



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisi3n de Ci3ncias de la Salut
Facultad de Medicina

**EL COMPLEJO FACTOR VIIa - FACTOR TISULAR Y SU PAPEL
COMPENSATORIO EN LAS DISFUNCIONES HEMOSTÁTICAS**

Tesis presentada por Raúl Tonda Hernández, licenciado en Biología por la Universidad de Barcelona para optar al grado de Doctor.

Tesis dirigida por el Dr. **GINÉS ESCOLAR ALBALADEJO** y la Dra. **ANA MARÍA GALÁN SILVO**.

Barcelona, Enero 2007

1. JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DEL TEMA

1.1 Fisiología de la hemostasia

La hemostasia es el resultado de un delicado equilibrio entre el mantenimiento de la sangre en estado fluido y una rápida reacción ante un daño vascular que permita detener la pérdida de sangre y restaurar la pared vascular. La alteración por defecto de la hemostasia desencadena complicaciones hemorrágicas, mientras que por exceso da lugar a patologías trombóticas. El Factor Hístico, más conocido por su denominación sajona, **Factor Tisular** (FT) es uno de los principales responsables de la hemostasia en las zonas de daño vascular. Además, se conoce desde hace tiempo que esta proteína está implicada en procesos inflamatorios, trombóticos e incluso angiogénicos (Mackman, 2006).

En condiciones fisiológicas, la sangre se mantiene en estado fluido mediante los sistemas de anticoagulación endógenos, principalmente la antitrombina, el inhibidor de la vía del Factor Tisular (TFPI) y el sistema de la proteína C. Además, las células endoteliales recubren la cara interna de arterias y venas, impidiendo que la sangre circulante interactúe con la matriz extracelular producida por las células endoteliales (ver Figura 1). Esta matriz, que forma parte del subendotelio, queda expuesta tras una lesión vascular y es altamente reactiva para las plaquetas. Cuando la sangre circulante entra en contacto con la matriz extracelular se generan agregados plaquetarios y se activa la coagulación en las inmediaciones de la zona dañada, generándose un tapón que restaurará la integridad del vaso.

El mantenimiento de la hemostasia requiere la interacción de elementos vasculares con elementos sanguíneos, tanto celulares como plasmáticos. Tradicionalmente, los procesos hemostáticos se han diferenciado en: aquellos en los que intervienen las plaquetas, conocidos como **hemostasia primaria**, y aquellos en los que intervienen los factores de la cascada de coagulación, también denominada **hemostasia secundaria**. Hasta ahora se entendía que las plaquetas cubrían las zonas dañadas y que, posteriormente, tras la activación de la coagulación, se formaba una

mall de fibrina que estabilizaba el tapón plaquetario (ver Figura 2). Aunque esta forma de entender la hemostasia es muy didáctica, los nuevos modelos sobre la hemostasia defienden que tanto los procesos de la hemostasia primaria como de la secundaria se dan de forma simultánea (Hoffman, 2001).

