



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**FACULTAT DE MEDICINA**

**“ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE ACTIVACION PLAQUETAR  
EN PACIENTES CON SEPSIS GRAVE Y SÍNDROME DE DISFUNCIÓN  
MULTIORGÁNICA. PAPEL DE LAS INTERACCIONES CELULARES.”**

Memoria presentada por el licenciado

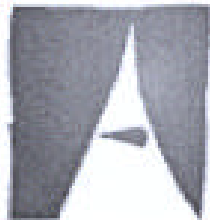
**Don José Luis García Allut**

para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

**Director: Prof. Miquel Vilardell i Tarrés**

**Codirectora: Dra. Jasone Monasterio Aspiri**

Barcelona, 20 de Diciembre del 2000



**Miquel VILARDELL TARRES**, Catedràtic del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**FA CONSTAR,**

Que la Tesi Doctoral titulada “**ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE ACTIVACION PLAQUETAR EN PACIENTES CON SEPSIS GRAVE Y SINDROME DE DISFUNCION MULTIORGANICA. PAPEL DE LAS INTERACCIONES CELULARES**”, presentada per **José Luis GARCÍA ALLUT**, i dirigida per mi per a optar al grau de Doctor, representa una gran aportació al tema i reuneix mèrits suficients per ser presentada i defensada davant del Tribunal corresponent.

I perquè així consti, signo la present a Barcelona, 1 de setembre del dous mil.

Prof. Miquel VILARDELL TARRÉS



**Jasone MONASTERIO ASPIRI**, Cap Clinic de la Unitat de Recerca en Hemostasia del Hospital General Universitari de la Vall d'Hebron

**FA CONSTAR,**

Que la Tesi Doctoral titulada **“ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE ACTIVACION PLAQUETAR EN PACIENTES CON SEPSIS GRAVE Y SINDROME DE DISFUNCION MULTIORGANICA. PAPEL DE LAS INTERACCIONES CELULARES”**,, presentada per **José Luis GARCÍA ALLUT**, i dirigida per mi per a optar al grau de Doctor, representa una gran aportació al tema i reuneix mèrits suficients per ser presentada i defensada davant del Tribunal corresponent.

I perquè així consti, signo la present a Barcelona, 1 de setembre del dous mil.

Dra. Jasone MONASTERIO ASPIRI

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Jasone Monasterio Azpiri, Jefe de la Unidad de Investigación en Hemostasia del Hospital Universitario Vall d'Hebrón y directora de esta tesis, que me inició en la investigación, por su entusiasmo constante en el trabajo clínico y de laboratorio y especialmente, por su amistad.

Al Profesor Miquel Vilardell i Tarrés, Catedrático de Patología y Clínica Médica de la Universidad Autónoma de Barcelona y director de esta tesis, por la confianza que ha depositado en mi para la realización de este estudio.

Al Dr. José Luis Bóveda Treviño, Médico Adjunto del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital General Universitario Vall d'Hebrón, por haberme transmitido su interés en el estudio de la sepsis y de las alteraciones de la hemostasia, por su confianza y apoyo constante.

A las Dras. Juana Vallés Giner y M<sup>a</sup> Teresa Santos Díaz, Investigadoras Adjuntas del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia, por haberme introducido en el estudio de las plaquetas, por su rigor científico, y por su amistad; sin su apoyo incondicional este trabajo no hubiera sido posible.

A las Dras. Isabel Caragol y Teresa Español, del Departamento de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, por su contribución imprescindible en los estudios de la citometría de flujo. A las Sras. Encarna y Susana, por su paciencia y profesionalidad.

A los Drs. Antonio Salgado, Juan Carlos Ruiz, Xavier Nuvials, Jesús Caballero, Federico Esteban, Mari Cruz Martín y Ricard Ferrer, por su colaboración y amistad durante estos años, en los que hemos participado en muchos proyectos comunes.

A la Dra. Ana Anglés, y a las Sras. Pilar Bermudez, Dori Quiroga y Charo Pousa, de la Unidad de Investigación en Hemostasia, por su ayuda desinteresada y entusiasta.

A la Dra. Rosa Gallart, del Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, por su contribución en la determinación de la serotonina. A la Sra. Mercé, por su profesionalidad.

A los Drs. Jaume Figueras y Rosa M<sup>a</sup> Lidón, de la Unidad de Cuidados Coronarios del Servicio de Cardiología del Hospital General Universitario Vall d'Hebrón, por compartir sus medios técnicos, haciendo posible este estudio.

Al Dr. Luis Armadans, del Departamento de Medicina Preventiva del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, que ha dirigido el análisis estadístico de los datos de esta tesis.

A todos los miembros del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital General Universitario Vall d'Hebrón, por su constante ayuda y compañerismo.

A mis actuales compañeros de trabajo del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

*A mis padres, Domingo y Emilia.*

## **ABREVIATURAS**

- AA:** Acido Araquidónico.
- AAS:** Acido Acetil-salicílico.
- ABP:** Actin Binding Protein.
- ACTP:** Angioplastia Coronaria Transluminal Percutánea.
- ACV:** Accidente Cerebro-Vascular.
- ADP:** Adenosin Difosfato.
- AINE:** Aintiinflamatorio no Esteroideo.
- ALP:** Agregados Leuco-Plaquetares.
- AMPc:** Adenosin Monofosfato cíclico.
- AP:** Agregados Plaquetares.
- APACHE II:** Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II.
- AT-III:** Antitrombina-III.
- ATP:** Adenosin Trifosfato.
- BI:** Indice de Unión.
- BGN:** Bacilo Gram-Negativo.
- BSA:** Albúmina de Suero Bovino.
- BPI:** Bactericidal Permeability Increasing Protein.
- **$\beta$ -TG:** -Tromboglobulina.
- CARS:** Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria Compensatoria.
- CEC:** Circulación Extracorpórea.
- CID:** Coagulación Intravascular Diseminada.
- CGP:** Coco Gram-Positivo.
- CMF:** Citometría de Flujo.
- DAG:** Diacil Glicerol.
- DDAVP:** 1-desamino,8 D-arginina vasopresina
- EDRF:** Factor Relajante Derivado del Endotelio.
- FiO<sub>2</sub>:** Fracción inspirada de oxígeno.
- FITC:** Fluorescein isotiocianato.
- FNT- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral- .
- FSC:** Forward Scattered Light.
- FT:** Factor Tisular.

- FvW**: Factor de von Willebrand.
- GC**: Grupo Control.
- GCS**: Glasgow Coma Score.
- GDP**: Guanosin Difosfato.
- GMPc**: Guanosin monofosfato cíclico.
- GM-CSF**: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.
- GMP**: Granule Membrane Protein.
- GTP**: Guanosin Trifosfato.
- GP**: Glicoproteína.
- GPI**: Grupo Fosfatidil-Inositol.
- GR**: Glóbulos Rojos.
- 15-HETE**: Acido 15-Hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico.
- 13-HODE**: Acido 13-Hidroxi-Octadecadienoico.
- 5-HT**: 5-Hidroxitriptamina.
- ICAM**: Molécula de Adhesión Intercelular.
- ICE**: Enzima Convertidora de la Interleuquina.
- IFM**: Intensidad de Fluorescencia Media.
- IFN- $\gamma$** : Interferón .
- IL**: Interleuquina.
- INR**: International Normalized Ratio.
- IP<sub>3</sub>**: Inositol Trifosfato.
- LAMP**: Proteina de Membrana Integral del Lisosoma.
- LA-PF4**: Factor 4 de Baja Afinidad.
- LBP**: LPS-Binding Protein.
- LDH**: Lactato Deshidrogenasa.
- LIBS**: Ligand Induced Binding Sites.
- LIF**: Factor Inhibidor de la Leucemia.
- LOD**: Logistic Organ Dysfunction.
- LPS**: Lipopolisacárido.
- MIF**: Factor Inhibidor de la Migración del Macrófago.
- MODS**: Multiple Organ Dysfunction Score.
- NO**: óxido nítrico.
- NOS**: sintasa del óxido nítrico.
- OSM**: Oncostatina M.



- PAC-1:** Receptor del Fibrinógeno Activado.
- PADGEM:** Platelet Activation Dependent Granule External Membrane.
- PAF:** Factor Activador Plaquetario.
- PAI:** Inhibidor del Activador del Plasminógeno.
- PaO<sub>2</sub>:** Presión parcial arterial de oxígeno.
- PBS:** *Buffer* fosfato salino.
- PCR:** Proteína C Reactiva
- PDGF:** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
- PE:** Ficoeritrina.
- PEEP:** Presión Positiva al Final de la Espiración.
- PFA:** Paraformaldehido.
- PF4:** Factor Plaquetario 4.
- PG:** Prostaglandinas.
- PKC:** Fosfoquinasa C.
- PLC:** Fosfolipasa C.
- PMN:** Leucocitos PolimorfoNucleares.
- PPP:** Plasma Pobre en Plaquetas.
- PRP:** Plasma Rico en Plaquetas.
- PSGL-1:** Ligando 1 de la Glicoproteína P-selectina.
- PTI:** Púrpura Trombocitopénica Idiopática.
- PTT:** Púrpura Trombótica Trombocitopénica.
- RIA:** Radio-Inmuno-Ensayo.
- RIBS:** Receptor Induced Binding Sites.
- SDMO:** Síndrome de Disfunción Multiorgánica.
- SDRA:** Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.
- SG:** Sepsis Grave.
- SHU:** Síndrome Hemolítico Urémico.
- SNG:** Sepsis No Grave.
- SOFA:** Sepsis-related Organ Failure Assesment.
- SRIS:** Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.
- SSC:** Side Scattered Light.
- ST:** Sangre Total.
- TGF-β:** Transforming Growth Factor- .
- TFPI:** Inhibidor de la Vía del Factor Tisular.

- TIH:** Trombocitopenia Inducida por Heparina.
- TSP:** Trombospondina.
- TP:** Tiempo de Protrombina.
- TXA<sub>2</sub>:** Tromboxano A<sub>2</sub>.
- UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos.
- VLA:** Very Late Antigens.
- VNR:** Receptor de la Vitronectina.

**INDICE**

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Preámbulo.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Sepsis: definiciones.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Infección.....	5
1.2.2. Bacteriemia.....	5
1.2.3. Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.....	6
1.2.4. Sepsis.....	7
1.2.5. Sepsis grave, sepsis con hipotensión y shock séptico.....	8
1.2.6. Síndrome de disfunción multiorgánica.....	9
<b>1.3. Respuesta inmunológica en la sepsis.....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Estímulos que inician la cascada inflamatoria.....	14
1.3.2. Citoquinas proinflamatorias.....	17
1.3.2.1. <i>Factor de necrosis tumoral - <math>\alpha</math></i> .....	17
1.3.2.2. <i>Interleuquina 1</i> .....	18
1.3.2.3. <i>Interleuquina 6</i> .....	19
1.3.2.4. <i>Interleuquina 8</i> .....	20
1.3.2.5. <i>Interferón-<math>\gamma</math></i> .....	21
1.3.2.6. <i>Interleuquina 12</i> .....	21
1.3.2.7. <i>Factor inhibidor de la migración del macrófago</i> .....	22
1.3.2.8. <i>Factor inhibidor de la leucemia y Oncostatina M</i> .....	22
1.3.3. Citoquinas antiinflamatorias.....	22
1.3.3.1. <i>Interleuquina 4</i> .....	23
1.3.3.2. <i>Interleuquina 6</i> .....	24
1.3.3.3. <i>Interleuquina 10</i> .....	25
1.3.3.4. <i>Interleuquina 13</i> .....	25
1.3.3.5. <i>Antagonista del receptor de la IL-1</i> .....	26
1.3.3.6. <i>Transforming Growth Factor - <math>\beta</math></i> .....	26
1.3.3.7. <i>Receptores solubles del TNF - <math>\alpha</math></i> .....	27
1.3.4. <i>Vía de la L-arginina-óxido nítrico</i> .....	29

