

Alteraciones de la hemostasia asociadas a los dispositivos de asistencia cardiopulmonar

Hemostatic alterations associated to cardiopulmonary assistance devices

Mecanismos de las alteraciones de la hemostasia. Rol del factor von Willebrand y ADAMTS13

Mechanisms of hemostasis disorders. Role of von Willebrand factor and ADAMTS13

Sánchez Luceros A

*Investigador Adjunto, IMEX-CONICET-ANM
Jefe Dto de Hemostasia y Trombosis Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina*

sanchezluceros@hematologia.anm.edu.ar



SIMPOSIO 4

HEMATOLOGÍA
Volumen 20 • Número Extraordinario
XII Congreso del Grupo CAHT: 122-127
Septiembre 2016

Palabras clave: ECLS,
Hemostasia,
Plaquetas,
Factor von Willebrand.

Keywords: ECLS
Hemostasis
Platelets
Von Willebrand factor

Desde que Gibbon usó por primera vez en 1953 la derivación (*by pass*) cardiopulmonar (CPB) de manera exitosa para corregir un defecto auricular en una joven de 18 años, las aplicaciones del soporte circulatorio vital extracorpóreo (siglas en inglés ECLS: *extracorporeal life support* o también conocido como ECMO, *extracorporeal membrane oxygenation*) han logrado significativos avances. Los primeros dispositivos para CPB causaban una respuesta inflamatoria aguda, con extensas complicaciones de coagulación, sangrado y disfunción de órganos, que impedía que estos dispositivos fueran aplicables para soporte circulatorio a largo plazo. A pesar de que en los últimos 50 años se han mejorado materiales, circuitos y técnicas de ECLS, aún no se ha logrado controlar la interacción entre sangre y biomateriales, generando los mismos desafíos que

en los equipos iniciales.

Los mecanismos básicos de activación de proteínas y células durante las diferentes aplicaciones de la perfusión extracorpórea son idénticos, pero la intensidad de las reacciones puede variar, dependiendo de la duración de los estímulos, el tipo de anticoagulantes utilizados, la variabilidad del paciente, y el tipo de circuito artificial. El ECLS difiere significativamente de la cirugía a corazón abierto y de los dispositivos de asistencia ventricular, principalmente debido a la duración del soporte extracorpóreo y a la cantidad de sangre expuesta a superficies no endoteliales por unidad de tiempo⁽¹⁾.

En el CBP todo el volumen circulante de sangre se encuentra expuesto al sitio quirúrgico y a un área significativa del circuito de biomateriales artificiales, sólo por unas pocas horas o menos. Se requieren

grandes cantidades de anticoagulantes para prevenir la trombosis, y esencialmente todos los elementos en la sangre se activan durante este tiempo. En cambio, los dispositivos de asistencia ventricular exponen la sangre circulante a un área relativamente pequeña de la superficie artificial. Inicialmente, la cantidad de sangre que se enfrenta a la herida varía; sin embargo, una vez que se conecta el dispositivo, la sangre no circula por la herida, y el área de superficie no endotelial de exposición es pequeña. Los sistemas ECLS exponen parte del volumen de sangre a una gran área de superficie de los circuitos, pero poco o nada de sangre de la herida circula, a menos que el paciente haya tenido una cirugía cardíaca reciente. Por lo tanto, algo de anticoagulación es necesaria para prevenir la coagulación en el circuito extracorpóreo, pero menos que la requerida en CPB porque el estímulo para la activación de componentes de la sangre es menor.

En condiciones fisiológicas, la carga negativa del endotelio vascular mantiene la fluidez de la sangre a través una compleja interacción entre las proteínas plasmáticas y plaquetas. Durante ECLS, hay un contacto continuo entre la sangre circulante y la superficie exterior del circuito extracorpóreo que altera la homeostasis normal y que es independiente de los controles fisiológicos. El corazón nativo, en paralelo con el sistema, aunque podría responder a los controles naturales, se utiliza sólo parcialmente, ya sea por enfermedad o falta de flujo de entrada.