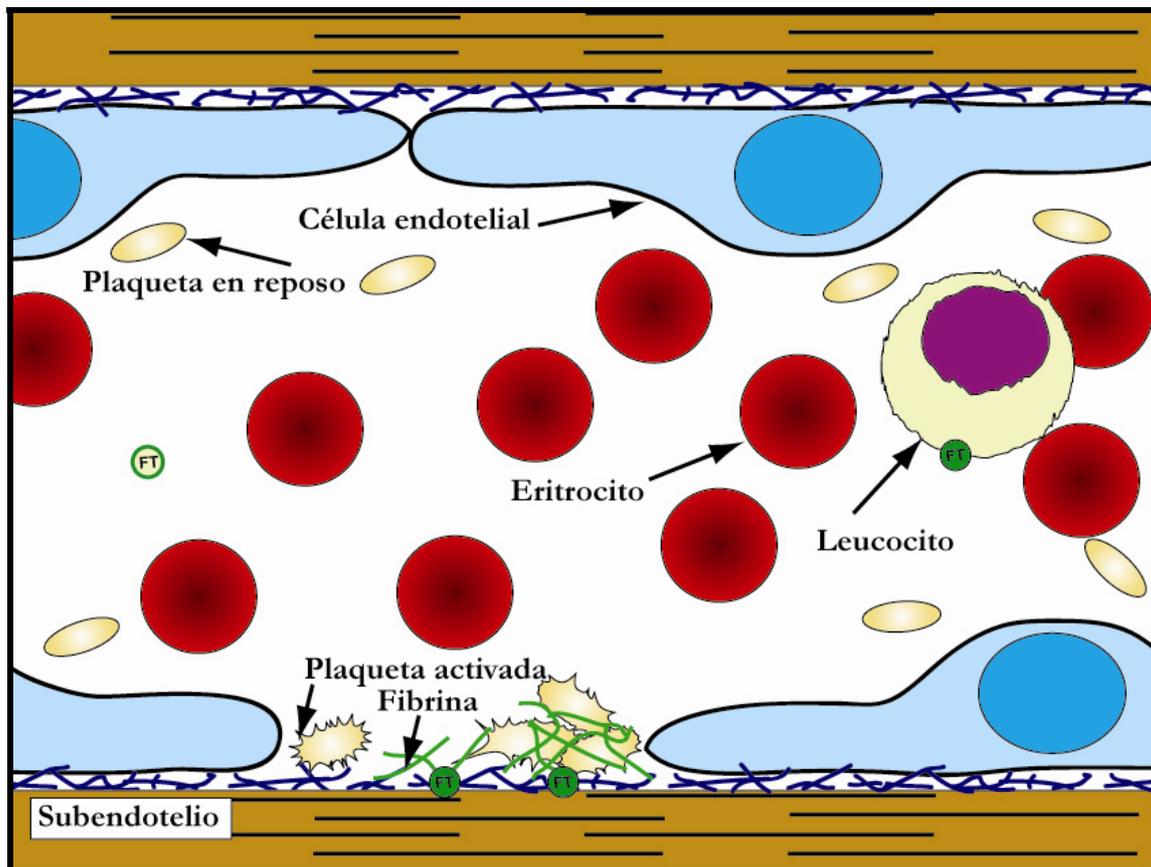


Figura 1: En condiciones fisiológicas la sangre circula sin interactuar con la pared de los vasos. Cuando se produce una lesión vascular, se activan los mecanismos hemostáticos mediados por las plaquetas y el sistema de coagulación, pero en los que también intervienen los leucocitos, los eritrocitos y micropartículas de origen diverso.

Cuando se produce una lesión vascular, quedan expuestas las principales proteínas adhesivas del subendotelio, principalmente colágeno y factor de von Willebrand (FVW). Estas proteínas son reconocidas por receptores específicos de la membrana plaquetaria, lo cual las frena en la zona lesionada. Esta fase se conoce como **arresto** o **contacto**. Las plaquetas entonces se adhieren y cubren al máximo la zona lesionada (fase de **adhesión**) y finalmente establecen agregados entre ellas (fase de formación del **trombo**) mediante puentes de fibrinógeno (FGN) y FVW. Paralelamente, la exposición de FT en la zona dañada desencadena la activación de la cascada de coagulación, que tiene como producto final la generación de trombina.

La trombina es una serin proteasa que juega un papel central en la hemostasia, no sólo regulando el nivel de activación de la coagulación en diversos puntos (tanto retroactivándola como inhibiéndola) sino también activando plaquetas. Asimismo, es capaz de transformar el FGN en una malla de fibrina que estabilizará el tapón plaquetario (Mann, 2003).

Paralelamente a todos estos procesos, la trombina que queda en las cercanías de la zona regenerada activa los mecanismos de disolución del tapón hemostático para prevenir posibles complicaciones trombóticas.

Aunque las plaquetas son los principales elementos celulares que intervienen en la hemostasia, otras células sanguíneas, como los eritrocitos y los leucocitos también juegan un papel importante en el proceso. Incluso las micropartículas procedentes de estas células, que tradicionalmente se habían considerado “platelet’s dust” desempeñan un papel fundamental en los nuevos modelos de hemostasia como transportadoras de FT circulante (ver Figura 1).

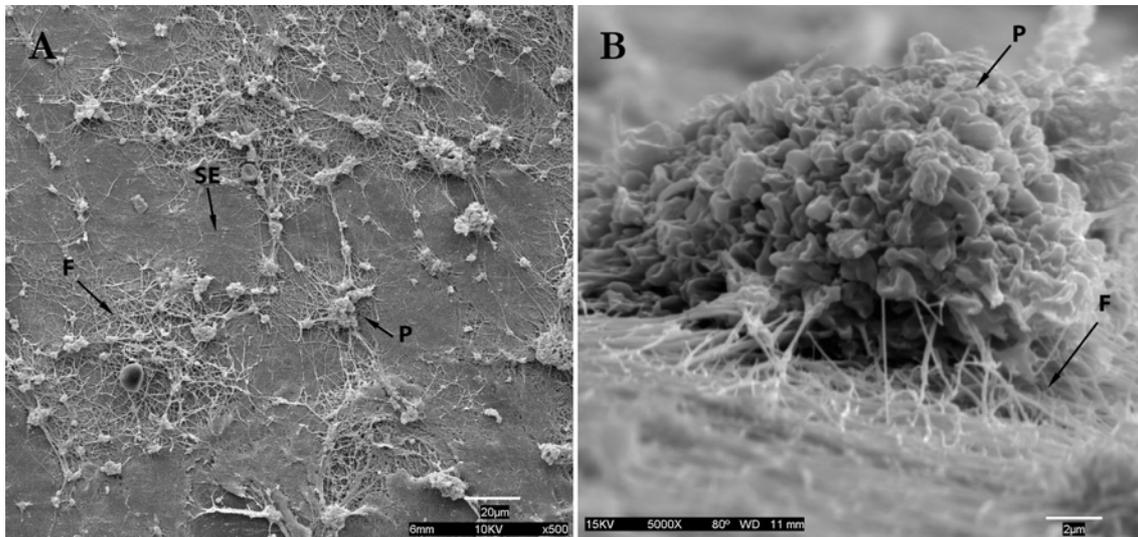


Figura 2: Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de segmentos vasculares perfundidos con sangre entera durante 10 minutos. A) Las plaquetas (P) se depositan sobre el subendotelio (SE) expuesto, mientras paralelamente se forma una malla de fibrina (F) que estabiliza el tapón plaquetario. B) Detalle a mayor aumento.