1.3.5. Factor activador plaquetario.....	30
1.3.6. Interacción entre los mediadores inflamatorios sistémicos, y el sistema de la coagulación / fibrinólisis.....	33
<b>1.4. Morfología y función plaquetaria.....</b>	<b>40</b>
1.4.1. Membrana plaquetaria.....	41
1.4.1.1. Glicoproteínas, receptores e integrinas.....	41
1.4.1.2. Receptores no glicoproteicos.....	48
1.4.2. Citoesqueleto plaquetario.....	49
1.4.3. Gránulos específicos.....	50
1.4.3.1. Gránulos $\alpha$ .....	51
1.4.3.2. Gránulos densos.....	53
1.4.3.3. Lisosomas.....	54
<b>1.5. Reactividad plaquetaria: definiciones.....</b>	<b>55</b>
1.5.1. Adhesión.....	57
1.5.2. Agregación.....	59
1.5.3. Reclutamiento.....	60
1.5.4. Consolidación del trombo.....	61
1.5.4.1. Actividad procoagulante de las plaquetas.....	62
<b>1.6. Activación plaquetaria: secuencia bioquímica.....</b>	<b>64</b>
1.6.1. Interacción ligando-receptor.....	65
1.6.2. Proteínas G.....	66
1.6.3. Metabolismo del fosfatidil inositol.....	66
1.6.4. Síntesis de eicosanoides.....	68
1.6.5. Metabolismo transcelular de los eicosanoides.....	71
<b>1.7. Aplicación de la citometría de flujo (CMF) al estudio de la función plaquetaria.....</b>	<b>73</b>
1.7.1. Principios de la citometría de flujo.....	73
1.7.2. Análisis de la activación plaquetaria.....	75
1.7.2.1. Parámetros de CMF de activación plaquetaria.....	75
1.7.2.2. Análisis de la activación plaquetaria in vivo.....	77
1.7.2.3. Análisis de la activación plaquetaria in vitro.....	79

1.7.2.4. Estudios indirectos relacionados con la función plaquetaria.....	79
<b>1.8. Interacción eritrocito-plaqueta en los procesos trombóticos.....</b>	<b>80</b>
1.8.1. Estudios clínicos.....	80
1.8.2. Estudios experimentales.....	81
1.8.3. Mecanismos de participación de los eritrocitos en la trombosis.....	82
1.8.3.1. Aspectos hemorreológicos y físicos.....	83
1.8.3.2. Efectos de los eritrocitos sobre los sistemas tromborreguladores.	85
1.8.3.3. Efectos de los eritrocitos sobre la función plaquetaria.....	86
1.8.3.4. Mecanismos bioquímicos de la interacción eritrocito-plaqueta....	87
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>90</b>
<b>2.1. Estudio 1: “Análisis de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y fracaso multiorgánico, por técnicas de citometría de flujo, y su relación con parámetros clínicos y evolutivos.”.....</b>	<b>91</b>
<b>2.2. Estudio 2: “Modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes en la sepsis: análisis <i>in vitro</i> del papel regulador de las interleuquinas (IL) 1<math>\beta</math>, 6 y 10, sobre dicha reactividad.”.....</b>	<b>92</b>
<b>3.MATERIAL Y METODO.....</b>	<b>94</b>
<b>3.1. Material y método empleados en el Estudio 1: “Análisis de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y fracaso multiorgánico, y su relación con parámetros clínicos y evolutivos.”.....</b>	<b>95</b>
3.1.1. Definición de pacientes.....	95
3.1.2. Criterios de selección.....	95
3.1.2.1. Criterios de inclusión.....	95
3.1.2.2. Criterios de exclusión.....	96
3.1.2.3. Momento de inclusión.....	97
3.1.3. Sistemática de trabajo y control evolutivo.....	97
3.1.4. Obtención de la muestra sanguínea.....	101
3.1.4.1. Tipo de muestra.....	101

3.1.4.2. <i>Recogida de la muestra</i> .....	102
3.1.4.3. <i>Anticoagulación plasmática</i> .....	102
3.1.5. <i>Material para el análisis citométrico</i> .....	102
3.1.5.1. <i>Tampones para incubación de anticuerpos</i> .....	102
3.1.5.2. <i>Fijadores de la muestra</i> .....	103
3.1.5.3. <i>Anticuerpos monoclonales</i> .....	103
3.1.5.3.1. <i>CD61 (Anti-GPIIIa o Anti-Integrina <math>\alpha_3</math>)</i> .....	104
3.1.5.3.2. <i>CD42a (Anti-GPIX)</i> .....	104
3.1.5.3.3. <i>CD62P (P-selectina)</i> .....	105
3.1.5.3.4. <i>PAC-1 (Anti-GPIIb-IIIa activado)</i> .....	105
3.1.5.3.5. <i>CD45</i> .....	106
3.1.5.4. <i>Selección de fluorocromos/conjugados</i> .....	106
3.1.5.5. <i>Citómetro de flujo</i> .....	107
3.1.6. <i>Procesado de la muestra</i> .....	107
3.1.6.1. <i>Preparación inicial de la muestra</i> .....	107
3.1.6.2. <i>Marcaje de la muestra</i> .....	108
3.1.6.3. <i>Paneles de anticuerpos</i> .....	108
3.1.6.3.1. <i>Análisis de los agregados plaquetares</i> .....	109
3.1.6.3.2. <i>Análisis de la expresión de CD62P y de PAC-1</i> .....	110
3.1.6.3.3. <i>Análisis de los agregados leuco-plaquetares</i> .....	111
3.1.7. <i>Expresión de los resultados</i> .....	112
3.1.7.1. <i>Porcentaje de células positivas</i> .....	112
3.1.7.2. <i>Intensidad de fluorescencia media</i> .....	112
3.1.8. <i>Tabulación de los resultados</i> .....	112
3.1.9. <i>Método estadístico</i> .....	113
<b>3.2. Material y método para el Estudio 2: "Modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes en la sepsis: análisis <i>in vitro</i> del papel regulador de las interleuquinas <math>1\beta</math>, 6 y 10, sobre dicha reactividad."</b> .....	114
3.2.1. <i>Obtención de la muestra sanguínea</i> .....	114
3.2.1.1. <i>Selección de donantes</i> .....	114

3.2.1.2.Tipo de muestra.....	114
3.2.1.3.Extracción de la muestra.....	115
3.2.1.4.Separación de las células sanguíneas.....	115
3.2.1.5.Lavado de los eritrocitos.....	115
3.2.2.Equipos, materiales y reactivos utilizados.....	116
3.2.2.1.Equipos.....	116
3.2.2.2.Materiales.....	116
3.2.2.3.Reactivos.....	117
3.2.3.Sistema experimental para el estudio de la activación y reclutamiento plaquetario.....	117
3.2.3.1.Procedimiento experimental.....	118
3.2.3.2.Inductores de la activación plaquetar.....	118
3.2.3.3.Sistema generador.....	119
3.2.3.4.Sistema de ensayo.....	120
3.2.3.4.1.Agregometría óptica de los sistemas de ensayo.....	121
3.2.3.4.2.Determinación de serotonina en el sobrenadante de estimulación de los sistemas generadores por RIA.....	121
3.2.4.Análisis del efecto de las interleuquinas (IL) 1 , 6 y 10 sobre la agregación plaquetaria.....	122
3.2.5.Análisis del efecto de las interleuquinas (IL) 1 , 6 y 10 sobre la modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes.....	123
3.2.6.Método estadístico.....	126
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>126</b>
<b>4.1.Resultados del Estudio 1: “Análisis de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y fracaso multiorgánico, y su relación con parámetros clínicos y evolutivos.”.....</b>	<b>126</b>
4.1.1.Estudio descriptivo del grupo control.....	126
4.1.2.Estudio descriptivo de los pacientes sépticos.....	127
4.1.2.1.Pacientes con sepsis no grave.....	127
4.1.2.2.Pacientes con sepsis grave.....	127

4.1.2.3. Comparación entre los grupos estudiados.....	128
4.1.2.4. Estudio microbiológico.....	129
4.1.2.5. Datos analíticos.....	132
4.1.2.6. Estudio de la disfunción multiorgánica: SOFA.....	133
4.1.2.7. Correlación APACHE II y SOFA.....	134
4.1.2.8. Datos evolutivos.....	135
4.1.3. Estudio de los agregados plaquetarios.....	135
4.1.3.1. Valores de normalidad.....	135
4.1.3.2. Grupo control.....	136
4.1.3.3. Grupo de sepsis no grave.....	136
4.1.3.4. Grupo de sepsis grave.....	136
4.1.3.5. Comparación entre grupos.....	136
4.1.4. Estudio de la expresión de PAC-1.....	137
4.1.4.1. Valores de normalidad.....	137
4.1.4.2. Grupo control.....	138
4.1.4.3. Grupo de sepsis no grave.....	138
4.1.4.4. Grupo de sepsis grave.....	139
4.1.4.5. Comparación entre grupos.....	139
4.1.5. Estudio de la expresión de CD62P.....	140
4.1.5.1. Valores de normalidad.....	140
4.1.5.2. Grupo control.....	141
4.1.5.3. Grupo de sepsis no grave.....	141
4.1.5.4. Grupo de sepsis grave.....	142
4.1.5.5. Comparación entre grupos.....	143
4.1.6. Estudio de agregados leuco-plaquetarios.....	143
4.1.6.1. Valores de normalidad.....	144
4.1.6.2. Grupo control.....	144
4.1.6.3. Grupo de sepsis no grave.....	144
4.1.6.4. Grupo de sepsis grave.....	144
4.1.6.5. Comparación entre grupos.....	145
4.1.7. Correlación entre parámetros de activación plaquetaria.....	146



4.1.8. Activación plaquetaria y datos epidemiológicos.....	147
4.1.9. Activación plaquetaria y datos microbiológicos.....	147
4.1.10. Activación plaquetaria y datos analíticos.....	148
4.1.11. Activación plaquetaria y disfunción orgánica.....	149
4.1.12. Activación plaquetar y evolución clínica.....	150
<b>4.2. Resultados del Estudio 2: “Modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes en la sepsis: análisis <i>in vitro</i> del papel regulador de las interleuquinas 1<math>\beta</math>, 6 y 10, sobre dicha reactividad.”.....</b>	<b>151</b>
4.2.1. Efecto de los eritrocitos sobre la reactividad plaquetaria en individuos sanos	151
4.2.1.1. Efecto de los eritrocitos sobre el reclutamiento plaquetario.....	151
4.2.1.2. Efecto de los eritrocitos sobre la activación plaquetaria.....	153
4.2.2. Efecto de los eritrocitos sobre la reactividad de las plaquetas, en pacientes sépticos.....	154
4.2.3. Efecto de las interleuquinas 1 , 6 y 10 sobre la agregación plaquetaria.....	155
4.2.3.1. Interleuquina 1 $\beta$ y agregación plaquetaria.....	156
4.2.3.2. Interleuquina 6 y agregación plaquetaria.....	157
4.2.3.3. Interleuquina 10 y agregación plaquetaria.....	158
4.2.4. Efecto de las interleuquinas 1 , 6 y 10 sobre la modulación eritrocitaria de la reactividad plaquetaria.....	159
4.2.4.1. Interleuquina 1 $\beta$ y reactividad plaquetaria.....	159
4.2.4.2. Interleuquina 6 y reactividad plaquetaria.....	160
4.2.4.3. Interleuquina 10 y reactividad plaquetaria.....	162
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>165</b>
<b>5.1. Marcadores de superficie de activación plaquetar en la sepsis grave: expresión de PAC-1 y de P-selectina.....</b>	<b>166</b>
<b>5.2. Agregados plaquetares y sepsis.....</b>	<b>180</b>
<b>5.3. Agregados leuco-plaquetares y sepsis.....</b>	<b>187</b>
<b>5.4. Trombosis como fenómeno multicelular: sepsis, plaquetas y eritrocitos. Papel de las interleuquinas 1<math>\beta</math>, 6 y 10.....</b>	<b>203</b>

<b>6.CONCLUSIONES.....</b>	<b>214</b>
<b>7.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>217</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. PREÁMBULO**

La sepsis y sus complicaciones, el shock séptico y el síndrome de disfunción multiorgánica, son las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (1).

Durante muchos años se ha venido empleando de forma imprecisa la terminología relacionada con el proceso séptico, de forma que se limitaba la posibilidad de estudiar a grupos homogéneos de pacientes, así como de desarrollar ensayos clínicos destinados a disminuir la morbimortalidad de esta patología. En Agosto de 1991, el “American College of Chest Physicians” y la “Society of Critical Care Medicine” celebraron en Chicago una Conferencia de Consenso en la que establecieron una serie de criterios para definir la sepsis, la sepsis grave, el síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica y el síndrome de la disfunción multiorgánica, entre otros términos afines, dotándonos de una herramienta útil, aunque con limitaciones, para la estratificación y estudio de estos pacientes (2). Es a partir de este momento cuando los estudios clínicos han ganado en racionalidad, y nuevas aproximaciones terapéuticas se han ido desarrollando; algunas no cumplieron las elevadas expectativas generadas, mientras otras se encuentran actualmente bajo evaluación clínica.

Se reconoce actualmente como sepsis, la respuesta inmunológica del huésped ante una infección. Muchos de los enfermos con sepsis evolucionan hacia el síndrome de disfunción multiorgánica, definido como un síndrome clínico caracterizado por el desarrollo de una disfunción progresiva, pero potencialmente reversible, de dos o más órganos o sistemas, inducida por diferentes insultos agudos, incluida la sepsis. A medida que aumenta el número de órganos disfuncionantes, se eleva también la mortalidad del proceso.

