

# Efecto de las Heparinas de bajo peso molecular (HBPM) de primera y segunda generación sobre la prueba de generación de Trombina

Effect of first and second generation LMWH on thrombin generation parameters

Duboscq C, Ceresetto J, Stemmelin G, Shanley C, Rabinovich O, Palmer S, Bullorsky EO

Servicio Hematología, Hospital Británico de Buenos Aires, Argentina

Mail: cristinaduboscq@speedy.com.ar

Fecha de recepción: 11/11/2013  
Fecha de aprobación: 23/11/2013



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA, Vol.17 N° 3: 231-237  
Septiembre - Diciembre 2013

## Resumen

El objetivo de este estudio es investigar el efecto de enoxaparina (E) relación anti Xa/anti IIa 3.9/1 y bemiparina (B), relación anti FXa/anti IIa 8/1 sobre los parámetros de la prueba de generación de trombina (TG). **Métodos:** Se realizó la prueba de generación de trombina en plasma rico en plaquetas de plasma de 15 donantes de sangre adicionados con concentraciones crecientes de bemiparina o enoxaparina. EL TG también se realizó en plasma de pacientes sometidos a cirugía ortopédica mayor con dosis profilácticas de bemiparina (n=10) y enoxaparina (n=10) extraídos 4 hs post inyección subcutánea de cada droga. La actividad anti Xa se determinó mediante un ensayo cromogénico. Para cada muestra se determinó el índice de propagación (IR), el potencial endógeno de trombina (ETP), la fase lag (tlag), la concentración máxima de trombina (Tmax) y el tiempo para alcanzar Tmax. **Resultados:** *In vitro*, ambas HBPM decrecen el ETP y el IR en forma directamente proporcional a la concentración de HBPM. La IC 50 % (concentración expresada en U anti Xa/ml que disminuye cada parámetro al 50 %)

fueron Bemiparina (n=15) Tmax = 0.60±0.05; ETP = 0.75 ± 0.06; IR 0.56± 0.03 Enoxaparina: Tmax = 0.42 ± 0.01; ETP = 0.50±0.06; IR = 0.41±0.01. Cuando la comparaciones se hacen en función de las actividades anti IIa no existen diferencias significativas entre ambas heparina. Todos los pacientes mostraron actividad anti Xa: B= 0, 35 ± 0.14 anti Xa /ml y para E=0.28 ±0.11 U anti Xa/ml. Todas las muestras de los pacientes mostraron una reducción en ETP, IR y Tmax con un alargamiento de la fase lag. **Conclusiones:** Los estudios *in vitro* muestran que para iguales actividades anti Xa la B tiene menor capacidad inhibir la generación de trombina que E; este hecho está de acuerdo con su menor actividad anti FIIa. En función de su actividad anti IIa ambas heparinas mostraron comportamientos similares en TG.

No obstante en los pocos pacientes estudiados Enoxaparina y Bemiparina no mostraron diferencias significativas en la prueba de generación de trombina

**Palabras claves:** enoxaparina, bemiparina, generación de trombina

## Abstract

The aim of this study is to investigate the effect of enoxaparin (E), Anti Xa/anti IIa activity ratio: 3.9/1 and bemiparin (B), Anti Xa/IIa activity ratio: 8/1 on the TG test in presence of platelets. **Methods:** Platelet rich plasma from fifteen blood donors were spiked with increasing concentration of E and B. Plasma of patients treated with a prophylactic dose of E (n=10) or B (n=10) was obtained between 4 hours post subcutaneous injection. Anti Xa activity in spiked plasma and patient plasmas were measured with chromogenic assay. For each LMWH a standard curve with the same drug was performed. TG was measured in platelet rich plasma initiated by recombinant tissue factor 15 $\mu$ M and CaCl<sub>2</sub>, 10nM. For each sample we determined the index rate of propagation (IR), endogenous thrombin potential (ETP), the lag phase (t<sub>lag</sub>), max-