Las condiciones reológicas que se producen a lo largo del sistema vascular son importantes para la hemostasia. Los glóbulos rojos, de mayor tamaño que las plaquetas, circulan por el centro del vaso, empujando a las plaquetas hacia la pared vascular, favoreciendo que tras una lesión vascular las plaquetas interactúen con la zona dañada (Aarts, 1988). Este fenómeno se conoce con el nombre de difusión radial inducida por las condiciones reológicas. Se sabe desde hace unas décadas que en situaciones clínicas en las que el hematocrito está disminuido se produce una disfunción hemostática asociada a una deficiencia en la interacción plaqueta-subendotelio (Zwaginga, 1991; Papadimitriou, 1993). Estudios *in vitro* de nuestro grupo demostraron que una reducción del hematocrito disminuye la interacción plaquetaria en zonas dañadas (Escolar, 1988). Además de su importante papel en la reología, los glóbulos rojos intervienen en la activación plaquetaria ya que transportan y liberan

ADP (Valles, 1998), que es un agonista capaz de activar las plaquetas a través de receptores específicos presentes en la membrana plaquetaria.

Como se verá en apartados posteriores (apartados 1.4 y 1.5), los nuevos modelos de la hemostasia atorgan a los leucocitos un papel cada vez más relevante en la hemostasia. Esto es debido sobre todo a su capacidad para generar y transportar FT, constituyendo una fuente circulante de FT (Kjalke, 1998; Giesen, 1999). También desempeñan un papel en la activación plaquetaria a través de la liberación de citocinas, que pueden actuar como atrayente de plaquetas y formar agregados heterotípicos con plaquetas. Igualmente, en los modelos actuales de la coagulación los leucocitos, principalmente los monocitos, son transportadores de FT y generadores de micropartículas ricas en FT con un claro efecto prohemostático, pero también protrombótico en determinadas ocasiones.

1.2 Las plaquetas

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados generados en la médula ósea a partir de los megacariocitos. Tienen una vida media de 7 a 10 días en circulación y, pasado este tiempo, si no han ejercido su función se destruyen en el bazo. En condiciones de reposo tienen forma discoide y un tamaño comprendido entre 2 y 3 μm . Sin embargo, tras su activación, las plaquetas pueden multiplicar su tamaño para extenderse sobre las zonas dañadas.

Según la literatura médica se considera que circulan en sangre en una concentración comprendida entre 150000 y 400000 plaquetas por microlitro, aunque en el área del Mediterráneo los recuentos suelen ser menores y los valores de normalidad se sitúan entre 150000 y 250000 plaquetas por microlitro.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la principal función de las plaquetas es formar un tapón para evitar la pérdida de sangre cuando se produce una

lesión vascular. Para ello, las plaquetas disponen de dos funciones principales: una función proadhesiva y una función procoagulante. Mediante la función proadhesiva, las plaquetas son capaces de reconocer una superficie dañada, extenderse sobre ella para cubrirla e interactuar entre ellas para dar lugar a la formación del trombo primario (Stassen, 2004). La otra función plaquetaria, a menudo obviada, es la capacidad procoagulante, que permite a las plaquetas activadas exponer en su membrana fosfolípidos aniónicos. De esta manera, se crea una superficie óptima para el ensamblaje de los complejos enzimáticos de la coagulación que darán lugar a la generación de trombina (Mann, 2003).

La función proadhesiva de las plaquetas está mediada por glicoproteínas presentes en la membrana, capaces de reconocer las proteínas expuestas en zonas de daño vascular. Entre los principales complejos receptoriales que garantizan el funcionalismo plaquetario se encuentran los complejos **GPIb-IX-V** y **GP IIb-IIIa**, aunque también existen otros receptores, como los del colágeno (GPIa/IIa, GPIV, GPVI), receptores de ADP (P2Y₁₂) o receptores de la trombina. Aunque no es objeto de esta introducción un repaso bibliográfico de los receptores plaquetarios. Únicamente, se mencionará la función de los receptores implicados en algunas de las patologías estudiadas en esta tesis. El complejo glicoproteína Ib-IX-V reconoce el daño vascular a través de su unión al FvW del subendotelio (de Groot, 1988; Andrews, 1999). Este primer estadio juega un papel importante en la detención de las plaquetas (contacto), e inicia la señalización intraplaquetar. Tras esta activación plaquetaria, se produce un cambio conformacional en el complejo GPIIb-IIIa, dejando expuesto el lugar de unión para el FGN. La unión del complejo GPIIb-IIIa al FGN, en presencia de Ca⁺⁺, posibilita la formación de puentes interplaquetarios que dan lugar a la formación del agregado. Además, este mismo complejo también posibilita la unión de las plaquetas a otros tipos celulares como los leucocitos (Spangenberg, 1993), o a otras proteínas adhesivas como la vitronectina, fibronectina y FvW. La unión de estas

proteínas al complejo GPIIb-IIIa está determinada por la presencia de la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD) en las proteínas (Pytela, 1986).

1.3 Los factores de coagulación

Aparte de por las plaquetas, el mantenimiento de una correcta hemostasia viene asegurado por el sistema de la coagulación.

Evolutivamente, el sistema de la coagulación aparece en estados tempranos, y se va complicando mediante duplicaciones de genes y translocaciones cromosómicas, que dan lugar a nuevos factores intermedios (Davidson, 2003).

