

ESTUDIO DE HEPARINAS Y HEPARINOIDE DE BAJO PESO MOLECULAR,
PENTASACARIDO Y HEPARINA NO FRACCIONADA EN UN MODELO DE
TROMBOSIS *IN VITRO*. EFECTO SOBRE EL DEPOSITO DE PLAQUETAS Y
LA FORMACION DE FIBRINA.

LOZANO MOLERO, MIGUEL
DEP. MEDICINA

presentada por Miguel LOZANO MOLERO, licenciado en Medicina y Cirugía
Universidad de Barcelona, para optar al grado de Doctor.

Barcelona, Septiembre de 1992

(043)92

LOZ



ESTUDIO DE HEPARINAS Y HEPARINOIDE DE BAJO PESO MOLECULAR,
PENTASACARIDO Y HEPARINA NO FRACCIONADA EN UN MODELO DE
TROMBOSIS *IN VITRO*. EFECTO SOBRE EL DEPOSITO DE PLAQUETAS Y
LA FORMACION DE FIBRINA.

Tesis presentada por Miguel LOZANO MOLERO, licenciado en Medicina y Cirugía
por la Universidad de Barcelona, para optar al grado de Doctor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Lozano', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Barcelona, Septiembre de 1992

A Gloria y a Oriol

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que con su ayuda han hecho posible la realización de esta tesis:

Al Dr. Antonio Ordinas por aceptar la dirección de la tesis y por su ayuda y estímulos constantes; sin ellos probablemente esta tesis no hubiera visto la luz.

Al Prof. R. Castillo por haberme concedido el privilegio de poder trabajar junto a él. Su incansable actividad en el campo de la Hemostasia, ha sido un ejemplo para mi.

A la Dra. Eva Bastida, por su decidido apoyo y por las provechosas discusiones durante la realización del proyecto.

Al Dr. Ginés Escolar, por su inestimable colaboración y sugerencias durante el trabajo experimental.

A mis compañeros del Laboratorio de Hemocoagulación del Servicio de Hemoterapia y Hemostasia: Lourdes Almirall, José Aznar, Pilar Antón, Maribel Diez, Marta Garrido, Mónica Alemany y Esperanza Mallafre. Sus enseñanzas me iniciaron en los fundamentos de las perfusiones y cultivos celulares.

Al Prof. Jan Sixma por permitirme trabajar en su laboratorio, dándome la oportunidad de ampliar mis conocimientos en muchos campos.

A mis compañeros del Research Lab 1, del Hospital Universitario de Utrecht: Anke Bos, Jacques de Graaf, Harry Hijnen, Martin IJsseldijk, Edwin Saelman, Henrita van Zanten, Sytske de Graaf, Sara Beumer, Ana Marie van der Hoeven, Gijsbert van Willigen y Marina Wildt Meyboom. Ellos crearon una fértil atmósfera donde desarrollar el trabajo experimental y colaboraron en su realización.

A Boehringer Ingelheim S.A.E., por concederme la 1ª Beca de Investigación Científica. Gracias a esta desinteresada ayuda se ha podido realizar el trabajo experimental expuesto en esta tesis.

Indice

0. INDICE	5
1. ABREVIATURAS	10
2. INTRODUCCION	12
3. REVISION BIBLIOGRAFICA	16
3.1 Fisiología de la hemostasia	17
3.1.1 Pared Vascular	17
3.1.1.1 Estructura	17
3.1.1.2 Fisiología	19
3.1.2 Plaquetas	20
3.1.2.1 Estructura	20
3.1.2.2 Fisiología	23
3.1.2.2.1 Adhesión y activación	23
3.1.2.2.2 Agregación	24
3.1.2.3 Factor von Willebrand	25
3.1.3 Coagulación	26
3.1.3.1 Componentes	27
3.1.3.2 Mecanismos de activación	34
3.1.3.2.1 Vía intrínseca	34
3.1.3.2.2 Vía extrínseca	35
3.1.3.2.3 Vía común	36
3.1.3.3 Mecanismos de inhibición	37
3.1.3.3.1 Antitrombina III	37
3.1.3.3.2 Inhibidor de la vía del factor tisular	38
3.1.3.3.3 Proteína C-proteína S	39
3.1.4 Fibrinólisis	39
3.1.4.1 Componentes	40
3.1.4.2 Activación	41

3.2 Heparinas	43
3.2.1 Historia	43
3.2.1.1 Heparina no fraccionada	43
3.2.1.2 Heparinas de bajo peso molecular	47
3.2.2 Estructura Química	48
3.2.3 Biosíntesis y Función Biológica	51
3.2.4 Farmacodinámica	53
3.2.4.1 Efecto anticoagulante y antitrombótico	53
3.2.4.2 Otras acciones	58
3.2.5 Farmacocinética	58
3.2.5.1 Heparina no fraccionada	61
3.2.5.2 Heparinas de bajo peso molecular	63
3.2.6 Uso Clínico	64
3.2.6.1 Indicaciones terapéuticas	64
3.2.6.1.1 Profilaxis de la trombosis venosa profunda	64
3.2.6.1.2 Tratamiento de la trombosis venosa profunda	67
3.2.6.1.3 Enfermedad coronaria	71
3.2.6.2 Efectos secundarios	72
3.2.6.2.1 Hemorragia	72
3.2.6.2.2 Trombocitopenia	72
3.2.6.2.3 Osteoporosis	75
3.2.6.2.4 Necrosis cutánea	75
3.2.6.2.5 Hipoaldosteronismo	76
3.2.6.2.6 Alteración de las enzimas hepáticas	76
3.2.6.3 Contraindicaciones y precauciones	77
3.2.6.4 Neutralización del efecto anticoagulante	77

4. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	79
5. MATERIAL Y METODOS	83
5.1 Reactivos	84
5.2 Soluciones	84
5.3 Cultivo de célula endotelial de vena de cordón umbilical humano . . .	86
5.4 Glicosaminoglicanos en estudio	89
5.5 Obtención de la sangre y anticoagulación	90
5.6 Perfusiones	91
5.6.1 Descripción de la cámara	91
5.6.2 Técnica de perfusión	92
5.7 Cuantificación del depósito de plaquetas en los cubreobjetos	93
5.7.1 Valoración <i>en face</i>	93
5.7.2 Valoración en sección transversal	94
5.8 Cuantificación de la fibrina depositada	95
5.8.1 Método del fibrinógeno marcado con peroxidasa	95
5.8.1.1 Marcaje del fibrinógeno	95
5.8.1.2 Uso en las perfusiones	96
5.8.2 Método del fibrinógeno marcado con ¹²⁵ I	97
5.8.2.1 Marcaje del fibrinógeno	97
5.8.2.2 Uso en las perfusiones	98
5.9 Test de desaparición de plaquetas aisladas	98
5.10 Cuantificación de los niveles de FPA	99
5.11 Análisis estadístico	100

6. RESULTADOS	101
7. DISCUSION	117
8. CONCLUSIONES	126
9. BIBLIOGRAFIA	130

1. Abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
APTT	Tiempo parcial de tromboplastina activado.
ATIII	Antitrombina III
DAB	Diaminobencidina
EDTA	Etilendiaminotetracético
FDNB	Fluordinitrobenzeno
Fg- ¹²⁵ I	Fibrinógeno marcado con ¹²⁵ I
Fg-PO	Fibrinógeno marcado con peroxidasa
FPA	Fibrinopéptido A
FvW	Factor von Willebrand
GAGs	Glicosaminoglicanos
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HBS	Tampón HEPES salino
HBSS	Solución salina tamponada de Hank
HCII	Cofactor II de la heparina
HMWK	Quininógeno de alto peso molecular
MEC	Matriz extracelular
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PAI-2	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2
PBS	Tampón fosfato salino
PO	Peroxidasa
scu-PA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa de cadena única.
SEM	Error estándar de la media
SPD	Desaparición de plaquetas aisladas
t-PA	Activador del plasminógeno tipo tisular
TBS	Tampón TRIS salino
tcu-PA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa de doble cadena
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
TVP	Trombosis venosa profunda
u-PA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

2. Introducción

La heparina, un glicosaminoglicano formado por cadenas constituidas por residuos de glucosamina y ácido urónico, es conocida desde hace más de 70 años y sin embargo su estructura química aún no se ha desentrañado por completo, a pesar de los esfuerzos dedicados a su estudio. Desde su introducción en la clínica, su eficacia en la profilaxis y tratamiento del tromboembolismo venoso está bien establecida; no obstante debido a ciertos inconvenientes asociados con su uso, en los últimos años se han llevado a cabo intensas investigaciones a la búsqueda de alternativas terapéuticas válidas.

Estos esfuerzos se han traducido en la producción de diversos compuestos, algunos se obtienen de la heparina mediante procesos de despolimerización y purificación, y son denominados heparinas de bajo peso molecular (p. ej. Fragmin® y Fraxiparine®); otros se obtienen directamente de mucosa intestinal porcina y están formados por moléculas de polisacáridos sulfatados de estructura diferentes a los de la heparina y a los que se denominan heparinoides de bajo peso molecular (Lomoparan®). Asimismo como resultado del mejor conocimiento del mecanismo de acción de la heparina y de los avances técnicos ha sido posible, mediante la síntesis química, producir el pentasacárido específico que media la unión de la heparina a la antitrombina III, así como variantes estructurales que poseen mayor actividad biológica que el pentasacárido natural (Org 31550). Algunas de estos compuestos ya se han introducido en terapéutica con las mismas indicaciones que el producto original, mientras que otros aún están en fase de desarrollo. Si bien originalmente despertaron muchas expectativas especialmente en la profilaxis de las trombosis venosas profundas asociadas a cirugía, trabajos ulteriores sólo demostraron de forma fehaciente algunas de ellas, v.g. su mayor biodisponibilidad que permitía su administración una vez al día. Por el contrario en cirugía ortopédica, las heparinas de bajo peso molecular parecen preferibles a la heparina no fraccionada por su mayor reducción en el riesgo de trombosis sin que ello signifique un aumento del riesgo hemorrágico.

Como consecuencia del diferente material de origen del que se extraen y de los diferentes procedimientos de obtención el peso molecular medio de las heparinas de bajo peso molecular introducidas en terapéutica varían entre 4.000 y 6.500. Además la distribución de los pesos moleculares en los preparados comerciales de

similar peso molecular medio varía ampliamente con lo que la comparación de la potencia anticoagulante entre los distintos productos se hace muy problemática. Intentando obviar algunos de estos problemas se introdujo un producto de referencia para las heparinas de bajo peso molecular; el preparado tiene algún defecto como estándar internacional de las heparinas de bajo peso molecular, sin embargo proporciona el medio más práctico de verificación de la potencia de un lote dado y para comparar los resultados clínicos obtenidos con diversos productos. Por otra parte se ha demostrado que la potencia expresada como actividad inhibidora del factor Xa no es un indicador fidedigno de la eficacia antitrombótica del compuesto.

Por estas razones se decidió llevar a cabo el presente trabajo experimental en el que en un modelo de trombosis *in vitro* se comparó el efecto de diversos glicosaminoglicanos en la formación de fibrina y en el depósito de plaquetas. El modelo experimental utilizado es el desarrollado por Sakariassen *et al.* que utiliza una cámara de perfusión rectangular donde se puede exponer a la sangre circulante diversas superficies adhesivas. Este modelo ha permitido profundizar considerablemente en el conocimiento de los distintos factores que intervienen en la hemostasia, p.ej. la interacción de las plaquetas con diversas proteínas adhesivas como el colágeno, factor von Willebrand, fibronectina, etc. bajo condiciones de flujo.

El modelo experimental utilizado en esta tesis reproduce la situación que encontramos en el árbol vascular cuando, tras lesión de la células endotelial se expone el subendotelio a la sangre circulante y se desencadenan las primeras etapas de la hemostasia primaria que culminará con la formación del trombo plaquetario, estabilizado por mallas de fibrina. Para simular esta situación *in vitro* se han cultivado células endoteliales de vena de cordón umbilical humano, que son capaces de sintetizar una matriz extracelular que reproduce el subendotelio de los vasos. Para convertir la matriz extracelular en trombogénica las células se estimularon con un éster de forbol que provoca la síntesis del factor tisular y su depósito en la matriz. Posteriormente dicha superficie se expuso a sangre circulante anticoagulada con los glicosaminoglicanos en estudio, bajo condiciones de flujo que permiten simular las condiciones reológicas presentes en los territorios venoso y arterial del árbol vascular. La evaluación de los trombos formados en presencia de los distintos

glicosaminoglicanos permite conocer el efecto que sobre los distintos componentes de la hemostasia ejerce cada uno de ellos.

3. Revisión bibliográfica

3.1. FISILOGIA DE LA HEMOSTASIA

La Hemostasia es el conjunto de procesos que tienen por misión dos funciones bien diferentes: por una parte detectar las pérdidas de continuidad que aparezcan en el árbol vascular y detener las pérdidas de sangre que se pudieran producir; por otra, mantener la permeabilidad de los vasos. Comprende un elevado número de complejas interacciones entre los componentes de la sangre y las paredes de los vasos sanguíneos. En esquema las podríamos agrupar en cinco grupos diferentes cuya activación presenta, en ocasiones, fases comunes. A saber, una vasoconstricción local, las reacciones de adhesión y liberación plaquetaria, la formación de fibrina y la subsiguiente estabilización del trombo plaquetario y, finalmente, la eliminación de este trombo por medio de los mecanismos fibrinolíticos⁵⁷.

En el presente capítulo revisaremos los componentes involucrados en la Hemostasia: por una parte describiremos brevemente la estructura y función de la pared vascular; a continuación revisaremos la morfología y el papel de las plaquetas; y finalmente expondremos con detalle los mecanismos de la coagulación y de la fibrinólisis incluyendo aquellos aspectos más actuales.

3.1.1 PARED VASCULAR

Clásicamente los vasos sanguíneos se habían considerado como un sistema inerte cuya única misión era el transporte de la sangre del corazón a los distintos órganos. Sin embargo los recientes avances en el conocimiento de la fisiología del sistema vascular han llevado a reconsiderar las funciones específicas del mismo.

3.1.1.1 Estructura de la pared vascular

La pared de los vasos sanguíneos se puede dividir en tres partes: la íntima, la capa media y la adventicia. Dependiendo del tipo de vaso el grosor y la composición de dichas capas varía²⁴⁷. La capa íntima es la más interna y la limita

por fuera la membrana elástica interna. En ella encontramos una capa continua de células endoteliales que contactan directamente con la sangre circulante. Vistas desde la luz del vaso estas células presentan una morfología de tipo poligonal y se disponen en un patrón característico "en empedrado". En un adulto de 70 kg las células endoteliales que tapizan el árbol vascular ocupan una superficie de unos 1.000 m² y pesan unos 100 g¹³⁰. Cada célula endotelial mide unos 50 μm de diámetro y unos 3 μm de altura y se halla íntimamente unida a sus vecinas a través de diversos sistemas de anclaje que varían dependiendo del territorio vascular que se considere. La célula endotelial posee diversas organelas intracitoplasmáticas que incluyen mitocondrias, microtúbulos y abundantes vesículas de pinocitosis. Estas vesículas son las responsables del transporte de diversas sustancias desde la luz del vaso a los tejidos y viceversa³⁶. Las células endoteliales contienen además unas organelas características en forma de bastón llamadas cuerpos de Weibel-Palade²⁷⁵, que se observan en todo el endotelio vascular, especialmente en el de las grandes venas. Estas organelas juegan un importante papel en la hemostasia pues es el lugar de depósito del factor von Willebrand²⁶⁹.

El área por debajo del endotelio se conoce como subendotelio. Morfológicamente está constituido por la membrana basal que sirve de soporte al endotelio suprayacente; elastina que se continua con la membrana elástica interna y microfibrillas que se orientan paralelas al eje longitudinal del vaso. En cuanto a composición química, en el subendotelio encontramos colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, factor von Willebrand y proteoglicanos²⁷. Con las técnicas de cultivo de la célula endotelial se ha visto que éstas son capaces de sintetizar *in vitro* una matriz extracelular con los mismos constituyentes que los encontrados *in vivo*¹⁴⁴. Ello ha permitido desarrollar un modelo experimental²²⁸ en el que se estudia bajo condiciones de flujo la reactividad de los componentes del subendotelio frente a los diferentes componentes hemáticos, tanto celulares como plasmáticos²⁴².

La membrana elástica interna constituye el límite entre la íntima, descrita anteriormente, y la capa media. Los componentes de ésta son células musculares lisas en las arteriolas y elastina en las venas. En general su grosor es menor en las venas que en las arterias de calibre similar. La adventicia es la capa más externa

de los vasos sanguíneos y está constituida fundamentalmente por tejido conectivo, en el cual están incluidas algunas fibras de colágeno, elastina y fibroblastos. La adventicia sirve de anclaje a los vasos a los tejidos circundante; a su través llegan los nervios y los *vasa vasorum* que nutren la pared de los vasos²⁴⁷.

3.1.1.2 Fisiología de la pared vascular

La pared vascular y esencialmente el endotelio vascular, juega un importante papel en la Hemostasia. El conocimiento de sus funciones se ha ampliado enormemente durante los últimos años gracias a su cultivo *in vitro* aplicando técnicas de cultivo de tejidos¹³².

El endotelio vascular sintetiza y libera múltiples moléculas de importancia capital para la adhesión plaquetaria, coagulación y fibrinolisis (Tabla 1)⁸⁷. Además en la membrana citoplasmática de la cara luminal del endotelio, existen glicosaminoglicanos como heparán sulfato, condroitín sulfato y

dermatán sulfato, de estructura semejante a la heparina, que contribuyen a la tromborresistencia del árbol vascular²¹⁸.

Tabla 1. Principales moléculas sintetizadas por el endotelio clasificadas según su función.

<u>Propiedades protrombóticas</u>	<u>Propiedades antitrombóticas</u>
- Factor activador de las plaquetas	- PGI ₂
- Factor tisular	- Trombomodulina
- Factor von Willebrand	- Proteína S
- Factor V	- Activador tisular del plasminógeno
- Fibronectina	- Receptores fibrinolisis
- Trombospondina	- Glicosaminoglicanos
- Inhibidor del activador del plasminógeno tipo I.	- Factor relajante vascular

Asimismo, se ha observado que el metabolismo de las células endoteliales es de gran importancia en la regulación de los distintos procesos fisiológicos y patológicos. Así, el metabolismo de los ácidos grasos a través de las vías de la ciclo y lipooxigenasa con la subsiguiente producción de eicosanoides se ha relacionado con el mantenimiento del balance hemostático, en el caso de los metabolitos de la vía de la ciclooxigenasa, y con la regulación de las propiedades

adhesivas de las células, en el caso de los metabolitos de la vía de la lipooxigenasa¹⁰⁶. Recientemente se han identificado otras moléculas sintetizadas por el endotelio que intervienen en el tono vascular son el factor relajante derivado del endotelio identificado como óxido nítrico con una potente acción vasodilatadora y la endotelina 1 que es el agente hipertensor más potente que se conoce²⁶⁶.

3.1.2 PLAQUETAS

Las plaquetas son fragmentos de citoplasma anucleados originados en la médula ósea a partir de los megacariocitos. Son los elementos formes más pequeños de la sangre, con un tamaño de 3 a 5 μm y una vida media de unos 7 días¹²⁹. En reposo tienen forma de disco biconvexo y normalmente en los vasos circulan junto a la pared al ser empujadas por los hematíes que circulan por el centro de los mismos^{3,262}.

3.1.2.1 Estructura plaquetaria

Con el fin de simplificar las complejas características estructurales de las plaquetas y de relacionarlas con su actividad funcional, consideraremos en su anatomía cuatro zonas fundamentales: la zona periférica, la zona sol-gel, la zona de las organelas y el sistema de membranas²⁸³.

La zona periférica está formada por el recubrimiento externo o glicocálix, la membrana citoplasmática, y la región submembranosa. El glicocálix rodea completamente a la plaqueta y se le considera un importante componente de la membrana plaquetaria. Glicoproteínas presentes en esta área son responsables de la especificidad de los grupos sanguíneos (ABO) y del HLA y de la antigenicidad plaquetaria. Las glicoproteínas de membrana actúan como receptores y facilitan la transmisión de los estímulos a través de la membrana plaquetaria. La glicoproteína Ib es el receptor del factor von Willebrand, que media la adhesión de las plaquetas al subendotelio¹⁰⁹. El complejo de glicoproteínas IIb-IIIa funciona como receptor para el fibrinógeno, fibronectina y factor von Willebrand y media la agregación

plaquetaria^{215,219}. Además de éstos, la membrana plaquetaria incluye receptores para el difosfato de adenosina (ADP), trombina, epinefrina y serotonina⁵⁶.

Por debajo de ella se encuentra la membrana citoplasmática constituida por una bicapa lipídica y proteínas que se extienden a ambos lados; la porción de fosfolípidos de membrana sirve como superficie de ensamblaje para las diversas proteínas que intervienen en la coagulación²⁴ (ver pág. 34). Esta membrana se invagina profusamente en el interior de la plaqueta formando el sistema canalicular abierto. La capa interna de la membrana es el tercer elemento de la zona periférica y su función esencial es la transducción de señales desde el medio externo al interior de las plaquetas²⁸².

El segundo componente anatómico de las plaquetas es la denominada zona de sol-gel, también conocida como citoesqueleto. Dentro de la matriz plaquetaria se encuentran microtúbulos, microfilamentos y filamentos submembranosos. La más abundante de las tres es la banda circunferencial de microtúbulos⁹¹. En la plaqueta estimulada, la contracción de ésta banda, parece ser la responsable de los movimientos centrípetos y reorganización de las organelas que facilitan el proceso de secreción²⁸⁰. Los microfilamentos están intercalados en el citoplasma de las plaquetas y están compuestos de actina y miosina. Actina es la principal proteína contráctil del citosol plaquetario, representando entre un 20 y un 30 por cien del contenido proteico plaquetario⁸², mientras que la miosina representa entre el 2 y el 5 por cien (un porcentaje elevado para una célula no muscular). Los microfilamentos pueden convertirse de un estado gelatinoso no organizado a filamentos paralelos capaces de contraerse en segundos, mientras que la plaqueta cambia de forma²⁸⁴.

El tercer componente anatómico de las plaquetas son los orgánulos plaquetarios, que divididos en gránulos α , gránulos densos y lisosomas, se reparten de forma homogénea por el citoplasma plaquetario. Los gránulos α son los más numerosos (de 20 a 200 por plaquetas) y contienen diferentes proteínas. El papel fisiológico que estas proteínas representan no está completamente aclarado; sin embargo, se sabe que el factor plaquetario 4 neutraliza el efecto anticoagulante de la heparina. El número de gránulos densos es menor (de 2 a 10 por plaqueta)

Tabla 2. Contenido de los gránulos plaquetarios.

<u>Gránulos densos</u>	<u>Gránulos α</u>
- Difosfato de adenosina	- Fibrinógeno
- Trifosfato de adenosina	- Factor V
- Difosfato de guanidina	- Factor von Willebrand
- Trifosfato de guanidina	- Fibronectina
- Calcio	- Factor plaquetario 4
- Serotonina	- β -Tromboglobulina
	- Trombospondina
	- Albúmina
	- Factores de crecimiento
	- Inhibidor del activador del plasminógeno tipo I

y se observan como gránulos intensamente opacos al microscopio electrónico de transmisión. En la Tabla 2 se resume su contenido; de éste el más importante en fisiología es el ADP. Los lisosomas contienen hidrolasas ácidas, enzimas activas a bajo pH, cuya función es digerir productos fagocitados por la plaqueta^{122,268}.

