

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de
Toxicologia**

**TROMBOSIS ARTERIAL Y SU
INHIBICIÓN MEDIANTE TRES
ESTRATEGIAS DE CONTROL
DEL RIESGO CARDIOVASCULAR**

Sonia Sánchez Gómez

2003

a Daniel

a mi familia

a mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Si realizo un cálculo aproximado del tiempo que he invertido en la realización de la Tesis Doctoral, me doy cuenta que le he dedicado prácticamente un 20% de mi vida. Durante todo este tiempo he tenido la oportunidad de introducirme en el mundo de la ciencia y de aprender muchísimas cosas. También he tenido la suerte de conocer a gente fantástica que ha estado conmigo y me ha apoyado en todo momento, sin la cual no habría podido llevar a cabo este proyecto. Por ello quisiera darles las gracias a todas esas personas.

En primer lugar quiero agradecer a Lina Badimon que me acogiese en el grupo, cuando yo ya había perdido la esperanza de poderme dedicar a la investigación. Gracias a ella y a su dirección, pude aprender gran cantidad de técnicas y adquirir un conocimiento considerable de la patología cardiovascular.

Al inicio de mi estancia en el grupo pude conocer a gente que actualmente ya no se encuentra en él, como José, que fue mi guía durante todo el tiempo que compartimos. Fue él quien me enseñó todo sobre el procedimiento de trombosis *ex vivo* y me introdujo en el uso de animales de experimentación y en la farmacología. Es más, colaboró conmigo en la realización de algunos trabajos que aparecen en esta tesis. Él, Toni y Teresita me ayudaron mucho en mis inicios como investigadora. A Susanna y Antonio les agradezco enormemente sus consejos y enseñanzas sobre las primeras técnicas laboratoriales que aprendí. Pero en esa época, la persona con quien más compartí y que me proporcionó más apoyo, tanto técnicos como personales, fue Núria. Todavía me acuerdo como empezamos juntas a aprender a utilizar técnicas nuevas para nosotras y el apoyo mutuo cuando surgían dificultades, ¡muchísimas gracias!

Tengo que agradecer muchísimo toda la ayuda que me han proporcionado Maya, Pablo, Rosa, Maribel, Olga y Vannesa por su colaboración en todos los trabajos de esta Tesis, sin ellos, ésta hubiese sido irrealizable. También tengo presente la gran cantidad de ocasiones en que Laura y Gemma me proporcionaron ayuda en los experimentos de trombosis. Y como no, a Oriol, por la paciencia que tuvo al enseñarme las diferentes técnicas de histología, y sobretodo a utilizar el sistema de análisis de imagen. Pude contar con la ayuda de Vicenta, Xevi y Marta para la realización de técnicas de biología molecular, Nia me ayudo con los Westerns y gracias a Teresa pude poner a punto la técnica de actividad procoagulante. Respecto a la escritura de la Tesis, a parte de gran ayuda de Lina, agradezco a I tziar sus ideas y consejos, y a Vicenta, a Teresa y a mi tutor, Joan Costa, su esfuerzo en la corrección de la misma. Igualmente, me acuerdo de la gente de Sant Pau, Pepe, Cristina, Berta, Jordi, Javi, Marta, Silvia...; y del CI D, Jureck, Judith, Albert, Sandra, Oriol, Marta, Silvia..., todos ellos también han colaborado de alguna manera a que yo haya podido finalmente completar esta Tesis.

Fuera del laboratorio, quiero darles las gracias a todos mis amigos por los buenos ratos que he pasado con ellos y por sus ánimos durante este periodo tan importante de mi vida.

Sin duda, de quien más fuerza y apoyo he recibido durante esta etapa ha sido de mi familia. Ellos, han estado conmigo incansablemente, cuando estaba contenta y motivada, y sobretodo, cuando surgían

dificultades y mi ánimo decaía. Mis padres siempre me impulsaron a seguir, a pesar de ver el gran sacrificio que suponía llevar a cabo tal proyecto, nunca dudaron de mí. Dani en realidad ha participado en esta Tesis casi tanto como yo, ha estado conmigo en todo momento, me ha ayudado siempre que lo he necesitado, me ha llevado a donde hiciese falta, y sobretodo, me ha dado el sostén y el ánimo suficiente para seguir, durante todo este tiempo. ¡Gracias por tu apoyo incondicional y tu enorme paciencia!

ABREVIATURAS

¹¹¹In	Indio-111
4S	<i>Scandinavian Simvastatin Survival Study</i>
A	Adventicia
AngII	Angiotensina II
AA	Ácido araquidónico
ACD	Ácido cítrico-dextrosa
ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanina Aminotransferasa
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análisis de la varianza
apo B	Apoproteína B
aPTT	Tiempo parcial de tromboplastina activada
ASA	Ácido acetilsalicílico (aspirina)
AST	Aspartato aminotransferasa
AUC	Área bajo la curva
BSA	Albúmina bovina sérica
BUN	Nitrógeno ureico plasmático
CARE	<i>Cholesterol and Recurrent Events Trial</i>
cdNA	Ácido desoxiribonucleico codificante
CML	Célula/s musculare/s lisa/s
Cox	Ciclooxigenasa
cpm	Cuentas por minuto
DAB	Diamino bencidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
ECA	Enzima convertidora de la angiotensina
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente con enzima conjugado
EIA	Ensayo inmunoabsorbente
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
Fb	Fibrina
FITC	Fluoresceína (isotiocianato)
FPP	Farnesil-pirofosfato
g	Unidad de gravedad

GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Difosfato de guanosina
GGPPc	Geranylgeranyl-pirofosfato trans trans cis
GGPPt	Geranylgeranyl-pirofosfato trans
GP	Glucoproteína
GTP	Trifosfato de guanosina
HC	Hiperlipémico control
HCT	Hematocrito
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HGB	Hemoglobina
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMWK	Quininógeno de alto peso molecular
HP	Hiperlipémico pravastatina
HPETE	Hidroxiperóxidos del ácido eicoxatetraenoico
HS	Hiperlipémico simvastatina
HTB	Ácido 2-hidroxi-4-trifluorometil-benzoico
I	Íntima
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelulares
IFN-γ	Interferón gamma
IL-1	Interleucina 1
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
IPP	Isopentil-pirofosfato
ISIS-2	<i>Second International Study of Infarct Survival</i>
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenoso/a
kDa	Kilodalton
L	Lumen
LAD	Arteria coronaria izquierda descendente
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL-ox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS	Lipopolisacárido
LS	Lesión
M	Túnica media

MCH	Hemoglobina corpuscular media
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
MMP	Metaloproteinasas
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NC	Normolipémico control
NF-κB	Factor de transcripción kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NSAID's	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
PAF	Factor de activación plaquetar
PAI-1	Inhibidor del activador tisular del plasminógeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Deposición plaquetaria
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	Polietilenglicol
PGHS	Prostaglandina H sintasa
PGI₂	Prostaciclina
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLT	Plaqueta/s
p.o.	Oral
Post-tto	Post-tratamiento
PRP	Plasma rico en plaquetas
PT	Tiempo de Protrombina
RBC	Glóbulos rojos
RT	Transcriptasa reversa
rFVIIai	Factor VIIa recombinante humano con el centro activo desactivado
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
rTFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular recombinante
rt-PA	Activador tisular del plasminógeno recombinante
S	Subendotelio
SDS	Docecil sulfato sódico
ST	Superficie total

T	Trombo
T.A.	Temperatura ambiente
TEMED	NNN'N'-tetra-metiletilendiamina
TF	Factor tisular
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
TFS	Triflusal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
TRITC	Rodamina (tetra-rodamina isotiocianato)
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
TX	Tromboxano
VCAM-1	Moléculas de adhesión de células vasculares
VCM	Volumen corpuscular medio
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
vs.	<i>versus</i>
vWF	Factor de von Willebrand
WBC	Glóbulos blancos
WOSCOPS	<i>West of Scotland Coronary Prevention Study</i>

ÍNDICE

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	I
-------------------------------	----------

<i>ABREVIATURAS</i>	V
----------------------------	----------

<i>ÍNDICE</i>	XI
----------------------	-----------

<i>PRESENTACIÓN</i>	1
----------------------------	----------

<i>INTRODUCCIÓN</i>	5
----------------------------	----------

FORMACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA.....	7
---	----------

LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	7
-------------------------------	---

Factores Derivados del Endotelio.....	8
---------------------------------------	---

Mecanismos de Disfunción Endotelial.....	10
--	----

EL INICIO DE LA LESIÓN: LA ESTRÍA GRASA.....	11
--	----

PROGRESIÓN DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA.....	12
---	----

ESTABILIDAD DE LA PLACA. PROCESO ATEROTROMBÓTICO.....	14
---	----

Factores Locales.....	15
-----------------------	----

Severidad de la Lesión Vascular, Importancia del Factor Tisular.....	15
--	----

Fuerzas Hemodinámicas de Flujo.....	16
-------------------------------------	----

Superficie del Trombo Residual.....	17
-------------------------------------	----

Vasoconstricción.....	17
-----------------------	----

Factores Sistémicos: Estado Hipertrombótico Sistémico.....	18
--	----

TROMBOSIS ARTERIAL.....	20
--------------------------------	-----------

PLAQUETAS.....	20
----------------	----

Activación Plaquetar.....	22
---------------------------	----

Adhesión Plaquetar.....	22
-------------------------	----

Secreción y Agregación Plaquetar.....	23
---------------------------------------	----

COAGULACIÓN SANGUÍNEA.....	25
----------------------------	----

FIBRINOLISIS.....	28
-------------------	----

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DESTINADAS AL TRATAMIENTO DE LA ATERTROMBOSIS.....	30
INHIBICIÓN DE LA CICLOOXIGENASA.....	31
La Vía de la Ciclooxygenasa.....	31
Los Salicilatos: Aspirina y Triflusal.....	33
Farmacocinética.....	34
Farmacodinámica	35
Farmacología Clínica.....	38
INHIBICIÓN DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR.....	39
El Factor VIIa Recombinante Humano con el Centro Activo Desactivado: FFR-rFVIIa.....	41
INHIBICIÓN DE LA HMG-CoA REDUCTASA.....	43
La Vía del Mevalonato.....	43
Inhibidores de la HMG-CoA Reductasa.....	44
Farmacocinética.....	45
Farmacodinámica	46
Farmacología Clínica.....	49
MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES.....	51
ATEROSCLEROSIS.....	51
TROMBOSIS.....	53
<i>OBJETIVOS</i>	57
<hr/>	
<i>MÉTODOS</i>	61
<hr/>	
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	63
MODELO EXPERIMENTAL.....	64
GRUPOS DE ANIMALES Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS.....	64
Estudio con Inhibidor del Factor Tisular, FFR-rFVIIa.....	64
Estudio con Inhibidores de la Ciclooxygenasa.....	65
Estudio con Inhibidores de la HMG-CoA Reductasa.....	67

DETERMINACIONES SANGUÍNEAS.....	69
RECOGIDA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE.....	69
RECUENTO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	70
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	70
COAGULACIÓN SANGUÍNEA.....	71
ACTIVIDAD PROCOAGULANTE DEL FACTOR TISULAR CIRCULANTE.....	72
Obtención de Extractos a partir de Sangre Total.....	73
Tratamiento <i>in vitro</i> de los Extractos.....	73
Determinación de la Actividad Procoagulante del Factor Tisular.....	73
NIVELES PLASMÁTICOS DE FFR-rFVIIa.....	73
LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	75
AGREGACIÓN PLAQUETAR <i>EX VIVO</i>	76
ESTUDIO DEL TROMBO FORMADO SOBRE PARED VASCULAR LESIONADA.....	78
SUBSTRATOS VASCULARES.....	79
Tratamiento Local de la Pared Vascul ar con FFR-rFVIIa.....	80
MARCAJE DE PLAQUETAS.....	80
DETERMINACIÓN DE LA DEPOSICIÓN PLAQUETAR.....	81
BIODISTRIBUCIÓN DE LAS PLAQUETAS EN EL ORGANISMO.....	86
ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL TROMBO.....	87
LOCALIZACIÓN FACTOR TISULAR EN EL TROMBO Y EN LA PARED VASCULAR.....	88
ANÁLISIS DE LA PLAQUETA: EXPRESIÓN DE RHO A ACTIVADO.....	88
OBTENCIÓN DE LAS PLAQUETAS.....	89
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA: FRACCIÓN DE MEMBRANA.....	89
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RHO A ACTIVADO.....	90
EVALUACIÓN DE LAS LESIONES VASCULARES.....	90
VALORACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES: EXTENSIÓN DE LA LESIÓN.....	90
ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA PARED VASCULAR.....	91
Preparación de Especímenes.....	91

Engrosamiento de la Íntima.....	92
Contenido Lipídico de la Lesión.....	93
Inmunohistoquímica.....	93
Marcaje por Inmunofluorescencia.....	94
Marcaje por Inmuno-Peroxidasa por el Sistema Avidina-Biotina.....	95
Análisis de Imagen y Cuantificación de los Marcadores.....	96
ANÁLISIS DE COX, MCP-1 Y eNOS A NIVEL DE mRNA Y PROTEÍNA EN LA PARED VASCULAR.....	97
RECOGIDA DE TEJIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE RNA Y PROTEÍNA.....	97
EXTRACCIÓN DE RNA Y PROTEÍNA.....	98
ANÁLISIS DEL RNA.....	99
Cuantificación del RNA y Verificación de la Integridad del RNA.....	99
Amplificación del RNA: RT-PCR.....	99
Transcripción Reversa del mRNA.....	100
Reacción en Cadena de la Polimerasa: PCR.....	100
<i>PCR semicuantitativa</i>	101
<i>PCR a tiempo real</i>	102
ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA.....	105
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	105
Tranferencia a Membrana de Nitrocelulosa.....	106
Western Blot.....	106
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	108
SOLUCIONES.....	109
<i>RESULTADOS</i>	113
ESTUDIO CON INHIBIDOR DEL FACTOR TISULAR, FFR-rFVIIa.....	115
PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS BASALES.....	115
TIEMPO DE PROTROMBINA.....	116

NIVELES PLASMÁTICOS DE FFR-rFVIIa.....	118
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE FFR-rFVIIa Y EL TIEMPO DE PROTROMBINA.....	119
AGREGACIÓN PLAQUETAR <i>EX VIVO</i>	119
TROMBO FORMADO SOBRE PARED VASCULAR LESIONADA.....	121
Trombo Formado sobre Pared Vascular Sana.....	121
Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación.....	121
Tratamiento <i>in vivo</i>	123
<i>Deposición Plaquetaria</i>	123
<u>Deposición Total</u>	123
<u>Deposición Axial</u>	125
<i>Correlación entre el Tiempo de Protrombina y los Niveles de FFR-rFVIIa en Plasma y la Deposición Plaquetaria</i>	127
<i>Composición del Trombo</i>	128
<u>Cuantificación de la Fibrina Presente en el Trombo</u>	130
Tratamiento <i>in vitro</i>	132
<i>Deposición Plaquetaria</i>	132
Localización de Factor Tisular en los Substratos Vasculares y en el Trombo.....	133
Actividad Procoagulante del Factor Tisular Circulante.....	135
Trombo Formado sobre Pared Vascular Aterosclerótica.....	136
Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación.....	136
Tratamiento <i>in vivo</i>	137
<i>Deposición Plaquetaria</i>	137
<u>Cuantificación de la Fibrina Presente en el Trombo</u>	139
ESTUDIO CON INHIBIDORES DE LA CICLOOXIGENASA.....	140
TRATAMIENTO AGUDO.....	140
Trombo Formado sobre un Trombo Preformado sobre Pared Vascular Lesionada: Trombosis Secundaria.....	141
Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación.....	141
Deposición Plaquetar.....	142
TRATAMIENTO CRÓNICO.....	144
Seguimiento de los Parámetros Hematológicos y Bioquímicos.....	144

Trombo Formado sobre un Trombo Preformado sobre Pared Vascular Lesionada: Trombosis Secundaria.....	145
Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación.....	146
Deposición Plaquetar.....	147
Composición del Trombo.....	148
Efecto de la Aspirina y del Trifusal sobre la Expresión de Cox-1 y Cox-2 en la Pared Vascular.....	149
Expresión Génica de Cox-1 y Cox-2.....	150
Expresión Proteica de Cox-2.....	151
ESTUDIO CON INHIBIDORES DE LA HMG-CoA REDUCTASA.....	153
TRATAMIENTO CON ESTATINAS DURANTE 50 DÍAS.....	153
Evolución del Peso y de los Parámetros Hematológicos, Bioquímicos y de Coagulación.....	154
Evolución de los Lípidos Plasmáticos.....	156
Colesterol Total y Triglicéridos.....	156
Lipoproteínas.....	158
Agregación Plaquetar <i>ex vivo</i>	160
Trombo Formado sobre Pared Vascular Lesionada.....	162
Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación.....	162
Deposición Plaquetaria.....	163
<i>Deposición Plaquetar en Condiciones de Flujo Laminar Paralelo y Alta Velocidad de Cizalladura.....</i>	<i>163</i>
<i>Deposición Plaquetar en Condiciones Flujo no Laminar no Paralelo y Velocidad de Cizalladura Variable (Estenosis Vascular).....</i>	<i>165</i>
Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y la Deposición Plaquetaria.....	169
Composición del Trombo.....	171
Análisis de la Plaqueta: Expresión de Rho A Plaquetario.....	171
Lesiones Vasculares.....	172
Extensión de la Lesión.....	172
Engrosamiento de la Capa Íntima Aórtica y Coronaria.....	174
Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y el Tamaño de la Lesión Arterial.....	176

Composición de la Lesión.....	177
<i>Contenido Lipídico de la Lesión</i>	177
<i>Componentes de la Lesión Vascul</i> ar.....	178
Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y la Composición de la Lesión Arterial.....	184
Correlación entre el Tamaño y la Composición de la Lesión Aórtica.....	184
Expresión Génica de MCP-1, eNOS y Cox (1 y 2) en la Pared Vascular.....	185
Expresión de MCP-1.....	185
Expresión de eNOS.....	186
Expresión de Cox-1 y Cox-2.....	187
TRATAMIENTO CON ESTATINAS DURANTE 100 DÍAS	188
Evolución del Peso y de los Parámetros Hematológicos, Bioquímicos y de Coagulación.....	189
Evolución de los Lípidos Plásmáticos.....	191
Colesterol Total y Triglicéridos.....	191
Lipoproteínas.....	193
Lesiones Vasculares.....	195
Extensión de la Lesión.....	196
Engrosamiento de la Capa Íntima Aórtica y Coronaria.....	198
Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y el Tamaño de la Lesión Arterial.....	200
Composición de la Lesión.....	200
<i>Contenido Lipídico de la Lesión</i>	200
<i>Componentes de la Lesión Vascul</i> ar.....	202
Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y la Composición de la Lesión Arterial.....	205
Correlación entre el Tamaño y la Composición de la Lesión Aórtica.....	206
Expresión Génica de MCP-1, eNOS y Cox (1 y 2) en la Pared Vascular.....	207
Expresión de MCP-1.....	207
Expresión de eNOS.....	208
Expresión de Cox-1 y Cox-2.....	210

DISCUSIÓN**211**

INHIBIDOR DEL FACTOR TISULAR, FFR-rFVIIa	216
---	------------

TROMBOSIS.....	218
INHIBIDORES DE LA CICLOOXIGENASA.....	223
TROMBOSIS.....	224
EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA VASCULAR.....	227
INHIBIDORES DE LA HMG-CoA REDUCTASA.....	231
EVOLUCIÓN DE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS.....	233
TROMBOSIS.....	235
DESARROLLO DE LA LESIÓN ATEROSCLERÓTICA.....	242
Tamaño y Composición de la Lesión.....	243
Expresión Génica de MCP-1, eNOS, Cox-1 y Cox-2.....	247
MCP-1.....	248
eNOS.....	248
Cox-1 y Cox-2.....	250
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	252
<i>CONCLUSIONES</i>	255
<i>REFERENCIAS</i>	261

PRESENTACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares derivadas de la progresión de la aterosclerosis se encuentran entre las principales causas de mortalidad y morbilidad en los países occidentales. La aterosclerosis es una patología multifactorial, que se caracteriza por tener una progresión lenta y silenciosa, hasta alcanzar tal grado de severidad que desencadena un evento isquémico. El fenómeno trombótico es clave en la evolución de la patología isquémica y contribuye tanto al crecimiento de la placa como a la oclusión definitiva del vaso cuando una placa inestable se fisura o fractura (aterotrombosis). Debido a la complejidad y a los numerosos procesos que intervienen en esta patología, actualmente existen diversas líneas farmacológicas destinadas a su tratamiento. Los fármacos antitrombóticos han sido y son ampliamente utilizados en la práctica clínica para el tratamiento del proceso agudo, y de entre ellos el más representativo es probablemente la aspirina, un inhibidor plaquetario del grupo de los salicilatos (inhibidores de la ciclooxigenasa). La aspirina ha demostrado ser efectiva en la prevención de eventos vasculares en diferentes ensayos clínicos, tanto a corto como a largo plazo (Patrono C, 2001). Sin embargo, a pesar de los beneficios obtenidos con los salicilatos y otros antitrombóticos, estos grupos farmacológicos no erradican completamente los eventos trombóticos (Harker L *et al.*, 1996), por lo que nuevos compuestos han sido objeto de investigación. Entre los más prometedores se encuentran los inhibidores directos de la trombina y los inhibidores de la producción de trombina (inhibidores del factor tisular). Este último grupo es de aparición muy reciente y todavía no se utiliza en el tratamiento de la patología isquémica cardiovascular.

Por otro lado, el descubrimiento de que la hiperlipemia supone un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular, ha motivado que se haya realizado en los últimos años un gran esfuerzo por encontrar nuevos fármacos hipolipemiantes. De entre estos cabe destacar los fibratos y, más recientemente, los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa o estatinas, ambos ampliamente utilizados en la práctica clínica. Aunque estos fármacos han conseguido reducir los eventos cardiovasculares de forma significativa (Sheperd J *et al.*, 1995; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994; Sacks FM *et al.*, 1996; The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group, 1998; Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Schwartz GG *et al.*, 2001; Sever PS *et al.*, 2003), su mecanismo de acción no está completamente aclarado. Un hecho a resaltar, es que el beneficio clínico observado en los pacientes aparece antes de que se detecte

regresión de las placas ateroscleróticas (Vaughan CJ *et al.*, 2000), lo cual sugiere que probablemente existan efectos adicionales beneficiosos además de los relacionados con la reducción de los lípidos plasmáticos y la regresión de la placa.

Por lo tanto, este trabajo se ha centrado en el estudio de los mecanismos de acción de determinados grupos farmacológicos destinados al tratamiento de la patología aterotrombótica (los salicilatos, los inhibidores del factor tisular y las estatinas), con la finalidad de esclarecer la manera por la cual son capaces de aportar beneficios apreciables desde el punto de vista clínico.

INTRODUCCIÓN

FORMACIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA

La aterosclerosis es un fenómeno patológico caracterizado por una respuesta inflamatorio-proliferativa de la pared vascular a diferentes agentes lesivos. Las lesiones ateroscleróticas progresan de manera crónica y asintomática a lo largo de los años y tardíamente pueden provocar sintomatología clínica como resultado de una reducción crónica o aguda (aterotrombosis) de la luz arterial. Esta patología afecta principalmente la capa íntima de las arterias de calibre mediano y grande, tales como la aorta, arterias femorales, carótidas, cerebrales, coronarias y renales.

LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio vascular desarrolla un gran número de funciones en el mantenimiento de la homeostasis vascular (Vane JR *et al.*, 1990). Proporciona una superficie no trombogénica y no adherente para leucocitos a través de la cual se realiza el intercambio de numerosas sustancias entre la sangre y los tejidos. Contribuye al mantenimiento del tono vascular mediante el balance de producción y liberación de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂), y vasoconstrictoras, como la endotelina, el tromboxano A₂ (TXA₂) y la angiotensina II (AII). Además, puede modular el tono y el crecimiento de las células musculares lisas (CML), así como la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión de células sanguíneas a la pared vascular (Furchgott RF & Vanhoutte PM, 1989; Moncada S *et al.*, 1991; Vanhoutte PM, 1997), mediante diversos factores promotores e inhibidores del crecimiento, moduladores de la inflamación (moléculas de adhesión) y factores hemostáticos y trombolíticos, como el activador tisular de plasminógeno (t-PA) y el inhibidor de t-PA tipo 1 (PAI-1) (DiCorleto PE & Gimbrone MA Jr, 1996). En condiciones normales existe un equilibrio entre las acciones de estos factores, pero en presencia de factores de riesgo cardiovascular tales como hiperlipidemia, hábito tabáquico, hipertensión arterial, diabetes, infecciones, hiperhomocisteinemia y otros, este equilibrio se altera provocando respuestas anormales del endotelio.

Consecuentemente, la proliferación del músculo liso, la vasoconstricción, la actividad trombótica y la adhesión de las células sanguíneas pasan a ser fenómenos predominantes (Furchgott RF & Vanhoutte PM, 1989; Ross R, 1993).

La hipercolesterolemia actúa sobre las células endoteliales produciendo alteraciones de la función vascular. De hecho, la disfunción de la respuesta vasomotora endotelial precede incluso al desarrollo aterosclerótico y está relacionada con niveles anormalmente elevados de lípidos plasmáticos. Esto se ha demostrado en varios estudios en los que se observó que la vasodilatación dependiente del endotelio estaba disminuida en animales y en pacientes hipercolesterolémicos sin presencia de alteraciones estructurales vasculares evidentes (Verbeuren TJ *et al.*, 1986; Creager MA *et al.*, 1990).

La presión de rozamiento del flujo sanguíneo sobre el endotelio es también un factor relevante en la disfunción endotelial, ya que estimula la liberación de sustancias vasoactivas, provoca cambios en la expresión de los genes, del metabolismo celular y de la morfología celular (Traub O & Berk BC, 1998; Malek AM *et al.*, 1999). Se ha demostrado que áreas del árbol arterial sometidas a baja presión de rozamiento y flujo con turbulencias presentan disfunción endotelial. Estas condiciones de flujo se producen en los puntos de bifurcación arterial y provocan el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

A partir del momento en que el endotelio presenta alteraciones de su funcionalidad, se produce la entrada de monocitos, lípidos plasmáticos y proteínas dentro de la pared arterial, así como la activación de fenómenos inflamatorios que dan lugar a la formación de la estría grasa, primer paso de la formación de la placa aterosclerótica.

Factores Derivados del Endotelio

De entre todos los factores derivados del endotelio, el NO parece desempeñar un papel fundamental a través de sus acciones relajantes, antiproliferativas, antitrombóticas

y antioxidantes. Por todas sus funciones se la considera la molécula antiaterogénica por excelencia (Cooke JP & Tsao PS, 1994). El NO se genera por la acción de la óxido nítrico sintetasa (NOS) sobre el aminoácido L-arginina (Bredt DS, 1991). Se conocen tres isoenzimas NOS (Knowles RG & Moncada S, 1995), dos constitutivas que sintetizan pequeñas cantidades de NO, la NOS-I del tejido neurológico (Mayer B *et al.*, 1991) y la NOS-III de la célula endotelial (eNOS) (Pollock JS *et al.*, 1991); y una inducible, la NOS-II (iNOS). Esta última isoenzima se expresa especialmente en los macrófagos por la acción de citocinas proinflamatorias (interleucina-1 (IL-1), interferon γ) y sintetiza grandes cantidades de NO (Stuehr DJ *et al.*, 1991; Änggard E, 1994; Nathan C & Xie QW, 1994). A concentraciones elevadas, el NO es citotóxico y desempeña un papel en la respuesta inmune de los macrófagos ante las bacterias y otros patógenos. Ambas NOS, la eNOS constitutiva y la iNOS inducible, coexisten en la célula endotelial. La forma constitutiva sintetiza NO por periodos breves cuando es estimulada por sustancias vasodilatadoras, y la inducible sintetiza NO de forma sostenida y prolongada cuando el estímulo parte de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Loscalzo J & Welch G, 1995; Jones CJH *et al.*, 1995). El NO tiene una vida media muy corta (3-5 segundos) (Moncada S *et al.*, 1991), y es muy susceptible de oxidación dando lugar a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) (Ignarro LJ, 1990).

El estímulo físico que más influye en la generación de NO, es la presión de rozamiento sobre la pared del vaso, cuanto mayor es ésta, mayor es la producción de NO (Cooke JP & Tsao PS, 2001). La presión de rozamiento provoca la apertura de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , este hecho posibilita la entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma que estimula directamente la eNOS generando mayor cantidad de NO (Miura H *et al.*, 2001).

Como antagonista del NO, la célula endotelial libera AII por la acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). A través de los receptores AT1, la AII provoca efectos contrarios a los del NO, como vasoconstricción, expresión de moléculas de adhesión, estimulación de factores de crecimiento y proliferación celular, acciones protrombogénicas, oxidantes y proinflamatorias. Todas estas acciones facilitan la iniciación y la progresión de la aterosclerosis (Johnston CI, 1992). Dependiendo hacia donde se incline el equilibrio entre el NO y la AII, prevalecerá una acción

vasodilatadora y antiaterogénica, o vasoconstrictora y proaterogénica. Hay que tener en cuenta que en el endotelio existen otras vías metabólicas que controlan el tono vascular, como la vía de la ciclooxigenasa (Cox) que da lugar a la PGI₂, la cual provoca la liberación de AMPc, responsable de la vasodilatación. Existen dos isoformas de este enzima, la Cox-1 que se expresa constitutivamente en diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran las células endoteliales y las plaquetas (Pollock JS *et al.*, 1991), y la Cox-2 que es inducida por diferentes productos de la inflamación y se encuentra en células endoteliales, CML y macrófagos de la pared vascular (DeWitt *et al.*, 1983; Herschman HR, 1996; Schönbeck U *et al.*, 1999; Stemme V *et al.*, 2000). Esta última isoforma se ha relacionado con en el proceso aterosclerótico (Ross R, 1993; Gordon D, 1996; Schönbeck U *et al.*, 1999; Baker C *et al.*, 1999). Estudios recientes demuestran que posiblemente la Cox-2 vascular es la principal fuente de PGI₂, tanto en individuos sanos como en pacientes ateroscleróticos (Catella-Lawson F *et al.*, 1999; McAdam BF *et al.*, 1999).

Mecanismos de Disfunción Endotelial

Se han estudiado los posibles mecanismos relacionados con la alteración del metabolismo del NO que pueden motivar disfunción endotelial. Parece ser que una disminución de la disponibilidad del sustrato para la síntesis de NO (L-arginina), debido a la hipercolesterolemia, podría ser responsable de respuestas vasculares anormales (Girerd XJ, 1990). Otro posible mecanismo, es el aumento de la concentración de peroxinitrito (ONOO⁻), producto resultante de la oxidación del NO, con gran potencial oxidante y mediador del daño vascular (Beckman JS & Crow JP, 1993). Además, el peroxinitrito puede iniciar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), una vez que éstas han quedado atrapadas en la zona subendotelial (White CR *et al.*, 1994). Numerosos estudios demuestran que las LDL oxidadas, y en menor medida las LDL nativas (no oxidadas), son capaces de inhibir la relajación dependiente del endotelio (Tanner FC *et al.*, 1991), y se ha sugerido que estas lipoproteínas inhiben la activación de la vía L-arginina/NO, e incluso que reducen la actividad y la expresión de la NOS. Así Vidal F *et al.* (1998) y Martínez-González J *et*

al. (2001c) han demostrado que concentraciones aterogénicas de LDL nativas reducen la expresión de NOS-III en células endoteliales humanas en cultivo.

EL INICIO DE LA LESIÓN: LA ESTRÍA GRASA

Las primeras lesiones ateroscleróticas macroscópicamente visibles son la estrías grasas, las cuales pueden ya manifestarse en la aorta y en la arterias coronarias durante las primeras décadas de vida y consisten básicamente en una acumulación de lípidos en la íntima vascular (Stary HC *et al.*, 1994). El primer factor que determina la formación de la estría grasa es el transporte de LDL hacia la pared vascular. Las LDL son lipoproteínas muy ricas en colesterol, que provienen en su mayor parte del metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y su función básica consiste en la distribución del colesterol a los diferentes tejidos. Las LDL son rápidamente transportadas a través del endotelio y se unen a los proteoglicanos que conforman la matriz extracelular (Nivelstein PFEM *et al.*, 1994). Los proteoglicanos a su vez tienen una alta capacidad de producir alteración y retención de las LDL en la íntima contribuyendo a la acumulación lipídica y al inicio de la formación de la estría grasa (Camejo G *et al.*, 1993). Debido al estado de estrés oxidativo provocado por la disfunción endotelial, las LDL retenidas en el espacio subendotelial son oxidadas (Steinberg D, 1997). La acumulación de LDL oxidadas, altamente inflamatorias y citotóxicas, motivan la activación de una respuesta inflamatoria que provoca la atracción de monocitos y linfocitos-T hacia la lesión, y una vez se encuentran dentro de la íntima vascular los monocitos se convierten en macrófagos. (Ross R, 1993; Ross R, 1999). Además de las LDL modificadas, la homocisteína, la AII y productos microbianos también inducen inflamación en la zona de la lesión (Libby P, 2002). Las LDL oxidadas inducen la producción por parte de las células endoteliales y CML de diferentes activadores de monocitos y linfocitos-T, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) (Valente AJ *et al.*, 1992). La expresión de MCP-1 y otros genes inflamatorios se halla bajo el control del factor de transcripción NF- κ B (Barnes PJ & Karin M, 1997). La activación de este factor puede desempeñar un papel clave desde las fases tempranas de la formación de la placa, ya que se ha demostrado que está presente de forma activa en las lesiones ateroscleróticas (Collins T, 1993; Brand K *et al.*, 1996).

Las LDL oxidadas y otros factores proinflamatorios, como la IL-1, la trombina y el factor de necrosis tumoral (TNF) inducen la expresión de moléculas de adhesión, que promueven la adhesión de los leucocitos (monocitos y linfocitos-T) al endotelio, y del factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) (Rajavashisth TB *et al.*, 1990). Entre las moléculas de adhesión se encuentran las selectinas, como la selectina E y la selectina P (Vora DK *et al.*, 1994), y las inmunoglobulinas, como ICAM-1 y VCAM-1 (Cybulsky MI & Grimbone MA Jr, 1991). El M-CSF, que también está controlado por NF- κ B, es el responsable de la diferenciación de los monocitos a macrófagos. Esta diferenciación conlleva la expresión de los receptores basurero (*scavenger*) (Geng YJ *et al.*, 1995). Estos receptores, a diferencia de los receptores LDL normales, no son regulados a la baja por la presencia de altas concentraciones de colesterol intracelular, por lo que los macrófagos captan y acumulan a través de estos receptores grandes cantidades de LDL modificadas (oxidadas, acetiladas, etc) transformándose en células “espumosas”. La causa de que el receptor LDL no reconozca a las LDL oxidadas (modificadas) se debe a que el proceso de oxidación induce cambios en la parte proteica de la lipoproteína (apo B), que en cambio, sí es reconocida por los receptores basurero de los macrófagos (Brown MS & Goldstein JL, 1990).

Al contrario que las LDL, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) tienen una función protectora, sobretodo en las fases iniciales de la aterosclerosis, ya que disminuyen la oxidación de las LDL (Parthasarathy S *et al.*, 1990), así como la formación de la estría grasa (Badimon JJ *et al.*, 1989), debido a su función en el transporte reverso del colesterol (Gordon DJ *et al.*, 1989).

PROGRESIÓN DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA

La estría grasa puede progresar hasta la formación de la placa, aunque, no todas las estrías grasas progresan (Freedman D *et al.*, 1988). Hay dos factores clave en la progresión de la lesión: la proliferación y migración de CML, y la acumulación lipídica en macrófagos y CML. Los macrófagos juegan el papel central del proceso ya que están presentes desde el inicio de la lesión. Como ya se ha mencionado anteriormente, bajo la acción de MCP-1, M-CSF y otras citocinas, los macrófagos son activados y se

incrementa su capacidad de oxidación de lipoproteínas y la secreción de factores de crecimiento así como diversas citocinas inflamatorias (Murakami T & Yamada N, 1996); entre ellas destacan nuevamente MCP-1, M-CSF, IL-1 y TNF, y también interferon gamma (IFN- γ) (Libby P & Ross R, 1996). Estas citocinas siguen estimulando la expresión de moléculas de adhesión y citocinas por parte de las células endoteliales y CML, favoreciéndose así un círculo vicioso de captación, proliferación y activación de monocitos-macrófagos, expresión de receptores basurero, captación de LDL modificadas y transformación en células espumosas, lo que se traduce en una acumulación incontrolada de lípido en el espacio subendotelial.

Junto a los macrófagos, las CML son el componente principal de la lesión aterosclerótica. Su migración y proliferación está estimulada por factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la AII y la trombina, liberados por plaquetas, macrófagos y CML (Ferns GAA, 1991; Ross R, 1993). Incluso las propias lipoproteínas favorecen la proliferación de las CML (Björkerud S & Björkerud B, 1995). Además, las CML al igual que los macrófagos, también captan y acumulan LDL modificadas transformándose en células espumosas (Llorente-Cortes V *et al.*, 1998, Llorente-Cortes V *et al.*, 2002). Las CML son la fuente de la matriz extracelular de la placa (Andreeva ER *et al.*, 1997), cuyo componente principal es el colágeno tipo I, el cual confiere a la placa una gran estabilidad estructural. La síntesis del colágeno tipo I está fundamentalmente promovida por el factor de crecimiento transformante (TGF- β) segregado por los macrófagos y CML (Bahadori L *et al.*, 1995).

Las plaquetas también juegan un papel importante en el desarrollo de la lesión, ya que se adhieren al endotelio disfuncional, a los macrófagos o al colágeno expuesto, y liberan citocinas y factores de crecimiento, como el PDGF y la trombina, que contribuyen a la migración y proliferación de CML y monocitos (Bombeli T *et al.*, 1998; Martínez-González J *et al.*, 2001b).

Con la sucesión de los procesos mencionados, la estría grasa se va haciendo más compleja a lo largo del tiempo y se recubre por una o más capas de CML y tejido conectivo, que darán lugar a la cápsula fibrosa.

ESTABILIDAD DE LA PLACA. PROCESO ATEROTROMBÓTICO

El factor predominante que afecta a la estabilidad de las placas ateroscleróticas es la proporción entre matriz extracelular y contenido lipídico (Stary H, 1989; Davies MJ *et al.*, 1990). Las placas están formadas por un núcleo lipídico, compuesto básicamente por colesterol libre y ésteres de colesterol acumulados en el interior de macrófagos (células espumosas), separado de la luz arterial por un caparazón fibromuscular y una capa de células endoteliales.

Las placas ateroscleróticas producen síntomas clínicos mediante dos mecanismos:

1. Por crecimiento de la placa hasta alcanzar un tamaño umbral que reduce u obstruye completamente el paso de la sangre. Este tipo de lesiones representan la mayor parte de los procesos ateroscleróticos, pero suponen una pequeña proporción de los episodios clínicos, ya que son lesiones bastante estables. Su estabilidad se debe a un elevado componente celular y de matriz extracelular.
2. Por rotura o fisura de la placa induciendo la formación de un trombo. Este tipo de placas causan la mayoría de episodios clínicos (Falk E, 1989). Los estudios patológicos demuestran que las placas ateroscleróticas que tienden a romperse están compuestas comúnmente por una masa de lípidos separados del lumen vascular por una cubierta fibrosa delgada (Richardson PD *et al.*, 1989). Las placas que se rompen tienden a ser relativamente blandas y a tener una concentración elevada de colesterol y de sus ésteres. El adelgazamiento de la fina cubierta fibrosa que cubre el núcleo lipídico precede a la rotura de la placa. Mediante estudios angiográficos, angioscópicos y patológicos se ha establecido una clara asociación entre la fisura de la placa o su ulceración y el desarrollo de la angina inestable, el infarto de miocardio y la muerte súbita de carácter isquémico (Badimon L *et al.*, 1992b; Badimon JJ *et al.*, 1993). Además, la trombosis mural formada sobre la placa rota, es también importante en la progresión de las placas ateroscleróticas, incluso en ausencia de síntomas clínicos (Falk E, 1985).

Una vez formada la lesión aterosclerótica, todos aquellos fenómenos que reduzcan su contenido en colágeno o disminuyan la presencia de CML que lo producen, debilitarán la cápsula fibrosa y harán que la placa sea más vulnerable y propensa a la rotura. Las células espumosas son determinantes en este aspecto, ya que son capaces de digerir la matriz extracelular por fagocitosis directa o por la secreción de enzimas proteolíticas, como los activadores del plasminógeno (t-PA), TNF- α , y una variedad de metaloproteinasas (MMP) de la matriz celular (colagenasas, gelatinasas y estromelinas) (Fuster V *et al.*, 1992b; Ross R, 1999). Además, la producción de tóxicos, como los radicales libres oxidantes y productos de la oxidación lipídica, también contribuyen al daño vascular y a la inestabilidad de la placa.

La rotura de la placa supone la desendotelización de la pared vascular y la exposición de las capas interiores ricas en colágeno, factor tisular (TF), lípidos y otros factores, que activan la agregación plaquetar y la formación de un trombo que puede ser oclusivo e impedir de forma súbita la circulación de la sangre o en cualquier caso, contribuir al crecimiento de la lesión aterosclerótica que produce una lesión silente. Existen una serie de factores locales y sistémicos que pueden determinar el tamaño, localización y composición de los trombos.

Factores Locales

Severidad de la Lesión Vascular, Importancia del Factor Tisular

La rotura de la placa provoca la exposición de componentes de su interior que inducen la trombosis. Se ha demostrado mediante estudios experimentales, que cuando el trombo plaquetar se forma sobre lesiones vasculares leves (pared vascular desendotelizada), éste es lábil y tiende a fragmentarse si sobre él actúan fuerzas de cizalladura elevadas. Sin embargo, cuando la lesión es más grave y se exponen los componentes de zonas más profundas del vaso, se produce una intensa agregación plaquetaria con formación de un trombo mural, que se acompaña de la formación de trombina a través de las vías de coagulación, tanto intrínseca (activada en superficie) como extrínseca (dependiente del TF), dando como resultado la formación de fibrina,

que da estabilidad al trombo plaquetario y lo une firmemente a la pared vascular. El trombo formado en este caso, es estable incluso en condiciones de cizalladura elevadas (Badimon L *et al.*, 1986).

Se ha demostrado que el núcleo graso o ateroma es el componente más trombogénico de las placas (Fernández-Ortiz A *et al.*, 1994) y el TF (o tromboplastina tisular), presente en grandes cantidades en este tipo de lesiones, parece ser el desencadenante de la reacción trombótica en cascada (Toschi V *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que el TF es un determinante importante de la trombogenicidad de las lesiones ateroscleróticas cuando sufre rotura espontánea o mecánica. Las LDL oxidadas contenidas en la lesión también inducen trombosis, ya que aumentan la agregación plaquetaria promoviendo la liberación de TXA₂ (Carvalho ACA *et al.*, 1974).