El sistema de la coagulación está compuesto por una serie de factores, en su mayoría serin proteasas y cofactores, que se van activando de forma secuencial, amplificando la respuesta a una lesión (Figura 3). Los factores de la coagulación se sintetizan en su mayoría en el hígado, con excepción del FT, y su síntesis es vitamina K-dependiente (Mann, 2005). Estos factores circulan en la sangre en forma inactiva (proenzimas) y tienen una vida media que varía entre minutos y 7 días (Roberts, 2004).

En la década de los 60 se adoptó la nomenclatura de los factores basada en números romanos, adjuntando una "a" para denominar a los factores activados. En 1964, Macfarlane hace la primera referencia comparando la activación de la coagulación con una cascada de la coagulación (Macfarlane , 1964). A partir de entonces, el concepto de cascada se desarrolla y amplía dando lugar al esquema que diferencia entre vía extrínseca e intrínseca. Tradicionalmente se considera que la vía intrínseca es la que se activa en contacto con superficies extrañas, mientras que la vía extrínseca es la que se inicia por la exposición de FT tras la ruptura de la pared vascular (Nemerson, 1972).

Además de los factores de coagulación, para el desencadenamiento de la coagulación se necesita calcio y una superficie fosfolipídica sobre la que se ensamblen

los complejos enzimáticos de la coagulación (Mann, 2005). La presencia de calcio es tan esencial que incluso algunos anticoagulantes de uso analítico, como el citrato y el EDTA, están basados en la quelación de este ión. En cuanto a los fosfolípidos, y como ya ha sido mencionado anteriormente, es necesaria la presencia de una superficie rica en fosfolípidos aniónicos, principalmente fosfatidil-L-serina (PS), para el correcto ensamblaje de los complejos enzimáticos de la coagulación, especialmente el complejo tenasa (FVIIIa+FIXa+Ca²⁺+fosfolípidos (PL)) y el complejo protrombinasa (FXa+FVa+Ca²⁺+PL). Esta superficie fosfolípídica está proporcionada in vivo por la membrana de plaquetas activadas que han expuesto PS.

La culminación de la coagulación da lugar a la generación de trombina, que proteoliza el fibrinógeno, formando fibras insolubles de fibrina. El FXIII establece puentes entre las diferentes fibras de fibrina, creándose una malla de fibrina que estabiliza el tapón plaquetario en la zona lesionada (Mann, 2005).

La trombina generada activa nuevas plaquetas y retroactiva la cascada de la coagulación en varios puntos, amplificando así la respuesta al daño (Mann, 2003).

Sin embargo, dado que la hemostasia es un proceso de balances, también existen mecanismos naturales que controlan la excesiva activación de la coagulación y evitan la aparición de episodios trombóticos o estados protrombóticos. La trombina generada, como consecuencia de la activación de la coagulación, también activa los mecanismos inhibitorios de la cascada de coagulación (antitrombina, proteína C reactiva y TFPI), activa la vía fibrinolítica mediada por plasmina y activa la fibrinólisis mediada por TAFI (ver figura 3).