Las sustancias almacenadas en los gránulos α y densos juegan un importante papel en el funcionalismo plaquetario. En efecto, en el curso de los fenómenos que se producen tras la activación, el contenido de dichos gránulos es liberado contribuyendo a la amplificación de la respuesta plaquetaria, pues la mayoría de las sustancias contenida en ellos están relacionadas con los fenómenos de agregación¹²².

Los sistemas de membrana tienen especial importancia en la anatomía plaquetaria. El sistema canalicular abierto, como ya hemos visto, está formado por invaginaciones de la membrana que tras la activación plaquetaria se exterioriza y permite a la plaqueta extenderse sobre la superficie a la que se ha adherido y aumentar considerablemente el área que es capaz de cubrir²⁸⁶. Este sistema de canales proporciona, también una vía para la llegada al exterior de las sustancias liberadas en el curso de la activación, así como una vía de aclaramiento de receptores²⁸⁵. El sistema tubular denso deriva del retículo endoplásmico liso; es el lugar de depósito del calcio, elemento fundamental para las reacciones de contracción plaquetaria y es donde se localiza las enzimas relacionadas con la síntesis de prostaglandinas⁹⁷. Estos dos sistemas se encuentran frecuentemente en estrecho contacto formando los llamados complejos de membrana²⁸¹.

3.1.2.2 Fisiología plaquetaria

Tras una lesión vascular con exposición de las capas subendoteliales, las plaquetas se adhieren sobre la superficie lesionada. Tras la adhesión, las plaquetas cambian su forma de discos lisos a esferas con pseudópodos y se fijan sobre el área dañada a través de dichos pseudópodos. A continuación las plaquetas se extienden, liberan el contenido de los gránulos y comienzan a agregar entre ellas para formar el llamado trombo plaquetario²⁶⁸.

3.1.2.2.1 Adhesión y activación plaquetaria

Cuando el recubrimiento de células endoteliales desaparece de la pared de los vasos, varias proteínas presentes en el subendotelio resultan expuestas a las plaquetas circulantes. Las proteínas que median en la interacción plaqueta-subendotelio se conocen como proteínas adhesivas: son la fibronectina, la laminina, la vitronectina¹⁹ y la más importante de ellas, el factor von Willebrand⁶⁵. El factor von Willebrand fijándose a la glicoproteína Ib es el que media la adhesión inicial de las plaquetas al subendotelio y es capaz de desencadenar también los mecanismos de activación¹⁴¹.

De forma concomitante a la adhesión se inician los procesos de activación plaquetaria. Varios agentes, interaccionando a través de receptores específicos presentes en la membrana citoplasmática, participan en dicho proceso, principalmente trombina, colágeno, ADP, epinefrina, serotonina y tromboxano A₂⁵⁵. A pesar de que cada uno de ellos posee un receptor específico, la secuencia de eventos que sigue en la mayoría de ellos es semejante. El receptor, tras la unión con el agonista, interacciona con una o varias proteínas en la membrana que requieren trifosfato de guanidina y que se conocen como proteínas reguladoras fijadoras de nucleótido de guanina (proteínas G)²⁸. Las proteínas G interaccionan a su vez con enzimas o canales de iones de la membrana plasmática, y estimulan la producción de segundos mensajeros o modulan el flujo de iones a través de la membrana¹¹.

En la plaqueta tras la estimulación, la primera señal que se detecta es la activación de la fosfolipasa C, mediada por una proteína G ligada al receptor, que de los fosfolípidos de la membrana libera trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DG). IP₃ media el aumento en la concentración de calcio intracitoplasmático, considerado el factor regulador de varios procesos plaquetarios como la movilización del ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana y la fosforilación de la cadena ligera de la miosina ligada con los fenómenos de liberación. DG activa la proteínquinasa C que fosforila a su vez otra proteína que actúa sinérgicamente con el calcio en la liberación de los gránulos¹⁴².

El ácido araquidónico libre es utilizado para sintetizar tromboxano A₂, proceso en el que intervienen la ciclooxigenasa y la tromboxano sintetasa¹¹. El tromboxano A₂, que actúa a través de receptores específicos, es el agente proagregante más potente que se conoce; además actuando sobre el músculo liso arterial provoca una vasoconstricción local, que favorece la detención del sangrado¹⁰⁸.

3.1.2.2.2 Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria constituye la última fase en la sucesión de eventos desencadenados por la activación. Consiste en la unión irreversible de las plaquetas entre sí utilizando principalmente la molécula de fibrinógeno como anclaje entre ellas.

En la plaqueta en reposo el receptor para el fibrinógeno, el complejo formado por las glicoproteínas IIb y IIIa, tiene una estructura tal que a aquel le resulta imposible unirse. Sin embargo, tras la activación se produce un cambio conformacional en el complejo IIb-IIIa que deja al descubierto el lugar de fijación del fibrinógeno²¹⁴. Los mecanismos bioquímicos que conducen a la activación de la glicoproteína IIb-IIIa no se conocen por completo. Existen evidencias experimentales que indican la existencia de varias vías de activación. Una de ellas sería a través de la fosfolipasa C y proteínquinasa C²⁶⁴ y otra mediada directamente por proteínas integrantes de la membrana citoplasmática (proteínas G), que se encuentran acopladas a los receptores de los diversos agonistas²³⁸.

Si bien inicialmente el agregado es laxo, fenómenos de contracción a nivel del citoesqueleto de las plaquetas hacen que a los tres minutos del comienzo de la formación, el trombo plaquetario esté formado por una masa compacta de plaquetas interdigitadas y degranuladas²⁴¹.

3.1.2.3 Factor von Willebrand

La hemostasia normal requiere la presencia del factor von Willebrand (FvW) por dos razones: 1) Interviene en la adhesión y agregación plaquetaria; 2) actúa como proteína transportadora de la molécula de factor VIII, contribuyendo a su vida media normal en el plasma aunque no interviene directamente en la coagulación, de hecho tras la activación del FVIII, el FvW se libera¹⁵. Por esta razón se describe en este apartado junto a las plaquetas. La importancia del papel desarrollado por el FvW en la hemostasia se ilustra por la gravedad de la diátesis hemorrágica que presentan los pacientes afectados de un déficit absoluto de dicho factor (enfermedad de von Willebrand tipo III)¹⁸⁰.

El FvW es una glicoproteína que circula en plasma a una concentración de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Este FvW se sintetiza en las células endoteliales que recubren el árbol vascular¹³¹ y en los megacariocitos¹⁸⁶. El gen que codifica la proteína es bastante grande, comprende unas 175 kilobases y se localiza en el brazo corto del cromosoma 12. La molécula de FvW está constituida por una sola cadena de unos 2.050 aminoácidos con un peso molecular aproximado de unos 225 KDa. Dímeros de esta molécula forman multímeros de gran variedad de tamaños; en el plasma normal se encuentran multímeros que oscilan entre 400 KDa y 20.000 KDa²¹¹. Grandes multímeros completamente extendidos llegan a alcanzar longitudes de 1,3 μm , haciendo al FvW la mayor de las proteínas solubles conocidas²²⁶. Estos multímeros de alto peso molecular también se encuentran en los extractos de células endoteliales y megacariocitos. El FvW se almacena en las células endoteliales en los cuerpos de Weibel-Palade²⁶⁹ y puede ser liberado tras varios tipos de estímulos (trombina, DDAVP, etc)²⁴⁶. En las plaquetas el lugar de depósito son los gránulos α .

El FvW y las plaquetas circulan juntos en el plasma sin que interactúen entre sí, sin embargo tras una lesión endotelial, el FvW actúa a través de receptores específicos, como un puente entre las plaquetas y el tejido subendotelial expuesto e incluso con células endoteliales lesionadas²²⁶. Existen evidencias experimentales de que son varios los componentes del subendotelio con los que el FvW es capaz de interactuar: diversos tipos de colágeno, heparina y glucolípidos sulfatados²²⁵. Tras la unión al subendotelio, la molécula de FvW sufre un cambio conformacional por el que es capaz de unirse a la glicoproteína Ib de la membrana plaquetaria²⁷³. Esta unión no es meramente un anclaje físico, sino que a la vez desencadena los mecanismos de activación plaquetaria¹⁴¹. Como consecuencia de la activación plaquetaria se expone el receptor de la glicoproteína IIb-IIIa, al que también se une el FvW contribuyendo a la extensión de las plaquetas sobre la superficie trombogénica²³⁰ y a la agregación¹²⁸. Ninguna de estas funciones es exclusiva del FvW, en el sentido de que otras proteínas adhesivas pueden mediar uno o más de ellos, dependiendo de las características reológicas de vaso; sin embargo, bajo condiciones de alto coeficiente de cizalladura como se encuentra en los pequeños vasos, el FvW es imprescindible para una hemostasia normal¹²²⁹.

3.1.3 COAGULACION

El trombo plaquetario es capaz de detener las hemorragias que se producen en capilares y pequeñas vénulas, sin embargo, en caso de vasos de mayor calibre, la firmeza de dicho trombo es insuficiente para detener la hemorragia. En estos casos las plaquetas deben ser estabilizadas por una malla de fibrina²²⁷.

La trombina es la responsable de la transformación del fibrinógeno soluble en fibrina insoluble que polimerizará y formará la malla necesaria para la estabilización del trombo plaquetario¹¹⁰. La formación de trombina es el punto final de toda una serie de reacciones enzimáticas en las cuales, una proenzima es convertida en enzima activa que a su vez activará otra proenzima. Este modelo de activación se ha descrito como "en cascada" y constituye el eje central de la coagulación de la sangre (Fig. 1)^{60,167}.

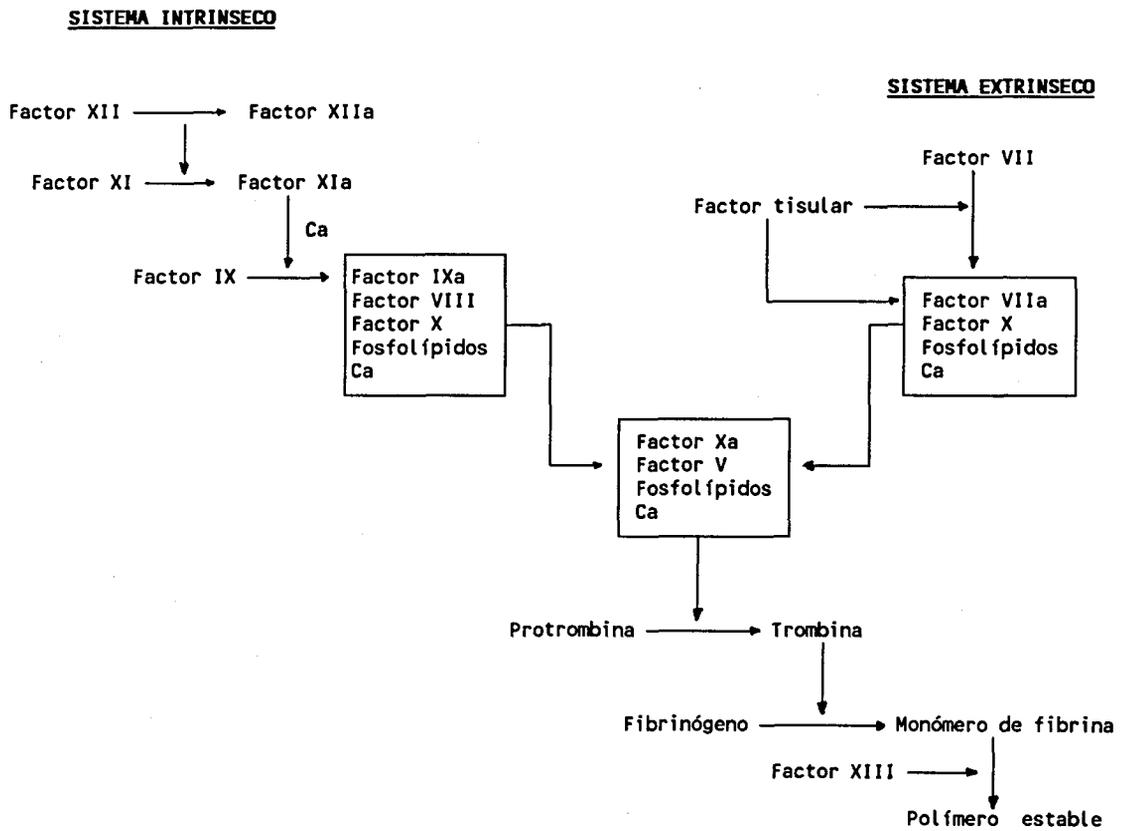


Figura 1. Cascada de activación de la coagulación.

3.1.3.1 Componentes de la coagulación

Las proenzimas, llamadas factores de la coagulación (Tabla 3), son proteínas que circulan a baja concentración en el plasma en forma inactiva. Su velocidad de interacción se acelera enormemente cuando se adsorben y concentran sobre una superficie. *In vivo* son los fosfolípidos de la membrana plaquetarios los principales responsables de ésta función. Todos los factores de coagulación se sintetizan en el

Tabla 3. Componentes de la coagulación

<u>Factor</u>	<u>Sinónimo</u>	<u>Peso molecular (kD)</u>	<u>Concentración por ml de plasma</u>	<u>Vida media biológica</u>
I	- Fibrinógeno	340	3 mg	80 horas
II	- Protrombina	72	200 µg	72 horas
III	- Factor tisular, tromboplastina tisular	45	0.0	
V	- Proacelerina, factor lábil	290-400	50 µg	12-36 horas
VII	- Proconvertina, factor estable	63	1-2 µg	3-6 horas
VIII	- Factor anti-hemofílico A	70-240	0,2 µg	8-12 horas
IX	- Factor Christmas, factor antihemofílico B	57	5 µg	18-24 horas
X	- Factor Stuart	59	6-8 µg	25-40 horas
XI	- Antecedente trombo-plastínico del plasma	160	4-7 µg	48-72 horas
XII	- Factor Hageman, factor contacto	80	10 µg	48 horas
XIII	- Factor estabilizante de la fibrina	320	8 µg	8-12 días
	- Precalicerina	88	25-50 µg	
	- Quinínogeno de alto peso molecular	180	70-80 µg	

hígado y algunos de ellos requieren la vitamina K para su producción (factores II, VII, IX, X, proteínas C y S)²⁴⁸. Estas proteínas contienen un dominio en su estructura formado por 10 a 12 residuos de ácido γ -carboxiglutámico. Estos aminoácidos son esenciales para la fijación de iones calcio y para la interacción de estas proteínas vitamino K-dependientes con las membranas celulares⁸⁴

FIBRINOGENO

El fibrinógeno representa el 2% de las proteínas plasmáticas, siendo la más abundante de las que intervienen en la coagulación. Aparte del plasma, las plaquetas también contienen fibrinógeno en el interior de los gránulos alfa¹⁶⁶ que aunque estructural y funcionalmente distinto del plasmático, provienen de un mismo gen.

Las diferencias observadas probablemente derivan de modificaciones postraduccion o bien de degradación durante el almacenamiento.

El fibrinógeno humano es una glicoproteína compuesta por tres pares de cadenas polipeptídicas llamadas $A\alpha$, $B\beta$ y γ conectadas por puentes disulfuro y que forman una molécula con dos mitades simétricas. El fibrinógeno se produce en los hepatocitos en cantidades que oscilan entre 1,7 y 5 gramos por día; posee una vida media de 3 a 5 días. El fibrinógeno plasmático es un reactante de fase aguda y su concentración aumenta en respuesta a una variedad de estímulos, p.ej. embarazo, diabetes, postoperatorio, etc.²⁸⁷.

El fibrinógeno bajo la acción de la trombina se transforma en fibrina; ello supone la hidrólisis de 4 puentes disulfuro de la molécula y la liberación de 2 moles de fibrinopéptido A y B de las cadenas $A\alpha$ y $B\beta$ respectivamente. La liberación del fibrinopéptido A (FPA) expone el lugar inicial de polimerización que conducirá a la formación de largas fibras de fibrina³⁷ que posteriormente serán estabilizadas por el factor XIII¹⁶⁴.

PROTROMBINA Y TROMBINA

La protrombina es una glicoproteína plasmática formada por una sola cadena polipeptídica y con una vida media de aproximadamente 3 días. Está constituida por una porción carboxi-terminal (que es la molécula de trombina propiamente dicha) y una mitad amino terminal (fragmento 1+2) que es liberado durante la activación por el factor Xa. La transformación de la protrombina en trombina supone la liberación del fragmento 1-2 y la hidrólisis de una unión interna isoleucina-arginina con lo que la molécula de trombina está finalmente constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro; su peso molecular es de unos 39 KDa²⁵⁰.

La trombina forma parte de la familia de los enzimas proteolíticos conocidos como serín proteasas, llamados así por poseer un residuo de serina en el centro activo. A dicha familia pertenecen también otros factores de la coagulación como los factores IXa y Xa¹⁶⁹.

FACTOR TISULAR

El factor tisular es una proteína estructural de la membrana citoplasmática de la mayoría de las células¹⁹¹; en las células endoteliales¹⁹⁰ y monocitos²³⁷ aparece tras la activación de las células. Se extiende a ambos lados de la membrana citoplasmática; posee un extremo amino terminal que es el componente principal y se halla orientado extracelularmente además de un pequeño fragmento hidrofóbico que se encuentra inmerso en la membrana y de una pequeña porción citoplasmática. Esta proteína es el receptor para el factor VII y es necesario para la activación de la vía extrínseca de la coagulación²⁰⁰.

FACTOR V

El factor V es una glicoproteína formada por una sola cadena polipeptídica que circula en plasma en forma de precursor inactivo, como la mayoría de los factores que intervienen en la coagulación. Aunque el hígado es el principal lugar de producción, también los megacariocitos sintetizan esta proteína siendo un componente habitual de los gránulos α plaquetarios¹³⁴. El factor V es un cofactor no enzimático que en su forma activa acelera la activación de la protrombina por parte del factor Xa unas 270.000 veces¹⁹⁵.

FACTOR VII

El factor VII humano es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica de unos 400 residuos de aminoácidos con un contenido de carbohidratos de aproximadamente 13 por cien. Es un componente de la vía extrínseca de la coagulación que se une al factor tisular para formar un complejo enzimático que activa al factor X²⁸⁸.

FACTOR VIII

El factor VIII es un cofactor fundamental para los mecanismos de la coagulación. Defectos en el gen que codifica el factor VIII que conducen a un déficit de este factor son la causa de la hemofilia A, enfermedad que se observa en

aproximadamente 1 de cada 6.000 varones nacidos vivos. Dicho gen localizado en el cromosoma X y constituido por unas 186 kilobases, es uno de los genes mayores identificados hasta ahora. La proteína es sintetizada como una única cadena polipeptídica de unos 2.332 residuos de aminoácidos; su secuencia muestra una marcada homología con otro cofactor de la coagulación, el factor V²⁶⁰. El factor VIII es sintetizado en muchos tipos de células aunque el hígado parece ser el principal lugar de producción²⁹². El factor VIII circula en la sangre como un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas derivadas de una única cadena original, y unido al factor von Willebrand²⁹⁶. El factor VIII es convertido en su forma activa por la digestión enzimática de dos o más puentes peptídicos dentro de la proteína por la trombina.

FACTOR IX

El gen que codifica el factor IX se halla en el cromosoma X, adyacente al gen del factor X. Su estructura es de gran homología con los genes que codifican otros factores de la coagulación que son vitamino K dependientes como el factor VII, factor X y proteína C. Defectos en dicho gen son la causa de la hemofilia B, que aparece en 1 de aproximadamente 30.000 varones nacidos vivos⁶⁹. El factor IX circula en sangre como una única cadena polipeptídica de unos 415 residuos de aminoácidos con un 17 por cien de su peso de carbohidratos y su activación supone la lisis de dos puentes peptídicos. *In vitro* tanto el factor XIa como el factor VIIa unido al factor tisular son capaces de activar al factor IX⁹⁸

FACTOR X

El factor X se sintetiza como una única cadena polipeptídica, sin embargo debido a una alta susceptibilidad a la proteólisis de una secuencia de algunos aminoácidos, la molécula que se aísla del plasma está constituida por dos cadenas unidas por un puente disulfuro. El factor X es una proteína fijadora de calcio que en presencia de éste se une a superficies de fosfolípidos cargadas negativamente gracias a los residuos de ácido γ -carboxiglutámico que posee¹⁶⁸.

FACTOR XI

El factor XI es único entre los factores de coagulación pues está compuesto por dos cadenas polipeptídicas idénticas de aproximadamente 80 KDa unidas por puentes disulfuro. Su activación por el factor XIIa se produce por la proteólisis de un puente amino en cada una de las cadenas resultando en dos fragmentos: la porción aminoterminal unidas por puentes disulfuros y el extremo carboxiterminal donde reside el centro activo. El factor XI circula en plasma asociado en forma no covalente al quinínogeno de alto peso molecular (HMWK). Además de la activación calcio-dependiente del factor IX, el factor XI es capaz de activar al factor XII y al plasminógeno¹⁰.

FACTOR XII

El factor XII es una glicoproteína de una sola cadena, conocido también como *Factor Hageman* y es el primer componente de la vía intrínseca. Esta proteína no parece tener un papel fundamental en la fisiología de la coagulación dado que los pacientes que no poseen esta proteína no presentan diátesis hemorrágica; además presentan una déficit en activación de la fibrinólisis (ver abajo)¹⁵³. De hecho el paciente en el que se identificó por primera vez una deficiencia de este factor, murió años más tarde por un tromboembolismo pulmonar tras una fractura de pelvis²²². Posee una elevada tendencia a unirse a superficie negativamente cargadas como el vidrio. Su activación en plasma se produce por la acción de la calicreína por hidrólisis de un puente peptídico que da lugar a una molécula formada por dos cadenas. A su vez el factor XIIa es capaz de activar al factor XI, a la precalicreína y al activador del plasminógeno. Es decir la activación del factor XII es la etapa inicial de una compleja cadena de reacciones que implica a la coagulación, la formación de quininas, el sistema de complemento y a la fibrinólisis⁹³.

FACTOR XIII

El factor XIII se produce en el hígado, en los megacariocitos y en la placenta. El plasmático proviene del hígado y está formado por dos cadenas a y dos cadenas b unidas por enlaces no covalentes. El factor XIII encontrado en las plaquetas y en

la placenta carece de las subunidades b, y está constituido por dos cadenas a. Su activación se produce bajo la acción de la trombina que libera un pequeño péptido de activación de las cadenas a; posteriormente en presencia de Ca^{2+} las cadenas b se disocian con lo que queda expuesto el centro activo situado en las cadenas a. El factor XIIIa actúa formando puentes amida entre residuos de glutamina y lisina de moléculas de fibrina vecinas. El resultado es la formación de dímeros constituidos por cadenas γ - γ y polímeros de cadenas α ¹⁷³. También se ha demostrado que otras moléculas pueden ser ensambladas a la malla de fibrina como p.ej. α_2 -antiplasmina²⁵¹, o entre sí p.ej. fibronectina-colágeno¹⁸⁴. Es decir, el factor XIII además de aumentar la fuerza mecánica de la malla de fibrina y la resistencia a la lisis por la plasmina, podría contribuir al anclaje del coágulo de fibrina a los tejidos circundantes.