imum thrombin concentration (T<sub>max</sub>) and time (t<sub>max</sub>) to reach T<sub>max</sub>. **Results:** In vitro, both anticoagulant decreased ETP and IR in a concentration depend manner. The IC 50 (concentration, expressed as U anti Xa/ml, that diminished 50 % of each parameter) were: bemiparin (n=15) T<sub>max</sub>= 0.60 $\pm$ 0.05; ETP= 0.75  $\pm$  0.06; IR 0.56 $\pm$  0.03 Enoxaparin: T<sub>max</sub>= 0.42  $\pm$  0.01; ETP= 0.50 $\pm$ 0.06; IR=0.41 $\pm$ 0.01. All patients showed anti Xa activity for B= 0, 35  $\pm$ 0.14 U anti Xa /ml and for E=:0.28  $\pm$ 0.11UI U anti Xa/ml. All sample patients showed a reduction in ETP, IR and T<sub>max</sub> with a lag phase prolonged. **Conclusions:** *In vitro* studies B showed lower inhibitory activity towards TG than E according its lower anti IIa activity. However in these few patients samples E and B did not show any difference on TG parameters.

**Key words:** bemiparin-enoxaparin-thrombin generation

## Introducción

Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM), obtenidas por despolimerización de la heparina no fraccionada, tienen gran diversidad de pesos moleculares y propiedades fisicoquímicas. El efecto anticoagulante lo ejercen potenciando la acción inhibitoria de la antitrombina sobre el FXa, IIa y en menor medida FIXa. Para ser consideradas HBPM el 60 % de su peso molecular debe estar debajo de 8000 Dalton.<sup>(1-3)</sup>

La relación anti Xa /anti IIa es mayor que 1 en todas las HBPM, pero tienen alta variabilidad (Tabla 1).

Tabla 1: Características de las principales HBPM<sup>(1)</sup>

HBPM	PM promedio	antiXa/anti IIa
Enoxaparina	4500	3.9
Dalteparina	6000	2.5
Tinzaparina	6500	1.6
Parnaparina	5000	2.3
Nadroparina	4300	3.3
Bemiparina	3600	8.0
Reviparina	4400	4.2

También difieren en la vida media de las fracciones anti Xa y anti IIa y en su habilidad para inducir la liberación del TFPI del endotelio.<sup>(4-5)</sup>

Como los procesos de producción y sus actividades biológicas son diferentes, no todas las HBPM son intercambiables, ya que presentan diferencias en el perfil farmacológico. Así, cada heparina tiene su propio nicho terapéutico en un contexto clínico de-

terminado. El intercambio de las HBPM basado en la potencia biológica no es aconsejable y la FDA, WHO, American College of Chest Physicians and American College of Cardiology consideran a cada HBPM una droga distinta.

Entre las principales ventajas de la HBPM frente a la heparina no fraccionada se puede mencionar su farmacocinética predecible, su excelente biodisponibilidad luego de la administración subcutánea y su larga vida media.<sup>(6)</sup>

Numerosos estudios clínicos han demostrado la utilidad de las HBPM en el manejo del síndrome coronario, accidente cerebrovascular trombotico, trombosis en cáncer y profilaxis de cirugías ortopédicas.<sup>(7-10)</sup>

Durante largo tiempo se ha debatido si debe o no monitorearse los niveles de heparinemia. Los resultados de los numerosos estudios clínicos han demostrado seguridad y eficacia en la mayoría de los pacientes que reciben HBPM a dosis fijas haciendo el monitoreo innecesario. Al aumentar el uso en todo tipo de pacientes, diferentes a los de los estudios clínicos, se vio que existiría un tipo de pacientes seleccionados (por ejemplo pacientes con falla renal) donde sería útil determinar el nivel de heparinemia. La normas internacionales indican que no se necesita monitoreo en pacientes con dosis profilácticas y recomiendan monitoreo de los niveles de U anti Xa/ml sólo para pacientes seleccionados (pacientes con falla renal, embarazadas, obesos, pediátricos y con

terapia de larga duración) cuando reciben dosis anticoagulantes.<sup>(3, 11,12)</sup>

En el caso de monitorear el nivel de heparinemia, se debe hacer con un método anti Xa cromogénico, equipo específico y calibrado con un patrón internacional o la HBPM que recibe el paciente. La toma de la muestra debe hacerse entre 3 y 4 hs post aplicación de la droga; la **Tabla 2** muestra los valores que se deberían observar para las diferentes HBPM. Se ha reportado que el nivel de anti Xa en plasma no muestra una buena correlación con el desenlace clínico final (hemorragia o trombosis).<sup>(3, 11,13)</sup>

