

La determinación de la concentración de generación de trombina (GT), se realizó mediante el tiempo de coagulación por ecarina (ECT, por sus siglas en inglés, *Ecarin Clotting Time*)¹⁴, usando el estuche comercial de HAEMOSYS®-THROGA (HaemoSys GmbH Jena, Germany). Se preparó un pool de plasma pobre en plaquetas del cual se añadieron 100 µL tanto al tubo activador (contentivo de activadores de la coagulación y 22,4 ATU de hirudina y estabilizadores), y al tubo de referencia (contentivo 22,4 ATU de hirudina y estabilizadores). Se agitaron ambos tubos a 550 rpm en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente, se precalentó el coagulómetro semi-automatizado (Coagulizer 2K/4K) a 37°C, y se procedió a determinar el ECT, donde se detuvo la reacción añadiendo 300µL del tampón ECT frío (tris base 0,05 M con 0,154 M CaCl₂ a un pH de 7,5), se pipetearon 200 µL del pool de plasma en una cubeta (previamente se colocó una bala de plomo), se

añadieron 80 µL de la muestra (plasma citratado), se dejó incubar por 3 minutos a 37°C y por último, se agregaron 20 µL de la solución de ecarina (5 U/mL de ecarina en 0,05M CaCl₂) precalentada a 37°C. Se midió el tiempo de coagulación, se tomó el valor de los tiempos medidos de ambos tubos (activador y referencia) por duplicado y se sacó un promedio de los tiempos. Se realizó una curva de calibración con el tampón ECT para determinar las unidades antitrombina, de la cual se permitió conocer la concentración de generación de trombina de los pacientes en estudio. Se consideraron como intervalos de referencia: 115 ± 20 ATU/mL.

Se calcularon los estadísticos descriptivos media aritmética [\bar{x}], desviación estándar [DS], valores mínimo y máximo, y se construyeron los intervalos al 95% de confianza para las medias poblacionales [IC_{95%}(μ)], clasificados por grupo. Se aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evidenciar diferencias entre los grupos. Las comparaciones de medias se

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

realizaron utilizando la prueba de la diferencia honestamente significativa de Tukey. La asociación entre generación de trombina y las variables asociadas a procesos inflamatorios y riesgo cardiovascular, se calculó por los coeficientes de correlación de Pearson para los grupos con AR y LES. Se consideró, una diferencia o asociación estadísticamente significativa con un $p \leq 0,05$. Los datos se analizaron utilizando los programas estadísticos Statistix 9.0, Minitab 16.0 y StatXact 9.0 de Windows.

RESULTADOS

En la tabla 1, se observa que los grupos bajo estudio presentan diferencias estadísticas significativas para el conteo de leucocitos, VSG y las concentraciones de fibrinógeno, IL-6, IL-8 y PCR. Los promedios obtenidos para VSG, fibrinógeno, IL-8 y PCR en los grupos con AR y LES son estadísticamente similares entre sí, y mayores al control. Sin embargo, en el grupo LES y control el valor promedio de conteo de leucocitos fue semejante.

Variable	Grupo	N	\bar{x}	DS	Min – Max	IC_{95%}(□)	P
Leucocitos (cel/mm³)	Control	20	6660	1358,20	4100 – 9300	6024 – 7296	0,0352*
	AR	20	8428	2441,90	5200 – 14100	7127 – 9729	
	LES	20	6865	2462,60	3600 – 12200	5553 – 8177	
VSG (mm)	Control	20	8,05	11,81	1 – 53	2,52 - 13,58	0,0009*
	AR	20	24,94	17,42	6 – 63	15,65 - 34,22	
	LES	20	31,94	25,21	5 - 80	18,51 - 45,37	
Fibrinógeno (mg/dL)	Control	20	265,45	62,55	203 - 428	236,18 - 294,72	<0,0001*
	AR	20	381,31	44,22	278 - 450	357,75 - 404,88	
	LES	20	380,94	70,94	255 - 523	343,14 - 418,74	
IL-6 (pg/mL)	Control	20	0,67	0,31	0,2 - 1,3	0,52 - 0,81	<0,0001*
	AR	20	2,64	0,74	1,89 - 4,27	2,24 - 3,04	
	LES	20	11,63	10,37	1,92 - 29,5	6,10 - 17,15	
IL-8 (pg/mL)	Control	20	74,25	22,22	45 - 120	63,85 - 84,65	<0,0001*
	AR	20	266,31	59,44	168 - 390	234,64 - 297,99	
	LES	20	291,56	80,97	189 - 420	248,42 - 334,71	
PCR(mg/dL)	Control	20	0,25	0,14	0,1 - 0,6	0,18 - 0,32	<0,0001*
	AR	20	3,20	1,50	1,32 - 7,27	2,40 - 4,00	
	LES	20	4,53	3,25	1,56 - 12,78	2,80 - 6,27	