PRECALICREINA PLASMÁTICA

La precalicreína plasmática es una glicoproteína de una sola cadena que al igual que el factor XI circula unida de forma no covalente al HMWK. Su activación se produce tras proteólisis por el factor XIIa que da lugar a la formación de una cadena pesada y una cadena ligera, donde reside el centro activo, unidas por puentes disulfuro. La calicreína una vez activada libera la bradiquinina del HMWK, activa al factor XII y también es capaz de activar débilmente al factor IX.²⁸⁸

QUININOGENO DEL ALTO PESO MOLECULAR (HMWK)

El HMWK es una proteína de cadena única que contiene dentro de su secuencia de aminoácidos, péptidos de una gran potencia vasodilatadora, las quininas. La calicreína plasmática lisa dos puentes peptídicos y libera el nonapéptido bradiquinina de la molécula del HMWK, transformándolo en una molécula de dos cadenas. Tanto la primera molécula como la segunda poseen actividad procoagulante²⁸⁸.

FOSFOLIPIDOS

Aunque no se les ha asignado ningún número romano en el sistema de nomenclatura actualmente en uso, los fosfolípidos son unos componentes esenciales en la cascada de la coagulación²⁹⁷. La presencia de fosfolípidos adecuados (p.ej. fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, etc) provoca un aumento en la velocidad de formación de la trombina de más de un millón de veces al facilitar dos reacciones secuenciales de la coagulación en las que intervienen los factores VIII y V¹⁷⁰. Son efectivos tanto en forma de fosfolípidos libres en emulsión como componentes de fosfolipoproteínas. Las fuentes de fosfolípidos que participan en la coagulación *in vivo* son las plaquetas y los componentes tisulares; no obstante en las células en reposo dichos fosfolípidos se encuentran en la cara interna de la membrana lipídica, inaccesibles a los factores de coagulación. Sólo tras activación los fosfolípidos se expresan en la cara externa²⁴.

3.1.3.2 Mecanismos de activación

Clásicamente se han considerado dos vías de activación de la coagulación: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Fig. 1). En la primera, todos los factores necesarios se hallan presentes en la sangre circulante y el estímulo desencadenante se produce tras el contacto o bien con una superficie cargada negativamente o bien con una superficie extraña. En la vía extrínseca es un componente extraplasmático, el factor tisular, el encargado de iniciar la activación. Tras la activación del factor X las dos vías se reúnen en una que conduce a la activación de la trombina. A continuación revisaremos cada vía de activación por separado.

3.1.3.2.1 Vía intrínseca

Cuando el factor XII entra en contacto con una superficie negativamente cargada, p.ej. colágeno y membrana basal tras la denudación del endotelio, es adsorbido sobre ella y sufre un cambio conformacional que lo hace más sensible a la proteólisis. El complejo circulante de precalicreína-HMWK, también es adsorbido

sobre la superficie negativamente cargada. En este momento se produce una activación mutua entre las porciones libre de la calicreína y el factor XII (XIIa). El factor XIIa permanece fijado a la superficie mientras que el complejo HMWK-calicreína se separa, permitiendo que nuevas moléculas de HMWK formando complejo con moléculas de factor XI se adsorban sobre la superficie. De ésta forma, los factores XIIa y XI entran en estrecho contacto, resultando en la activación del factor XI (XIa) que permanecerá fijado a la superficie. A su vez la calicreína liberada activa nuevas moléculas de factor XII fijadas a la superficie y en la fase líquida activa los sistemas fibrinolíticos y de complemento, entre otros.

Mientras tanto, el factor XIa activa el factor IX, que como todos los factores vitamino K-dependientes se concentra cerca de las superficie negativas y se fija, utilizando puentes de calcio, a los fosfolípidos cargados a través del ácido γ -carboxiglutámico que posee. Posteriormente el factor IXa junto con el factor VIII que actúa como cofactor no enzimático, activan al factor X. La velocidad de formación del factor Xa posee varios mecanismos de retroalimentación positivos. Uno es la activación del factor VIII por parte del factor Xa o la trombina. Otro son los fosfolípidos plaquetarios que bajo la acción de la trombina sufren una reorientación por la que la fosfatidilserina es expuesta en la cara externa de la membrana citoplasmática. Tras la formación del factor Xa, las dos vías de activación de la coagulación prosiguen por una vía común^{149,205}.

3.1.3.2.2 Vía extrínseca

Unicamente dos componentes intervienen en la vía extrínseca, el factor tisular y el factor VII. El factor tisular activa la coagulación al formar un complejo con el factor VII mediado por el calcio, donde el primero sufre un cambio conformacional que resulta en la exposición del centro activo. Este complejo, factor tisular-factor VII es el más potente activador de la coagulación que se conoce. Como resultado, el factor X es activado sobre la superficie fosfolipídica y por un mecanismo de retroalimentación positivo, activará algunos de los factores que participan en su formación^{23,77}.

Por razones de claridad en la exposición hemos dividido las dos vías de activación de la coagulación como compartimientos estancos. Sin embargo *in vivo* la vía extrínseca e intrínsecas se hallan estrechamente interconectadas, así por ejemplo el factor VIIa unido al factor tisular y al calcio pueden activar al factor IX, y a su vez el factor XIIa puede activar al factor VII²³.

3.1.3.2.3 Vía común

La vía común de activación de la coagulación comienza con la formación del Factor Xa. La activación de esta proteína se produce en la vía intrínseca sobre una superficie fosfolipídica, principalmente la membrana plaquetaria. En la vía extrínseca es el componente lipídico del factor tisular el que actúa como superficie de ensamblaje. El factor Xa convierte protrombina en trombina aunque a velocidad baja; sin embargo, la rapidez de la reacción es acelerada considerablemente en presencia de factor V y fosfolípidos. Aquí también encontramos una reacción con retroalimentación positiva pues el factor V activado por la trombina es más activo acelerando la reacción⁹⁴.

Una vez formado, el factor Xa actúa sobre la molécula de protrombina liberando dos péptidos y transformándola en trombina. Tan pronto como se forma trombina libre ésta actúa sobre la molécula de fibrinógeno liberando dos pequeños péptidos del extremo aminoterminal de las cadenas A α (FPA) y dos de las cadenas B β (FPB) para transformarlo en fibrina. La liberación de estos péptidos expone puntos de la molécula de fibrina que interactúan con otras moléculas para formar polímeros que precipitarán formando una malla que asegurará el trombo plaquetario¹⁸³. Finalmente el factor XIII o factor estabilizante de la fibrina, formará puentes entre cadenas vecinas que aumentará la firmeza del trombo y lo hará menos sensible a la acción de la plasmina¹¹⁰.

3.1.3.3 Mecanismos de inhibición

Tabla 4. Características de los principales inhibidores de la coagulación.

	Peso molecular (kD)	Concentración por ml de plasma
- Antitrombina III	58	100-150 µg
- Inhibidor de la vía del factor tisular.	33	60-180 ng
- Proteína C	62	4 µg
- Proteína S	69	35 µg
- α_1 -antitripsina	55	2,5 µg
- α_2 -macroglobulina	725	2,5 µg

La principal función de la fibrina es contribuir al taponamiento de la lesión a través de la cual un vaso sangra. Sin embargo, tan pronto como el objetivo se consigue, deben existir mecanismos que limiten su formación. Si estos mecanismos no funcionan

adecuadamente, aparece el riesgo de trombosis. La información actualmente disponible sugiere que de las varias proteínas plasmáticas con capacidad de inhibición (Tabla 4), tres son los principales mecanismos inhibidores de la coagulación *in vivo*: el sistema heparina-antitrombina III (ATIII), la vía de la proteína C y el inhibidor de la vía del factor tisular (tissue factor pathway inhibitor, TFPI), denominado hasta el XIII Congreso Internacional de Trombosis y Hemostasia como inhibidor de la vía extrínseca (extrinsic pathway inhibitor, EPI) o bien inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteínas (lipoprotein associated coagulation inhibitor, LACI). Estas vías parecen complementarse unas a otras y trabajar en concierto para ejercer una potente actividad anticoagulante *in vivo* que es relativamente impotente *in vitro*.

3.1.3.3.1 Antitrombina III

La ATIII es el principal inhibidor fisiológico de la trombina y del factor Xa, aunque también neutraliza a los factores IXa, XIa, XIIa, calicreína plasmática y plasmina. La ATIII es una *serpina* (*serin protease inhibitors*, inhibidores de serín proteasas) que inhibe a los factores de la coagulación activados, uniéndose a través de un residuo de arginina a la serina del centro activo del factor; posteriormente este complejo será eliminado de la circulación por el sistema mononuclear fagocítico²¹.

La importancia de la ATIII como inhibidor de la coagulación la subrayan el hecho que la deficiencia homocigota de ATIII sea letal *in útero* y que los heterocigotos presenten frecuentes trombosis venosas¹⁴⁸.

La heparina acelera considerablemente la velocidad de la reacción de la ATIII con los factores de la coagulación. En el caso de la trombina, la unión de la heparina a la ATIII acelera la reacción unas 2.000 veces^{243,244}. Tras la formación del complejo ATIII-trombina, la heparina se disocia del complejo y puede ser utilizada nuevamente²²⁴. En un apartado posterior se revisa extensamente la interacción entre la ATIII y la heparina (ver pág. 53).

3.1.3.3.2 Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)

El TFPI es una proteína sintetizada en el endotelio que en condiciones basales circula en plasma asociada a las lipoproteínas y que también se encuentra en el interior de las plaquetas en unos gránulos distintos a los α ¹⁹⁶. Los niveles plasmáticos de TFPI aumentan bruscamente segundos después de una inyección endovenosa de heparina; de forma análoga a la liberación de la lipoproteína lipasa, la heparina liberaría el TFPI fijado a los glicosaminoglicanos de la superficie luminal del endotelio vascular^{197,234}. Dado que una inyección de heparina puede aumentar los niveles de TFPI varias veces, el pool de TFPI fijado a la superficie del endotelio puede muy bien ser mayor que el pool de TFPI circulante en plasma. De esta forma es posible que la superficie luminal del endotelio represente el sitio principal de acción para las acciones fisiológicas del TFPI²³³.

El TFPI actúa por un mecanismo poco común como es el siguiente: en primer lugar se une al factor Xa inhibiendo su función, a continuación el complejo formado por TFPI-factor Xa se une al complejo fijado sobre la membrana factor VIIa-factor tisular inhibiendo su actividad. La ventaja potencial de este mecanismo de inhibición radica en que la inhibición del factor VIIa se demora temporalmente hasta que se forma factor Xa permitiendo de esta forma que alguna cantidad de factor Xa pueda producirse cuando el factor tisular se expresa en la superficie. Este sistema podría contribuir de forma significativa al ajuste fino de los mecanismos de

regulación²²¹. Existen evidencias experimentales de que la heparina y otros glicosaminoglicanos actúan como cofactores del TFPI en la inhibición de la coagulación inducida por el factor tisular²⁹³.

3.1.3.3.3 Proteína C-proteína S

El tercer mecanismo en importancia es el sistema de la proteína C-proteína S. Este sistema difiere de los anteriores en que la ATIII y el TFPI inhiben a proteasas de la cascada de la coagulación mientras que la proteína C activada inhibe dos de las proteínas reguladoras no proteolíticas (cofactores): los factores Va y VIIIa. El sistema se activa en el lugar de la lesión al unirse parte de la trombina formada a la trombomodulina presente en la superficie de las células endoteliales; este complejo activa a la proteína C que a su vez forma un complejo con la proteína S fijada a la superficie del endotelio⁸³. El complejo unido a la superficie de diversas células (endoteliales, plaquetas, etc.) puede entonces inactivar al factor Va y VIIIa⁷⁰.

La proteína C, proteína S y trombomodulina están asociadas a las membranas celulares pero a través de mecanismos distintos. La proteína C y proteína S requieren residuos de ácido γ -carboxiglutámico y Ca^{2+} . Dado que estas proteínas requieren vitamina K para su biosíntesis, las proteínas sintetizadas en presencia de antagonistas de dicha vitamina son inefectivas. Por el contrario la trombomodulina es una proteína integral de la membrana y no se disocia de la superficie celular²⁴⁹.

3.1.4 Fibrinólisis

El sistema fibrinolítico es el encargado de eliminar la fibrina del lecho vascular; además interviene en otros importantes fenómenos biológicos como la ovulación, la implantación del embrión, el funcionalismo de los macrófagos, la transformación neoplásica y la cicatrización de los tejidos.

3.1.4.1 Componentes

Tabla 5. Características de los principales componentes del sistema fibrinolítico.

	Peso molecular (kD)	Concentración por ml de plasma
- Plasminógeno	92	200 µg
- Activador del plasminógeno tipo tisular	68	0.005 µg
- Activador del plasminógeno tipo urinario de cadena única	54	0.008 µg
- α_2 -antiplasmina	70	70 µg
- Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo I	52	0.05 µg
- Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo II	60/47	<0.005 µg

El sistema fibrinolítico (Tabla 5) está constituido por una proenzima inactiva, el plasminógeno, que es convertida en la enzima activa, la plasmina, que digiere a la fibrina convirtiéndola en productos de degradación de la fibrina solubles. Dos tipos inmunológicamente distintos de activadores del plasminógeno han sido identificados en sangre: el activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA). La inhibición del sistema fibrinolítico se produce o a nivel de los activadores del plasminógeno por inhibidores específicos (inhibidores del activador del plasminógeno tipo 1 y 2, PAI 1 y PAI 2), o bien a nivel de las plasmina por la α_2 -antiplasmina⁵³.

Las enzimas del sistema fibrinolítico (como algunos de los factores de coagulación) son serín-proteasas, es decir contienen el aminoácido serina en el centro activo de la molécula. En general están constituidas por dos cadenas A y B, unidas por uno o más puentes disulfuro. En cuanto a los inhibidores, casi todos ellos pertenecen a la familia de las serpinas. Todos ellos poseen en el centro activo un puente peptídico que es digerido por la enzima específica a la que inhiben,

produciéndose la liberación de un péptido del inhibidor y la formación de un complejo inactivo enzima-inhibidor^{35,81}.

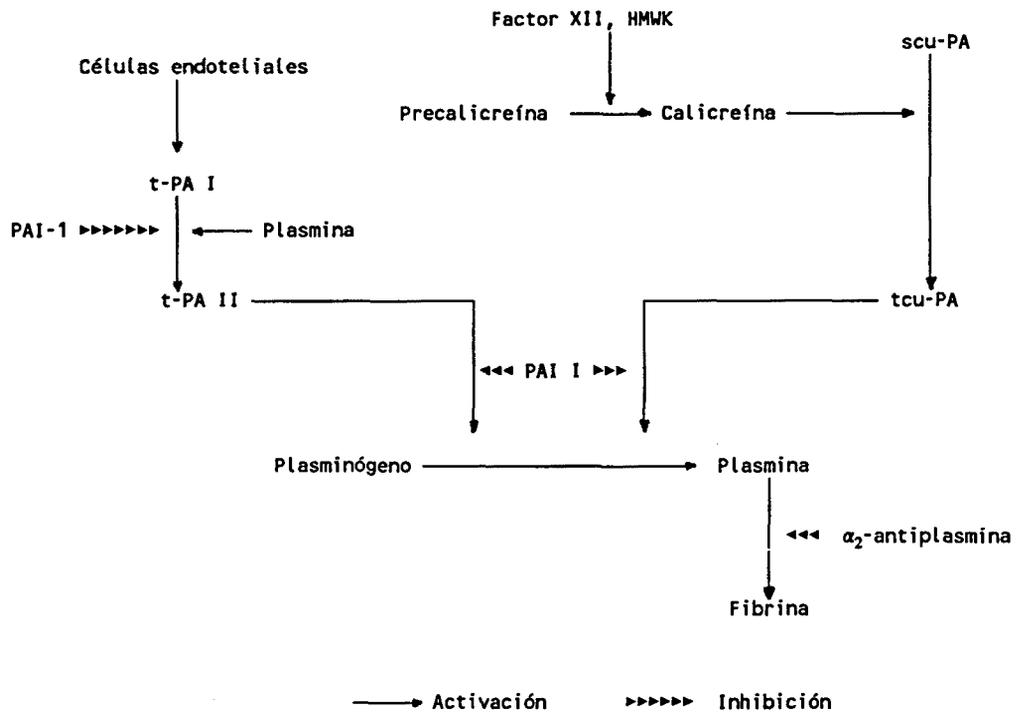


Figura 2. Cascada de activación de la fibrinólisis.

3.1.4.2 Activación

La plasmina, la enzima primeramente envuelta en la lisis de la fibrina, se encuentra en el plasma en forma de precursor inactivo, el plasminógeno que es activado principalmente por dos vías: la del t-PA y la vía del u-PA (Fig. 2). La lisis de un trombo se inicia cuando el t-PA es liberado por el endotelio. Uno de los factores que activan su liberación es la estasis proximal que se produce tras una trombosis en el árbol vascular. En ausencia de fibrina la actividad enzimática del

t-PA es baja, sin embargo en presencia de aquella la actividad catalítica del t-PA sobre el plasminógeno aumenta unas 1.500 veces. Asimismo la fibrina proporciona una superficie a la que el t-PA y el plasminógeno se fijan con lo que se aumenta la concentración local del enzima y su sustrato. Una vez formada la plasmina sobre la fibrina, aquella se halla protegida de la inhibición por la α_2 -antiplasmina, así la vida media de la plasmina en plasma es de aproximadamente 0,1 segundos mientras que en presencia de fibrina es de 10 a 100 segundos. La activación del plasminógeno también se puede producir por una "vía intrínseca" en la que intervienen el factor XII, HMWK y la precalicreína. La calicreína generada por acción del factor XII y HMWK convierte el u-PA de cadena única (scu-PA) en u-PA de dos cadenas (tcu-PA), que posee un efecto activador del plasminógeno 100 veces mayor que el scu-PA.

La activación de la plasmina está sujeta a una estrecha regulación. El PAI 1 liberado por las plaquetas tras la activación, es el principal inhibidor del t-PA y del u-PA en plasma. Posiblemente su acción es mucho más importante en los trombos arteriales que contienen un mayor número de plaquetas y una menor cantidad de t-PA debido a que las células endoteliales que recubren las arterias producen menos t-PA que el endotelio que tapiza las venas.

3.2 HEPARINAS

3.2.1. HISTORIA

3.2.1.1 Heparina no Fraccionada

La heparina posee una historia peculiar; tras su descubrimiento tardó 20 años en ser introducida en clínica, y sin demasiados trabajos experimentales. Por ejemplo en Suecia donde se registró como fármaco en 1939, se presentó un formulario de dos hojas y dos pequeños trabajos experimentales (como contraste quizás señalar que la documentación presentada para el registro de una heparina de bajo peso molecular, en ese mismo país estaba formada por 21 grandes volúmenes).



A

Jay McLean



B

Figura 3. Fotografías de Jay McLaen (A) y de Williams Henry Howell (B).

Para centrarnos en el descubrimiento de la heparina, debemos remontarnos a Septiembre de 1915, cuando un joven estudiante del primer curso de Medicina llamado Jay McLaen, solicita al entonces insigne profesor William Henry Howell

de la Universidad Johns Hopkins, trabajar en un proyecto de investigación en el campo de la Fisiología. Howell le dirigió hacia el estudio de la acción procoagulante de las cefalinas obtenidas del cerebro, corazón e hígado. Los trabajos experimentales del joven estudiante confirmaron que la cefalina extraída de los órganos citados poseía una acción procoagulante; los resultados fueron publicados en el *American Journal of Physiology* con el título de "The thromboplastic action of cephalin"¹⁷⁴.

Sin embargo en el curso de los experimentos, McLean obtuvo extractos del corazón y del hígado de solubilidad ligeramente diferente a la de la cefalina. Estas sustancias habían sido descritas anteriormente con el nombre de *cuorina* (del corazón) y *heparfosfátido* (del hígado) aunque su efecto sobre la coagulación nunca habían sido probado¹⁷⁵. McLean lo hizo y para su sorpresa encontró que ambas sustancias inhibían en lugar de inducir la coagulación de la sangre. Las insólitas propiedades anticoagulantes de los extractos hepáticos y cardíacos fueron mencionados únicamente en cinco frase del artículo citado, pero no en el título ni en las conclusiones. En una carta escrita 24 años después, McLean explicaba que ésto se debió a que el Profesor Howell consideró que dichos hallazgos eran muy prematuros y que no debían incluirse en un artículo sobre la propiedades procoagulantes de la cefalina sino en uno aparte. McLean, sin reconocer la importancia de su descubrimiento, dejó Baltimore en el verano de 1916, tras aceptar una plaza en Filadelfia. Pasarían más de 20 años, antes de que buscara el crédito y el reconocimiento de la comunidad científica por el descubrimiento de la heparina, que sería atribuido a su maestro.

Mientras tanto el Profesor Howell intrigado por el hallazgo y con la colaboración con otro estudiante de Medicina, L. Emmett Holt Jr., continuó el trabajo de purificación y estudio de la sustancia. Los resultados fueron publicados en un artículo en el *American Journal of Physiology* en Octubre de 1918 con Holt como coautor y titulado "Two new factors in blood coagulation - Heparin and proantithrombin"¹²⁴. En el escribía " El primer nuevo factor es un fosfátido no descrito previamente, que aparece en varios tejidos pero que se encuentra en mayor cantidad en el hígado. Este fosfátido es designado como *heparina*, para indicar su origen en el hígado. Inhibe la coagulación parcial o completamente dependiendo de la

concentración". Howell continuó trabajando en la purificación e identificación de la heparina hasta el final de su carrera. En su último artículo publicado en 1928, a los 68 años el extracto que utilizaba contenía de 50 a 100 unidades Howell por mg (1 unidad Howell era igual a la cantidad necesaria de producto para anticoagular 1 ml de sangre durante 24 horas) y el agente activo había sido ya identificado como un hidrato de carbono complejo con grupos sulfato en su molécula¹²³.

No obstante, los avances necesarios en la obtención y purificación de la heparina para su introducción en clínica fueron realizados por dos grupos a ambos lados del Atlántico, en Toronto (Canadá) y en Estocolmo (Suecia) y fueron el resultado de la colaboración entre un investigador básico y un cirujano. El grupo de Toronto dirigido por Charles Herbert Best, a la sazón catedrático y director del Departamento de Fisiología de la Universidad de Toronto, habían publicado en 1934 un método para purificar la heparina de pulmón bovino mucho más barato y eficaz que el utilizado para obtenerla de hígado de perro. Por entonces habían conseguido heparina sódica cristalizada con una potencia de 500 u Howell por mg. En colaboración con Gordon Murray, un reputado cirujano vascular, el grupo del Profesor Best comenzó el 15 de Abril de 1935, el primer ensayo clínico con la heparina bovina en el Hospital General de Toronto.