Diferentes estudios clínicos y experimentales, han profundizado en el conocimiento

de las vías fisiopatológicas involucradas en este proceso, apuntando a un desequilibrio entre la respuesta proinflamatoria ante el insulto infeccioso, y la respuesta antiinflamatoria, que incapaz de mantener una homeostasis, conduce al fracaso de diferentes órganos (3).

Los estudios anatomopatológicos de diferentes órganos disfuncionantes de pacientes fallecidos en situación de fracaso multiorgánico, describen la existencia de trombos a nivel de la vasculatura capilar, formados fundamentalmente por plaquetas y fibrina. La consistencia de estos hallazgos ha suscitado la hipótesis de la trombosis microvascular como pivote de la disfunción multiorgánica, y ha convertido a las plaquetas, en un componente celular sanguíneo con un grado de implicación mucho mayor del que se le había otorgado inicialmente, pasando de ser simples testigos de un proceso, a ser una parte activa del complejo entramado fisiopatológico en que ha devenido la sepsis (4).

## **1.2. SEPSIS: DEFINICIONES**

Aunque la incidencia exacta de la sepsis y el shock séptico es desconocida, se estima que en Estados Unidos ocurren anualmente 400.000 casos de sepsis y 200.000 casos de shock séptico, responsables de 100.000 muertos al año. Aunque los avances terapéuticos deberían disminuir su incidencia, la realidad es que se detecta un aumento progresivo, explicado en parte por el mayor número de pacientes inmunodeprimidos y por la creciente longevidad de la población (5).

La sepsis se presenta en un 1% de los pacientes hospitalizados, y entre un 4.5% y un 49% de los pacientes de UCI, según las diferentes series (6).

En 1992 se publicaron las definiciones de la Conferencia de Consenso sobre sepsis, estableciendo unos criterios estrictos que permiten la homogeneización de los pacientes estudiados y al mismo tiempo permiten identificar a aquellos individuos que se podrían beneficiar de los nuevos tratamientos (2) (Tabla 1).

**Tabla 1. Definiciones de sepsis y términos relacionados.**

**Infección:** fenómeno microbiológico caracterizado por la respuesta inflamatoria frente a la agresión microbiana, o la invasión de los tejidos del huésped normalmente estériles, por microorganismos.

**Bacteriemia:** presencia de bacterias viables en la sangre.

**Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS):** respuesta sistémica a cualquier agresión grave, manifestada por dos o más de las siguientes condiciones:

temperatura  $> 38^{\circ}\text{C}$  ó  $> 36^{\circ}\text{C}$

frecuencia cardíaca  $> 90$  latidos / minuto

frecuencia respiratoria  $> 20$  respiraciones / minuto, o  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg

leucocitos en sangre  $> 12000$  células/ $\mu\text{l}$  ó  $< 4000$  células/ $\mu\text{l}$  ó  $> 10\%$  bandas

**Sepsis:** respuesta sistémica a la infección, manifestada por dos o más de las anteriores condiciones. Deben representar una alteración aguda respecto a la basal en ausencia de otras causas que las justifiquen.

**Sepsis grave:** sepsis asociada a disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión. La hipotensión y las alteraciones de la perfusión pueden incluir, pero no están limitadas, a acidosis láctica, oliguria o alteración del estado mental.

**Sepsis con hipotensión:** tensión arterial sistólica  $< 90$  mmHg, o una reducción de la tensión arterial basal en 40 mmHg, en ausencia de otras causas de hipotensión.

**Shock séptico:** sepsis con hipotensión, a pesar de una adecuada restitución de líquidos, asociado a alteraciones de la perfusión que pueden incluir, pero no están limitadas a acidosis láctica, oliguria o alteración del estado mental. Los pacientes con tratamiento inotrópico o vasopresor pueden no estar hipotensos en el momento en el que se les miden las alteraciones de la perfusión.

**Síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO):** presencia de alteraciones de la función orgánica en un paciente con enfermedad aguda, y que es incapaz de mantener su homeostasis sin ayuda.

*Crit Care Med 1992; 20:864-874.*

### **1.2.1. INFECCIÓN**

Se limita al fenómeno microbiológico caracterizado por la respuesta inflamatoria frente a la agresión microbiana, o la invasión de los tejidos del huésped normalmente estériles, por microorganismos.

Las infecciones bacterianas son generalmente más virulentas, e inducen más frecuentemente una sepsis grave que las infecciones fúngicas o víricas, las cuales provocarán una reacción sistémica grave más habitualmente en pacientes debilitados o inmunodeprimidos. El tipo de bacteria es de menor importancia, así aunque inicialmente la endotoxina, o lipopolisacárido (LPS) de membrana, de los bacilos gram-negativos (BGN) se reconoció como un potente activador de la respuesta séptica con un patrón hemodinámico determinado, actualmente sabemos que las exotoxinas de las bacterias gram-positivas pueden generar una respuesta séptica muy similar (7). Con respecto al foco de la infección, los pacientes con sepsis de origen urinario, tienen un mejor pronóstico que aquellos con un foco respiratorio o abdominal (8).

### **1.2.2. BACTERIEMIA**

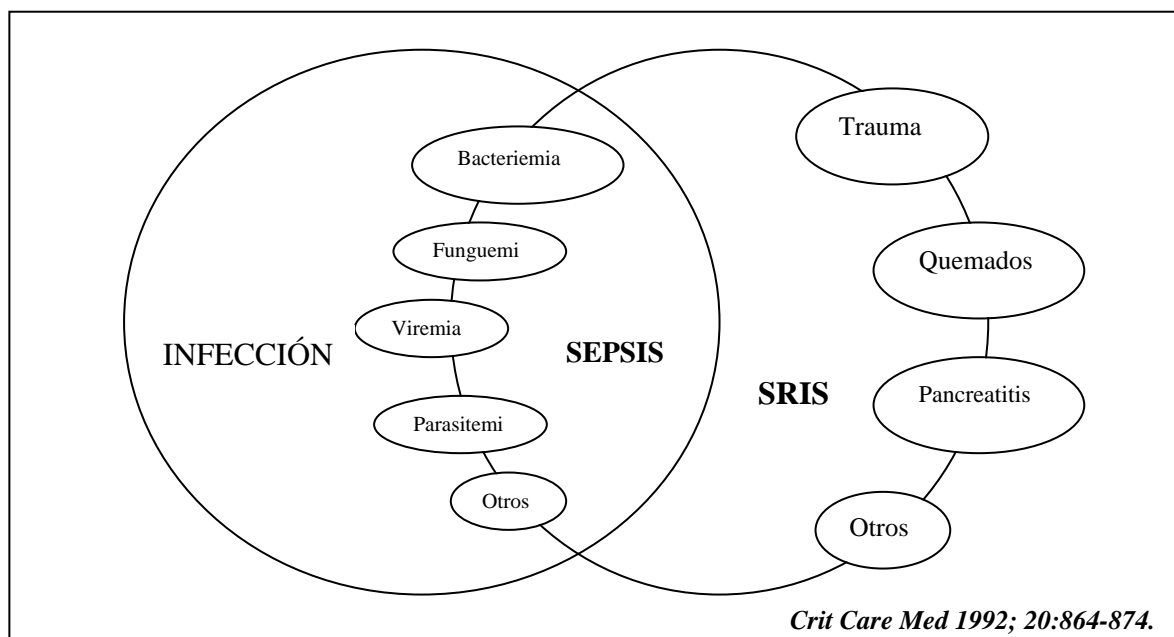
El concepto de bacteriemia se limita a la presencia de bacterias viables en la sangre. Así, la presencia de bacteriemia no constituye un requerimiento para el diagnóstico de sepsis. Un 50% de los pacientes con sepsis grave tienen bacteriemia documentada (9). A pesar de que se ha descrito que la incidencia de shock circulatorio es mayor cuando la bacteriemia es presente, los últimos estudios encuentran esta diferencia no significativa (10). Este hecho podría explicarse porque muchos pacientes desarrollan infecciones graves mientras reciben tratamiento antibiótico que negativiza el cultivo. El término “septicemia” se refiere a la asociación de sepsis y bacteriemia, pero se ha venido empleando de forma que inducía a confusión, y actualmente está en desuso.

### 1.2.3. SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA (SRIS)

La respuesta inflamatoria generalizada, inducida por la infección, no es específica y puede observarse en ausencia de ésta. Por ello se ha propuesto el término síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, para describir este proceso inflamatorio independientemente de su causa. Así, causas no infecciosas responsables del SRIS incluyen: grandes quemados, pancreatitis graves, traumatismos severos, isquemia, shock hemorrágico, lesiones inmunológicas y otras. Se han descrito diferencias importantes en la activación de la cascada inflamatoria / inmunológica en función de la noxa desencadenante. Como ejemplo decir que los radicales libres de oxígeno parecen jugar un papel más importante en el traumatismo con isquemia-reperfusión, y las proteasas lo juegan en la pancreatitis grave (11).

La introducción de este neologismo no ha tenido éxito por resultar un concepto demasiado amplio, que si bien es muy sensible para predecir la sepsis grave, resulta muy poco específico. Pittet et (12) al encuentran que el SRIS tiene una sensibilidad del 100%, pero una especificidad del 14% para predecir sepsis; otros autores no encontraron diferencias pronósticas entre los pacientes con y sin SRIS (13).

**Figura 1. Interrelación entre SRIS, sepsis e infección.**





#### 1.2.4. SEPSIS

Se define como la respuesta sistémica a la infección, manifestada por dos o más de las condiciones descritas en la Tabla 1. Debe representar una alteración aguda respecto a la basal en ausencia de otras causas que la justifiquen.

Sepsis es un término médico muy antiguo, que deriva del griego “*sepsis*”, que significa putrefacción; durante muchos años se ha considerado sinónimo de infección, dado al papel preponderante atribuido al microorganismo en la sepsis. Hoy reconocemos la sepsis como la respuesta inmunológica del huésped a la agresión microbiana, más que el efecto directo del microorganismo agresor. Esta respuesta sistémica está constituida por una serie de signos clínicos, hematológicos, bioquímicos e inflamatorios (11).

Utilizando las nuevas definiciones, la incidencia de sepsis en pacientes de UCI oscila entre el 4.5 y el 49%, según las diferentes series publicadas (12-14).

Aunque los signos clínicos de sepsis constituyen una larga lista, repasaremos brevemente los más habituales; debemos admitir previamente, que ninguno de estos signos es sensible ni específico, especialmente en el paciente crítico.

La fiebre es un importante signo de infección, pero puede estar ausente en un número no desdeñable de casos. Ha sido una fuente de frustración en los ensayos clínicos recientes, donde pacientes con una obvia infección grave, no alcanzaban el criterio de temperatura requerido por el estudio. La incapacidad para desarrollar fiebre ha sido relacionada con una mayor mortalidad de estos pacientes. En presencia de un fracaso circulatorio agudo, podemos observar también hipotermia, probablemente por alteración de los mecanismos termogénicos. Dicha hipotermia es un signo ominoso, asociado con una mayor mortalidad. Además la fiebre está presente en muchas otras condiciones diferentes a la infección, como son el trauma o el infarto de miocardio.

Después de la fiebre, la taquicardia es el signo sistémico más importante de una

infección. Se presenta generalmente en relación a una respuesta simpática a la sepsis, y muchas veces a hipovolemia. El grado de taquicardia se ha relacionado con la mortalidad en el shock séptico. En pacientes ancianos, o en aquellos tratados con antiarrítmicos, la taquicardia puede estar ausente.

La hiperventilación que se asocia con alcalosis respiratoria fue identificada hace muchos años como un signo de infección. Sin embargo, este signo clínico a menudo se pierde en los pacientes críticos si éstos requieren ventilación mecánica.

De forma similar, aunque un recuento de células blancas elevado es un valioso signo de infección, la leucocitosis es un hallazgo común en pacientes gravemente enfermos, en relación a una respuesta de stress a cualquier otro estímulo.

### **1.2.5. SEPSIS GRAVE, SEPSIS CON HIPOTENSIÓN Y SHOCK SÉPTICO**

La sepsis y sus complicaciones representa un *continuum* de severidad clínico y fisiopatológico. La infección, como iniciador del evento, puede evolucionar a sepsis con disfunción orgánica y shock séptico. El grado de severidad parece afectar de modo independiente al pronóstico. Por ello se definen algunos estadios clínicos reconocibles, tales como sepsis grave, sepsis con hipotensión y shock séptico (2) (Tabla 1).

Pittet et al (12) describen una incidencia de sepsis, sepsis grave y shock séptico del 49%, 16% y 7% respectivamente. Rangel et al (14) encuentran que la incidencia de sepsis, sepsis grave y shock séptico en pacientes de UCI, es respectivamente del 26%, 18% y 4%. Salvo et al (13) confirman que los términos sepsis, sepsis grave y shock séptico identifican a una serie de pacientes con un riesgo de muerte que se incrementa de forma progresiva. Aunque la comparación de los datos de unas series a otras es difícil, se estima que la mortalidad de la sepsis no complicada es de alrededor del 15%-20%, la de la sepsis grave del 30%-40%, y la del shock séptico entre el 50%-60%. Estos estudios demuestran la

hipótesis de que la historia natural de la respuesta inflamatoria a la infección es una progresión desde el SIRS hasta el shock séptico.