**Tabla 2:** Niveles plasmático de U anti Xa/ml que deberían obtenerse a las 4 hs post administración de las distintas HBPM<sup>(3)</sup>

Dosis y Tipo de HBPM	Valores target a las 4 Hs U anti Xa /ml
Nadroparina dos veces por día	0.6-1.0
Dalteparin una vez por día	1.05
Enoxaparina dos veces por día	0.6-1.0
Enoxaparina una vez por día	>1.0
Nadroparinina una vez por día	1.3
Bemiparina subcutánea	0.54
Tinzaparina una vez por día	0.85

Dado que el efecto central de estos anticoagulantes es disminuir la generación de trombina, la prueba de generación de trombina (TG) sería una buena herramienta para estudiar las HBPM. Sin bien la influencia de los distintos HBPM sobre los parámetros de TG es variable, no ha sido establecido aún cuál es el mejor parámetro para monitorear este tipo de droga.<sup>(14-15)</sup>

Bemiparina es la heparina de menor peso molecular (3600 Da) y de mayor vida media con una relación anti Xa/anti IIa de 8/1. Si bien en la literatura existen pocos reportes acerca de cómo afecta los parámetros del test de generación de trombina, la utilidad de esta heparina de segunda generación ha sido demostrada en diferentes estudios clínicos.<sup>(16-17)</sup>

El objetivo de este trabajo es comparar el efecto sobre los perfiles de la generación de trombina en

presencia de plaquetas de la enoxaparina (E) y bemiparina (B) en plasma normales adicionados con HBPM. También se investiga los perfiles de generación en pacientes tratados con dosis profilácticas de ambas HBPM.

## Métodos

**Población para pruebas in vitro:** plasma de 15 donantes sanos que no han ingerido medicación en los últimos 10 días fue recolectada en citrato 3,2 % (nueve partes de sangre una parte de citrato).

Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación por 10 min a 150 g a temperatura ambiente. El recuento de plaquetas fue ajustado a  $2.0 \times 10^9$  cel /L.

El plasma rico en plaquetas de cada donante fue adicionado con cantidades crecientes (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 unidades U anti Xa/ml) de cada una de las heparinas de bajo peso (E o B).

**Pacientes:** 10 pacientes (4 mujeres, edad: 55 (40-70) años) tratados con dosis profilácticas de enoxaparina y 10 pacientes (5 mujeres, edad 59 (46-72) años) tratados con dosis profilácticas de bemiparina post cirugía ortopédica mayor. Todas las muestras fueron extraídas a las 4 hs post inyección subcutánea de la droga en citrato 3,2 %.

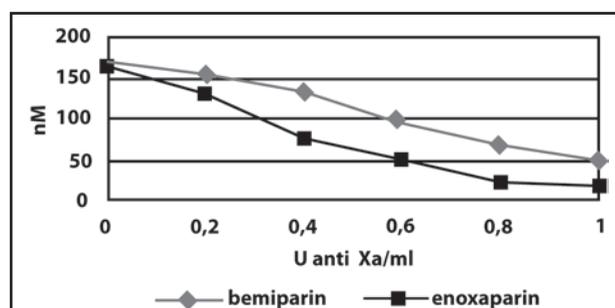
A todos los pacientes se les realizaron el dosaje de todos los factores de coagulación por método coagulable en una etapa.

**Determinación de los niveles de anti Xa /ml:** el nivel de heparinemia expresados como niveles de anti Xa/ ml se determinó por sustrato cromogénico utilizando un método equipo específico (Hemosil heparin, de Instrumentation Laboratory). Se realizó una curva de calibración para cada heparina utilizando un calibrador preparado con E o B respectivamente. Las curvas fueron validadas mediante la utilización de controles interno de calidad de dos niveles 0 U anti Xa/ml y 0.6 U anti Xa/ml

**Prueba de generación de trombina:** La TG fue medido en plasma rico en plaquetas utilizando factor tisular recombinante 15 uM (Recombiplastin, Instrumentation Laboratory) y  $Cl_2Ca$  (Cf:10 nM). Cada 30 seg se tomó una alícuota y se determinó la concentración de trombina generada por su acción sobre un sustrato cromogénico específico (S-2238 0.2

mM). Para cada concentración de HBPM se graficó la concentración de trombina vs tiempo de reacción y a partir de allí se determinó el potencial endógeno de trombina (ETP), la fase lag (t<sub>lag</sub>), la concentración máxima de trombina (T<sub>max</sub>) y el tiempo en alcanzar el pico (t<sub>max</sub>). Se calculó el índice de propagación (IR) expresado en nM/min como el cociente entre el T<sub>max</sub> y la diferencia entre el tiempo al pico y la fase lag.