Al mismo tiempo en Estocolmo Erik Jorpes trabajaba también en la obtención y composición de la heparina y había publicado en 1935 un trabajo donde clarificaba (tanto como era posible para la época) su estructura química¹³⁶. En colaboración con Clarence Crafoord, un conocido cirujano vascular, publicó en 1937 el primer ensayo clínico de la literatura con heparina, que contiene dos series de 6 pacientes cada una, a los que se administra heparina como prevención del tromboembolismo postoperatorio⁵⁸. La eficacia del tratamiento con heparina en la profilaxis de las complicaciones tromboembólicas de la cirugía y en la enfermedad tromboembólica es confirmada por el trabajo de Murray y Best publicado en 1938 con 335 pacientes¹⁸⁵ y en una segunda publicación de Crafoord y Jorpes aparecida en 1941 con 325 pacientes tratados⁵⁹. Como anécdota señalar que ya estos trabajos pioneros seguían pautas terapéuticas diferentes: así el grupo canadiense administraban la heparina en perfusión endovenosa continua mientras que los

autores suecos lo hacía en forma de inyecciones endovenosas intermitentes, generalmente 4 veces al día.

Tras estos trabajos iniciales el uso clínico del anticoagulante descubierto se extendió por el resto de Europa y Estados Unidos y sus indicaciones se ampliaron rápidamente. Así se comenzó a usar en el tratamiento de las trombosis venosas establecidas. Asimismo, abrió nuevos campos a la cirugía vascular al permitir la reparación quirúrgica de vasos lesionados u ocluidos y la realización de intervenciones a corazón abierto con el uso de los circuitos de circulación extracorpórea. También la Nefrología se benefició de la introducción en terapéutica de la heparina al poder llevarse a cabo las primeras hemodiálisis con éxito como tratamiento de la insuficiencia renal aguda.

De forma paralela a los estudios sobre la estructura de la heparina se llevaron a cabo trabajos sobre su mecanismo de acción. Así, ya en 1918 Howell sugirió que el polisacárido requería de un cofactor plasmático para llevar a cabo su acción¹²⁴. La naturaleza del cofactor de la heparina (tal como fue llamado entonces) continuó ignorada, aunque pronto se hizo evidente las similitudes que presentaba con una inhibidor de proteasas plasmáticas llamado antitrombina. En ese momento hasta 6 "antitrombinas" habían sido descritas siendo denominadas por números romanos; las tres principales eran la antitrombina I que designaba a la adsorción de la trombina por la fibrina durante la coagulación, la antitrombina II que era el llamado cofactor de la heparina y la antitrombina III que denominaba la progresiva acción antitrombina del plasma o suero. Evidencias de que las dos últimas actividades correspondían a una misma proteína fue presentada por Abildgaard en 1968, tras purificar por primera vez la molécula. La proteína aislada, llamada ATIII, mostraba a la vez actividad antitrombínica (es decir inhibición lenta y progresiva de la trombina en ausencia de heparina) y actividad cofactor de la heparina (inhibición "inmediata" del enzima en presencia del polisacárido). Trabajos posteriores demostraron que la actividad cofactor de la heparina es dependiente de la unión de la heparina a la ATIII, con lo que se acelera de forma considerable la velocidad de inactivación de la trombina y de varias serín proteasas por parte del complejo.

3.2.1.2. Heparinas de Bajo Peso Molecular

En 1976, tres grupos de forma independiente demostraron que sólo entre el 30 y el 50 por cien de las cadenas de polisacárido presentes en la heparina son capaces de unirse a la ATIII y por tanto poseer actividad anticoagulante^{9,125,146}. Se utilizó ATIII purificada unida a una matriz insoluble para separar la heparina en dos fracciones distintas: una con alta y otra con baja afinidad por la ATIII. La actividad anticoagulante de estas fracciones correlacionaba fuertemente con el grado de afinidad: así la de alta afinidad poseía una mayor actividad anticoagulante (300-400 U/mg) comparada con la heparina inicial (150 U/mg), mientras que la de baja afinidad estaba casi exenta de esta actividad. Esta desigualdad funcional entre las dos fracciones son el resultado de pequeñas pero importantes diferencias estructurales. En efecto, únicamente la fracción de alta afinidad por la ATIII posee en sus cadenas la secuencia de cinco monosacáridos esenciales para la unión a la ATIII.

La heparina disponible en terapéutica está formada por cadenas de polisacáridos de un peso molecular que varía entre unos 5 y 30 KDa con una media entre 10 y 15 KDa. Mediante diversas técnicas se han obtenido fracciones de diferentes pesos moleculares promedio y con una variación en dichos pesos mucho más estrecha. Los estudios de dichas fracciones han demostrado que su efecto anticoagulante es dependiente de su peso molecular. Así la capacidad para prolongar el tiempo de coagulación plasmático medido con el APTT, disminuye de forma drástica con la reducción en el peso molecular. El desarrollo de sustratos cromogénicos sintéticos con una alta especificidad por ciertos factores de la coagulación junto a la mejora de las técnicas de purificación de las proteínas plasmáticas han hecho posible el estudio del efecto de la heparina sobre factores de la coagulación aislados. Así estudios sobre la capacidad de las diferentes fracciones de la heparina para potenciar la inhibición de la trombina por parte de la ATIII, en experimentos con los factores sustratos puros han obtenido un patrón similar al obtenido con el APTT. De forma inesperada, Andersson *et al* demostraron que las fracciones de bajo peso molecular, que poseían una escasa capacidad para alargar el APTT y para potenciar la inhibición de la trombina, eran unos poderosos estimuladores de la inhibición del factor Xa por parte de la ATIII⁹. Por primera vez

se demostró que estas fracciones consideradas hasta entonces inactivas, poseían una actividad biológica significativa.

Este primer hallazgo despertó un enorme interés por sus potenciales implicaciones teóricas; parecía posible deslindar el efecto de la heparina sobre la trombina y sobre el factor Xa y por tanto reducir el riesgo de hemorragia que se observa con la heparina manteniendo el efecto terapéutico. Las investigaciones encaminadas a profundizar en el conocimiento de estas fracciones se vieron dificultadas por el escaso material que se halla presente normalmente en la heparina. El desarrollo de técnicas de despolimerización controlada permitió la preparación de grandes cantidades de material de bajo peso molecular y el progreso en el conocimiento de sus efectos sobre la hemostasia. El resultado práctico de todo ello fue el desarrollo e introducción en terapéutica de las heparinas de bajo peso molecular.

3.2.2 ESTRUCTURA QUIMICA

La definición química de heparina ha cambiado varias veces en el curso de los últimos años de forma paralela al refinamiento en los métodos de purificación y análisis estructural de los polisacáridos que la forman. La heparina no es estructuralmente homogénea debido a la modificaciones biosintéticas de sus precursores y regiones heterogéneas que se encuentran distribuidas por diferentes cadenas de la heparina. Tal heterogeneidad, junto a la posible contaminación por sustancias de composición similar, han dificultado el conocimiento de incluso las principales características estructurales de la heparina⁴³.

Actualmente se define a la heparina como una familia de moléculas de polisacáridos formados por residuos de ácido urónico y D-glucosamina con diversos grados de sulfatación unidos por enlaces 1→4. Las fórmulas de los monosacáridos constituyentes identificados hasta ahora se muestran en la Fig. 4. Los residuos de ácido urónico pueden ser o bien ácido L-idurónico (1,IdoA) o ácido D-glucurónico (2,GlcA); los residuos de D-glucosamina (GlcN) están o N-sulfatados (3,GlcNSO₃) o bien N-acetilados (4,GlcNAc). Los residuos que se

Name	Structure	R-group	Abridged nomenclature	Symbols
uronic acid residues				
(1) α -L-iduronic acid		(a) R = H	IdoA	I
		(b) R = SO ₃ ⁻	IdoA-2S	I _{2s}
(2) β -D-glucuronic acid		(a) R = H	GlcA	G
		(b) R = SO ₃ ⁻	GlcA-2S	G _{2s}
glucosamine residues				
(3) N-sulpho- α -D-glucosamine		(a) R = R' = H	GlcNSO ₃	A _{NS}
		(b) R = SO ₃ ⁻ R' = H	GlcNSO ₃ -6S	A _{NS,6s}
		(c) R = R' = SO ₃ ⁻	GlcNSO ₃ -3,6S	A _{NS,3,6s}
		(d) R = H R' = SO ₃ ⁻	GlcNSO ₃ -3S	A _{NS,3s}
(4) N-acetyl- α -D-glucosamine		(a) R = H	GlcNAc	A _{NA}
		(b) R = SO ₃ ⁻	GlcNAc-6S	A _{NA,6s}

Figura 4. Monosacáridos constituyentes identificados en la heparina.

encuentran más abundantemente en las heparinas utilizadas en terapéutica son IdoA 2-sulfato (1b) y GlcNSO₃ 6-sulfato (3b).

La fórmula de las secuencias típicas de la heparina se representan en la Fig. 5. Los residuos 1b y 3b se combinan más frecuentemente en secuencias 5 (1→4)O- α -L-ácido idopiranosilurónico 2-sulfato)-(1→4)-(2-deoxi-2-sulfamino- α -D-glucopiranosil 6-sulfato)-), constituyendo las regiones regulares de la heparina. Dicha secuencia constituye el producto principal (aunque no necesariamente el último) de la biosíntesis y representa aproximadamente el 90 por cien de la

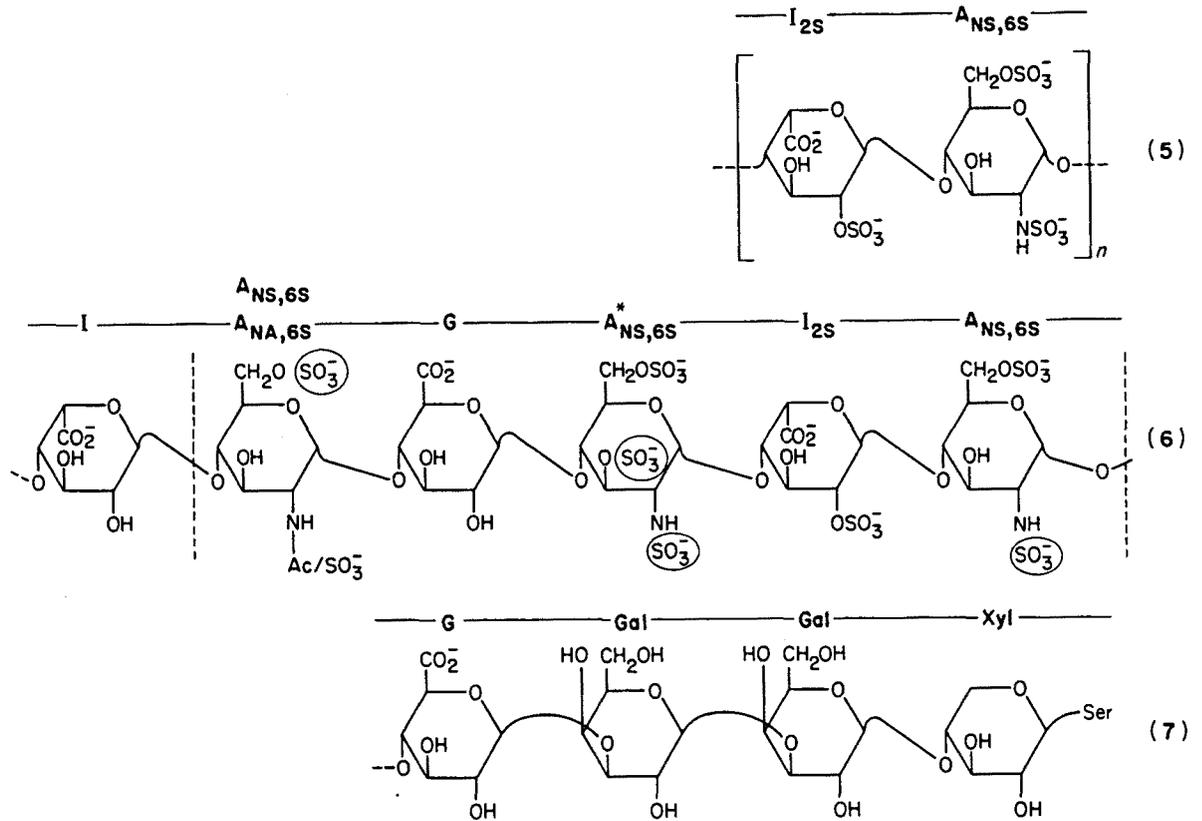


Figura 5. Secuencias típicas de la heparina.

estructura de la heparina de pulmón bovino y el 70 por cien de la de mucosa intestinal porcina. La biosíntesis incompleta conduce a una mezcla de cadenas donde las secuencias 5 se interponen, en regiones irregulares, con otras que contienen ácidos urónicos no sulfatados. Los aminoazúcares 3 y 4 pueden presentar diversos grados de sulfatación.

Una única combinación de la unidad de disacárido 5 y otros residuos constituyen la secuencia de hexasacárido 6, que contiene la secuencia de unión a la ATIII¹⁶¹. Esta secuencia se encuentra únicamente en alrededor de un tercio de las cadenas que forman la heparina de origen mucoso^{9,125,146}. El residuo IdoA no sulfatado (1) no es esencial para la unión a la ATIII; en realidad la mínima secuencia que se fija a la ATIII es un pentasacárido (entre líneas discontinuas en

fórmula 6)⁴⁶. Grupos sulfato esenciales para la unión con alta afinidad a la ATIII están marcados con un círculo en la fórmula 6¹⁶⁰. Recientemente mediante síntesis química se ha obtenido una nueva molécula de pentasacárido con un grupo sulfato extra que posee una mayor afinidad por la ATIII que el pentasacárido natural. Es el llamado ORG 31550 que posee una actividad anti-Xa de 1.230 U anti-Xa/mg mientras que el pentasacárido natural sólo posee 700¹⁷⁸.

Un cierto número de las moléculas de la heparina terminan con una "región de enlace" constituida por el tetrasacárido 7 representado en la Fig. 5, que contiene GlcA, dos residuos de D-galactosas y uno de D-xilosa unidos a un residuo de serina. El aminoácido es un resto del armazón polipeptídico original del cual las cadenas de polisacáridos han sido separadas por proteólisis. Sin embargo sólo una parte de las cadenas de polisacáridos que forman la heparina terminan con serina; ello se debe a la ruptura de puentes glicosídicos en el curso de la biosíntesis del proteoglicano, posiblemente por parte de una endo-glucoronidasa así como ocasionales despolimerizaciones que pueden ocurrir durante el almacenamiento. Como consecuencia un número variable de las cadenas de polisacáridos constituyentes de la heparina terminan con residuo de monosacárido.

Otra causa de heterogeneidad en la heparina es la acción de endo-glicosidasas específicas sobre secuencias de monosacáridos que no están uniformemente distribuidos por el precursor así como posibles despolimerización aleatoria durante la síntesis. Como resultado la longitud de las cadenas varía considerablemente⁴⁴.

3.2.3 BIOSÍNTESIS Y FUNCIÓN BIOLÓGICA.

La heparina se produce en los mastocitos mediante un complicado proceso biosintético que incluye unas 12 reacciones diferentes. Los procesos involucrados en dicha síntesis pueden ser divididos en tres fases: formación de una región de unión polisacárido-proteína que sirve de armazón (proteoglicano), formación de las cadenas de polisacárido y la ulterior modificación de las cadenas de polisacárido.

Estudios realizados en preparaciones obtenidas de piel de rata¹²¹ han demostrado que cada uno de dichos proteoglicanos contiene unas 15 cadenas de

polisacáridos (peso molecular entre 60 y 100 KDa) unidos a un armazón peptídico compuesto de 20 a 25 residuos de serina y glicina dispuestas de forma alterna²⁵². Al menos 2 de cada 3 residuos de serina están unidos a una cadena de polisacárido. La unión del polisacárido al residuo de serina se realiza a través de secuencia de tres monosacáridos (galactosil-galactosil-xilosil) que es común a otros proteoglicanos de importancia biológica como los del heparán sulfato, condroitín sulfato y dermatán sulfato.

Las preparaciones de heparina disponible en terapéutica generalmente no contienen proteoglicanos sino fragmentos de polisacáridos de un peso molecular entre 5 y 30 kD. Este bajo peso molecular no es el resultado de una degradación durante el proceso de obtención sino que refleja el estado en el que el polisacárido se encuentra en los tejidos (mucosa intestinal porcina o pulmón bovino). Ello es consecuencia de la acción de endoglicosidasas capaces de despolimerizar las largas cadenas de polisacáridos presentes en el proteoglicano original a fragmentos de menor tamaño. Estudios llevados a cabo en cultivo de células de mastocitoma han puesto de manifiesto que este proceso de degradación, que se produce en las siguientes 10 ó 20 horas de finalizar la síntesis, se inicia con la separación de la cadena de polisacárido intacta, posiblemente por la acción de peptidasas. En un segundo tiempo es cuando actúan las endoglicosidasas resultando en cadenas de polisacárido de tamaño que se encuentran en la heparina comercial.

El amplio abanico de acciones, aparentemente no relacionadas, que posee la heparina ha planteado la cuestión de cuál es su verdadero papel en el organismo. La heparina se halla confinada al citoplasma de las células cebadas o mastocitos y entre los mamíferos algunas especies carecen de ella completamente (e.g. el conejo) mientras que en otros (e.g. perro y vaca) la poseen en muchos tejidos y a altas concentraciones¹⁸⁸. Entre los invertebrados, la heparina solo ha sido hallada en algunas especies de moluscos. La aparición de la heparina se produce tardíamente durante el desarrollo fetal.

Diversos autores han especulado sobre el papel que jugaría la heparina en la protección del cuerpo frente a organismos extraños como bacterias y virus, pues algunas las de las características descritas anteriormente, parecen avalar dicha

hipótesis. La heparina (y/o los mastocitos) se localizan especialmente en tejidos y órganos que están en contacto directo con el exterior (e.g. piel, pulmón e intestino). Además cuando la piel, el pulmón o el intestino no están funcionalmente activos (como en el desarrollo fetal) no se encuentra ni siquiera trazas de heparina. También la presencia de heparina en el hígado, ganglios linfáticos, bazo y placenta (órganos que funcionan como barreras internas contra la infección) contienen apreciables cantidades de heparinas. Es interesante señalar que la cara maternal de la placenta contiene siete veces más heparinas que la cara fetal.

Trabajos experimentales han apoyado la teoría de que la heparina intervendría en la defensa contra patógenos sin la participación del sistema inmune. En este contexto quizás apuntar que la heparina aparece en etapas tardías del desarrollo fetal, antes del desarrollo del sistema inmune. Es improbable que las funciones biológicas de la heparina pueda estar relacionada con la coagulación dado que organismos con un sistema de coagulación sanguínea complejo (e.g. el conejo) no poseen heparina, y especies sin mecanismos de coagulación funcionantes (e.g. algunos moluscos) contienen grandes cantidades de heparinas. Finalmente, cualquiera que sea la función biológica de la heparina, su heterogénea distribución en la economía sugiere que participa en mecanismos que no son esenciales para la supervivencia del organismo¹⁸⁷.

3.2.4 FARMACODINAMICA.

3.2.4.1 Efecto Anticoagulante y Antitrombótico

Para la discusión que sigue, será importante distinguir entre los términos "anticoagulante" y "antitrombótico" que si bien presentan cierta relación entre ellos, no es siempre de este modo. Así, por "anticoagulante" nos referiremos a un test *in vitro* que refleja la capacidad de la heparina para prolongar el tiempo de coagulación plasmático (p.ej. el APTT) o bien para potenciar la inhibición de factores de la coagulación aislados (p.ej. factor Xa o trombina). Esta actividad o potencia se expresa en unidades internacionales (UI) referidas a un estándar en uso. Con el término "antitrombótico" se designará la capacidad real de la heparina para

inhibir *in vivo* la formación o crecimiento de un trombo en una situación clínica o experimental.

La heparina ejerce la mayor parte de su efecto anticoagulante al incrementar la velocidad en la que el inhibidor fisiológico de la coagulación ATIII inactiva a los factores de coagulación activados, principalmente calicreína y factores XIIa, XIa, IXa, Xa y trombina (IIa). En primer lugar la heparina, a través de una secuencia específica de cinco monosacáridos, se une a varios residuos de lisina de la ATIII que induce un cambio conformacional en el centro activo del inhibidor por el que se acelera varios órdenes de magnitud la afinidad por el factor de coagulación activado. Tras la formación del complejo heparina-ATIII-factor de la coagulación activado, la heparina es liberada del complejo pudiendo nuevamente unirse a otra molécula de ATIII y comenzar de nuevo el proceso. El complejo ATIII-factor de la coagulación activado es eliminado de la circulación por el sistema mononuclear fagocítico²²³. Como consecuencia de la inhibición de la trombina, ésta es incapaz de activar a los factores V y VIII, con lo que se bloquea el mecanismo fisiológico de retroalimentación positiva-trombina dependiente²⁰⁴.

Aproximadamente sólo el 30-50 por cien de las cadenas de polisacáridos que constituyen la heparina posee la secuencia de cinco monosacáridos necesaria para unirse a la ATIII y por lo tanto son capaces de catalizar la inhibición de los factores de la coagulación activados; es la llamada fracción de alta afinidad. Las cadenas que no poseen el pentasacárido específico, forman la llamada fracción de baja afinidad y aunque no puedan unirse a la ATIII también son capaces de inhibir la activación de la protrombina en plasma normal. La fracción de baja afinidad también aumenta la actividad anticoagulante de los oligosacáridos de la heparina²⁵⁵. La razón por la que la fracción con baja afinidad por la ATIII es capaz de inhibir la activación de la protrombina en el plasma normal es doble. En primer lugar catalizan la inhibición de la trombina por el HCII y así disminuyen la formación del complejo protrombinasa al reducir la concentración efectiva de trombina. En segundo lugar también inhiben la activación del factor V independiente de toda inhibición de la trombina²⁰³.

A concentraciones mayores de las terapéuticas, la heparina posee un efecto adicional al catalizar la inhibición de la trombina por otra proteína plasmática, el HCII. Este es un inhibidor de proteasas que se halla en el plasma a concentraciones de $1,2 \mu\text{M}$, y a diferencia de la ATIII, sólo es capaz de inhibir a la trombina²¹².

Recientemente se han presentado evidencias experimentales de que el TFPI (ver pág. 38) contribuye de forma significativa al efecto anticoagulante de la heparina *in vivo*. Tras la administración de dosis terapéuticas de heparina por vía endovenosa se observa un aumento de la actividad TFPI en sangre¹⁵⁸. Este aumento es el responsable del llamado efecto postheparina, un efecto anticoagulante que no desaparece con la neutralización de la heparina en las muestras de plasma¹⁷⁹. La adición de anticuerpos anti-TFPI a plasma postheparina acorta el tiempo de coagulación, aunque de una forma algo menos efectiva que la adición de anticuerpo que inactiven a la ATIII⁵. Sin embargo, en muestras de plasma postheparina de pacientes con neoplasias el acortamiento del tiempo de coagulación observado con la inhibición del TFPI puede ser comparable al obtenido al inactivar la ATIII¹⁵⁹.