En cuanto a los factores del paciente, aquéllos que requieren soporte vital frecuentemente se encuentran internados en unidades de cuidados intensivos, siendo los más comprometidos dentro de estas unidades (por falla multiorgánica, reanimación cardiopulmonar reciente, sepsis, cirugía, etc.), con sus propios desequilibrios de la hemostasia y respuesta inflamatoria establecidos con anterioridad. Como adyuvante a estas situaciones, sin contar las posibles co-morbilidades, el paciente será sometido a un procedimiento para obtener un gran acceso arterial y venoso y acceder a ECLS. El propio sistema ECLS generará activación de proteínas, incluidas las del sistema de coagulación, como así también se producirá una respuesta inflamatoria con expresión de receptores celulares e iniciación de la señalización celular, con liberación de sustancias vasoactivas y citotóxicas. El balance hemostático se desplaza a la hipercoagulabilidad, resultando en riesgo de trom-

bosis en pacientes y circuitos extracorpóreos.

Este delicado balance debe equilibrarse nuevamente con administración de medicación antitrombótica, clásicamente heparina no fraccionada (HNF), la que en exceso puede resultar en sangrado en la circulación sistémica. La hemorragia y trombosis que se producen regularmente durante el transcurso de ECLS pueden dar como resultado complicaciones clínicas significativas, incluyendo la muerte.

Fisiopatología de la interacción sangre-superficies artificiales

Cuando la sangre se expone a las superficies no biológicas de un circuito extracorpóreo, se inicia una respuesta compleja que implica a la coagulación y mecanismos inflamatorios. Esta respuesta conduce a fuga capilar que puede causar disfunción temporal de órganos. De hecho, la respuesta a la circulación extracorpórea es muy similar, desde el punto de vista de laboratorio y clínico, a la que se observa en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA).

En contacto con una superficie no endotelial, las fuerzas de cizallamiento, la cavitación (o desgasificación), la turbulencia y las fuerzas osmóticas afectan directamente los componentes plasmáticos. Tanto proteínas como lipoproteínas son progresivamente desnaturalizadas durante ECLS. De este modo, aumenta la viscosidad plasmática, disminuye la solubilidad de proteínas y aumentan las especies reactivas de oxígeno. Albúmina, IgG, IgA e IgM disminuyen en exceso a lo esperado por la hemodilución. Los glóbulos rojos desarrollan cambios de forma reversibles a equinocitos, aunque también se produce hemólisis variable, de origen mecánico por las fuerzas de cizallamiento o por la presión negativa del circuito y por activación del complemento. Células circulantes, como plaquetas, leucocitos, monocitos y linfocitos, y células endoteliales se lesionan y activan durante la perfusión. Cuanto mayor sea la velocidad de cizallamiento, mayor el depósito de plaquetas y la generación de tromboxanos por el aumento del FT:FVIIa (FT: factor tisular, FVIIa factor VII activado).

Activación de la coagulación durante ECLS

Luego de segundos de contacto de la sangre con la superficie no biológica del circuito extracorpóreo,

las proteínas del plasma se adsorben en la superficie para formar una monocapa de proteínas. La composición física y química de los polímeros determina qué proteínas tienen más probabilidad de adherirse. El FXII y el fibrinógeno adsorbido se someten a cambios conformacionales, gatillando la activación del sistema de contacto. El FXIIa está implicado en varias vías fisiológicas⁽²⁾, no sólo mediando la generación de trombina, sino también asociado a complemento y a la respuesta inflamatoria, de modo que se ha transformado en una molécula de interés por su potencial terapéutico antitrombótico, con bajo riesgo de hemorragia, en el marco de ECLS⁽³⁾.