**Análisis estadístico:** Los datos son mostrados como media  $\pm$  SD. La comparación estadística entre los distintos parámetros del TG de las distintas heparinas se realizó utilizando el test no paramétrico de Mann Whitney. Se consideraron significativas  $p < 0.05$ .



**Figura 1:** Efecto de la HBPM agregadas in vitro sobre el pico de trombina. Cada punto es el promedio de los 15 ensayos para cada concentración y cada HBPM

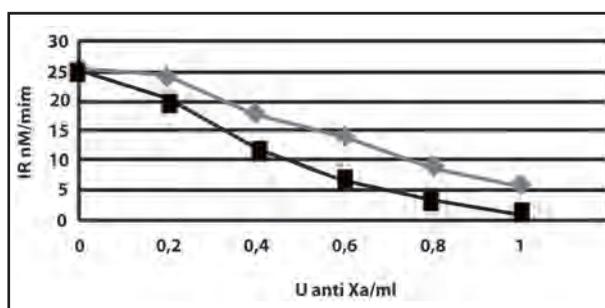
Bemiparina disminuyen significativamente la concentración máxima de trombina y el ETP a concentraciones mayores de 0.6 unidades U anti Xa/ml mientras que Enoxaparina inducen una disminución de la concentración máxima de trombina y el ETP a partir de concentraciones superiores a 0.4 U anti Xa/ml.

En base a su actividad anti Xa, a cada concentración

## Resultados

### Efecto de E o B sobre la generación de trombina.

Todas las muestras adicionadas *in vitro* con E o B mostraron actividad de U anti Xa/ml acorde a lo esperado. EL t<sub>lag</sub> y t<sub>max</sub> en presencia de E o B se prolongó respecto al control ( $p < 0.05$ ) cuando la concentración fue mayor o igual a 0.4 U anti Xa/ml de ambas HBPM. Para concentraciones menores de 0.4 U anti Xa/ml no se observaron alteraciones en ninguno de los parámetros del TG estudiados Bemiparina and enoxaparina descienden el ETP, índice de propagación y el pico de trombina en forma concentración dependiente. (Fig 1-2).



**Figura 2:** Efecto de la HBPM agregadas in vitro sobre el índice de propagación (IR). Cada punto es el promedio de los 15 ensayos para cada concentración y cada HBPM.

estudiada, bemiparina tiene un efecto menor sobre el IR, la concentración máxima de trombina y el ETP comparada con enoxaparina. En cambio, de acuerdo a su relación anti IIa no hay diferencias significativas en ningún parámetro estudiado como lo demuestran las dosis IC 50 (cantidad de droga necesaria para disminuir cada parámetro al 50 % del valor del control). (Tabla 3)

**Tabla 3:** IC 50: concentración de cada droga expresada como U anti Xa/ml y U anti IIa /ml que disminuye el 50 % el valor de los parámetros investigados

	Bemiparina (n=15)	Enoxaparina (n=15)
T Máx.	0.60 $\pm$ 0.05 U anti Xa/ml	0.42 $\pm$ 0.01 U anti Xa/ml
	0.075 $\pm$ 0.06 U anti IIa/mL	0.084 $\pm$ 0.03 U anti IIa/mL
ETP	0.75 $\pm$ 0.04 U anti Xa/ml	0.50 $\pm$ 0.06 U anti Xa/ml
	0.094 $\pm$ 0.03 U anti IIa/mL	0.10 $\pm$ 0.04 U anti IIa/mL
IR	0.56 $\pm$ 0.03 U anti Xa/ml	0.41 $\pm$ 0.01 U anti Xa/ml
	0.07 $\pm$ 0.02 U anti IIa/mL	0.08 $\pm$ 0.03 U anti IIa/mL

Acorde a los resultados obtenidos se puede decir que tanto la bemiparina como la enoxaparina inhiben, cuando se adicionan *in vitro*, la generación de trombina en base a su actividad anti IIa.