Como ya se comentó anteriormente (ver pág. 47) el factor Xa y la trombina presentan diferentes patrones de inhibición por parte de la ATIII en presencia de la heparina. En cuanto al resto de los factores de coagulación de la vía intrínseca los modelos de inhibición siguen el patrón característico de la trombina o bien del factor Xa. Así el factor IXa y el factor XIa presentan un patrón semejante al de la trombina (es decir, por debajo de cierto límite la actividad específica disminuye de forma drástica cuando el peso molecular se reduce). Por el contrario, la inactivación de la calicreína y del factor XII muestran un modelo que coincide con el del factor Xa. Estas discrepancias en el patrón de inhibición apuntaban hacia diferencias en los mecanismos moleculares que conducían a la inhibición de los factores.

Estudios llevados a cabo en modelos experimentales con factores de la coagulación purificados, ATIII y fracciones de la heparina de alta afinidad por la ATIII han puesto de manifiesto las grandes diferencias que se observan en la inhibición de los factores de coagulación por parte de las cadenas de monosacáridos de diferente longitud. Los oligosacáridos formados por la secuencia de unión a la

ATIII (pentasacárido) y algunas unidades de monosacáridos más (en conjunto hasta 16-18 unidades) poseen una pronunciada capacidad para potenciar la inhibición del factor Xa pero no la de la trombina (o

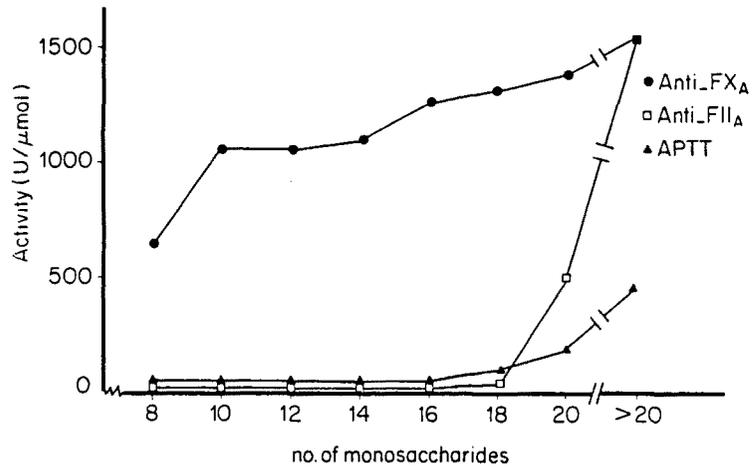


Figura 6. Actividad anticoagulante de oligosacáridos de la heparina con alta afinidad por la antitrombina III (ATIII). El efecto de los oligosacáridos en la inhibición del factor Xa (FXa) y la trombina (FIIa) se estudió en un sistema purificado que contenía la enzima y el oligosacárido.

alargar el APTT) (Fig. 6). Es decir, la potenciación de la inhibición de la trombina (o para prolongar el APTT) requiere que el oligosacárido contenga al menos 16-18 residuos de azúcares equivalente a un peso molecular de aproximadamente 5-6 kD. Estudios realizados con la mínima secuencia de la heparina capaz de fijarse a la ATIII (pentasacárido), preparada por síntesis química, han confirmado estos hallazgos: es un potenciador de la inhibición del factor Xa pero carece de toda acción inhibidora de la trombina⁴⁶.

Un mecanismo propuesto para explicar la inhibición del factor Xa y la trombina por parte de la ATIII con la influencia del peso molecular de la heparina, se muestra en la Fig. 7. El efecto potenciador en la inhibición del factor Xa es debido principalmente a la unión de la heparina (en realidad la secuencia del pentasacárido específico) a la ATIII que induce un cambio conformacional en el inhibidor que la convierte en más efectiva. No se requiere interacción entre la cadena de polisacáridos y la enzima, lo que explica el porqué incluso cadenas cortas de oligosacáridos son potentes aceleradores de la inhibición del factor Xa (y del factor XIIa y la calicreína). Sin embargo para la inhibición de la trombina la interacción entre la cadena de heparina y el inhibidor no es suficiente para un efectivo aumento en la velocidad de la reacción. Parece esencial la unión simultánea de la enzima y la ATIII al polisacárido para esta función y para ello se

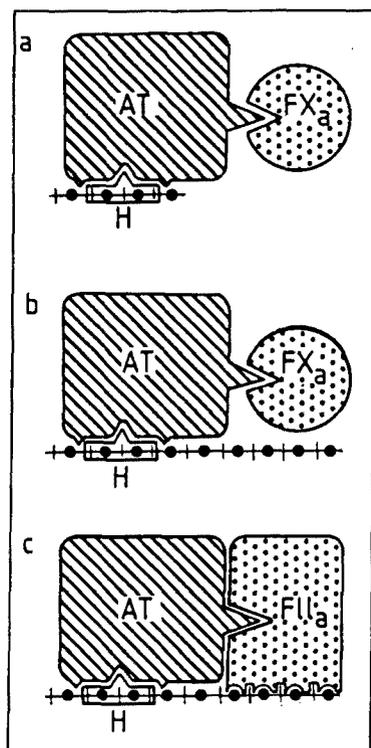


Figura 7. Complejos teóricos de ATIII (AT), trombina (FIIa), factor Xa (FXa) y oligosacáridos de la heparina de diversa longitud

en el tratamiento de las trombosis venosas profundas^{126,217}.

En cuanto a la actividad antitrombótica *in vivo*, se ha observado que ésta depende del peso molecular, es decir por debajo de una cierta longitud, los polisacáridos pierden toda acción antitrombótica a pesar de conservar una actividad inhibidora del factor Xa valorable^{201,255}. La capacidad antitrombótica disminuye de forma constante con la disminución del tamaño molecular, sin embargo esta reducción no es paralela a la desaparición del efecto antitrombina encontrado a los 18-20 monosacáridos. Estas observaciones se corresponden con los hallazgos obtenidos en trabajos experimentales, llevados a cabo con el pentasacárido que se une con alta afinidad a la ATIII. Aunque no posee actividad antitrombótica posee una alta capacidad inhibitoria del factor Xa y se demostró eficaz inhibiendo la trombosis inducida por suero y estasis^{256,271}. Sin embargo la dosis requerida para

requiere una cadena de al menos 18 monosacáridos. Cadenas más cortas sería por tanto inefectivas para inhibir la trombina (y los factores IXa y XIa).

El hallazgo de que las HBPM son catalizadores más eficaces de la inhibición del factor Xa que de la trombina llevó a diversos autores a proponer que dichos productos poseerían un relación efecto antitrombótico efecto hemorrágico mayor que la heparina no fraccionada^{42,255}; dicha hipótesis se vio apoyada por hallazgos experimentales en animales que demostraban un mayor efecto hemorrágico de la heparina no fraccionada que de las HBPM⁷². Algunos datos de ensayos terapéuticos publicados recientemente parecen mostrar que ésta reducción en el riesgo hemorrágico podría también observarse

alcanzar el mismo efecto antitrombótico fue 80 veces mayor en términos de actividad anti-Xa.

3.2.4.2 Otras Acciones

Durante los 60 años que siguieron al descubrimiento de la heparina, su efecto anticoagulante fue considerado el más importante, si no el único, efecto biológico. Sin embargo, desde la mitad de la década de los 70 un creciente número de trabajos han demostrado otras acciones importantes de la heparina independientes de su efecto anticoagulante. Destacan: inhibición de la función plaquetaria¹⁷⁶; inhibición de la unión del factor von Willebrand a las plaquetas²⁴⁵; aumento de la permeabilidad de la pared vascular²⁹¹; inhibición de la proliferación de las células musculares lisas de la misma¹¹³; actividad anti aterosclerótica¹³⁸; inhibición de la angiogénesis⁸⁹; actividad inmunosupresora¹⁴⁵ por su capacidad para inhibir la lisis mediada por anticuerpos²⁷⁹ y la actividad natural killer²⁹⁴ y modulación del efecto de distintos factores de crecimiento¹⁶³.

3.2.5 FARMACOCINETICA

Nuestro conocimiento de las propiedades farmacocinéticas de las heparinas es aún incompleto por varias razones. La heparina no fraccionada, como ya se ha discutido, es un mezcla heterogénea de polisacáridos de un peso molecular entre 5 y 30 KDa siendo el comportamiento farmacocinético de las cadenas de alto y bajo peso molecular bien diferentes. Aún más, las cadenas con alta afinidad por la ATIII (es decir aquellas que poseen el pentasacárido específico) poseen una vida media más larga que la cadenas con baja afinidad^{39,209}. Por otra parte, la farmacocinética de las HBPM son claramente diferentes de la de la heparina no fraccionada. Además, se ha demostrado que las características farmacocinéticas de la actividad anti-IIa y anti-Xa son muy diferentes. Por estas razones un estudio riguroso de la farmacocinética de la heparina es, teóricamente, casi imposible. En ésta sección

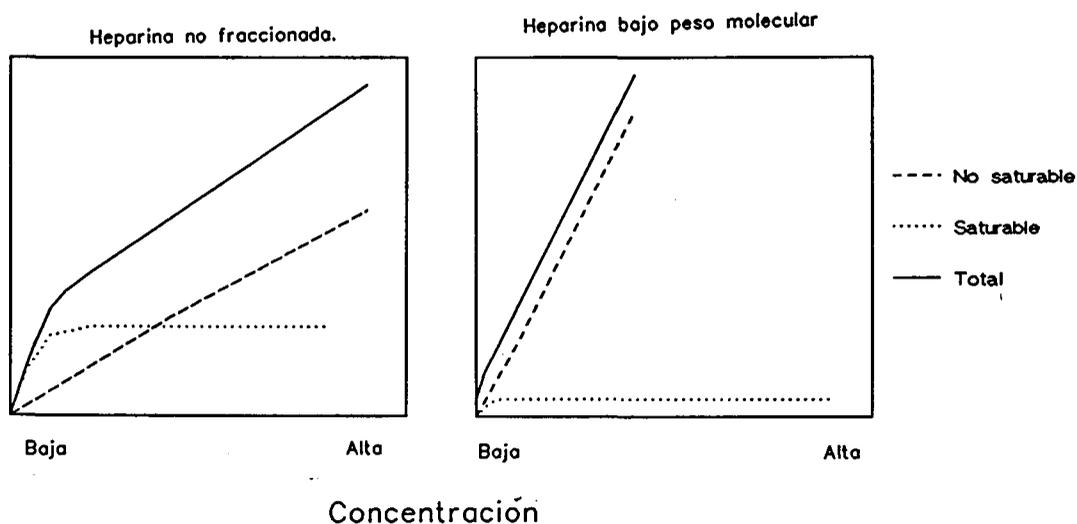


Figura 8. Representación esquemática de los modelos farmacocinéticos de la heparina no fraccionada y de la heparina de bajo peso molecular. Ver texto.

se revisará el modelo más aceptado que explica la mayoría de las propiedades farmacocinéticas de las heparinas.

Tras una inyección parenteral, la heparina se elimina de la sangre vía dos mecanismos uno saturable y otro no saturable, que funcionan de forma conjunta. La Fig. 8 muestra de forma esquemática el funcionamiento de dicho modelo: la cantidad de heparina no fraccionada eliminada por unidad de tiempo vía el mecanismo saturable inicialmente aumenta rápidamente con la dosis administrada aunque tiende a estabilizarse a dosis altas. Por el contrario, la cantidad de heparina no fraccionada excretada por la el mecanismo no saturable es siempre directamente proporcional a la dosis administrada. La relativa importancia de los dos mecanismos al aclaramiento de la heparina depende de la dosis y del tipo de heparina inyectada. Dosis bajas de heparina es aclarada principalmente a través de la eficiente vía saturable, mientras que a altas dosis, la relativa contribución de la vía no saturable se torna preminente. Por el contrario, en el caso de las HBPM, a cualquier dosis la contribución de la vía saturable es mínima; así estos compuestos son eliminados por la vía no saturable.

Existen evidencias que sugieren que el sistema mononuclear fagocítico y las células endoteliales representan la vía saturable de eliminación. Tras una inyección

a animales de heparina marcada con radioisótopos, la radioactividad se concentran en el hígado, bazo, médula ósea y pulmones⁶². Por medio de diversas técnicas ha sido posible demostrar la presencia de heparina en macrófagos¹¹² y células endoteliales¹¹². El bloqueo de la capacidad fagocítica del sistema mononuclear fagocítico prolonga de forma significativa la vida media de la heparina inyectada por vía endovenosa^{181,210}. La heparina marcada con radioisótopos se fija a las células endoteliales en cultivo^{16,100}; ésta fijación es saturable, reversible y relativamente específica para la heparina no fraccionada dado que otros glicosaminoglicanos tales como el dermatán y heparán sulfato no competen con la heparina. La afinidad de la heparina por las células endoteliales es independiente de su afinidad por la ATIII²⁰⁹ pero decrece con el peso molecular. La afinidad de la heparina de bajo peso molecular por las células endoteliales es unas 200 veces menor que la de la heparina no fraccionada¹⁷. Aproximadamente un 30 por cien de la heparina unida al endotelio es internalizada y despolimerizada por enzimas lisosómicas¹⁸.

El excreción renal representa la vía no saturable y lineal de eliminación de la heparina no fraccionada. Inmediatamente después de una inyección de dosis altas de heparina marcada con radioisótopo, se recupera de la orina producto activo no degradado, seguido en las horas siguientes por material desulfatado y despolimerizado. Tras una inyección de una dosis menor, sólo son excretados metabolitos inactivos⁶². Estos hallazgos experimentales apoyan el modelo expuesto anteriormente: tras la inyección de dosis altas de heparina, una parte del compuesto es captada por el endotelio y metabolizado. Dado que la capacidad de captación de las células es saturable, el exceso de la heparina no unido a las células es directamente excretado por la orina. Cuando se inyectan dosis bajas, la mayoría del material inyectado es metabolizado por las células, que no es saturado y los productos de degradación son eliminados por la orina^{38,100}.

El modelo de dos mecanismos de aclaramiento explicaría las principales propiedades farmacocinéticas de la heparina no fraccionada y las HBPM. No obstante algunas observaciones siguen sin ser plenamente explicadas. Diversos autores han publicados que pacientes tratados con heparina no fraccionada presentan una grandes variaciones interindividuales en cuanto a la vida media de la actividad

biológica^{51,116}. Estas grandes variaciones interindividual de parámetros farmacocinéticos también se ha encontrado en las HBPM.

También se han publicado la existencia de cambios circadianos en el efecto anticoagulante de la heparina infundida por vía endovenosa a un ritmo constante^{67,235}. Las diferencias observadas en el APTT o el tiempo de trombina entre la noche y el día eran lo suficientemente grandes como para llegar a tener significación clínica, incluso a dosis bajas¹⁴³. Sin embargo, en otro trabajo los autores no pudieron demostrar variaciones circadianas en la actividad anti factor Xa determinada por medio de sustrato cromogénicos para una HBPM²⁵⁹.

3.2.5.1 Heparina no fraccionada

Tras la administración de un bolus por vía endovenosa, la heparina no fraccionada desaparece de la sangre según una cinética de primer orden (exponencial). Este tipo de cinética sugeriría que la vida media del fármaco es constante, independientemente de la dosis administrada²⁵. Sin embargo, es bien conocido que la vida media de la heparina no fraccionada aumenta con la dosis administrada²⁰⁷. Por otra parte se ha publicado que tras la administración de una dosis grande de heparina no fraccionada (200 U/kg) a voluntarios sanos o animales de experimentación, la curva que describe la desaparición de la actividad biológica tiene un perfil cóncavo-convexo. Dichos autores sugieren que las observaciones previas correspondientes a cinéticas de primer orden se debían al cálculo de tangentes a curvas ligeramente convexas⁶⁶.

Boneau *et al* en trabajos experimentales en conejos obtuvieron resultados que concilian las anteriores observaciones y que ilustran la farmacocinética no lineal de la heparina no fraccionada (Fig. 9). Se administró a animales dosis crecientes de heparina no fraccionada y se midió la actividad anti-factor Xa en muestras seriadas. Cuando la dosis administrada fue menor que 100 U anti-factor Xa/kg, la desaparición de la actividad anti-factor Xa fue exponencial con una vida media de 3,8 a 11,4 minutos. Cuando las dosis administradas fueron mayores que 100 U anti-

factor Xa/kg, la desaparición de la actividad anti-Xa seguía el patrón de una curva cóncavo-convexo²⁶.

El modelo descrito explica también las aparentes contradicciones referidas en la literatura sobre la biodisponibilidad de la vía subcutánea en comparación con la vía endovenosa. Algunas publicaciones indican una biodisponibilidad del 30 por cien para la heparina no fraccionada cuando se administra por vía subcutánea mientras que para la HBPM ésta es del 100 por cien^{13,61}. Algunos autores atribuyen estas diferencias a la pobre absorción de los depósitos subcutáneos en comparación a la HBPM debido al mayor peso molecular de la primera⁷⁹. Sin embargo, en diversos ensayos clínicos se ha demostrado que las dosis de heparina no fraccionada que se requiere para tratar una trombosis venosa profunda por vía endovenosa o subcutánea son equivalentes⁷³. Este hallazgo sugiere que la biodisponibilidad de dosis altas de

heparina no fraccionada tendería a ser del 100 por cien. Este hecho ha sido demostrado en el animal de experimentación³⁴; así, la biodisponibilidad de la heparina no fraccionada inyectada por vía subcutánea aumenta con la dosis administrada, mientras que la de la HBPM permanece constante, y por encima del 100 por cien, independiente de la dosis. Estos resultados pueden ser explicados de la siguiente forma. La biodisponibilidad de la heparina inyectada subcutáneamente refleja la cantidad que entra en el compartimiento plasmático y por otra la velocidad a la que desaparece del plasma. Dichos autores³⁴ sugieren que a cualquier dosis más del 90 por cien de la heparina no fraccionada entra en la circulación general. Sin embargo, dado que las concentraciones máximas generadas son menores tras una

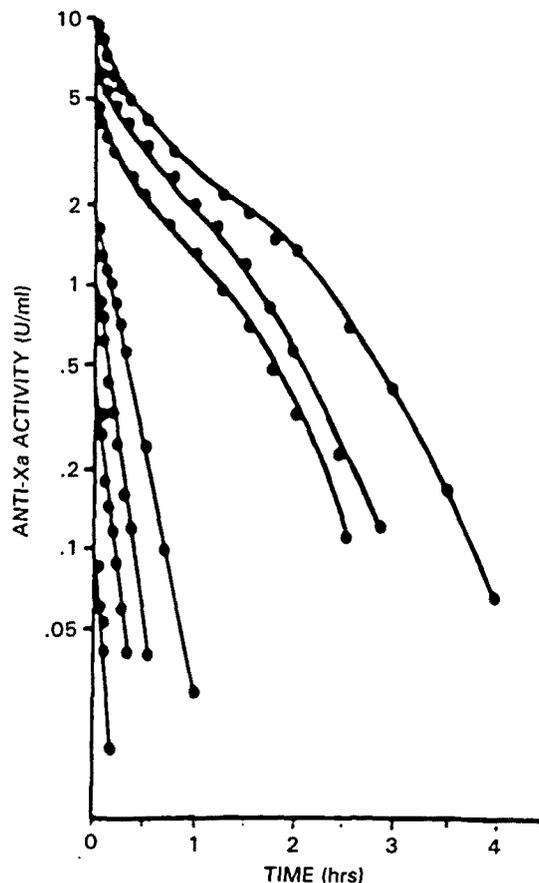


Figura 9. Desaparición de la actividad anti-Xa tras la administración endovenosa de dosis crecientes de heparina a conejos. De izquierda a derecha las dosis son 10, 25, 50, 100, 250, 375 y 500 U anti-Xa/Kg.

inyección subcutánea que tras una endovenosa, la heparina no fraccionada liberada por la vía subcutánea es eliminada más rápidamente por el mecanismo saturable, que continuamente acorta la vida media a medida que la concentración plasmática descende. Evidentemente, la importancia relativa de este efecto dosis dependiente, disminuye a medida que la dosis administrada por vía subcutánea aumenta, es decir cuando la concentración plasmática de heparina no fraccionada generada es más alta y el mecanismo celular de eliminación está saturado.

3.2.5.2 Heparinas de bajo peso molecular

El modelo de dos vías de excreción, una saturable y otra no saturable, puede ser también aplicado a las HBPM. Como consecuencia de su menor afinidad por las células endoteliales la contribución del mecanismo saturable en la eliminación de las HBPM es casi nula; la mayor parte de la HBPM es eliminada por la vía renal lineal no saturable. Los parámetros farmacocinéticos de la HBPM son independientes de la dosis inyectada, característica que contrasta con la heparina no fraccionada. Así, tras una inyección endovenosa de HBPM, la desaparición de la actividad inhibidora del factor Xa sigue un patrón exponencial con una vida media de 2 horas; un valor dos veces mayor que el normalmente observado tras la inyección de una dosis equivalente de heparina no fraccionada. Como se discutió en el apartado anterior, la ausencia de dosis dependencia, es decir la ausencia de acortamiento de la vida media cuando la actividad anti factor Xa circulante decrece, puede explicar por qué la biodisponibilidad de la vía subcutánea es independiente de la dosis y aproximarse al 100 por cien^{13,32}.

Otra aplicación de este modelo farmacocinético de la heparina, es el estudio de la influencia de la función renal en la vida media de las HBPM. Diversos trabajos experimentales han demostrado que así como la farmacocinética de la heparina no fraccionada no se ve afectada por el deterioro de la función renal, en el caso de las HBPM tanto si se administra por vía endovenosa como por vía subcutánea, el aclaramiento sufre una significativa reducción y la vida media se prolonga. Estos resultados sugieren la existencia de un riesgo potencial de

acumulación cuando las HBPM se administran a pacientes que sufren insuficiencia renal^{101,102}.

3.2.6 USO CLINICO

La heparina es efectiva en la prevención y tratamiento de las trombosis venosas y embolismo pulmonar, en la prevención de la trombosis mural después del infarto de miocardio, en el tratamiento de los pacientes con angina inestable e infarto de miocardio y en la prevención de la retrombosis arterial coronaria tras la trombolisis. Aunque no los discutiremos aquí, la heparina se usa también para evitar la coagulación de la sangre de los circuitos extracorpóreos en cirugía cardiovascular y hemodialisis, para tratar casos seleccionados de coagulación intravascular diseminada y para tratar retrasos de crecimiento intrauterinos en la mujer embarazada¹¹⁴.

3.2.6.1 Indicaciones terapéuticas

3.2.6.1.1 Profilaxis de la trombosis venosa profunda

La incidencia de trombosis venosa profunda (TVP) en piernas y pelvis es de alrededor del 0,4 por cien en los pacientes de bajo riesgo (edad inferior a 40 años y cirugía no complicada sin otro factor de riesgo para el tromboembolismo venoso), del 2 al 8 por cien en pacientes con riesgo moderado (cirugía mayor de más de 30 minutos de duración en pacientes de más de 40 años) y del 10 al 20 por cien en pacientes de alto riesgo (cirugía mayor en pacientes mayores de 40 años con TVP previa o tromboembolismo pulmonar (TEP) y alcanza el 50 por cien en la cirugía de cadera^{33,96}.