El FT expresado en células activadas (monocitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales activadas, células de músculo liso, células apoptóticas), o componentes celulares (micropartículas o microvesículas de plaquetas circulantes) contribuirá con generación de trombina. Las plaquetas se adhieren a la superficie del circuito extracorpóreo y se activan, lo que conduce a la agregación de plaquetas y activación adicional del sistema de coagulación. La activación y consumo de plaquetas se produce desde el inicio de ECLS, de tal manera que el número y la función disminuyen dentro de la primera hora, y continúa mientras dure el ECLS. Con la activación de las plaquetas también los neutrófilos son activados, produciendo citoquinas y contribuyendo más a la respuesta inflamatoria a la circulación extracorpórea.

En cuanto a la fibrinólisis, la presencia de trombina circulante estimula las células endoteliales para producir tPA que participa en el pasaje de plasminógeno a plasmina. Las reacciones posteriores terminan generando dímero-D, que se eleva durante ECLS, siendo en adultos⁽⁴⁾ y aún en neonatos, con un sistema hemostático en desarrollo, un marcador de la fibrinólisis en curso⁽⁵⁾ y potencial marcador de riesgo trombotico del circuito. La activación de la coagulación es tan significativa que resulta en un patrón de coagulopatía por consumo, aún con reposición de factores⁽⁶⁾.

A pesar de la actividad del sistema fibrinolítico, el uso de circuito extracorpóreo resulta en activación continua del sistema de coagulación y generación de trombina. La actividad endógena antitrombótica se satura y esto hace necesario el uso de anticoagulantes exógenos para mantener la integridad del circuito.

Complemento

La vía alternativa del complemento, a diferencia de

la vía clásica, es primariamente activada por ECLS como parte de la activación procoagulante e inflamatoria⁽⁷⁾. La vía alternativa no requiere anticuerpos o complejos inmunes, siendo activada por superficies extrañas, incluyendo microorganismos, partículas y superficies de biomateriales. La activación del complemento a través de la vía alternativa ocurre espontáneamente a la mínima tasa. Cuando se forma C3 hidrolizado, el factor B se activa, y así se inicia el clivaje de C3 a C3a y C3b. Durante ECLS o CBP, en presencia de una superficie biomaterial para unir covalentemente C3b a sus grupos hidroxilos o aminos, el factor B y D se unen, y la C3 convertasa (C3bBb) es formada, creando así una vía de amplificación.

Respuesta inflamatoria y sistema inmune innato

Neutrófilos, monocitos, y linfocitos son los principales grupos de células implicados en la respuesta inflamatoria durante ECLS. Leucocitos circulantes se activan en parte por la activación del FT, de complemento y endotoxina. Esta activación libera numerosas citoquinas pro-inflamatorias circulantes que activan neutrófilos facilitando su adhesión a la superficie vascular de numerosos órganos. La activación de leucocitos se traduce en una gran variedad de potentes especies libres de oxígeno y enzimas proteolíticas que son liberadas. El recuento de neutrófilos disminuye inmediatamente después de la iniciación de ECLS por dilución y se va recuperando lentamente a partir de entonces. Los principales agonistas para la activación de los neutrófilos durante ECLS son calicreína y C5a. Tanto CPB como ECLS causan acumulación de neutrófilos activados en el tejido perivascular e intersticial pulmonar. Esta acumulación se asocia con aumento de la permeabilidad capilar, edema intersticial y grandes diferencias de oxígeno alvéolo-arterial durante y después de la perfusión. Durante CBP, los monocitos se activan para expresar FT, tanto en la herida como en el circuito extracorpóreo. La perfusión disminuye el número total de linfocitos, en particular linfocitos B, células *natural-killer*, células *T helper*, y los linfocitos T supresores. El recuento en general se recupera dentro de los cinco días del destete de ECLS; si la recuperación es más lenta se asocia con un pobre pronóstico⁽⁸⁾.

Esta respuesta pro-inflamatoria se cree que es responsable de las alteraciones fisiológicas observadas tempranamente después de que la sangre entra en

contacto con el circuito extracorpóreo. Un síndrome de respuesta compensatoria antiinflamatoria (CARS) está dirigido a contrarrestar la tendencia a la inflamación⁽⁹⁾. Mientras que CARS es una respuesta necesaria, si es exagerada o mal regulada puede hacer fallar la inmunidad y de este modo hacer al huésped susceptible a infecciones nosocomiales y sepsis.