### Generación de trombina en los pacientes tratados con dosis profilácticas de enoxaparina y bemiparina

Todos los pacientes mostraron actividad anti Xa medidas por sustrato cromogénico a las 4 hs post inyección. Para bemiparina la media fue de  $0,35 \pm 0.14$  U antiXa/ml (n=10) and para enoxaparina:  $0.28 \pm 0.11$  U anti Xa/ml (n=10). Dada la diferencia de relación anti Xa/anti IIa se deben realizar dos curvas de calibra-

ción independientes. Los niveles de cada uno de los factores de coagulación fueron comparables en ambos grupos (datos no mostrados).

Cada uno de los pacientes estudiado presentó niveles plasmáticos de los factores de coagulación normales y comparables a los del grupo control.

Todas las muestras de los pacientes mostraron disminución en el ETP (porcentaje de disminución B= 14.3 %; E=16.7%), prolongación de la fase lag, disminución del pico de trombina (B=24 %; E= 27%) y principalmente reducción del IR respecto al control (E=33.3%; E=36.6 %). En los parámetros estudiados no se observaron diferencias significativas entre los pacientes tratados con enoxaparina y bemiparina. (Tabla 4)

Tabla 4: Parámetros de la prueba de generación de trombina en los pacientes anticoagulados con enoxaparina y bemiparina a dosis profilácticas

	Control	Bemiparina (n=10)	Enoxaparina (n=10)
Heparinemia (anti Xa /ml)	0.001±0.01	0,35 ±0.14 U	0.28 ±0.11
T Máx. (nM)	165 ± 32	125 ± 54	119 ± 67
ETP (nM/min)	1435 ± 320	1230 ± 285	1195 ± 236
IR (nM/min)	30 ± 6	20 ± 11	19 ± 9

### Conclusiones

En base a su actividad antiXa las HBPM muestran un efecto inhibitorio variable sobre los parámetros de generación de trombina. En ensayos *in vitro*, bemiparina presenta menor actividad inhibitoria en la generación de trombina. La IC 50 es mayor para bemiparina que para enoxaparina en todos los parámetros estudiados en base a su actividad anti Xa. Estos resultados están de acuerdo a lo publicado por Gerotziafas et al.<sup>(16)</sup>

Cuando la comparación se hace en base a las actividades anti IIa ambas HBPM muestran comportamientos similares en el sistema experimental utilizado.

Los resultados obtenidos permiten decir que el efecto de la HBPM sobre la generación de trombina estaría dado por la fracción anti IIa presentes en toda HBPM.<sup>(17)</sup> Estos resultados están de acuerdo con los descrito en estudios previos que demuestran que la inhibición del ETP esta principalmente determinado por la concentración del extremo carboxi terminal que contiene el pentasacárido que une a AT y exhibe

actividad anti IIa.<sup>(18)</sup>

La actividad anti Xa sería la responsable de la reducción de la fase de propagación en el test de generación iniciado por el factor tisular, siendo aparentemente el IR el parámetro más sensible a la fracción anti Xa.

Todos los pacientes estudiados tratados con dosis profilácticas de E o B redujeron la generación de trombina mostrando dentro de un mismo grupo una respuesta variable. Esta variabilidad en la reducción de generación de trombina en pacientes tratados con enoxaparina post cirugía de rodilla o reemplazo total de cadera fue reportada recientemente por Giannis MN et al.<sup>(19)</sup>

Los parámetros de la generación de trombina de los pacientes estudiados a las 4 hs post inyección son similares, tal vez porque luego de la administración subcutánea la actividad anti IIa de ambas heparinas es rápidamente depurada, mientras que la actividad anti Xa permanece en plasma por un período de tiempo más prolongado. Este hecho está de acuerdo

con que *in vivo* la eficacia de las HBPM está relacionada con su función anti Xa. La importancia de la actividad anti Xa como estrategia antitrombótica ha sido sustentada por los numerosos estudios clínicos que han probado la eficacia del fondaparinux en la prevención y tratamiento del tromboembolismo venoso y el síndrome coronario agudo.