El “*síndrome séptico*” es un término acuñado por Roger Bone, para definir la asociación de sepsis con alteración de la perfusión y/o función orgánica. Para muchos autores esta terminología es claramente redundante, ya que sepsis en sí misma ya es un síndrome clínico. Además sería poco homogénea ya que incluye a pacientes con sepsis grave, shock séptico y fracaso multiorgánico, con y sin shock.

### 1.2.6. SINDROME DE DISFUNCIÓN MULTIORGÁNICA (SDMO)

Definido como un síndrome clínico caracterizado por el desarrollo de una disfunción progresiva, pero potencialmente reversible, de dos o más órganos o sistemas, inducida por diferentes insultos agudos, incluida la sepsis. Se prefiere el término disfunción, de naturaleza dinámica, al concepto de fallo o fracaso, que sería la presencia o ausencia del mismo; la disfunción multiorgánica es un proceso más que un evento (2).

Una infección incontrolada puede abocar a un SDMO; una serie de mediadores y la persistencia de hipoxia tisular han sido incriminados en el desarrollo del SDMO. La traslocación bacteriana intestinal, asimismo, ha sido descrita como un posible desencadenante del SDMO; en cualquier caso, nuestro conocimiento de su fisiopatología es muy limitado.

Se han descrito dos tipos de SDMO, uno **primario** referido a la disfunción orgánica que ocurre inmediatamente después de un insulto agudo a la homeostasis y como una consecuencia directa del mismo; mientras que el SDMO **secundario** se desarrolla más tardíamente y ocurre como resultado de la respuesta del huésped al proceso patológico primario (2). Así ejemplos de SDMO primario sería una contusión pulmonar o la coagulopatía postransfusional, mientras el síndrome del distrés respiratorio agudo (SDRA) y la coagulopatía asociados a una peritonitis, serían ejemplos del SDMO secundario.

Veamos a continuación brevemente, las manifestaciones clínicas del SDMO:

- Disfunción cardiovascular: la hipotensión arterial es el signo clínico fundamental del shock séptico. Pueden estar presentes signos de hipoperfusión tisular en ausencia de hipotensión significativa. El patrón hemodinámico del shock séptico se caracteriza por taquicardia, gasto cardíaco elevado y descenso de las resistencias vasculares sistémicas; un efecto depresor de la contractilidad miocárdica asociado a un gasto cardíaco bajo, se puede observar en pacientes con evolución desfavorable. La acidosis láctica y el metabolismo anaerobio en pacientes con shock séptico, medidos por los niveles de ácido láctico, se correlacionan con el desarrollo de disfunción multiorgánica y con la mortalidad.
  
- Disfunción respiratoria: La insuficiencia respiratoria inicial suele presentarse como taquipnea, disnea e hiperventilación con alcalosis respiratoria; en los casos más graves se desarrolla el SDRA, caracterizado por alteraciones de la microvasculatura pulmonar que llevan a un incremento de la permeabilidad capilar, con edema alveolar y lesión del surfactante alveolar, que condiciona finalmente hipoxemia grave y necesidad de ventilación mecánica. Los parámetros utilizados para evaluar esta disfunción son la relación  $PaO_2 / FiO_2$ , así como la necesidad de ventilación mecánica.
  
- Disfunción renal: la oliguria es uno de los signos precoces en el shock séptico, como respuesta inicial compensadora a la hipotensión arterial. La persistencia del shock conduce a la necrosis tubular aguda, siendo el mecanismo inicial de disfunción la hipoperfusión renal, aunque se ha descrito la acción causal de diferentes mediadores inflamatorios. Aunque la mayoría de insuficiencias renales agudas son oligúricas, el tratamiento precoz puede convertirlas en poliúricas. Para valorar la disfunción de este órgano se emplean el volumen de diuresis, y los niveles de creatinina sérica.
  
- Disfunción neurológica: puede manifestarse como desorientación, agitación, confusión o letargia, siendo los signos focales y las convulsiones poco

frecuentes. En la patogénesis de la encefalopatía séptica se han implicado a diferentes factores como la hipoperfusión cerebral, la hipoxemia, la diselectrolitemia, la presencia de falsos neurotransmisores o los efectos directos de algunos mediadores inflamatorios. La valoración del grado de disfunción neurológica se mide con el Glasgow Coma Score (GCS), aunque en la práctica, la necesidad de sedación de estos pacientes dificulta dicha evaluación.

- Disfunción hepática: su aparición en el transcurso de la sepsis es más tardía, y puede manifestarse desde una mínima elevación de los enzimas hepáticos e ictericia, hasta una insuficiencia hepática aguda franca. La hiperbilirrubinemia suele ser a expensas de la bilirrubina conjugada, y el patrón analítico es de colestasis intrahepática. Su patogénesis es multifactorial, incluyendo mecanismos como la isquemia hepática, lesión directa por endotoxinas y mediadores inflamatorios, y toxicidad por fármacos entre otros.
  
- Disfunción hematológica: la sepsis es la principal causa de coagulación intravascular diseminada (CID), caracterizada por trombosis, fibrinólisis y coagulopatía de consumo, jugando un papel importante en el desarrollo del SDMO. La trombocitopenia aislada es un signo frecuente y precoz en la sepsis, empleándose como marcador de disfunción multiorgánica. Entre las causas de la trombocitopenia en la sepsis, se han descrito la coagulopatía de consumo, la lesión directa por endotoxinas, la inhibición de la trombopoyesis, y el daño plaquetario inmunológico, habiéndose detectado elevados niveles de IgG asociadas a las plaquetas en pacientes sépticos con trombocitopenia (15,16).

Con el objeto de evaluar la disfunción multiorgánica, aumentar nuestro conocimiento de su historia natural, analizar la interrelación entre el fracaso de dos órganos, y poder estudiar los efectos de nuevas terapias, así como seleccionar pacientes para su estudio, se han diseñado diferentes “scores”: el “Multiple Organ Dysfunction Score (MODS)” desarrollado por Marshall *et al* (17), el “Brussels Score” desarrollado por Bernard *et al* (18), el “Logistic Organ Dysfunction (LOD) System” de Le Gall *et al* (19) y el más reciente

y en el desarrollo del cual nosotros hemos trabajado, el “Sepsis-related Organ Failure Assesment – SOFA Score” publicado por Vincent *et al* (20). Una diferencia entre los tres scores radica en la definición de disfunción cardiovascular. En el MODS, esta basado en un cálculo complejo de la frecuencia cardíaca ajustada a las presiones, definido como el producto de la frecuencia cardíaca multiplicado por la presión venosa central y dividido por la presión arterial media; contradiciendo el ideal de variable que debe ser de simple aplicación. El Score de Bruselas se basa en la hipotensión y la acidemia, pero la acidemia puede estar causada por otros factores, incluido el fallo renal y la hipercapnia. El Score SOFA basa la disfunción cardiovascular en los requerimientos de drogas vasoactivas; aunque sería deseable no emplear criterios basados en el tratamiento, los resultados de dichos criterios encuentran que las categorías fueron lo suficientemente amplias como para evitar el impacto de los protocolos terapéuticos de diferentes hospitales. El LOD System, menos práctico por su mayor complejidad estadística, tiene en cuenta no sólo el grado de disfunción de cada órgano, sino que asume que la disfunción de los diferentes órganos tiene consecuencias de gravedad variable en el pronóstico del paciente.

La aparición del SDMO se ha querido asociar a los avances de las medidas de soporte de los pacientes ingresados en UCI. Actualmente se le considera la causa principal de los fallecimientos entre pacientes ingresados en unidades de críticos, siendo el responsable del 50%-80% de todas las muertes. Su incidencia oscila entre el 10% y el 40% de los pacientes de UCI, según las series (21). La mortalidad del SDMO es muy elevada, oscilando entre el 30% y el 100%, estando relacionada con el número de órganos disfuncionantes y la gravedad y duración del fallo orgánico, aproximándose de forma universal al 90%-100% cuando disfuncionan tres o más órganos (22).

### 1.3. RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA SEPSIS

La respuesta inmunológica en la sepsis, es una reacción normal y necesaria para tratar la infección. Inicialmente se hacía especial énfasis en la respuesta de los mediadores proinflamatorios involucrados en propagar esta respuesta, sin embargo, actualmente se ha definido la respuesta inmunológica de la sepsis, como un proceso en el que intervienen unos mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios. Todos estos mediadores actúan juntos para producir una respuesta final séptica, que puede ser diferente en los diferentes estadios evolutivos de la enfermedad.

En la respuesta inmunológica de la sepsis, los mediadores pro y antiinflamatorios tienen papeles beneficiosos que ejercer, pero ambos pueden ser potencialmente dañinos para el paciente. Es esta respuesta inmunológica compleja y variada, pudiendo ser excesiva, en términos de liberación de mediadores, o inadecuada, o disregulada, como ocurre en la respuesta celular ante estímulos activadores que suele estar francamente disminuída en pacientes críticamente enfermos (23).

Evolución de la respuesta inmune: Un microorganismo invasor, ya sea bacteriano, vírico o fúngico, es detectado por los sistemas de defensa del organismo, y se produce una liberación local de mediadores proinflamatorios, en un intento de eliminar la infección, y de promover la restauración de los tejidos dañados. Posteriormente, se liberan los mediadores antiinflamatorios para controlar la inflamación y restaurar un balance pro/antiinflamatorio. El grado y duración de la respuesta inmune varía, y algunos pacientes presentan más dificultades para restaurar dicho balance, o la homeostasis inmunológica, que otros, con el potencial riesgo de daño tisular, disfunción orgánica y muerte. No todos los pacientes con un insulto infeccioso grave desarrollarán shock séptico o fracaso multiorgánico; el porqué algunos pacientes desarrollan una respuesta sistémica excesiva y persistente, y otros no lo hacen, es aún incierto, pero puede ser debido a procesos subyacentes a la enfermedad, como factores genéticos que afecten a la situación inmune, mecanismos inmunoreguladores como la tolerancia a la endotoxina, o la cantidad y/o cualidad del insulto infeccioso (23).

### 1.3.1. ESTIMULOS QUE INICIAN LA CASCADA INFLAMATORIA

Cuando la inflamación se inicia por un proceso infeccioso, la presencia de microorganismos y de sus productos derivados (componentes de la membrana, toxinas liberadas, constituyentes intracelulares que se liberan con la lisis bacteriana) son potentes activadores de la producción de citoquinas. Los macrófagos son probablemente una de las mayores fuentes de citoquinas.

Entre los componentes derivados de las bacterias Gram-negativas, la endotoxina o lipopolisacárido, es el inductor de la respuesta inflamatoria mejor conocido. Durante la infección bacteriana por bacterias Gram-positivas, componentes de membrana tales como peptidoglicanos o el ácido lipoteicoico, son fuertes inductores de las citoquinas. Además, las exotoxinas, se comportan como superantígenos y disparan la liberación de citoquinas desde las células T. Una vez generadas, las citoquinas poseen la capacidad de perpetuar su propia producción (24).

A pesar de la gran heterogeneidad de las endotoxinas de diferentes bacterias Gram-negativas, todas tienen una estructura molecular similar compuesta por tres regiones mayores: la cadena lateral o antígeno O, la región del core y el lípido A. La porción lipídica de la endotoxina, el lípido A, es una molécula compleja constituida por residuos glicosaminos, asociados con ácidos grasos no hidroxilados, con una longitud de cadena de 12 a 16 átomos de carbono, siendo el componente biológicamente activo responsable de la toxicidad de la endotoxina (25).