La activación inicial de los componentes del sistema inmune innato por el circuito ECLS contribuye de forma acumulativa para la respuesta SIRS que puede manifestarse clínicamente como inestabilidad hemodinámica y fuga capilar. Por lo tanto, dependiendo del grado de respuesta inmune, un ligero aumento del soporte hemodinámico puede ser necesario en las primeras horas después del inicio de ECLS.

Plaquetas, factor von Willebrand, ADAMTS13

Las plaquetas responden a estimulaciones mínimas y se activan cuando se encuentran con un estímulo trombogénico como endotelio lesionado, subendotelio, o superficies artificiales. La exposición del colágeno y el factor von Willebrand (VWF) liberado por el endotelio dañado resulta en la adhesión plaquetaria. En condiciones de altas fuerzas de cizallamiento (arterias y microvasos) los multímeros de mayor peso molecular del VWF median la adhesión de plaquetas a través de la unión a colágeno y a plaquetas no activadas a través de la glicoproteína (GP) plaquetaria Ib-IX-V. Tanto GPIb como GPIIb-IIIa son importantes y complementarias en la interacción con la superficie del circuito que se produce durante ECLS.

La secreción de plaquetas, a partir de los gránulos intracelulares, resulta en una serie de reacciones, que incluyen entre otros: mayor adhesión y agregación plaquetaria (ADP, VWF, fibrinógeno, trombospondina), participación en la coagulación (FV, fibrinógeno), aumento del tono vascular y contracción (serotonina), aumento de proliferación y migración celular (factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF), como así también que el fibrinógeno se una a las plaquetas activadas a través del receptor GPIIb-IIIa y actúe como un puente entre las plaquetas, lo que resulta en agregación.

La activación y adhesión plaquetaria, ocurre tanto durante CPB y ECLS, así como en catéteres de acceso vascular e injertos. Plaquetas adherentes y micropartículas plaquetarias son procoagulantes por naturaleza, y por lo tanto proporcionan un estímulo

continuo para la reactividad plaquetaria. Se sabe que durante ECLS la adhesión de plaquetas y la formación de agregados reducen el recuento de plaquetas circulantes. Mientras ECLS continúa, las plaquetas adherentes se separan, dejando fragmentos de membrana de las plaquetas detrás; las que también se separan y circulan. De este modo, el pool de plaquetas circulantes durante ECLS consiste de un número de plaquetas disminuidas, pero morfológicamente normales; un número de plaquetas aumentado en varias etapas de activación (con pseudópodos, degranuladas, y con pérdida de receptores de membrana); y nuevas plaquetas más grandes liberadas de la médula ósea. El tiempo de sangría aumenta en presencia de plaquetas de apariencia normal, y si ECLS continúa más allá de las 24 horas, el consumo de plaquetas también lo hará⁽¹⁰⁾.

El VWF es la glicoproteína más grande circulante. Para comprender las funciones biológicas del VWF, es necesario observar algunas de sus características: 1- que es esencial para la hemostasia en la microvasculatura, donde las fuerzas de cizallamiento o *shear stress* son mayores. Esto se manifiesta clínicamente en la enfermedad de von Willebrand, donde los síntomas más importantes provienen del sangrado de arteriolas muco-cutáneas, dando epistaxis, sangrado menstrual y gastrointestinal, entre otros; 2- que sus propiedades adhesivas dependen del tamaño multimérico, y 3- que por acción de ADAMTS13, VWF circula como una serie de multímeros en plasma, aunque éstos no están presentes en las células endoteliales y megacariocitos donde se sintetiza y deposita el VWF y ADAMTS13. Esto se explica porque, a diferencia de la mayoría de las proteasas, la interacción entre VWF y ADAMTS13 requiere de altas fuerzas de cizallamiento. El VWF secretado de la célula endotelial, si no es expuesto a estas fuerzas, será resistente al clivaje por ADAMTS13. Al ser sometido a *shear stress*, el VWF sufre un cambio conformacional y se despliega, exponiendo sitios activos, como el puente peptídico en el dominio A2 para la proteólisis mediada por ADAMTS13. La exposición de otros sitios activos permite la adhesión y agregación mediada por plaquetas, ya que, debido a la unión repetitiva bajo condiciones de flujo, eventualmente se producirá activación plaquetaria. La agregación/activación plaquetaria inducida por *shear* (SIPA, *shear-induced platelet aggregation*) ha sido largamente estudiada en atención a los defectos