La elevación de las extremidades inferiores, deambulación precoz, y medias de compresión decrecientes proporcionan una prevención efectiva en pacientes de bajo riesgo²⁶³. Numerosos ensayos terapéuticos han demostrado la utilidad de la profilaxis con dosis bajas de heparina en la prevención del TVP y del TEP en pacientes de riesgo moderado. En el régimen profiláctico, la primera dosis de

5.000 UI de heparina por vía subcutánea generalmente se administra 2 horas antes de la cirugía, seguida de 5.000 UI de heparina cada 12 horas. La administración cada 8 horas se asocia con un ligero aumento, pero aún aceptable, en la incidencia de complicaciones hemorrágicas. La superioridad del esquema de 3 veces al día en pacientes con bajo riesgo trombotico con respecto a la prevención de la TVP y del TEP no ha sido plenamente demostrado⁵⁴.

En los pacientes de alto riesgo, que incluye aquellos con fracturas o cirugía electiva de cadera, cirugía urológica abierta, neoplasias ginecológica y amputaciones mayores, una dosis de 5.000 UI de heparina administrada a intervalos de 8 horas produce una reducción del 50 al 60 por cien del riesgo de TVP¹⁶². Con el ánimo de mejorar la reducción del riesgo trombotico, se han sugerido nuevos regímenes profilácticos; uno de ellos propone ajustar la dosis de heparina subcutánea para mantener el APTT alrededor de 1,5 veces el control (dependiendo del fabricante del reactivo APTT utilizado). Con este régimen se consigue mejorar la profilaxis pero no aumentar el riesgo de hemorragia postquirúrgica¹⁵⁷. La heparina subcutánea ajustando la dosis puede ser también utilizada para la profilaxis secundaria de la TVP después de una tanda de tratamiento con heparina a dosis completas. La dosis inicial es de 15.000 UI (40 por cien de la dosis total en 24 horas) ajustada posteriormente la dosis para que el APTT a las 6 horas de la inyección se encuentre entre 1,5 y 2 veces el control que corresponde a unos niveles de heparinemia medidos por la actividad inhibidora del factor Xa entre 0,2 y 0,3 UI/ml⁷³.

El efecto profiláctico se potencia con la administración conjunta de dihidroergotamina (0,5 mg) con cada 5.000 UI de heparina con lo que la protección se aumenta incluso en los pacientes que sufren cirugía ortopédica electiva o traumatológica¹. La dihidroergotamina aumenta el tono simpático de las venas y el flujo venoso en la región pélvica y extremidades inferiores. La mejoría en la eficacia de esta combinación sobre la heparina aislada podría ser debido al aumento del retorno venoso, aunque también podrían existir otras explicaciones para este fenómeno.

Diversos ensayos terapéuticos realizados con HBPM han demostrado igualmente su eficacia en la profilaxis de la TVP¹⁵⁵. La mayoría de estos ensayos se han realizado comparando la eficacia y la seguridad de una o dos inyecciones diarias de HBPM con la de la profilaxis con heparina a dosis bajas. No obstante a pesar de sus similitudes, las HBPM son lo suficientemente distintas en sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas como para ser consideradas como compuestos distintos cada una de ellas. Los resultados parecen indicar que las HBPM serían al menos tan efectivas como la heparina no fraccionada; incluso tres grandes ensayos han encontrado una reducción estadísticamente significativa en la incidencia de TVP mayor en el grupo de la HBPM que la observada en el grupo de heparina a bajas dosis^{22,137,202} y que las HBPM son efectivas con una única inyección diaria.

En cirugía ortopédica las HBPM son muy efectivas y seguras en pacientes de alto riesgo. Comparadas con placebo la reducción del riesgo relativo para todas las trombosis y para las trombosis venosas proximales es de aproximadamente un 70 por cien. Esta impresionante reducción se obtiene sin un aumento del sangrado clínicamente importante. Aunque el número de estudios que comparan las HBPM con otras formas de profilaxis es pequeño, los hallazgos sugieren que las HBPM son alrededor del 50 por cien más efectivas que la dosis de heparina de 5.000 U tres veces al día, sin una evidente diferencia en sangrado. De los datos limitados que disponemos las HBPM parecen ser tan seguras y eficaces como la heparina no fraccionada a dosis ajustadas¹¹⁵.

Sin embargo las HBPM no son intrínsecamente seguras: p.ej. Fragmin® es efectiva a dosis de 2.500 a 7.500 U anti Xa/día pero 5.000 a 7.500 U anti Xa/día provoca aumento del sangrado quirúrgico¹⁴⁰. Los distintos ensayos terapéuticos no permiten concluir que una HBPM sea más segura que otra. Por ello, es muy probable que la ventaja añadida de una sola inyección sea la principal ventaja de las HBPM sobre la heparina no fraccionada en cirugía general, aunque podría existir una mejora en la eficacia de alguno de estos materiales. Sin embargo las HBPM podrían ser preferibles a la heparina no fraccionada en la profilaxis de las trombosis venosas en cirugía ortopédica, a la vista de la mayor reducción en el riesgo de trombosis¹⁹⁹.

3.2.6.1.2 Tratamiento de la trombosis venosa profunda y del embolismo pulmonar.

Después de 50 años de uso en clínica, la heparina continúa siendo el tratamiento de elección de las TVP. El comienzo de la acción es inmediato, la monitorización del tratamiento está generalmente disponible y su eficacia está plenamente demostrada. Aunque la morbilidad de la TVP puede ser elevada, los trombos confinados a las extremidades inferiores nunca resultan fatales, por ello el principal objetivo del tratamiento con heparina es prevenir la migración del trombo desde las venas periféricas hasta la árbol arterial pulmonar, es decir el embolismo pulmonar que sí se asocia a una elevada mortalidad.

En 1960 Barritt y Jordan publicaron un ensayo terapéutico en el que se había comparado la eficacia del tratamiento con heparina con un placebo. Este es el único ensayo terapéutico prospectivo controlado en el embolismo pulmonar agudo y es muy probable que nunca se repita. En este ensayo el diagnóstico de embolismo pulmonar se realizó en base a datos clínicos. Treinta y cinco pacientes se aleatorizaron para recibir heparina durante 2 días o no tratamiento. De los primeros 16 pacientes que recibieron heparina ninguno presentó recidiva del embolismo y ninguno de ellos murió de embolismo pulmonar. Por el contrario en el grupo control (19 pacientes), 5 presentaron recidivas no fatales y 5 fallecieron como consecuencia del embolismo. En este momento, los autores finalizaron el protocolo, concluyendo que la administración de heparina seguida de anticoagulantes orales reducía el riesgo de muerte por embolismo, que era del 35 por cien en el grupo control. Estos datos confirmaron muchos de los ensayos no controlados realizados en los años previos, y han proporcionado la justificación más frecuentemente citada para el uso de la heparina en el embolismo pulmonar¹⁴.

Tras el diagnóstico de TVP, el tratamiento con heparina se inicia con un bolus endovenoso de 5.000 a 10.000 U, para alcanzar rápidamente la concentración terapéutica seguido por una infusión continua de mantenimiento para la que una bomba de infusión continua no es imprescindible. La dosis media necesaria en 24 horas es de aproximadamente 300 a 600 U/Kg (entre 20.000 y 40.000 U/24 horas),

sin embargo dado que la respuesta individual a una dosis fija de heparina basada en el peso corporal puede variar de forma considerable en pacientes con enfermedad tromboembólica, se recomienda una prueba de control como el APTT¹⁴.

En la literatura sólo existe un ensayo que haya evaluado la influencia de la monitorización del tratamiento con heparina sobre la incidencia de accidentes hemorrágicos²⁰. En este estudio los pacientes recibieron inyecciones intermitentes de heparina con o sin control de laboratorio con el APTT. Las diferencias en la incidencia de sangrado entre los dos grupos (8 y 10 por cien, respectivamente), no fue estadísticamente significativa. Sin embargo la interpretación de este trabajo es problemática dado que no se informa de la frecuencia con la que se alcanza el límite terapéutico en el grupo monitorizado, el estudio no es a doble ciego y porque falla al demostrar que la diferencia observada del 20 por cien podría reflejar el escaso tamaño de la muestra. Aunque ningún estudio ha proporcionado evidencias concluyentes que los pacientes monitorizados vayan mejor que los tratados con dosis sin ajustar, existen evidencias de que la eficacia clínica de la heparina se optimiza si el efecto anticoagulante se mantiene por encima de un nivel mínimo y que el riesgo de hemorragia se incrementa a medida que la dosis de heparina aumenta⁴.

Por estas razones el tratamiento con heparina, generalmente, se monitoriza para mantener la relación entre el APTT del paciente y del control entre 1,5 y 2,5. Sin embargo se debe destacar que la respuesta de los reactivos utilizados en la prueba del APTT puede variar ampliamente. La recomendación anterior está basada en estudios de laboratorio y clínicos en los que los límites terapéuticos eran equivalentes a unos niveles de heparina de 0,2 a 0,4 U por ml por titulación de protamina o bien 0,35 a 0,7 U por ml de acuerdo con los niveles de actividad inhibidora del factor Xa. Las diferencias en reactividad entre las tromboplastinas hacen difícil las comparaciones entre el efecto anticoagulante entre diferentes estudios y es la responsable de las variaciones observadas entre el APTT y los niveles plasmáticos de heparina. Debido a que las pendientes de las líneas que describen la relación entre el APTT y los niveles de heparina con diferentes reactivos pueden no ser paralelas, la reactividad no puede estandarizarse expresando el APTT como el resultado de un cociente. Hasta que no se desarrollen métodos alternativos, el límite terapéutico para un reactivo de APTT dado, debe establecerse

en el laboratorio como aquel que corresponda a unos niveles de heparina de 0,35 a 0,7 anti-Xa U por ml¹¹⁴.

La heparinización terapéutica se consigue igualmente con la administración intermitente por vía endovenosa cada 4 horas. El control del anticoagulante no es útil con esta forma de administración excepto para asegurar que los niveles de anticoagulación (inmediatamente predosis) no caen por debajo de los límites terapéuticos. Se han realizados diversos ensayos terapéuticos para comparar la eficacia y la seguridad de la heparina administrada por vía endovenosa continua con la de la administrada de forma intermitente^{20,85,99,171,232,289,290}. Sin embargo no es posible determinar la óptima vía de administración debido a las dosis diferentes de heparina que se administraron a los diferentes grupos. Por ello no sabemos si la incidencia de complicaciones hemorrágicas está influenciada por la vía de administración; sin embargo parece que si el objetivo es alcanzar un nivel dado de anticoagulación medido por test *in vitro*, se necesita más heparina administrada por vía endovenosa intermitente que continua, y parece claro que una mayor dosis diaria está asociada con un mayor riesgo hemorrágico¹⁸². Una tercera forma de administración de dosis terapéuticas de heparina es la vía subcutánea; aunque no se ha utilizado de forma generalizada en nuestro país. Un reciente metaanálisis de estudios que comparaban la administración endovenosa continua y la administración subcutánea dos veces al día, muestra que ésta última forma de administración es más efectiva y al menos tan segura como la administración endovenosa¹²⁰.

La práctica habitual dicta que los pacientes afectos de TVP sean ingresados en el hospital y tratados con heparina por vía endovenosa de 7 a 10 días. Con el ánimo de reducir la duración del ingreso se han realizado diversos ensayos terapéuticos en los que se han comparado la eficacia del tratamiento con heparina durante 10 días con la de heparina y anticoagulantes orales durante 5 días. La razón de este período de solapamiento de la heparina con los anticoagulantes orales se basa en estudios experimentales que demuestran un retraso hasta que se alcanza el pleno efecto anticoagulante de los antagonistas de la vitamina K. Dos ensayos terapéuticos aleatorizados en pacientes con TVP proximales han demostrado que un ciclo corto de tratamiento con heparina asociada con anti vitaminas K (4 ó 5 días) presenta una tasa de recurrencia similar a la del ciclo largo (9-10 días)^{95,127}. Probablemente es

prematureo recomendar el tratamiento con el ciclo corto de heparina a los pacientes con trombosis venosa iliofemoral masiva o embolismo pulmonar, dado que en dichos estudios tales pacientes fueron excluidos de un estudio y representaban solo una pequeña proporción en el segundo.

Diversos estudios han mostrado que pacientes con TVP tratados con un ciclo inicial de heparinoterapia tienen un riesgo elevado de recurrencia a menos que se administre un efectivo tratamiento anticoagulante. Así la mayoría de los pacientes con TVP o embolismo pulmonar deben ser tratados con anticoagulantes orales durante 3 meses, intentando mantener un INR entre 2 y 3; el tratamiento crónico con anticoagulantes se debe considerar en los casos en los que persista los factores de riesgo y en aquellos con tromboembolismo recurrente.

Las HBPM administradas por vía subcutánea se han comparado con la heparina no fraccionada en el tratamiento de TVP establecidas en varios grandes estudios. Como valoración de la eficacia del tratamiento algunos de ellos utilizaban el tamaño del trombo en flebografías pretratamiento y tras 5 y 10 días de administración del fármaco^{6,30,31,76,86,118,240}. Dos estudios más recientes han utilizado un criterio de eficacia del tratamiento con mayor trascendencia clínica como es la recurrencia confirmada por flebografía de un tromboembolismo sintomático^{126,217}. En los estudios iniciales, la HBPM mostraba una tendencia hacia una mayor eficacia que la heparina no fraccionada en términos de reducción del tamaño del trombo; estas impresiones se vieron confirmadas en los grandes estudios llevados a cabo. Los resultados de estos estudios sugieren que en pacientes con TVP, las HBPM administradas por vía subcutáneas en forma de dosis fija o bien ajustada en función del peso corporal son más efectivas y producen menos hemorragias que el tratamiento convencional de heparina no fraccionada continua por vía endovenosa y ajustada según las cifras del APTT.

Los dos estudios más recientes^{126,217} que estudiaban un relativamente alto número de pacientes y utilizaban un método de valoración de la eficacia, clínicamente relevante, encontraron datos similares. Una fuerte tendencia (50%) en la reducción de la recurrencia de tromboembolismos en el grupo de HBPM; una reducción mayor del 50% de hemorragias en el grupo tratado con HBPM, que fue

significativo en uno de los estudios¹²⁶. Son necesarios nuevos estudios con una potencia de detección de diferencias verdaderas del 50%, antes de que se pueda extraer definitivamente la conclusión de que algunas HBPM son más seguras y eficaces que la heparina no fraccionada en el tratamiento de las TVP, aunque los actuales hallazgos son muy sugerentes de que es así. La mayor eficacia de las HBPM (basado en diferencias significativas en las flebografías y fuerte tendencia en recurrencias sintomáticas) tienen un fundamento teórico. Así, las HBPM se administran en dosis anticoagulantes mucho mayores que la heparina no fraccionada, pero debido a que poseen menores efectos anticoagulantes, estas mayores dosis no se acompañan de mayor frecuencia de hemorragias¹¹⁵.

Los resultados obtenidos hasta ahora con las HBPM en el tratamiento de las TVP son muy prometedores, aunque deben ser confirmados por nuevos ensayos. Además la posibilidad de administración por vía subcutánea con una sola dosis diaria resulta especialmente atractiva. Sin embargo, algunas cuestiones permanecen aún por contestar. ¿Hay una reducción significativa del riesgo hemorrágico cuando se usa las HBPM?. ¿se debe modificar la dosis de las HBPM en función de los niveles de actividad inhibidora del factor Xa plasmática?. Sólo estudios bien diseñados que incluyan grandes series de pacientes podrán dar respuesta a estas dos preguntas.

3.2.6.1.3. Enfermedad coronaria

El tratamiento de elección en las primeras seis horas de evolución del infarto agudo de miocardio es la trombolisis endovenosa, dado que este tratamiento mejora la función ventricular izquierda y la supervivencia a largo plazo^{165,257}. La heparina^{2,194}, y más frecuentemente la aspirina se han utilizado para prevenir el reinfarto tras una trombolisis eficaz; si uno de estos fármacos o ambos son esenciales o pueden ser reemplazados por otros fármacos antitrombóticos no está aún claro. Los trombos intracavitarios en el ventrículo izquierdo son una complicación de los infartos transmurales anteriores; la heparina no fraccionada a bajas dosis reduce la incidencia de aparición de dichos trombos¹⁰⁷. Este fármaco ha demostrado también

prevenir el embolismo sistémico cuando se administra en el primer día tras el infarto agudo de miocardio y se sigue con anticoagulantes orales durante 3 ó 6 meses²⁷⁶, pues la mayoría de los accidentes embólicos aparecen en los primeros 4 meses.

La heparina no fraccionada seguida de anticoagulantes orales se ha utilizado en la fase aguda del infarto agudo de miocardio, aunque no existen evidencias convincentes de que la anticoagulación mejore la supervivencia a corto plazo *per se*, aunque la incidencia de TVP y accidentes vasculares cerebrales se ve reducida significativamente. Dosis bajas de heparina profilácticas se recomiendan en pacientes con infarto agudo de miocardio y alto riesgo de trombosis venosa (edad avanzada, gravedad del infarto, duración de la inmovilidad, obesidad, historia previa de TVP) para evitar la sobrecarga que representaría un embolismo pulmonar para un corazón ya afectado por un infarto.

En caso de angina inestable, en un ensayo terapéutico la heparina no fraccionada administrada en forma de perfusión endovenosa continua, disminuyó el número de ataque anginosos, los episodios de isquemia silente y disminuyó la duración media de la isquemia¹⁹³. En este estudio ni la heparina administrada en bolus ni la aspirina fueron eficaces.

3.2.6.2 Efectos secundarios

3.2.6.2.1 Hemorragia

La hemorragia es la complicación potencialmente más grave del tratamiento con heparina y es un resultado directo de su mecanismo de acción. Cuatro variables han sido identificadas como predisponentes a hemorragias durante el tratamiento con heparina: la dosis de heparina, la respuesta anticoagulante del paciente, el método de administración y características del paciente tales como edad, cirugía previa, administración concomitante de fármacos inhibidores de la función plaquetaria, y ciertas patologías asociadas. Existen evidencias indirectas de que la frecuencia de

accidentes hemorrágicos aumenta con el incremento de las dosis de heparina y por tanto de su efecto anticoagulante¹⁵⁶.

La aspirina administrada de forma concomitante es otro factor de riesgo para las hemorragias asociadas al tratamiento con heparina^{272,295}. Sin embargo ésta observación merece un examen más meticulado porque heparina y aspirina se usan frecuentemente en combinación en el tratamiento inicial de la enfermedad isquémica coronaria aguda. La aspirina aumenta el sangrado operatorio y postoperatorio en pacientes que reciben la altas dosis de heparina necesarias durante la cirugía a corazón abierto²³⁶. Sin embargo, el riesgo de añadir aspirina a un tratamiento corto con dosis normales de heparina es mucho más bajo y es aceptable en pacientes con enfermedad isquémica coronaria.

La insuficiencia renal y la edad y sexo del paciente, también han sido implicadas como factores de riesgo de los accidentes hemorrágicos inducidos por la heparina^{135,156}. No obstante, la asociación con el sexo femenino no ha sido comunicada de forma constante y permanece aún en discusión. La influencia de los factores dependientes del paciente en la hemorragia asociada a la heparina se ilustra en un reciente estudio de pacientes con TVP⁹⁵. Los pacientes recibieron un bolus endovenoso inicial de 5.000 U de heparina, seguido de una perfusión continua de 30.000 U cada 24 horas si tenían factores de riesgo para sangrar, o de 40.000 U cada 24 horas si carecían de dichos riesgos. La incidencia de accidentes hemorrágicos mayores fue del 11 por cien en el grupo con alto riesgo (que recibieron la menor dosis) y del 1 por cien en el grupo de bajo riesgo (que recibieron la dosis mayor) ($p=0.007$).

Los primeros hallazgos experimentales en animales de que las HBPM producían menos hemorragias que la heparina convencional para un efecto antitrombótico equivalente, no está definitivamente probado en humanos, aunque los resultados de dos trabajos publicados recientemente apuntan en esa dirección^{126,217}. Parece existir una relación entre el riesgo de hemorragia y los niveles de actividad inhibidora del factor Xa *in vitro*, pero no una clara relación entre con la dosis de HBPM administrada¹⁵⁵.

3.2.6.2.2 Trombocitopenia

Existe una considerable confusión en el tema de las interacciones heparina-plaquetas, a menudo agrupadas como trombocitopenia inducida por la heparina⁴¹. Una reacción no-idiosincrásica que generalmente es inmediata en su comienzo, debe ser distinguida de una interacción heparina-plaquetas idiosincrásica que resulta en una trombocitopenia aislada o asociada a trombosis arteriales agudas.

La interacción heparina-plaquetas aguda no-idiosincrásica, es una agregación plaquetaria inducida por la heparina, que puede traducirse en una caída transitoria del recuento plaquetario y una prolongación del tiempo de sangría. Esta reacción depende de las características de la preparación de heparina (especialmente en presencia de las fracciones de alto peso molecular) y varía considerablemente entre las personas²⁷⁴. Existe evidencias experimentales y clínicas que las HBPM no aumentan de forma significativa la agregación plaquetaria⁴⁷.

La forma de trombocitopenia inducida por la heparina idiosincrásica, complicada o no con trombosis arteriales (el llamado síndrome del trombo blanco⁴⁵), aparece entre los días 7 y 11 de iniciado el tratamiento y es algo más frecuente con la heparina bovina no fraccionada y tras una exposición previa a la heparina²²⁰; en este último caso la trombocitopenia también aparece antes sugiriendo una respuesta anamnésica. El mecanismo desencadenante no se conoce con seguridad aunque un mecanismo inmune parece el más probable. Varios estudios han apuntado hacia un mecanismo por inmunocomplejos; se ha propuesto que la activación plaquetaria sería causada por un complejo IgG anti heparina-heparina a través de su receptor Fc (CD 32)^{48,139}. Este mecanismo explicaría el porqué este tipo de trombocitopenia inducida por la heparina no es dosis dependiente y puede aparecer tras inyecciones subcutáneas⁶³ e incluso por lavados con soluciones de heparina de los catéteres endovenosos¹¹¹. Respecto a las HBPM ya han sido descritos algunos casos de trombocitopenia y trombosis arteriales en pacientes tratados con HBPM^{78,151,253}. Además en un trabajo publicado recientemente se encuentra que el anticuerpo presente en el suero de una serie de pacientes con trombocitopenia inducida por la heparina, no es heparina-específico sino que éste reconoce una variedad de oligosacáridos con un alto grado de sulfatación. En dicho estudio *in vitro* el

heparinoide Lomoparan® no es reconocido por ninguno de los sueros estudiados, probablemente por su alto contenido en heparán sulfato con un menor grado de sulfatación¹⁰⁴. Este hallazgo experimental confirma resultados obtenidos en anteriores trabajos⁴⁹ y proporcionan un soporte teórico a las observaciones de pacientes afectos de trombocitopenia inducida por la heparina, que pueden ser tratados con Lomoparan® con la resolución de dicho cuadro²⁰⁸.

La aparición de fenómenos trombóticos que en ocasiones complican el cuadro, no deja de sorprender pues ocurren en presencia de recuentos plaquetarios muy bajos. Se ha propuesto que la oclusión de los vasos aparece como consecuencia del daño endotelial provocado por el anticuerpo que interacciona con la heparina fijada a la célula endotelial, que induciría la liberación de sustancias procoagulantes y la posterior formación del trombo⁵⁰.