Fuerzas Hemodinámicas de Flujo

Las zonas de estenosis vascular que están provocadas por el engrosamiento de la pared (presencia de una lesión aterosclerótica, o de un trombo sobre una lesión que protuye en la luz del vaso) aumentan considerablemente la fuerza de cizalladura y alteran el flujo (Zarins CK *et al.*, 1983), mientras que en los vasos normales la fuerza de cizalladura es menor y el flujo es de tipo laminar paralelo. El aumento de la fuerza de cizalladura provoca que aumente considerablemente la deposición de plaquetas en la zona estenosada (Badimon L & Badimon JJ, 1989), al tiempo que la desaceleración del flujo sanguíneo que existe en la zona postestenótica produce una separación de las líneas de flujo y la aparición de zonas de recirculación que pueden favorecer el depósito de fibrina. La consecuencia de estos fenómenos es la formación de un trombo plaquetar fijo en la zona de máxima estenosis que se continúa con una gran red de fibrina en la que se hallan atrapados glóbulos rojos. El incremento de la fuerza de cizalladura que se produce en las áreas de estenosis, así como los factores mencionados anteriormente, contribuyen a la rotura de la placa, especialmente cuando éstas son blandas y grasas (Fuster V *et al.*, 1988).

Superficie del Trombo Residual

Una vez se ha formado el trombo sobre una lesión aterosclerótica que ha sufrido rotura, éste puede lisarse por fibrinólisis fisiológica (o inducida farmacológicamente). La presencia del trombo mural residual predispone a la oclusión trombótica recurrente del vaso (Van Lierde *et al.*, 1990; Fuster V *et al.*, 1990; Davies SW *et al.*, 1990; Gulba DC *et al.*, 1991). Se han identificado dos factores que contribuyen que a este proceso. En primer lugar, un trombo mural residual estrecha la luz del vaso, lo que produce un aumento de la tasa de cizalladura, que facilita la activación y depósito de las plaquetas en la lesión (Badimon L & Badimon JJ, 1989; Lassila R *et al.*, 1990). En segundo lugar, la presencia de un trombo fragmentado genera una superficie de gran poder trombogénico, así, el depósito de plaquetas sobre el trombo residual se ve incrementado entre dos y cuatro veces en comparación con una lesión profunda de una arteria (Badimon L *et al.*, 1988). Este fenómeno es debido en parte a la trombina atrapada en la red de fibrina en el área de formación del trombo (Badimon L *et al.*, 1989; Francis CW *et al.*, 1983), así pues, después de la lisis parcial del trombo, la trombina queda expuesta a la sangre circulante, de forma que se produce la activación de las plaquetas y del sistema de coagulación generándose nuevos procesos de trombosis (trombosis secundaria).

Vasoconstricción

Varios estudios han sugerido que el vasoespasmo es importante en la patogénesis de la enfermedad aterotrombótica (Hackett D *et al.*, 1987). La interacción de plaquetas con la pared vascular y la liberación de sustancias vasoactivas, como la serotonina y el TXA₂, contribuyen a la reducción del flujo sanguíneo (Lam JYT *et al.*, 1987; Ashton JH *et al.*, 1986). Además, las arterias ateroscleróticas tienen un tono vascular anormal debido a una deficiencia NO, lo cual conduce a una vasoconstricción incrementada al producirse la liberación de serotonina y TXA₂ por parte de las plaquetas (Badimon L *et al.*, 1992a; Badimon L, 2001).

Factores Sistémicos: Estado Hipertrombótico Sistémico

Un estado trombogénico o hipercoagulable de la sangre circulante puede promover la formación local de trombos (Fuster V *et al.*, 1992a; Fuster V *et al.*, 1992b), este hecho confirma que los factores añadidos a la placa aterosclerótica son de gran importancia en el riesgo trombótico. Diferentes factores sistémicos están asociados a un aumento de la reactividad de la sangre y a la trombogenicidad.

El aumento de los niveles plasmáticos de catecolaminas puede inducir la activación plaquetar y la generación del trombo (Badimon L *et al.*, 1990b; Badimon L *et al.*, 1999), lo cual podría vincular condiciones de estrés con el desarrollo de trombosis arterial. Se ha observado un aumento en la reactividad plaquetaria en fumadores que podría estar relacionado con estímulos de las catecolaminas (Winniford MD *et al.*, 1986; Fuster V *et al.*, 1981; Blann AD *et al.*, 1998). La hipercolesterolemia también está relacionada con un estado de hipercoagulabilidad de la sangre y aumento de la reactividad de las plaquetas (Hunt BJ, 1990; Badimon JJ *et al.*, 1991; Thompson SG *et al.*, 1995; Henry PD *et al.*, 1995). Las LDL tienen un efecto directo sobre las plaquetas, ya que aumentan la relación colesterol/fosfolípidos de la membrana plaquetar (Opper C *et al.*, 1995), así como los niveles de TXB₂ (Carvalho ACA *et al.*, 1974; Stuart MT *et al.*, 1980; Davi G *et al.*, 1992), y de trombina intraplaquetarios (Aoki I *et al.*, 1997), haciéndolas más reactivas. Un factor de riesgo descubierto recientemente es la homocisteína, esta substancia aumenta la actividad del TF en células endoteliales, inhibe la expresión de trombomodulina en la superficie de la célula endotelial y la unión de la antitrombina III al heparan sulfato endotelial, que como resultado supone una reducción de las propiedades anticoagulantes del endotelio normal (Boers GH, 1997; de Jong SC *et al.*, 1998). La lipoproteína (a) (Lp(a)), molécula similar a la LDL en su configuración (Berg K, 1963), es otro factor de riesgo para la aterotrombosis. Así, la apoproteína (a), una glicoproteína que forma parte de la estructura de la Lp(a), tiene una estructura muy similar a la del plasminógeno (McLean JW *et al.*, 1987), al que inhibe de manera competitiva, disminuyendo la fibrinólisis y aumentando así la predisposición a las complicaciones trombóticas (Edelberg JM *et al.*, 1990; Loscalzo J, 1990). Niveles elevados de fibrinógeno, factor VII (Meade TW *et al.*, 1986) y TF en plasma (Suefuji H, 1997; Key NS, 1998; Giesen PL *et al.*, 1999), así como de inhibidor del activador de

plasminógeno-1 (PAI-1) (Paramo JA *et al.*, 1985; Olofsson BO *et al.*, 1989) también se han identificado como factores de riesgo para sufrir episodios trombóticos.

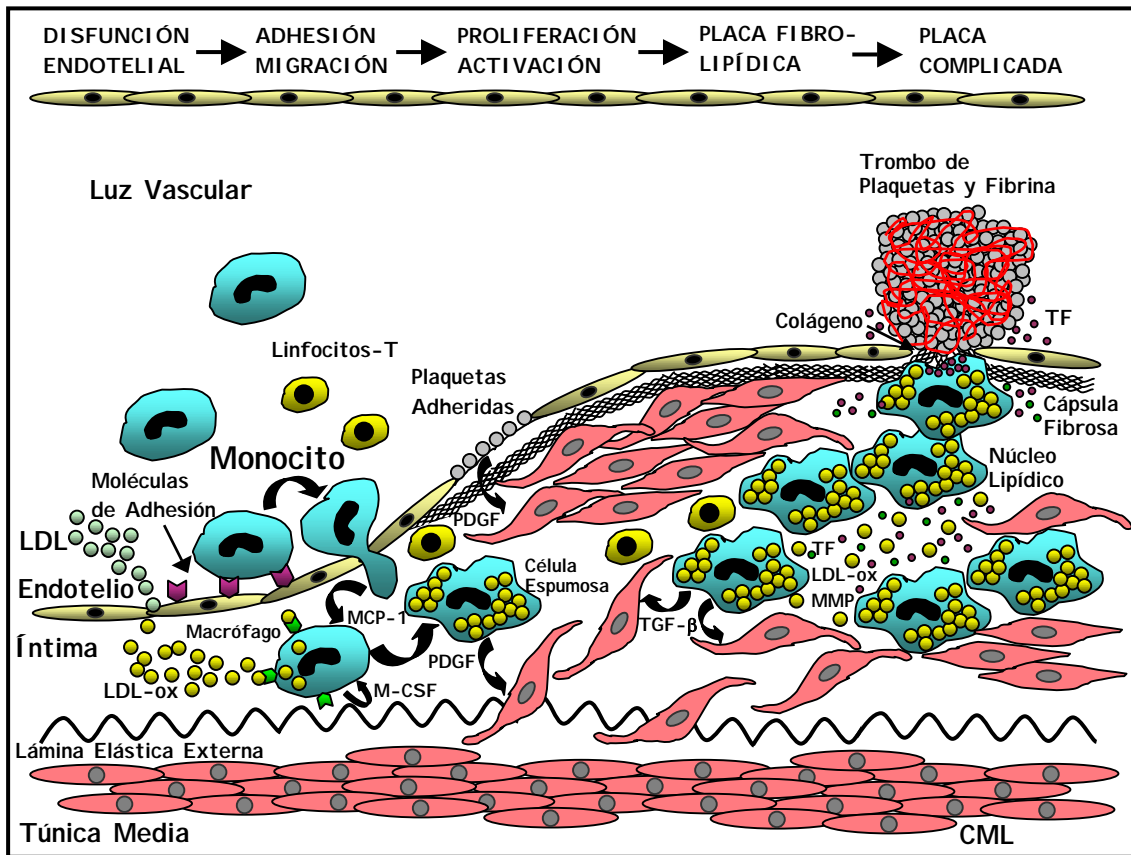


Figura 1. Representación esquemática de la evolución de la placa aterosclerótica. Tras los insultos iniciales se produce disfunción endotelial: las células endoteliales expresan moléculas de adhesión que facilitan la migración de los monocitos y linfocitos-T a favor de un gradiente quimiotáctico producido por las lipoproteínas oxidadas (LDL-ox) y citocinas quimiotácticas como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). Bajo la acción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), los monocitos se diferencian a macrófagos, expresan los receptores basurero y acumulan grandes cantidades de lípidos convirtiéndose en células espumosas. Los macrófagos segregan múltiples citocinas (entre ellas el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)) que promueven la migración de células musculares lisas (CML) de la túnica media a la íntima y su proliferación. Hay zonas de la íntima en las que se produce adhesión de plaquetas, que una vez activadas liberan citocinas como el PDGF. Activadas por factor de crecimiento transformante (TGF- β) de los macrófagos, las CML sintetizan el colágeno I, principal componente de la capa fibrosa. Las fases más avanzadas de la lesión se caracterizan por una acumulación de lípidos y un empobrecimiento celular debido en parte a la apoptosis de CML y macrófagos. En las placas con un alto contenido en macrófagos se produce la degradación de la cápsula fibrosa por parte de las proteasas, como las metaloproteasas (MMP), que son segregadas por los mismos. De este modo se favorecen la rotura de la placa y la exposición al torrente sanguíneo de factores procoagulantes como el propio colágeno y el factor tisular (TF), conduciendo a la formación de trombos y a la aparición de accidentes isquémicos agudos (Modificado de Sánchez S a partir de Guijarro C *et al.*, 1997).

TROMBOSIS ARTERIAL

Como ya se ha comentado, diversos procesos determinan la formación del trombo arterial. Básicamente son tres vías metabólicas las que dan lugar al trombo: la activación plaquetaria, el proceso de coagulación y la fibrinólisis.

PLAQUETAS

En la trombosis arterial, la activación de las plaquetas y su deposición en zonas alteradas de la pared vascular ocupan un papel preponderante, produciéndose trombos ricos en plaquetas y pobres en plasma y eritrocitos (al contrario que en la trombosis venosa, donde se forman trombos ricos en fibrina y eritrocitos).

Las plaquetas son pequeños fragmentos de citoplasma envueltos por una membrana con forma de disco que se generan a partir de los megacariocitos. Están compuestas de la mayoría de los componentes celulares excepto DNA, ya que carecen de núcleo (mitocondrias, microtúbulos, aparato de Golgi (a veces) y ribosomas). Sus constituyentes principales son:

- *Citoesqueleto*: constituido por proteínas como actina y miosina, que se encargan de la movilidad y la forma de la plaqueta. Ambas proteínas son responsables de los drásticos cambios conformacionales que se producen en la plaqueta durante su activación (Holmsen H, 1990a).
- *Membrana*: los lípidos de la membrana son importantes no sólo estructural sino también funcionalmente. La mayor proporción corresponde a fosfolípidos y el resto a lípidos neutros, sobre todo colesterol. La proporción entre ambos es importante ya que condiciona la viscosidad de la membrana y su capacidad de respuesta. La activación de la plaqueta precipita el metabolismo de varios fosfolípidos de membrana derivados del fosfatidilinositol (flip/flop).

- Gránulos Secretores: hay dos tipos, los gránulos densos que contienen oligonucleótidos fosfatos en diversas formas químicas (ATP, ADP, GTP y otras), calcio y serotonina, y los gránulos alfa, que contienen factores de coagulación (fibrinógeno, factor V, factor de von Willebrand (vWF), factor XI, proteína S, PAI-1, cininógeno de alto peso molecular-HMWK-), factores de crecimiento como PDGF y el TGF- β , y otras proteínas. También hay lisosomas ricos en hidrolasas ácidas (Holmsen H & Weiss HJ, 1979). El 60% del calcio celular se encuentra en el interior de los gránulos densos y se secreta al citoplasma en cuestión de milisegundos cuando las plaquetas se estimulan (Holmsen H, 1990b). Entre los factores de coagulación, el fibrinógeno es la proteína que se encuentra en mayor proporción en la plaqueta (12%).
- Glicoproteínas: hay al menos 30 tipos de glicoproteínas (GP) en la membrana que cumplen funciones de receptor y que se podrían definir como integrinas, es decir receptores que median la adhesión de productos solubles y de la matriz extracelular; pero que también participan en la regulación de diversas funciones celulares (Clark EA & Brugge JS 1995).

En la plaqueta, la familia más abundante de integrinas incluye los receptores GPIIb-IIIa, GP Ia-IIa, GP Ic-IIa y los receptores de fibronectina y vitronectina. Cada plaqueta contiene aproximadamente entre 50.000 y 80.000 moléculas de GP IIb-IIIa, que supone un 2% de la proteína plaquetar total. El complejo IIb-IIIa es un heterodímero dependiente de calcio, asociado no covalentemente a la superficie plaquetar (Fitzgerald LA & Philips DR, 1985), consistente en dos glicoproteínas transmembrana: GP IIb y GP IIIa. Su ligando principal es el fibrinógeno, pero se enlaza además al vWF, a la vitronectina y a la trombospodina. La secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), presente en las proteínas adhesivas, es la mediadora del enlace ligando-receptor (Cheresh DA *et al.*, 1989). Así, el fibrinógeno contiene dos secuencias RGD en la cadena α , además tiene una secuencia dodecapeptídica que se encuentra en la zona carboxiterminal de la cadena γ , que también participa en la unión al receptor GP IIb-IIIa (Kloczewiack M *et al.*, 1984).

La familia de integrinas que incluyen las glicoproteínas ricas en leucina está representada por el complejo GP Ib y el GP V. Existen aproximadamente unas 25.000 moléculas de GP Ib en cada plaqueta. Este receptor está formado por dos subunidades, la GP Ib α y la GP Ib β que forman un complejo 1:1 con otra glicoproteína, la GP IX, formando una estructura transmembrana (Fox JEB *et al.*, 1988). La función principal de este receptor es enlazarse con el vWF fijado en el subendotelio e iniciar el proceso de adhesión plaquetar. El GP Ib no se enlaza al vWF plasmático, debido a que esta molécula requiere un cambio conformacional que se produce cuando ésta se une a la matriz extracelular, para ser reconocida por el receptor.

Activación Plaquetar

El proceso de activación plaquetar se puede resumir en una primera fase de adhesión de la plaqueta a la pared o zona lesionada del vaso, la extensión de la plaqueta sobre la superficie endotelial expuesta, la secreción del contenido granular de las plaquetas y la formación de un agregado o masa de plaquetas y la amplificación del proceso de coagulación, que lleva a la formación de una red de fibrina que refuerza el lábil tapón de plaquetas (Badimon L *et al.*, 1995). También se produce, como paso final, el reclutamiento de otras células hemáticas (eritrocitos, neutrófilos y monocitos) que dan lugar a trombos mixtos. La eficacia de reclutamiento plaquetario dependerá del substrato subyacente y de la geometría local.

Adhesión Plaquetar

Las plaquetas no se adhieren al endotelio vascular normal, sino únicamente a las zonas donde éste se encuentra alterado. A velocidades de cizalladura elevadas (a más de 800 s⁻¹) es necesaria la presencia de vWF en el endotelio que se enlaza al receptor plaquetar GP Ib (Weiss HJ *et al.*, 1973). Por esta razón, las personas que sufren la enfermedad de von Willebrand, en la que existe una deficiencia del vWF (Sakariassen KS *et al.*, 1979), presentan un tiempo de sangría elevado a velocidades de cizalladura elevadas, pero no a bajas, ya que a baja velocidad de cizalladura esta función la realiza

el colágeno que se enlaza al receptor plaquetar GP Ia-IIa (Sakariassen KS *et al.*, 1986). El receptor GP IIb-IIIa también participa en la adhesión plaquetar como sitio de enlace adicional al vWF (Hawiger J, 1987).

Secreción y Agregación Plaquetar

Los procesos de secreción y agregación plaquetar se desencadenan por la acción de ciertos agonistas, tales como el ADP (procedente de eritrocitos hemolizados), el colágeno (procedente de capas profundas de la pared vascular dañada) o la trombina (generada durante la cascada de la coagulación) que se unen a receptores de membrana y activan diversos procesos intracelulares, como son la desaparición de los microtúbulos que mantienen la forma discoidal de la plaqueta, y la formación de pseudópodos (Escolar G *et al.*, 1986). Estos agonistas inducen además, la liberación al citoplasma plaquetar del calcio almacenado en el sistema tubular denso. El calcio, por su parte, es un mediador importante de la activación plaquetaria (Colman RW & Walsh PN, 1987) que induce la contracción y secreción del contenido granular de las plaquetas.

Tras la activación inducida por los agonistas que actúan en la superficie de la plaqueta, se producen tres efectos principales:

- a) Secreción del contenido de los gránulos intracelulares de la plaqueta.
- b) Exposición de receptores de superficie para proteínas plasmáticas adhesivas, principalmente fibrinógeno y vWF.
- c) Alteración de la estructura lipídica de la membrana plaquetaria, que conlleva a la amplificación de la coagulación sanguínea (Badimon L *et al.*, 1990a).

Específicamente, al unirse los agonistas de la agregación (ADP, serotonina, epinefrina, colágeno, trombina, factor de activación plaquetar -PAF-, TXA_2) a los receptores de membrana de la plaqueta se desencadenan las cascadas de los segundos mensajeros intracelulares. Se produce entonces la hidrólisis del fosfatidilinositol, que se

encuentra en la membrana plaquetaria, debido a la acción de la fosfolipasa C, dando lugar a inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol. Estos dos intermediarios movilizan a su vez el calcio desde el sistema tubular denso, provocando la secreción de los gránulos de la plaqueta y la exposición del receptor GP IIb-IIIa en la superficie. El incremento de la concentración de calcio citosólico facilita la liberación de ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de la membrana por acción de la fosfolipasa A₂, éste es metabolizado a TXA₂, mediante la acción de la Cox y la tromboxano sintasa. El TXA₂ difunde fuera de la célula, interacciona con los receptores plaquetarios de superficie y activa nuevas plaquetas (Huang EM & Detwiler TC, 1986; Colman RW & Walsh PN, 1987; Kroll MH & Schafer AI, 1989; Marcus A & Safier LB, 1993), esta molécula, además de favorecer la continuación de la agregación, es un potente vasoconstrictor.

En el curso de la activación, las plaquetas muestran los receptores para factores de la coagulación específicos. El factor Va, secretado por la plaqueta o proveniente del plasma, se fija en la superficie y forma un complejo con el factor Xa, que cataliza la conversión de protrombina a trombina (Mann KG, 1984). La trombina, a parte de ser un enzima clave en la cascada de la coagulación, donde actúa transformando el fibrinógeno en fibrina insoluble, es uno de los más potentes agonistas conocidos de la activación y el reclutamiento plaquetarios. En las zonas de lesión arterial, se produce la exposición de TF que desencadena la activación de factores de la coagulación y la rápida generación de trombina, que es el principal mediador de la activación plaquetaria (Krishnaswamy S *et al.*, 1992).

La activación de las plaquetas se inhibe cuando los niveles de AMP cíclico (AMPc) están incrementados, ya que facilita la entrada de calcio en sus depósitos, reduciendo su disponibilidad en la plaqueta. Cuando los niveles de AMPc aumentan, el calcio libre se secuestra en el sistema tubular denso y se inhibe la actividad de la fosfolipasa A₂ (Brass LF *et al.*, 1994). Éste es el mecanismo de acción de algunos inhibidores de la función plaquetaria, como la PGI₂ y el NO. Generalmente, los agonistas de la activación plaquetaria inhiben la formación de AMPc bloqueando la adenilciclase, y otros compuestos aceleran el metabolismo del AMPc mediante la activación de la fosfodiesterasa (Sakon M *et al.*, 1994).

En condiciones patológicas, cuando se produce la rotura de una placa aterosclerótica, el colágeno que queda expuesto, y sobretodo la trombina, que se forma por activación de la cascada de la coagulación, tienen un gran peso en la estimulación del proceso de agregación. En este caso, el papel que juegan estos dos agonistas es más importante que el del ADP, ya que se encuentra a una concentración fisiológica relativamente baja, o incluso que el TXA₂, que se puede encontrar inhibido por medios farmacológicos (Stein B *et al.*, 1991).

Una vez las plaquetas se han activado, forman enlaces plaqueta-plaqueta a través de la unión del fibrinógeno plasmático a los receptores GP IIb-IIIa (Hawiger J, 1987), dando lugar al agregado plaquetario (Peerschke EIB, 1985). Éste se vuelve estable y se une firmemente a la superficie vascular lesionada, gracias a la fibrina formada durante el proceso.

COAGULACIÓN SANGUÍNEA

La función fisiológica de la coagulación es prevenir las hemorragias, de manera que éste es un proceso que refuerza el tapón plaquetar mediante la creación de fibras insolubles de fibrina. La fibrina se forma a partir del fibrinógeno, que es soluble, por la acción de una enzima proteolítica, la trombina, que normalmente se encuentra en forma de protrombina. Ésta se activa a través del sistema de la coagulación que implica una serie de reacciones en cadena que integran zimógenos (proteínas susceptibles de ser activadas a enzimas a través de una proteólisis limitada) y cofactores (activadores enzimáticos no proteolíticos).

Clásicamente en el mecanismo de la coagulación sanguínea se distinguían dos vías de activación: la *vía extrínseca*, que se iniciaba cuando el TF o tromboplastina tisular se exponía al plasma; y la *vía intrínseca*, que se activaba por contacto con la superficie vascular sin endotelio. Aunque inicialmente se pensó que eran vías independientes, hoy en día se sabe que varios enzimas interaccionan en los dos sistemas (Osterud B, 1990; Rapaport SI & Rao L, 1995).

Recientes investigaciones sobre la coagulación sanguínea resaltan la preponderancia de la *vía del TF*, anteriormente denominada *vía extrínseca* (Bauer KA, 1997; Carmeliet P & Collen D, 1998; Cawthron KM *et al.*, 1998), donde la expresión del TF constituye el más importante iniciador de la coagulación a través de la formación de un complejo con el factor VII. Todas las reacciones que se desencadenan cuando se activa la *vía del TF* se producen en la superficie de diferentes tipos celulares. Las plaquetas proveen la superficie más eficiente para la generación de trombina, por lo que el agregado plaquetario constituye una gran superficie procoagulante en la zona de lesión vascular. Además de las plaquetas, es necesaria la presencia de células o restos de membranas que expresen TF en su superficie para que se pueda desarrollar todo el proceso (Monroe DM *et al.*, 1994).

El TF es una pequeña glicoproteína de membrana, que pertenece a la superfamilia de los receptores del tipo citocinas (Edginton T *et al.*, 1991). Ésta proteína, se distribuye en gran número de tejidos normales formando parte de las cápsulas fibrosas que rodean a los órganos (Drake TA *et al.*, 1989). En las arterias el TF es abundante en la adventicia donde predominan los fibroblastos, mientras que prácticamente no se encuentra en la túnica media (Maynard JR *et al.*, 1977). Las células en contacto directo con la sangre, como las células endoteliales, no lo expresan constitutivamente, pero lo pueden sintetizar tras ser inducidas por citocinas, endotoxinas, infecciones víricas, trombina y algunos factores de crecimiento (Camerer E *et al.*, 1996). La trombosis se desencadena cuando se produce una lesión vascular o se expone los componentes del interior de la placa aterosclerótica, que expresan TF, a la circulación sanguínea (Zeldis SM *et al.*, 1972; Nemerson, 1988; Fuster V *et al.*, 1996; Fuster V *et al.*, 1997). Trabajos recientes afirman que las moléculas de TF provienen de los restos de membranas resultantes de la muerte por apoptosis de macrófagos contenidos en el núcleo graso (Mallat A, *et al.*, 1999), y de microvesículas asociadas a TF que son secretadas a partir de las CML que componen la lesión (Schechter *et al.*, 2000). Recientemente se ha descubierto que existe un pool de TF en la circulación sanguínea, libre o en monocitos, que es potencialmente activo (Suefuji H, 1997; Key NS, 1998; Giesen PL *et al.*, 1999).

En el sistema de coagulación sanguínea se pueden distinguir cuatro grupos de reacciones (Nemerson Y, 1990):

- a) Activación por contacto: la exposición de superficies desencadenantes de la activación por contacto de la pared vascular (sulfatidas, glucosaminoglicanos), activan el factor XI mediante el factor Hageman (factor XII). El factor XIa activa el factor IX, que forma un complejo con el factor VIIa y dan lugar al factor Xa.
- b) Vía del TF: la exposición del TF en la zona lesionada, activa la formación del complejo TF-factor VII a partir de factor VII de la circulación. Este complejo, que se forma en la superficie de la célula que expresa TF, cataliza la transformación de los factores X y IX a factores Xa y IXa, respectivamente. Al igual que en la etapa anterior, el factor IXa forma un complejo catalítico con el factor VIIIa en la superficie plaquetaria, que transforma el factor X en factor Xa.
- c) Conversión de protrombina a trombina y formación de fibrina: el factor Xa forma un complejo con el factor Va, que transforma la protrombina en trombina. Ésta libera los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, dando lugar a la formación de monómeros y polímeros de fibrina.
- d) Mecanismos inhibitorios del sistema de la coagulación: existen una serie de inhibidores proteolíticos que limitan y controlan la velocidad y magnitud de la coagulación (proteína C activada, antitrombina III, α_2 -macroglobulina, α_1 -tripsina).

Dentro de la *vía del TF* se distinguen dos etapas diferentes:

1. La etapa de iniciación: en la que se producen cantidades limitadas de trombina a partir de pequeñas cantidades de factor Xa formado por el complejo TF-factor VIIa, en la superficie de la célula que expresa TF. Estas pequeñas cantidades de trombina formada inicialmente, son las que activan a las plaquetas.

2. La etapa de amplificación: que se caracteriza por la formación explosiva de trombina. Las plaquetas, una vez han sido activadas en la primera etapa, soportan el complejo factor IXa-factor VIIIa en la superficie, que forma grandes cantidades de factor Xa; este factor junto al factor Va forman un segundo complejo en la plaqueta, que da lugar a grandes cantidades de trombina (Monroe DM *et al.*, 1994; Rappaport SI, 1995). La trombina formada en la segunda etapa, es la que da lugar a la formación final de fibrina.

Muchos de los zimógenos y cofactores de este sistema necesitan Calcio y/o vitamina K para ser activos. Gran cantidad de anticoagulantes se basan en esta dependencia, algunos de ellos quelan el calcio, como el citrato o el EDTA, y otros inhiben la vitamina K (anticoagulantes orales). Otro tipo de anticoagulantes son los inhibidores de la trombina, como la heparina, que inhibe indirectamente la trombina potenciando la actividad de la antitrombina III, o la hirudina, que produce una inhibición directa.

La trombina, como se ha visto en los apartados de trombosis, juega un papel central en la hemostasia y la trombosis, ya que actúa -de manera muy importante- sobre la activación plaquetaria y sobre múltiples substratos del sistema de la coagulación. También hay que mencionar su capacidad de mediación de la proliferación celular en la zona lesionada (Badimon L *et al.*, 1994; Turpie AGG *et al.*, 1995), que tiene importancia a más largo plazo.

FIBRINOLISIS

Como en la mayoría de los sistemas fisiológicos, el sistema hemostático consiste en un delicado balance entre dos acciones contrapuestas. Si sólo existieran los sistemas descritos en las secciones anteriores, el sistema circulatorio se encontraría en un permanente estado de hipercoagulabilidad. Esto no ocurre ya que existe un sistema fibrinolítico cuya función consiste básicamente en degradar las mallas de fibrina ya formadas y llevar a la dilución del coágulo. Éste es un sistema complicado con muchos

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DESTINADAS AL TRATAMIENTO DE LA ATEROTROMBOSIS

Debido a la complejidad y los numerosos procesos que intervienen en la patología aterotrombótica, se han desarrollado un gran número estrategias farmacológicas destinadas a su tratamiento. Éstas se podrían dividir en dos grandes líneas:

1. La reducción del proceso agudo mediante terapia antitrombótica. La inhibición de la formación del trombo se consigue mediante fármacos que actúan a diferentes niveles del proceso:
 - Fármacos Antiagregantes: actúan sobre las plaquetas impidiendo su activación y agregación. Entre ellos se encuentran los inhibidores de la Cox (salicilatos, NSAID's), los antagonistas del receptor plaquetario GP IIb-IIIa, los antagonistas del receptor de la serotonina y los inhibidores de la movilización del calcio.
 - Fármacos Anticoagulantes: bloquean la cascada de coagulación a diferentes niveles impidiendo la formación de fibrina. Los más conocidos son los inhibidores de la trombina, los inhibidores de la vitamina K (anticoagulantes orales), y más recientemente los inhibidores de la formación de trombina mediante el bloqueo de la *vía del TF*.
 - Fármacos Trombolíticos: activan la fibrinólisis, potenciando así la disolución del trombo. Algunos fármacos trombolíticos son la estreptoquinasa y el t-PA recombinante (IV rt-PA).

2. La prevención del proceso aterotrombótico mediante la reducción de los factores de riesgo. Ésta estrategia se centra básicamente en la reducción de los niveles plasmáticos de lípidos mediante la administración de fármacos hipolipemiantes. Éste grupo de fármacos consigue frenar la evolución de las placas ateroscleróticas previniendo así su rotura y complicaciones trombóticas. Existen al menos dos tipos de hipolipemiantes, los fibratos y los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), también llamados estatinas.

A continuación se explican algunos de los grupos farmacológicos citados y las rutas metabólicas sobre las que actúan, teniendo en cuenta su importancia en esta tesis doctoral.

INHIBICIÓN DE LA CICLOOXIGENASA

La Vía de la Ciclooxygenasa

El primer paso en la conversión del ácido araquidónico (AA) en eicosanoides está catalizado por el enzima ciclooxygenasa (Cox), también conocido como prostaglandina H sintasa (PGHS). Entre los eicosanoides se encuentran las prostaglandinas, la PGI₂ y el TXA₂, con diversas funciones fisiológicas. Su producción está iniciada por diversos estímulos físicos y químicos; como los mediadores de la inflamación y hormonales, los cuales actúan mediante la interacción con receptores de membrana que están acoplados a proteínas reguladoras G (Burch RM & Axelrod J, 1987). A través de ellas, o bien por un incremento de la concentración de iones calcio en el citosol, se produce una activación de las fosfolipasas (fundamentalmente la PLA₂), que hidrolizan los fosfolípidos de la membrana celular, liberando el AA (Burch RM & Axelrod J, 1987; Okajima F & Ui M, 1984). Una vez liberado, el AA se metaboliza por dos vías oxidativas, la vía de la Cox y la vía de la lipooxygenasa, que originan dos grupos de sustancias activas diferentes, los eicosanoides y los hidroxiperóxidos del ácido eicoxatetraenoico (HPETE), respectivamente.

Por la acción de la Cox el AA se transforma en prostaglandina G_2 (PGG_2), y ésta en el endoperóxido prostaglandina H_2 (PGH_2). Ambas son inestables y sufren una rápida transformación, mediada por enzimas, en prostaglandinas más estables (PGD_2 , PGE_2 y PGF_2). La PGH_2 puede ser transformada por acción de tromboxanosintasa, en TXA_2 , compuesto inestable con gran actividad vasoconstrictora y proagregante plaquetario, que se convierte rápidamente en TXB_2 , estable pero inactivo. La PGH_2 también puede ser transformada por la prostaciclinsintasa en prostaciclina, de actividad vasodilatadora y antiagregante, que sufre una rápida hidroxilación no enzimática a 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ (Moncada S & Vane JR, 1979). El resto de prostaglandinas tienen funciones diversas: mediadoras de la inflamación, protectoras de la mucosa gástrica y participan en la funcionalidad renal y ovárica. La Cox está presente en la mayoría de las células, y una vez activada transforma el AA en PGH_2 , pero cada tipo celular tiene una sintasa específica que determina el producto final. En el caso de las plaquetas el producto final de la vía es el TXA_2 ya que expresan tromboxanosintasa, en cambio las células endoteliales producen PGI_2 a través de la prostaciclinsintasa (Williams CS & Dubois RN, 1996).

Existen dos isoformas de la Cox, una constitutiva (Cox-1) y una inducible (Cox-2) (Simmons DL *et al.*, 1989; Smith WL *et al.*, 1996). La Cox-1 se expresa de manera fisiológica en numerosos tejidos entre los que se encuentran el endotelio vascular y las plaquetas. Por otro lado, la expresión de Cox-2 puede ser inducida por estímulos inflamatorios (endotoxinas, citocinas, mitógenos) en diferentes tipos celulares implicados en inflamación (Herschman HR, 1996; Pairet M & Engelhardt G, 1995; Wu KK, 1995), siendo responsable de la producción de eicosanoides mediadores del proceso inflamatorio. Asimismo, es quimiotáctica para leucocitos (Simon L, 1999). Recientemente, se ha descrito que la Cox-2 también está implicada en funciones fisiológicas como la producción de PGI_2 a nivel vascular (Catella-Lawson F *et al.*, 1999; McAdam BF *et al.*, 1999). Además, Viñals M *et al.* (1997) describió que las HDL estimulan la producción de PGI_2 por CML debido a una inducción de esta isoforma. Ya que la PGI_2 es beneficiosa en el proceso aterosclerótico, el hecho de que sea el producto mayoritario de la Cox-2, sugiere un papel protector de este enzima.

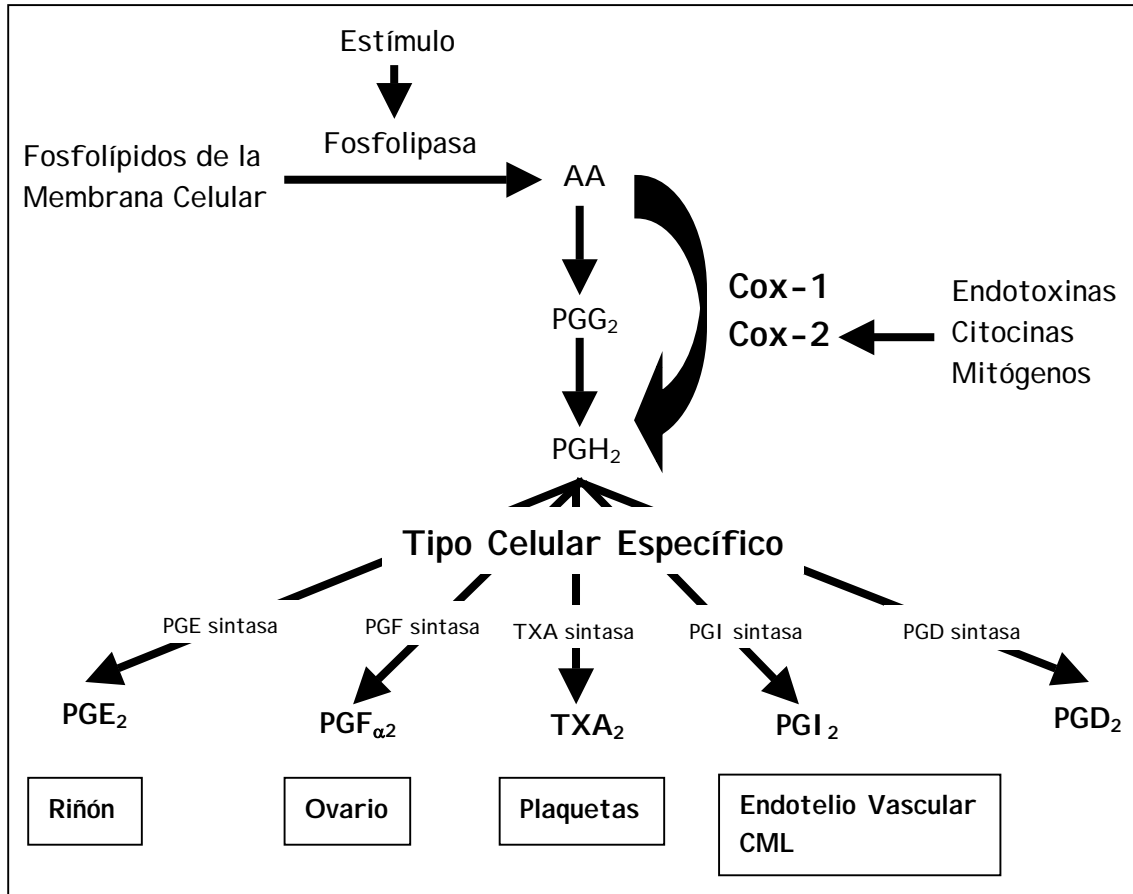


Figura 3. Representación esquemática de la vía de la Ciclooxygenasa (Cox) (Williams CS & Dubois RN, 1996).

Los Salicilatos: Aspirina y Triflusal

El compuesto farmacológico que tradicionalmente representa a los inhibidores de la Cox, es un derivado sintético del ácido salicílico, el ácido acetilsalicílico (ASA), popularmente conocido como aspirina (Figura 4). Este compuesto se introdujo en la terapéutica a finales del siglo XIX y se convirtió en el analgésico-antipirético más utilizado y actualmente se considera el patrón farmacológico de los analgésicos no opiáceos. Además, el descubrimiento de su mecanismo de acción, hace escasamente 30 años, permitió la extensión de su uso a la prevención y tratamiento de los fenómenos tromboembólicos. Existe un gran número de salicilatos derivados de la aspirina y muchos de ellos se utilizan en procesos inflamatorios y como analgésicos. La aspirina también tiene múltiples usos, pero es el fármaco de primera elección para los procesos

trombóticos. A partir del ácido acetilsalicílico se sintetizaron nuevos compuestos más específicos para este tipo de procesos, entre estos se encuentra el triflusal (ácido-2-acetoxi-4-(trifluorometil)-benzoico, y su metabolito el ácido 2-hidroxi-4-trifluorometil-benzoico (HTB) (Figura 4).

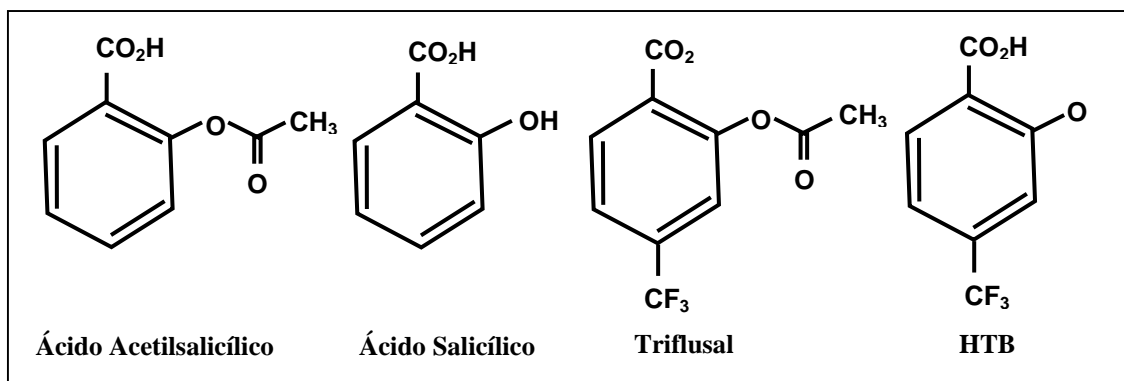


Figura 4. Estructura química del ácido salicílico y su derivado acetilado, el ácido acetilsalicílico, y del triflusal y su principal metabolito, el HTB.

Farmacocinética

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID's), también conocidos como salicilatos, en general se absorben con rapidez una vez ingeridos, básicamente en el intestino delgado superior y una pequeña parte en el estómago. Tras la administración oral se obtienen concentraciones plasmáticas apreciables a los 2-30 minutos y máximas a los 60-120 minutos (Rowland M *et al.*, 1972) y la biodisponibilidad de la forma no hidrolizada es 70%. El porcentaje de unión de la aspirina a proteínas plasmáticas depende de su concentración y oscila entre 25-95%, y su vida media plasmática es de 15 minutos. El triflusal se une en un 99% a proteínas plasmáticas y su vida media es de 30 minutos. La aspirina sufre un rápido proceso de hidrólisis tras su absorción mediante esterasas presentes fundamentalmente en el hígado, pulmón, plasma y glóbulos rojos, aunque el proceso comienza en la mucosa gastrointestinal durante la fase de absorción. El proceso de metabolización da lugar a ácido salicílico, entre otros compuestos, que es un metabolito activo. El triflusal también es metabolizado rápidamente, mediante desacetilación, transformándose en HTB, su principal metabolito activo. El HTB tiene una semivida mucho mayor que el triflusal (35 horas).

Farmacodinámica

El mecanismo de acción de la aspirina, el triflusal, así como de otros salicilatos, consiste en la acetilación de un residuo de serina situada en la posición 530 de la cadena polipeptídica de la Cox, lo cual conduce a una inhibición irreversible del enzima. De esta manera, se interrumpe la transformación del AA en sus derivados ciclooxygenados, inhibiendo los mecanismos fisiopatológicos en los que éstos están implicados. Debido a la gran cantidad de mecanismos en los que está implicada la Cox, los salicilatos producen amplitud de acciones, y no todas ellas beneficiosas. Mediante la inhibición de los eicosanoides mediadores de la inflamación, se producen acciones analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias; a través de la inhibición de la producción de TXA₂ en plaquetas se produce un efecto antitrombótico, pero como contrapartida modifican la producción de PGI₂ vascular, efecto contrapuesto al de la inhibición plaquetaria, y de varias prostaglandinas implicadas en la funcionalidad de numerosos órganos (Castillo J *et al.*, 1995).