plaquetarios que ocurren asociados a dispositivos artificiales. El plasma rico en plaquetas y la sangre entera expuestos a fuerzas lineares en viscosímetro de cono-placa muestran agregación plaquetaria espontánea (*shear rate* mayor a 3000-5000 s⁻¹)⁽¹¹⁾. La lisis plaquetaria no forma parte del mecanismo SIPA, a menos que las fuerzas excedan las 250 dyn cm⁻², constituyendo un parámetro biomecánico útil para evaluar la performance de un dispositivo⁽¹¹⁾. La GPIb sigue una cinética rápida de asociación-disolución al VWF inmovilizado, con una alta resistencia a fuerzas de tensión, dando como resultado que plaquetas en lento movimiento mantengan un contacto casi continuo con la superficie injuriada, aún bajo fuerzas de flujo patológicas de 6000 s⁻¹. Este mecanismo conducirá eventualmente a que GP IIb-IIIa se active como para arrestar plaquetas sobre VWF en condiciones no permisivas para la unión directa al fibrinógeno⁽¹²⁾. Debido a las propiedades adhesivas del VWF, SIPA es mediado de manera más eficaz por los multímeros grandes y extragrandes de VWF. Bajo fuerzas de flujo extremas, como en ECLS, el VWF sufre proteólisis con disminución de los multímeros de mayor eficacia hemostática, grandes y extragrandes, contribuyendo, junto con las alteraciones plaquetarias, al riesgo de sangrado. Estas interacciones entre "VWF-plaquetas-*shear rate*" explican los cambios observados en presencia de ECLS, como así también en otras situaciones patológicas. Un trabajo reciente estudió de manera longitudinal los parámetros hemostáticos durante el soporte con dispositivo de asistencia ventricular de tercera generación en 28 pacientes adultos. El objetivo fue correlacionar las alteraciones del VWF, con la presencia de sangrado y la pulsatilidad del dispositivo⁽¹³⁾. La mayor alteración del perfil multimérico y del cociente actividad/antígeno de VWF se dio por el día +30, normalizándose hacia el día +180, con una caída significativa al día +360. La mitad de los pacientes mostraron sangrado significativo, especialmente originado en malformaciones vasculares en el tubo digestivo. Una asociación similar es descrita como síndrome de Heye, donde coexisten estenosis aórtica, angiodisplasia intestinal y síndrome de von Willebrand adquirido⁽¹⁴⁾. En parte, el defecto multimérico podría ser corregido con el uso de dispositivos de tipo pulsátiles o bien con medidas tendientes a incrementar la presión de pulso del circuito, mejorando por otro lado la regulación

vasomotora de la microvasculatura intestinal. Algunos trabajos recientes intentaron evaluar el mecanismo por el cual se produce la alteración del VWF en pacientes bajo soporte circulatorio. En un modelo ex vivo, sangre de donantes sanos, pero no la de pacientes con déficit congénito de ADAMTS13, indujo un rápido descenso de los niveles de VWF y de los multímeros de alto peso molecular. En el mismo modelo, el plasma pobre en plaquetas no pudo inducir cambios del VWF bajo las mismas condiciones de *shear stress*. Los autores demostraron así que, al menos *in vitro*, tanto ADAMTS13 como plaquetas son necesarios para inducir una alteración del perfil multimérico de VWF⁽¹⁵⁾. Es probable que la congestión en la circulación mesentérica *in vivo* sea un factor que contribuya a que el sangrado digestivo ocurra. En modelos *in vitro* de alto *shear stress*, la inhibición de la interacción ADAMTS13-VWF con moléculas⁽¹⁶⁾ o anticuerpos⁽¹⁷⁾, logró preservar parcialmente la composición del VWF, siendo otro blanco a evaluar para disminuir el riesgo hemorrágico.