3.2.6.2.3 Osteoporosis

El tratamiento prolongado con heparina puede provocar osteoporosis; se sospecha que esta complicación está relacionada con la dosis de heparina más que con la duración del tratamiento¹⁰⁵. Como posibles mecanismos de aparición se ha propuesto tanto una síntesis disminuida como una aumento de la reabsorción ósea. En ratas el tratamiento con HBPM provoca una reducción de la masa ósea de nivel comparable al de la heparina no fraccionada¹⁷². Por tanto es poco probable que el efecto osteoporótico esté relacionado con el tamaño de la molécula de heparina.

3.2.6.2.4 Necrosis cutánea

Reacciones de hipersensibilidad a la heparina convencional o a las HBPM se publican periódicamente en la literatura; pueden variar desde un shock²¹³ a una necrosis de la piel suprayacente a los lugares de inyección⁷ o provocar necrosis cutánea a distancia, sin ningún sitio de predilección¹⁵⁴. El examen histológico sugiere una reacción de tipo Arthus, con formación de complejos antígeno-anticuerpo con o sin depósito de plaquetas²⁶¹. Es interesante resaltar que tests

intracutáneos con heparinas de diversos fabricantes dan reacciones retardadas positivas; sin embargo tests realizados con el conservante antimicrobiano clorbutal, utilizado en los preparados comerciales de heparina, da resultados negativos, contradiciendo hipótesis previas de que el conservante era el responsable de la lesión⁹⁰.

3.2.6.2.5 Hipoaldosteronismo

El tratamiento con heparina tanto a dosis completas (20.000 U/día o más) como a dosis bajas poseen un efecto inhibitor en la producción de aldosterona²³⁹ y el consiguiente riesgo de aparición de hiperkaliemia²¹⁶. La probabilidad de una hiperkaliemia inducida por la heparina puede verse especialmente incrementada cuando se utilizan diuréticos ahorradores de potasio e inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina en pacientes con insuficiencia renal crónica⁷⁵. Tras la interrupción del tratamiento con heparina, estos pacientes pueden estar en riesgo de hipokaliemia por el aumento de la kaliuresis; además, la disminución de la natriuresis podría provoca la retención de sodio y el empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.

3.2.6.2.6 Alteraciones de las enzimas hepáticas

Las alteraciones del funcionalismo hepático posiblemente sea la complicación más frecuente del tratamiento con heparina. Un aumento en los niveles séricos de aminotransferasas por encima de los valores normales aparece en el 60-80 por cien de los pacientes tratados, alcanzando un nivel pico que puede ser hasta 15 veces los valores basales^{74,147}. El aumento es más marcado para la alanin aminotransferasa que para la aspartato aminotransferasa. Aumento en la concentración sérica de la gamma-glutamyl transpeptidasa, fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa han sido también publicados⁷⁴. El aumento en los niveles de aminotransferasas aparece entre el 5º y el 10º día de tratamiento, y vuelven a los valores basales en un 20 por cien de los pacientes durante el tratamiento y en todos los pacientes una vez que se interrumpe el tratamiento. La típica situación es un aumento en los niveles séricos

de aminotransferasas entre 6 y 10 días después de un infarto agudo de miocardio y el inicio del tratamiento con heparina. Hasta ahora no ha sido publicado ningún caso de deterioro a largo plazo del funcionalismo hepático o de insuficiencia hepática aguda²³¹.

3.2.6.3 Contraindicaciones y precauciones

Los fármacos anticoagulantes en general y la heparina en particular, no deben ser usados en pacientes ambulatorios poco cumplidores, o en pacientes en los que exista un riesgo definido de hemorragia que no pueda ser evitado por un cuidadoso ajuste de la dosis, especialmente cuando la hemorragia puede ocurrir en ciertos tejidos (ojos, sistema nervioso central, etc). La hipertensión arterial no controlada es una contraindicación absoluta. La presencia de defectos de la hemostasia, congénitos o adquiridos (p.ej. trombocitopenia) contraindica la instauración del tratamiento con heparina. Debe fijarse especial atención en el balance electrolítico durante y al interrumpir el tratamiento con heparina, particularmente si este fármaco se asocia con otros que afecte a la kaliemia. Los fármacos que inhiben el funcionalismo plaquetario, especialmente la aspirina y la ticlopidina, deben ser usados con precaución en los pacientes en tratamiento con heparina.

La heparina es parcialmente degradada en el hígado y eliminada en parte por el riñón en forma no modificada. Su eliminación puede estar alargada después de grandes dosis en pacientes con insuficiencia renal crónica o hepatopatía grave²⁵⁴, sin embargo la importancia clínica de alteraciones en el aclaramiento no se conoce.

3.2.6.4 Neutralización del efecto anticoagulante

El clorhidrato o el sulfato de protamina administrado tras una inyección endovenosa de heparina no fraccionada, neutraliza completamente su efecto anticoagulante. Un miligramo de protamina inactiva de 80 a 100 U de heparina administrada lentamente. Si la neutralización de la heparina se requiere después de 1 hora de haberla administrado, se requiere un 50 por cien de la dosis de protamina;

a las dos horas sólo se requiere el 25 por ciento. Cuando la heparina se administra por vía endovenosa continua, se requiere 1 mg de protamina por cada 100 U de heparina administrada en las 4 horas precedentes¹³³.

Todas las HBPM son neutralizadas en menor medida por la protamina que la heparina no fraccionada. Prácticamente toda la actividad anti-Xa de las HBPM con una cadena de menos de 16 a 18 monosacáridos se neutraliza. Sin embargo la cadenas con menos de 8 a 14 monosacáridos (con falta de capacidad de alargar el APTT) son más resistentes a la inactivación y de un 25 al 30 por ciento de actividad anti Xa persiste incluso después de la administración de alta dosis de protamina. No obstante se desconoce si este efecto restante influye significativamente en la hemostasia y afecta el riesgo de hemorragia; trabajos experimentales en animales sugieren que no^{68,71,119}.

4. Objetivos y diseño experimental

A la búsqueda de alternativas terapéuticas a la heparina convencional se han desarrollado nuevos productos de estructura química similar, son las llamadas heparinas y heparinoides de bajo peso molecular. Debido a diferentes materiales de partida y distintos procedimientos de producción, las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de dichos glicosaminoglicanos varían considerablemente. Además la manera de expresar su actividad difiere según el fabricante. Por último la actividad inhibidora del factor Xa no es un buen indicador de la actividad antitrombótica *in vivo* del producto.

Por las razones anteriormente expuestas, se decidió llevar a cabo el presente trabajo experimental, con el objetivo fundamental de estudiar, bajo condiciones de flujo, el efecto sobre la hemostasia de dos heparinas de bajo peso molecular (Fragmin® y Fraxiparine®), un heparinoide de bajo peso molecular (Lomoparan®), un derivado sintético de la secuencia (pentasacárido) de la heparina que se une a la antitrombina III (Org 31550) y de la heparina no fraccionada.

El trabajo experimental se llevó a cabo en las siguientes etapas:

1. Establecer la dosis mínima de cada uno de los glicosaminoglicanos en estudio que inhibiera la formación de trombina *in vitro*.

Debido a los distintos tipos de unidades empleadas por los fabricantes, en primer lugar se hubo de seleccionar la concentración óptima para cada uno de los productos que sería utilizada en las perfusiones. Para ello se anticoaguló sangre de voluntarios sanos, con dosis bajas de cada uno de los glicosaminoglicanos en estudio. Inmediatamente después de la extracción se dividió la sangre en tubos a los que se habían añadido cantidades crecientes del producto correspondiente; los tubos se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación se obtuvieron muestras de cada uno de los tubos en el momento inicial y posteriormente a intervalos de 1 hora hasta las 3 horas postextracción. En cada una de las muestras se cuantificó los niveles de fibrinopéptido A como indicador de la formación de trombina. Para los experimentos de perfusión se tomó la dosis mínima que inhibió la generación de trombina durante las 3 horas. Se comprobó

la eficacia de estas dosis en perfusiones sobre matriz extracelular de células endoteliales no estimuladas.

2. Estudiar el efecto de dicha dosis en el funcionalismo plaquetario.

Una vez establecida la concentración adecuada para ser utilizada en las perfusiones, se estudió el efecto que sobre el funcionalismo plaquetario tenía cada uno de los glicosaminoglicanos. Para ello se anticoaguló sangre de un mismo donante con los 5 glicosaminoglicanos en estudio y se perfundió sobre matriz extracelular de células endoteliales no estimuladas durante 5 minutos a un coeficiente de cizalladura de 1.300 s^{-1} , que es óptimo para obtener una alta adhesión plaquetaria sobre la matriz. La adhesión de las plaquetas se cuantificó como el tanto por ciento de la superficie expuesta al flujo que estaba cubierta por plaquetas. En estas perfusiones se hicieron recuentos plaquetarios pre y postperfusión para valorar la formación de agregados plaquetarios durante la perfusión. Ello se realizó comparando los recuentos en EDTA (donde los agregados se separan) con los obtenidos en glutaraldehído (donde los agregados permanecen unidos).

Para valorar el efecto de los productos en estudio sobre la formación de los trombos plaquetarios se realizaron las perfusiones a alto coeficiente de cizalladura (1.300 s^{-1}). Bajo estas condiciones de flujo (semejantes a las que imperan a nivel de arteriolas) el depósito de plaquetas es óptimo mientras que la cantidad de fibrina formada sobre la superficie es baja. Tras las perfusiones, la matriz extracelular expuesta al flujo se incluyó y seccionó para valorar en dichos cortes transversales la superficie cubierta por plaquetas y el tanto por ciento de dicha superficie que estaba cubierta por trombos de diferentes alturas.

3. Comparar dos técnicas de cuantificación de la fibrina depositada sobre una matriz extracelular trombogénica expuesta al flujo.

Hasta ahora la mayoría de los trabajos experimentales que han utilizado la cámara de perfusión han valorado la fibrina depositada de forma morfométrica. Sin embargo este método tiene limitaciones importantes, pues no permite apreciar variaciones pequeñas en la cantidad de fibrina formada sobre la superficie perfundida. Por ello se decidió utilizar una valoración cuantitativa, validándose en primer lugar una técnica que utiliza fibrinógeno marcado con peroxidasa con otra de fibrinógeno marcado con ^{125}I que se considera el patrón.

Para obtener fibrina sobre la superficie perfundida, es necesario que ésta sea capaz de inducir la formación de trombina. Esto se consigue estimulando las células endoteliales en cultivo con un éster de forbol, que induce la síntesis y depósito en la matriz extracelular de factor tisular. El factor tisular en combinación con el factor VII activan la cascada de la coagulación que conducirá a la producción de trombina que a su vez provocará la formación de trombos plaquetarios y el depósito de fibrina sobre la matriz extracelular perfundida. Bajo estas condiciones experimentales se probarán los dos métodos.

4. Determinar el efecto de cada uno de los glicosaminoglicanos y de las condiciones de flujo en la formación de de fibrina.

El efecto sobre la fibrina de los distintos glicosaminoglicanos se estudió bajo las mismas condiciones que el apartado anterior, es decir matriz extracelular de células endoteliales estimuladas con forbol. Las perfusiones se realizaron con sangre de un mismo donante anticoagulada con los distintos glicosaminoglicanos en estudio, es decir Fragmin®, Fraxiparine®, Lomoparan®, Org 31550 y heparina no fraccionada, en perfusiones realizadas a bajo coeficiente de cizalladura (300 s^{-1}), en las que se obtiene una cantidad de fibrina óptima para su evaluación. Asimismo la cantidad de fibrina obtenida para cada uno de los glicosaminoglicanos se comparó con la teóricamente formada, calculada a partir de las cifras de fibrinopéptido A generado en perfusiones realizadas en experimentos paralelos. Se repitieron dichos experimentos a alto coeficiente de cizalladura (1.300 s^{-1}) para evaluar el efecto del flujo en el depósito de fibrina.

5. Material y métodos

5.1 REACTIVOS

Todos los reactivos empleados, obtenidos de diversos fabricantes, fueron del máximo grado de pureza disponible.

5.2 SOLUCIONES

- Solución salina fisiológica 0,15 M

Cloruro de sodio	150,0 mM
------------------	----------

- Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7,2

Cloruro de sodio	130,0 mM
------------------	----------

Fosfato sódico dibásico	10,4 mM
-------------------------	---------

Fosfato potásico monobásico	3,1 mM
-----------------------------	--------

- Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, con Ca^{2+} y Mg^{2+} , pH 7,2

Cloruro sódico	130,0 mM
----------------	----------

Fosfato sódico dibásico	10,4 mM
-------------------------	---------

Fosfato potásico monobásico	3,1 mM
-----------------------------	--------

Cloruro cálcico	9,1 mM
-----------------	--------

Cloruro magnésico	0,5 mM
-------------------	--------

- Tampón fosfato salino (PBS), 1,23 M, pH 7,4

Cloruro sódico	130,0 mM
Cloruro potásico	2,6 mM
Fosfato sódico dibásico	6,4 mM
Fosfato potásico monobásico	4,6 mM
Glucosa	1,1 M

- Tampón HEPES salino 10 mM, pH 7,4

Cloruro sódico	154,00 mM
Acido N-2-hidroxiethylpiperacina -N'-2-etano-sulfónico	10,00 mM

- Suero humano

Pool de sueros humanos libres de contaminación vírica y por micoplasmas. Se añade un 25 % del pool al volumen final de medio de cultivo.

- Tampón HEPES 1 M

Acido N-2-hidroxiethylpiperacina -N'-2-etano-sulfónico	20,00 mM
---	----------

- Tampón Michaelis-Ca²⁺, pH 7,35, conductividad 8,8

Acetato sódico	28,0 mM
Barbiturato sódico	2,8 mM
Cloruro sódico	50,0 mM
Cloruro cálcico	30,0 mM

- Tampón TRIS salino (TBS), 0,05 M, pH 7,6

TRIS base 6,1 g en 50 ml de agua destilada.

Añadir 37 ml de ácido clorhídrico 1 N

Completar con agua destilada hasta 1 l.

- Tampón borato, pH 8,2

Borato Sódico	125,0 mM
Cloruro Sódico	75,0 mM

- Solución Tyrode, pH 7,25

Cloruro sódico	137,0 mM
Cloruro potásico	2,68 mM
Fosfato monosódico	0,42 mM
Cloruro magnésico	1,7 mM
Carbonato sódico	11,9 mM

5.3 CULTIVO DE CELULA ENDOTELIAL DE VENA DE CORDON UMBILICAL HUMANO

Se ha seguido básicamente el método descrito por Jaffe *et al*, con mínimas modificaciones¹³². El cordón umbilical fue separado de la placenta inmediatamente después del parto, sumergido en PBS 0,14 M y conservado a 4°C como máximo 48 horas hasta su utilización. En ambiente y con material estéril, se elimina toda área pinzada o dañada del cordón. Los extremos de éste se seccionan con un bisturí, y tras la identificación del orificios de la vena umbilical se canula con una aguja que se fija con una pinza de presión continua; se lava la luz vascular con 50

ml de PBS 1.23 M. Seguidamente, se canula el otro extremo de la vena con otra aguja que se fija de la misma manera.

Manteniendo uno de los extremos de la vena cerrado, se infunden por el otro 10 ml de colagenasa (Boehringer Mannheim,) en solución al 0.2% en PBS 1.23 M, y se incuba durante 15 minutos a 37°C. Por la acción enzimática, las células endoteliales se desprenden y quedan en suspensión en el incubado. Tras finalizar la incubación el efluente se recoge en tubos y se centrifuga a 200 g durante 10 minutos a 20°C, el sobrenadante se elimina mediante aspiración y el residuo sólido, constituido por células endoteliales y restos hemáticos se resuspende, en condiciones estériles, en 5 ml de medio de cultivo. A continuación, se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones; el sobrenadante se desecha y el "pellet" celular se resuspende en 1 ml de medio. Dicha resuspensión se trasvasa a un frasco Roux (25 cm²) y se añade medio de cultivo hasta un total de 5 ml. Los frascos sembrados se colocan horizontales, con la cara apta para el cultivo como base en una estufa de cultivo a 37°C y con un 5% de CO₂. El medio de cultivo es renovado totalmente cada 48 h con el fin de eliminar los detritus celulares y aportar nutrientes para el correcto crecimiento celular.

Aproximadamente en 7 días los cultivos de células alcanzan la confluencia, momento en los que se resiembran en frascos Roux de mayor superficie (75 cm²). Para ello se aspira el medio de cultivo y la monocapa de células se lava con solución salina tamponada de Hank (HBSS, Flow Laboratories, Rockville, USA) a continuación se añade 1 ml de tripsina-EDTA (Gibco Biocult, Paisley, Scotland) en solución al 0.05% y se incuba durante 5 min a 37°C. Tras comprobar con el microscopio que la mayoría de células se han despegado, se hace una resuspensión homogénea en la solución de tripsina, se transfiere al frasco de cultivo de mayor capacidad y se completa con 10 ml (totales) de medio. Las células endoteliales crecen en este nuevo frasco hasta formar una monocapa; tras despegarlas con tripsina-EDTA se siembran sobre los cubreobjetos de 18x18 mm, apropiados para el uso en la cámara de perfusión plana de Sakariassen. Los cubreobjetos pueden ser de vidrio o de plástico (Thermanox[®], Miles Laboratories, Naperville, USA). Los cubreobjetos fueron previamente lavados en solución antiséptica (alcohol etílico 70%), enjuagados con PBS esterilizado, incubados con gelatina (al 1% en agua

destilada durante 30 minutos a 37°C y el exceso de gelatina eliminado por sucesivos lavados en PBS). Finalmente, la gelatina fue fijada mediante incubación con glutaraldehído al 0,5% (30 min, 37°C), tras lo cual se lavaron y colocaron en una placa de cultivo de 6 pocillos.

Generalmente, el cultivo confluyente en frasco de 75 cm² era resembrado en doce cubreobjetos, siguiendo una metodología similar a la expuesta para el caso de resiembra de frasco de 25 cm² a frasco de 75 cm²: eliminación del medio de cultivo y lavado con HBSS, despegamiento de las células endoteliales incubándolas a 37°C con 1.5 ml de tripsina-EDTA en solución 0.05%, resuspensión homogénea de las células endoteliales despegadas y adición de 3 ml totales de la suspensión celular por pocillo. Una vez sembradas las células, no se cambiaba el medio hasta transcurridas 24h con el objetivo de permitir el asentamiento de las mismas sobre los cubreobjetos. Las células crecieron sobre cubreobjetos en las mismas condiciones que los frascos anteriores y, a los 5-7 días alcanzaban la confluencia

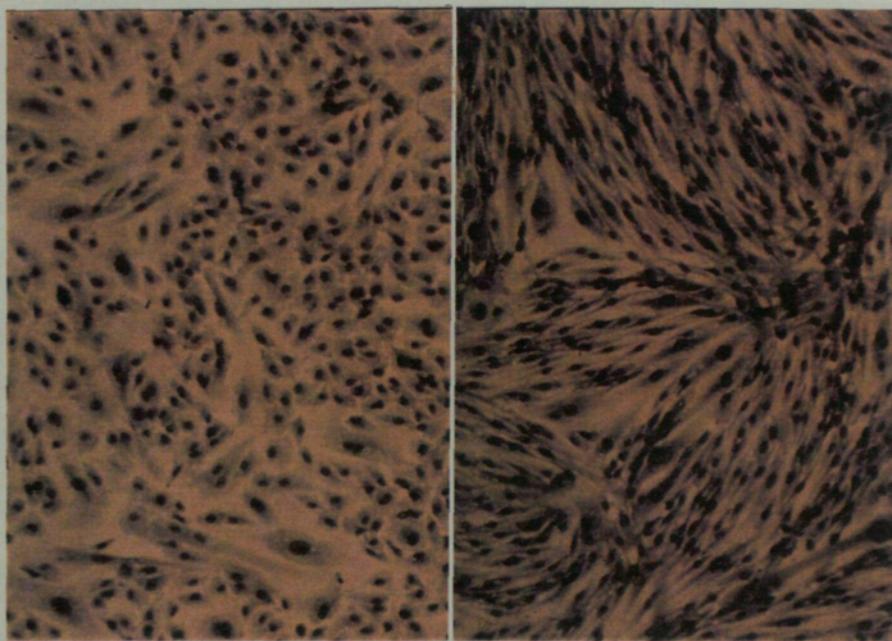


Figura 10. Microfotografías de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano, en cultivo, (A) en reposo, (B) tras estimulación con un éster de forbol durante 16 horas (x450).

(aproximadamente 50.000 células/cm²) y habían producido una matriz extracelular apta para continuar con los estudios en los que se basa la parte experimental de esta tesis. Para algunos experimentos, las células endoteliales fueron estimuladas durante 16 horas con 4 β -forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) disuelto en dimetilsulfóxido y diluido 1:1.000 v/v en medio de cultivo, resultando una concentración final de 20 ng/ml. Se controló la estimulación de las células por el cambio de patrón de crecimiento observado al microscopio; es decir de un patrón "en empedrado" las células adoptan un patrón "en abanico" (Fig. 10). El día de su utilización, se obtuvieron las MEC eliminando las células endoteliales por incubación con NH₄OH 0,1 M durante 5 minutos a temperatura ambiente¹². Tras su obtención las MEC se lavaron 3 veces con PBS y se mantuvieron a 4°C en este tampón hasta su uso.

El PMA es un activador de la proteínquinasa C que induce la síntesis del factor tisular por parte de la célula endotelial y su depósito en la MEC⁶⁴. La presencia del factor tisular provoca la activación de la vía extrínseca de la coagulación que tiene como consecuencia la formación local de trombina, que inducirá la formación de agregados plaquetarios y de fibrina²⁹⁸. La presencia del factor tisular en las MEC se comprobó mediante un ensayo de coagulación en superficie. Para ello en placas de 6 pocillos se añade 1 ml de tampón Michaelis con Ca²⁺ sobre el cubreobjeto con la MEC y se incubó durante 1 minuto a 37°C, tras lo cual se añadió 1 ml de un pool de plasma citratado. Tras 20" de incubación y con una pequeña asa a intervalos de 5" se comprueba la aparición de la primera fibra de fibrina, momento en el que se detiene el cronómetro. En presencia de MEC estimuladas con PMA el tiempo de coagulación en superficie fue siempre inferior a 90 segundos, mientras que las MEC de células endoteliales no estimuladas fue superior a los 2 minutos.