Una vez que es liberada de la bacteria, la endotoxina rápidamente se une a varias proteínas plasmáticas, y la diferente naturaleza de esta unión, define la respuesta variable al LPS. La familia de glicoproteínas CD11b/CD18 puede unirse a la endotoxina, pero esta unión no resulta en la activación de los monocitos o macrófagos. Asimismo, se ha descrito que los fagocitos tienen un receptor *scavenger* al que se puede unir el LPS, tras lo cual sería internalizado el complejo ligando-receptor y degradada la molécula; no se ha demostrado



que dicha interacción resulte en una activación de los macrófagos, por lo que este receptor *scavenger* podría jugar un papel en la detoxificación de la endotoxina. Una proteína asociada a la membrana, de 73 kDa y que puede unir a la endotoxina, fue descrita inicialmente en esplenocitos murinos, y se ha descubierto que existe un análogo en monocitos humanos. Un anticuerpo monoclonal generado contra este receptor activaba a los macrófagos. Resulta interesante que este receptor no solo reconoce a la endotoxina, sino además al péptidoglicano del *Staphilococcus aureus*, sugiriendo la posibilidad de una vía final común para la activación de los monocitos por parte de los microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos. La última de las moléculas que unen la endotoxina, que ha sido identificada es el CD14. El CD14 es una glicoproteína de membrana, de 55kDa, originalmente clasificada como antígeno de diferenciación de la línea mielomonocítica. Está presente en monocitos, macrófagos y granulocitos desactivados, así como en líneas celulares tumorales maduras. El gen del CD14 ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma humano 5, una región que codifica diferentes factores de crecimiento y receptores tales como la interleuquina (IL)-3, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) entre otros. Se encontró que el CD14 está anclado a la membrana celular por un grupo fosfatidilinositol (GPI), por lo que su estímulo resulta en un aumento del calcio intracelular. El sistema de anclaje mediado por GPI, es su facilidad para su clivaje no proteolítico por fosfolipasas C o D. Se han detectado en orina y plasma, dos formas solubles del CD14, respectivamente de 53 y 48 kDa. Ambas formas se diferencian por la permanencia o no del grupo GPI, en función del tipo de fosfolipasa que hubiera actuado. Los niveles séricos de CD14 soluble se hallan elevados en pacientes con sepsis por Gram-negativos. Se ha demostrado que la liberación de las interleuquinas (IL) -1, IL-6, IL-8 y TNF por parte de los monocitos humanos tras la inducción con endotoxina, está mediada por el CD14 (25).

Existen también factores solubles que unen a la endotoxina y modulan sus efectos biológicos, tales como la LPS-binding protein (LBP) y la proteína incrementadora de la permeabilidad (BPI). La LBP es una proteína de 60 kDa presente en el suero de la reacción de fase aguda., y que comparte el 45% de su secuencia aminoacídica con la BPI, molécula

también de 60 kDa que se encuentra en los gránulos secretores de los neutrófilos. Ambas proteínas forman complejos de alta afinidad con el lípido A. Recientemente los genes del LBP y del BPI fueron localizados en la misma región del brazo largo del cromosoma humano 20, sugiriendo que son miembros de una misma familia de proteínas que se unen a la endotoxina (26).

La unión del LPS al LBP facilita su interacción con los macrófagos. Esta interacción ocurre a través de un receptor móvil en la membrana celular, que se ha identificado posteriormente como el CD14. La respuesta del macrófago a la endotoxina o al lípido A, medido por la producción *in vitro* de TNF, fue 1000 veces menor en un suero depleccionado en LBP, comparado con un suero normal (27).

La administración experimental de endotoxina en animales, reproduce la mayor parte de las manifestaciones clínicas del shock séptico: fiebre o hipotermia, leucocitosis o leucopenia, taquicardia, taquipnea, e hipotensión, hipoperfusión y disfunción orgánica. Además, se ha demostrado un papel para la endotoxina en el desarrollo del síndrome del distrés respiratorio agudo, la insuficiencia renal, la coagulopatía, las alteraciones del tracto gastrointestinal, páncreas, hígado y trastornos metabólicos asociados a la sepsis (25).

Existen múltiples estudios que determinan la endotoxemia en individuos en sépticos. Así Danner *et al* encontraron que el 43% de un grupo de 100 pacientes con shock séptico presentó endotoxemia detectable durante las primeras 24 horas del proceso séptico; además la endotoxemia se asoció a más episodios de insuficiencia renal y SDRA, aunque no se correlacionaron los niveles de endotoxina con la mortalidad (28). Nuestro grupo ha realizado un trabajo en el que estudiamos 81 pacientes con sepsis grave/shock séptico, observando una correlación significativa entre las concentraciones plasmáticas de endotoxina y el SDMO, aunque no se detectó una correlación con la mortalidad de los pacientes (29). Por tanto, la determinación plasmática de endotoxina, no ha demostrado en la clínica, ser un método útil para identificar a aquellos pacientes con mayor riesgo de muerte.

Se han realizado diferentes ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales antiendotoxina, dirigidos contra el lípido A (HA-1A), que no demostraron una disminución en la mortalidad de pacientes con sepsis por Gram-negativos, mientras sí que aumentaba la mortalidad de los pacientes sépticos sin bacteriemia demostrada por Gram-positivos (30).

### 1.3.2. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

Como hemos comentado previamente, la sepsis es la respuesta inflamatoria del organismo frente a la infección. Si la producción de citoquinas es un requisito para iniciar el proceso antiinfeccioso, su producción exacerbada durante la inflamación grave, puede contribuir a la aparición de fatales consecuencias. La capacidad de la interleuquina (IL)-1 y del factor de necrosis tumoral (TNF)- para inducir a los mediadores inflamatorios, contribuye a sus propiedades proinflamatorias. La IL-1 y el TNF- , activan las vías de la fosfolipasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa, produciendo la liberación de prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos, y factor activador plaquetario (PAF). Otros mediadores producidos por células diana en respuesta a la IL-1 y el TNF- , son los radicales libres (superóxido [O<sub>2</sub><sup>-</sup>], óxido nítrico [NO]), y enzimas proteolíticos. Otras citoquinas, incluyendo quimoquinas tales como la IL-8, o algunas citoquinas derivadas de las células T, también están involucradas en la cascada de las citoquinas. Diferentes aproximaciones experimentales han demostrado la contribución de las citoquinas proinflamatorias a los efectos dañinos observados en la sepsis. La inyección de citoquinas proinflamatorias obtenidas por recombinación genética, imitan algunos de los parámetros clínicos observados en el paciente séptico; y el uso de anticuerpos anticitoquinas, previene en modelos animales de sepsis, algunos de sus efectos deletéreos (24).

#### 1.3.2.1. Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

El TNF- , también llamado caquectina, es una proteína de 17 kDa constituida por 3 polipéptidos que forman un trímero compacto. Se produce fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a determinados estímulos como la endotoxina. Otras

células, como linfocitos, neutrófilos y células endoteliales, aunque en menor cantidad, también lo pueden secretar (31).

La toxicidad del TNF- $\alpha$  incluye, inestabilidad hemodinámica, fiebre, diarrea, acidosis metabólica, síndrome de fuga capilar, coagulación intravascular diseminada, hipoglicemia, inducción de un estado catabólico, neurotoxicidad, caquexia, alteraciones renales y hematológicas, y disfunción pulmonar aguda, todos ellos, fenómenos asociados con el síndrome séptico y la genesis del SDMO. Estos efectos los produce a través del estímulo de diferentes células diana. Induce la producción de citoquinas por parte del monocito, activa las células endoteliales produciendo un estado procoagulante mediante la inducción del factor tisular, regulación de la trombomodulina y producción del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI); incrementa la adhesión de los neutrófilos al endotelio mediante la producción de moléculas de adhesión (ICAM-1, ELAM-1); degranula al macrófago liberando radicales libres e induce la producción de IL-1 e IL-6 en las células endoteliales (24).

En estudios experimentales, el empleo de anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  ha logrado disminuir el grado de lesión inducido por la isquemia/reperfusión hepática o intestinal; igualmente su empleo ha demostrado aumentar la supervivencia en un modelo animal de fracaso multiorgánico inducido por zymosan (32). Sin embargo en humanos, el uso terapéutico de varios anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  ha resultado hasta el momento inefectivo (24).

Mientras estos datos indican que el TNF- $\alpha$  juega un papel importante en el proceso inflamatorio, ninguno demuestra que sea un mediador imprescindible. De hecho, en un modelo animal deficiente en TNF- $\alpha$ , la mortalidad inducida por la endotoxina, resultó similar a la de los animales control (33).

### **1.3.2.2. Interleuquina-1**

Está constituida por 2 polipéptidos, la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . La mayor parte de la IL-1 se encuentra a nivel citosólico, funcionando como mensajero autocrino y yuxtacrino. La IL-

IL-1 es secretada al exterior, siendo el tipo predominante de IL-1 que se encuentra circulando en diferentes patologías. Es una proteína de 17 kDa sintetizada fundamentalmente por monocitos, aunque también la producen neutrófilos, linfocitos y células endoteliales. Existen dos tipos de receptores de IL-1 en la superficie celular; el tipo 1 (IL-1R1) presente en las células T y en los fibroblastos, y el receptor tipo 2 (IL-1R2). El IL-1R1 sería responsable de la traducción de casi todos los efectos celulares de la IL-1(34).

La inyección de IL-1 en animales, resulta en hipotensión, aumento del gasto y de la frecuencia cardíaca, leucopenia, trombocitopenia, hemorragias, edema pulmonar asociado a lesión del endotelio vascular pulmonar, acidemia láctica, lesiones histopatológicas en el córtex suprarrenal. Sus efectos biológicos son muy similares a los del TNF- $\alpha$ , actuando de forma sinérgica con esta citoquina. Actúa como factor quimiotáctico de neutrófilos, monocitos y linfocitos, a través de la inducción de diferentes quimioquinas como la IL-8, modulando moléculas de adhesión, e induciendo la producción de factor activador de las plaquetas (PAF) (24).

El antagonista del receptor de la IL-1, es un inhibidor natural de la IL-1, y el tratamiento de un modelo animal de shock endotóxico con IL-1ra redujo su mortalidad, así como también mejoró la supervivencia de otro modelo de shock séptico inducido por *Escherichia coli*. De acuerdo con esto, los ratones deficientes en IL-1ra, son más susceptibles que los controles a la endotoxemia letal. La enzima convertidora de la IL-1 (ICE), o caspasa-1, es un enzima requerido para la maduración del precursor inactivo de la IL-1 en su forma activa. La supervivencia a una dosis letal de endotoxina alcanzó el 70% entre los animales deficientes en ICE. Por otro lado, los ratones deficientes en IL-1 presentaron una sensibilidad normal al efecto letal del LPS. Este último resultado sugiere que, en ratones, la IL-1 podría solapar el rol de la IL-1 (35).

### 1.3.2.3. Interleuquina-6

La IL-6 es una glicoproteína de 30 kDa producida por diferentes tipos de células, incluyendo fibroblastos, monocitos, linfocitos y células endoteliales. Actúa sobre las

células diana a través de un receptor dimérico específico de carácter proteico. Durante largo tiempo se la ha considerado como una citoquina proinflamatoria, ya que es secretada en grandes cantidades tras el TNF y la IL-1, después de la inducción con LPS o durante infecciones agudas. Participa en la síntesis de reactantes de fase aguda en el hígado, interviene en la diferenciación de los linfocitos B y en la producción de inmunoglobulinas; activa a los linfocitos T y modula la hematopoyesis; además puede activar la coagulación; su inyección experimental no reproduce un estado sistémico similar a la sepsis (36).

Diferentes autores han demostrado que los niveles de IL-6 circulantes se correlacionan con la severidad de la sepsis, pudiendo incluso predecir la supervivencia. Aunque tradicionalmente se ha considerado a la IL-6 como una citoquina proinflamatoria, la mayoría de sus acciones están relacionadas con un control negativo de la infección, por lo que la estudiaremos más adelante en profundidad.

#### **1.3.2.4. Interleuquina-8**

Es una proteína de bajo peso molecular secretada por diferentes estirpes celulares, como fibroblastos, células endoteliales, monocitos y polimorfonucleares. El LPS, la IL-1 y el TNF, son los principales inductores de su síntesis. Actúa como factor quimiotáctico y activador neutrofílico, amplificando la respuesta inflamatoria a nivel local. Su administración experimental no produce las manifestaciones típicas de un estado séptico.

La sepsis grave se asocia frecuentemente a la disfunción orgánica, un reflejo del proceso inflamatorio que ocurre en los tejidos. Uno de las razones de este fenómeno es el reclutamiento de leucocitos activados, la adherencia de células circulantes al endotelio, y su respuesta a las quimoquinas producidas localmente. Las células endoteliales responden de forma importante al estímulo de la IL-1 y del TNF; en términos de expresión de moléculas de adhesión y expresión de factor tisular, así como de producción de citoquinas. Una vez inmovilizados en el endotelio, los leucocitos migran a través de los tejidos, en respuesta a la IL-8 y a las otras quimoquinas. Así, estos mediadores, favorecen el infiltrado celular inflamatorio que contribuye a la pérdida de la integridad tisular.

Se ha demostrado que la neutralización de la IL-8 inhibe de forma importante el reclutamiento de neutrófilos en un modelo de pleuritis en conejos, inducida por LPS. Durante la sepsis, se detectan niveles elevados de IL-8 en el espacio intravascular, no solo como una citoquina libre, sino también en una forma asociada a las células. Se ha postulado que la presencia de IL-8 en el espacio vascular puede ser un mecanismo para limitar la acumulación de neutrófilos en focos extracelulares (24).

#### **1.3.2.5. Interferón (IFN)- $\gamma$**

Los efectos inducidos por el IFN- incluyen taquicardia, mialgias, leucopenia, y debilidad. Su sinergia con las acciones dañinas del LPS han sido claramente establecidas: el IFN- aumentó la mortalidad inducida por el LPS, y también aumentó los niveles de TNF- circulante inducidos por el LPS. Consecuentemente, anticuerpos anti-IFN- resultaron protectores frente a la mortalidad inducida por LPS y por *Escherichia coli*(37).