En las plaquetas, la aspirina produce una acetilación irreversible de la Cox, con lo cual reduce la producción de TXA₂ (Roth GJ & Majerus PW, 1975; Roth GJ & Calverley DC, 1994). Como las plaquetas son anucleadas, y por tanto incapaces de llevar a cabo las síntesis proteica, no pueden reponer la actividad enzimática, por lo que la inhibición plaquetaria se prolonga durante toda la vida de la plaqueta (8-9 días). En humanos, una dosis oral de 50 mg de aspirina es suficiente para inhibir la síntesis plaquetaria de TXA₂ durante 3 días (Mohri H & Ohkubo T, 1993). La aspirina inhibe también la agregación secundaria inducida por la trombina, colágeno o AA, debido a que inhibe la producción plaquetaria de diacilglicerol (Werner MH *et al.*, 1991), aunque este efecto es menos duradero que la inhibición de la Cox y depende de la dosis administrada. Es importante resaltar que la inhibición de la Cox no excluye de forma absoluta el papel trombogénico de las plaquetas, pues éstas pueden ser activadas a través de otras rutas. Esto contribuye a explicar los fracasos terapéuticos observados en ensayos clínicos y en la práctica diaria en relación con el uso de la aspirina como profilaxis antitrombótica (Chesebro JH & Fuster V, 1987; Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1988 y 1994; Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002). A través del mismo mecanismo de acetilación de la Cox, la aspirina inhibe la síntesis de PGI₂ por el endotelio vascular, que ejerce un efecto contrario al TXA₂, ya que inhibe la

agregación plaquetaria y es vasodilatadora. La PGI_2 inhibe la activación plaquetaria mediante la estimulación de la adenilciclasa, lo que conlleva a un incremento del AMPc. Como ya se ha comentado anteriormente, el AMPc facilita la entrada de calcio en sus depósitos, reduciendo su disponibilidad en la plaqueta, mientras que el TXA_2 facilita el paso inverso. Los efectos contrapuestos de la aspirina sobre la agregación plaquetaria y sobre la capacidad antitrombótica del endotelio vascular suponen un problema en la terapia antitrombótica conocido como el “dilema de la aspirina” (Preston FE *et al.*, 1981; Cruz JP *et al.*, 1992) (Figura 5). El efecto sobre la PGI_2 vascular es dosis-dependiente, y a diferencia de las plaquetas, carentes de núcleo, en el endotelio vascular se produce una regeneración del complejo enzimático de la Cox. Debido a esta característica, la manera de obtener una inhibición de la Cox plaquetaria sin afectar la Cox vascular consiste en la administración de dosis bajas de aspirina (50-75 mg) que consigan una inhibición de la síntesis de TXA_2 plaquetario sin afectar de la síntesis vascular de PGI_2 (Vial JH *et al.*, 1990; Fitzgerald GA *et al.*, 1991).

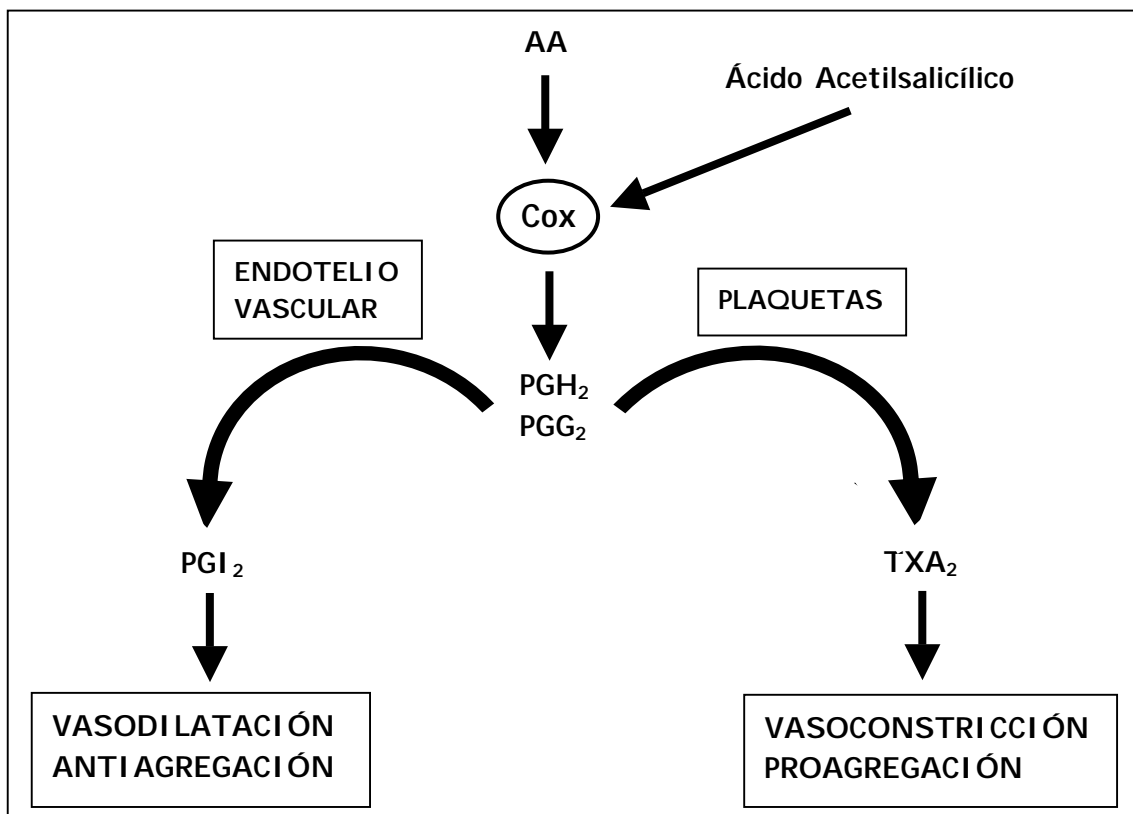


Figura 5. Efectos antagónicos del ácido acetilsalicílico (ASA) sobre los procesos de agregación plaquetaria, “Dilema de la aspirina” (Vial JH *et al.*, 1990; Fitzgerald GA *et al.*, 1991).

El fármaco antiagregante ideal debería inhibir la síntesis de TXA_2 , respetando la de PGI_2 , e incrementar los niveles de AMPc. Según esta premisa se diseñó el triflusal. Este derivado de la aspirina inhibe de manera irreversible la Cox, pero con menor potencia, y además inhibe la fosfodiesterasa plaquetaria, enzima responsable de la metabolización del AMPc (Cruz JP & Sánchez de la Cuesta F, 1995). Su metabolito, el HTB, también inhibe la Cox, pero más débilmente que el triflusal, e inhibe la fosfodiesterasa con mucha más potencia que su antecesor (10 veces más). Respecto a la PGI_2 vascular, el triflusal y el HTB inhiben su síntesis, pero son necesarias concentraciones mil veces superiores a las de aspirina, y diez veces superiores que las necesarias para su efecto como antiagregante plaquetario (Cruz JP *et al.*, 1992). Ya que el triflusal una vez administrado, se metaboliza rápidamente a HTB, el cual tiene una vida media mucho más larga, los efectos obtenidos básicamente se deben a éste último, con lo que el resultado es la inhibición de la formación de TXA_2 y un incremento de AMPc en la plaqueta, mientras que a nivel vascular no se afecta la PGI_2 .

Respecto a otros efectos de los salicilatos, el mecanismo mediante el cual estos compuestos tienen un efecto antiinflamatorio, es a través de la inhibición de la isoforma Cox-2, implicada en los procesos inflamatorios. La inhibición de esta isoforma se consigue con dosis superiores a las antitrombóticas, debido a que es rápidamente regenerada por las células nucleadas. Esto explica la diferencia de dosificación y del intervalo de administración de la aspirina, cuando se utiliza como fármaco antiinflamatorio o como antiplaquetario. Recientemente se ha descrito que los salicilatos ejercen la acción antiinflamatoria a través de un mecanismo independiente de la inhibición de la Cox-2, mediante la inhibición del factor de transcripción NF- κ B (Kopp E & Ghosh S, 1994; Bayón Y *et al.*, 1999), factor que participa activamente en el proceso inflamatorio controlando diversos genes de inflamación (Barnes PJ & Karin M, 1997).

Los salicilatos clásicos inhiben las dos isoformas de Cox, pero en estos últimos años se han sintetizado nuevos compuestos que inhiben selectivamente la Cox-2 con la finalidad de obtener un efecto antiinflamatorio aislado, evitando los efectos colaterales que acompañan a la inhibición de la Cox-1 constitutiva (a nivel vascular, gástrico, etc). Sin embargo, diversos estudios clínicos relacionados con la patología cardiovascular

han demostrado que los inhibidores de la Cox-2 no son tan beneficiosos como se esperaba, ya que se observó una reducción en los niveles de prostaciclina vascular tanto en pacientes de riesgo como en voluntarios sanos, acompañada de mayores niveles de TXA₂ debido a la falta de inhibición de la Cox-1 plaquetaria, por lo que se obtuvo una situación de vasoconstricción generalizada que favorecía los procesos aterotrombóticos (Catella-Lawson F *et al.*, 1999; McAdam BF *et al.*, 1999). Estos resultados indican que la Cox-2 no es exclusiva de procesos inflamatorios y que probablemente también participa en procesos fisiológicos. Con el uso de salicilatos que inhiben ambas isoenzimas, el equilibrio prostaciclina-TXA₂ se mantiene y por ello, se obtiene como resultado global un beneficio en la enfermedad isquémica coronaria.

Farmacología Clínica

La aspirina demostró ser efectiva en la prevención de eventos vasculares en diferentes ensayos clínicos, pero los resultados obtenidos en éstos fueron muy heterogéneos. En el estudio ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) la administración de 163 mg de aspirina durante 5 días, a partir de 24 horas de mostrar síntomas de infarto de miocardio, redujo en un 23% el riesgo de mortalidad vascular y un 46-49% el reinfarcto (Patrono C, 2001). El tratamiento a largo plazo también demostró ser efectivo en la prevención del infarto de miocardio en pacientes de riesgo medio y alto. Dos ensayos realizados en hombres, con riesgo cardiovascular reducido o elevado, en los que la aspirina se administró a largo plazo (Physicians' Health Study y Thrombosis Prevention Trial), mostraron una reducción de los eventos vasculares pero no de la mortalidad vascular (Patrono C, 2001). En el meta-análisis Antiplatelet Trialists' se obtuvieron resultados similares (reducción de la incidencia de los eventos cardiovasculares en un 25%) (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1988 y 1994). Se ha observado que dosis bajas de aspirina son tan efectivas en la patología cardiovascular, como dosis más elevadas. Incluso se ha descrito una mayor incidencia de accidentes cardiovasculares en pacientes tratados con dosis altas, lo cual se atribuye al efecto de los salicilatos sobre la producción de PGI₂ vascular (Catella-Lawson F *et al.*, 1999; McAdam BF *et al.*, 1999). Estudios clínicos muestran que el triflusal y la aspirina tienen una efectividad similar en la prevención de la patología cardiovascular, aunque

comparado con esta última, el triflusal muestra mayor efectividad en la prevención de los eventos cerebrovasculares (Cruz-Fernández JM *et al.*, 2000).

A pesar de que los ensayos clínicos sugieren un beneficio con la terapia con aspirina en pacientes ateroscleróticos, su uso clínico diario y su estudio en diversos modelos animales sugieren que este compuesto no es del todo efectivo en la inhibición de la aterotrombosis, ya que sólo bloquea una de las numerosas vías de activación plaquetaria (Folts JD *et al.*, 1999).

INHIBICIÓN DE LA VÍA DEL FACTOR TISULAR

A pesar de que la aspirina y la heparina han sido utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de la patología isquémica coronaria, no han demostrado prevenir en su totalidad los eventos trombóticos (Chesebro JH & Fuster V, 1987; Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1988 y 1994). Esto se debe a que la aspirina y otros fármacos del mismo grupo, como se ha comentado en el apartado anterior, no bloquean totalmente la activación plaquetaria, ya que sólo afectan la formación de TXA₂. Por otro lado, la actividad inhibitoria de la heparina sobre la trombina se ve limitada ya que el trombo residual, presente en la zona lesionada de la arteria, contiene trombina activa unida a fibrina que es poco accesible para la heparina, y además en la zona del trombo se produce liberación de factor plaquetario 4, así como del monómero de fibrina II, los cuales inhiben a la heparina (Weitz JI *et al.*, 1990; Fitzgerald DJ & Fitzgerald GA, 1989), de manera que la trombosis se sigue activando.

Por esta razón, diferentes estrategias alternativas han sido estudiadas. Estas se basan en la interrupción del reclutamiento plaquetario y de la formación de fibrina mediante la inhibición directa de la trombina (Hanson SR & Harker L, 1988). Un ejemplo de este grupo farmacológico es la r-Hirudina (Badimon L *et al.*, 1989), molécula sintética que inhibe irreversiblemente y de manera competitiva a la trombina. Las moléculas de hirudina y otras antitrombinas específicas son al menos diez veces más pequeñas que el complejo heparina-antitrombina III, no tienen inhibidores naturales y, por tanto, tienen una mayor accesibilidad a la trombina. Se ha demostrado que la

inhibición específica de la trombina es mucho más eficaz para inhibir la progresión del crecimiento del trombo en las zonas de daño arterial, que la aspirina, la heparina o ambas a la vez (Meyer BJ *et al.*, 1994). El inconveniente de estos fármacos es que alteran la función hemostática prolongando el tiempo de sangría (Topol EJ, 1993; Antman EM, TIMI 9^a Investigators, 1994; GUSTO IIa Investigators, 1994) y lo hacen de manera proporcional al efecto antitrombótico obtenido.

Un mecanismo con el que se consigue la disminución de los riesgos hemorrágicos de los agentes antitrombóticos, consiste en la inhibición de la formación de trombina. Para ello se utilizan inhibidores de las proteasas de la cascada de la coagulación, que concretamente inhiben la generación de trombina dependiente de la *vía del TF*. Diferentes trabajos han estudiado el efecto de los inhibidores del TF en la trombosis desencadenada sobre lesiones vasculares y se ha observado que se consigue un efecto antitrombótico sin prolongar el tiempo de sangrado (Harker L *et al.*, 1996). Incluso, la lesión al cabo de varios días es menor cuando se ha administrado un inhibidor del TF (Jang Y *et al.*, 1995; Harker L *et al.*, 1996; Asada Y *et al.*, 1998). Entre los diferentes inhibidores del TF estudiados se encuentran:

- *Inhibidor del TF recombinante humano (rTFPI)*: Este compuesto es una molécula recombinante del inhibidor del TF humano (TFPI ó LACI). Es un inhibidor de proteinasas trivalentes tipo Kunitz que se encuentra en la sangre de manera fisiológica. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición del segundo dominio tipo Kunitz del factor Xa y del primer dominio tipo Kunitz del complejo factor tisular-factor VIIa. Como resultado de su unión a estos factores se forma un complejo cuaternario que contiene el factor Xa-TFPI-factor VIIa/TF que inactiva la *vía del TF* (Girard TJ *et al.*, 1989; Wesselsch R *et al.*, 1992; Han X *et al.*, 1999; Badimon JJ *et al.*, 1999).
- *Anticuerpos contra el TF*: Se unen al TF y bloquean la formación del complejo TF-factor VIIa, inhibiendo la *vía del TF* de la coagulación (Badimon JJ *et al.*, 1999).

- Factor VIIa inhibido (rFVIIa_i): El factor VIIa es un enzima de la cascada de la coagulación, muy parecido a la tripsina, que pertenece al grupo de las proteasas de la serina homóloga. Actúa hidrolizando substratos específicos en el residuo arginilo (Coggins JR *et al.*, 1974). El rFVIIa_i es una molécula recombinante del factor VIIa humano que tiene su centro activo inactivado. El centro activo se puede inhibir con péptidos de clorometil cetona arginina, según el tipo de inhibidor utilizado se obtiene el FFR-rFVIIa (D-Phe-Phe-Arg clorometil cetona) o el DEGR-rFVIIa (dansyl-Glu-Gly-Arg- clorometil cetona) (Kettner C & Shaw E, 1981). Cuando el rFVIIa está presente en el lugar de la lesión, compite con el factor VIIa fisiológico, por su unión al TF formándose el complejo TF-rFVIIa, que no es funcional (Rao L & Ezban M, 2000).

El Factor VIIa Recombinante Humano con el Centro Activo Desactivado: FFR-rFVIIa

El FFR-rFVIIa (Novo Nordisk, Dinamarca) es un fármaco de reciente descubrimiento que todavía está en fase experimental y aún no está disponible para su uso en patologías trombóticas. Los efectos de este compuesto han sido parcialmente estudiados *in vitro* e *in vivo*. Respecto a los datos farmacocinéticos, existe un estudio en humanos, donde se administró una sola dosis intravenosa de FFR-rFVIIa, que muestra que su tiempo de vida media se encuentra aproximadamente entre 4 y 6 horas, y que éste es un fármaco relativamente seguro y bien tolerado (Erhardsten E *et al.*, 2001).

Por lo que se refiere a la farmacodinámica, el mecanismo de acción del FFR-rFVIIa se basa en su unión al TF y consecuente inactivación del complejo formado por ambos. El FFR-rFVIIa tiene la misma afinidad que el factor VIIa por enlazarse al TF funcional (a las zonas activas del TF), pero este compuesto se une con una afinidad seis veces mayor que el factor VIIa al TF inactivo (a las zonas inactivas) (Sorensen BB *et al.*, 1997; Sorensen BB & Rao L, 1998). Esta unión es reversible, ya que la presencia de una mayor cantidad de moléculas de factor VIIa en la zona de la reacción son capaces de desplazar el FFR-rFVIIa unido a TF (Golino P *et al.*, 1998). Al unirse al TF el FFR-rFVIIa induce una prolongación del tiempo de la protrombina (PT) (prueba laboratorial

que evalúa la *vía del TF*), sin afectación del tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT) (prueba laboratorial que evalúa la *vía por contacto*), agregación plaquetaria, ni del tiempo de sangrado (Rao L & Ezban M, 2000; Erhardsten E *et al.*, 2001). Este efecto sobre el PT ya se aprecia a los 15 minutos de la administración intravenosa, y puede perdurar durante unas 8 horas (Erhardsten E *et al.*, 2001).

Diferentes estudios *in vitro* con modelos celulares de la *vía del TF*, han demostrado que el FFR-rFVIIa disminuye la producción de trombina y la activación plaquetaria (Kjalke M *et al.*, 1997). También se ha observado una disminución en la deposición de plaquetas y de fibrina en modelos *in vivo* y *ex vivo* después de administrar sistémicamente FFR-rFVIIa (Lindahl AK *et al.*, 1993; Kirchhofer D *et al.*, 1995), así como un menor engrosamiento de la neointima varias semanas después de la inducción de una lesión arterial (Harker LA *et al.*, 1997; Courtman DW *et al.*, 1998). La aplicación local de FFR-rFVIIa en la zona lesionada del vaso también disminuye la trombosis (Golino P *et al.*, 1998).

Además de los efectos directos y a corto plazo del FFR-rFVIIa, la inhibición del TF durante unas pocas horas (el tiempo de vida media es corto), induce efectos que persisten durante mucho más tiempo. El complejo TF-FVIIa activa una serie de eventos de señalización intracelular, como la elevación del calcio intracelular (Rottingen JA *et al.*, 1995), la activación de la proteína-quinasa de actividad mitógena (MAP) (Poulsen LK *et al.*, 1998) y la alteración de la expresión génica. Cuando el FFR-rFVIIa forma el complejo con el TF, las respuesta de señalización intracelular no se producen (Pendurthi UR *et al.*, 1997). Se sabe que la trombina activa el gen del TF, posiblemente la inhibición de la formación de trombina por el FFR-rFVIIa suponga una menor expresión de este gen (Rao L & Ezban M, 2000). De hecho, un efecto similar ha sido descrito inhibiendo el TF con TFPI (Hamik K *et al.*, 1999). Estos efectos a más largo plazo están relacionados con la reducción de la restenosis por el FFR-rFVIIa y otros inhibidores del TF. Por tanto, la inhibición de la *vía del TF* da lugar a diversos efectos beneficiosos más allá de los esperados a nivel de la coagulación sanguínea.

INHIBICIÓN DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La Vía del Mevalonato

La vía del mevalonato es la ruta metabólica a través de la cual se produce la biosíntesis de colesterol a partir del 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) (Figura 6). La primera reacción de esta vía es la reducción del HMG-CoA a mevalonato, catalizada por el enzima HMG-CoA reductasa, enzima clave debido a su carácter limitante de la vía. El mevalonato es además precursor de los isoprenoides, productos imprescindibles en el funcionamiento de la célula (Goldstein JL & Brown MS, 1990). Uno de los primeros isoprenoides de la vía es el isopentenil-pirofosfato (IPP), que es el precursor de la isopentiladenina y participa en la síntesis del RNA de transferencia. El IPP es a su vez, precursor del farnesil-pirofosfato (FPP). La condensación de dos moléculas de FPP por acción de la escualenosintasa da lugar al colesterol. Por otro lado, la condensación del FPP con IPP da lugar al geranylgeranylpirofosfato trans (GGPPt) o geranylgeranylpirofosfato trans-trans-cis (GGPPc). El GGPPc es el precursor del dolicol, un isoprenoide de cadena larga que participa en el proceso de glicosilación de proteínas (Carroll KK *et al.*, 1992). El GGPPt y el FPP están implicados en la modificación post-transcripcional de las proteínas. Existen numerosas proteínas que han de someterse a este proceso para ser funcionales, entre ellas se encuentran las proteínas G y las Rho GTPasas (Van AL & D'Souza-Schorey C, 1997; Hall A, 1998). Las Rho GTPasas, miembros de la superfamilia Ras de pequeñas proteínas unidas a GTP, son los sustratos que más se someten a la modificación post-transcripcional mediante isoprenalización. La familia Rho está constituida por tres tipos de proteínas, Rho, Rac y Cdc42. Tras la isoprenalización de Rho, el Rho inactivo (unido a GDP) situado en el citosol es activado (unido a GTP) y se transloca a la membrana. Los diferentes miembros de la familia Rho tienen funciones específicas relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina, la transcripción genética, transducción del señal, conformación de la célula, motilidad, secreción, proliferación, y estabilidad del RNA mensajero.

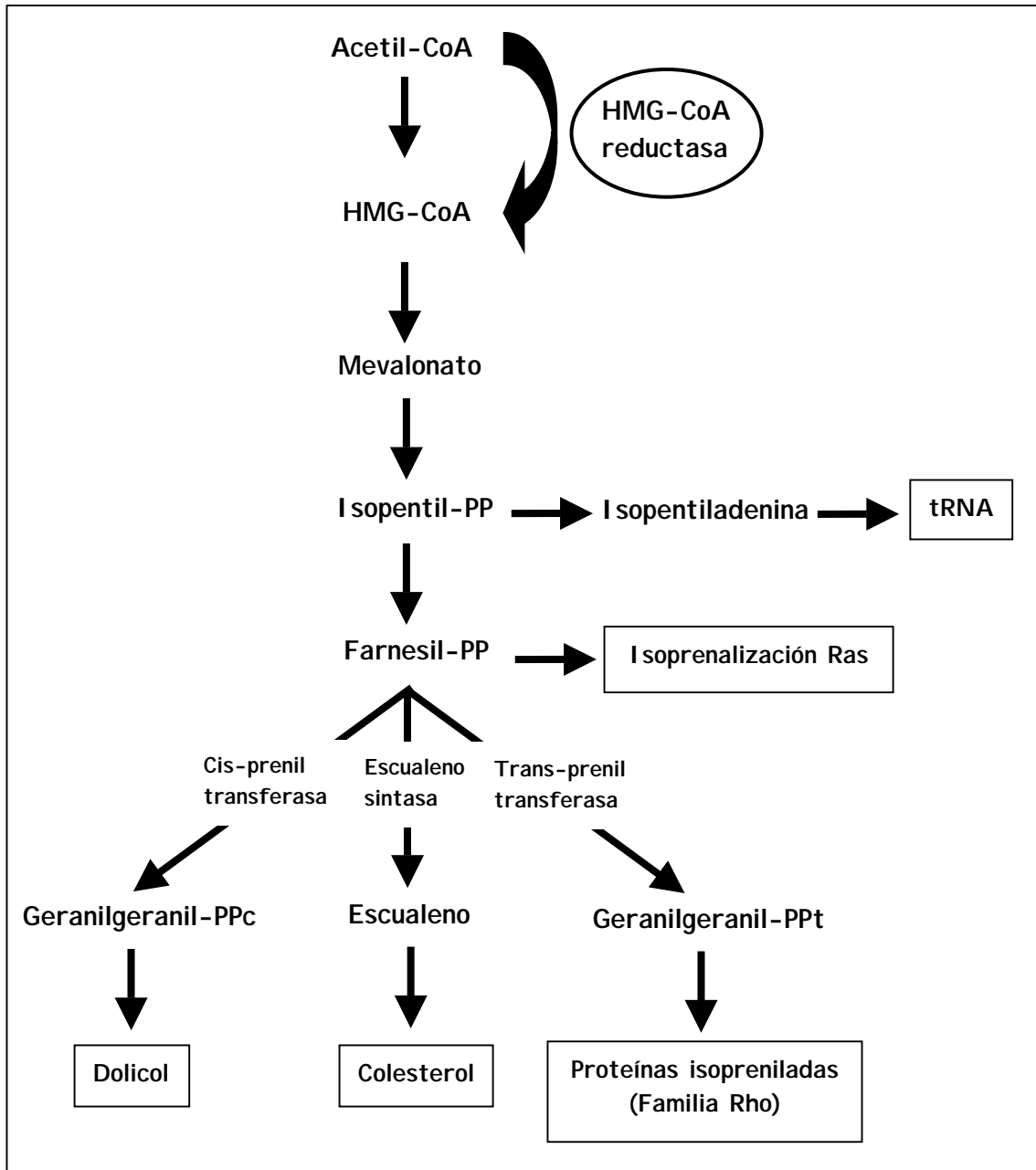


Figura 6. Representación esquemática de la vía del mevalonato (Takemoto M & Liao JK, 2001).

Inhibidores de la HMG-CoA Reductasa

En 1973, Endo A (1992) descubrió el primer inhibidor de la HMG-CoA reductasa, la mevastatina o compactina, a partir de una cepa de *Penicillium citrinum*. Actualmente existen varios inhibidores de la HMG-CoA, también conocidos como estatinas. Este grupo de fármacos son los hipolipemiantes de primera elección en la patología cardiovascular. Entre las estatinas más importantes están la lovastatina,

simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina. Todas ellas inhiben la biosíntesis del colesterol, sin embargo, en los últimos años se está demostrando que su espectro de actividad es cada vez mayor (Laufs U, Liao J, 2000; Takemoto M, Liao J, 2001).

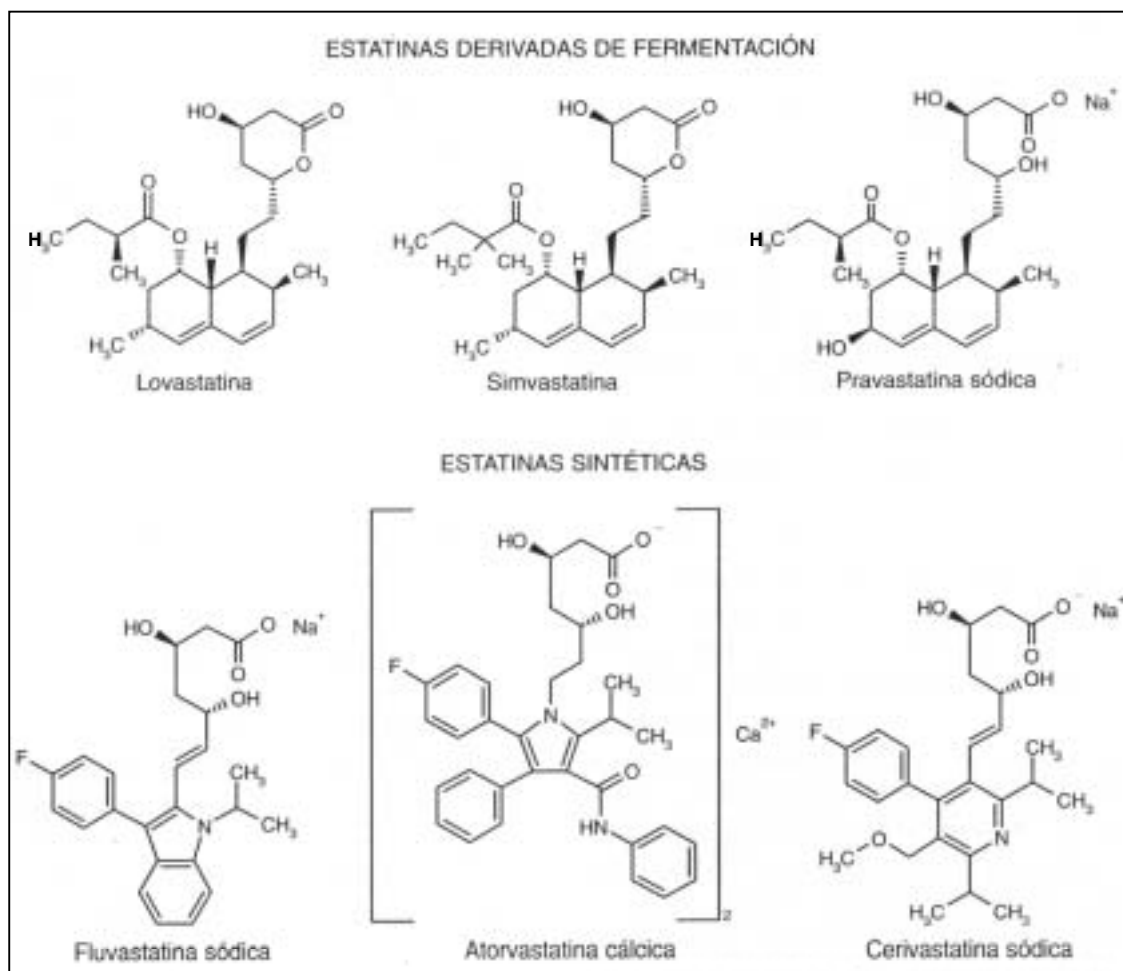


Figura 7. Inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) que se emplean actualmente en la clínica. La lovastatina, simvastatina y pravastatina se obtienen de la fermentación de cultivos de hongos, y la fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina son sintéticas.

Farmacocinética

La biosíntesis del colesterol se produce principalmente en el hígado, aunque también tiene lugar en otros órganos, sobretodo en el bazo y las gónadas, donde es el precursor de hormonas esteroideas. Se ha encontrado que la selectividad tisular de las diferentes estatinas está determinada por su carácter lipófilo, de manera que aquellas

que tienen un carácter más hidrófilo presentan en principio una mayor hepatoselectividad (Roth BD *et al.*, 1991).

Los datos farmacocinéticos en pacientes hipercolesterolémicos muestran que la fluvastatina tiene la mejor biodisponibilidad (98%), la simvastatina la tiene elevada (60-85%) y la más baja la tienen la pravastatina y lovastatina (30-35%). Todos, excepto la pravastatina se fijan en gran medida a las proteínas plasmáticas (>95%). La semivida plasmática de todos los inhibidores, oscila entre 1 y 3 horas, excepto para la atorvastatina, que es de 14 horas. Además, la atorvastatina tiene dos metabolitos activos, el PD152873 y el PD 142545 (Lea AP & McTavish, 1997).

Farmacodinámica

Las estatinas son inhibidores competitivos de la HMG-CoA ($K_i \approx 0,5-10$ nM), actúan por interacción con dos zonas del centro activo del enzima: la región de unión del hidroximetilglutarilo y un bolsillo hidrófobo al que se unen los anillos aromáticos o hidrófobos. La forma farmacológicamente activa de las estatinas es la hidroxiácida y no lactónica, ya que ésta mimetiza la estructura de transición en la reducción de HMG-CoA por HMG-CoA reductasa, es lo que se denomina un análogo del estado de transición (Nakamura CE & Abeles RH, 1985). Por lo tanto, la atorvastatina y la pravastatina se administran en forma hidroxiácida activa, mientras que la simvastatina y la lovastatina requieren la metabolización del anillo lactónico al hidroxiácido.

Tal como se ha mencionado previamente, los metabolitos del mevalonato participan en muchas funciones celulares, por lo que su inhibición mediante estatinas puede motivar la alteración de otras actividades además de la reducción de los niveles de colesterol (Figura 8). A nivel cardiovascular se ha descrito que las estatinas tienen los siguientes efectos:

- Pared arterial: mediante su acción hipolipemiente, las estatinas inducen una modesta regresión del tamaño de la lesión y significativos cambios en su composición que hacen la lesión más estable (Koh KK, 2000; Fukumoto Y *et al.*, 2001). Estos cambios de composición se basan en la reducción de la acumulación de lípidos, macrófagos y de su producción de MMP y TF (Aikawa M *et al.*, 2001). Las estatinas inhiben la expresión de MMP y TF mediante mecanismos dependientes e independientes de la reducción del colesterol (Bourcier T & Libby P, 2000; Aikawa M *et al.*, 2001; Fukumoto Y *et al.*, 2001). Las estatinas también inhiben la proliferación de las CML (Soma MR *et al.*, 1993; Martínez-González J & Badimon L, 1996; Guijarro C *et al.*, 1998; Fukumoto Y *et al.*, 2001), lo cual frena la progresión de la lesión. Este mecanismo es independiente de los niveles de colesterol y se produce mediante la inhibición de la isoprenalización de Rho, el cual es el mediador de la inducción de la proliferación de CML a través de PDGF (Laufs U *et al.*, 1999). Estudios recientes sugieren propiedades antiinflamatorias de estos compuestos, ya que reducen el contenido de células inflamatorias en la placa aterosclerótica (Vaughan CJ *et al.*, 2000). Se ha descrito que las estatinas inhiben la activación del factor de transcripción NF- κ B, factor implicado en la transcripción de diferentes mediadores de la inflamación, ya que impiden la isoprenalización necesaria para su activación (Ortego M *et al.*, 1999; Hernández-Presa MA *et al.*, 2002). Finalmente, se ha descrito que las estatinas mejoran la disfunción endotelial, ya que reducen el estrés oxidativo (Rikitake Y *et al.*, 2001) y aumentan la producción de NO a través de la inducción de eNOS y la estabilización de su RNA mensajero (mRNA) (Laufs U *et al.*, 1998; Kureishi Y *et al.*, 2000; Martínez-González J *et al.*, 2001c). El mecanismo mediante el cual inducen eNOS también es independiente de su acción hipolipemiente y se produce a través de la inhibición de Rho (Laufs U *et al.*, 1998).
- Trombosis: la hipercolesterolemia aumenta la reactividad plaquetar *in vivo* (Badimon JJ *et al.*, 1991) e *in vitro* (Rosenson RS & Lowe GDO, 1998), y se ha sugerido que la disminución de los niveles de lípidos por medios farmacológicos reduce la reactividad plaquetar (Schor K, 1990). Varios estudios mostraron una menor deposición plaquetaria en modelos de trombosis *ex vivo* con varias estatinas (Lacoste L *et al.*, 1995, 1996; Alfón J *et al.*, 1999a y 1999b; Rauch U *et al.*, 2000b; Dangas G *et al.*, 2000). Los mecanismos sugeridos se basan en la reducción de la

producción de TXA_2 (Notarbartolo A *et al.*, 1995) y la modificación del contenido en colesterol de la membrana plaquetaria (Oshamah H *et al.*, 1997; Lijnen P *et al.*, 1996). También se han descrito efectos sobre los factores de coagulación. En el apartado anterior se ha comentado la inhibición de TF en macrófagos (Aikawa M *et al.*, 2001; Fukumoto Y *et al.*, 2001), lo que implica una reducción de la trombogenicidad de la pared vascular. Hay estudios que demuestran una reducción de la producción de trombina y de varios factores de coagulación en pacientes hipercolesterolémicos tratados con estatinas, en los que se redujo la coagulación sanguínea (Szczeklik A *et al.*, 1999; Undas A *et al.*, 2001). Se han obtenido reducciones de los niveles de PAI-1 con estatinas y otros hipolipemiantes, potenciándose así la fibrinólisis (Koh KK, 2000). El efecto sobre el fibrinógeno es contradictorio, ya que se han descrito reducciones e incrementos (Koh KK, 2000).

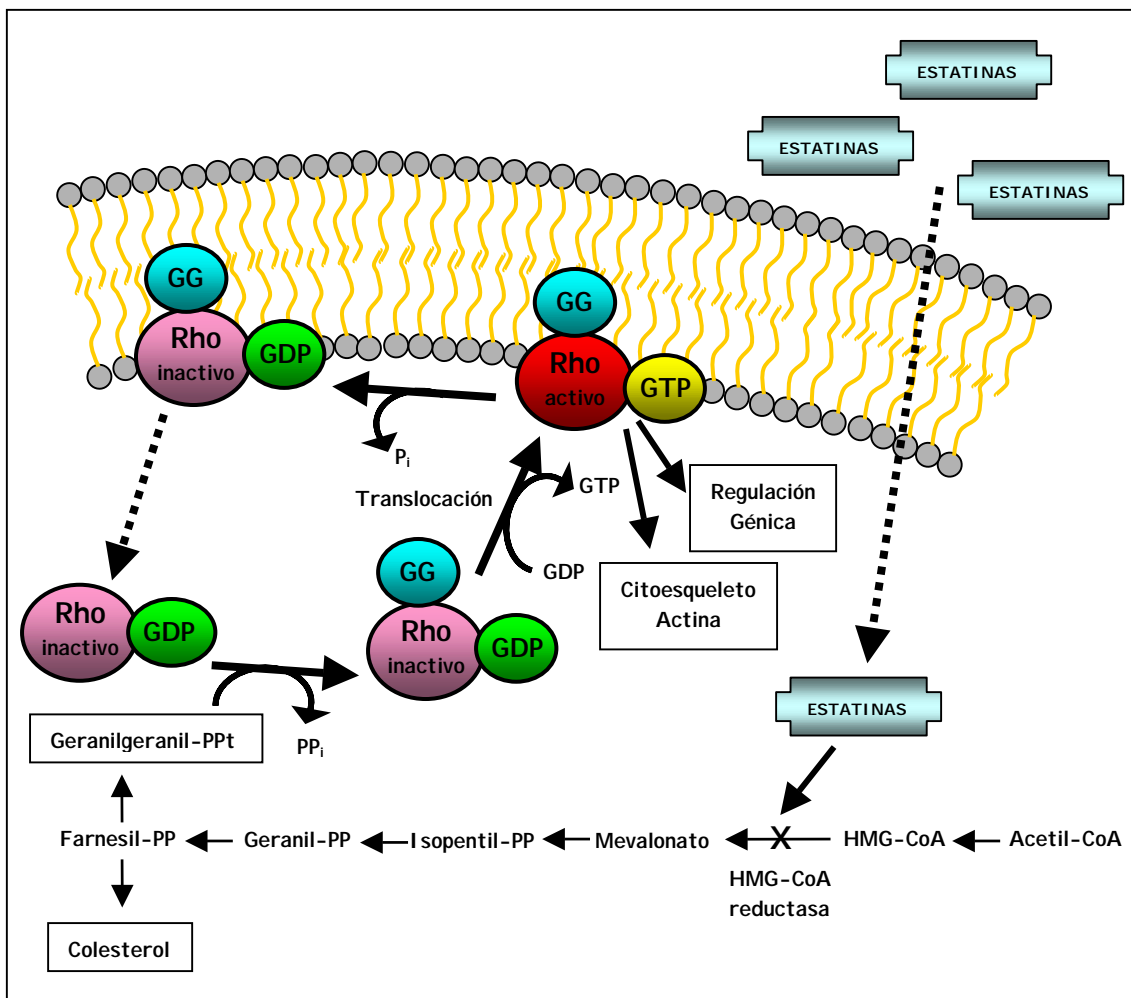


Figura 8. Esquema representativo de la inhibición de Rho por las estatinas. Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa, bloqueando la síntesis de isoprenoides y colesterol. El isoprenoide geranylgeraniol (GG) se une a Rho, permitiendo su activación y translocación a la membrana celular (Modificado de Sánchez S a partir de Laufs U & Liao K, 2000).

Respecto a la actividad de cada una de las estatinas, según estudios de inhibición en varios tipos celulares, la pravastatina es la menos potente en lo que respecta a la inhibición de la HMG-CoA reductasa, pero es la que presenta mayor selectividad hepática. Las seis estatinas siguen el siguiente orden de magnitud en función de su actividad: cerivastatina >> atorvastatina = fluvastatina = lovastatina = simvastatina >> pravastatina (Roth BD *et al.*, 1991; Lea AP & McTavish, 1997).

Farmacología Clínica

Las estatinas inducen disminuciones significativas de los niveles de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos (en menor proporción), y a la vez aumentan la concentración de colesterol HDL. El mecanismo de reducción lipídica se basa en que el enzima HMG-CoA reductasa es limitante en la biosíntesis del colesterol (Goldstein JL & Brown MS, 1977), y como resultado de su inhibición se reduce la síntesis hepática de LDL. Para compensar esta reducción de LDL, el hígado aumenta la captación del LDL circulante mediante una regulación al alza de los receptores hepáticos de LDL. El resultado es la disminución de la concentración plasmática de LDL. En algunas estatinas, el mecanismo de acción también está relacionado con la inhibición de la secreción hepática de VLDL y LDL (Burnett JR *et al.*, 1997).

En la Tabla 1 se resumen los resultados de diversos ensayos clínicos realizados con pacientes y voluntarios sanos, en los que se estudió el efecto hipolipemiante de las estatinas (Lea AP & McTavish, 1997). Según estos ensayos, la atorvastatina tiene una potencia ligeramente superior a la simvastatina en cuanto a las reducciones de colesterol total, LDL y triglicéridos. Sin embargo, la potencia hipocolesterolémica de ambas es superior a la de la pravastatina a dosis equivalentes. La pravastatina y la simvastatina incrementan de manera similar el colesterol HDL, y la atorvastatina lo hace con menor potencia.

Fármaco	Dosis ^a	Sujetos	Col. total ^b	Col. LDL ^b	Col. HDL ^c	Triglicéridos ^b
A	40 x 2	Vol. sanos	34	48	2	25
A	10 x 26	Hipercolest.	26	35	1*	21
A	20-80 x 4	Hipercolest.	32-39	35		27-37
P	10 x 6	Hipercolest.	16	22	5	6
P	20 x 6	Hipercolest.	20	29	7	11
S	10 x 6	Hipercolest.	23	32	7	13
S	20 x 6	Hipercolest.	28	38	7	14

Tabla 1. Ensayos clínicos en los que se evaluaron las propiedades hipolipolipemiantes de diversos inhibidores de la HMG-CoA reductasa; A, indica atorvastatina; P, pravastatina y S, simvastatina; ^a, dosis en mg/día x semanas de tratamiento; ^b, porcentaje de la reducción; ^c, porcentaje del incremento (* reducción). Adaptado de Lea AP & McTavish, 1997.