(*) Diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0,05$.

Tabla 1. Parámetros inflamatorios en los grupos de estudio
Fuente: Elaboración propia

En la tabla 2, se evidencia que hubo diferencias estadísticas entre los grupos control, AR y LES en los parámetros bioquímicos del perfil lipídico. El colesterol total, LDL-c, VLDL-c y triglicéridos presentaron medias estadísticamente similares entre sí en los grupos AR y LES, y

mayores al control. En el caso del HDL-c el grupo control presentó la mayor media, seguido del grupo AR y LES respectivamente. Las variables IMC, ICC, PAS y PAD no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

Variable	Grupo	N	\bar{x}	DS	Min - Max	IC _{95%} (□)	P
IMC (Kg/m ²)	Control	20	25,31	6,24	20,5 - 49,9	22,39 - 28,23	0,7267 ^{NS}
	AR	20	26,65	5,82	19,3 - 36,5	23,55 - 29,75	
	LES	20	25,25	4,66	18,6 - 35,1	22,76 - 27,73	
ICC	Control	20	0,93	0,10	0,81 - 1,19	0,88 - 0,97	0,9981 ^{NS}
	AR	20	0,93	0,04	0,85 - 1	0,90 - 0,95	
	LES	20	0,93	0,07	0,75 - 1,05	0,89 - 0,96	
PAS (mm Hg)	Control	20	116,50	5,87	100 - 120	113,75 - 119,25	0,6020 ^{NS}
	AR	20	116,25	15,86	80 - 160	107,80 - 124,70	
	LES	20	120,63	18,43	90 - 170	110,81 - 130,44	
PAD (mm Hg)	Control	20	77,00	7,33	60 - 90	73,57 - 80,43	0,7106 ^{NS}
	AR	20	77,50	6,83	60 - 90	73,86 - 81,14	
	LES	20	79,38	11,82	60 - 100	73,08 - 85,67	
Colesterol total (mg/dL)	Control	20	159,60	21,26	120 - 190	149,65 - 169,55	<0,0001*
	AR	20	198,75	23,43	150 - 245	186,27 - 211,23	
	LES	20	215,56	33,57	175 - 312	197,67 - 233,45	
HDL-c (mg/dL)	Control	20	51,40	4,19	45 - 58	49,44 - 53,36	0,0175*
	AR	20	47,31	4,44	40 - 55	44,95 - 49,68	
	LES	20	46,69	6,91	40 - 59	43,01 - 50,37	
LDL-c (mg/dL)	Control	20	80,37	19,84	45 - 117	71,09 - 89,65	<0,0001*
	AR	20	116,84	24,05	75 - 163	104,02 - 129,65	
	LES	20	134,72	33,43	88 - 225,6	116,91 - 152,54	
VLDL-c (mg/dL)	Control	20	27,83	3,54	18 - 34	26,18 - 29,49	0,0001*
	AR	20	34,63	5,92	24 - 52	31,47 - 37,78	
	LES	20	33,34	3,77	26 - 38,4	31,33 - 35,35	
Triglicéridos (mg/dL)	Control	20	139,15	17,68	90 - 170	130,88 - 147,42	<0,0001*
	AR	20	173,63	29,55	120 - 260	157,88 - 189,37	
	LES	20	170,13	21,30	131 - 210	158,78 - 181,47	

(*) diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0,05$. (^{NS}) Diferencia estadísticamente no significativa.

Tabla 2. Factores de riesgo cardiovascular en los grupos de estudios.
Fuente: Elaboración propia

De igual manera, tal y como se muestra en la Tabla 3, la concentración plasmática de generación de trombina (GT), no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

En la tabla 4, se observa una

correlación negativa estadísticamente significativa entre la generación de trombina y la HDL-c en el grupo con AR, mientras que en el grupo con LES se aprecia una asociación directamente proporcional y estadísticamente significativa entre la generación de trombina con IL-6 y VSG.