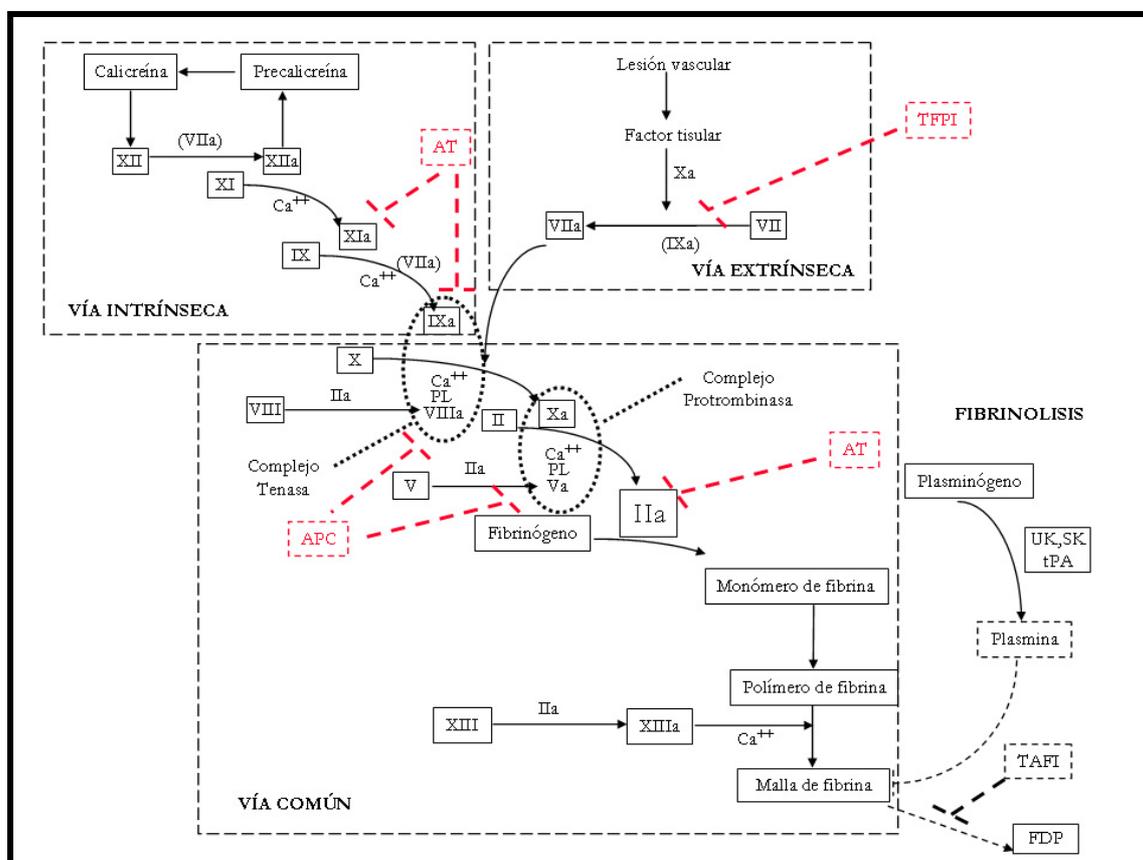


Figura 3: Concepto clásico de la cascada de la coagulación. La coagulación se puede desencadenar por dos mecanismos independientes, la vía extrínseca o la intrínseca, que convergen en una vía común, y dan lugar a la generación de trombina, lo cual generará una malla insoluble de fibrina que estabilizará el tapón plaquetario formado. Los mecanismos fibrinolíticos, mediados por la plasmina, degradarán esta malla de fibrina. APC= Activated Protein C, AT= Antitrombina, FDP= Fibrin Degradation Products, SK= Streptokinasa, TAFI= Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor, TFPI= Tissue Factor Pathway Inhibitor, tPA= Tissue Plasminogen Activator, UK= Urokinasa.

1.4 Modelo actual de coagulación

Aunque el modelo en cascada de la coagulación, con la subdivisión en vía intrínseca y extrínseca, ayudó mucho a la identificación de factores y cofactores, en la actualidad tal subdivisión ha quedado en parte obsoleta y se ha propuesto un nuevo modelo donde no existe dicha subdivisión (Hoffman, 2001). Estudios realizados a finales de la década de los 90s, demostraron la existencia de FT circulante en sangre con un papel controvertido en la hemostasia y en la trombosis (Giesen, 1999).

En el año 2001 Hofmann y colaboradores proponen el modelo actual de coagulación según el cual la coagulación se da en tres fases: iniciación, amplificación y propagación. Este nuevo modelo, posteriormente revisado, otorga un papel importante en la coagulación a las plaquetas y a la existencia de una fuente circulante de FT, que en principio se identificó en células transportadoras (como los leucocitos) y que posteriormente también se ha asociado a microvesículas (ver Figura 4).

La **fase de iniciación** empieza cuando el factor tisular del subendotelio se une a FVIIa y activa FX, que pasa a FXa. A la vez, el complejo FT/FVIIa activa el FIX, que pasa a FIXa. El FXa activa el FV plasmático y forman un complejo en la membrana celular que permite formar una pequeña cantidad de trombina (FIIa). Si el FXa se aleja de la membrana celular es rápidamente inactivado por TFPI o por la antitrombina.

La trombina generada en la primera fase es incapaz de activar por completo la cascada de la coagulación pero hace que se activen las plaquetas en la zona dañada y los factores V, VIII y XI sobre la membrana de la plaqueta activada (**fase de amplificación**). Esto facilitará que en la **fase de propagación** se ensamblen complejos tenasa (FVIIIa-FIXa + Ca²⁺) y protrombinasa (FXa-FVa + Ca²⁺) sobre la membrana de la plaqueta activada (rica en PS), que generarán una gran cantidad de trombina. Esta trombina proteolizará el fibrinógeno dando lugar a monómeros de fibrina, que se ensamblan y se entrecruzan generando una malla de fibrina insoluble

que estabiliza el tapón plaquetario. Paralelamente, tras la generación de trombina se activan también los mecanismos de fibrinólisis y anticoagulación mencionados en el apartado 1.3.