El uso de simvastatina en el estudio 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994) y pravastatina en los estudio CARE (Sacks FM *et al.*, 1996) LIPID (The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group, 1998) y WOSCOPS (Sheperd J *et al.*, 1995) demostró que estas estatinas disminuyen el colesterol y a la vez proporcionan un beneficio terapéutico tanto en prevención secundaria (4S y CARE) como primaria (WOSCOPS). En el ensayo 4S una dosis media diaria de 27 mg de simvastatina indujo un descenso del 35% de los niveles de colesterol LDL y una disminución del 34% de las muertes por causa cardiovascular y en el número de infartos definidos. El estudio WOSCOPS fue el primero en evaluar los beneficios de la reducción de los niveles de colesterol con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa en prevención primaria. En el grupo de pacientes al que se administró una dosis de 40 mg/día de pravastatina se observó una reducción del número de infartos de miocardio y de muertes por enfermedad cardiovascular (31%).

Sin embargo, el beneficio terapéutico que se observa se produce antes de que pueda haberse producido regresión de la placa aterosclerótica. Así, el estudio MAAS halló que se producía un efecto significativo en la mejora de la morfología arterial sólo tras 4 años de tratamiento con estatinas (MASS investigators, 1994). Por otro lado, fueron necesarios 9 años en el estudio POSCH para obtener beneficio clínico mediante una intervención que reducía únicamente el colesterol plasmático a una concentración similar a la de las estatinas (Buchwald H *et al.*, 1995). Los beneficios clínicos del

estudio 4S empezaron a observarse a partir de los dos años (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994), mientras que en estudio HPS (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002) el tratamiento con simvastatina produjo beneficios en pacientes de elevado riesgo cardiovascular, de manera independiente a las concentraciones de colesterol plasmático. En los estudios MIRACL (Schwartz GG *et al.*, 2001) y ASCOT (Sever PS *et al.*, 2003) la atorvastatina redujo los eventos isquémicos antes de finalizar el primer año de tratamiento, periodo de tiempo insuficiente para obtener cambios significativos en las lesiones vasculares. Estos hechos junto a los datos experimentales ya mencionados anteriormente, hacen suponer que el efecto beneficioso de las estatinas provenga de actividades colaterales a nivel de la célula periférica, este tipo de efectos se denominan efectos pleiotrópicos. Por lo tanto, existe una serie de factores que participan directamente en el proceso aterotrombótico que pueden verse afectados por el tratamiento con los inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Es por ello que hay un gran interés en su investigación con el fin de determinar aquellos efectos diferenciales que provienen de cada uno de ellos.

MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES

ATEROSCLEROSIS

La utilización de modelos de aterosclerosis *in vivo* e *in vitro* ha ayudado enormemente a la comprensión de los mecanismos implicados en la patología aterosclerótica, así como a la elaboración de estrategias antiateroscleróticas.

En función de cómo desarrollan esta patología se distinguen dos tipos de animales: ateresistentes y aterosensibles. Los primeros no padecen la enfermedad de manera espontánea (perro, conejo, rata, ratón, cobaya), mientras que los segundos sí (cerdo, pollo, pato, mono). Estas diferencias se deben al tipo de perfil lipídico y al metabolismo de la pared arterial (enzimas implicadas en el catabolismo aeróbico de la glucosa, hidrólisis del ATP y lipólisis). Además, las especies aterosensibles se

caracterizan por un mayor contenido de proteoglicanos en la pared arterial (Hadjiisky P *et al.*, 1991).

El conejo se ha utilizado en muchas ocasiones como modelo de aterosclerosis (Amstrong ML & Heistad DD, 1990), ya que aunque no desarrollan aterosclerosis espontánea, la administración de una dieta hipercolesterolémica (0,5% a 4% de colesterol en la dieta) induce un rápido desarrollo de lesiones vasculares, y además el coste de mantenimiento es bajo. En los protocolos típicos de inducción de aterosclerosis, los conejos se someten a esta dieta durante 8 a 16 semanas y en poco tiempo alcanzan la hipercolesterolemia. El inconveniente de este modelo es que las lesiones desarrolladas son muy diferentes a las lesiones humanas, ya que tienen un contenido lipídico y de macrófagos mucho mayor, y el índice de hipercolesterolemia es extremadamente elevado.

El cerdo y el mono son mejores modelos de la aterosclerosis desarrollada en humanos. La utilización de diferentes razas de monos en numerosos estudios ha contribuido de manera enorme al conocimiento de la patología aterosclerótica (Malinov MR & Maruffo CA, 1965), pero actualmente este animal no se utiliza de manera intensiva debido al elevado coste y a factores relacionados con la especie (peligro de extinción). El cerdo también es un buen modelo debido a que desarrolla lesiones ateroscleróticas de manera espontánea. Tiene muchas similitudes con la especie humana, incluyendo el tamaño y distribución de las arterias, localización del engrosamiento de la íntima en estado normal, distribución de las lipoproteínas plasmáticas y respuesta a las dietas hiperlipémicas (Kim DN *et al.*, 1984). Debido a esto, en los últimos años se ha multiplicado el número de trabajos que utilizan el cerdo como modelo de aterosclerosis. Los inconvenientes de este modelo son el coste y las dificultades que implica su mantenimiento y manipulación.

Los modelos más recientes de aterosclerosis son los animales genéticamente modificados (transgénicos). El ratón transgénico con disrupción en el gen de la apolipoproteína E (ApoE KO) se ha utilizado en numerosos trabajos en los últimos años (Zhang SH *et al.*, 1992), ya que desarrolla hiperlipidemia y lesiones ateroscleróticas. Éste modelo tiene como ventaja su fácil manejo debido a su reducido tamaño. Se ha observado que en el ratón ApoE KO la distribución de las lesiones es muy diferente a la

de los humanos, y además no se produce rotura espontánea de la placa, por ello la utilidad de éste y de otros ratones transgénicos como modelos de la aterosclerosis humana, todavía ha de ser probada.

TROMBOSIS

El uso de modelos experimentales de trombosis arterial *in vivo* y *ex vivo* supone un paso obligado para la comprensión de los mecanismos que participan en la trombogénesis, así como para evaluar posibles agentes antitrombóticos.

En cuanto a los modelos *in vivo*, la primera fase consiste en la inducción de una lesión vascular que simule la aterosclerótica o la que se produce tras la rotura de una placa, que desencadena el proceso trombótico. También se simula la lesión producida tras intervención intracoronaria (angioplastia) para el estudio de la reestenosis. Un modo de obtener un modelo de lesión aterosclerótica es inducir este tipo de lesiones en animales de experimentación (Hasler-Rapacz *et al.*, 1995), no obstante este método es largo, complicado y muy costoso. La alternativa consiste en inducir una lesión profunda de la pared al tiempo que se aplica una estenosis (Folts JD *et al.*, 1982), mediante el método de lesión intravascular inducida por un balón (angioplastia) se consigue lesionar el vaso en mayor o menor grado, según la intensidad aplicada (Steele PM *et al.*, 1985; Adams PC *et al.*, 1987). Otro método, también utilizado consiste en exponer un material trombogénico a la circulación sanguínea, como el ADP (Bourgain RH *et al.*, 1984).

Los modelos *ex vivo* consisten básicamente en cámaras de perfusión que permiten evaluar la deposición plaquetaria. Estos modelos son especialmente útiles en estudios mecanísticos, ya que permiten modular la mayoría de los parámetros, sobre todo las condiciones de flujo (velocidad y fuerza de cizalladura) y el sustrato reactivo. Al determinar estas condiciones *a priori* se evita la variabilidad inherente al sistema *in vivo*, por lo que ésta es la principal ventaja respecto a estos modelos. También permiten evaluar posibles materiales protésicos para ser utilizados en cirugía cardiovascular. Con esta intención se desarrollan técnicas que permiten estudiar el efecto de la exposición de diversos productos a la circulación sanguínea en condiciones de flujo controladas. En

1973, Baumgartner describió el diseño de una cámara de perfusión anular (Baumgartner HR, 1973) que fue posteriormente modificada (Baumgartner HR *et al.*, 1976). No obstante, este sistema tenía el inconveniente de ser difícilmente adaptable a materiales protésicos, y los vasos que se empleaban debían tener unas dimensiones determinadas. Por otro lado, otras cámaras que se desarrollaron para el estudio de materiales protésicos no se pueden adaptar a sustratos biológicos (Grabowski EF *et al.*, 1976). Así mismo, hay cámaras de perfusión planas en las que la superficie reactiva, que es un portaobjetos, se cubre con componentes purificados de tejido conectivo, o de matriz extracelular producidos por células endoteliales en cultivo (Muggli R *et al.*, 1980). La cámara desarrollada por Badimon L es cilíndrica, por lo que imita la forma del sistema circulatorio, y además permite emplear tanto sustratos biológicos como protésicos (Badimon L *et al.*, 1986). La mayor ventaja respecto a las anteriores es que las condiciones de flujo es un parámetro que está totalmente controlado con esta cámara, y no supone un factor de variación como sucede en muchos modelos de trombosis.

La cámara de perfusión Badimon es la que se ha empleado en la realización de este trabajo, se ha caracterizado con detalle, sobre todo en lo que respecta a las condiciones de flujo (Badimon L *et al.*, 1987). El flujo de esta cámara de perfusión es paralelo y parabólico en todo el recorrido. Aunque la forma del canal que se expone al sustrato vascular no es del todo circular, sino en forma de U, se ha demostrado que este aspecto sólo modifica ligeramente las condiciones de velocidad de cizalladura en el sustrato.

En la sección de *Métodos* se indica las velocidades de cizalladura de las cámaras que se emplearon en este estudio. La velocidad de cizalladura (γ) depende directamente de la velocidad de avance de la sangre (V) e inversamente del diámetro de la cámara (d), según la siguiente fórmula:

$$\gamma = 8 \times V/d$$

Esta cámara de perfusión se ha aplicado al estudio de los mecanismos que desencadenan la trombosis y se ha demostrado que, por ejemplo, el núcleo ateromatoso

es la parte más trombogénica de la lesión aterosclerótica (Fernández-Ortiz A *et al.*, 1994). Además ha servido para demostrar el efecto antitrombótico de la r-Hirudina (Badimon L *et al.*, 1989), el efecto del sustrato trombogénico y de la velocidad de cizalladura sobre la formación del trombo (Badimon L *et al.*, 1987), la efectividad de fármacos antiagregantes (Badimon JJ *et al.*, 1997) y antitrombóticos (Badimon JJ *et al.*, 1999).

De lo anteriormente expuesto, podría concluirse que la búsqueda de los mecanismos de formación del trombo y su regulación, son objetivos prioritarios para el control de la transformación de la aterosclerosis como enfermedad crónica-silenciosa, en el síndrome isquémico agudo. Por ello, en esta tesis nos hemos propuesto evidenciar los efectos antitrombóticos de tres grupos de fármacos que abordan estrategias muy diversas de control de determinadas vías metabólicas, pero que pueden tentativamente converger en la reducción de la manifestación clínica de la aterosclerosis, por la vía de la trombosis.

OBJETIVOS

La aterotrombosis es un proceso patológico complejo que se desarrolla en varias etapas y en el que intervienen numerosos factores. Existen dos fases claramente diferenciadas en esta patología. En la primera fase, se desarrolla la lesión aterosclerótica de una manera crónica y asintomática; en la segunda, generalmente cuando la lesión está ya avanzada, se produce la rotura de la misma seguida de la formación de un trombo que ocasiona la oclusión aguda del vaso dando lugar a patologías de tipo isquémico. Debido a estas etapas diferenciadas del proceso aterotrombótico, existen dos grandes líneas destinadas a su prevención y tratamiento:

1. el tratamiento de la aterotrombosis, que consiste en la reducción de la trombosis mediante terapia antitrombótica. La inhibición de la formación del trombo se consigue mediante fármacos que actúan sobre las plaquetas, impidiendo su activación y agregación, sobre la cascada de coagulación, bloqueándola a diferentes niveles, o incluso sobre la fibrinólisis, potenciando la disolución del trombo.
2. la estrategia basada en la prevención, que consiste en la reducción y/o control de los factores de riesgo. En el contexto de esta tesis, una de las vías de prevención es la reducción de los niveles plasmáticos de lípidos. Esto se consigue modificando los hábitos alimenticios y/o administrando fármacos hipolipemiantes. Mediante el uso de estos fármacos se consigue frenar la evolución de las placas ateroscleróticas previniendo así su rotura y complicaciones trombóticas. Se ha observado que algunos de estos compuestos van más allá y son capaces de actuar a otros niveles.

El objetivo de esta tesis, por tanto, se ha dirigido a determinar la eficacia de diferentes moléculas, utilizadas ya de forma rutinaria en el tratamiento de la patología cardiovascular o todavía en fase experimental, y dirigidas a la inhibición de la aterotrombosis, así como evaluar a qué niveles de este proceso pueden estar ejerciendo acciones. En función de las vías metabólicas evaluadas y su inhibición, se han determinado los siguientes objetivos:

Objetivo 1: evaluar la contribución de la vía del factor tisular (TF) a la aterotrombosis.

Para ello se ha estudiado específicamente:

1. 1. Efecto del bloqueo del TF sobre los parámetros de coagulación y la agregación plaquetar *ex vivo*.
1. 2. Efecto del bloqueo del TF sobre la formación del trombo desencadenado por pared vascular sana lesionada y aterosclerótica.
1. 3. Localización del TF en el trombo y en las estructuras de la pared vascular expuestas a la sangre.

Objetivo 2: evaluar la contribución de la vía de la ciclooxigenasa (Cox) y sus metabolitos a la aterotrombosis. Para ello se ha estudiado específicamente:

2. 1. Efecto del bloqueo de la Cox sobre la formación del trombo desencadenado por un trombo residual formado sobre pared vascular lesionada (trombosis secundaria).
2. 2. Efecto del bloqueo de la Cox sobre la expresión de la Cox en la pared vascular sana.

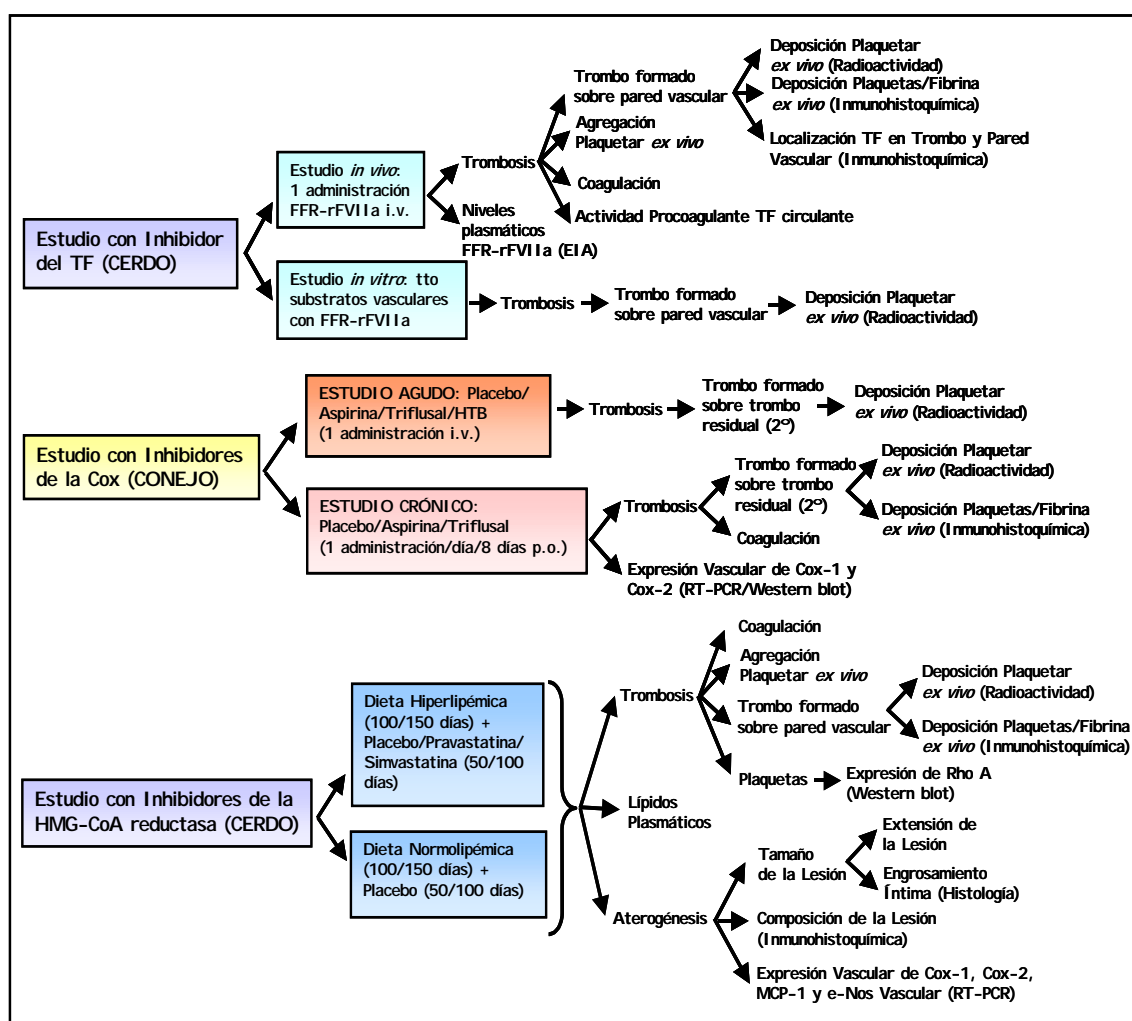
Objetivo 3: evaluar el efecto de la inhibición de la HMG-CoA reductasa sobre la aterotrombosis. Para ello se ha estudiado específicamente:

3. 1. Efecto sobre la agregación plaquetar *ex vivo*.
3. 2. Efecto sobre la formación del trombo sobre pared vascular lesionada.
3. 3. Efecto sobre el desarrollo de la lesión aterosclerótica: tamaño, composición (lípidos, fibrinógeno, CML, macrófagos y TF), y expresión génica (MCP-1, eNOS, Cox-1 y Cox-2).

MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

En el siguiente esquema se describe el diseño experimental realizado en este trabajo. Se realizaron tres estudios en los cuales se evaluaron tres grupos de fármacos que intervienen a diferentes niveles del proceso aterotrombótico. En el primer estudio se evaluó el efecto *in vivo* e *in vitro* del FFR-rFVIIa, un inhibidor del TF, sobre la trombosis, para ello se utilizó el cerdo como modelo experimental. En el segundo estudio se determinó el efecto de la administración aguda y crónica de aspirina, triflusal y HTB, inhibidores de la Cox (salicilatos), sobre la trombosis desencadenada por un trombo residual (trombosis secundaria), así como sobre la expresión de Cox vascular, en conejos. Finalmente, en el tercer estudio se analizó el efecto de la pravastatina y la simvastatina, dos inhibidores de HMG-CoA reductasa (estatinas), sobre la trombosis y sobre el desarrollo de la lesión aterosclerótica en cerdos hiperlipémicos.



MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizaron dos modelos experimentales: conejo y cerdo. Los conejos utilizados fueron machos White New Zealand con un peso aproximado de 2,5 kg, adquiridos de un criador local (B&K Universal). Los cerdos, hembras de cruce comercial (25% Duroc, 25% Pietrain, 25% Landrace y 25% Landrace Belga) provenientes de una granja local, tenían un peso aproximado de 35-40 kg en el *estudio con FFR-rFVIIa*, y de 20 kg al inicio del *estudio con estatinas*. Los animales se mantuvieron estabulados al menos una semana antes del inicio del experimento, es decir antes de la toma de la muestra basal de sangre y de la administración de fármacos. Cada especie dispuso de una zona de estabulación dotada de ventilación y temperatura regulada (20°C), y con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (7,00-19,00 horas); todos los animales se estabularon individualmente.

La alimentación se llevó a cabo con pienso comercial de conejos (1.879 Kcal/kg, B&K Universal) y de cerdos de engorde (2.309 Kcal/kg, C-1, C.I.A.). Los cerdos que recibieron dieta hiperlipémica (*estudio con estatinas*) se alimentaron con pienso normal de engorde al que se adicionó 1% de ácido cólico, 2% de colesterol y 20% de sebo de ternera (3.501 Kcal/kg). A todos los animales se les administró una cantidad diaria de pienso equivalente al 3-3,5% del peso corporal y el agua se administró *ad libitum*.

GRUPOS DE ANIMALES Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Los animales se pesaron antes de la realización del procedimiento experimental con el fin de calcular la dosis de fármaco y/o la ración de pienso, así como para evaluar su estado de salud. En los procedimientos crónicos el pesado se realizó semanalmente.

Estudio con Inhibidor del Factor Tisular, FFR-rFVIIa

En este estudio el tratamiento se realizó de forma aguda, mediante una única administración de FFR-rFVIIa (cedido por Mirella Ezban, Novo Nordisk, Dinamarca).

Tras las determinaciones en situación basal, los animales fueron tratados mediante bolo intravenoso (i.v.) de FFR-rFVIIa, el mismo día en que se realizó el experimento (Figura 1). Los estudios duraron un máximo de 2 horas, ya que la vida media de este fármaco es de 4-6 horas. De manera preliminar se utilizaron diferentes dosis a fin de determinar la dosis mínima con efecto antitrombótico: 0,1 mg/kg (n=3), 0,5 mg/kg (n=5), 1 mg/kg (n=3) y 2 mg/kg (n=1). El estudio de trombosis se realizó con las dosis de 0,5, 1 y 4 mg/kg (n=11). Un grupo adicional de animales (n=3), que no recibió ningún tipo de tratamiento, se destinó al estudio del tratamiento local de la pared vascular con FFR-rFVIIa (*in vitro*).

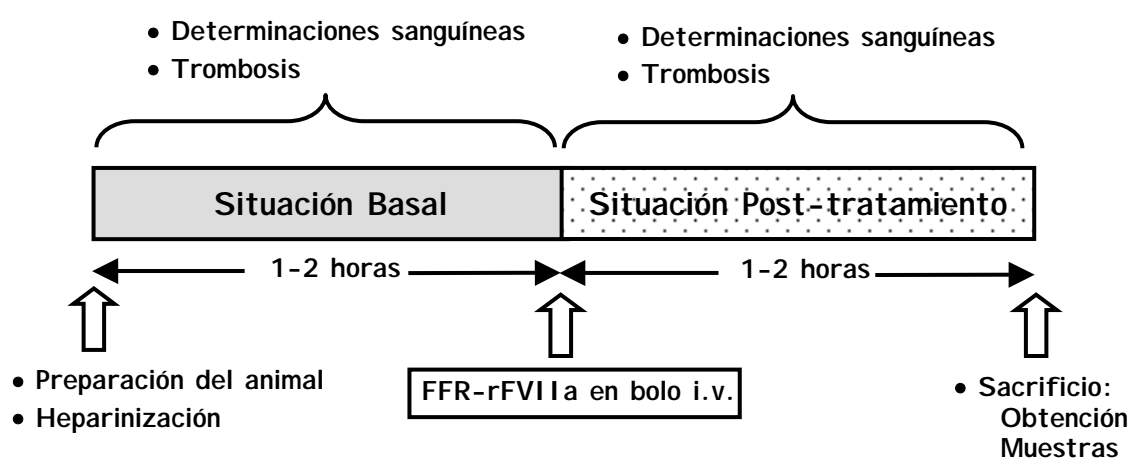


Figura 1. Esquema representativo del protocolo experimental seguido en la primera parte del estudio con inhibidor del TF, en el que se administró FFR-rFVIIa *in vivo* (i.v.). El modelo experimental utilizado fue el cerdo.

Estudio con Inhibidores de la Ciclooxygenasa

Los experimentos realizados en conejo se dividieron en dos partes, según la duración del tratamiento: *tratamiento agudo*, una sola administración del fármaco i.v. el mismo día del procedimiento experimental; y *tratamiento crónico*, una administración diaria del fármaco por vía oral (p.o.) durante una semana (Figura 2). En ambos protocolos, además de los grupos de conejos que recibieron tratamiento, se usó un grupo de animales control como inductor de trombosis primaria.

En la primera parte del estudio, los animales se dividieron en cuatro grupos según el fármaco administrado: aspirina (ácido acetil salicílico de lisina), triflusal (ácido 2-acetoxi-4-(trifluorometil)-benzoico), HTB (ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilben-zoico) y placebo. Se les administró un único bolo i.v. de aspirina (5 mg/kg), triflusal (10 mg/kg), HTB (10 mg/kg) o suero fisiológico (placebo/control).

En la segunda parte, los conejos se dividieron en tres grupos: control (placebo), aspirina y triflusal. Los animales fueron tratados oralmente una vez al día, durante 8 días. Al igual que en el *estudio con FFR-rFVIIa*, se utilizaron varias dosis de aspirina (10, 20, 30 mg/kg/día) y triflusal (15, 30, 40 mg/kg/día) con el fin de hallar la dosis mínima con efecto antitrombótico. Para asegurar que los conejos ingirieran el total de la dosis diaria de los fármacos se procedió de la siguiente manera: 500 mg de cada uno de los fármacos se disolvieron en 25-50 ml de cloroformo y se pulverizaron sobre 100 g de pienso normal, que se dejó secar bajo una corriente de aire en una campana de extracción durante toda la noche. Este pienso se almacenó a 4°C y se empleó a lo largo de la siguiente semana. Asimismo, se preparó pienso sin fármaco pulverizando una cantidad equivalente del solvente sobre el pienso, que se empleó en los animales del grupo control. Ambos fármacos y el placebo se administraron en una sola toma diaria por las mañanas. Para asegurar la ingestión completa del fármaco, se dispuso una rejilla de acero en cada comedero cubriendo el pienso normal y sobre ésta, se colocó el pienso con el fármaco. Una vez ingerido el mismo, se retiraba la rejilla de manera que el animal tuviera acceso al resto del alimento.

La concentración de fármaco según este procedimiento es de 5 mg por g de pienso, para calcular la dosis de pienso para cada animal se siguió la siguiente fórmula:

$$\text{Pienso (g)} = \text{Peso del animal (kg)} \cdot \text{Dosis (mg/kg)} / 5 \text{ (mg/g pienso)}$$

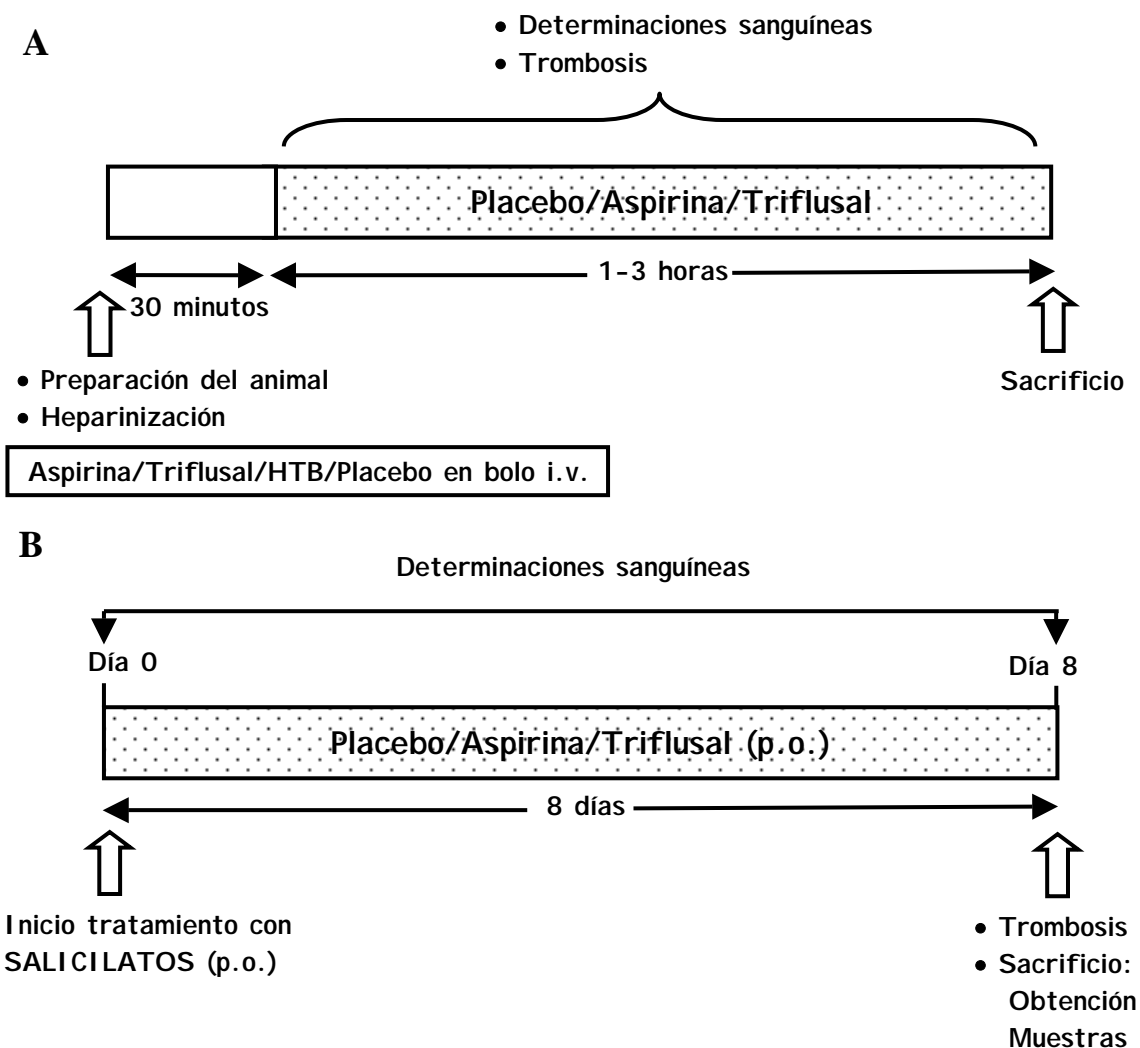


Figura 2. Esquema representativo del protocolo experimental seguido en el estudio con inhibidores de la Cox, en el que se utilizó el conejo como modelo experimental. La figura A y B corresponden a los estudios con administración aguda (i.v.) y crónica (p.o.) de salicilatos, respectivamente.

Estudio con Inhibidores de la HMG-CoA Reductasa

Los cerdos alimentados con dieta hiperlipémica se dividieron en 3 grupos según el tratamiento administrado: control (placebo), simvastatina y pravastatina. Para administrar los fármacos, éstos se mezclaron con una pequeña cantidad de pienso, la cual se administró poco antes de la ración diaria de pienso hiperlipémico. Se realizó un estudio preliminar con varias dosis de cada estatina (pravastatina 5 y 10 mg/kg/día y simvastatina 2,5 y 5 mg/kg/día) para elegir la más adecuada para el estudio definitivo.

En el estudio se incluyó además un grupo de animales control (placebo) alimentados con dieta normolipémica.

Los animales recibieron dieta hiperlipémica durante 50 días, y a partir de este momento se inició el tratamiento con estatinas sin modificar la dieta. El estudio se dividió en dos etapas según la duración del tratamiento (Figura 3): a) tratamiento con placebo/estatinas (pravastatina 5 mg/kg/día, simvastatina 5 mg/kg/día) durante 50 días; y b) tratamiento con placebo/estatinas (pravastatina 5 mg/kg/día, simvastatina 2,5 mg/kg/día) durante 100 días.

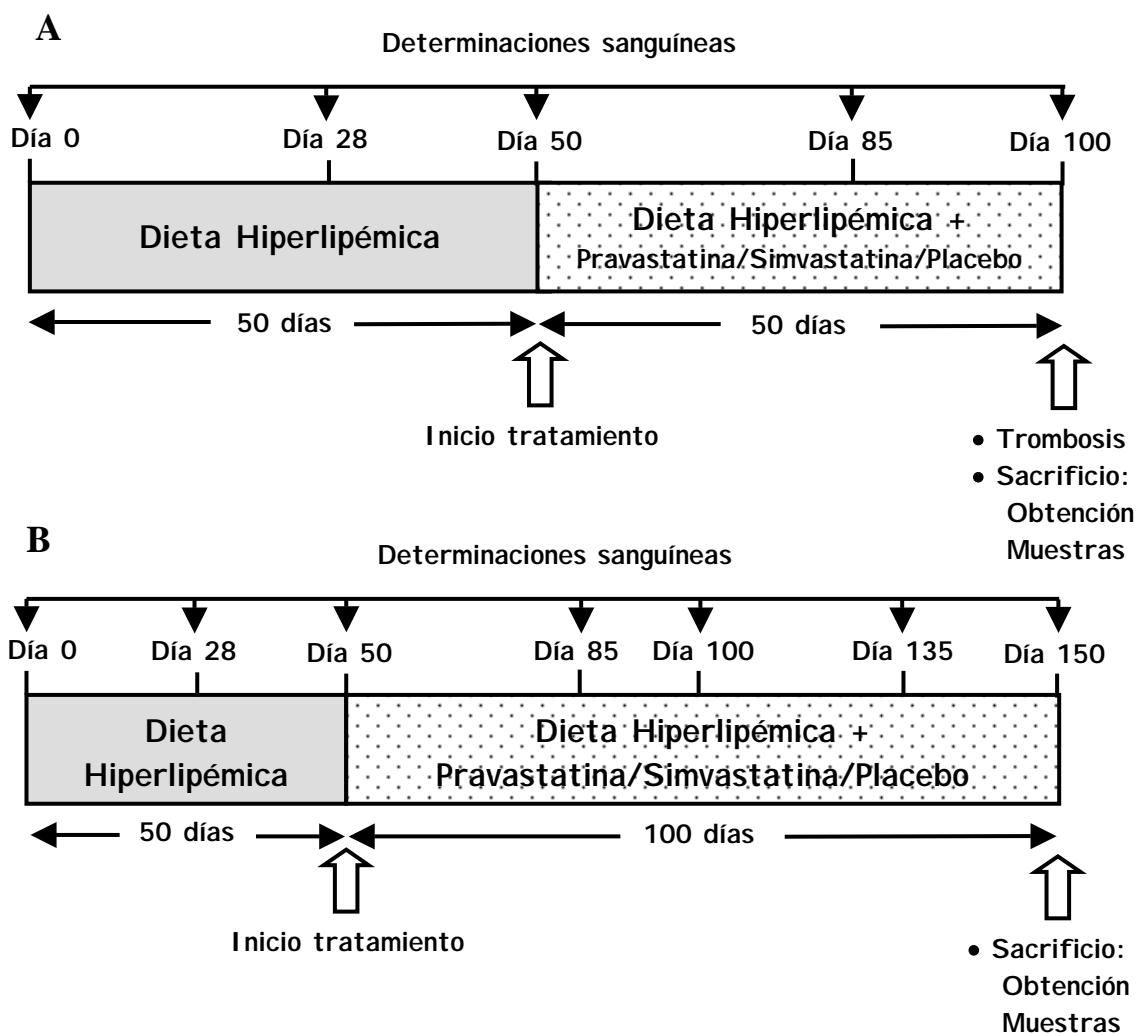


Figura 3. Esquema representativo del protocolo experimental seguido en los grupos hiperlipémicos dentro del *estudio con estatinas*. La figura A y B corresponden a los grupos de animales sometidos a dieta hiperlipémica y tratamiento durante 100 y 150 días, respectivamente. El grupo normolipémico control, siguió el mismo protocolo experimental, pero recibió dieta normal y placebo. El modelo experimental utilizado fue el cerdo.

DETERMINACIONES SANGUÍNEAS

A partir de muestras sanguíneas, se realizaron diferentes determinaciones para detectar posibles alteraciones y/o efectos de los fármacos y dietas utilizados. En los tres estudios y a los tiempos descritos en las Figuras 1, 2 y 3 se determinaron los parámetros bioquímicos y de coagulación sanguínea, así como el recuento de células sanguíneas. Además, en el *estudio con FFR-rFVIIa* se analizaron los niveles plasmáticos de este fármaco y la actividad procoagulante del TF en plasma y sangre total, y en el *estudio con estatinas* se determinaron los niveles de las lipoproteínas ya que se utilizó un modelo hiperlipémico. La agregación plaquetaria *ex vivo* también fue evaluada en estos dos estudios, con el fin de analizar como influían los fármacos y la dieta administrados, en la funcionalidad plaquetaria *in vitro*.

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

En los conejos tratados de manera crónica, se realizaron determinaciones sanguíneas antes de comenzar la administración del fármaco (medición basal) y al finalizar el tratamiento. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la arteria central de la oreja y se recogieron en citrato sódico 3,8% (1:10).

En los cerdos del *estudio con estatinas*, se practicó una determinación basal (día 0), una serie de determinaciones periódicas a lo largo del periodo de dieta y tratamiento (día 28, 50, 85, 100, 135), y la última el día anterior al sacrificio (día 100 ó 150). Tras un ayuno nocturno de 12 horas, los animales se sedaron con una administración intramuscular (i.m.) de azoperona (8 mg/kg, Stressnil ®, Esteve), seguida de un bolo de tiobarbital sódico (10 mg/kg, B. Braum) i.v., y la sangre se recogió en citrato sódico 3,8% (1:10) y/o en EDTA (1:13) por punción de la arteria femoral o vena marginal auricular, según el volumen a extraer.

En los tres estudios se realizaron varias determinaciones a partir de sucesivas muestras sanguíneas obtenidas a lo largo del procedimiento experimental de trombosis

(circuito extracorpóreo *ex vivo*). En el caso de tratamiento agudo, se diferenciaron dos tipos de muestras: basales y post-tratamiento, dependiendo si éstas se obtenían antes o después de la administración del fármaco. La sangre se recogió en citrato sódico a partir de un cateter situado en la arteria carótida.

Los parámetros bioquímicos y de coagulación, los niveles de FFR-rFVIIa en plasma y las lipoproteínas plasmáticas se determinaron en plasma obtenido por centrifugación de la sangre total a 1.200 g durante 15 minutos. Todas las determinaciones se realizaron con plasma fresco, excepto en el estudio de los niveles de FFR-rFVIIa, donde éste se guardó congelado a -80°C .

RECUESTO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

El recuento de las células sanguíneas se realizó con un contador automático (System 9000, Serono) a partir de sangre total anticoagulada con citrato. Este instrumento basa su medida en la diferencia de conductividad que existe entre las células sanguíneas (hematíes, leucocitos y plaquetas) y el diluyente en que están resuspendidas. De esta manera se determinó el recuento de glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC) y plaquetas (PLT), así como el hematocrito (HTC), la hemoglobina (HGB), el volumen (MCV) y la hemoglobina corpuscular medios (MCH).

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Las determinaciones bioquímicas se realizaron con un autoanalizador de química seca (Ektachem, Kodak) a partir de muestras de plasma (anticoagulado con citrato o EDTA). Este aparato trabaja con unas placas que contienen los reactivos necesarios para que se produzca una reacción colorimétrica al añadir suero o plasma. A continuación, determina la absorbancia producida que se traduce en concentración del parámetro mediante una curva patrón que se encuentra previamente establecida.

Se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos en todos los estudios: alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatinina, nitrógeno ureico plasmático (BUN) y proteínas plasmáticas totales. Además, en los estudios con estatinas donde se utilizó modelo hiperlipémico se determinaron: colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos.

COAGULACIÓN SANGUÍNEA

El fibrinógeno, el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT) se determinaron con un coagulómetro automático (ST4, Diagnostica Stago) en plasma (anticoagulado con citrato). La técnica consiste en incubar muestras de plasma con determinados componentes que inducen su coagulación. El aparato detecta, gracias a unos sensores electromagnéticos, el tiempo que tarda en formarse el coágulo, obteniéndose el resultado bien en segundos, bien en una unidad de concentración si disponemos de una curva patrón.

Para determinar la concentración plasmática de fibrinógeno, se calcula el tiempo que tarda en coagular el plasma (diluido 1:10) al añadir un exceso de trombina (Diagnostica Stago), ya que existe una proporcionalidad entre el tiempo de coagulación y la concentración de fibrinógeno. Mediante una curva patrón realizada con diferentes concentraciones de fibrinógeno (Diagnóstica Stago), es posible expresar el tiempo de coagulación en función de la concentración de fibrinógeno hallada.

El PT permite determinar el nivel de coagulación a través de la *vía extrínseca* o *vía del TF*. La determinación del PT se efectúa añadiendo TF (tromboplastina hística; Diagnostica Stago), inductor de esta vía, y cloruro cálcico, que aporta el calcio necesario para la coagulación, al plasma. La coagulación se desencadena por la reacción del factor VII del plasma con el TF exógeno. El tiempo que tarda en coagular el plasma, dependerá de las concentraciones de los factores V, VII, y X, protrombina y fibrinógeno.

Mediante el aPTT se determina el estado de coagulación a través de la *vía intrínseca o por contacto*. Para determinar el aPTT, se agregan al plasma: caolín, que es una sustancia inerte que provoca la activación rápida del sistema de contacto; cefalina, que aporta los fosfolípidos necesarios para la interacción normal de algunos factores de coagulación, y cloruro cálcico (Diagnostica Stago). El aPTT puede prolongarse por déficit de cualquier factor de coagulación, excepto de los factores VII y XIII. Además, es útil para valorar el grado de inhibición de la coagulación mediante heparina. La heparina es cofactor de la antitrombina III (Verstraete M *et al.*, 1990), por lo que su administración prolonga el aPTT.

Durante el experimento de trombosis se monitorizaron los niveles de fibrinógeno, PT y aPTT. La determinación del aPTT sirvió para llevar un control de la heparinización. Para ello, los valores obtenidos de aPTT tras la administración de heparina, se normalizaron respecto al valor basal. Normalmente se alcanza un nivel óptimo de coagulación en el sistema de perfusión extracorpóreo cuando esta relación es menor de 3 (300%). La determinación de fibrinógeno y PT no están influidas por la heparina, ya que los reactivos utilizados llevan un inhibidor específico de éste, de manera que no interfiere en las mediciones.

ACTIVIDAD PROCOAGULANTE DEL FACTOR TISULAR CIRCULANTE

En el *estudio con FFR-rFVIIa* se determinó la actividad procoagulante del TF en sangre total. Se analizaron muestras basales y tras la administración sistémica de FFR-rFVIIa. Además, se testaron muestras donde se aplicó FFR-rFVIIa *in vitro*. Este procedimiento consiste en obtener un extracto de restos de membranas celulares y vesículas contenidas en la sangre, mediante lisado y ultracentrifugación. A partir de este extracto, donde está contenido el TF, se realiza un test de actividad de TF añadiendo los factores de coagulación y otros componentes necesarios para que lleve a cabo la reacción (*etapa de iniciación de la vía del TF*). El nivel de actividad se determina mediante una reacción colorimétrica, que se mide por espectrofotometría.