Variable	Grupo	N	\bar{x}	DS	Min – Max	IC _{95%} (□)	P
Generación Trombina (UTA/mL)	Control	20	107,68	22,43	50,61 - 153,63	97,18 - 118,18	0,9250 ^{NS}
	AR	20	109,28	41,20	25,78 - 191,62	87,32 - 131,24	
	LES	20	104,67	36,61	24,06 - 174,46	85,17 - 124,18	

(^{NS}) Diferencia estadísticamente no significativa.

Tabla 3. Generación de trombina en los grupos en estudio
Fuente: Elaboración propia

Variables	Generación de Trombina			
	Artritis Reumatoidea		Lupus Eritematoso Sistémico	
	Pearson	P	Pearson	P
Leucocitos	-0,0702	0,7961 ^{NS}	0,3740	0,9340 ^{NS}
VSG	0,3498	0,1841 ^{NS}	0,5323	0,0338*
Fibrinógeno	-0,3060	0,2491 ^{NS}	-0,3463	0,1889 ^{NS}
IL-6	0,0559	0,8372 ^{NS}	0,4325	0,0943**
IL-8	-0,3153	0,2343 ^{NS}	0,1163	0,6679 ^{NS}
PCR	0,2846	0,2853 ^{NS}	0,2873	0,2807 ^{NS}
IMC	-0,0242	0,9293 ^{NS}	-0,2731	0,3061 ^{NS}
ICC	-0,1763	0,5137 ^{NS}	-0,1531	0,5712 ^{NS}
Colesterol total	0,1826	0,4984 ^{NS}	-0,1760	0,5143 ^{NS}
HDL-c	-0,4735	0,0639**	-0,2006	0,4564 ^{NS}
LDL-c	0,2368	0,3772 ^{NS}	-0,1348	0,6185 ^{NS}
VLDL-c	0,1129	0,6772 ^{NS}	-0,1537	0,5698 ^{NS}
Triglicéridos	0,1163	0,6681 ^{NS}	-0,0337	0,9013 ^{NS}

(**) Diferencia estadísticamente significativa al 10%. (*) Diferencia estadísticamente significativa al 5%.

(^{NS}) Diferencia estadísticamente no significativa.

Tabla 4. Asociación de generación de trombina con biomarcadores de inflamación y factores de riesgo cardiovascular en individuos con lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

Fuente: Elaboración propia

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los pacientes con AR y LES presentan un estado inflamatorio crónico y dislipidemia caracterizado por aumento de IL-6, IL-8, VSG, Fibrinógeno, PCR, colesterol total, triglicéridos, LDL-c, VLDL-c y disminución de HDL-c sin incremento en la concentración plasmática de generación de trombina en comparación con el grupo control. Además, se encontró una asociación negativa entre generación de trombina y HDL-c en el grupo AR, mientras que en el grupo LES se encontró una asociación positiva entre la generación de trombina, IL-6 y VSG.

Los promedios obtenidos en los parámetros inflamatorios VSG, fibrinógeno, leucocitos, IL-8 y PCR de los grupos con AR y LES se encontraron estadísticamente similares entre sí, y mayores al control. Sin embargo, en el grupo LES y control el valor promedio del conteo de leucocitos fue semejante, y más elevado en el grupo AR. La media aritmética del conteo de leucocitos fue mayor en el grupo con

AR, seguido del grupo con LES y por último el grupo control. La IL-6 fue superior en los pacientes con LES que en los pacientes con AR. Resultados similares se apreciaron en los pacientes con LES, donde los niveles de PCR fueron superiores a los obtenidos en los pacientes con AR y el grupo control. Estos hallazgos evidencian un estado inflamatorio que incrementa la predisposición para presentar eventos cardiovasculares adversos¹⁵. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que los biomarcadores de inflamación pueden actuar como predictores independientes de eventos cardiovasculares^{15,16}. En tal sentido, es necesaria la medición de estos parámetros a fin de identificar y/o monitorear pacientes con alto riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