5.4 GLICOSAMINOGLICANOS EN ESTUDIO

Se estudiaron los siguientes productos: HNF (Laboratorios Rovi, Madrid, España) obtenida de mucosa intestinal porcina. Lomoparán® (Organon, Oss, Países Bajos) un heparinoide de bajo peso molecular obtenido directamente de mucosa intestinal porcina; está formado por una mezcla de aproximadamente un 80% de

Tabla 6. Características de los glicosaminoglicanos en estudio

	<u>Peso molecular medio (kD)</u>	<u>Actividad anti-Xa /mg</u>	<u>Actividad anti-IIa /mg</u>
Fragmin®	5,0	130	58
Fraxiparine®	4,5	95	27
Lomoparan®	6,5	14	<0,5
Org 31550	1,7	1230	---
UFH	14,0	193	193

heparán sulfato, un 10% de dermatán sulfato, un 5% de condroitín sulfato y un 3% de una subfracción semejante a las HBPM¹⁷⁸. A diferencia de los otros GAGs en estudio contiene galactosamina en su molécula. Fragmin® (Kabi, Estocolmo, Suecia) es una HBPM obtenida a partir de la heparina no fraccionada de origen porcino por despolimerización inducida por ácido nitroso y posterior purificación por cromatografía. Fraxiparine® (Sanofi, París, Francia) es una HBPM obtenida también de heparina porcina por despolimerización con ácido nitroso y purificación por cromatografía⁸⁸. El pentasacárido Org 31550 (Organon, Oss, Países Bajos) es un derivado del pentasacárido natural obtenido por síntesis química; contiene un grupo 3-O-sulfato en uno de los residuos de glucosamina y posee una mayor actividad anti-Xa que el pentasacárido natural (1.230 U anti-Xa/mg contra 700 de éste último)¹⁷⁸. Todos los GAGs en estudio fueron cedidos gentilmente por sus respectivos fabricantes. (Tabla 6)

5.5 OBTENCION DE LA SANGRE Y ANTICOAGULACION

Todos los GAGs se diluyeron en solución salina fisiológica a una concentración 10 veces mayor que la deseada en la sangre total. La sangre se obtuvo por punción venosa antecubital en 1:10 v/v de la solución salina-GAGs, de donantes humanos sanos que negaron la ingesta de fármacos que afectaran al funcionalismo plaquetario en la semana previa. La sangre de cada donante se

anticoaguló con los 5 GAGs en estudio. Los resultados para cada donante son la media de los valores observados en dos perfusiones separadas.

5.6 PERFUSIONES

5.6.1 Descripción de la cámara

En la parte experimental de esta tesis se ha utilizado el sistema de perfusión descrito por Sakariassen²²⁸, formado en esencia por una cámara plana de perfusión conectada a través de unos tubos de silicona a una bomba peristáltica de flujo regulable y a un reservorio para la sangre; la cámara y el reservorio se sumergen en un baño a 37°C en donde se sumerge la cámara de perfusión y el reservorio de sangre. Entre la bomba y la cámara se coloca un embudo para convertir el flujo pulsátil de la bomba peristáltica en continuo.

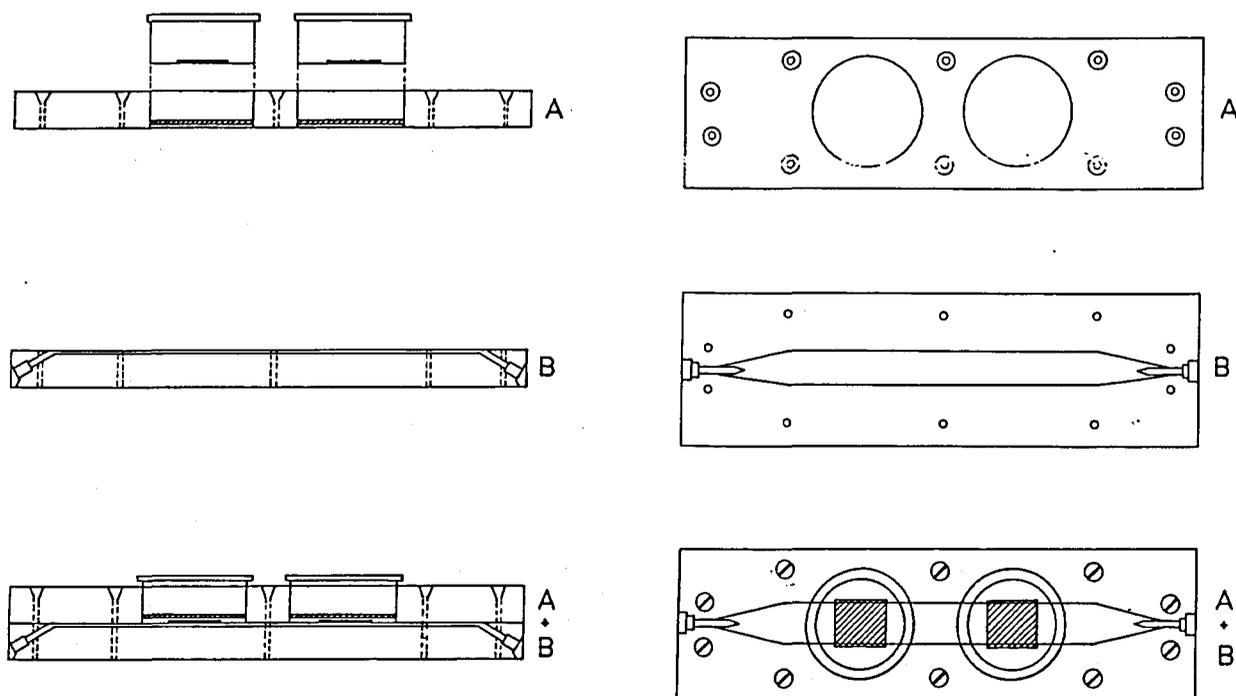


Figura 11. Esquema de la cámara plana de perfusión rectangular de Sakariassen. Ver texto.

La cámara de perfusión consta de un canal por donde circula la sangre en cuyo techo se insertan los cubreobjetos que contienen la MEC que será expuesta al flujo. La cámara original fue descrita con una altura del canal de perfusión de 1.0 mm, dando índices de cizalladura hasta 1600 s^{-1} . La Fig. 11 representa esquemáticamente la cámara plana de perfusión utilizada en las experiencias desarrolladas en el presente estudio y consta de cuatro piezas separadas fabricadas en polimetil-metacrilato:

A+B) constituye el bloque central que contiene la cámara de perfusión propiamente dicha, consistente en un canal cerrado de 1 cm de ancho por 0.1 cm de altura cuando ambas piezas se acoplan.

C) tapones centrales, piezas que se acoplan en los orificios del bloque central A. Contienen una depresión de $18 \times 18 \times 0.147$ mm para alojar los cubreobjetos a perfundir. Los tapones centrales se introducen en sus orificios respectivos de la pieza A, con la depresión perpendicularmente al canal de circulación de la sangre. La existencia de dos tapones centrales permitió hacer perfusiones dobles por cada experiencia.

5.6.2 Técnica de perfusión

Mientras se montan los cubreobjetos en la cámara, los 15 ml de la sangre a perfundir se atemperan a 37°C durante 5 minutos, tras lo cual se hace recircular a través del circuito durante 5 minutos. Los diferentes coeficientes de cizalladura se consiguen variando la altura de la cámara y/o el flujo a su través²²⁸. Tras la perfusión el sistema es lavado con 30 ml de HBS y los cubreobjetos extraídos de la cámara. Inmediatamente antes y después de la perfusión se extraen muestras del reservorio para determinaciones de FPA y de formación de microagregados de plaquetas (ver después). En algunos experimentos la sangre del reservorio se mantuvo a 37°C después de la perfusión y se obtuvieron muestras para FPA a los 5 y 10 minutos.

5.7 CUANTIFICACION DEL DEPOSITO DE LAS PLAQUETAS EN LOS CUBREOBJETOS

Se realizaron dos tipos de evaluaciones en los cubreobjetos perfundidos, una *en face* y otra en sección transversal.

5.7.1 Valoración *en face*

Una vez finalizada la perfusión los cubreobjetos perfundidos se extrajeron de la cámara y se fijaron en glutaraldehído (Fluka AG, Buchs SG, Suiza) al 0,5% en PBS durante al menos 1 hora y posteriormente teñidos con May-Grünwald/Giemsa. Cuando la cantidad de fibrina formada dificultaba la evaluación de la superficie cubierta por plaquetas, en los cubreobjetos teñidos con May-Grünwald/Giemsa éstos se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 2% en PBS y se tiñeron con una técnica de inmunoperoxidasa indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal anti glicoproteína Ib²⁶⁵. Para ello tras la fijación, los cubreobjetos se incubaron primero con glicina 0,1 M en TBS 0,05 M durante 10' para bloquear los grupos aldehído libres, y se sumergieron a continuación en agua destilada durante 30". La actividad peroxidásica intrínseca de los hematíes presentes en el cubreobjeto perfundido se bloqueó incubándolos con H₂O₂ al 0,6% en metanol durante 20'. Después de lavar en TBS se incubaron con suero de ratón inactivado para el complemento en TBS (1:5) durante 20', tras lo que se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-glicoproteína Ib (RUU 6.66 obtenido en el Departamento de Hematología del Hospital Universitario de Utrecht, Países Bajos) diluido 1:3.000 en TBS con 1% de albúmina humana, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los cubreobjetos sumergiéndolos tres veces en TBS durante 5 minutos, y se incubaron los cubreobjetos con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa de rábano (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca). Tras sumergir los cubreobjetos en TBS durante 5 minutos, se reveló la actividad peroxidásica presente en los cubreobjetos incubándolos con 3,3-diaminobencidina (DAB, Sigma) al 0,05% (p/v) en PBS al que se añadieron 0,025% de H₂O₂ inmediatamente antes de la incubación. Se añadieron también

sales de níquel y cobalto para conseguir una coloración negra más intensa que la marrón claro normal del DAB.

La evaluación del depósito de plaquetas en los cubreobjetos una vez teñidos se realizó mediante un microscopio óptico conectado a un analizador de imágenes (40-10 Image Analyzer, Analytical Measuring Systems Ltd, Shirehill, Reino Unido) y expresado como el tanto por ciento de la superficie total que estaba cubierta por plaquetas. En cada uno de los cubreobjetos se midieron un mínimo de 30 campos seleccionados al azar; el resultado se expresó como la media de los valores obtenidos en los dos cubreobjetos perfundidos en cada perfusión.

5.7.2 Valoración en sección transversal

En los experimentos para la evaluación en sección transversal se utilizaron cubreobjetos de Thermanox®. Tras la perfusión los cubreobjetos se fijaron con glutaraldehído al 0,5% en PBS y posteriormente expuestos a tetróxido de osmio al 0,5% en PBS 0,1 M como postfijación. Tras deshidratarlos con lavados con concentraciones crecientes de etanol (75%, 85%, 95% y alcohol absoluto con gránulos de MgSO₄), los cubreobjetos se impregnaron y posteriormente se incluyeron en EPON. El EPON se preparó mezclando sus cuatro componentes (42 partes de EPON 812, 43 partes de DDSA, 13 partes de MNA y 2 partes de DMP-30) con agitación durante 30 minutos y posteriormente desgaseando la muestra en desecador de vacío durante 30 minutos. La inclusión se realizó colocando dos gotas de EPON sobre el cubreobjeto y dejándolo polimerizar 6 horas a 65°C. Para desprender el Thermanox® del EPON, primero se calentó la pieza a 75°C durante 5" y posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido; debido a los diferentes coeficientes de dilatación del cubreobjeto y del EPON fue posible separarlos fácilmente, quedando la MEC con las plaquetas adheridas incluida en el EPON. Posteriormente del bloque de EPON se practicaron secciones de 1 µm de grosor que tras ser teñidas con azul de metileno y fucsina básica, se evaluaron con un microscopio óptico conectado al analizador de imágenes. Los resultados se expresan como porcentaje de la superficie cubierta por agregados plaquetarios de <5 µm, de 5 a 10 µm y mayores de 10 µm de altura respectivamente.

5.8. CUANTIFICACION DE LA FIBRINA DEPOSITADA

Para cuantificar la fibrina depositada en los cubreobjetos tras las perfusiones se utilizaron dos métodos: en uno se utilizó fibrinógeno marcado con peroxidasa y en otro se marcó el fibrinógeno con ^{125}I . A continuación se describen por separado.

5.8.1 Método del fibrinógeno marcado con peroxidasa

5.8.1.1 Marcaje del fibrinógeno

El marcaje del fibrinógeno con la peroxidasa se realizó según el método descrito originalmente por Nakane y Kawaoi¹⁸⁹ con algunas modificaciones²⁵⁸. El método, en forma resumida, es el siguiente, los grupos amino de la molécula de peroxidasa de rábano (PO, tipo VI Sigma) se bloquean con fluordinitrobenceno (FDNB, Sigma). Para ello se disuelven 12 mg de PO en 3 ml de bicarbonato de sodio 0.3 M, pH 8,1; a continuación se añaden 0,3 ml de FDNB al 1% en etanol del 95% y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. El siguiente paso es oxidar los carbohidratos de la molécula de PO para formar grupos aldehídos, que serán los que se unan a los grupos amino de la molécula de fibrinógeno. A la solución anterior se añaden 3 ml de periodato de sodio 0,08 M en agua destilada, y se mantienen en agitación suave durante 30 minutos; el proceso de oxidación se detiene añadiendo 3 ml de etilén-glicol 0,16 M en agua destilada. A continuación se dializa contra un tampón carbonato de sodio 0,01 M pH 9,5 para eliminar el exceso de DNFB.

A la vez se disuelve 1 g de fibrinógeno (Grado L, Kabi, Estocolmo, Suecia) en 40 ml de agua destilada y se dializa contra un tampón Michaelis sin Ca^{+2} para eliminar el citrato presente. A continuación se añade muy lentamente a 50 mg de fibrinógeno la solución de PO preparada y se deja incubar 3 horas en agitación suave. Se centrifuga a 3.000 rpm durante 10' para eliminar el precipitado que pueda aparecer y se dializa contra PBS 0,1 M pH 7,3 al que se ha añadido 1 mM de

EDTA, 1 mM de benzamidina y 1 mM de ácido ϵ -amicaproico. El fibrinógeno marcado se separó de la PO libre con una columna Sephadex G100 y se almacenó a -80°C . La relación molar PO a fibrinógeno fue 1:1. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se demostró la no degradación de la molécula de fibrinógeno durante el proceso de marcaje.

El Fg-PO purificado fue incapaz de formar una malla de fibrina estable tras la incubación con trombina aunque sí que da lugar a un aumento en los niveles de FPA y de los monómeros de fibrina. Cuando el Fg-PO se añadió a plasma hasta una relación molar de fibrinógeno/Fg-PO de 50:1, no se detectaron alteraciones de la malla de fibrina por microscopía. Fibrina conteniendo Fg-PO teñida por incubación con DAB mostraba todas la fibra teñida de marrón, indicando la incorporación del Fg-PO en fibras de diferentes tamaños²⁵⁸.

5.8.1.2 Uso en las perfusiones

Cuando se utilizó el Fg-PO para cuantificar la fibrina depositada, las perfusiones se realizaron según la técnica descrita anteriormente utilizando MEC de célula endotelial estimulada con PMA sobre cubreobjetos de Thermanox[®]. En estos casos en primer lugar se cuantificó la concentración del fibrinógeno de la sangre a perfundir, según el método de Clauss⁵² y se añadió Fg-PO a la sangre a perfundir en una relación molar 200:1 de fibrinógeno nativo/Fg-PO. Tras la perfusión los cubreobjetos se retiraron de la cámara y se lavaron con 2 ml de HBS. Para eliminar la actividad PO no específica presente en las superficies no expuestas al flujo, éstas se cortaron. La actividad PO presente en el área del Thermanox[®] expuesta al flujo se reveló incubándolo durante 30 minutos con un solución de 1,2-fenilendiamina (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,4% (p/v) en un tampón citrato fosfato (ácido cítrico 50 mM, fosfato sódico dibásico 100 mM, pH 5) al que se añadió H_2O_2 al 0,0015%. Tras la incubación la reacción se detuvo con H_2SO_4 2N. La absorbancia a una longitud de onda de 492 nm se midió con un Tirtex Multiscan, Flow Laboratories.

Para correlacionar absorbancias con la cantidad de fibrina formada sobre el cubreobjeto, se construyó una curva estándar de la siguiente forma: se pulverizó una solución de fibrinógeno/Fg-PO (relación molar 200:1) a una concentración de 1 mg/ml en acetato de amonio 0,05 M pH 7,4 sobre cubreobjetos de vidrio con un pincel de aire (Badger modelo nº 100, Badger Air-Brush Co, Franklin Park, Ill, USA). El pincel de aire estaba conectado a un cilindro de nitrógeno a una presión de 1 atmósfera. Justo ante de proceder a la pulverización, a la solución de nitrógeno se añadió trombina humana (Sigma) para alcanzar una concentración final de 1 U/ml. La cantidad de fibrina depositada en la superficie se determinó pesando los cubreobjetos con una microbalanza antes y después de la pulverización y correlacionado con la actividad PO encontrada en el mismo cubreobjeto.

5.8.2 Método del fibrinógeno marcado con ^{125}I

5.8.2.1 Marcaje del fibrinógeno

El fibrinógeno (Grado L, Kabi) fue pasado a través de una columna de Sepharosa 4B para separarlo de la fibrina y de la fibronectina. El fibrinógeno purificado se marcó radioactivamente con Na^{125}I (actividad específica 629 GBq/mg; Amersham, Bucks, Reino Unido) mediante el método de yodógeno modificado. En forma resumida el método consistió en tomar entre 0,25 y 0,4 mg de fibrinógeno y marcarlo con 2 mCi de ^{125}I -NaI en tampón borato al que se había añadido 3,3 mM KI con un Iodo-bead (Pierce, Rockford, Ill, USA). El marcaje se realizó a 4°C durante 45 minutos. La mezcla se dializó contra un volumen 500 veces mayor de 154 mM de NaCl a 4°C durante 16 horas seguido por 2 veces 500 volúmenes de solución Tyrode (8 h y 16 h a 4°C respectivamente).

La preparación final mostró en la electroforesis bajo condiciones reducidas, una mezcla pura de cadenas $\text{A}\alpha$ (M_r 68.000 D), cadenas $\text{B}\beta$ (M_r 57.000 D) y cadenas γ (M_r 49.000). La incorporación del ^{125}I al fibrinógeno fue del 95% \pm 4%. La cantidad de ^{125}I que no precipitó con una solución del 20% (p/v) de ácido tricloroacético fue del 5% \pm 3%. La coagulabilidad del preparado tras añadir

trombina α a una concentración de 5 U/ml e incubar durante 10 minutos a 37°C fue del 99,2% \pm 0,8%.

5.8.2.2 Uso en las perfusiones

En aquellas perfusiones encaminadas a cuantificar la fibrina depositada en los cubreobjetos con Fg-¹²⁵I, en primer lugar se determinó la concentración del fibrinógeno en la sangre a perfundir, según el método de Clauss⁵². A continuación se añadió el Fg-¹²⁵I a la sangre a perfundir en una relación molar 1.000:1 de fibrinógeno nativo a Fg-¹²⁵I. Al finalizar la perfusión los cubreobjetos se lavaron con 2 ml de HBS, y tras separar las partes del Thermanox[®] no perfundidas, se midió la radioactividad presente con un contador gamma (Cobra[®] Auto-gamma, Packard Becker, Groningen, Países Bajos). La cantidad de fibrina depositada se calculó a partir de la actividad específica por mg de Fg-¹²⁵I.

5.9 TEST DE DESAPARICION DE PLAQUETAS AISLADAS

El test de desaparición de plaquetas aisladas (single platelet disappearance, SPD) en una medida de la formación de agregados durante la recirculación de la sangre a través del circuito de perfusión y se realizó según el método propuesto por Frojmovic^{92,267} con algunas modificaciones. En esencia el método es el siguiente: tras finalizar la perfusión se toman muestras de 100 μ l de sangre del reservorio y se añaden a 900 μ l de una solución de glutaraldehído (Fluka AG) al 0,5% (v/v) en PBS y a 900 μ l de EDTA dipotásico al 0,178% (p/v) en PBS 0,1 M. Posteriormente ambas muestras se contaron en un Platelet Analyzer 810 (Baker Instruments, Allentown, USA) con la ventana de recuento fijada para unos volúmenes de entre 3,2 y 16 fl. El SPD se expresó como porcentaje y calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{SPD} = \frac{(\text{Recuento EDTA}) - (\text{Recuento glutaraldehído})}{\text{Recuento EDTA}} \times 100$$

El fundamento teórico de este test es el siguiente: tras la perfusión se forman en la sangre agregados plaquetarios que cuando se añaden a una solución de EDTA se separan, sin embargo en presencia de glutaraldehído estos aglutinados permanecerán unidos y dado que hemos fijado el límite superior de la ventana de recuento en 16 fl, no se contarán.

5.10 CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE FPA

La medición de los niveles de FPA se realizó con un kit de radioinmunoensayo (Byk-Sangtec, Dietzenbach, Alemania) según la instrucciones del fabricante, con mínimas modificaciones. Se recogieron muestras de sangre del reservorio de 900 μ l, antes y después de cada perfusión y se añadió a 100 μ l de la solución anticoagulante suministrada con el kit y constituida por una mezcla de EDTA, aprotinina y D-Phe-Pro-ArgCh₂Cl. Tras separar el plasma (1.500xg, 20' a 4°C) se almacenó a -20°C hasta su uso. El día de la realización de la técnica las muestras se descongelaron y diluyeron en una relación 1:10 con una solución de proteínas plasmáticas (CLB, Amsterdam, Países Bajos), con una concentración de FPA inferior a 0,62 pmol/ml. A 165 μ l de dicha solución se añadían 300 μ l de la solución de Bentonite y tras mezclar bien se centrifugó a 1.500xg durante 20' a 4°C para eliminar el fibrinógeno que pudiera interferir con el test. Tras la centrifugación, del sobrenadante se dispensaron 60 μ l en tubos convenientemente rotulados a los que se añadieron 30 μ l de FPA marcado con ¹²⁵I y 30 μ l del anticuerpo de conejo anti FPA. Cada muestra pre y postperfusión se procesó por duplicado. Cada uno de los puntos de la curva estándar, de las concentraciones baja y alta (control A y B) y de la unión no específica se realizó por triplicado. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente se añadieron 150 μ l de la solución del anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de conejo en polietilén glicol. Se agitó bien y se centrifugó a 1.500xg durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se aspiró con una pipeta y la radioactividad ligada al fondo de tubo se contó con un contador gamma (Cobra® Auto-Gamma).

La generación de FPA se calculó restando la concentración postperfusión de la preperfusión. A partir de esta cifra se calculó la cantidad de moléculas de fibrina

formada; para ello se asumió que una molécula de fibrinógeno daba lugar a dos moléculas de FPA para transformarse en fibrina y que el volumen de plasma en cada perfusión era de 9 ml. La cantidad teórica de fibrina formada se comparó con la fibrina depositada sobre la totalidad de la MEC expuesta al flujo, aproximadamente unos 4,4 cm².

5.11 ANALISIS ESTADISTICO

Los valores para cada uno de los GAG se compararon entre sí mediante el test del análisis de la variancia de un factor con mediciones repetidas (MANOVA). Cuando las diferencias entre las medias fue estadísticamente significativa, se compararon pares de medias mediante el test de Student-Newmann-Keuls con corrección de Bonferroni según el número de pares de medias considerado. Para estudiar la correlación entre variables se utilizó la regresión lineal con ajuste por el método de mínimos cuadrados. Un nivel de significación de la $p < a 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo. Los cálculos se realizaron en ordenador PC con el paquete estadístico SPSS versión para PC 4.0.