El IFN- es un mediador de la letalidad inducida por LPS, ya que dosis subletales de TNF- e IFN- , cuando se inyectan simultáneamente, producen una mortalidad del 100% en ratones. Además anticuerpos anti-IFN- protegieron al 25% de los ratones que recibieron una dosis letal 100 de TNF- (38).

#### **1.3.2.6. Interleuquina-12**

Entre sus efectos adversos de la IL-12, se han reportado la esplenomegalia, leucopenia, anemia y mielodepresión. Estos fenómenos parecen depender del IFN- , ya que no han sido comunicados en ratones deficientes en el receptor del IFN- . La hepatomegalia se asocia a una infiltración de macrófagos y células natural killer (NK) activadas. En contraste, el edema pulmonar y el infiltrado intersticial por macrófagos generado por la inyección de IL-12 ha demostrado ser independiente del IFN- (39)

### **1.3.2.7. Factor inhibidor de la migración del macrófago (MIF)**

Recientes investigaciones sobre factores derivados de la pituitaria resultaron en el redescubrimiento de una citoquina ya conocida, el factor inhibidor de la migración del macrófago (MIF). La inyección de MIF junto con una dosis letal 40 de LPS aumentaba de forma significativa la mortalidad; asimismo, estudios con anticuerpos anti-MIF protegieron al 100% de los animales del estudio contra una dosis letal 50 de LPS. Se ha descrito, que el MIF actúa contrarregulando los efectos inhibitorios de los glucocorticoides en la producción de citoquinas inflamatorias. Recientemente se ha demostrado que el MIF se expresa de forma constitutiva en muchos tejidos, incluyendo pulmón, hígado, riñón, bazo, glándula suprarrenal, y piel. El MIF existe como una citoquina preformada que es rápidamente liberada tras la inoculación de LPS (40).

### **1.3.2.8. Factor inhibidor de la leucemia (LIF) y Oncostatina M (OSM)**

El factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la oncostatina M (OSM), pertenecen a la superfamilia de la IL-6, con la que comparten la cadena gp130 del receptor. El LIF está involucrado en la patogénesis de la inflamación y del síndrome séptico(41). Se produce tras la activación del LPS y TNF, y puede por sí mismo inducir la liberación de otras citoquinas, incluyendo la IL-1, IL-6 e IL-8. Los niveles plasmáticos de LIF y OSM, se encuentran elevados en pacientes sépticos. La inyección subcutánea de OSM en ratones, causa una reacción inflamatoria aguda. La OSM favorece la adhesión de los PMN a las células endoteliales y la transmigración, a través de su capacidad de aumentar la expresión de P- y E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (42).

## **1.3.3. CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS**

Existe un gran cuerpo de evidencia derivado de estudios realizados en animales y humanos, que apoya el concepto de que la sepsis está causada por una respuesta proinflamatoria incontrolada. La inyección sistémica de LPS, o de exotoxinas de cocos



Gram-positivos (CGP), estimula la producción de mediadores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$ , y la IL-1. La neutralización de estas citoquinas se ha asociado con la protección de las mismas ante la muerte, en modelos animales seleccionados. Durante la pasada década, se realizaron unos 20 ensayos clínicos en fases II y III de agentes antiinflamatorios, no corticoideos. Estos estudios con terapias basadas en anticuerpos monoclonales contra el TNF, receptores solubles del TNF, antagonistas del receptor de la IL-1, bradiquinina y PAF, y prostaglandinas, han obtenido resultados desesperanzadores. Entre las posibles causas del fracaso se incluyen la falta de actividad de los agentes empleados, el diseño inapropiado del ensayo, el *timing* en su uso, el hecho de que bloquear a sólo una molécula no sea suficiente, y se cuestiona la hipótesis fundamentada sólo en la fase proinflamatoria (43).

Durante el curso de la sepsis, los pacientes también desarrollan una respuesta antiinflamatoria, algunas veces denominada como Síndrome de Respuesta Anti-Inflamatoria Compensatoria (CARS). Diferentes estudios han demostrado que los monocitos de los pacientes sépticos, se vuelven hiporespondedores en la fase postaguda del shock séptico. Estas observaciones dan soporte al concepto de que esta respuesta antiinflamatoria puede desactivar a los monocitos, y llevar a un estado de inmunoparálisis (44).

Aunque establecer una dicotomía entre citoquinas pro y antiinflamatorias pueda ser demasiado simplista, ya que muchas citoquinas pueden ejercer ambas acciones, veamos a continuación unos apuntes sobre las principales citoquinas antiinflamatorias, definidas como aquellas moléculas que inhiben la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF e IL-1 (45).

### **1.3.3.1. Interleuquina-4**

La IL-4 es una citoquina de 18 kDa producida por las células T activadas, por los mastocitos y por los basófilos. El gen de la IL-4 está localizado en el cromosoma humano 5, región que también contiene los genes de la IL-3, IL-5, IL-13 y GM-CSF. La proteína

madura consta de 129 aminoácidos. Como la mayoría de las citoquinas, la IL-4 actúa sobre una variedad de células que expresan un receptor de alta afinidad para ella, el IL-4R. Este receptor es un heterodímero formado por una cadena de 140 kDa que une específicamente a su ligando, y una cadena de señalización, también llamada cadena común ( $\gamma$ ), que es compartida con otras citoquinas como la IL-2 e IL-7. La actividad de la IL-4 es fundamentalmente antiinflamatoria, suprimiendo la producción de diferentes moléculas proinflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1 y metaloproteinasas. Aunque también tiene alguna función como componente de la fase tardía de la reacción inflamatoria, favoreciendo el desarrollo de linfocitos CD4<sup>+</sup> T helper, estimulando precursores hematopoyéticos, y ejerciendo efectos estimuladores en células que contribuyen a la inflamación, como los macrófagos, células endoteliales y fibroblastos (46).

### 1.3.3.2. Interleuquina-6

Como hemos mencionado previamente, la IL-6 se ha venido considerando una citoquina proinflamatoria, hasta que estudios recientes, han asociado sus actividades con un control negativo de la inflamación. Así, se ha descrito que la IL-6 induce la liberación de IL-1ra y de receptores solubles del TNF. La IL-6 inhibe la síntesis de IL-1 y de TNF, inducida por el LPS, y es el mayor inductor de la respuesta de fase aguda con potencial antiinflamatorio. Su más potente actividad antiinflamatoria, está unida a su capacidad para inducir la liberación de proteínas de fase aguda. Resulta interesante el hecho de que el IL-1ra ha sido recientemente identificado como un producto de los hepatocitos, cuya producción está regulada por las proteínas de fase aguda. La proteína C reactiva, la  $\alpha_1$ -antitripsina, y la  $\alpha_1$ -glicoproteína, inducen la IL-1ra. Se ha demostrado que estas proteínas de fase aguda pueden limitar el proceso inflamatorio, proteger contra la endotoxina del meningococo, e incluso inhibir una respuesta letal al TNF. Todos estos resultados pueden explicar, porqué la IL-6 ha demostrado ser protectora en modelos de infección y de shock séptico. Experimentos realizados en ratones deficientes en IL-6, o en ratones tratados con anticuerpos anti-IL-6 o con IL-6 recombinante, han mostrado que la IL-6 es necesaria para curar infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria*

*monocytogenes* o *Mycobacterium tuberculosis*. Por todo esto, se ha reconsiderado a la IL-6 como una citoquina fundamentalmente antiinflamatoria (47).

### 1.3.3.3. Interleuquina-10

La IL-10 es producida por linfocitos T, monocitos/macrófagos y células B. Esta interleuquina exhibe importantes propiedades inmunosupresoras, aunque también algún efecto inmunoestimulador, como aumentar la expresión de complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) de clase II, en las células B, y favorecer la proliferación y diferenciación de las células B activadas. Fundamentalmente, la IL-10 es una potente molécula antiinflamatoria, que suprime la respuesta inmune mediada por células, e inhibe la proliferación de células T dependiente del macrófago y la producción de citoquinas por parte del macrófago activado, neutrófilo, y células natural killer (NK). La IL-10 inhibe la mayoría de citoquinas involucradas en la respuesta inmune, incluyendo TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, G-CSF, proteína inflamatoria del macrófago (MIP)-1, MIP-1, IL-2, IL-3 e IFN- $\gamma$ ; es el prototipo de molécula antiinflamatoria. El mecanismo preciso de su acción antiinflamatoria está aún poco definido, habiéndose propuesto mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. Así se ha visto que inhibe la localización nuclear del factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) en monocitos estimulados por LPS o TNF. Además la IL-10 promueve la degradación de mRNA de TNF e IL-1. También se encarga la IL-10 de disminuir la expresión en la superficie celular, de receptores para el TNF, y aumenta los receptores solubles para el mismo. En modelos *knockout* de ratones deficientes en IL-10, no se generaba una producción espontánea de citoquinas, pero una vez estimulados, los niveles de sus citoquinas proinflamatorias eran mayores (45).

### 1.3.3.4. Interleuquina-13

Es una interleuquina descrita recientemente, de la familia de la IL-4, producida por las células T activadas (células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), que actúan sobre células B y sobre monocitos. La IL-13 comparte muchas de sus actividades biológicas con la IL-4, siendo generalmente menos potente que ella; esto puede ser debido a que ambas interleuquinas

compiten por el receptor de alta afinidad IL-4R . En contraste a la IL-4, la IL-13 no activa a las células T, ni inhibe la proliferación de células T inducida por la IL-4. La IL-13 es un potente inmunomodulador de las funciones del monocito/macrófago, afectando a la morfología celular, la expresión de moléculas de superficie, y la producción de citoquinas. Sobre los monocitos exhibe efectos duales, estimulando la expresión de diferentes integrinas y complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) clase II, pero disminuyendola expresión de CD14, CD64, CD32 y CD16. Al igual que la IL-10 y la IL-4, al IL-13 inhibe la producción de las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10), quimoquinas (IL-8 y MIP-1 $\alpha$ ) y de factores de crecimiento hematopoyéticos (GM-CSF y G-CSF) de monocitos/macrófagos estimulados por LPS. Los efectos de IL-13 e IL-4, se mantienen incluso en presencia de anticuerpos anti-IL-10, indicando que sus efectos no están mediados por la IL-10 (48).

#### **1.3.3.5. Antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra)**

El IL-1ra es el tercer miembro de la familia de la IL-1. Mientras la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son agonistas, el IL-1ra es un antagonista específico de su receptor. El IL-1ra existe en diferentes formas; IL-1ra soluble, IL-1raI intracelular y el IL-1raII intracelular, que son solubles o citoplásmicos, constitutivos e inducibles. El IL-1ra es inducido por bacterias, virus, hongos, así como por las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF. El IL-1ra compete con el IL-1 por unirse a los receptores de la IL-1, resultando finalmente en una fuerte inhibición de la estimulación celular mediada por la IL-1. El IL-1ra no dispara ninguna señal biológica, incluso cuando se inyecta en concentraciones  $10^6$  veces mayores que aquellas de la IL-1. Desafortunadamente, dos grandes ensayos clínicos en fase III de IL-1ra llevados a cabo en pacientes con shock séptico, no han confirmado la reducción de la mortalidad dosis-dependiente observada en uno de los estudios en fase II (49).

#### **1.3.3.6. Transforming Growth Factors-Beta (TGF- $\beta$ )**

Esta familia de citoquinas está compuesta de cinco isoformas, de las que tres, las TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2 y TGF- $\beta$  3, son expresadas en mamíferos. Macrófagos, linfocitos T y B,

células endoteliales, plaquetas, fibroblastos, astrocitos, osteoblastos y osteoclastos, son fuentes celulares de los TGF- $\beta$ . Estas, regulan el crecimiento y diferenciación de diferentes tipos celulares, y juegan un importante papel en la inflamación, en la respuesta inmune y en la reparación tisular. El TGF- $\beta$  se caracteriza por ejercer ambas acciones, proinflamatoria e inmunosupresora, promoviendo la respuesta inmune e inflamatoria a nivel tisular, mientras actúa como inmunosupresor a nivel sistémico. Es liberada como respuesta a la lesión tisular y a la inflamación, estimula la quimiotaxis de los leucocitos, mastocitos y fibroblastos, e induce la producción de mediadores proinflamatorios. El TGF- $\beta$  fue una de las primeras citoquinas de las que se describió una acción desactivadora de los monocitos y macrófagos, y dicha evidencia se estableció definitivamente en un modelo animal deficiente en el gen del TGF- $\beta$ . Dichos ratones expresaban múltiples focos inflamatorios, que sobreexpresaban múltiples interleuquinas proinflamatorias. El mecanismo por el que el TGF- $\beta$  inhibe al TNF y a la IL-1, es diferente al que emplea la IL-10, ambos actúan a nivel postranscripcional, pero mientras la IL-10 degrada el mRNA preformado, el TGF- $\beta$  interfiere en el mecanismo de translación proteica (50).