En la AR y LES se ha evidenciado una elevación de colesterol total y LDL-c, así como una reducción considerable del HDL-c. Aunque la relación no se ha descrito como consistente, los procesos inflamatorios crónicos alteran la estructura lipoproteica en formas que

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

no son reflejadas en un perfil lipídico estándar. Estos procesos inflamatorios han demostrado ser capaces de modificar las lipoproteínas LDL-c, hacia formas más pequeñas y densas pro-aterogénicas. En este estudio se evidenció un incremento en la concentración de LDL-c en los pacientes con LES en relación al grupo AR. Es importante considerar que a pesar que ambas patologías son de evolución crónica, el LES es de una magnitud superior, por lo que se considera este grupo obtuvo una elevación considerable del colesterol total y LDL-c así como un descenso en los niveles, y posiblemente funcionalidad del HDL-c, en relación a los pacientes AR.

En 2016 Batún y cols realizaron una investigación sobre la dislipidemia y riesgo aterogénico en pacientes con LES, en la cual encontraron dislipidemia en el 68,6% de los pacientes con LES, lo cual incrementa el riesgo a desarrollar enfermedad cardiovascular ¹⁷. De igual forma, en este estudio se evidenció que los pacientes con LES

tuvieron un aumento del 21,5% y 13,4% en la concentración del colesterol total y LDL-c respectivamente, así como un descenso significativo de 4,6% en la concentración de HDL-c, en referencia al grupo control. Por su parte, los pacientes con AR mostraron un incremento del 3% y 17% en las concentraciones de VLDL-c y triglicéridos respectivamente, así como un descenso del 4,7% de la cifra de HDL-c, en relación al grupo control.

A pesar que el n muestral empleado en este estudio, es inferior al considerado por Batún y cols, es posible apreciar la misma tendencia de alteración en los niveles de los parámetros lipídicos antes mencionados, la cual se asocia con la gravedad inflamatoria de ambas patologías reumáticas, la cual desencadena la secreción de interleucinas pro-inflamatorias conjuntamente con la posterior liberación de ácidos grasos a la circulación por parte del tejido adiposo ¹⁷.

En las patologías reumáticas, la dislipidemia se ha explicado por la existencia de una actividad disminuida de la lipoproteína lipasa (LPL), o la presencia de anticuerpos anti-LPL así como por la presencia de anticuerpos anti HDL-c o Apo-A1 (porción proteica del HDL-c). Estos factores contribuyen al incremento de los triglicéridos y la disminución progresiva del HDL-c, asociándose a su vez con un incremento de la IL-6, quien es producida normalmente por el hígado, pero en los procesos inflamatorios también es secretada por células del tejido adiposo, el cual funciona como un gran tejido secretor¹⁸.

En 2014, Navarro y cols realizaron una investigación sobre factores de riesgo cardiovascular en pacientes con LES. En el estudio los autores encontraron una concentración sérica disminuida del HDL-c en el 100% de los pacientes con LES, en relación a los valores de referencia. En contraste a lo encontrado por Navarro y cols, en este estudio se evidenció una disminución significativa del valor medio del HDL-c obtenido en los

pacientes con LES, en relación al grupo control, a pesar de no evidenciarse un valor reducido del HDL-c en el 100% de los pacientes con LES, en comparación a los valores de referencia. En relación a este particular, es importante resaltar que los pacientes con LES consumen diversos tipos de esteroides, los cuales tienen la propiedad de incrementar las concentraciones de colesterol total, LDL-c y triglicéridos, explicándose de este modo el conocido efecto de dislipidemia lúpica presente tanto en LES como en AR, el cual es responsable de la prescripción médica de hipolipemiantes para estos pacientes.

En pacientes diagnosticados con LES como en otras patologías inflamatorias donde las lipoproteínas aumentan en concentración y adquieren un rol patológico, los macrófagos subendoteliales internalizan cantidades incrementadas de LDL-c, el cual se oxida y cambia la conformación estructural de estas células, convirtiéndolas en células espumosas, lo que a su vez genera

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

una respuesta inflamatoria *in situ* que conlleva a la secreción de IL-6, IL-8, PCR y fibrinógeno, quienes son considerados también factores de riesgo cardiovascular ⁵.