Obtención de Extractos a partir de Sangre Total

Se obtuvo sangre anticoagulada con citrato, y una parte fue procesada para obtener plasma. La sangre total se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta su procesamiento. Los extractos se obtuvieron como se explica a continuación:

100 μl de sangre total se sometieron a dos ciclos de congelación (nitrógeno líquido) y descongelación (T.A.), seguidamente se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Se mezclaron 100 μl de muestra con 900 μl de TBS-EDTA 0,1 M y se ultracentrifugaron durante 15 minutos a 436.000 g (4°C) (Rotor TLA 130, Optima Max Beckman). Se eliminó el sobrenadante y el precipitado, formado por restos de vesículas y/o membranas celulares, se resuspendió en 1000 μl de TBS-EDTA 0,1 M y se ultracentrifugó, este procedimiento se realizó dos veces. El precipitado obtenido se resuspendió en 1000 μl de HBSA y nuevamente se ultracentrifugó. Finalmente, se resuspendió en 100 μl (extracto de sangre) de HBSA.

Tratamiento *in vitro* de los Extractos

Un grupo de extractos obtenidos a partir de sangre basal fue tratado con FFR-rFVIIa. A una porción de cada muestra se le adicionó HBSA (control), y a otra una dosis de fármaco equivalente a 0,0125 mg/ml de sangre total, se incubó a T.A. durante 5 minutos y a continuación se determinó su actividad procoagulante.

Determinación de la Actividad Procoagulante del Factor Tisular

Esta técnica reproduce la *etapa de iniciación* de la *vía del TF* mediante la adición de vesículas de fosfolípidos, que sirven de soporte de la reacción; calcio, indispensable para la activación de los factores de coagulación; extractos de sangre, que contienen TF; factor VIIa, que forma un complejo con el TF; y factor X, que es el sustrato del complejo factor VIIa-TF. La reacción da lugar a factor Xa como producto final. Para medir la producción de factor Xa se añade un sustrato cromogénico

específico de este factor, que tras reaccionar con éste produce color cuya intensidad es proporcional grado de actividad procoagulante. El proceso seguido fue el siguiente:

Se adicionaron 20 μ l de vesículas de fosfatidilserina:fosfatidilcolina 500 μ M (30:70) (Sigma), 20 μ l de cloruro cálcico 25 mM a 20 μ l de extracto. Tras agitar, se añadieron 20 μ l de factor VIIa 20 nM (Calbiochem), se incubó en agitación durante 15 minutos (T.A.). Seguidamente se adicionaron 20 μ l de factor X 1,5 μ M (Calbiochem) y nuevamente se incubó durante 15 minutos. La reacción se paró añadiendo 50 μ l de TBS-BSA 0,1%-EDTA 300 μ M. A continuación se añadieron 25 μ l de substrato cromogénico del factor Xa 0,01 mUI/ml (Sigma). Se incubó durante 15 minutos a 37°C y se determinó la absorbancia a 405 nm.

NIVELES PLASMÁTICOS DE FFR-rFVIIa

A partir del plasma obtenido a lo largo del procedimiento experimental del estudio con FFR-rFVIIa, se analizaron los niveles plasmáticos de FFR-rFVIIa. Las determinaciones se realizaron en el laboratorio de donde procedía este fármaco (NovoNordisk, Dinamarca), con la que se colaboró en la realización de este estudio (Mirella Ezban).

El FFR-rFVIIa se determinó mediante la técnica de ELISA tipo sandwich (*kit* EIA para detectar FVII, Dako), según las instrucciones de la casa comercial. Ésta técnica utiliza un anticuerpo monoclonal contra FVIIa humano, que también reconoce FFR-rFVIIa, que se encuentra fijo en una fase sólida y a él se unen las moléculas de FFR-rFVIIa contenidas en el plasma. Al añadir seguidamente, un segundo anticuerpo contra FFR-rFVIIa (policlonal de conejo), que se enlaza la zona de FFR-rFVIIa expuesta, se forma un complejo anticuerpo-FFR-rFVIIa-anticuerpo. Posteriormente, se hace reaccionar con un anticuerpo anti-conejo unido a peroxidasa, que reconoce al segundo anticuerpo contra FFR-rFVIIa. Finalmente, la peroxidasa reacciona con su substrato y se produce una reacción colorimétrica, cuya intensidad se mide mediante un espectrofotómetro.

LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

La determinación de las lipoproteínas plasmáticas se realizó en los cerdos del *estudio con estatinas*. Se obtuvieron muestras de sangre en EDTA periódicamente a lo largo de todo el periodo experimental. Se empleó el método validado por el *Lipid Research Clinic Program* (Lipid Research Clinic Program, 1974). Éste es un método que combina dos propiedades de las lipoproteínas: a) la diferencia de densidad para aislar las VLDL mediante ultracentrifugación y b) la precipitación de las lipoproteínas que contienen la apoproteína B-100 (sobre todo LDL) mediante reactivos determinados (ácido fosfotúngstico o polietilenglicol). Se procedió de la siguiente manera:

En un tubo para ultracentrífuga (Beckman) se dispensaron 2,4 ml de plasma y cuidadosamente se añadieron 1,6 ml de solución salina, obteniéndose así 2 fases diferenciadas. Posteriormente, se centrifugó a 105.000 g en una ultracentrífuga (L-60, rotor SW60, Beckman) durante 18 horas. Inmediatamente, se recogió con precaución la banda superior de color blanquecino, correspondiente a las VLDL (fracción 1, f_1); se determinó su volumen (Vol_1), así como la concentración de colesterol mediante un kit comercial (Medical Diagnostics). Tras la homogeneización del infranadante restante (f_2), también se determinó su concentración de colesterol. Un volumen de 500 μ l de esta mezcla se homogeneizó con una solución 20% PEG 8.000 (1:1), se dejó reposar durante 30 minutos y se centrifugó durante 30 minutos a 5.000 g. Mediante este procedimiento se obtuvo un precipitado blanquecino correspondiente a las LDL, y un sobrenadante donde se encontraban las HDL, este sobrenadante (f_3) se recogió y se determinó la concentración de colesterol (Figura 4). Finalmente, se calcularon las concentraciones plasmáticas de colesterol contenido en cada tipo de lipoproteína mediante las siguientes fórmulas:

$$VLDL = (f_1) \times Vol_1 / 2,4$$

$$HDL = (f_3) \times 2 \times (4 - Vol_1) / 2,4$$

$$LDL = [(f_2) \times (4 - Vol_1) / 2,4] - HDL$$

Para validar el método, se comprobó que la suma de las tres fracciones fuera equivalente al colesterol total ($\pm 10\%$).

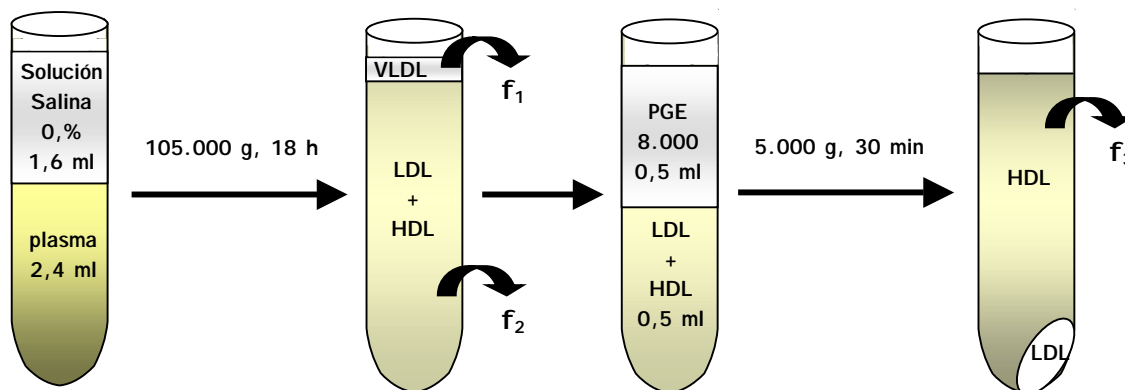


Figura 4. Esquema representativo del protocolo de obtención y determinación de las fracciones lipoproteicas (VLDL, LDL y HDL).

AGREGACIÓN PLAQUETAR *EX VIVO*

Los estudios de agregación se realizaron en sangre total mediante un agregómetro de impedancia, y en plasma rico en plaquetas (PRP) mediante un agregómetro óptico, a partir de sangre anticoagulada con citrato. Esta técnica consiste en la adición al PRP o sangre, de diferentes concentraciones de agonistas que activan la agregación plaquetaria, así mientras algunos actúan a través del receptor GP IIb-IIIa, tales como colágeno, ADP, trombina o ácido araquidónico (Galvez A *et al.*, 1986), otros como la botrocetina, lo hacen a través del GP Ib (Read MS *et al.*, 1989). De esta manera se pueden evaluar diversas vías de activación plaquetaria.

El agregómetro de impedancia se basa en la diferencia de conductividad que se produce entre dos electrodos sumergidos en sangre total cuando se activa la agregación. Esta conductividad se registra, de manera que se obtiene una curva que presenta un máximo, que es la agregación máxima (en ohmios); una pendiente, que indica la velocidad con la que agregan las plaquetas y un tiempo de latencia desde que se añade

el agonista. El principio del agregómetro óptico es prácticamente el mismo que el de impedancia, pero en vez de conductividad, registra cambios en la transmisión de la luz que se producen cuando las plaquetas contenidas en PRP se agregan (Figura 5).

La agregación plaquetar ex vivo se determinó en los *estudios con FFR-rFVIIa y con estatinas*, y se procedió como se explica a continuación:

- **Agregación en sangre total:** una vez obtenida la sangre, el hematócrito se ajustó al 20% con solución salina y se repartió en alícuotas de 1 ml, que se mantuvieron a 37°C. Se indujo agregación plaquetaria añadiendo colágeno a las siguientes concentraciones: 3, 5, 10 µg/ml.
- **Agregación en PRP:** se obtuvo PRP centrifugando la sangre a 320 g durante 10 minutos. El número de plaquetas se ajustó a $3 \times 10^5/\mu\text{l}$ diluyendo el PRP con plasma, este se repartió en alícuotas de 500 µl que se mantuvieron a 37°C. A continuación se añadieron diversas concentraciones de ADP (5, 10, 20 µM) y de colágeno (3, 5, 10 µg/ml).

En ambos ensayos se registró la agregación máxima o la detectada a los cinco minutos, la pendiente de la agregación y el tiempo de latencia.

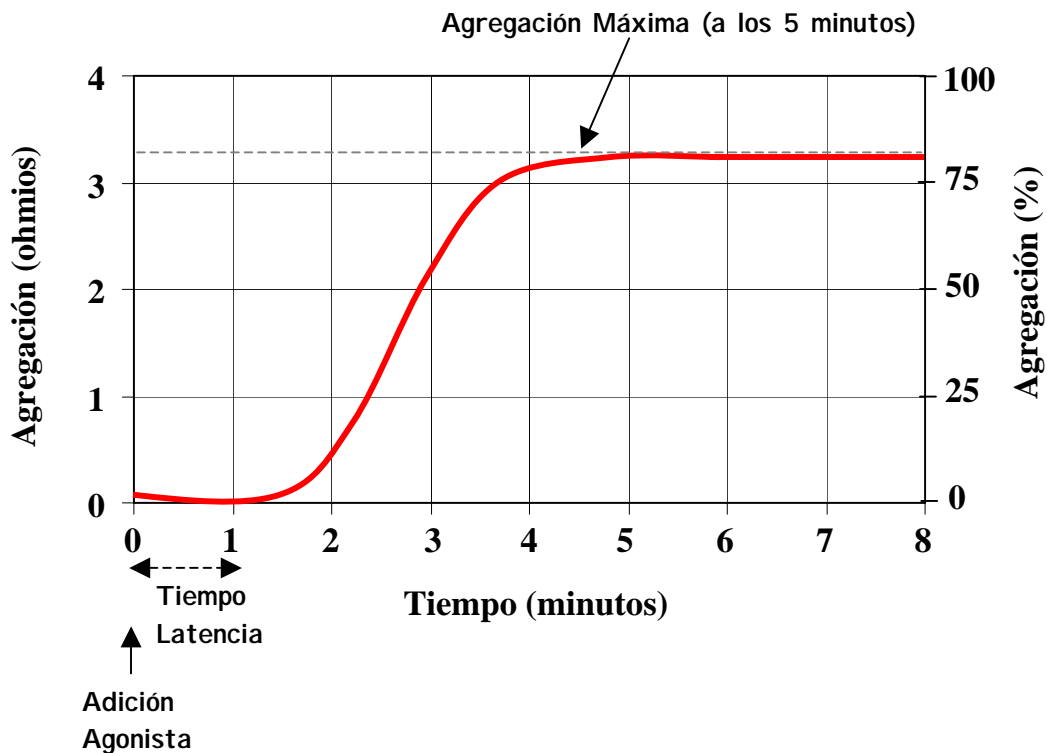


Figura 5. Gráfico representativo de la curva obtenida en el agregómetro tras la adición del agonista plaquetario. La agregación máxima (ohmios para sangre total, % para PRP) corresponde a la zona más elevada de la curva a los 5 minutos (recta discontinua), el tiempo de latencia es el intervalo de tiempo entre la adición del agonista y el inicio de la formación de la curva (flecha discontinua), y la pendiente mide la inclinación máxima de la esta.

ESTUDIO DEL TROMBO FORMADO SOBRE PARED VASCULAR LESIONADA

Para evaluar el efecto de los diferentes fármacos estudiados sobre la trombosis, se estudió la deposición plaquetaria al perfundir sustratos vasculares en una cámara de perfusión cilíndrica (Badimon L *et al.*, 1987). Con el fin de cuantificar el número de plaquetas que se depositan, previamente se aísla una muestra de plaquetas de sangre del animal, se marcan con un isótopo radiactivo y se reinyectan. La medición de la radiactividad en el sustrato y su posterior análisis, permite valorar la deposición inducida en condiciones determinadas, tales como al realizar un tratamiento farmacológico, al modificar la trombogenicidad del sustrato o la velocidad de cizalladura.

En los conejos se evaluó la deposición plaquetar sobre un trombo preformado sobre un substrato vascular, como modelo de trombosis secundaria (residual), para ello se perfundió sangre con plaquetas no marcadas radiactivamente procedente de un animal sano (inductor), y posteriormente sangre con plaquetas marcadas de un animal tratado o placebo (Meyer B *et al.*, 1994).

SUBSTRATOS VASCULARES

La pared vascular se utiliza como desencadenante de la deposición plaquetar (trombo). En el caso de la pared vascular normal se utilizaron dos modelos de lesión arterial: lesión ligera (erosión vascular), que tiene una reducida trombogenicidad e induce poca deposición plaquetaria; y lesión severa (rotura vascular), mucho más trombogénica que la anterior e induce una gran deposición de plaquetas en su superficie. Además, se utilizó pared vascular aterósclerótica como modelo de lesión (severa) más próximo a las situaciones clínicas. En los tres estudios realizados se utilizaron varios tipos de substratos vasculares:

1. *Estudio con Inhibidor del Factor Tisular, FFR-rFVIIa*: debido a que el contenido en TF está aumentado en las lesiones ateróscleróticas, en este estudio se emplearon dos tipos de substratos vasculares: aortas de cerdos normales, como modelo de pared vascular no aterósclerótica, y aortas humanas, que contenían lesiones ateróscleróticas avanzadas, como modelo de pared vascular aterósclerótica.
2. *Estudio con Inhibidores de la Ciclooxygenasa*: se utilizaron aortas de conejos como modelo de lesión ligera. Debido a que la pared vascular de las aortas de conejo era muy delgada y era prácticamente imposible eliminar la capa subendotelial, procedimiento necesario para obtener lesión severa (ver más adelante en este apartado), se utilizaron aortas de cerdo como modelo de este tipo de lesión.
3. *Estudio con Inhibidores de la HMG-CoA reductasa*: se emplearon aortas de cerdo, como modelo pared vascular lesionada ligera y severamente.

Las aortas de cerdo y de conejo se recogieron en mataderos locales en el momento del sacrificio de los animales, y las humanas se obtuvieron a partir de autopsias. Una vez obtenidas, se mantuvieron en PBS, se limpiaron y se eliminó la capa adventicia. A continuación se cortaron en segmentos de aproximadamente 3 cm de largo y se congelaron a -20°C hasta el experimento, en el caso de aortas ateroscleróticas las lesiones se caracterizaron macroscópicamente. El día del experimento se descongelaron en PBS, se abrieron longitudinalmente y se cortaron en segmentos de 1 cm de ancho.

El modelo de lesión ligera se obtuvo al exponer la superficie de la arteria a la circulación sanguínea, esta estructura se denomina subendotelio ya que las células endoteliales han sido destruidas mediante el proceso de congelación (pared vascular deendotelizada o erosionada). El modelo de lesión severa se consiguió exponiendo la túnica media del vaso, para ello se separó la capa subendotelial con la ayuda de unas pinzas (Badimon L *et al.*, 1987, Badimon JJ *et al.*, 1991).

Tratamiento Local de la Pared Vascular con FFR-rFVIIa

En el estudio del efecto local del FFR-rFVIIa, los substratos vasculares de cerdo y humanos (subendotelio y túnica media) fueron incubados con una solución del fármaco (2 mg/ml) durante 5 minutos a T.A..

MARCAJE DE PLAQUETAS

El $^{111}\text{Indio}$ (^{111}In) se emplea de forma habitual para el marcaje radiactivo de plaquetas (Hawker RJ *et al.*, 1978) y otras células sanguíneas, como leucocitos (Doherty PW *et al.*, 1978) y granulocitos (Weibler BJ *et al.*, 1979). El marcaje de plaquetas se ha aplicado a la detección *in vivo* de trombos vasculares (Goodwin DA *et al.*, 1978) y para el análisis de la cinética plaquetar (Heaton WA *et al.*, 1979). En este trabajo se utilizó la oxina como quelante transportador del ^{111}In . El marcaje de células aisladas con ^{111}In se basa en que al mezclar una solución de ^{111}In -oxina con las células, este complejo, que es lipófilo, atraviesa la membrana celular. Posteriormente, se produce una reacción en la

oxina se libera y el ^{111}In firmemente enlazado a las estructuras intracelulares (Thakur ML *et al.*, 1977). El marcaje de las plaquetas se realizó el día anterior al experimento de trombosis para permitir una completa biodistribución de las plaquetas marcadas (Badimon L *et al.*, 1986). Se procedió de la siguiente manera:

Se extrajo sangre (cerdos <50 kg, 43 ml; cerdos >50 kg, 86 ml; conejos, 13 ml) en ACD-Anticoagulante (7:50). Se obtuvo PRP (ver apartado *Agregación Plaquetar ex vivo*) y se centrifugó (15 minutos, 1.200 g) para separar el plasma sobrenadante del precipitado las plaquetas. Las plaquetas se lavaron 2 veces con ACD-Salino (15 minutos, 1.200 g), y la suspensión en ACD-Salino se incubó con ^{111}In -oxina (Amersham) (10-12 $\mu\text{Ci/kg}$ de peso corporal del animal) durante 20 minutos (T.A.). Se determinó la dosis (dosis 1, d_1) en un dosímetro (Atomlab 100, Biodex) y posteriormente se centrifugó (800 g, 10 minutos) para obtener las plaquetas marcadas. El precipitado de plaquetas se resuspendió en plasma, se realizó el recuento de plaquetas y se midió la dosis de radioactividad (d_2). Finalmente, la suspensión se inyectó por la vena marginal de la oreja del animal. Para verificar el grado de marcaje de las plaquetas, se realizaron las siguientes determinaciones:

- 1) Eficiencia del marcaje (%) = $d_2/d_1 \times 100$.
- 2) Viabilidad de las plaquetas (porcentaje de radiactividad unida a plaqueta): a 480 μl de solución salina se agregó 20 μl de la suspensión de plaquetas marcadas y se separó el sobrenadante del precipitado mediante centrifugación (3 minutos, 13.000 g). Se determinó la radiactividad (como cpm) presente en el precipitado (r_{pellet}) y en el sobrenadante (r_{sn}) con un contador gamma (Wizard, Wallac).

$$\text{Viabilidad (\%)} = [r_{\text{pellet}} / (r_{\text{pellet}} + r_{\text{sn}})] \times 100$$

DETERMINACIÓN DE LA DEPOSICIÓN PLAQUETAR

Tras mantener los animales en ayuno nocturno, los cerdos se tranquilizaron con azoperona (8 mg/kg i.m., Stressnil ®, Esteve), seguidamente se les anestesió mediante

un bolo de tiobarbital sódico (10mg/kg, B. Braum) i.v., y a lo largo del procedimiento experimental se mantuvo una infusión de este anestésico diluido en suero fisiológico (6-8 mg/kg/h). Los conejos se anestesiaron con una mezcla de ketamina (35 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) administrada i.m., a lo largo del procedimiento se les fue administrando dosis adicionales según necesidad. La vena yugular y la arteria carótida contralateral fueron canuladas con tubos de polietileno de calibre adecuado para impedir la activación de la agregación plaquetar. A los animales se les inyectó un bolo i.v. de 50 U/kg de heparina (Liquemine ®, Roche), que en los cerdos se siguió de una infusión de 50 U/kg/hora, ya que el procedimiento era más largo. Estas dosis impiden la activación de la coagulación en el sistema extracorpóreo sin modificar significativamente la deposición plaquetar (Badimon L *et al.* 1986). Se estableció un circuito arteriovenoso con tubos de silicona y una bomba peristáltica (Masterflex, modelo 7518-10) a una velocidad de 10 ml/min (ver Figura 6).

Se emplearon dos tipos de cámaras de perfusión en las cuales se colocaron los substratos vasculares. Las características de estas cámaras se resumen en la Tabla 1. En el estudio con estatinas, se modificó la cámara de perfusión original con la intención de obtener un modelo de estenosis similar a las descritas en coronarias humanas. A la cámara de 0,2 cm de anchura de canal se añadió un fragmento de goma para obtener una protuberancia constante en el interior del canal de 4,5 mm de longitud y 60-70% de reducción de la luz del canal, una vez colocado el substrato (Badimon L & Badimon JJ, 1989) (Figura 7). En este modelo, la velocidad de cizalladura no es constante a lo largo del canal, ya que se produce una reducción de su luz. En la zona de estenosis la velocidad de cizalladura es mucho mayor que en las zonas proximal y distal. Además, a diferencia del modelo con diámetro de canal constante donde las líneas de flujo son paralelas y el flujo laminar, en el modelo de estenosis se producen anomalías del flujo y las líneas de flujo no son paralelas en todo el recorrido del canal.

Cámara	Longitud del canal (cm)	Anchura del canal (cm)	Área del canal (cm ²)	Velocidad de cizalladura (seg ⁻¹)*
1	2,5	0,1	0,25	1700
2	2,5	0,2	0,50	212

Tabla 1. Dimensiones y propiedades reológicas de la cámaras de perfusión empleadas. * Ref: Badimon L *et al.*, 1987.

El sustrato vascular se colocó en el interior de la cámara, y ésta en un baño a 37°C, a continuación se perfundió la sangre durante 5 ó 10 minutos. Antes y después de perfundir la sangre sobre el sustrato, se perfundió PBS (60 segundos) con el fin de eliminar aquellas células que no estuvieran firmemente adheridas a la superficie vascular. En los experimentos en que se trataron los sustratos localmente con FFR-rFVIIa se utilizó Tyrode buffer en vez de PBS, para asegurar el aporte de calcio necesario para la función de este compuesto.

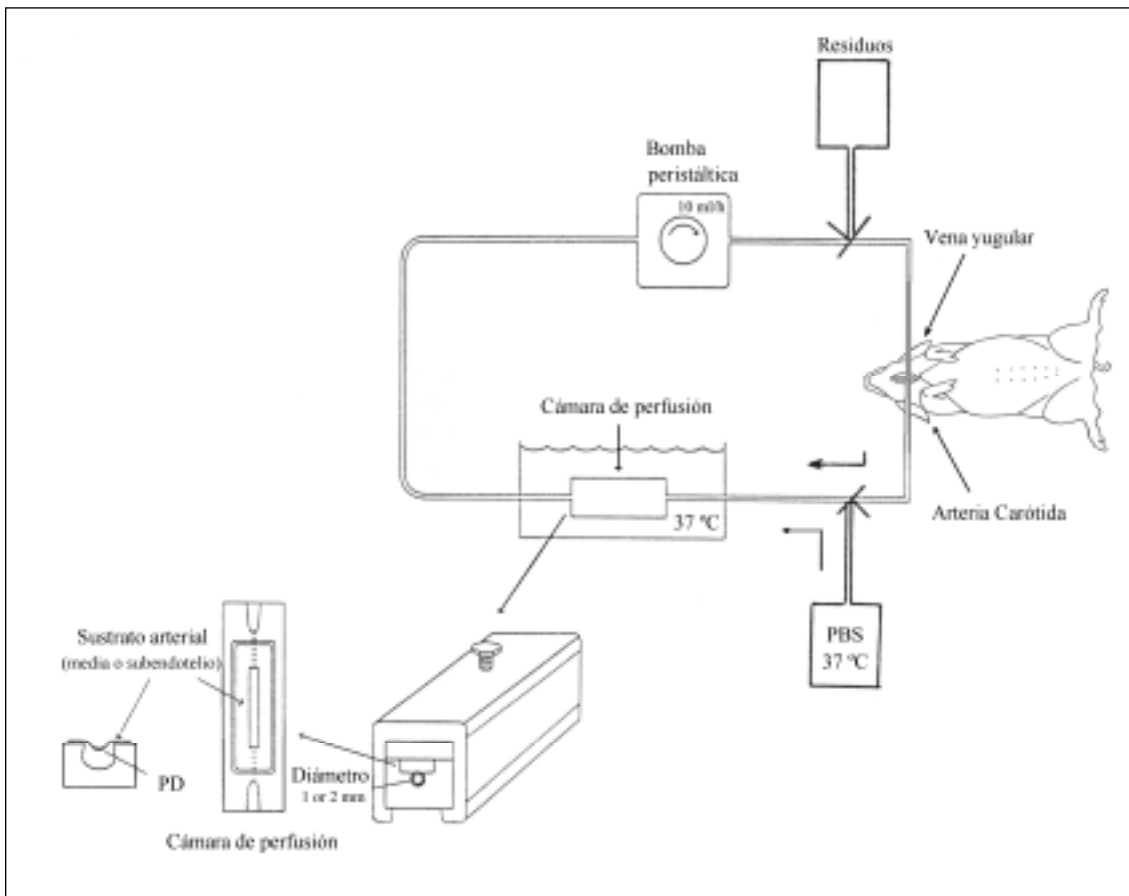


Figura 6. Representación esquemática la cámara de perfusión y del circuito extracorpóreo en el cerdo. El sustrato vascular (10 x 30 mm) se coloca en la cámara de perfusión, ésta se coloca en un baño atemperado a 37°C y se conecta mediante tubos de silicona y polietileno a la arteria carótida y a la bomba peristáltica. La sangre sale succionada por la bomba a velocidad constante (10 ml/min) y pasa primero por la cámara; a continuación se recircula al animal por la vena yugular. Antes y después de perfundir la sangre se lava el circuito con PBS, el cual se desecha. Al finalizar la perfusión se extrae el sustrato vascular con cuidado y se determina la radiactividad. Deposición plaquetaria, PD.

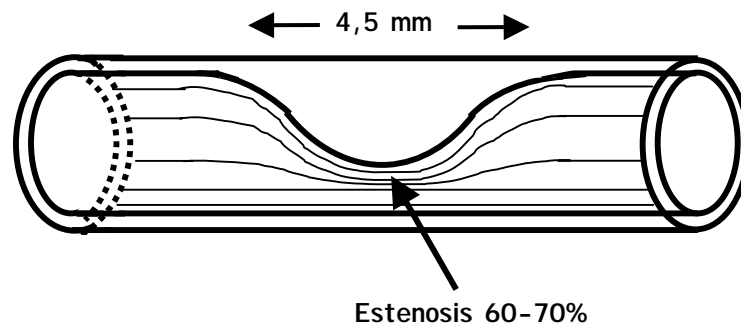


Figura 7. Diagrama de una sección longitudinal de un substrato vascular montado en la cámara Badimon de 0,2 cm de diámetro de canal, con estenosis de 60-70%. Las líneas de flujo aparecen representadas y se observa la pérdida de paralelismo debido a la estenosis.

En el estudio realizado en conejos, donde se estudió la trombosis desencadenada por un trombo preexistente (secundaria), en primer lugar los substratos fueron perfundidos por sangre del animal inductor, cuyas plaquetas no estaban marcadas radiactivamente, para formar el trombo primario. Una vez finalizada la primera perfusión, y tras el lavado con PBS, se llevó a cabo una segunda perfusión con sangre del animal tratado/control, con plaquetas marcadas, con el fin de formar el trombo secundario inducido por el trombo preexistente. Además de la trombosis secundaria, en el grupo control se realizaron perfusiones sobre pared vascular (trombosis primaria) para estandarizar el método (Figura 8).

Una vez finalizada la perfusión, los substratos se fijaron en paraformaldehído 4% y se determinó la radiactividad presente en el substrato mediante un contador de radioactividad gamma (Wizard 1470, Wallac). Periódicamente se tomaron muestras de sangre en las que se determinó el recuento plaquetar (PLT/ml), la actividad (cpm/ml) y la lisis de plaquetas. Para determinar cambios en los niveles de radiactividad unida a plaqueta, se centrifugó un pequeño volumen de sangre (500 μ l) durante 3 minutos a 13.000 g y se separó el sobrenadante del precipitado, y se calculó la proporción de plaquetas no lisadas (viabilidad) según la fórmula descrita en el apartado de *Marcaje de Plaquetas*. Al concluir todas las perfusiones los animales se sacrificaron con una sobredosis i.v. de tiobarbital sódico o KCl (2 M).

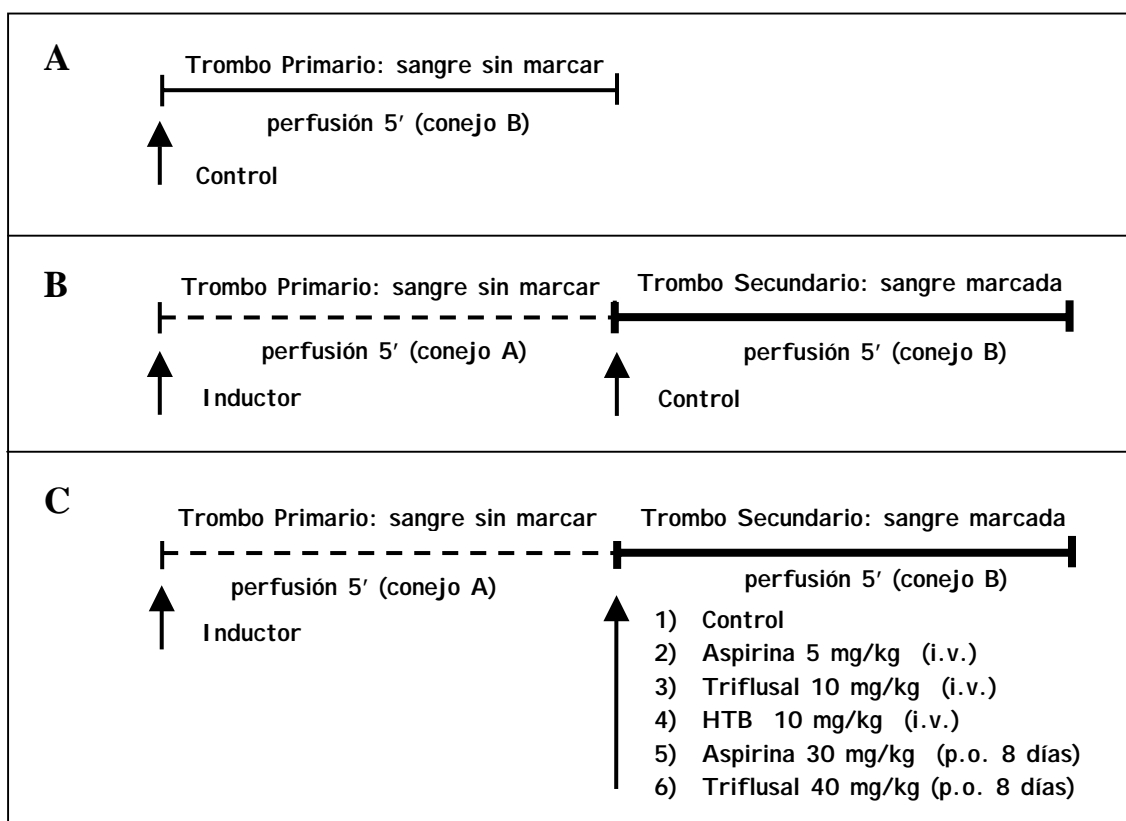


Figura 8. Representación esquemática del crecimiento del trombo inducido por la presencia de un trombo primario. Los esquemas A y B se refieren a los protocolos realizados en el grupo control (placebo), donde se estudió la trombosis desencadenada por sustratos vasculares (primaria) a los 5 minutos (A), así como la trombosis desencadenada por un trombo preexistente (secundaria) (B). En el esquema C se muestra el protocolo de trombosis secundaria en los grupos de tratamiento.

El recuento radiactivo de los sustratos vasculares se normalizó teniendo en cuenta la radiactividad en sangre y el recuento de plaquetas del animal específico: si conocemos el recuento de plaquetas (PLT/ml) y la actividad en sangre (cpm/ml) podemos averiguar las plaquetas por unidad de actividad (PLT/cpm). De este valor se resta la radiactividad que no proviene de las plaquetas (por lisis de éstas). Este dato se traslada a la actividad obtenida en el sustrato (cpm) por lo que obtenemos el número total de plaquetas (PLT). Finalmente, se divide este valor entre el área del sustrato (cm^2) que se expone a la circulación sanguínea, obteniéndose finalmente el resultado en número de plaquetas por unidad de superficie (PLT/cm^2).

Para obtener una mayor información sobre la deposición plaquetar se determinó su dependencia axial, es decir la deposición obtenida a lo largo del sustrato. Para ello, cada sustrato se dividió en cinco secciones: las secciones de entrada y salida, de 2 mm

de longitud cada una, que fueron desechadas, y las secciones a (proximal), b (media) y c (distal), que se contaron por separado. En los substratos perfundidos en cámara de perfusión sin estenosis, se obtuvieron todas las secciones del mismo tamaño, 7 mm aproximadamente (Figura 9A). En cambio, en los substratos perfundidos en cámara con estenosis, los segmentos seriados eran de tamaños diferentes: secciones a y c de 5 mm y sección b de 11 mm (Figura 9B). De esta manera se obtuvo la totalidad del segmento central sometido a estenosis. Tras el recuento radioactivo, la sección b se mantuvo con fijador para su tratamiento posterior.

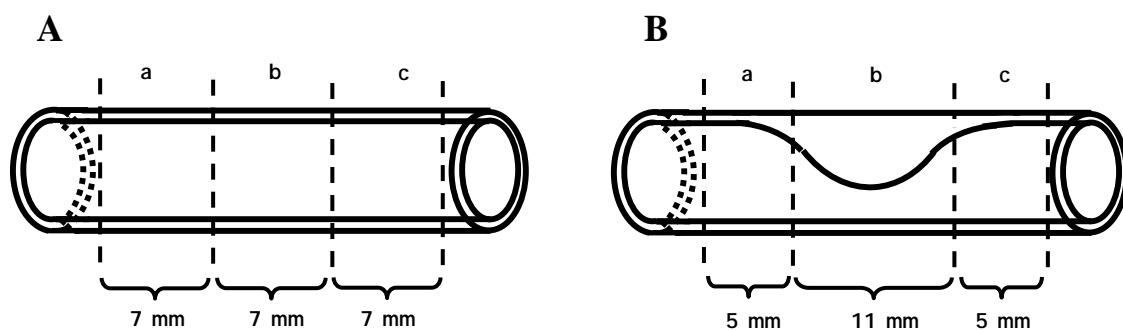


Figura 9. Esquema representativo de los segmentos obtenidos para el estudio de la deposición axial, a partir de substratos vasculares perfundidos en la cámara de perfusión Badimon en condiciones normales (Figura A) y con estenosis (Figura B).

BIODISTRIBUCIÓN DE LAS PLAQUETAS EN EL ORGANISMO

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los siguientes órganos: corazón, bazo, hígado, pulmones y riñones, se pesaron y se determinó la radiactividad (cpm/g) en muestras de los mismos. Asimismo, se determinó la radiactividad en varias muestras de sangre. Para determinar la radiactividad total en sangre se asumió que la volemia era equivalente al 8% del peso del cerdo. Con estos datos se pudo determinar la biodistribución plaquetar en los principales órganos receptores de plaquetas del organismo. Normalmente, las plaquetas se concentran en sangre e hígado; aunque en el bazo también suele haber cantidades significativas. Es importante que la cantidad presente en el pulmón sea baja, pues indica que no se reinyectaron microcoágulos en el sistema circulatorio. En la Tabla 2 se resume los valores medios de biodistribución

obtenidos en todos los animales, donde se puede apreciar que la radioactividad se concentró mayoritariamente en sangre, seguida del hígado y del bazo.

PARÁMETRO	Radiactividad relativa (%)
Corazón	0,14 ± 0,02
Riñón	0,26 ± 0,04
Pulmón	2,7 ± 0,4
Bazo	14 ± 3
Hígado	23 ± 5
Sangre	50 ± 4

Tabla 2. Valores medios de la biodistribución de plaquetas (% de la radiactividad total) en los principales órganos receptores de plaquetas del organismo en todos los animales utilizados en este trabajo.

ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL TROMBO

Como complemento al estudio de deposición plaquetaria, se analizó la composición del trombo mediante inmunohistoquímica. Para ello, se seleccionaron los substratos vasculares en los que la deposición plaquetaria fue equivalente al valor medio \pm 20%. Se procesó la sección central (sección b) y se realizó marcaje de plaquetas y fibrina mediante inmunofluorescencia. Las muestras se procesaron según se describe en el apartado de *Inmunohistoquímica: Preparación de los Especímenes y Marcaje por Inmunofluorescencia*, y se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

Diana	Descripción	Proveedor
Plaquetas	Policlonal (conejo) anti-vWF humano	F3520, Sigma Immunochemicals
Fibrina	Monoclonal (ratón), antifibrina porcina	Cedido por el Dr. Gaffney, NIBSC, Gran Bretaña
Fibrinógeno	Policlonal (conejo) anti-fibrinógeno humano	F9902, Sigma Immunochemicals.

En las muestras de cerdo se realizó una inmunofluorescencia doble utilizando anticuerpos primarios anti-plaquetas (1:50) y anti-fibrina y (1:100). En las muestras de conejo se realizaron inmunofluorescencias simples utilizando anticuerpos primarios

anti-plaquetas (1:50) y anti-fibrinógeno (1:50), para la detección de fibrina, además los trombos se tiñeron mediante la técnica de Tinción de Tricrómico de Masson (ver apartado de *Engrosamiento de la Íntima*) para evaluar su aspecto. En el *estudio con FFR-rFVIIa*, además se cuantificó la fibrina depositada en los substratos con lesión severa, tal como se describe en el apartado de *Análisis de Imagen y Cuantificación de Marcadores*: a partir de cada substrato, se seleccionaron 3 cortes histológicos, de cada uno se tomaron al menos 5 imágenes a 20 aumentos, se midió el área ocupada por la fibrina en cada caso y se calculó el valor medio.

LOCALIZACIÓN FACTOR TISULAR EN EL TROMBO Y EN LA PARED VASCULAR

En el *estudio con FFR-rFVIIa* se inmunolocalizó el TF en las estructuras de la pared vascular (no aterosclerótica) expuestas a la circulación sanguínea y en el trombo. El TF se detectó mediante inmunohistoquímica como se describe en el apartado de *Inmunohistoquímica: Preparación de los Especímenes y Marcaje por Inmuno-Peroxidasa por el Sistema Avidina-Biotina*.

ANÁLISIS DE LA PLAQUETA: EXPRESIÓN DE RHO A ACTIVADO

A partir de plaquetas procedentes de cerdos del *estudio con estatinas*, se realizó el análisis del contenido en proteína Rho A activado (situado en la membrana plaquetaria) mediante la técnica de Western blot, ya que se ha relacionado esta proteína con la funcionalidad plaquetaria.

OBTENCIÓN DE LAS PLAQUETAS

Las plaquetas se obtuvieron el mismo día que se realizó el procedimiento de trombosis *ex vivo*. Se extrajeron 20 ml de sangre en ACD-anticoagulante (7:50). Se obtuvo PRP y se centrifugó (1.200 g, 15 minutos). Tras eliminar el plasma sobrenadante las plaquetas se resuspendieron en ACD-salino. Se procedió a su recuento y posteriormente se repitió la centrifugación (1.200 rpm, 15 minutos). Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo un precipitado de plaquetas.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA: FRACCIÓN DE MEMBRANA

Los niveles de Rho A plaquetario se determinaron en la membrana (Rho A activado). Para obtener esta fracción proteica se procedió de la siguiente manera:

Se añadió 750 μ l de Tampón de Lisis por cada 4×10^6 plaquetas y se agitaron durante 10 minutos a 4°C. Para obtener la máxima disociación de los componentes celulares, la mezcla se sonificó durante 10 segundos tres veces y el homogenizado obtenido se congeló a -80°C durante 20 minutos. Tras la descongelación, las muestras se centrifugaron (4.000g , 5 minutos a 4 °C) para eliminar los restos celulares. Para separar las proteínas de la membrana de las del citoplasma, la mezcla se ultracentrifugó (L-60, rotor SW60, Beckman) a 112.500 g a 4°C durante 1 hora. En el sobrenadante correspondía a las proteínas del citoplasma y el precipitado a las de membrana. Se eliminó el sobrenadante y se obtuvo la fracción de membrana. Para ello, las muestras se disolvieron en tampón de lisis-Tritón 1%, incubando a 4°C en agitación, y centrifugando (1.400 g, 15 minutos, 4°C). Finalmente, se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas de membrana.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RHO A ACTIVADO

Para determinar los niveles de Rho A (peso molecular de 24 kDa) en primer lugar se determinó la cantidad de proteína de cada muestra mediante el método de BCA, después se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (15 %) y finalmente Western Blot, para el cual se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón anti-Rho A humano (Santa Cruz Biotechnology) como anticuerpo primario (1:200) y antiglobulinas de ratón (Dako) como anticuerpo secundario (1:10.000). Estas técnicas se describen en el apartado de *Análisis de Cox, MCP-1 y e-Nos a nivel de mRNA y Proteína en la Pared Vasculare: Análisis de la Proteína*.

EVALUACIÓN DE LAS LESIONES VASCULARES

Para evaluar el efecto de las estatinas sobre el desarrollo de la lesión, en los cerdos tratados con estos fármacos se evaluó el tamaño y composición de las lesiones ateroscleróticas desarrolladas en diferentes zonas del sistema arterial (arteria aorta torácica y abdominal, y arteria coronaria izquierda descendente (LAD)).

VALORACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS LESIONES: EXTENSIÓN DE LA LESIÓN

La valoración macroscópica de las lesiones se realizó mediante la determinación de la extensión de la lesión en varios segmentos de la arteria aorta: segmento central de la aorta torácica (zona de ramas intercostales) y segmento de la aorta abdominal (entre la zona de la bifurcación de las arterias ilíacas y renales). Los segmentos vasculares se fijaron en paraformaldehído 4% durante 6-8 horas. A continuación, se tiñeron con solución de Herxmeheimer, utilizada para la tinción de lípidos (color rojo) (Smith A & Bruton J, 1977). Se procedió como se describe a continuación:

Se extrajeron los tejidos de la solución fijadora, se lavaron con agua del grifo (1 hora), se sumergieron en solución Herxheimer y se dejaron en agitación suave durante 30 minutos. Finalmente, se lavaron varias veces con alcohol 70% hasta que desapareciese completamente el exceso de tinción. Los segmentos vasculares se visualizaron con una cámara de vídeo (SSC-M0370CE, Sony) y mediante un analizador de imagen (Visilog 4.1.5), se determinaron las siguientes áreas: superficie recubierta de lípidos (LS), que es la zona de la lesión y queda teñida de rojo, y superficie total del vaso (ST). La extensión de la lesión se expresó como $(LS/ST) \times 100$ (Figura 10).

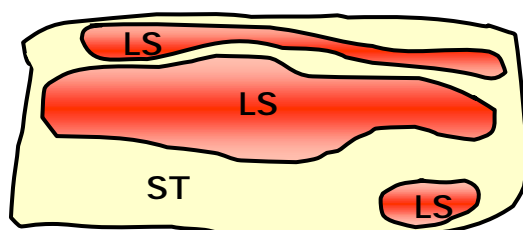


Figura 10. Esquema de la superficie de un fragmento de arteria (ST) con lesiones ateroscleróticas tras tinción con solución de Herxheimer. La zona lesionada aparece en color rojo (LS).

ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA PARED VASCULAR

El tamaño y la composición de la lesión aterosclerótica se determinaron en segmentos de aorta abdominal distal (a nivel de la bifurcación con las arterias ilíacas) y en la LAD (zona proximal).

Preparación de Especímenes

Las muestras se fijaron con paraformaldehído 4% durante 6-8 horas. A continuación se crioprotegieron con solución de sacarosa 30% a 4°C y se incluyeron en OCT Compound (Miles Inc). Se realizaron cortes seriados de 5 μm mediante un criostato (Jung CM 300, Leica), que se depositaron sobre portaobjetos gelatinizados al 1% y 2%.

Engrosamiento de la Íntima

Los cortes depositados sobre portaobjetos gelatinizados (1%) se tiñeron según el método Tricrómico de Masson, a fin de identificar las diferentes estructuras de la pared vascular. Este método se basa en la distinta afinidad de los colorantes (según su carácter ácido o básico) a las proteínas celulares. Así, el colágeno y las células musculares lisas (CML) que abundan en la capa media, se tiñen respectivamente de color azul y rojo, los núcleos de color negro y el endotelio queda poco teñido (Smith A & Bruton J, 1977). Se procedió como se indica a continuación:

Se secaron los portaobjetos a 37°C (15 minutos), se fijaron en solución de Bouin durante 2 horas y se lavaron con agua del grifo. A continuación, los tejidos se tiñeron con tinción Azul Celeste (12 minutos) y se lavaron con agua destilada. Tras esta tinción, se tiñeron con Hematoxilina de Mayer (12 minutos) y se lavaron con agua del grifo hasta la aparición de color azul. Para diferenciar los tejidos se introdujeron durante 30 segundos en alcohol ácido y nuevamente se lavaron con agua del grifo. Después se tiñeron con fucsina ácida (20 minutos) y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, los tejidos se trataron con ácido fosfomolibdico 1% (4 minutos) y se introdujeron en solución de azul de metileno (3 minutos). Se lavaron con agua destilada y se trataron con ácido acético 1% (2 minutos). Se deshidrataron mediante una serie de alcoholes, primero se lavaron con agua destilada, después se sumergieron en alcohol 90% y seguidamente en alcohol absoluto (3 minutos). Finalmente, los cortes se trataron con Histoclear (National Diagnostic) (3 minutos), se secaron y se montaron con Histomount (National Diagnostic).

Una vez teñidos, los cortes se observaron a través de una lupa (SZH10, Olympus) y se determinó el engrosamiento de la íntima arterial mediante un analizador de imagen. Se calcularon las siguientes áreas y longitudes (Figura 11): área de la luz vascular ($a=L$), área envuelta por la elástica interna ($b=L+I$) y área envuelta por la elástica externa ($c=L+I+M$). A partir de estas tres medidas se realizaron los siguientes cálculos:

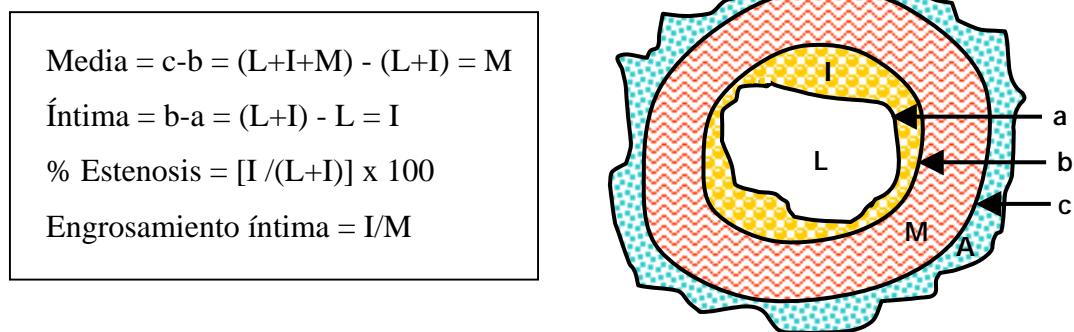


Figura 11. Esquema y cálculos de las áreas determinadas en los vasos estudiados mediante el sistema de análisis de imagen. I, íntima; L, lumen; M, túnica media; A, adventicia.

Contenido Lipídico de la Lesión

A partir de cortes histológicos depositados sobre portaobjetos gelatinizados (1%), se realizó una tinción de lípidos mediante la técnica de tinción Oro, para determinar y cuantificar el contenido lipídico de la lesión. Se procedió de la siguiente manera:

Los tejidos se secaron a 37°C (40 minutos) y se fijaron durante 1 hora en solución formol cálcico. Seguidamente se secaron y se lavaron con isopropanol 60%. Los portaobjetos se sumergieron en solución Oro durante 15 minutos y después se diferenciaron en isopropanol 60% (2 veces durante 1 minuto). Se lavaron con agua destilada y se tiñeron con Hematoxilina de Mayer (3 minutos). Se volvieron a lavar, primero con agua del grifo y después con agua destilada. Finalmente, se secaron con cuidado y se montaron en Glicergel (Dako).

Inmunohistoquímica

Esta técnica se basa en el empleo de anticuerpos mono o policlonales (anticuerpos primarios) que reconocen proteínas (antígenos) específicamente. Estos

anticuerpos reaccionan posteriormente con anticuerpos (policlonales) específicos para cada especie (anticuerpos secundarios) que están conjugados con marcadores. A partir de los marcadores se obtienen señales visibles, haciendo posible la detección de las zonas de unión entre el antígeno y el anticuerpo primario.

Marcaje por Inmunofluorescencia

En este tipo de inmunohistoquímica se utilizan marcadores fluorescentes visibles mediante luz ultravioleta. Como marcadores se utilizaron la fluoresceína (luz verde) y la rodamina (luz roja). Se realizó un marcaje doble para inmunolocalizar fibrinógeno y CML, y un marcaje simple para marcar macrófagos. Para ello, se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Diana	Descripción	Proveedor
Fibrinógeno	Policlonal (conejo) anti-fibrinógeno humano	F9902, Sigma Immunochemicals
CML	Monoclonal (ratón), anti-alfa-actina de CML humanas	M851, Dako
Macrófagos	Policlonal (conejo) anti-proteína <i>pabBp46</i> de monocitos/macrófagos de cerdo*	<i>pabBp46</i> , producido en nuestro laboratorio
Secundario, fluoresceína	Inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con FITC	T1659 Sigma Immunochemicals
Secundario, fluoresceína	Inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con FITC	F0479, Dako
Secundario, rodamina	Inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo conjugadas con TRITC	R156, Dako

* *pabBp46* es una proteína obtenida a partir de monocitos de cerdo que todavía no ha sido identificada (datos sin publicar).

Procedimiento seguido fue el siguiente:

Se secaron los cortes a 40°C (45 minutos) y posteriormente lavaron dos veces con PBS (10 minutos). A continuación, se permeabilizaron los tejidos mediante una con una solución PBS-1% Twen 20 (10 minutos) y se bloquearon con BSA 2% (30 minutos). La incubación con los anticuerpos primarios se efectuó incubando los tejidos

durante 2 horas con una solución BSA 1% con anticuerpos anti-fibrinógeno (1:50) y anti-CML (1:25) en la misma mezcla, en el caso del marcaje doble, o anticuerpos anti-monocitos/macrófagos (1:50), en el caso del marcaje simple. Tras tres lavados con PBS-1% Twen 20 (10 minutos), las muestras se incubaron (1 hora) con los anticuerpos secundarios (en solución BSA 1%) anti-ratón y anti-conejo (1:50) mezclados para el marcaje doble, y anticuerpos anti-conejo (1:50) para el marcaje simple. A continuación, se realizaron cuatro lavados de con PBS (10 minutos). Los cortes secados se montaron en Glicergel (Dako) y se conservaron protegidos de la luz.

Marcaje por Inmuno-Peroxidasa por el Sistema Avidina-Biotina

En los casos en que la inmunofluorescencia no fue suficientemente sensible para detectar el antígeno deseado, se utilizaron técnicas que permiten mayor amplificación de las señales. Se utilizó la ampliación con avidina/biotina y detección por peroxidasa. En esta técnica la detección del antígeno se lleva a cabo mediante una reacción colorimétrica que se produce cuando la peroxidasa, que está unida a la avidina, actúa sobre su substrato. Las señales se visualizaron a través de un microscopio óptico con luz blanca. Con esta técnica se realizó el marcaje simple de TF. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

Diana	Descripción	Proveedor
TF	Policlonal (oveja) anti-TF de conejo	No 4513, American Diagnostic
Secundario, biotina	Inmunoglobulinas de conejo anti-oveja conjugadas con Biotina	BA-5000, Vector Laboratories

El procedimiento se realizó en condiciones similares a las descritas para inmunofluorescencia, con las siguientes modificaciones:

Tras el secado y lavado de los portaobjetos con PBS, se realizó el tratamiento de bloqueo de peroxidasas endógenas, sumergiendo los tejidos en la solución de bloqueo de peroxidasas (30 minutos). Después del bloqueo de las muestras con BSA 2%, se bloqueó la biotina endógena con un kit específico de bloqueo Avidina-Biotina (Vector

Laboratories), incubando con avidina durante 15 minutos y lavando tres veces BSA 1% (5 minutos), y repitiendo el mismo procedimiento con biotina. La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, se realizó con anticuerpos anti-TF (1:50) y anticuerpos anti-cabra (1:200) en solución BSA 1%, respectivamente. Tras la incubación los anticuerpos secundarios y los lavados, los cortes se trataron con la solución “ABC reagent” (Vector Laboratories) kit durante 30 minutos, esta solución contiene avidina unida a peroxidasa, que se une a la biotina del anticuerpo secundario. Después de lavar 3 veces con PBS (5 minutos) las muestras se trataron con diamino bencidina (DAB) diluida 1:10 en el tampón de DAB comercial (Boehringer Mannheim), que es el sustrato con el cual reacciona la peroxidasa, hasta observar un cambio de color de los tejidos. A continuación, los portaobjetos se trataron con alcoholes, solución Histoclear y se montaron con Glicergel (National Diagnostic), tal como se describe en el apartado de *Engrosamiento de la Intima*. En las muestras en las que había mucho marcaje de fondo, se utilizó suero de cabra 10% para el bloqueo y la incubación con anticuerpos.

Análisis de Imagen y Cuantificación de los Marcadores

Todos los cortes de tejido procesados para inmunohistoquímica y tinción de lípidos, se observaron mediante un microscopio binocular de luz transmitida o fluorescencia (modelo Vanox de marca Olympus). La captación de imágenes se realizó mediante una cámara digital en color Sonny 3CCD. Se cuantificó la extensión del área ocupada por cada uno de los marcadores mediante un analizador de imagen acoplado al microscopio (Visilog 4.1.5., Noesis). A partir de 3 cortes histológicos de cada muestra, se tomaron al menos 5 imágenes (en función del tamaño del vaso) por cada corte, a 20 aumentos. En cada imagen, se realizaron las siguientes medidas: el área teñida (a_t) y el área de la íntima visible en la imagen (a_i), la proporción de cada marcador presente en la lesión se calculó como $(a_t / a_i) \times 100$. Finalmente, se calculó la media de los valores obtenidos en cada una de las imágenes para cada muestra. Además se realizó el siguiente cálculo:

- Área Total ocupada por el marcador: $(a_t / a_i) \times \text{Área de la Íntima}$

En los casos en que había una diferencia significativa del tamaño de los vasos (LAD), el área total ocupada por el marcador se normalizó por el área de la media, que teóricamente es un parámetro constante e independiente del tamaño de las lesiones, o al menos lo es cuando las lesiones son tempranas. Este cálculo se realizó como se indica a continuación:

- Área Total ocupada por el marcador / Área de la Media: $\frac{(a_t / a_i) \times \text{Área de la Íntima}}{\text{Área de la Media}}$

ANÁLISIS DE COX, MCP-1 Y eNOS A NIVEL DE mRNA Y PROTEÍNA EN LA PARED VASCULAR

Se estudió la expresión vascular de Cox-1, Cox-2, MCP-1 y eNos, proteínas implicadas en la funcionalidad vascular y en el proceso aterosclerótico, para determinar si estaban afectados por los fármacos. En el *estudio con inhibidores de la Cox*, se evaluaron los niveles de RNA mensajero (mRNA) de las dos isoformas de la Cox (Cox-1 y Cox-2); y de proteína de Cox-2, ya que para Cox-1 (conejo) no se consiguieron anticuerpos específicos. En el *estudio con estatinas* se evaluó la expresión de mRNA de MCP-1, e-Nos, Cox-1 y Cox-2.

RECOGIDA DE TEJIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE RNA Y PROTEÍNA

Para la obtención de mRNA y proteína se utilizó el segmento de la aorta que va desde el cayado hasta la bifurcación de las iliacas, en los conejos; y el segmento de

aorta abdominal comprendido entre la zona de la bifurcación de las arterias ilíacas y la arteria celíaca, en los cerdos. En algunos casos se separó la túnica media (capa inferior) de la capa superior, que contiene la capa íntima y el subendotelio, para analizarlas por separado. Una vez extraídos los segmentos, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, se pulverizaron y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento.

EXTRACCIÓN DE RNA Y PROTEÍNA

La extracción de proteína y RNA se realizó mediante el método de Tripure (Boehringer Mannheim), el cual permite la obtención de RNA y de proteína a partir de una misma muestra de tejido. Este procedimiento se basa en una mejora del método de aislamiento de RNA desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski P, 1993; Chomczynski P & Sacchi N, 1987).

Para evitar la degradación del RNA por RNAsas, en todo el procedimiento se utilizó material estéril, agua autoclavada y tratada con DEPC, y se trabajó siempre con guantes. Se procedió de la siguiente manera:

El tejido se homogeneizó en el reactivo de Tripure (100 mg de tejido en 2 ml de Tripure) con ayuda de un Polytron y seguidamente se eliminaron los restos celulares del tejido mediante centrifugación. Se añadió cloroformo a la mezcla (0,2 ml por ml de Tripure) y se centrifugó, obteniéndose una solución que contenía tres fases: una fase superior acuosa, donde se encontraba el RNA, una interfase, que contenía el DNA, y una fase inferior que contenía la proteína. Una vez separada la fase superior, el RNA se obtuvo mediante precipitación con isopropanol (0,5 ml por ml de Tripure) y lavando con etanol 75%. La proteína se aisló a partir de la fase inferior, mediante eliminación por centrifugación de los restos celulares, seguido de la precipitación de la proteína con isopropanol (1,5 ml por cada ml de Tripure), lavado con hidrocloreuro de guanidinio 0,3 M (2 ml por ml de Tripure) y etanol absoluto. Finalmente, se eliminaron los sobrenadantes en cada caso, y se resuspendió el RNA en agua tratada con DEPC y la proteína en SDS 1%.

ANÁLISIS DEL RNA

El nivel de expresión de Cox-1, Cox-2, eNos y MCP-1 se determinó por RT-PCR. Para ello, el mRNA se convirtió a cDNA, y a partir de éste se llevó a cabo la reacción de PCR de cada gen analizado. Finalmente, el producto amplificado fue cuantificado.

Cuantificación del RNA y Verificación de la Integridad del RNA

Para determinar la concentración del RNA, se midió la absorbancia a 260 nm de 1-2 μ l de la solución acuosa de RNA. Una absorbancia de 1 OD equivale a una concentración aproximada de RNA de 40 μ g/ μ l en la muestra original.

La integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, la cual permite separar el RNA según un gradiente de tamaño. Para ello 0,5-1 μ g de RNA diluidos en tampón de muestras 1x, se cargaron en un gel de agarosa 1% en solución TBE 1x, y se dejaron correr a 100 V. Las bandas de RNA obtenidas se examinaron con un transiluminador de luz ultravioleta (Gel-Doc 1000, Bio-rad). Se observaron las bandas ribosomales 18S y 28S, así como una banda menos intensa correspondiente a RNA de menor tamaño. La ausencia de bandas o la presencia de una cola (*smear*) son indicativas de la degradación del RNA de las muestras.

Amplificación del RNA: RT-PCR

Para detectar del RNA mensajero (mRNA) correspondiente a Cox-1, Cox-2, MCP-1 y eNos, se aplicaron dos técnicas: la transcripción reversa del mRNA (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La primera técnica consiste en convertir el mRNA a cDNA uncatenario mediante el enzima transcriptasa reversa (RT); a continuación se amplifica en varios órdenes la cantidad de cDNA bicatenario mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Transcripción Reversa del mRNA

La conversión del mRNA en cDNA está catalizada por el enzima transcriptasa reversa (SuperScript II Rnase HRT, Life Technologies). Como cebadores se emplearon oligo (dT)₁₂₋₁₈, los cuales se hibridan con las colas poli(A) del extremo 3' que están presentes en la mayoría de los mRNA de las células eucariotas. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Se mezclaron 1-2 µg de RNA, 1 µl de oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) y agua DEPC hasta un volumen final de 12 µl. La mezcla se incubó a 70°C (10 minutos) y a continuación se dejó en hielo. Se añadieron 4 µl de tampón de síntesis de cadena 5X (Gibco), 1 µl de mezcla de nucleótidos dNTP (10 mM), 2 µl de DTT 0,1 M (Gibco) y 1 µl de SuperScript II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Gibco) a cada muestra, y toda la mezcla se incubó a 42°C durante 55 minutos. Finalmente, se incubó a 70°C durante 15 minutos y posteriormente se enfrió en hielo para parar la reacción.

Reacción en Cadena de la Polimerasa: PCR

La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar específicamente cualquier secuencia de DNA a partir de una mezcla de diversas secuencias genómicas. Los componentes principales de la reacción PCR son los oligonucleótidos cebadores sentido y antisentido, la mezcla de nucleótidos y el enzima *Taq* Polimerasa.

La técnica de PCR se basa en la copia de una cadena de cDNA mediante una serie de ciclos repetidos (entre 25 y 40), cada uno de los cuales consta de 3 fases con diferentes temperaturas que permiten la desnaturalización de las cadenas de DNA (95°C), la hibridación de los cebadores (50-60°C) y la elongación de la cadena por la *Taq* Polimerasa (72°C). Una vez amplificado el cDNA se cuantifica y se normaliza en función de la expresión de un gen constitutivo (GAPDH, rRNA ribosomal 18S), para obtener valores comparables. En este trabajo aplicaron dos tipos de técnicas de amplificación de cDNA, que se diferencian fundamentalmente por el sistema de cuantificación del producto amplificado: *PCR semicuantitativa* y *PCR a tiempo real*.

Para la selección de los cebadores se recurrió a la base de datos GeneBank dónde se buscaron secuencias conservadas de los genes estudiados, y se eligieron de diferentes zonas del DNA para obtener un producto de una longitud determinada.

PCR semicuantitativa

Se pusieron a punto las condiciones de PCR para cada uno de los genes evaluados, así como para cada especie estudiada. Las secuencias seleccionadas para los diferentes cebadores utilizados fueron sintetizadas por Gibco y se muestran en la Tabla 3. La descripción de las fases y el número de ciclos aplicados se describen en la Tabla 4.

Especie	Secuencia diana	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
	GAPDH	GTCACCAGGGCTGCTTTTAA	ACGGAAGGCCATGCCAGTGA	652
Conejo	COX-1	TCAATGCCACCTTCATCCGG	ATCCAGCACCTGGTACTTGA	466
	COX-2	TCAGCCACGAGCAAATCCT	GTGATCTGGATGTCAGCACG	282
	GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GCAGGGATGATGTTGTGGGC	265
Cerdo	e-NOS	CCCAGCCAACGTGGAGATCAC	GGACACCACGTCATACTCATCC	889
	MCP-1	CCTTCTGTGCCTGCTGCTCA	GTCAGCACAGATCTCCTTG	215

Tabla 3. Cebadores sentido y antisentido y tamaño del producto esperado.

Fase	Ciclos	Tiempo	Temperatura	Objetivos
1	1	3 min	95°C	Desnaturalización inicial
	GAPDH (conejo y cerdo): 30 COX-1: 35 COX-2: 30 e-NOS: 35 MCP-1:32	45 seg 45 seg 45 seg 1 min 45 seg	95°C	Desnaturalización
2		45 seg 45 seg 45 seg 2 min 45 seg	GAPDH(conejo y cerdo): 56°C COX-1: 56°C COX-2: 56°C e-NOS: 60°C MCP-1: 56°C	Hibridación cebadores
		1 min 30 seg 1 min 30 seg 1 min 30 seg 3 min 1 min 30 seg	72°C	Elongación cadenas
3	1	2 min	72°C	Elongación final

Tabla 4. Condiciones de amplificación por PCR.

Se procedió como se explica a continuación:

En un tubo de PCR se dispensaron 2 μ l de la solución de cDNA, 2,5 μ l de tampón PCR 10x (Gibco), 2,5 μ l de mezcla de nucleótidos dNTP (2 mM), 0,375 μ l de cebador sentido (75 ng/ μ l), 0,375 μ l de cebador antisentido (75 ng/ μ l), 0,125 μ l de Taq Polimerasa (5 U/ μ l) (Gibco) y agua Milli-Q estéril hasta un volumen final de 27 μ l. Una vez preparadas las muestras, se dejaron en hielo hasta el momento de introducir las en el termociclador (Genius, Techne).

Se programaron las condiciones de la PCR en el termociclador, se introdujeron las muestras y se llevó a cabo el procedimiento. Para evaluar el cDNA obtenido mediante la técnica de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2%, la cual permite separar el DNA según un gradiente de tamaño y comprobar que la banda obtenida corresponde a la esperada, así como determinar la intensidad de ésta. Se corrieron 10 μ l de cDNA amplificado en tampón de muestras (6x) en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio 4% a 100 W. La imagen del gel se captó bajo luz ultravioleta y se determinó la intensidad de la banda (Gel-Doc 1000, Bio Rad). Finalmente, los resultados se normalizaron con el estándar interno GAPDH.

PCR a tiempo real

A diferencia de la PCR semicuantitativa, la PCR a tiempo real muestra la cantidad de cDNA que se está amplificando en cada momento. Por ello, además de los cebadores, la Taq Polimerasa y la mezcla de oligonucleótidos, es necesaria una sonda que hibride con el cDNA, y en el momento de la amplificación emita fluorescencia, de manera que a mayor cantidad de producto amplificado, mayor emisión de fluorescencia. Esta sonda, es una secuencia de nucleótidos (sentido, 5'-3') que se hibrida en el segmento de cDNA que se amplifica, en cualquier zona comprendida entre las secuencias de hibridación de los cebadores sentido y antisentido. La sonda tiene unido un fluorocromo (FAM), que se libera y emite fluorescencia en el momento que la Taq Polimerasa accede a la zona de unión de la sonda al cDNA.

Para llevar a cabo la técnica de PCR a tiempo real se utilizaron los reactivos y el termociclador de Applied Biosystem (Abi Prism 7000). Las secuencias de los diferentes cebadores se seleccionaron de manera que el producto final no superase los 100 pb. Tanto las sondas como los cebadores se diseñaron para que se pudiesen aplicar las mismas condiciones de temperatura y tiempo en todos los casos. Las secuencias de los cebadores y de las sondas utilizadas fueron diseñadas con el programa informático Primer Express y se muestran en la Tabla 5. Las secuencias del control interno rRNA 18S no aparecen en esta tabla porque es un producto preparado por la casa comercial (ref. 4319413E).

Especie	Secuencia diana	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Sonda (5'-3')
Cerdo	COX-1	TGCTCATGCGCCTGGTACT	TCGTGCCGTGTTGTAGGT	ACAGTGCGTTCCAAC
	COX-2	TTAGAAGCGTCTATGGTGA CATT	TCTGGGCGAGGCTTTTCTA C	ATGCCATGGAGCTGTATCC TGCCCTT

Tabla 5. Cebadores sentido y antisentido y tamaño del producto esperado.

La descripción de las fases de temperatura y tiempo que se aplicaron se describen a continuación, en todos los casos se realizaron 40 ciclos:

Fase	Ciclos	Tiempo	Temperatura	Objetivos
1	1	10 min	95°C	Desnaturalización inicial
		15 seg	95°C	Desnaturalización
2	40	1 min	60°C	Hibridación cebadores
		30 seg	72°C	Elongación cadenas

Se procedió de la siguiente manera:

Para cada muestra se dispensan 2-4 µl de cDNA, 25 µl de TaqMan PCR Master Mix 2x, 2,5 µl de Sonda TaqMan (250 nM), 1,25 µl de cebador sentido Cox-1 (300 nM) ó 1,6 µl de cebador sentido Cox-2 (300 nM), 1,88 µl de cebador antisentido Cox-1 (300 nM) ó 1,43 µl de cebador antisentido Cox-2 (300 nM), y agua Milli-Q estéril hasta un volumen final de 50 µl. Para la reacción con el estándar interno rRNA 18S, se

añadieron 2-4 μl de cDNA, 25 μl de TaqMan PCR Master Mix 2x, 2,5 μl de mezcla de cebadores rRNA 18S y sonda TaqMan y agua Milli-Q estéril hasta un volumen final de 50 μl . Se dispensaron 25 μl de la mezcla final por pocillo en una placa de 96 pocillos para PCR (Applied Biosystem), de manera que cada muestra se analizó por duplicado. Inmediatamente se tapó la placa con un plástico adhesivo para evitar la evaporación del contenido durante el proceso. Tras la programación de las condiciones de amplificación, la placa se introdujo en el termociclador (Abi Prism 7000, Applied Biosystem) y se dejó correr el programa.

La cuantificación se llevó a cabo determinando el ciclo en el cual comenzaba la amplificación exponencial (C^T), donde el producto de amplificación era proporcional a la cantidad inicial. Un gráfico mostraba la evolución de la amplificación en función de los ciclos, en el que el eje de las “x” correspondía al número de ciclos y el de las “y” a la cantidad de cDNA (nivel de fluorescencia) (Figura 12). Con ayuda del programa informático del termociclador se evaluaron los gráficos que mostraban la amplificación de cada muestra y se determinó la recta de corte de la curva (zona de amplificación exponencial), obteniéndose así las unidades de cuantificación (C^T). Finalmente, los resultados se expresaron normalizados por el estandar interno rRNA 18S.

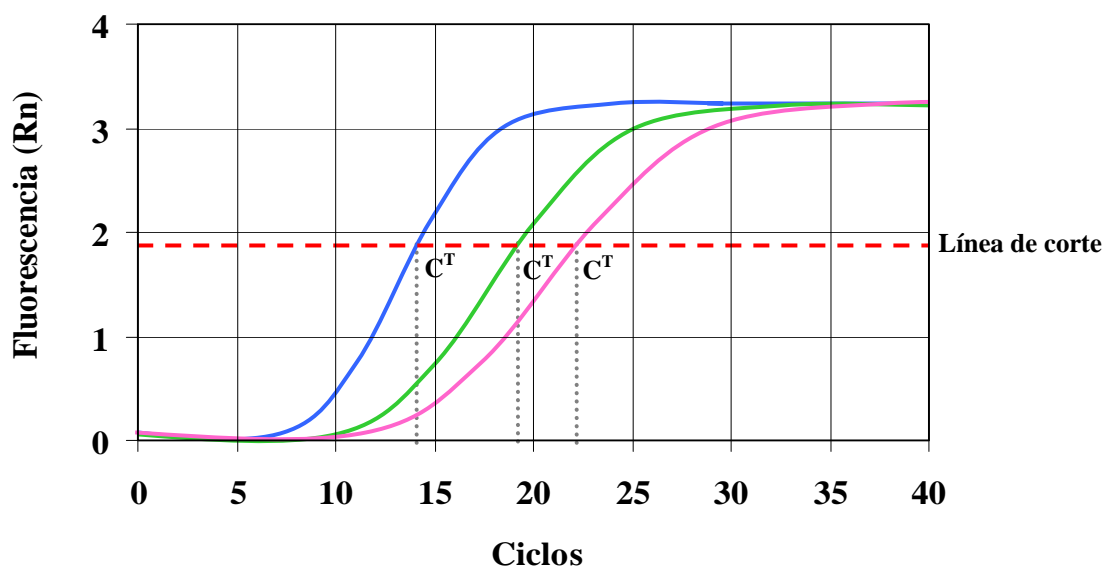


Figura 12. Gráfico representativo que muestra la evolución de la amplificación cDNA en función del número de ciclos (eje de las “x”) mediante la técnica de PCR a tiempo real. La cantidad de cDNA amplificado se mide con fluorescencia (eje de las “y”). La cuantificación se expresa como número de ciclos obtenido a un mismo nivel de fluorescencia (C^T) de los diferentes cDNA amplificados. La línea de corte para determinar el C^T se sitúa en la zona de crecimiento constante de las curvas.

ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA

Los niveles de proteína de Cox-2 se determinaron por Western blot. Para ello las muestras de proteína se corrieron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 7,5% y seguidamente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó con los anticuerpos primarios (anti-Cox-2) y secundarios. Finalmente, la señal se reveló en un film radiográfico.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Las proteínas se separaron mediante electroforesis discontinua en condiciones desnaturizantes, la cual permite separar proteínas en función de su masa molecular. Se utilizó el método descrito por Laemmli UK *et al.* (1970), que consiste en que las proteínas migren a través de un gel concentrador o apilador (superior) y uno separador (inferior). El gel inferior o separador favorece la separación de las proteínas en función de su tamaño. Para el estudio de Cox-2, de 72 kDa, se utilizó un gel de 7,5% de acrilamida para obtener la banda en la zona central del gel. En todos los casos se utilizaron equipos de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, USA), y se procedió como se describe a continuación:

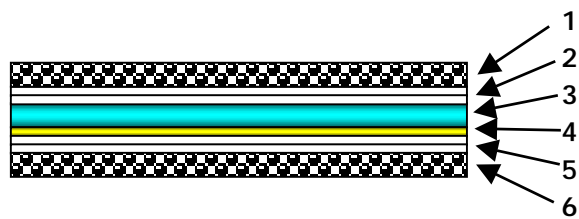
A 25 µg de proteína, cuantificada según el método BCA (Pierce, USA) (Smith PK *et al.*, 1985), se le añadió tampón de aplicación a las muestras (x2) y se incubó a 95°C (5 minutos), para desnaturizar las proteínas. La mezcla se sembró en el gel apilador, y la electroforesis se corrió en tampón de elución a 60 W hasta que el frente pasó al gel de acrilamida 7,5%. Una vez las proteínas se situaron en el gel separador, se aumentó a 100 W hasta finalizar la electroforesis.

Tranferencia a Membrana de Nitrocelulosa

Tras la electroforesis, las proteínas contenidas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Éste procedimiento consiste en aplicar corriente eléctrica de manera que las proteínas migran del gel a la membraba y se unen a ésta por medio de un enlace covalente, que es muy estable. Se procedió como se explica a continuación:

El gel se extrajo cuidadosamente del soporte de electroforesis y se montó el sandwich de transferencia en el cassette apropiado (Mini-protean II, Bio-rad) con las siguientes capas, todas ellas empapadas con el tampón de transferencia:

- 1) esponja
- 2) 2 capas de papel Whatman
- 3) gel de acrilamida
- 4) membrana de nitrocelulosa
- 5) 2 capas de papel Whatman
- 6) esponja



A continuación se cerró el cassette y se colocó en el soporte de transferencia (Mini-protean II, Bio-rad). Se aplicó un amperaje de 0,4 A durante 2 horas y la reacción se realizó a 4°C en tampón de transferencia. Las bandas de proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa se visualizaron con tinción Rojo de Ponceau, de esta manera se confirmó que su distribución a lo largo del gel era correcta y que la cantidad de proteína era similar entre las diferentes muestras.

Western Blot

Los niveles de Cox-2 se determinaron mediante la técnica de Western blot (Twbins H *et al.*, 1979). En este procedimiento, las proteínas transferidas a una membrana de nitrocelulosa son expuestas a anticuerpos (primarios) que se unen

específicamente a una proteína determinada. La reacción se visualiza añadiendo un anticuerpo secundario unido covalentemente a peroxidasa que reconoce al anticuerpo primario. Finalmente, la membrana se expone a una solución que contiene luminol, el cual reacciona con la peroxidasa y como resultado se produce una emisión de luz que será captada en el film radiográfico durante el revelado.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

Diana	Descripción	Proveedor
Cox-2	Policlonal (conejo) anti- Cox-2 humano	P0161, Oxford Biomedical
Secundario, peroxidasa	Inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa	P0217, Dako

El procedimiento seguido fue el siguiente:

La membrana de nitrocelulosa se saturó con solución de bloqueo durante 1 hora y a continuación, se incubó con el anticuerpo primario anti-Cox-2 en agitación (1:5.000 en solución de bloqueo, 1 hora). Se lavó con TBS-Tween (2 lavados de 15 minutos) y con TBS (2 lavados de 15 minutos). Seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario (1:10.000 en solución de bloqueo) en las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Nuevamente se realizaron lavados con TBS-Tween y TBS. Se añadió el reactivo SuperSignal (Pierce), substrato de la peroxidasa, y se incubó durante 6 minutos. Tras eliminar los restos del reactivo y secar la membrana, se colocó sobre un film radiográfico en un cassette de revelado y se dejó contactando durante unos segundos. El film se reveló y se fijó sumergiéndolo unos segundos correlativamente en solución de revelado, agua y solución de fijación. Se probaron diferentes tiempos de contactación de la membrana con el film hasta obtener señal sin que ésta estuviese saturada. Finalmente, la intensidad de las bandas obtenidas se cuantificaron mediante un densitómetro (Molecular Devices).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación estadística del efecto de los tratamientos farmacológicos aplicados en las diferentes variables analizadas, se realizó en varias fases. En la mayoría de los casos, debido a que el tamaño de muestra no era elevado, no se asumió que los datos se distribuyeran de manera normal y se aplicaron los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis, para el análisis de más de dos grupos, y la prueba U de Mann-Whitney, para analizar las diferencias entre dos grupos. En cambio, cuando el número de datos lo permitía, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA), para evaluar diferencias entre varios grupos, o la prueba *t* de Student no apareada con especificación bilateral, para comparar dos grupos. Algunas determinaciones que aparecen en este trabajo se tomaron a partir de los mismos individuos antes y después de aplicar un tratamiento farmacológico, en este caso se consideró que los datos estaban apareados y se evaluaron mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. Para estudiar el grado de correlación entre variables, se calculó el coeficiente de correlación (r^2) mediante la regla de los cuadrados mínimos, cuando el tamaño de muestra era elevado (distribución normal), y la regresión no paramétrica de Spearman, cuando el número de datos era reducido (distribución no normal).

Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media) y la significación estadística se estableció al nivel de $p < 0,05$. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa informático StatView para ordenadores Macintosh.

SOLUCIONES

- ACD-anticoagulante: Ácido cítrico 0,8%, citrato trisódico dihidrato 2,2%, dextrosa 2,45%, ajustar pH a 5.
- ACD- salino: ACD-anticoagulante 14,4% en solución salina, ajustar pH a 6,50.
- Ácido fosfomolíbdico 1%: Ácido fosfomolíbdico 1% en agua destilada.
- Acrilamida/bisacrilamida (30/0,8%): Acrilamida 30%, N-N'-bismetilén acrilamida 0,8%; almacenar preservada de la luz.
- Agua libre de RNAsas: Tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).
- Alcohol ácido: Ácido clorhídrico concentrado 1% en alcohol 70%.
- Azul celeste: Azul celeste B 0,5%, Sulfato amónico férrico 5%, glicerina 14%. El sulfato amónico férrico se disuelve en agua destilada fría con agitación, el azul celeste se añade a esta solución y la mezcla se hierve durante unos minutos. Tras enfriar la solución se filtra y se añade la glicerina.
- Azul de metileno: Azul de metileno 2%, ácido acético 2,5%. Añadir el azul de metileno a agua hirviendo, a continuación el ácido, enfriar y filtrar.
- Bromuro de etidio, 10 mg/ml, solución stock: pastilla de 100 mg diluida en agua DEPC, almacenar protegido de la luz.
- BSA 1%: BSA 1% en PBS-Tween 20 0,1%.
- BSA 2%: BSA 2% en PBS-Tween 20 0,1%.
- Citrato sódico 3,8%: Citrato trisódico dihidratado 4,3%.
- Cloruro cálcico 25 mM: cloruro cálcico 25 mM en TBS-BSA 0,1%.
- EDTA: EDTA 5%, ajustar el pH a 7,4.
- Fijador de Bouin: Formalina 3,4%, ácido acético 7% en solución saturada de ácido píttrico.
- Formol cálcico: Clorato cálcico 16,7%, paraformaldehido 6,7%.
- Fucsina ácida: Fucsina ácida 0,5%, ácido acético glacial 0,5%. Añadir la fucsina ácida a agua hirviendo. Agregar el ácido acético y filtrar.
- Gel agarosa 1%: Agarosa 1%, bromuro de etidio (0,5 µg/ml), en TBE (1x); fundir la agarosa en microondas y disolver. Verter sobre un molde de geles cuando se haya enfriado lo suficiente y dejar gelificar con un peine adecuado.

- Gel agarosa 2%: Agarosa 2%, bromuro de etidio (0,2 µg/ml), en TBE (1x); preparar igual que el gel agarosa 1%.
- Gel de acrilamida 4% (apilador): 0,5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 0,26 ml de solución de Acrilamida/Bisacrilamida (30/0,8%), 20 µl SDS 10%, 1,22 ml de H₂O Milli-Q, 10 µl de persulfato amónico 15% y 2 µl de TEMED. Verter entre los dos cristales del equipo para geles de electroforesis sobre el gel separador ya gelificado, y dejar gelificar con un peine adecuado durante 20 minutos.
- Gel de poliacrilamida 15% (separador): 1,25 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 2,25 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida (30/0,8%), 50 µl de SDS 10%, 1,17 ml de H₂O Milli-Q, 25 µl de persulfato amónico 15% y 2,5 µl TEMED. Verter entre los dos cristales del equipo para geles de electroforesis, añadir un capa fina de isopropanol y dejar gelificar durante 20 minutos. Eliminar el isopropanol, secar y verter el la mezcla para el gel apilador (4%).
- Gel de poliacrilamida 7,5% (separador): 1,25 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 1,25 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida (30/0,8%), 50 µl de SDS 10%, 2,43 ml de H₂O Milli-Q, 25 µl de persulfato amónico 15% y 2,5 µl TEMED. Preparar como el gel separador al 15%.
- HBS: Cloruro sódico 137 mM, cloruro potásico 5,38 mM, glucosa 5,55 mM y HEPES 10mM. Ajustar el pH a 7,5.
- HBSA: albúmica sérica bovina (BSA) 0,1% en HBS.
- Hematoxilina de Mayer: Hematoxilina 0,1%, sulfato alumínico potásico 5%, ácido cítrico 0,1%, hidrato de cloral 5%, iodato sódico 0,02%. La hematoxilina, el sulfato alumínico potásico y el iodato sódico se disuelven en agua caliente con agitación. Se añaden el hidrato de cloral y el ácido cítrico; la mezcla se hierve durante 5 minutos, se deja enfriar y se filtra.
- Hidrocloruro de guanidinio 0,3 M: Hidrocloruro de guanidinio 0,3 M en etanol 75%.
- HTB, para administración i.v.: HTB 250 mM, NaOH 0,43N, ajustar el pH a 7,0.
- Paraformaldehido 4%: Cloruro sódico 0,9 %, paraformaldehido 4%, en PBS. Diluir el paraformaldehido con agitación y aplicando calor hasta observar que la solución queda transparente, evitar la ebullición (<80°C), dejar enfriar y filtrar.
- PBS, pH 7,40: Cloruro potásico 2,68 mM, cloruro sódico 136,8 mM, dihidroenofosfato de potasio 1,46 mM, hidrogeno de disodio dodecahidrato 8 mM.
- PBS-Tween 20 1%: Tween 20 1% en PBS

- PBS-Tween 20 0,1%: Tween 20 0,1% en PBS
- PBS-Tween 0,05%: Tween 20 0,05% en PBS
- PEG 8.000 20%: PEG 8.000 20% en tampón glicina 0,2 M, pH 9,0.
- Persulfato amónico 15%: Persulfato amónico 15% en agua; preparar al momento.
- Rojo de Ponceau: Ponceau 2 mg/ml, ácido acético glacial 1%.
- SDS 1%: Lauril sulfato sódico 1%.
- Solución de bloqueo de peroxidasas: Peróxido de hidrógeno 3% en metanol.
- Solución de bloqueo para inmunohistoquímica: Tween 20 0,05%, albúmina sérica bovina (BSA) 1% en PBS.
- Solución de bloqueo para Western blot: Leche descremada en polvo 5%, Tris (pH 7,5) 10 mM, cloruro sódico 100 mM, Tween 20 0,05%.
- Solución de carbonato, pH 9,6: Carbonato 0,1 M.
- Solución de gelatinización de portaobjetos:
 1. *Gelatinización 2% (Inmunohistoquímica)*: gelatina 2%, cromo III potasio sulfato dodecahidrato 0,5%.
 2. *Gelatinización 1% (histología convencional)*: gelatina 2%, cromo III potasio sulfato dodecahidrato 0,5%.