### 1.3.3.7. Receptores solubles del TNF

Como hemos visto, el TNF es uno de los pivotes de la respuesta inflamatoria. Su actividad biológica está mediada a través de dos receptores presentes en las células diana, el TNF-R1, y el TNF-R2. Ambos receptores son clivados de la membrana celular una vez que la célula ha sido activada, y circulan como moléculas solubles. Ambos receptores solubles son inhibidores naturales del TNF que poseen dos funciones. Por un lado, su liberación desde la membrana celular, provoca que estas células se hallen desensibilizadas transitoriamente; por otro lado, estos receptores solubles unen al TNF circulante. Por las dos vías referidas se produce una inhibición de la actividad biológica inflamatoria del TNF. Como efecto deletéreo, es que pueden prolongar la actividad del TNF, permitiendo al complejo TNF-receptor disociarse tardíamente, en el curso de la enfermedad. Excepto para el TNF-R1, TNF-R2, IL-1ra y posiblemente la IL-10, es difícil determinar si las propiedades antiinflamatorias de estos mediadores, exceden los procesos proinflamatorios que son capaces de accionar durante la sepsis (51).

¿Una dicotomía demasiado simple?: Los eventos que ocurren durante la compleja fisiopatología de la sepsis y el shock séptico, no pueden ser tan simples como una interrelación entre factores pro y antiinflamatorios. En primer lugar, existe una información genética que contribuye a la heterogeneidad de la respuesta inflamatoria en los humanos. Se han descrito polimorfismos genéticos para muchas de las citoquinas pro y antiinflamatorias; además, existen otros polimorfismos que regulan la diferente respuesta una vez que la citoquina se ha unido a la célula diana. Mientras un exceso de citoquinas proinflamatorias puede ser dañino e incluso mortal, cuando se estudian modelos animales, estas mismas citoquinas, son esenciales en la iniciación de la respuesta antiinfecciosa. Incluso estas mismas citoquinas presentan una acción antiinflamatoria. Así, en un modelo *in vitro*, el TNF puede prevenir la producción de NO iniciada por el IFN- $\gamma$ . La dosis de citoquina liberada también puede influenciar su actividad, así bajas concentraciones de IL-12 exacerbaron la enfermedad en un modelo de artritis, mientras que a altas concentraciones se comportó como una citoquina antiinflamatoria. Interleuquinas consideradas habitualmente antiinflamatorias, como la IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$ , pueden mostrar propiedades proinflamatorias, en función de la naturaleza de la célula diana, la naturaleza del estímulo que la célula ha recibido, la secuencia de eventos bioquímicos y la naturaleza de los factores microambientales. Ejemplos de esto son los siguientes: La IL-4 inhibe la producción de IL-8 inducida por el LPS sobre los macrófagos, pero estimula la producción de IL-8 por las células endoteliales. La IL-6, por su parte, puede inducir el estímulo de los neutrófilos para la producción del factor activador plaquetario (PAF) y de aniones superóxido. La inyección de un adenocarcinoma que exprese el gen de la IL-10 resulta en un mayor grado de inflamación local, comparado con el adenocarcinoma sin IL-10. Igualmente, la IL-10 indujo la expresión de E-selectina en las células endoteliales de pequeño y gran vaso. Otro ejemplo de la discordancia entre el dogma y la realidad es que, mientras una inyección de LPS en voluntarios humanos, al final de una infusión de cortisol, no produjo niveles circulantes de TNF, sin embargo, la misma inyección de LPS 14-144 horas tras la infusión de cortisol, produjo una elevación de TNF y de IL-6 por encima de los niveles de los voluntarios no tratados con cortisol (52).

La literatura se va enriqueciendo progresivamente de datos como los referidos, que ilustran nuestro desconocimiento sobre el tema; tenemos mucho que aprender, hasta que podamos comprender los mecanismos profundos de la sepsis, y mientras tanto debemos ser muy cautelosos cuando analicemos la respuesta inflamatoria, e ir añadiendo nuestra aportación a este tema que nos fascina.

#### **1.3.4. VÍA DE LA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO**

En 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron que el endotelio poseía y liberaba una sustancia con efectos vasodilatadores que denominaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF). En 1987, los grupos de Palmer e Ignarro, identifican el EDRF como el óxido nítrico (NO). Desde entonces el NO se ha implicado en múltiples procesos fisiológicos, así como se ha visto involucrado en la fisiopatología de las más variadas enfermedades, desde las relacionadas con la neurotransmisión, la modulación inmunológica, o las implicadas en la agregación plaquetaria.

El NO es una molécula gaseosa, muy liposoluble, con una vida media muy corta. Se sintetiza a partir del nitrógeno del grupo guanidino-terminal de la molécula de L-arginina, por la acción de una enzima NO-sintetasa (NOS), dando lugar a NO y L-citrulina. El NO así formado, reacciona rápidamente con el O<sub>2</sub> para formar N O<sub>2</sub>, que se degradará posteriormente a nitritos y nitratos. Se han descrito dos enzimas NO sintetasa; una enzima constitutiva, presente en condiciones normales en las células endoteliales y neuronales (cNOS), y una enzima inducible (iNOS) sintetizada por diferentes estirpes celulares tras un estímulo inmunológico.

La síntesis de NO a través de la cNOS, es Ca<sup>+2</sup>-calmodulina dependiente y produce pequeñas cantidades de NO durante periodos cortos de tiempo. Es activada por la acción de sustancias como la acetilcolina o la bradiquinina, o por efectos del flujo sanguíneo sobre las células endoteliales. El NO producido por las isoformas cNOS, activa la guanidilciclasa, generando GMP cíclico, que será el responsable de la acción final de NO. Entre las

diferentes funciones fisiológicas que ejerce el NO en el organismo se encuentran las siguientes: regula el tono vascular, siendo responsable del control de la tensión arterial, como un mecanismo de vasodilatación activa continuado; en el SNC y periférico, estaría implicado en la neurotransmisión no colinérgica, no adrenérgica, también llamada nitrérgica. Es responsable además, de la actividad citotóxica de los macrófagos, actuando como regulador de la función linfocitaria. Además, se ha demostrado que inhibe la adhesión y agregación plaquetaria (53).

En presencia de endotoxina y de algunas citocinas, se induce la iNOS por parte de diferentes estirpes celulares, entre otras: macrófagos, hepatocitos, células de la musculatura lisa, fibroblastos, células endoteliales y astrocitos. Esta forma inducible de NOS, es  $Ca^{+2}$ -calmodulina independiente, y libera grandes cantidades de NO. El NO producido por esta vía, activa también la guanilato ciclasa, pudiendo además activar o inhibir otros sistemas enzimáticos. En la sepsis se ha implicado al NO en múltiples fenómenos patológicos: es responsable de la hipotensión y de la hiporreactividad a los fármacos vasoconstrictores que se produce en el shock séptico, pudiendo ser revertida por análogos de la L-arginina. Su acción es también importante como antiagregante plaquetario, y leucocitario sobre el endotelio, disminuyendo la permeabilidad capilar, y previniendo el paso de los leucocitos a los tejidos. A concentraciones elevadas puede actuar como radical libre, inhibiendo la respiración mitocondrial y la síntesis de ADN, resultando tóxico para macrófagos y células endoteliales (53).

### **1.3.5.FACTOR ACTIVADOR PLAQUETARIO (PAF)**

El factor activador plaquetario (PAF), es un mediador fosfolipídico, que es liberado por diferentes estirpes celulares, incluyendo plaquetas, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales, en respuesta al estímulo de diferentes citoquinas, entre ellas la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los datos experimentales apoyan que el PAF es un mediador importante en múltiples procesos patológicos, entre los que se encuentran la lesión de isquemia-reperfusión, el SDRA, el shock séptico y el síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) (54).



De forma similar a la endotoxina, su administración sistémica remedia los cambios hemodinámicos característicos del shock séptico, induciendo además depresión miocárdica, insuficiencia renal, leucopenia, coagulación intravascular diseminada, trombocitopenia, y otras alteraciones metabólicas. Estudios en animales y en humanos con sepsis, demuestran niveles elevados de PAF, tanto en suero como en pulmón y riñón. Aunque el PAF tiene efectos directos sobre muchos tipos celulares, tales como las plaquetas o las células miocárdicas, muchos de los fenómenos inducidos por el PAF, son causados por la liberación de mediadores secundarios que incluyen al tromboxano A<sub>2</sub>, al leucotrieno B<sub>4</sub> y a los cisteinil-leucotrienos (55).

El PAF es sintetizado por dos rutas: una vía *de novo* que mantiene los niveles fisiológicos de PAF en las células en reposo, y es la única vía significativa para la síntesis de PAF en el riñón. Esta vía opera en ausencia de estímulos específicos, y no resulta activada por agentes inflamatorios; además esta vía no estimula la síntesis de eicosanoides. La segunda ruta es la del remodelado, es la principal ruta por la que el PAF es sintetizado para mediar en la inflamación, y es la única ruta significativa para la síntesis de PAF en las células endoteliales; es estimulada por los agentes inflamatorios e induce la producción de eicosanoides (55).

La mayoría de los órganos que participan en el SDMO, poseen células capaces de sintetizar PAF. Así en el pulmón, los neumocitos tipo II, neutrófilos marginales y macrófagos alveolares; en el riñón, son las células glomerulares; el endotelio gastrointestinal también sintetiza PAF, además de todas las células inflamatorias ya estén circulantes, o hayan invadido tejidos, incluyendo estas células inflamatorias a granulocitos, monocitos, macrófagos, mastocitos y plaquetas (56).

Los estímulos que inducen la formación del PAF son múltiples y variados, incluyendo: TNF, IL-1, IL-6, trombina, leucotrienos, bradiquinina, histamina, ATP y peróxido de hidrógeno. El PAF estimula a los neutrófilos a producir más PAF, generando una retroalimentación positiva (55).

La respuesta y activación de las células inflamatorias ante el estímulo que constituye el PAF, está mediado por altas dosis del mismo. Los neutrófilos estimulados por el PAF, se adhieren a las células endoteliales, participando en la quimiotaxis, se degranulan y liberan metabolitos tóxicos del oxígeno. Esta quimiotaxis neutrofílica puede ser inhibida por antagonistas del PAF. Los macrófagos y monocitos son estimulados por el PAF para liberar TNF, IL-1 y eicosanoides. Las plaquetas son estimuladas por el PAF para liberar histamina y serotonina. Bajas concentraciones de PAF, no generan estas respuestas celulares, pero “priman” a dichas células inflamatorias para responder de forma más vigorosa a los estímulos activadores (54). Como vemos, la denominación de Factor Activador Plaquetario, que recibió inicialmente esta molécula lipídica en función de sus primeras características descritas, es actualmente inexacta, ya que ni es la plaqueta su principal productor, ni es la plaqueta la única de las células diana sobre las que actúa.

La infusión de PAF, induce hipotensión sistémica en los modelos animales, por diferentes mecanismos, vasodilatación arterial que resulta en disminución de las resistencias vasculares periféricas, y directamente sobre el miocardio, por un fenómeno de vasoconstricción coronaria y depresión de la contractilidad miocárdica. Al igual que el PAF, la endotoxina también induce hipotensión sistémica; los antagonistas del PAF atenuan la hipotensión y la fuga capilar inducida por la endotoxina, y disminuyen la mortalidad asociada al shock endotóxico, implicando que al menos parte del shock inducido por la endotoxina, está mediado por el PAF.

El empleo de antagonistas del PAF (SRI 63-675, WEB 2086) en modelos animales de sepsis, han aportado una protección parcial y/o transitoria contra algunas de las alteraciones cardiovasculares o pulmonares inducidas por el LPS. En un reciente ensayo clínico con un antagonista del PAF (BN52021) en pacientes con sepsis grave, la mortalidad fue del 51% en el grupo placebo, y del 42% en el grupo en tratamiento ( $p=0.17$ ) (56).

### **1.3.6.INTERACCIÓN ENTRE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS SISTÉMICOS Y EL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN/FIBRINOLISIS**

La sepsis se asocia a una alteración de la coagulación y fibrinólisis, con el desarrollo potencial de agregados de fibrina, trombos en la microvasculatura y coagulación intravascular diseminada (CID). Además, la coagulopatía de consumo que ocurre en una CID incontrolada, puede precipitar una diátesis hemorrágica como consecuencia de los factores de la coagulación consumidos. Mientras una CID clínicamente establecida ocurre en un mínimo porcentaje de pacientes sépticos, determinaciones de marcadores sensibles de la activación de la coagulación, evidencian que algún grado de coagulación ocurre en casi todos los pacientes en shock séptico (57).