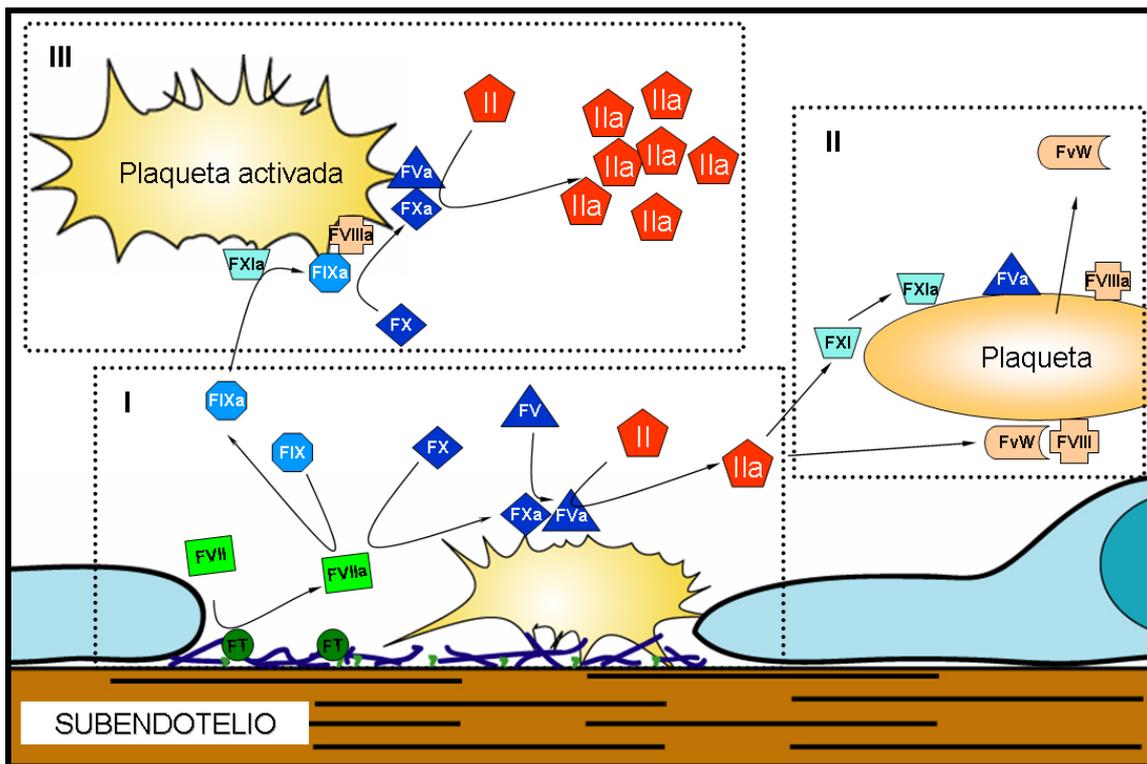


Figura 4: El actual modelo de la coagulación propone un desencadenamiento de la cascada de coagulación en tres fases: iniciación (I), amplificación (II) y propagación (III). En la fase de iniciación, desencadenada tras la exposición de FT, se produce una pequeña cantidad de trombina que permite, en la siguiente fase de propagación (II), activar plaquetas y los factores V, VIII y XI en la membrana de las plaquetas activadas. En la fase de amplificación (III), el ensamblaje de complejos tenasa y protrombinasa produce un gran aumento de la trombina generada, y por tanto la generación de fibrina en la zona lesionada que estabilizará el tapón hemostático.

1.5 El complejo FT-FVIIa como eje central de la coagulación

El principal activador del sistema de la coagulación *in vivo* es el FT. Esta proteína es codificada por un gen de 6 exones que da lugar a un propéptido de 295 aminoácidos (Mackman, 1989). Tras la eliminación del péptido señal de 32 aminoácidos que hace que la proteína se localice en la membrana celular, la proteína transmembrana madura tiene un peso de 42-45 KDa en su pauta de lectura normal, si bien, se ha descrito una forma de FT circulante no asociada a membranas producida por splicing alternativo (Bogdanov, 2003).

En algunos tejidos se expresa de forma constitutiva creando una barrera para evitar la pérdida de sangre si se produce una lesión vascular, mientras que en otros tejidos se expresa inducido por interleuquinas o como respuesta a una inflamación. No obstante, no todo el FT que se expresa en la membrana de las células está activo, por lo cual no se puede correlacionar la cantidad de FT presente en las membranas con la actividad como cofactor del FVII(a). Existe una parte del FT que permanece inactivo o encriptado (Bach, 2006). Una de las teorías para explicar este fenómeno defiende que en estado de reposo el FT se encuentra dimerizado en la membrana y que tras la activación celular se produce una reorganización de la membrana que hace que se separen las unidades y sean activas (Key, 2001). Sin embargo se requiere más evidencia en literatura que corrobore esta teoría.

Estudios recientes indican que existe un pool de FT en la sangre, también conocido como “blood-borne TF”, asociado a micropartículas (Giesen, 1999). La contribución de este FT circulante a la hemostasia es controvertida, aunque posiblemente está implicado en la progresión de los trombos oclusivos. Se ha postulado, empleando matemáticos, que debe existir una fuente circulante de FT que permita la progresión del trombo, ya que las plaquetas depositadas y la fibrina formada actúan como barrera impermeable que impide que el FX se active en el FT vascular (Hathcock, 2004). Interesantemente, mediante combinación de técnicas de

inmunolocalización y de perfusión en tiempo real, se pudo observar como colocalizaban micropartículas ricas en FT y trombos en formación (Balasubramanian, 2002; Falati, 2002). Sin embargo son necesarios estudios que determinen si este FT circulante es causante o producto de un estado inflamatorio.

El FVII(a) es el principal ligando natural del FT y principal activador del complejo. En condiciones fisiológicas sólo el 1% del FVII circulante en sangre está en forma activa. Como se ha comentado en apartados anteriores, el complejo FT-FVIIa inicia la coagulación y activa el FX y FIX. El complejo FT-FVIIa es 100 veces más eficiente en la proteólisis del FX que el FVIIa libre (Martin, 1995).

El principal inhibidor endógeno de la vía del factor tisular es el TFPI, que ejerce su función uniéndose al complejo FT-FVIIa e impide que catabolice más FIX y FX (Mackman, 2006).

1.6 Alteraciones de la hemostasia primaria y secundaria

Como ya se ha mencionado anteriormente, los trastornos de la hemostasia se pueden dividir en: a) trastornos hemorrágicos por déficit de hemostasia que cursan con episodios de sangrado y b) trastornos trombóticos por exceso de hemostasia que pueden dar lugar a trombosis o accidentes isquémicos cardiovasculares. Los trabajos incluidos en esta tesis doctoral se centran principalmente en el estudio de los trastornos hemorrágicos y su corrección.