Disolver la gelatina en agua caliente y agregar el sulfato. Los portaobjetos se introducen en la solución durante varios segundos, se escurren y se dejan secar.
- Solución del sustrato de la peroxidasa: 0-dihidrocloride fenilenediamina 0,42 mg/ml en solución citrato 0,2 M, pH 5,0, y peróxido de hidrógeno 0,3%.
- Solución Herxheimer: Sudán III 0,5%, Sudán IV 0,5%, en solución alcohol acetona proporción 1:1. Agitar durante 1 hora y filtrar. Guardar protegido de la luz.
- Solución salina: Cloruro sódico 0,9%.
- Solución suero de cabra 10%: Tween 20 0,05%, suero de cabra 1% en PBS.
- SuperSignal Ultra (Pierce): Solución de luminol y solución de peróxido estable (1:1).
- Tampón glicina 0,2 M, pH 9,0: Glicina 0,2 M.
- Triflusal, para administración i.v.: Triflusal 250 mM en bicarbonato sódico 60 mM.
- Tampón de aplicación a las muestras (2x): Tris-HCl 60 mM, glicerol 20%, (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v); ajustar el pH a 6,8.
- Tampón de carga (6x): Glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xilencianol FF 0,25%.

- Tampón de elución (10x): Glicina 1,92 M, Tris 0,25 M, SDS 1% pH 8,3-8,5.
- Tampón de lisis: Tris-HCl pH 7,5 0,01 mM, HCl 150 mM, PMSF 3 mM, DTT 0,1 mM, leucepeptin 0.02%, aprotinin $1,02 \times 10^6$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Añadir el PMSF en el último momento ya que es muy inestable.
- Tampón de lisis-tritón 1%: Tritón 1% en tampón de lisis.
- Tampón Hepes, pH 7,40: Cloruro sódico 137 mM, cloruro potásico 2,6 mM, Hepes 15 mM.
- Tampón del gel apilador (x4): Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,4% SDS.
- Tampón del gel separador (x4): Tris-HCl 1.5 M pH 8,6-8,8; 0.4 % SDS.
- Tampón de transferencia, pH 7,5: Tris 25 mM, glicina 192 mm, metanol 20%.
- TBE: Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0.
- TBS (inmunohistoquímica): Tris (pH 7,5) 10 mM, cloruro sódico 100 mM. Ajustar pH a 7,5.
- TBS (actividad procoagulante TF): Tris 50mM y cloruro cálcico 150 mM. Ajustar pH a 7,5.
- TBS-BSA 0,1%: albúmica sérica bovina (BSA) 0,1% en TBS.
- TBS-EDTA 0,1 M, pH 7,5: EDTA 0,1 M en TBS. Ajustar el pH a 7,5.
- TBS-BSA 0,1%-EDTA 300 μM , pH 7,5: EDTA 300 μM en TBS-BSA 0,1%. Ajustar el pH a 7,5.
- TBS-Twen: Tris (pH 7,5) 10 mM, cloruro sódico 100 mM, Twen 20 0,05%.
- Tinción Oro: Dextrina 1% en aceite rojo saturado en isopropanol 99%.
- Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8: Trizma 0,5 M, ajustar el pH a 6,8 con ácido clorídrico.
- Tyrode buffer: Bicarbonato sódico 11,9 mM, dextrosa 3,5 mM, cloruro magnésico 0,9 mM, cloruro cálcico 1 mM, en tampón Hepes.
- Vesículas de fosfatidilserina:fosfatidilcolina (30:70) 500 μM : Fosfatidilserina 30%: fosfatidilcolina 70% 0,5 mM en TBS. Preparar la proporción de los dos fosfolípidos y evaporar el metanol bajo nitrógeno para evitar la oxidación. Añadir el TBS y sonicar a 4°C hasta obtener una solución transparente, guardar a 4°C. Realizar una dilución 1:10.

RESULTADOS

ESTUDIO CON INHIBIDOR DEL FACTOR TISULAR, FFR-rFVIIa

Se evaluó el efecto de un inhibidor del TF sobre la trombosis arterial, ya que se ha propuesto que este factor es determinante en la activación y desarrollo del trombo. Inicialmente se estudiaron diferentes dosis de FFR-rFVIIa (0,1; 0,5; 1 y 2 mg/kg), que se administraron a los cerdos mediante bolo intravenoso. Los parámetros fisiológicos y niveles de fármaco en plasma se determinaron con todas las dosis. Sin embargo, para estudiar la agregación plaquetar y la trombosis sobre pared vascular no aterosclerótica, se eligieron las dosis intermedias de 0,5 y 1 mg/kg. Posteriormente, se evaluó el efecto del FFR-rFVIIa sobre la trombosis en presencia de lesión aterosclerótica, y teniendo como referencia los resultados obtenidos sobre pared sana, se aplicaron las dosis de 1 y 4 mg /kg.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS BASALES

El día anterior a la inducción experimental de trombosis, se determinaron los parámetros hematológicos y bioquímicos en situación basal, así como el pesado de los animales en todos los grupos (Control n=3; FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg n=3; 0,5 mg/kg n=3; 1 mg/kg n=5; 2 mg/kg n=1). El peso medio de los animales fue de $39,7 \pm 3,3$ kg. Los datos referentes a los parámetros hematológicos y bioquímicos se resumen en las Tablas 1 y 2, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en ningún caso.

GRUPO	CONTROL	FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg	FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg	FFR-rFVIIa 1 mg/kg	FFR-rFVIIa 2 mg/kg
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	6,0 ± 0,5	5,2 ± 0,4	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,5
PLT (x10 ³ /mm ³)	413 ± 69	591 ± 47	475 ± 79	484 ± 38	631
HCT (%)	32,0 ± 0,8	28,5 ± 1,1	30,2 ± 0,4	29,4 ± 1,6	32,7
MCV (micron mm ³)	47 ± 8	55 ± 3	56 ± 4	53 ± 1	59
MCH (pico grams)	16,7 ± 0,9	17,5 ± 1,0	17,7 ± 0,6	17,0 ± 0,2	19,0
HGB (%)	9,8 ± 0,3	9,0 ± 0,6	9,5 ± 0,3	9,6 ± 0,5	10,5
WBC (x10 ³ /mm ³)	14,6 ± 1,1	11,7 ± 0,7	14,7 ± 1,8	13,5 ± 1,1	21,5

Tabla 1. Parámetros hematológicos basales en los diferentes grupos de tratamiento (Control n=3; FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg n=3; 0,5 mg/kg n=3; 1 mg/kg n=5; 2 mg/kg n=1).

GRUPO	CONTROL	FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg	FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg	FFR-rFVIIa 1 mg/kg	FFR-rFVIIa 2 mg/kg
AST (U/L)	23,6 ± 5,4	12,7 ± 2,2	29,7 ± 10,7	24,8 ± 7,2	57,0
ALT (U/L)	51 ± 7	33 ± 3	44 ± 7	39 ± 6	50
BUN (mg/dl)	11,2 ± 0,6	11,0 ± 0,9	7,7 ± 1,8	11,0 ± 0,9	7,1
Creatinina (mg/dl)	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0
Proteínas Totales (g/dl)	5,2 ± 0,3	5,1 ± 0,4	4,4 ± 0,6	5,2 ± 0,3	3,7
Glucosa (mg/dl)	136 ± 20	121 ± 15	123 ± 29	114 ± 10	131

Tabla 2. Parámetros bioquímicos basales en los diferentes grupos de tratamiento (Control n=3; FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg n=3; 0,5 mg/kg n=3; 1 mg/kg n=5; 2 mg/kg n=1).

TIEMPO DE PROTROMBINA

Los animales fueron tratados con diferentes dosis de FFR-rFVIIa (FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg, n=3; FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, n=3; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=5; FFR-rFVIIa 2 mg/kg, n=1) mediante una única administración intravenosa (i.v.). Se determinó el PT a partir de sucesivas muestras sanguíneas obtenidas a diferentes tiempos a lo largo del procedimiento experimental, en situación basal y a partir de los 15 minutos de administrar FFR-rFVIIa (post-tto) (las determinaciones se realizaron entre el minuto 15

y 130). En la Tabla 3 se muestran los valores medios de PT obtenidos en los diferentes grupos de dosis. Todas la dosis de FFR-rFVIIa aumentaron significativamente el valor medio de PT respecto a su valor basal ($p < 0,001$), también se encontraron diferencias significativas entre grupos de dosis ($p < 0,001$). La evolución de los valores de PT a lo largo del tiempo en los cuatro grupos se expone en la Figura 1, donde también se aprecian las diferencias entre dosis.

GRUPO	FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg		FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg		FFR-rFVIIa 1 mg/kg		FFR-rFVIIa 2 mg/kg	
	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto
PT (segundos)	13,5±0,2	17,8±0,4*	14,3±0,3	25,4±0,5*†	13,7±0,1	29,1±0,4*†‡	14,2±0,1	43,5±0,7*†‡#

Tabla 3. Valores medios de PT obtenidos en los diferentes grupos de dosis en situación basal y a partir de los 15 minutos de la administración de FFR-rFVIIa (post-tto) (las determinaciones se realizaron entre el minuto 15 y 130) (FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg, n=10; FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, n=9; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=15; FFR-rFVIIa 2 mg/kg, n=3). * $p < 0,05$ vs. valor basal, † $p < 0,05$ vs. grupo tratado con la dosis de 0,1 mg/kg; ‡ $p < 0,05$ vs. grupo tratado con la dosis de 0,5 mg/kg y # $p < 0,05$ vs. grupo tratado con la dosis de 1 mg/kg.

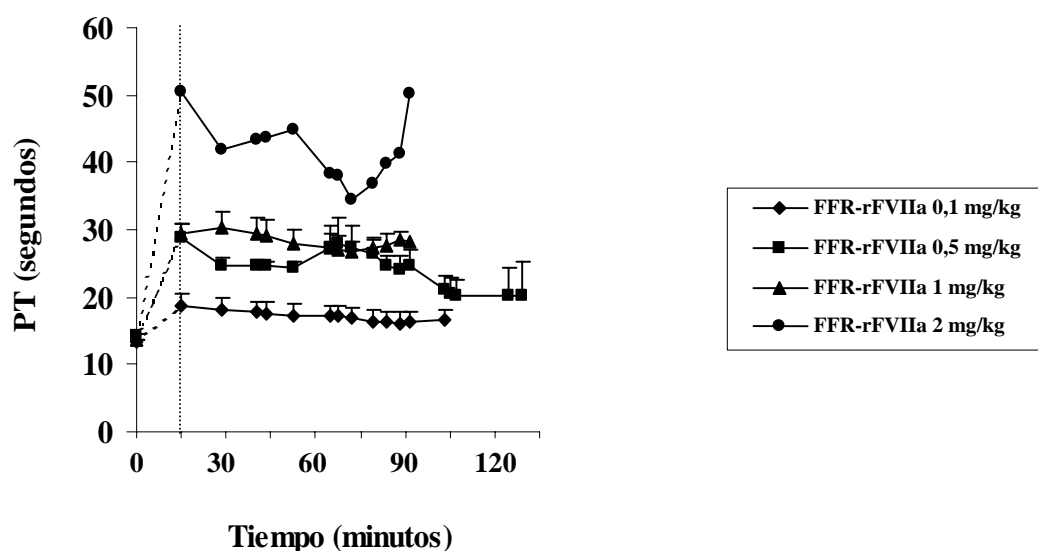


Figura 1. Evolución de los valores de PT a lo largo del tiempo en los diferentes grupos de dosis. El FFR-rFVIIa se administró en el minuto 0, y las determinaciones post-tratamiento se realizaron entre el minuto 15 y 130. El valor medio del PT en situación basal para cada grupo de dosis, aparece representado en el minuto 0.

NIVELES PLASMÁTICOS DE FFR-rFVIIa

A partir de las mismas muestras de plasma utilizadas para la determinación del PT, se determinaron los niveles de FFR-rFVIIa. Los valores medios en plasma de este compuesto se muestran en la Tabla 4. Éstos fueron significativamente diferentes entre grupos de dosis ($p < 0,001$), y además se correlacionaron de manera positiva con la dosis administrada ($r^2 = 0,936$, $p = 0,0001$). En la Figura 2 está representada la cinética del FFR-rFVIIa y también se aprecian diferencias significativas entre grupos de dosis.

GRUPO	FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg		FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg		FFR-rFVIIa 1 mg/kg		FFR-rFVIIa 2 mg/kg	
	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto
FFR-rFVIIa (ng/ml)	0	728±140*	0	3225±405*†	0	8032±1049*†‡	0	14880±1911*†‡#

Tabla 4. Valores medios de FFR-rFVIIa en plasma obtenidos en los diferentes grupos de dosis en situación basal y a partir de los 15 minutos de la administración de FFR-rFVIIa (post-tto) (las determinaciones se realizaron entre el minuto 15 y 130) (FFR-rFVIIa 0,1 mg/kg, n=10; FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, n=9; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=15; FFR-rFVIIa 2 mg/kg, n=3). * $p < 0,05$ vs. valor basal, † $p < 0,05$ vs. grupo tratado con la dosis de 0,1 mg/kg; ‡ $p < 0,05$ vs. grupo tratado con la dosis de 0,5 mg/kg y # $p < 0,05$ vs. grupo tratado con la dosis de 1 mg/kg.

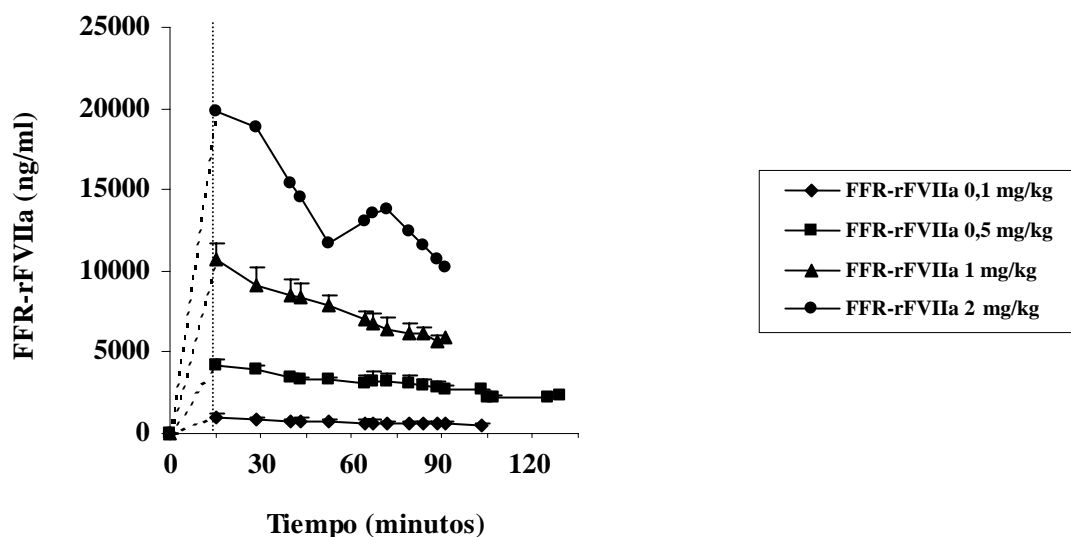


Figura 2. Cinética de los niveles plasmáticos de FFR-rFVIIa en los diferentes grupos de dosis. El FFR-rFVIIa se administró en el minuto 0, y las determinaciones post-tratamiento se realizaron entre el minuto 15 y 130. Los niveles de FFR-rFVIIa basales ($<$ límite detección, ≈ 0) para cada grupo de dosis, aparecen representados en el minuto 0.

CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE FFR-rFVIIa Y EL TIEMPO DE PROTROMBINA

Como se ha demostrado en los apartados anteriores, el tratamiento con FFR-rFVIIa afecta al tiempo de protrombina, indicador de la *vía extrínseca* (*vía del TF*) de la cascada de la coagulación. En los grupos tratados con dosis mayores de este compuesto se obtuvieron valores de PT más elevados. Como se aprecia en la Figura 3, se obtuvo una correlación positiva y altamente significativa entre estos dos parámetros ($r^2 = 0,82$; $p=0,0001$).

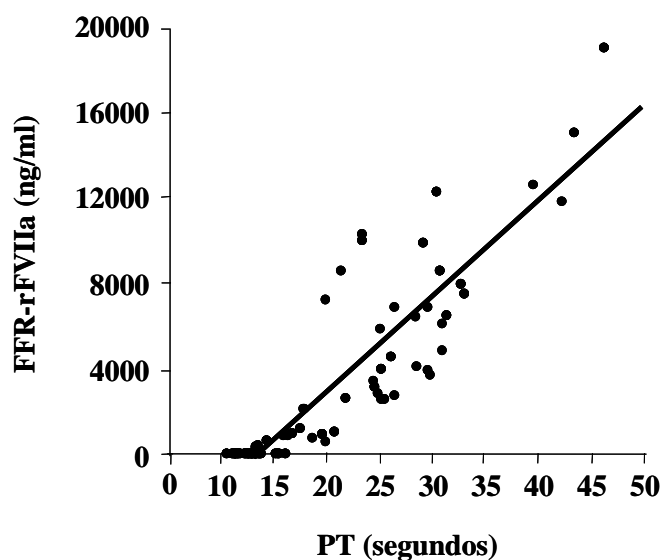


Figura 3. Correlación entre las concentraciones plasmáticas de FFR-rFVIIa y los valores de PT en los diferentes grupos de dosis ($r^2 = 0,82$; $p=0,0001$).

AGREGACIÓN PLAQUETAR *EX VIVO*

La agregación plaquetar *ex vivo* se estudió a partir de una muestra de sangre obtenida en situación basal y a los 15 minutos de administrar FFR-rFVIIa (dosis de 0,5 y 1 mg/kg). Se evaluó la agregación plaquetar en sangre total inducida por colágeno y en plasma rico en plaquetas (PRP) inducido por colágeno y ADP (Figura 4). Al comparar los resultados obtenidos en situación basal y tras la administración de FFR-

rFVIIa en cada grupo (0,5 mg/kg y 1 mg/kg), no se observaron diferencias en ningún caso.

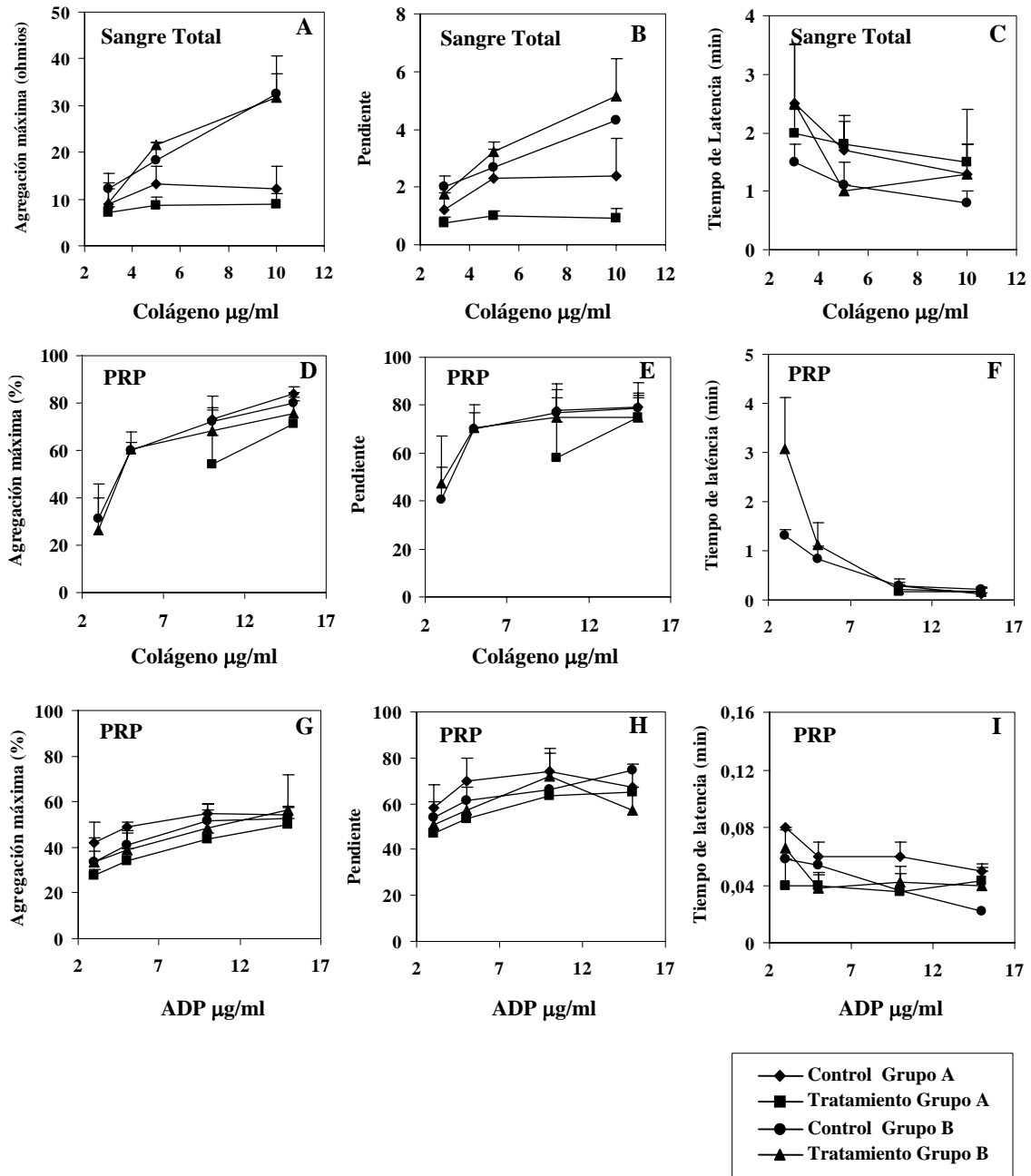


Figura 4. Agregación plaquetar *ex vivo* en los dos grupos de dosis antes (control) y después de la administración de FFR-rFVIIa (tratamiento) (FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, grupo A, n=3; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, grupo B, n=4). Se estudió la agregación en sangre total a la que se añadió colágeno como agonista (A, B, C) y plasma rico en plaquetas (PRP) al que se agregó colágeno (D, E, F) o ADP (G, H, I). La agregación se expresa en términos de agregación máxima (A, D, G), velocidad de agregación o pendiente (B, E, H) y tiempo de latencia (C, F, I).

TROMBO FORMADO SOBRE PARED VASCULAR LESIONADA

El efecto del FFR-rFVIIa sobre la trombosis se evaluó en dos tipos de substratos vasculares, pared vascular sana y aterosclerótica. El tratamiento se aplicó de manera sistémica (*in vivo*), mediante un único bolo intravenoso, y localmente (*in vitro*), incubando los substratos vasculares con el fármaco. En los experimentos *in vivo*, se realizaron perfusiones en situación basal (control) y tras la administración del fármaco (a partir del minuto 15 hasta el minuto 130).

Trombo Formado sobre Pared Vascular Sana

El estudio de la trombosis desencadenada por pared vascular sana lesionada se realizó administrando FFR-rFVIIa sistémica y localmente. En el estudio *in vivo* los animales se dividieron en dos grupos según la dosis recibida (0,5 mg/kg, n=3; y 1 mg/kg, n=4). Un tercer grupo de animales sin tratar se utilizaron para el estudio *in vitro* con FFR-rFVIIa (n=3).

Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación

El marcaje de las plaquetas se realizó el día anterior al experimento de trombosis. Los parámetros relacionados con el marcaje y el nivel de anticoagulación así como los valores hematológicos (obtenidos durante el experimento) pueden condicionar en gran medida los resultados del experimento de deposición plaquetar por lo que es importante una valoración detallada de los mismos.

En la Tabla 5 se resumen los datos del marcaje, y en la Tabla 6 y 7 los valores medios de coagulación y hematológicos durante los experimentos. En los parámetros de marcaje no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales. En lo que se refiere a los parámetros hematológicos los valores oscilaron dentro del rango de normalidad para la especie. En los dos grupos de tratamiento, se observó que el PT (% respecto al basal) aumentó significativamente de forma dosis-dependiente entre el

minuto 15 y 130 tras la administración de FFR-rFVIIa. El fibrinógeno y el aPTT no se modificaron de manera relevante con el tratamiento. Los valores obtenidos en el grupo control destinado al estudio *in vitro* con FFR-rFVIIa, fueron similares a los valores basales de los grupos de tratamiento *in vivo*.

PARÁMETRO	CONTROL	FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg	FFR-rFVIIa 1 mg/kg
Viabilidad de plaquetas (%)	98,5 ± 0,2	98,9 ± 0,4	97,5 ± 1,6
Eficiencia (%)	87 ± 6	90 ± 4	90 ± 3
Plaquetas inyectadas (x10 ⁶)	9,1 ± 1,9	7,3 ± 0,9	9,8 ± 1,8
Dosis inyectada (µCi)	303 ± 68	280 ± 30	342 ± 36

Tabla 5. Resumen del marcaje de plaquetas en los tres grupos de tratamiento (Control, n=3; FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, n=3; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=4).

PARÁMETRO	FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg		FFR-rFVIIa 1 mg/kg	
	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto
aPTT (% basal)	261 ± 43	230 ± 8	304 ± 53	238 ± 26
PT (% basal)	96 ± 4	175 ± 15*	102 ± 5	211 ± 12*†
Fibrinógeno (mg/dl)	180 ± 3	155 ± 4	179 ± 20	178 ± 18
RBC (x10 ⁶ /µl)	4,8 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5 ± 0,2	5,4 ± 0,3
HCT (%)	26,6 ± 1,2	29,7 ± 0,8	26,7 ± 1,2	29,3 ± 0,8
PLT (x10 ⁶ /µl)	409 ± 65	383 ± 49	422 ± 34	419 ± 33

Tabla 6. Principales valores medios de coagulación y hematológicos obtenidos durante el experimento de deposición plaquetar en los dos grupos de tratamiento (FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, n=3; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=4). * p < 0,05 vs. valor basal, † p < 0,05 vs. grupo tratado con la dosis de 0,5 mg/kg.

PARÁMETRO	Grupo control (tratamiento <i>in vitro</i>)
aPTT (% basal)	251 ± 33
PT (% basal)	93 ± 1
Fibrinógeno (mg/dl)	157 ± 5
RBC (x10 ⁶ /µl)	5,8 ± 0,1
HCT (%)	32,0 ± 0,3
PLT (x10 ⁶ /µl)	438 ± 60

Tabla 7. Principales valores medios de coagulación y hematológicos obtenidos durante el experimento de deposición plaquetar en el grupo control destinado al estudio del FFR-rFVIIa *in vitro* (n=3).

Tratamiento *in vivo*

Se estudió el efecto inhibitor de FFR-rFVIIa sobre la formación y crecimiento de un trombo mural sobre pared vascular sana con dos niveles de lesión: ligera, que simula situaciones de erosión vascular, y severa, que simula situaciones de ruptura de la integridad del vaso. Los experimentos se realizaron a alta (1700 s^{-1}) y baja (212 s^{-1}) velocidad de cizalladura, profundiendo durante 5 y 10 minutos.

Deposición Plaquetaria

Deposición Total

En el grupo control, se estudió la deposición plaquetaria sobre lesión vascular ligera (Figura 5A) y severa (Figura 5B), en las dos velocidades de cizalladura. En los dos tipos de lesión, la deposición fue significativamente mayor a alta velocidad de cizalladura en vasos perfundidos durante 5 (lesión ligera, $p < 0,05$; lesión severa, $p < 0,005$) y 10 minutos (lesión ligera $p < 0,005$; lesión severa, $p < 0,01$). Además, la deposición plaquetaria sobre lesión severa aumentó significativamente con el tiempo de perfusión (Figura 5B) (1700 s^{-1} , $p < 0,005$; 212 s^{-1} , $p < 0,01$). Los resultados obtenidos muestran que la deposición plaquetaria sobre vasos erosionados (deendotelizados) es relativamente baja y que no aumenta con el tiempo de perfusión si la velocidad de cizalladura es baja. Por el contrario, sobre lesión severa la deposición es alta y crece exponencialmente con el tiempo de perfusión.

La infusión de FFR-rFVIIa no tuvo efectos significativos sobre la deposición plaquetaria en pared vascular erosionada, como se muestra en la Figura 6. Mientras que la presencia de lesión vascular severa desencadenó un efecto trombótico que fue inhibido por el tratamiento i.v. con FFR-rFVIIa (0,5 y 1 mg/kg). En la Figura 7 se muestra que este compuesto inhibió significativamente la deposición de plaquetas a alta (Figura 7A) (perfusiones 10 minutos, 1700 s^{-1} , $p < 0,005$) y a baja velocidad de cizalladura (Figura 7B) (perfusiones 5 minutos, $p < 0,005$; perfusiones 10 minutos, $p < 0,005$).

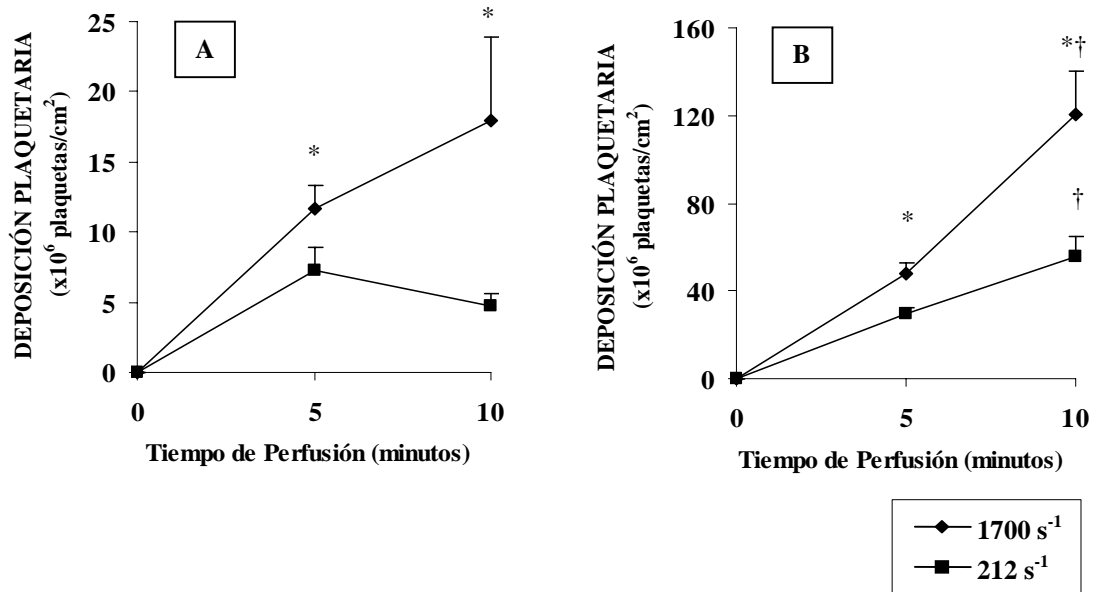


Figura 5. Deposition plaquetar total sobre pared vascular con lesión vascular ligera (A) y severa (B) a alta y a baja velocidad de cizalladura (1700 s^{-1} y 212 s^{-1}), en el grupo control (lesión ligera: 1700 s^{-1} , 5 minutos, $n=7$; 212 s^{-1} , 5 minutos, $n=7$; 1700 s^{-1} , 10 minutos, $n=7$; 212 s^{-1} , 10 minutos, $n=7$) (lesión severa: 1700 s^{-1} , 5 minutos, $n=14$; 212 s^{-1} , 5 minutos, $n=14$; 1700 s^{-1} , 10 minutos, $n=14$; 212 s^{-1} , 10 minutos, $n=14$). * $p < 0,05$ respecto a 212 s^{-1} ; † $p < 0,05$ vs. perfusiones de 5 minutos.

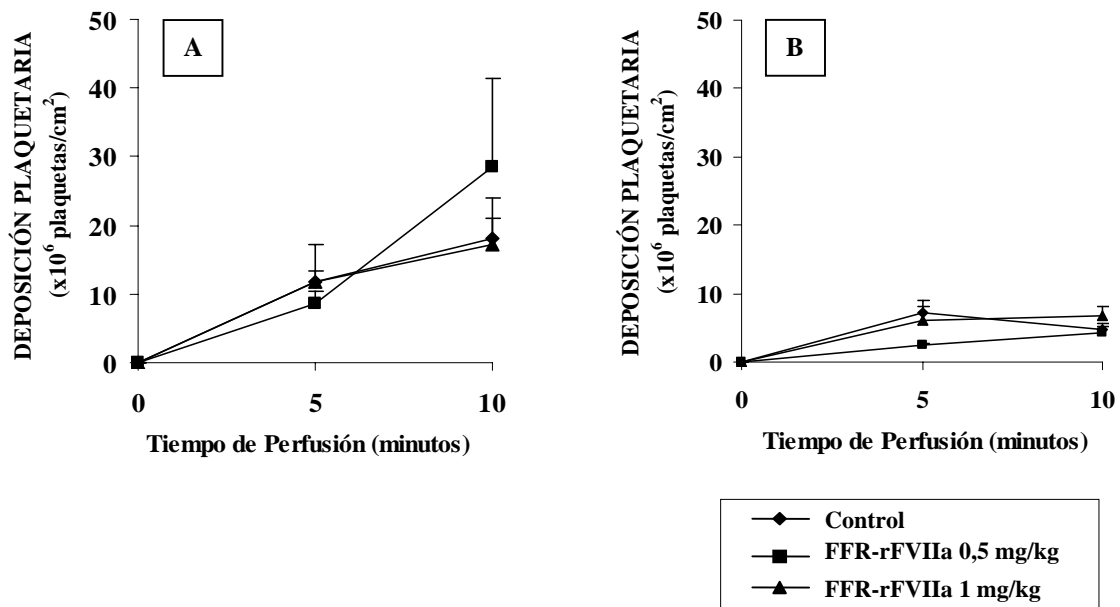


Figura 6. Deposition plaquetar total sobre pared vascular con lesión ligera (subendotelio) a alta (1700 s^{-1}) (A) y a baja velocidad de cizalladura (212 s^{-1}) (B) durante 5 y 10 minutos, en los tres grupos de dosis (Control, $n=7$; FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, $n=3$; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, $n=4$).

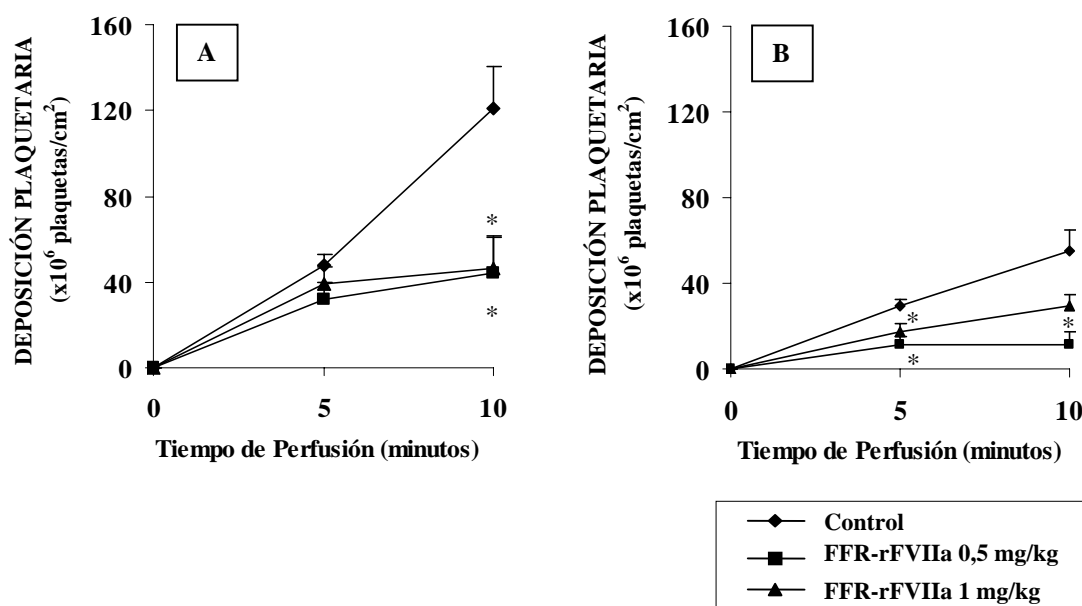


Figura 7. Deposición plaquetar total sobre pared vascular con lesión severa (túnica media) a alta (1700 s⁻¹) (A) y a baja velocidad de cizalladura (212 s⁻¹) (B) durante 5 y 10 minutos, en los tres grupos de dosis (Control, n=14; FFR-rFVIIa 0,5 mg/kg, n=6; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=8). * p<0,05 vs. grupo control.

Deposición Axial

Al analizar la deposición plaquetaria en los tres segmentos en que se dividió el sustrato (deposición axial) se obtuvo un patrón característico (segmento a \geq segmento b \geq segmento c) la mayoría de las veces (Figura 8 y 9). Al igual que en los resultados de deposición total, el FFR-rFVIIa no redujo significativamente la deposición axial sobre lesión ligera en ninguno de los tiempos evaluados ni a alta ni a baja velocidad de cizalladura (Figura 8). Por el contrario, sobre lesión severa FFR-rFVIIa redujo la deposición axial a ambas velocidades de cizalladura a los 10 minutos (Figuras 9B y 9D), y a baja velocidad de cizalladura a los 5 minutos (Figura 9C), aunque la significación no siempre se alcanzó en los tres segmentos axiales.

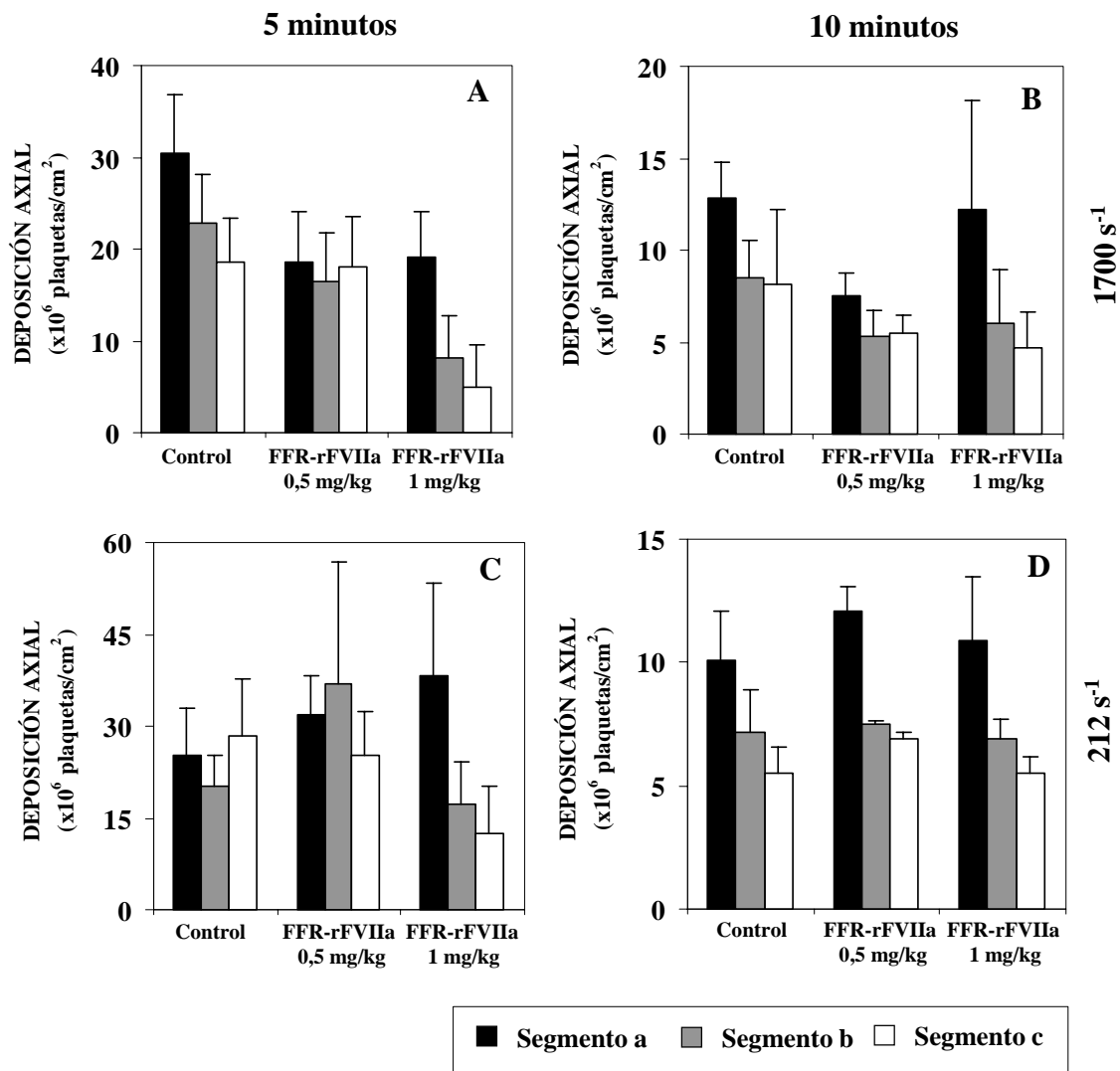


Figura 8. Deposición plaquetar axial sobre pared vascular con lesión ligera a alta (A, B) y a baja velocidad de cizalladura (C, D), durante 5 (A, B) y 10 minutos (C, D) en los tres grupos de dosis.