Estudios recientes han corroborado que el HDL-c puede perder sus efectos anti-inflamatorios en este tipo de enfermedades reumáticas y adquirir funciones pro-inflamatorias (HDL-pi). En diversas investigaciones se ha demostrado que el cambio funcional del HDL-c a HDL-pi, ocurre frecuentemente en pacientes con LES asociándose a la formación de la placa de ateroma y a una consecuente enfermedad coronaria arterial ¹⁹.

La aterosclerosis es definida como una enfermedad inflamatoria vascular crónica donde las proteasas de la coagulación (especialmente trombina), están activamente involucradas con la finalidad de ser utilizadas como instrumentos para la oclusión vascular a través de la formación de trombos ²⁰.

En este estudio la concentración plasmática de generación de trombina (GT), no presentó diferencia

estadística significativa en los pacientes con LES y AR en relación al grupo control. Es posible que este resultado sea debido a que la GT posee tendencia al incremento de sus niveles *in vivo*, mientras que *in vitro* la tiene la particularidad de aumentar sus niveles por un tiempo no muy prolongado. Actualmente, no están esclarecidas las razones por las cuales la GT varía sus niveles entre las mediciones *in vitro* e *in vivo* ²¹. El análisis *ex vivo* de GT fue reportado por primera vez en 2008, mostrando que era más rápido, temprano y elevado en sujetos con antecedentes de síndrome coronario agudo (SAC) en comparación con pacientes sanos, lo que nos lleva a especular que la muestra en estudio no presenta SCA ²².

La GT *in vivo*, es un fenómeno fisiológico normal; los marcadores de la actividad de trombina tales como el fragmento de protrombina 1,2, los complejos de trombina-antitrombina (TAT) y las formas de fibrina degradada tales como los dímeros D, son siempre detectables en la sangre. La generación de trombina *in vitro* es

una prueba que mide la capacidad de la sangre (plasma) para formar trombina. Una persona fisiológicamente estable con una trombosis provocada mostrará signos de aumento *in vivo* de la generación de trombina, mientras que su capacidad para formar trombina *in vitro* puede ser normal ²¹. En 2015, Hemker explica *“Cuanta más trombina menos hemorragia, pero más trombosis, cuanta menos trombina, más hemorragia, pero menos trombosis”* ²³.

Es importante destacar que la determinación de la concentración de generación de trombina no es similar a las pruebas de tiempos de sangría. La generación de trombina requiere una completa termoestabilidad como condición indispensable para su medición reproducible. Durante el procedimiento de ejecución de la prueba, las muestras y reactivos preincubados se sirven en las placas a temperatura ambiente, lo que conlleva a que no se alcance generalmente una temperatura uniforme de 37°C, incluso después de 10 minutos de incubación. Además,

las diferencias de temperaturas entre los pozos de la placa pueden ser factores críticos en la medición, lo que dificulta la calibración, así como la comparación con un plasma estándar. Así mismo, es un inconveniente el hecho que se requiera a parte de la muestra problema, una segunda muestra necesaria para ejecutar la calibración, ya que esto duplica la cantidad de muestra y tiempo requerido, por lo que se incrementa el error experimental, aun cuando la muestra y el calibrador sean manejados en pozos adyacentes ²³.

Es posible que la complejidad técnica que enviste el desarrollo de la prueba descrita, así como el hecho de haber conservado las muestras de plasma citratado varios días a una temperatura de -20°C, a cambio de su procesamiento inmediato, pudo haber influido en la obtención de un resultado no significativo en la concentración de generación de trombina entre los grupos de estudio.

El objetivo final de esta investigación fue establecer la correlación de la GT, los

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

biomarcadores de inflamación y los factores de riesgo cardiovascular, donde las muestras de los pacientes con AR demostraron una correlación estadísticamente negativa en relación a la GT y la concentración de HDL-c. Las demás variables no tuvieron significancia estadística en los pacientes con AR. Con respecto a esta correlación, en procesos reumáticos e inflamatorios en general, ocurre un pleomorfismo en las lipoproteínas que actúa sobre las proteasas de serina causando disturbios consecutivos en la coagulación, especialmente en la fibrinólisis. El HDL-c estimula la producción de anticoagulantes con efectos de resistencia a la proteína C activada (APC) y proteína S, las cuales inhiben la GT. Es decir, a mayor concentración de HDL-c menor será la GT. A pesar de las diversas sustancias fisiológicas usadas para la neutralización de una GT excesiva, esta tiene mecanismos de protección para evadirlos, entre los que se incluyen el lugar donde se forma la trombina. Cuando se genera aceleradamente trombina e induce la

formación de fibrina, la GT toma lugar en sitios con grandes concentraciones de fosfolípidos como las articulaciones distales, incapacitando a los inhibidores naturales a acceder fácilmente al lugar para poder contrarrestar sus efectos, como ocurre en el caso de la AR ²¹.