Los trastornos hemorrágicos pueden clasificarse en dos grandes grupos: a) aquellos relacionados con recuentos plaquetarios bajos o con un funcionalismo deficiente de las plaquetas y b) aquellos que se caracterizan por la carencia o disfunción de alguno de los factores de coagulación. El tratamiento de estas patologías se basa principalmente en la administración exógena del elemento deficitario, obtenido de productos derivados del fraccionamiento de la sangre (terapia sustitutiva), o en la

administración de fármacos con acción prohemostática. La utilización de terapias sustitutivas con concentrados de plasma y de plaquetas para la prevención y control de la sintomatología hemorrágica ha mejorado el pronóstico de estas patologías. Sin embargo, estas estrategias tienen riesgos asociados tales como la hemodilución de los factores de coagulación, refractariedad a los productos transfundidos y generación de anticuerpos, el aumento de presión portal, coagulación intravascular diseminada o riesgos de transmisión de enfermedades por transfusión (Pagliaro, 1992; Levi, 2002).

En la década de los 80 se produjeron numerosos casos de transmisión de agentes patógenos asociados a la administración de derivados sanguíneos contaminados. Esto produjo un gran revuelo mediático y alarma social, lo cual condujo al desarrollo de técnicas de reducción de patógenos y alternativas a la transfusión que incrementaron la seguridad transfusional.

En las últimas décadas, han irrumpido en el mercado fármacos con carácter prohemostático de naturaleza química u obtenidos mediante tecnología recombinante. En el primer grupo de fármacos se encuentran los antifibrinolíticos (ácido gamma-amino caproico, ácido tranexámico) y la desmopresina (DDAVP, análogo sintético de la vasopresina). Estos fármacos han sido utilizados en clínica para el tratamiento, entre otros, de pacientes con enfermedad de von Willebrand y en pacientes urémicos. Los primeros factores de la coagulación recombinantes en ser utilizados en el control de la hemostasia en pacientes hemofílicos fueron factor VIII (FVIII) y factor IX (FIX) (Wood, 1984). Estos han demostrado ser tan eficaces como los factores purificados, pero sin los inconvenientes de transmisión de patógenos (Schwartz, 1990). En la actualidad existe controversia respecto a si los productos recombinantes inducen mayor generación de anticuerpos inhibidores que los productos plasmáticos o no. Actualmente, el principal inconveniente de este tipo de estrategia terapéutica es su elevado coste y una disponibilidad no siempre constante.

Existía una serie de pacientes de difícil manejo que eran aquellos pacientes hemofílicos que desarrollaban anticuerpos contra el FVIII y en los cuales el tratamiento con FVIII no tenía efecto. Para tratar a estos pacientes se crearon los fármacos conocidos como agentes baipás, ya que puntúan la falta de los factores FVIII y FIX. Dentro de este tipo de fármacos se encuentran los complejos protrombónicos (derivados plasmáticos) y el rFVIIa. Así, el Factor VII activado recombinante (rFVIIa) fue ideado para tratar a estos pacientes hemofílicos que desarrollaban inhibidores (Schmidt, 1994), donde demostró una elevada eficacia clínica (Hedner, 1992). Ha sido en los años posteriores donde la acción de baipás del rFVIIa también ha demostrado eficacia en el control de hemorragias en pacientes con trombocitopatías, trombocitopenias y otros defectos de coagulación (Hedner, 1998), e incluso en pacientes con politraumatismos o con sangrados incoercibles (Martinowitz, 2002). La amplia eficacia clínica ha hecho que algunos autores lo consideren un agente hemostático universal (Hedner, 2000a). Los resultados clínicos y experimentales con rFVIIa revelan la importancia clínica del complejo FVIIa-FI y su papel compensatorio en las disfunciones hemostáticas pero actualmente existe un debate en la comunidad científica sobre el mecanismo de acción del rFVIIa, que aún no ha sido completamente elucidado.

Los trabajos comprendidos en esta tesis doctoral estudian el papel compensatorio del FI-FVIIa en diferentes disfunciones hemostáticas, tanto trombocitopatías como coagulopatías. Dentro de las trombocitopatías se recoge el déficit congénito de GPIIb-V-IX (síndrome de Bernard-Soulier), el déficit congénito de GPIIb/IIIa (trombastenia de Glanzmann), la cirrosis hepática y finalmente la trombopenia inducida en condiciones experimentales. Las coagulopatías incluidas en esta tesis son la cirrosis hepática, el exceso de tratamiento anticoagulante oral (que disminuyen los niveles de factores de coagulación), la hemofilia A grave (déficit

congénito de FVIII) y finalmente la hemofilia A grave con aloanticuerpos inhibidores (déficit adquirido de FVIII).

1.7 Sistemas de estudio de la hemostasia

Uno de los problemas con los que se encuentra el estudio de fármacos o terapias con carácter prohemostático o antitrombótico es el establecimiento de una metodología que permita estudiar en el laboratorio la eficacia de estos productos en condiciones lo más parecidas a las fisiológicas. No podemos olvidar que uno de los grandes retos del estudio de la hemostasia es que en condiciones fisiológicas la hemostasia se produce en condiciones de flujo, lo que puede condicionar la activación de la coagulación y las plaquetas.

Por tanto, dado que la hemostasia se da en condiciones de flujo, los estudios encaminados a analizar los mecanismos hemostáticos no deberían realizarse en condiciones estáticas sino que deberían simular las condiciones que se dan fisiológicamente.