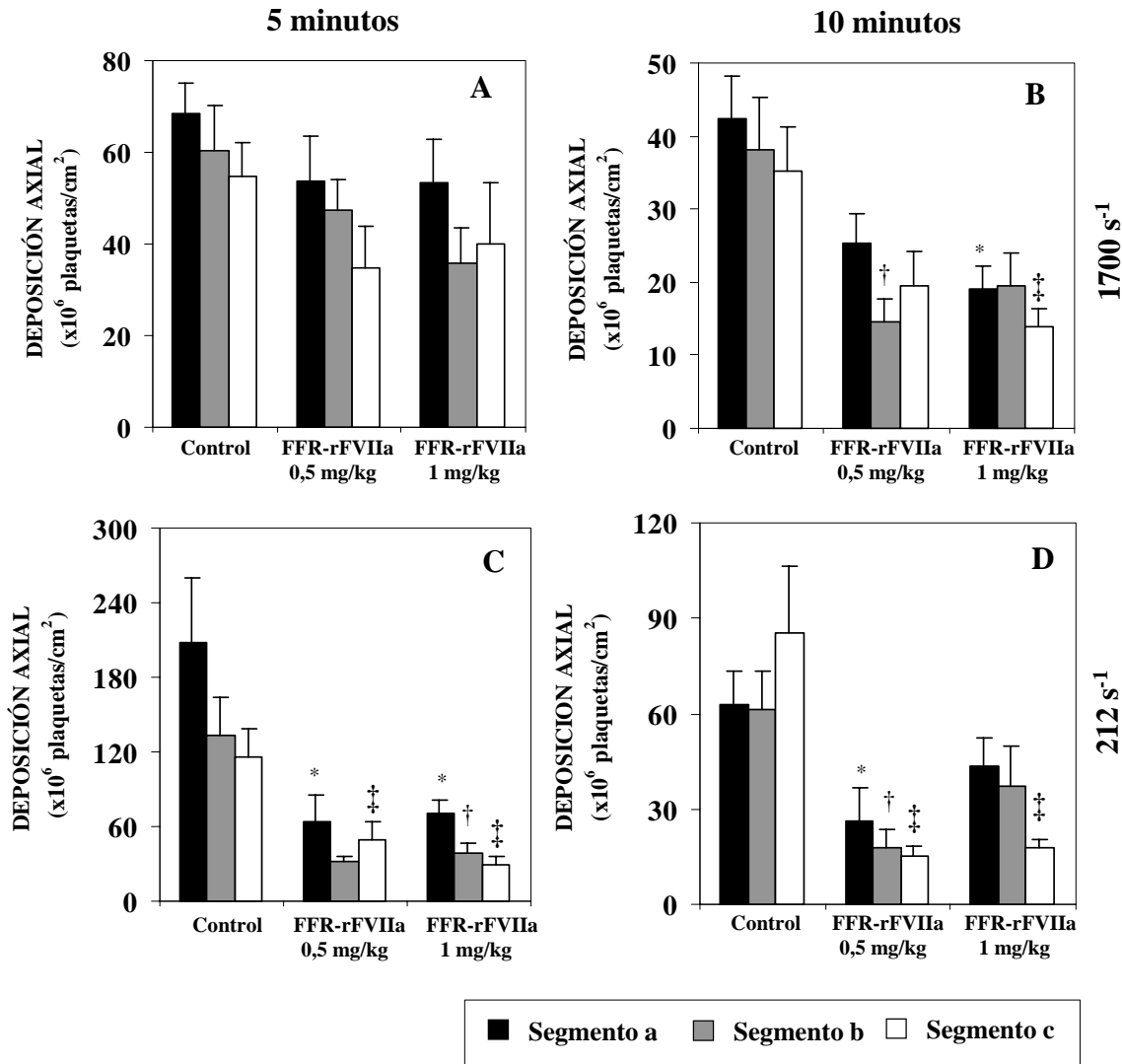


Figura 9. Deposición plaquetar axial sobre pared vascular con lesión severa a alta (A, B) y a baja velocidad de cizalladura (C, D) durante 5 (A, B) y 10 minutos (C, D) en los tres grupos de dosis. * $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento a, † $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento b y ‡ $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento c.

Correlación entre el Tiempo de Protrombina y los Niveles de FFR-rFVIIa en Plasma y la Deposición Plaquetaria

En apartados anteriores pudimos ver que existe una relación entre la dosis administrada de FFR-rFVIIa y el tiempo de protrombina (PT). Para comprobar si estos parámetros también estaban relacionados con la deposición plaquetar, se realizó un análisis de correlación estadístico para cada una de las condiciones de velocidad de cizalladura, tiempo de perfusión y sustrato desencadenante. No se encontró una

correlación significativa entre el PT y los niveles plasmáticos de FFR-rFVIIa y deposición plaquetaria sobre lesión ligera en ningún caso (Tabla 8). La deposición plaquetaria sobre pared vascular con lesión severa se correlacionó de manera inversa y significativa con el PT y con los niveles de FFR-rFVIIa plasmáticos (Tabla 9).

Condiciones	Subendotelio 5 min 1700 s ⁻¹		Subendotelio 5 min 212 s ⁻¹		Subendotelio 10 min 1700 s ⁻¹		Subendotelio 10 min 212 s ⁻¹	
	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p
PARÁMETRO								
PT (segundos)	0,002	0,86	0,06	0,38	0,006	0,8	0,04	0,47
FFR-rFVIIa (ng/ml)	0,02	0,66	0,005	0,81	0,002	0,87	0,2	0,11

Tabla 8. Correlación (r^2) entre el PT (% respecto el basal) y los niveles de FFR-rFVIIa plasmáticos y deposición plaquetar sobre lesión ligera en las diferentes condiciones de velocidad de cizalladura y tiempo de perfusión (n=14 en todas las condiciones).

Condiciones	Túnica Media 5 min 1700 s ⁻¹		Túnica Media 5 min 212 s ⁻¹		Túnica Media 10 min 1700 s ⁻¹		Túnica Media 10 min 212 s ⁻¹	
	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p
PARÁMETRO								
PT (segundos)	0,05	0,25	0,24	0,008	0,21	0,014	0,26	0,007
FFR-rFVIIa (ng/ml)	0,05	0,25	0,21	0,013	0,23	0,011	0,114	0,08

Tabla 9. Correlación (r^2) entre el PT (% respecto el basal) y los niveles de FFR-rFVIIa plasmáticos y deposición plaquetar sobre lesión severa en las diferentes condiciones de velocidad de cizalladura y tiempo de perfusión (n=28 en todas las condiciones).

Composición del Trombo

El análisis de la composición del trombo se realizó en el segmento central de los substratos perfundidos (segmento axial b) procedentes del grupo control y del grupo tratado con la dosis de 1 mg/kg de FFR-rFVIIa. La fibrina y las plaquetas presentes en el trombo se detectaron mediante tinción inmunohistoquímica. En el grupo control, los trombos formados sobre lesión severa, tanto a alta como a baja velocidad de cizalladura, estaban formados por una capa de fibrina sobre la cual estaban depositadas las plaquetas formando agregados. Sin embargo, en el grupo tratado con FFR-rFVIIa se observaron algunos agregados de plaquetas, pero la cantidad de fibrina estaba muy reducida (Figura 10). Los trombos formados sobre lesión ligera estaban formados por plaquetas depositadas directamente sobre el subendotelio sin formar agregados y sin prácticamente presencia de fibrina (Figura 11).

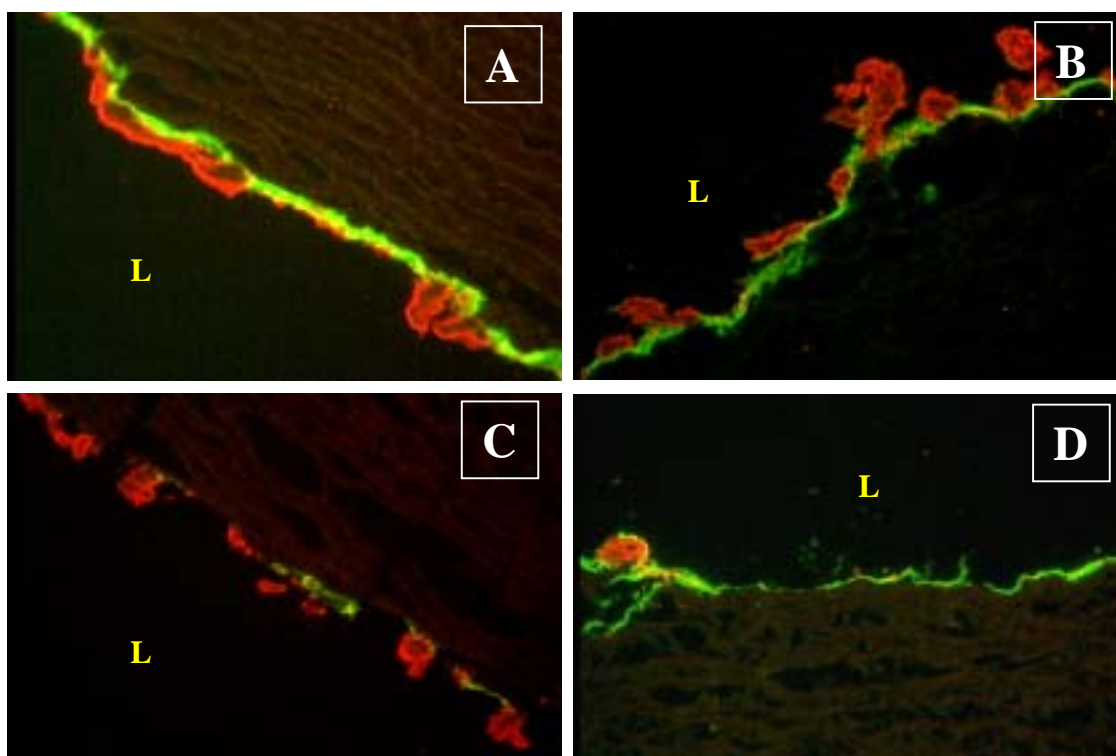


Figura 10. Trombos formados sobre lesión severa a alta (A,C) y baja velocidad de cizalladura (B, D), en el grupo control (A, B) y en el grupo tratado con FFR-rFVIIa 1 mg/kg (C,D). Las plaquetas aparecen teñidas en rojo y la fibrina en verde (x200 aumentos).

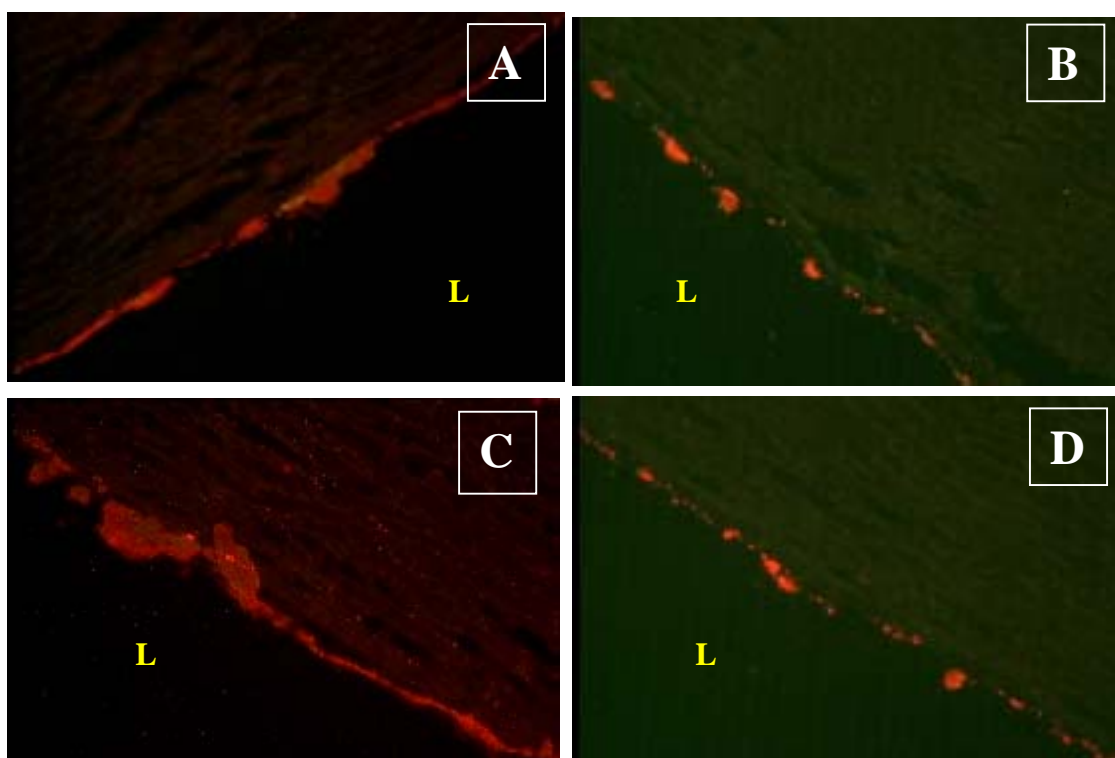


Figura 11. Trombos formados sobre lesión ligera a alta (A,C) y baja velocidad de cizalladura (B, D), en el grupo control (A, B) y en el grupo tratado con FFR-rFVIIa 1 mg/kg (C,D). Las plaquetas aparecen teñidas en rojo (x200 aumentos).

Cuantificación de la Fibrina Presente en el Trombo

La deposición de fibrina se evaluó semicuantitativamente mediante un programa de análisis de imagen. Estas determinaciones se realizaron en los trombos formados sobre lesión severa, ya que sobre subendotelio sólo se observó deposición de plaquetas. En la Figura 12 se muestra la deposición de fibrina en el grupo control, a alta y a baja velocidad de cizalladura, a lo largo del tiempo, y se aprecia que es dependiente del tiempo. Sin embargo, a diferencia de la deposición plaquetaria, la deposición de fibrina no resultó afectada por la velocidad de cizalladura, ya que la evolución en el tiempo fue similar en los dos casos. La Figura 13 compara los resultados obtenidos en el grupo control y en el grupo tratado con 1 mg/kg de FFR-rFVIIa. La deposición fue inferior en este último grupo a ambas velocidades de cizalladura, pero esta diferencia sólo fue significativa a los 10 minutos a 1700 s^{-1} ($p < 0,05$). Al no observarse diferencias entre velocidades de cizalladura, se analizaron conjuntamente todos los datos y el resultado se muestra en la Figura 14. Igualmente, la cantidad de fibrina fue inferior en el grupo tratado con FFR-rFVIIa respecto al grupo control en ambos tiempos de perfusión, aunque sólo se halló significación a los 10 minutos ($p < 0,01$).

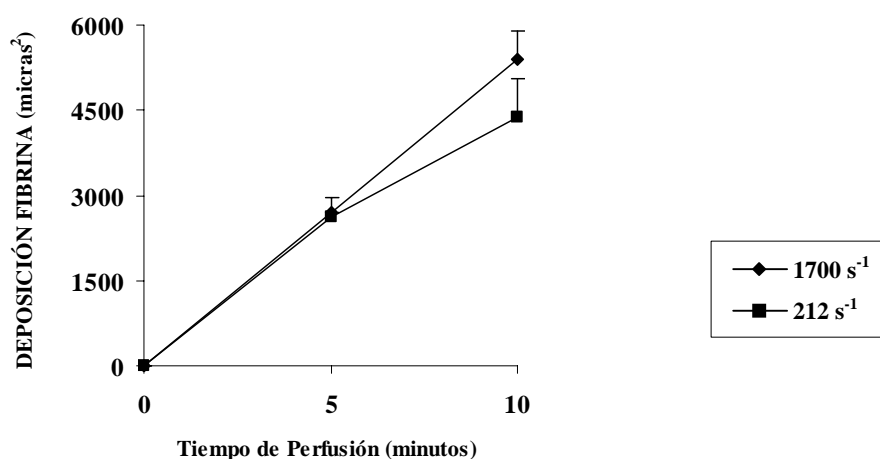


Figura 12. Deposición de fibrina sobre pared vascular con lesión vascular severa en el grupo control a alta (1700 s^{-1}) y a baja velocidad de cizalladura (212 s^{-1}) (5 minutos, 1700 s^{-1} , $n=3$, 212 s^{-1} , $n=3$; 10 minutos, 1700 s^{-1} , $n=3$; 212 s^{-1} , $n=3$).

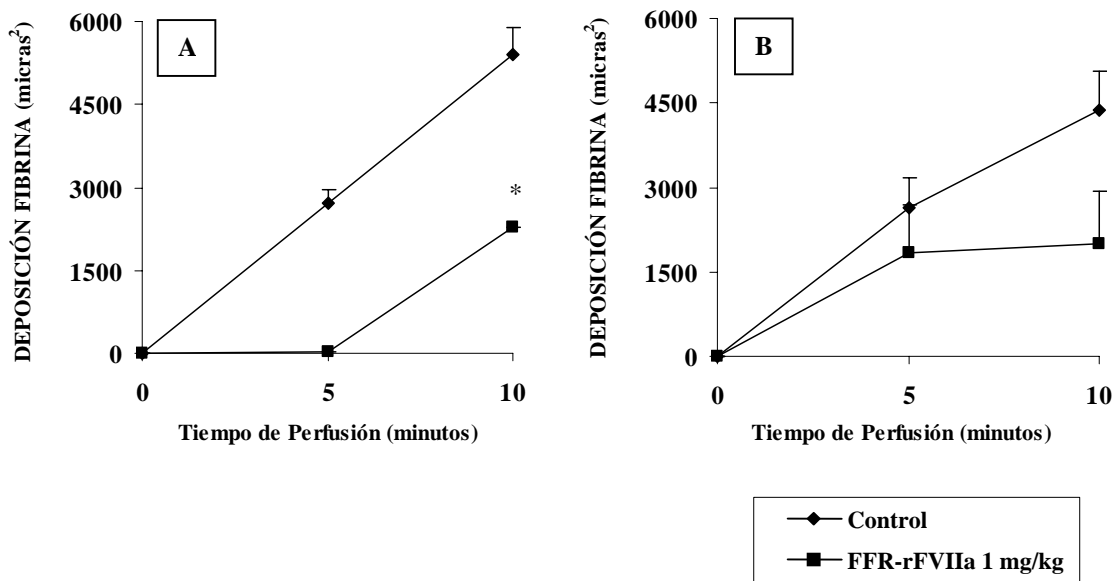


Figura 13. Deposición de fibrina sobre pared vascular con lesión vascular severa a alta (1700s⁻¹) (A) y a baja velocidad de cizalladura (212 s⁻¹) (B) en el grupo control (5 minutos, 1700 s⁻¹, n=3; 212 s⁻¹, n=3; 10 minutos, 1700 s⁻¹, n=3; 212 s⁻¹, n=3) y en el grupo tratado con 1 mg/kg FFR-rFVIIa (5 minutos, 1700 s⁻¹, n=2, 212 s⁻¹, n=3; 10 minutos, 1700 s⁻¹, n=3, 212 s⁻¹, n=2). * p<0,05 vs. grupo control.

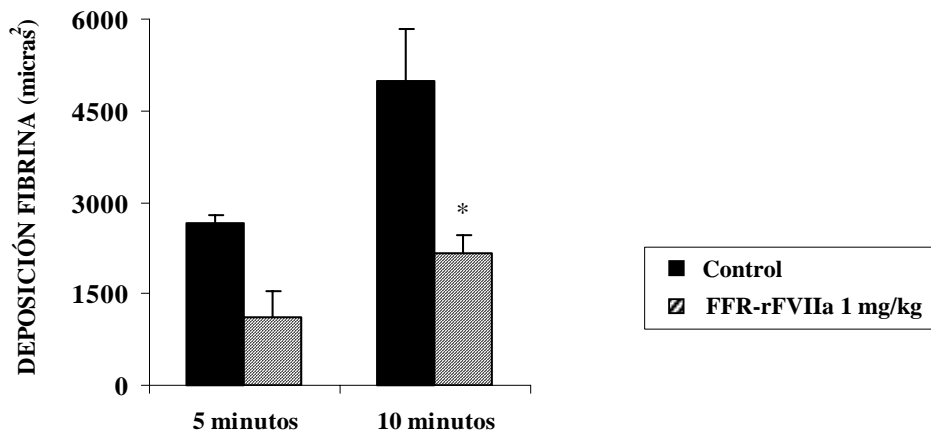


Figura 14. Deposición de fibrina sobre pared vascular con lesión vascular severa en ambas velocidades de cizalladura durante 5 y 10 minutos en el grupo control (5 minutos, n=6, 10 minutos, n=5) y en el grupo tratado con 1 mg/kg de FFR-rFVIIa (5 minutos, n=5, 10 minutos, n=5). * p<0,05 vs. grupo control.

Tratamiento *in vitro*

Una vez evaluado el efecto del tratamiento sistémico con FFR-rFVIIa sobre la trombosis, se evaluó la deposición plaquetaria sobre substratos tratados localmente con este compuesto para determinar si el TF, al que se une el FFR-rFVIIa, se encontraba en la pared vascular. Para ello se trataron substratos vasculares sanos y se perfundieron con sangre procedente de animales control (n=3). Se perfundieron substratos con lesión vascular ligera y severa, a alta y a baja velocidad de cizalladura durante 5 minutos.

Deposición Plaquetaria

La Figura 15A muestra la deposición plaquetaria al perfundir con sangre no tratada pared vascular sana con lesión ligera, a alta y baja velocidad de cizalladura. La deposición fue menor en pared vascular tratada con FFR-rFVIIa respecto a la tratada con suero fisiológico (control) cuando se perfundió a alta velocidad de cizalladura, pero no se encontraron diferencias significativas. A baja velocidad de cizalladura la deposición fue similar en los dos grupos de substratos. Tampoco se hallaron diferencias significativas en pared vascular sana con lesión severa (Figura 15B).

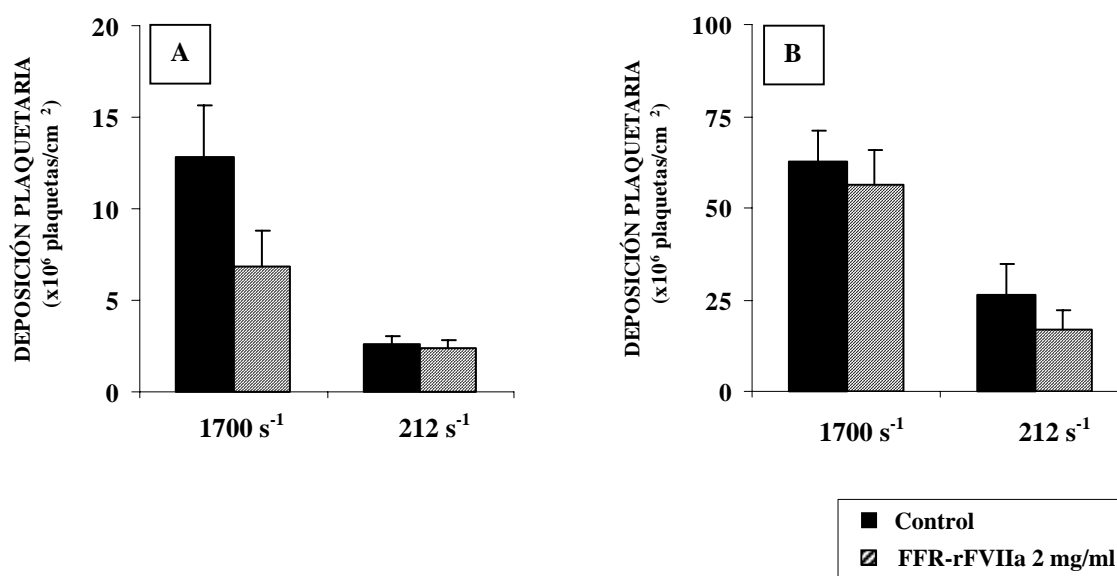


Figura 15. Deposición plaquetar total sobre pared vascular sana con lesión vascular ligera (A) y severa (B) a alta y a baja velocidad de cizalladura (1700s⁻¹ y 212 s⁻¹) tratada localmente con suero fisiológico (control) (1700 s⁻¹, n=13; 212 s⁻¹, n=11) y con FFR-rFVIIa (2 mg/ml) (1700 s⁻¹, n=12; 212 s⁻¹, n=10).

Localización de Factor Tisular en los Substratos Vasculares y en el Trombo

A partir de los mismos substratos destinados al estudio de la trombosis, se realizó el estudio de la presencia de TF (inmunohistoquímica) en el trombo, así como en las diferentes estructuras de la pared vascular expuestas a la circulación sanguínea. Tanto en el grupo control como en el tratado con FFR-rFVIIa (1 mg/kg), el trombo formado sobre subendotelio (lesión ligera) no presentaba TF (Figura 16A y 16B), mientras que el trombo formado sobre túnica media (lesión severa) era altamente positivo para TF (Figuras 16C y 16D). Además, al evaluar los mismos substratos con lesión severa teñidos por inmunofluorescencia para detección de fibrina (Figura 16E y 16F), se halló colocalización de ésta con TF. En la pared vascular no se encontró prácticamente marcaje de TF.

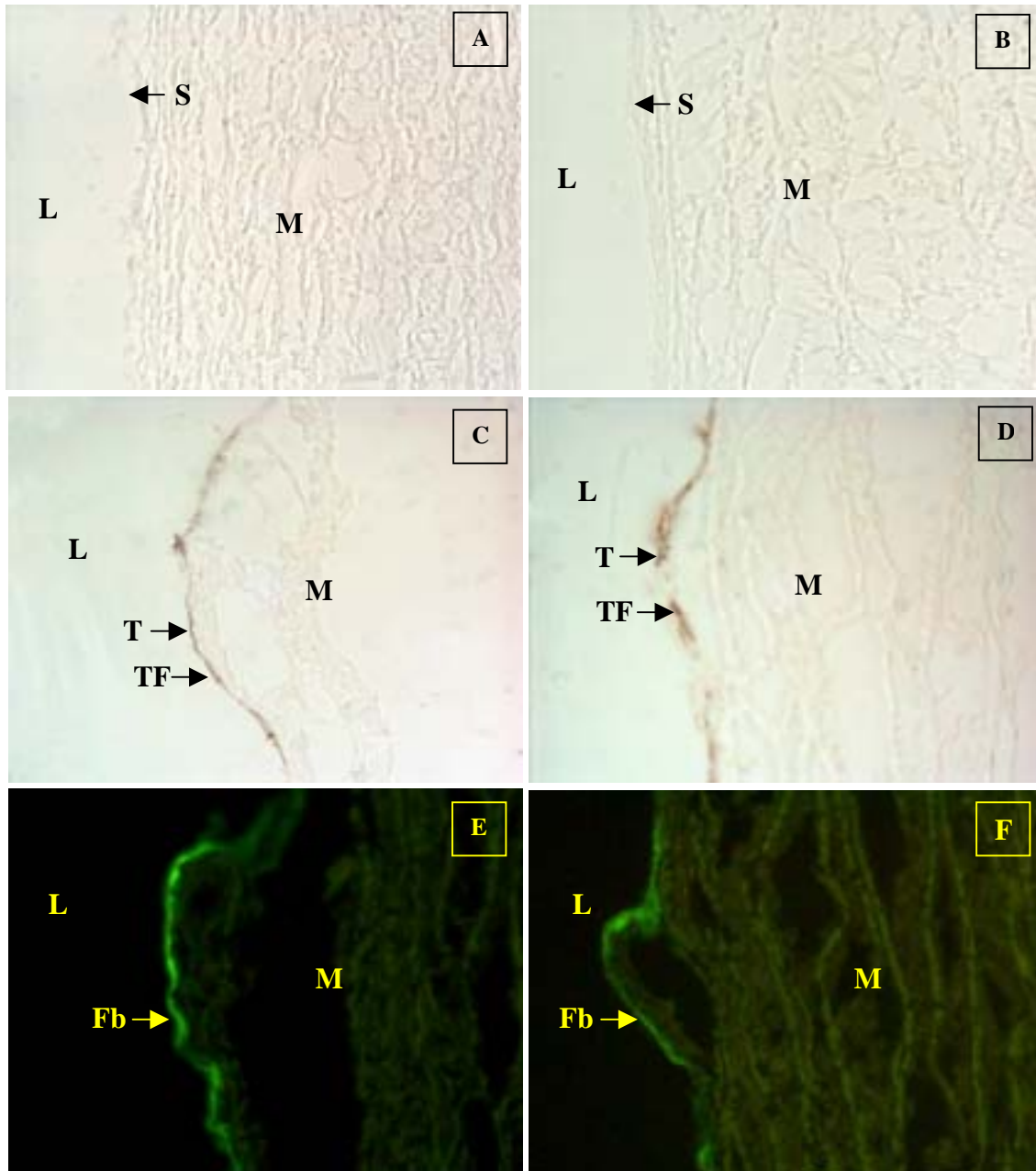


Figura 16. Micrografías de pared vascular con lesión vascular ligera (A y B) y severa (C, D, E y F) en el grupo control (A, C y E) y tratado con 1 mg/kg de FFR-rFVIIa (B, D y F) que se perfundieron en las cámaras de perfusión (x400 aumentos). En color marrón oscuro aparece el factor tisular, que se encuentra en el trombo formado sobre lesión severa, y en verde (inmunofluorescencia) la fibrina que colocaliza con el factor tisular del trombo. L, indica lumen; M, túnica media; S, subendotelio; T, trombo; TF, factor tisular; y Fb, fibrina.

Actividad Procoagulante del Factor Tisular Circulante

Para determinar la presencia de TF potencialmente activo en la sangre y el efecto del FFR-rFVIIa sobre éste, se determinó su actividad procoagulante en extractos de membranas celulares y vesículas obtenidos a partir de sangre de los grupos control y tratado con 1 mg/kg de FFR-rFVIIa. También se determinó la actividad del TF en extractos de sangre control incubados con solución HBSA (control) y 0,0125 mg/ml de FFR-rFVIIa.

La Figura 17 muestra los resultados de actividad procoagulante del TF en sangre. Se halló actividad del TF en ambos grupos, y el tratamiento tanto *in vivo* como *in vitro* la inhibió significativamente (Figura 17A, $p < 0,005$; Figura 17B, $p < 0,0001$). La inhibición fue mucho más acusada en el tratamiento *in vitro* (88%) que en el tratamiento *in vivo* (25%).

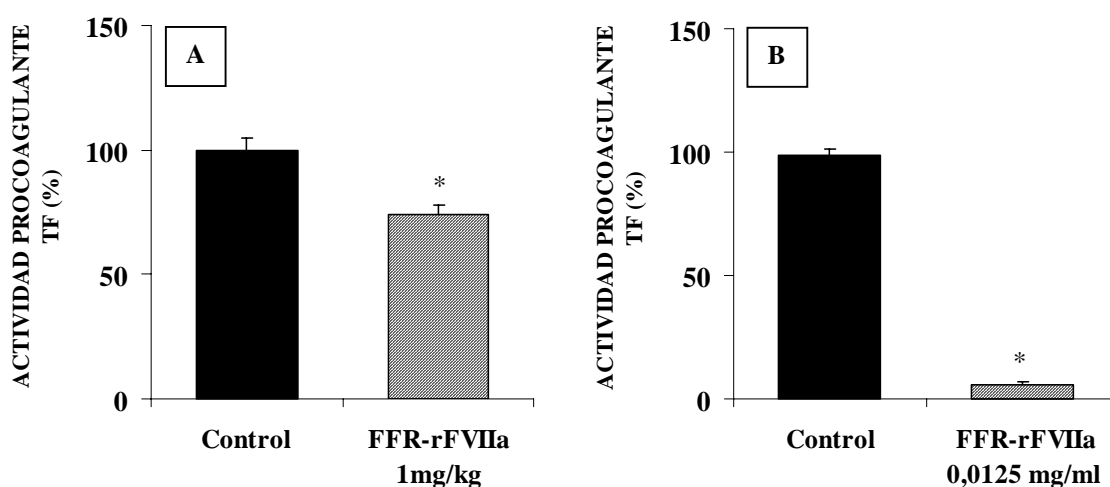


Figura 17. Actividad procoagulante del factor tisular (TF) en extractos de sangre total en el grupo control (n=9) y el grupo tratado con 1 mg/kg de FFR-rFVIIa (n=9) (A), y en extractos de sangre total del grupo control incubados *in vitro* con solución HBSA (control, n=5) y con FFR-rFVIIa (0,0125 mg/ml, n=5) (B).

Trombo Formado sobre Pared Vascular Aterosclerótica

Debido a que no se halló prácticamente TF en la pared vascular sana, se evaluó el efecto del FFR-rFVIIa sobre la trombosis desencadenada por pared vascular aterosclerótica (humana), que contiene gran cantidad de TF. El tratamiento se realizó de manera sistémica. En función de los resultados obtenidos sobre pared vascular sana, se eligió la dosis de 1 mg/kg (n=4), pero además se evaluó una dosis superior, 4 mg/kg (n=1), debido a la mayor presencia de TF en la zona de formación del trombo. Se realizaron perfusiones de 10 minutos a alta y baja velocidad de cizalladura.

Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación

En las Tablas 10 y 11 se resumen los datos del marcaje de coagulación y hematológicos durante los experimentos. Todos los valores, exceptuando el PT, se hallaron dentro de los intervalos de normalidad y se produjeron modificaciones significativas debidas al tratamiento. Como ya se ha comentado en apartados previos, el PT (% respecto al basal) aumentó significativamente (entre el minuto 15 y 130) tras la administración de FFR-rFVIIa.

PARÁMETRO	FFR-rFVIIa 1 mg/kg	FFR-rFVIIa 4 mg/kg
Viabilidad de plaquetas (%)	96,7 ± 0,2	97,6
Eficiencia (%)	97,2 ± 0,2	98,0
Plaquetas inyectadas (x10 ⁶)	7,4 ± 0,8	7,1
Dosis inyectada (μCi)	252 ± 1	250

Tabla 10. Resumen del marcaje de plaquetas en los grupos de tratamiento (FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=4; FFR-rFVIIa 4 mg/kg, n=1).

PARÁMETRO	FFR-rFVIIa 1 mg/kg		FFR-rFVIIa 4 mg/kg	
	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto
aPTT (% basal)	181 ± 25	174 ± 3	122 ± 1	162 ± 1
PT (% basal)	92 ± 2	171 ± 3*	78 ± 1	168 ± 3*
Fibrinógeno (mg/dl)	205 ± 10	147 ± 9	144 ± 3	139 ± 2
RBC (x10 ⁶ /μl)	4,6 ± 0,1	4,8 ± 0,1	4,8 ± 0,1	4,8 ± 0,1
HCT (%)	25,5 ± 0,4	24,2 ± 1,0	26,5 ± 0,6	26,1 ± 0,2
PLT (x10 ⁶ /μl)	387 ± 16	393 ± 8	487 ± 14	461 ± 2

Tabla 11. Principales valores medios de coagulación y hematológicos obtenidos durante el experimento de deposición plaquetaria en los grupos de tratamiento (FFR-rFVIIa 1 mg/kg, n=4; FFR-rFVIIa 4 mg/kg, n=1). * p< 0,05 vs. valor basal.

Tratamiento *in vivo*

Deposición Plaquetaria

Las Figuras 18 y 19 muestran la deposición total y axial obtenidas tras exponer pared vascular aterosclerótica a la circulación sanguínea en los tres grupos de tratamiento. Se halló una gran variabilidad en los valores causada por la heterogeneidad de las lesiones ateroscleróticas expuestas. Por ello, a pesar de las tendencias descritas no se obtuvo significación estadística en todos los casos.

En condiciones de alta velocidad de cizalladura, se observó una tendencia a una menor deposición plaquetaria, sobretudo con la dosis de 4 mg/kg (Figura 18A). Al realizar el análisis de la deposición axial se observó una tendencia más acusada con ambas dosis, incluso se obtuvo significación estadística en algunos segmentos (segmento b en el grupo tratado con 1 mg/kg, y segmento c en el grupo tratado con 4 mg/kg) (Figura 18B). A baja velocidad de cizalladura, ambas dosis inhibieron la deposición plaquetaria respecto al control, aunque sólo la dosis de 4 mg/kg lo hizo de manera significativa (p<0,05) (FFR-rFVIIa 1 mg/kg, p=0,07). Este efecto inhibitorio también se observó en la deposición axial, sobretudo en los segmentos b y c (Figura 19B). El patrón típico de la deposición axial (segmento a ≥ segmento b ≥ segmento c) sólo se cumplió en algunos casos, sobretudo en condiciones de alta velocidad de cizalladura (Figuras 18B y 19B).

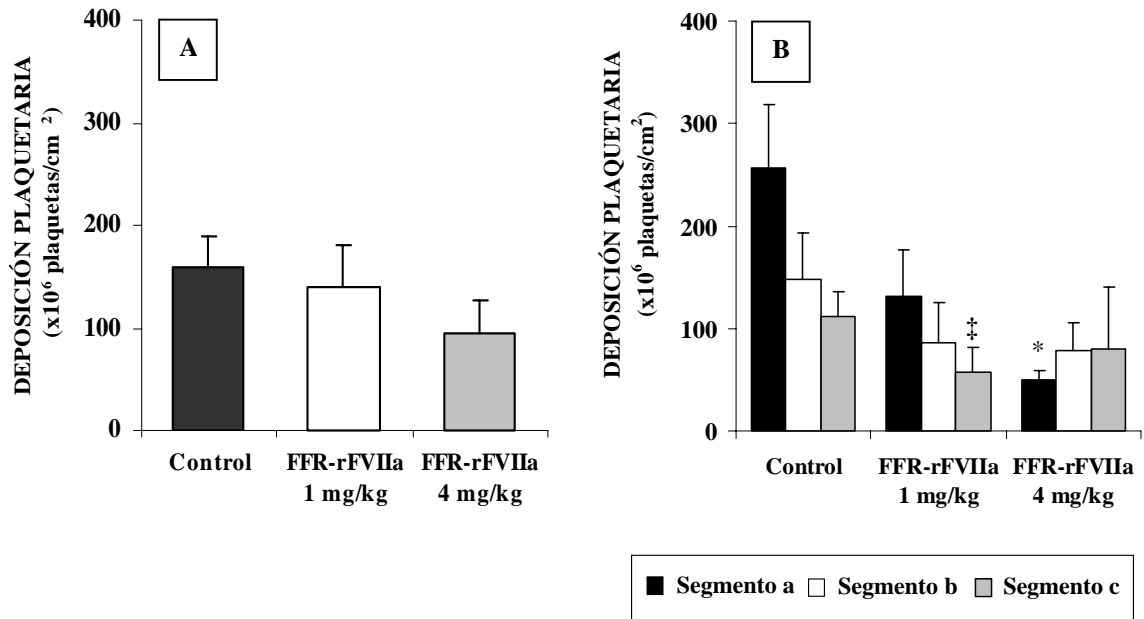


Figura 18. Deposición plaquetaria total (A) y axial (B) sobre pared vascular aterosclerótica a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}), en los tres grupos de dosis (Control, $n=19$; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, $n=14$; FFR-rFVIIa 4 mg/kg, $n=6$). Gráfica A: * $p<0,05$ vs. grupo control; Gráfica B: * $p<0,05$ vs. grupo control en el segmento a, y ‡ $p<0,05$ vs. grupo control en el segmento c.

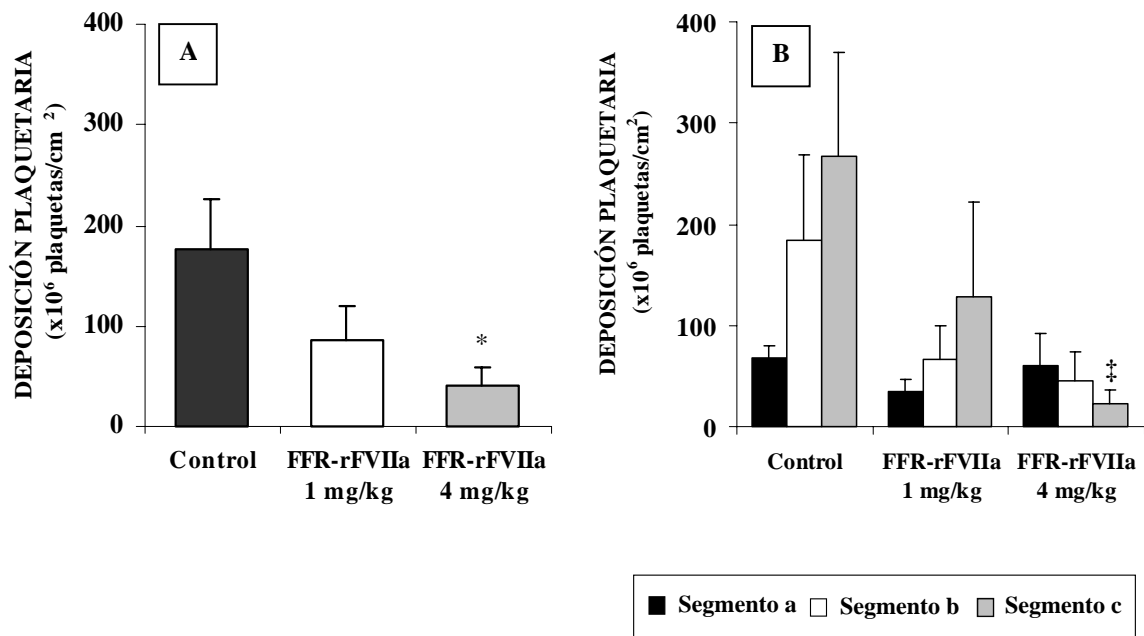


Figura 19. Deposición plaquetaria total (A) y axial (B) sobre pared vascular aterosclerótica a baja velocidad de cizalladura (212 s^{-1}), en los tres grupos de dosis (Control, $n=19$; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, $n=14$; FFR-rFVIIa 4 mg/kg, $n=8$). Gráfica A: * $p<0,05$ vs. grupo control; Gráfica B: ‡ $p<0,05$ vs. grupo control en el segmento c.

Cuantificación de la Fibrina Presente en el Trombo

Se seleccionaron substratos (segmento axial b) representativos de cada grupo, se localizó la fibrina mediante inmunohistoquímica y se cuantificó (análisis de imagen). La Figura 20 muestra la deposición de fibrina en los tres grupos. Tanto a alta como a baja velocidad de cizalladura las dosis de 1 y 4 mg/kg de FFR-rFVIIa inhibieron significativamente la fibrina depositada en sobre los substratos ateroscleróticos (1700 s^{-1} , $p < 0,05$; 212 s^{-1} , $p < 0,05$).

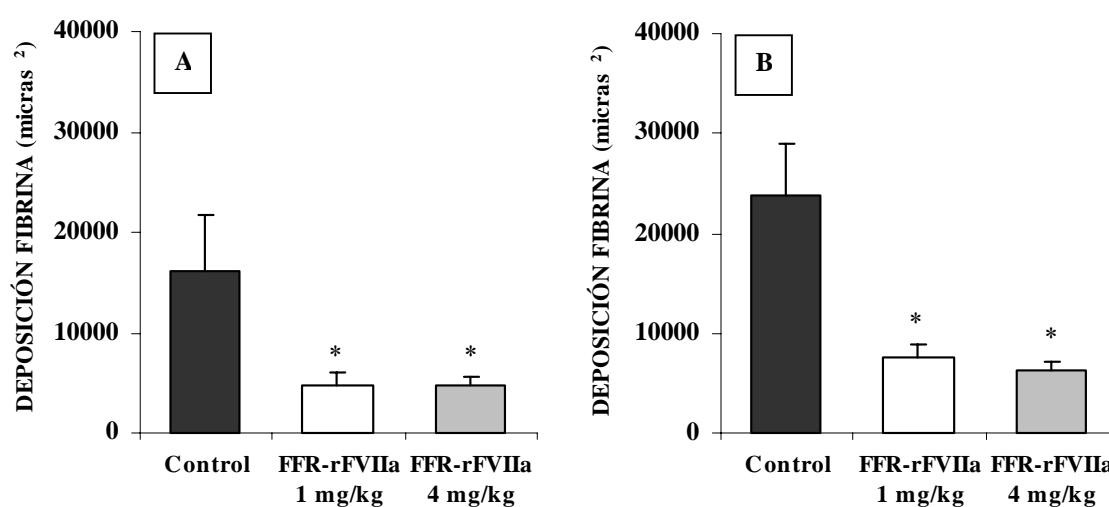


Figura 20. Deposición de fibrina sobre pared vascular aterosclerótica a alta (1700 s^{-1}) (A) y baja (212 s^{-1}) (B) velocidad de cizalladura, en los tres grupos de dosis (Control, $n=4$; FFR-rFVIIa 1 mg/kg, $n=4$; FFR-rFVIIa 4 mg/kg, $n=4$). * $p < 0,05$ vs. grupo control.