Según el último reporte internacional del Registro ELSO (*Extracorporeal Life Support Organization*), con más de 78000 pacientes incluidos, la supervivencia alcanzada es del 70%⁽¹⁸⁾. Estos resultados promisorios no están libres de eventos adversos mayores. Entre los muchos desafíos para mejorar los sistemas de soporte circulatorio, uno de los principales será diseñar superficies no biológicas suficientemente inertes que disminuyan la frecuencia de complicaciones.

Declaración de conflictos de interés:

La autora declara que no posee conflictos de interés

Bibliografía

1. ECMO. Extracorporeal cardiopulmonary support in critical care. 4th Edition, 2012. Eds Annich G, Lynch W, MacLaren G, Wilson J, Bartlett R. Michigan, USA.
2. Long AT, Kenne E, Jung R, Fuchs TA, Renné T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost*. 2016;14:427-37.
3. Larsson M, Rayzman V, Nolte MW et al. A factor XIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk. *Sci Transl Med*. 2014;6:222ra17.

4. Lubnow M, Philipp A, Dornia C et al. D-dimers as an early marker for oxygenator exchange in extracorporeal membrane oxygenation. *J Crit Care*. 2014; 29:473.e1-5.
5. Hundalani SG, Nguyen KT, Soundar E et al. Age-based difference in activation markers of coagulation and fibrinolysis in extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Crit Care Med*. 2014;15:e198-205.
6. McManus ML, Kevy SV, Bower LK et al. Coagulation factor deficiencies during initiation of extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr*. 1995;126:900-904.
7. Valhonart H, Swinford RD, Ingelfinger JR et al. Rapid activation of the alternative pathway of complement by extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO J*. 1999;45:113-114.
8. Kawahito K, Kobayashi E, Misawa Y et al. Recovery from lymphocytopenia and prognosis after adult extracorporeal membrane oxygenation. *Arch Surg*. 1998;133:216-217.
9. Zimmerman, J.J. Congenital heart disease, cardiopulmonary bypass, systemic inflammatory response syndrome, compensatory anti-inflammatory response syndrome, and outcome: evolving understanding of critical care inflammation immunology. *Crit Care Med*. 2002;30: 178-9.
10. Anderson HL, Ciley RE, Zwischenberger JB et al. Thrombocytopenia in neonates after extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO Trans*. 1986;32:534-537.
11. Brass LF, Diamond SL. Transport physics and bioreology in the setting of hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2016;14:906-17.
12. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289-97.
13. Muthiah K, Connor D, Ly K et al. Longitudinal changes in hemostatic parameters and reduced pulsatility contribute to non-surgical bleeding in patients with centrifugal continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35:743-51.
14. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2003;349:343-9.
15. Jilma-Stohlwetz P, Quehenberger P, Schima H et al. Acquired von Willebrand factor deficiency caused by LVAD is ADAMTS-13 and platelet dependent. *Thromb Res*. 2016;137:196-201.
16. Bartoli CR, Kang J, Restle DJ et al. Inhibition of ADAMTS-13 by Doxycycline Reduces von Willebrand Factor Degradation During Supraphysiological Shear Stress: Therapeutic Implications for Left Ventricular Assist Device-Associated Bleeding. *JACC Heart failure*. 2015;3:860-9.
17. Rauch A, Legendre P, Christophe OD et al. Antibody-based prevention of von Willebrand factor degradation mediated by circulatory assist devices. *Thromb Haemost*. 2014;112:1014-23.
18. <https://www.else.org/Registry/Statistics/InternationalSummary.aspx>, último acceso Julio, 2016.