Resumiendo, se puede decir que los pacientes con dosis profiláctica de enoxaparina o bemiparina disminuyeron los parámetros de generación de trombina respecto al control siendo el IR el parámetro más sensible a la presencia de las HBPM. Son necesarios más estudios para establecer si uno o varios de los parámetros de la TG son útiles para monitorear las HBPM

### Declaración de conflictos de intereses

Todos los autores de este manuscrito declaran que no existe ningún conflicto de intereses relacionado con este artículo.

### Bibliografía

- 1- Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin *Thromb Haemost.* 2008; 99 (5): 807-18.
- 2- Linhardt RJ, Gunay NS. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost.* 1999; 25 (Suppl 3): 5-16.
- 3- Samama David A, Garcia, Trevor P, Baglin, Jeffrey I et al. Evidence-Based Clinical Practice Guidelines ed: American College of Chest Physicians Therapy and Prevention of Thrombosis. *Chest* 2012; 141: e24S-e43S
- 4- Samama MM, Gerotziapas GT Comparative pharmacokinetics of LMWHs. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26 (Suppl 1): 31-8.
- 5- Hansen JB, Sandset PM. Differential effects of low molecular weight heparin and unfractionated heparin on circulating levels of antithrombin and tissue factor pathway inhibitor (TFPI): a possible mechanism for difference in therapeutic efficacy. *Thromb Res.* 1998; 91(4): 177-81.
- 6- Fareed J, Jeske W, Hoppensteadt D, Clarizio R, Walenga JM Low-molecular-weight heparins: pharmacologic profile and product differentiation. *Am J Cardiol.* 1998 (10); 82 (5B): 3L-10L.
- 7- Kearon C, Ginsberg JS, Julian JA et al. Comparison of fixed-dose weight-adjusted unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin for acute treatment of venous thromboembolism *JAMA.* 2006 (23); 296 (8): 935-42.
- 8- Lee AY, Levine MN, Baker RI et al Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349 (2): 146-53
- 9- Abbate R, Gori AM, Farsi A, Attanasio M, Pepe G. Monitoring of low-molecular-weight heparins in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 1998 (10); 82(5B): 33L-36L
- 10- Anderson DR, O'Brien BJ, Levine MN, Roberts R, Wells PS, Hirsh J. Efficacy and cost of low-molecular-weight heparin compared with standard heparin for the prevention of deep vein thrombosis after total hip arthroplasty. *Ann Intern Med.* 1993; 119 (11): 1105-12
- 11- Baglin T, Barrowcliffe TW, Cohen A, Greaves M. British Committee for Standards in Haematology Guidelines on the use and monitoring of heparin. *Br. J Haematol.* 2006; 133(1): 19-34.
- 12- Greaves M. Limitations of the laboratory monitoring of heparin therapy. Scientific and Standardization Committee Communications: on behalf of the Control of Anticoagulation Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 2002; 87 (1): 163-4.
- 13- Bara L, Leizorovicz A, Picolet H, Samama M. Correlation between anti-Xa and occurrence of thrombosis and haemorrhage in post-surgical patients treated with either Logiparin (LMWH) or unfractionated heparin. Post-surgery Logiparin Study Group. *Thromb Res.* 1992; 65 (4-5): 641-50
- 14- Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Hemost.* 2000; 83(4): 589-91
- 15- Hemker HC, Béguin S. Mode of action of unfractionated and low molecular weight heparins on the generation of thrombin in plasma. *Haemostasis.* 1990; 20 (Suppl 1): 81-92.
- 16- Gerotziapas GT, Petropoulou AD, Verdy E, Samama MM, Elalamy I. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(5): 955-62.
- 17- Sánchez-Ferrer CF Bemiparin: pharmacological profile. *Drugs.* 2010; 70 (Suppl 2): 19-23.

- 18- Al Dieri R, Wagenvoort R, van Dedem GW, Béguin S, Hemker HC The inhibition of blood coagulation by heparins of different molecular weight is caused by a common functional motif--the C-domain. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(5): 907-14
- 19-Gionis Mn, Ioannou CV, Katsamouris AN et al .The estudy of the thrombin generation mechanism and the effect of low molecular weight heparin as thromboprophylaxis in patients undergoing total knee and hip replacement. *Thromb Res.* 2013 in press ;doi10.1016/j.thromres.2013.09.037