Las condiciones reológicas se modifican a lo largo del árbol vascular. La cizalladura o fricción a la que se somete la sangre varía en función del calibre de los vasos y la situación territorial. Así, el flujo sanguíneo es muy rápido en los vasos de menor diámetro y lento en los vasos grandes (ver Figura 5). En condiciones fisiológicas la sangre es sometida a coeficientes de cizalladura comprendidos entre 300 y 1200 s⁻¹.

Durante los últimos 30 años se han diseñado varios sistemas en flujo para estudiar la hemostasia. Estos sistemas se basan generalmente en hacer circular sangre a un flujo determinado por una cámara que contiene una superficie trombogénica. Se valora el funcionalismo hemostático por la capacidad de formar agregados y generar fibrina en la superficie. La ventaja de estos sistemas es que

permiten el estudio de diferentes patologías y el efecto hemostático de fármacos probar fármacos sin exponer al paciente a riesgos, ya que estos estudios requieren únicamente la extracción de una muestra de sangre.

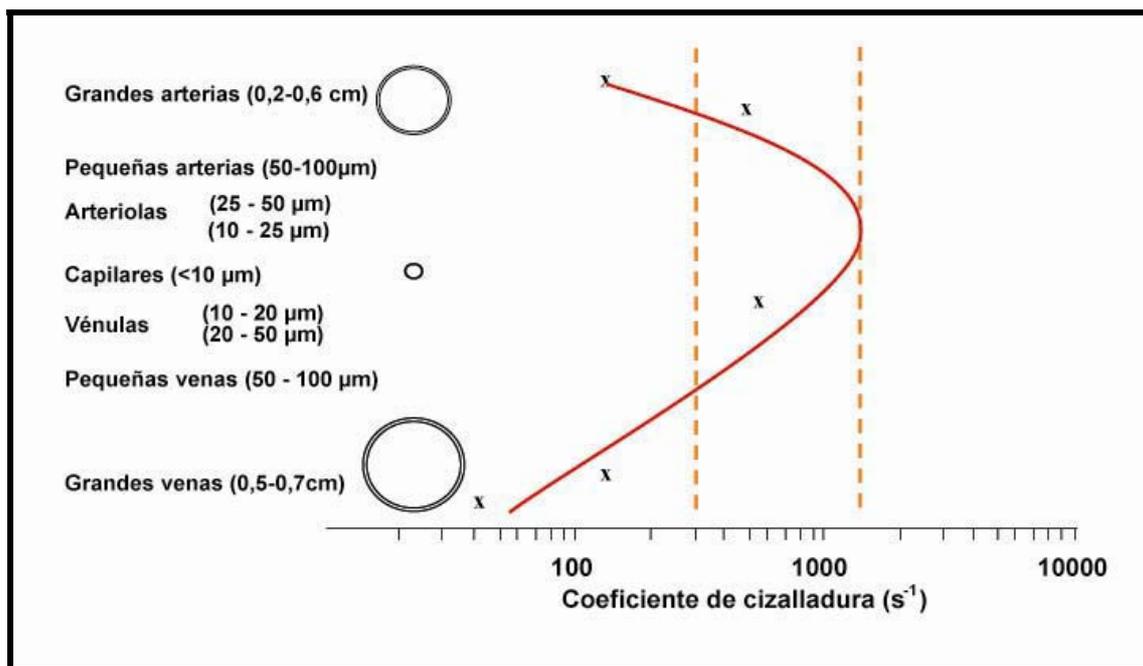


Figura 5: Variación del coeficientes de cizalladura a lo largo del árbol vascular. El coeficiente de cizalladura es inversamente proporcional al diámetro del vaso.

Los déficits congénitos o adquiridos de determinadas proteínas plasmáticas o glicoproteínas plaquetarias constituyen un modelo natural que permite estudiar el papel que éstas juegan en la hemostasia. Sin embargo, generalmente los pacientes que sufren estas disfunciones se encuentran en baja frecuencia en la población, y presentan una sintomatología hemorrágica que en determinados casos puede ser importante, por lo que el uso de muestras de estos pacientes no siempre está disponible. En estos casos se desarrollan aproximaciones metodológicas como el uso de anticuerpos para inhibir

receptores específicos y estudiar su función e incluso preparación de muestras como por ejemplo trombocitopenias mediante métodos de filtración con filtros de leucorreducción Pall RC100.

Nuestro grupo ha desarrollado una técnica de estudio de la hemostasia en flujo basada en el sistema descrito por Baumgartner en 1983 (Escolar, 2001). En este sistema la sangre se hace recircular por una cámara que contiene una aorta de conejo evertida y desendotelizada. La bomba peristáltica permite ajustar las condiciones de flujo para que simulen las que se dan en un punto determinado del árbol vascular. Finalizada la perfusión, los segmentos se procesan histológicamente para su evaluación morfométrica mediante un programa informático diseñado específicamente (Escolar, 2001). Este programa clasifica los agregados plaquetarios según su tamaño en contacto adhesión o trombo y permite obtener datos tales como el tanto por ciento de superficie cubierta por plaquetas, el área de los agregados que se han formado, el porcentaje de trombos, etc. Recientes modificaciones del programa de evaluación permiten además valorar la fibrina que se ha formado sobre la superficie trombogénica.

Recientemente hemos implementado en nuestro laboratorio técnicas de microscopía en tiempo real, que permiten monitorizar la formación de un agregado plaquetario mientras éste se está formando. Además, permiten acoplar anticuerpos fluorescentes para valorar la implicación de la proteína diana en la hemostasia.