Por su parte, los pacientes con LES presentaron una correlación directamente proporcional entre la GT y las concentraciones de IL-6 y VSG. Como es de esperarse, mientras más trombina se genera, mayor será el proceso inflamatorio, y por ende, se elevarán aleatoriamente la IL-6 y la VSG. La señalización de IL-6 en los procesos inflamatorios, cumple un rol fundamental en la patogénesis de las enfermedades reumáticas. La constante producción de la IL-6 conlleva a una secreción hepática exacerbada de proteínas de fase aguda, así como a una diferenciación de células T, específicamente TH1 y TH17, ampliamente reconocidas por protagonizar procesos inflamatorios. Adicionalmente, la IL-6 es responsable de la estimulación

desequilibrada de células B, quienes son las responsables de la secreción de autoanticuerpos dirigidos específicamente a las articulaciones o a cualquier otro tejido ²⁴. Existen múltiples variables que puedan relacionarse con esta clase de patologías causadas por la activación de diferentes sustancias orgánicas las cuales desembocan en un desequilibrio fisiológico que descompensa aún más al paciente. Es de vital importancia profundizar las investigaciones a fin de dilucidar completamente el papel que cumple la trombina en las patologías reumáticas, en relación a cómo puede transformarse en un efector protrombótico, y adicionalmente servir como factor quimiotáctico leucocitario, que agrava la situación en este tipo de pacientes.

CONCLUSIONES

Para el momento de la realización del estudio, los pacientes con AR y LES presentaron dislipidemia caracterizada por hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, con niveles elevados de LDL-c y VLDL-c, y disminución del HDL-c; así como un

proceso inflamatorio evidenciado por la elevación de los niveles de VSG, fibrinógeno, IL-6, IL-8 y PCR. Por su parte, la concentración plasmática de GT se encontró dentro de los intervalos de referencia, y se asoció negativamente con la concentración de HDL-c en los pacientes con AR, y positivamente con los niveles de IL-6 y VSG en los pacientes con LES.

Estos resultados demuestran la presencia de un desequilibrio vascular y hemostático que podría favorecer el desarrollo de procesos aterotrombóticos en los pacientes con enfermedades reumáticas, por lo que se hace necesario la determinación de factores hemostáticos, inflamatorios y de riesgo cardiovascular, para el pronóstico y seguimiento de los pacientes con diagnóstico de AR y LES, con la finalidad de disminuir la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular.

AGRADECIMIENTOS

Al personal profesional y técnico del Servicio de Reumatología del Hospital Central de Maracay, y del Instituto Venezolano de

PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS

Investigaciones Científicas que contribuyó con el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Saldarriaga, L; Ventura, L; Hernández, C; Pineda, C. Medición del grosor de la íntima-media carotídea: utilidad y diagnóstico ecográfico de aterosclerosis subclínica en enfermedades reumáticas. Revisión de la literatura. *Rev Colomb Reumatol.* 2016; 23(2):92-101
2. Ramírez, M; Mínguez, M; Zarca, M; Espinosa, P; Romero, G. Qué papel juega la actividad de la enfermedad en el riesgo cardiovascular de la artritis reumatoide. *Rev Colomb Reumatol.* 2016; 14(6):317-382
3. Navarro, M; Rodríguez, J; Rodríguez, J; Vicci, H; Pérez-Ybarra, L; Crespo, G; et al. Factores de riesgo cardiometabólico y biomarcadores de inflamación en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Saber.* 2018; 30:488-497
4. Galindo, M; Molina, R; Pablos-Álvarez, J. Lupus eritematoso sistémico (I). Etiopatogenia. Manifestaciones clínicas. Historia natural. Pruebas diagnósticas. Diagnóstico diferencial. *Medicine* 2017; 12:1429-39
5. Navarro, M; Acevedo, Y; Castillo, A; López, M; Ruíz, M; Bofelli, C; Camacho M. Factores de riesgo convencionales, no convencionales y lúpicos para aterosclerosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Comunidad y Salud.* 2014;12(1):11-19
6. Schuett, K; Lehrke, M; Marx, N; Burgmaier, M. High-Risk Cardiovascular Patients: Clinical Features Comorbidities and Interconnecting Mechanisms *Front Immunol.* 2015; 6: 591
7. López, C; Aguirre, M; Pérez, C. Mecanismos de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular en el síndrome antifosfolípido y el lupus eritematoso sistémico. *Alternativas terapéuticas Medicina Clínica.* 2017; 149:(4), 22:160-169
8. Vicci, H; Navarro, M; Ebbelen-Zajjur, A. La trombina más allá de la coagulación. *Vitae Academia Biomédica* 2015; 63:1-13
9. Loeffen, R; Winckers, K; Ford, I; Jukema, J; Robertson, M; Stott, J; et al; Grupo de Estudio PROSPER. Associations Between Thrombin Generation and the Risk of Cardiovascular Disease in Elderly Patients: Results From the PROSPER Study. *J Gerontol A Biol Sci Medicina Sci.* 2015; 70(8):982-988
10. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285(19):2486-2497

11. González, E; Montero, M; Schmidt, J. Estudio de la utilidad del índice de cintura-cadera como predictor del riesgo de hipertensión arterial en niños y adolescentes. *Nutr. Hosp.* 2013; 28(6):1993- 1998

12. Jou, J; Lewis, S; Briggs, C, Lee, S; De La Salle, B; Cfadden, S. ICSH review of the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. *Int. J. Lab. Hem.* 2011; 33(2):125-132

13. Campuzano, G. Eritrosedimentación: réquiem para una prueba. *Med. Lab.* 2010; 78 (16):11-40

14. Nowak, G. The ecarin clotting time, a universal method to quantify direct thrombin inhibitors. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003 Jul-2004 Aug; 33 (4):173-183

15. Tanaka, T; Narazaki, M; Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6 (10):1-16

16. Acosta, G; Álvarez, A; Baldovino, F; Briceño, C; Pérez-Ybarra, L; Barrera, G; et al. Evaluación de vitamina D, biomarcadores de inflamación y factores

de riesgo cardiovascular en pacientes con hipertensión arterial. *AVFT.* 2018; 37(4): 360-367

17. Batún, J; Radillo, H; Hernández, E. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus. *Rev Colomb Reumatol.* 2016;10:1-8

18. Steyers, C; Miller, F. Disfunción endotelial en enfermedades inflamatorias crónicas. *Int J Mol Sci.* 2014;15 (7):11324-49

19. Giannelou, M; Mavragani, C. Enfermedad cardiovascular en el lupus eritematoso sistémico: una actualización completa. *J Autoimmun.* 2017; 82: 1-12

20. Mayerl, C; Lukasser, M; Sedivy, R; Niederegger, H; Seiler, R; Wick, G. Atherosclerosis research from past to present—on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch.* 2006; 449:96–103

21. Ten, C; Hemker, H. Thrombin Generation and Atherothrombosis: What Does the Evidence Indicate?. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(8): 1-8

22. Orbe, J; Zudaire, M; Serrano, R; Coma-Canella, I; Martínez, S; Rodríguez, J; Paramo JA. Increased thrombin generation after acute versus chronic coronary disease as assessed by the

**PARÁMETROS INFLAMATORIOS, FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y
GENERACIÓN DE TROMBINA EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDADES REUMÁTICAS**

thrombin generation test. *Thromb Haemost*, 2008; 99: 382–387

23. Hemker, H. The application of thrombin generation in real life clinical situations. *Thrombosis research*. 2015; 136:3-4

24. Calabrese, L; Rose-John, S. IL-6 biology: implication for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2014; 10: 720-727

CORRESPONDENCIA: María Navarro.
Dirección: Unidad de Investigación de Lípidos y Lipoproteínas. Departamento Clínico Integral. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo Sede Aragua. Teléfono: (094) 6427373. Dirección de correo electrónico: sapianma2712@gmail.com.