Diferentes productos microbianos, así como citoquinas proinflamatorias producidas por el huésped, son potenciales inductores del sistema de la coagulación. Voluntarios humanos que recibieron de forma intravenosa, cantidades pequeñas de endotoxina bacteriana o de TNF, presentaron diferentes grados de activación de la cascada de la coagulación. Se ha especulado con que la activación incontrolada del sistema de la coagulación durante la inflamación generalizada en la sepsis, contribuye a la fisiopatología de la sepsis. Los microtrombos son frecuentemente encontrados en la sepsis, y el paro circulatorio con el consecuente daño tisular, y disfunción orgánica, pueden considerarse un resultado de la activación de la coagulación. En los pacientes sépticos, la microcirculación frecuentemente exhibe evidencia de hipoperfusión regional de los lechos capilares, resultando en isquemia tisular y disfunción multiorgánica (58).

La inhibición del sistema de la coagulación ha sido considerada una potencial estrategia terapéutica contra la sepsis. Sabemos hoy en día, que no sólo los mediadores de la inflamación sistémica activan el sistema de la coagulación, sino que dicha activación del sistema de la coagulación puede inducir *per se* la liberación de mediadores inflamatorios sistémicos. Parece que sería posible atenuar la respuesta inflamatoria generalizada del huésped al estímulos séptico, a través de la regulación del sistema de la coagulación.

Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos controlados, con el fin de intentar demostrar esta hipótesis (59).

Se ha demostrado fehacientemente, que la vía extrínseca de la coagulación, es la primariamente responsable de la activación de la coagulación en las fases tempranas de la sepsis. El complejo formado por el factor VII y el factor tisular, cataliza la activación del factor X, activando de esta forma la cascada de la coagulación para generar trombina y fibrina. Los componentes de la vía intrínseca de la coagulación, forman una amplificación secundaria que aumenta el potencial procoagulante (60).

La vía intrínseca de la coagulación, consiste en los factores de contacto: el factor de Hageman (factor XII), factor XI, precalicreína, y quininógeno de alto peso molecular. El sistema del contacto puede ser activado con altas dosis de endotoxina, y puede secundariamente contribuir a la activación de la coagulación en la sepsis. Sin embargo la administración de anticuerpos neutralizadores del factor XII, no afecta al desarrollo de CID a continuación de una infusión de *Escherichia coli*. A pesar de esta aparente ineficiencia de la vía intrínseca de la coagulación, el sistema de contacto, parece inducir muchas de las alteraciones hemodinámicas observadas en la sepsis. Esto puede estar relacionado con la generación de bradiquinina desde quininógeno de alto peso molecular, o a través de la activación de otras vías tales como la del óxido nítrico (NO) o de la prostaciclina. El sistema de contacto contribuye además a la activación del sistema fibrinolítico (61).

Las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6, incrementan la expresión de factor tisular, e inhiben la síntesis de la trombosmodulina, la cual es esencial para la activación de la proteína C, un inhibidor de la coagulación. Las citoquinas proinflamatorias, además, activan la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). El sistema fibrinolítico es rápidamente activado en la sepsis, primariamente a través de la activación de la vía intrínseca de la coagulación, y posteriormente a través de las citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, la rápida activación del plasminógeno, es subsecuentemente inhibida por la generación del PAI-1. El resultado final, es una situación disregulada, en la

que la activación de sistema de la coagulación no está controlado por el sistema fibrinolítico, generando un estado procoagulante (61;62).

La activación y degranulación del neutrófilo, libera elastasa y radicales oxidantes, que destruyen la trombomodulina, e inhiben a la antitrombina III y al inhibidor del C1. El inhibidor del C1, no sólo regula la activación de la vía clásica del complemento, sino que también inhibe a diferentes componentes del sistema de contacto, particularmente al factor XII y a la precalicreína. La pérdida del inhibidor del C1 resulta en un estado procoagulante (63).

La respuesta de las proteínas de fase aguda, también resulta en un estado procoagulante. La alfa-1-antitripsina es un potente inhibidor de la proteína C activada. La proteína C reactiva (PRC), promueve la expresión del factor tisular por parte de las células mononucleares. El factor tisular es el activador inicial de la vía extrínseca de la coagulación. La PRC también se ha visto que puede activar la vía del complemento, generando anafilotoxinas(C3a, C5a), activando neutrófilos y monocitos, induciendo la síntesis de citoquinas, y promoviendo las interacciones celulares neutrófilo-endotelio. La activación del complemento, también aumenta la superficie de exposición de la fosfatidilserina en la superficie de las células endoteliales, lo cual es un importante estímulo procoagulante (61).

Ha sido demostrado de forma repetida, que la generación de trombina en la circulación sistémica, es un evento con numerosas secuelas proinflamatorias. La trombina promueve la agregación plaquetaria en la microcirculación tisular. Las plaquetas activadas, expresan P-selectina, como también lo hacen las células endoteliales expuestas a la trombina. La P-selectina, es el mediador principal del proceso de “rolling” de los leucocitos sobre las células endoteliales, y es fundamental para la unión de las células blancas al endotelio. La glicoproteína-ligando tipo I que unirá a la P-selectina, se expresa en los neutrófilos, y específicamente une a la P-selectina en las superficies endotelial y plaquetar. La expresión de P-selectina inducida por la trombina, en la superficie de las células endoteliales y de las plaquetas, contribuye aún más a generar una lesión microvascular

difusa en la sepsis, a medida que los leucocitos se van activando, y se adhieren a los capilares y a las vénulas postcapilares. Recientemente, se ha demostrado que la P-selectina se puede unir al LPS, lo cual puede incrementar las concentraciones locales de LPS en la microcirculación. La liberación de enzimas líticos desde los neutrófilos activados, contribuye también a la lesión endotelial difusa y al compromiso vascular en la sepsis. La trombina también se ha demostrado como inductor de un potente vasoconstrictor, la endotelina-1, que vendría a complicar aún más el flujo sanguíneo, por unos capilares parcialmente trombosados. La suma de todos estos mecanismos, y otros aún por describir, llevarían al paro circulatorio (*circulatory arrest*), que subyace a la disfunción orgánica en la sepsis (64-66).

Como ocurre con otros sistemas biológicos en el organismo humano, el sistema de la coagulación, tiene un gran número de elementos reguladores primarios y secundarios, que controlan la coagulación en la salud y en la enfermedad. El consumo de estos elementos reguladores en el curso de la sepsis grave, puede resultar en una alteración de la coagulación, exceso de activación de la trombina, y depósito difuso de fibrina en la microcirculación. Existen tres inhibidores endógenos del sistema de la coagulación: la antitrombina III, la proteína C y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Estos inhibidores, trabajarán en concierto con el sistema fibrinolítico, y con los mecanismos de aclaramiento hepáticos y extrahepáticos, para evitar una disregulación de la coagulación durante la respuesta inflamatoria sistémica. La degradación de estos inhibidores de la coagulación durante la sepsis grave, puede acabar con la integridad de este complejo engranaje molecular, que puede contribuir a la hipoperfusión tisular y SDMO (59).

Antitrombina III (AT-III): Es uno de los mayores inhibidores de la coagulación, que actúa sobre las vías intrínseca, extrínseca y sobre la vía común. Además de su potente acción inhibidora de la trombina, la AT-III es un potente inhibidor de las serin-proteasas, con la capacidad para inhibir los factores de contacto XIIa y XIa; además inhibe al factor IXa de la vía intrínseca, y al factor Xa de la vía final común de la coagulación. La AT-III es un inhibidor clásico de las serin-proteasas (SERPIN), y debe su amplio espectro

anticoagulante al hecho de que la mayoría de los componentes de la coagulación funcionan como serin-proteasas (61).

La AT-III es sintetizada en el hígado, como una proteína polipeptídica de cadena única, de 58 kDa. Circula en forma de monómero en el plasma, pero también puede ser hallada en la superficie de plaquetas y de células endoteliales. La heparina, de forma competitiva inhibe la unión de la AT-III al heparán sulfato, un glicosaminoglicano que se encuentra en la superficie endotelial. En ausencia de heparina, la AT-III, se unirá a dicha superficie endotelial, a través del heparán sulfato, actuando como un anticoagulante en la microcirculación. Además de sus propiedades anticoagulantes, la AT-III unida a las células endoteliales, estimula a estas células en la síntesis de prostaciclina. La prostaciclina es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria. La prostaciclina, además, por un proceso mediado por el AMP cíclico, inhibe la síntesis de las citoquinas proinflamatorias, además atenúa la activación neutrofílica, reduciendo la degranulación del mismo, la liberación de elastasa, y la liberación de radicales oxidantes tóxicos. Estas propiedades antiinflamatorias de la AT-III, sólo se observan en ausencia de heparina, y son mayores a dosis suprafisiológicas de AT-III (67).

Las concentraciones de AT-III en la sepsis, rápidamente disminuyen como consecuencia de la rápida formación de complejos con los factores de la coagulación. Una rápida deplección de AT-III se asocia a un pronóstico fatal en pacientes con sepsis (68). Basados en todos estos datos, se están llevando a cabo ensayos clínicos en humanos con sepsis, administrando AT-III, no encontrándose por el momento un beneficio sobre el pronóstico de estos pacientes.

Proteína C: El segundo factor regulador de la coagulación es la proteína C activada. La proteína C se sintetiza como un zimógeno, que se activa por la trombina en asociación con otra proteína que se encuentra en la membrana de las células endoteliales conocida como trombomodulina. El mecanismo fundamental por el que la proteína C activada inhibe el sistema de la coagulación, es a través de la degradación de las formas activadas del factor V y del factor VIII. La proteína C activada es una molécula compleja que requiere una

modificación post-translacional para ser fisiológicamente activa; existe circulante como un zimógeno que necesita activarse a través de un clivaje proteolítico de los primeros 12 aminoácidos del extremo amino-terminal de su cadena pesada; dicho clivaje genera la proteína C activada. Esta reacción de activación es generada por la trombina en asociación con la trombomodulina. La expresión de la trombomodulina es regulado por diferentes variables fisiológicas, que incluyen su ritmo de síntesis, velocidad de liberación, y estado de las células endoteliales en la microcirculación (69).

La proteína S se considera un cofactor de la proteína C. Al igual que la proteína C es un factor vitamina K dependiente, con dominios estructurales y modificaciones post-translacionales similares. Los niveles de proteína C y de proteína S disminuyen rápidamente en la sepsis, y se ha encontrado una asociación entre las bajas concentraciones plasmáticas de proteína C en pacientes sépticos, y un pronóstico fatal. El reemplazamiento de proteína C en estos pacientes, se ha asociado a una disminución de la mortalidad de la sepsis grave, pero aún se están realizando ensayos clínicos multicéntricos que refrenden dichos resultados (59).

Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI): El TFPI es un inhibidor únicamente de la vía extrínseca de la cascada de la coagulación. Es una glicoproteína de 42 kDa, cuya estructura le permite unirse e inhibir al factor Xa de forma directa. La inhibición del factor tisular y del factor VIIa las realiza a través de un complejo cuaternario que consiste en factor Xa-TFPI-factor VIIa-factor tisular. El TFPI se sintetiza en las células endoteliales, y se encuentra en la superficie de dichas células, así como libre en la circulación sistémica. La mayoría del TFPI circulante se encuentra asociado a lipoproteínas plasmáticas. Las plaquetas, también transportan TFPI, y esta fuente plaquetar de TFPI, puede ser liberada tras la activación plaquetaria. La heparina aumenta los niveles circulantes de TFPI, parece que por liberación de éste desde almacenes endoteliales. La medición de niveles circulantes de TFPI durante la respuesta inflamatoria sistémica ha obtenido resultados variables, lo que puede ser un reflejo de la dinámica de la liberación del TFPI, de la presencia o ausencia de heparina, y de la capacidad de los ensayos realizados para detectar TFPI unido o libre en la circulación (70).



Como otros anticoagulantes, el TFPI puede tener propiedades antiinflamatorias, así parece interferir en las interacciones LPS/CD14, por su capacidad de unirse al LPS. Los complejos LPS-TFPI, previenen de la unión LPS-LBP. El significado funcional de este mecanismo inhibitorio en la sepsis, aún no está aclarado, y está siendo investigado con mayor profundidad. Existen otros hallazgos que sugieren que el TFPI pueda cumplir funciones fisiológicas en el mantenimiento de la integridad vascular, que no están relacionadas con sus propiedades anticoagulantes. Al igual que los otros anticoagulantes mayores, la AT-III, y la proteína C, se están llevando a cabo actualmente ensayos clínicos multicéntricos en pacientes con sepsis grave, en busca de un efecto beneficioso de la infusión del TFPI (70).

#### 1.4. MORFOLOGIA Y FUNCION PLAQUETARIA

Las plaquetas son pequeñas células discoides anucleadas, procedentes de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos medulares, que circulan en la sangre y cuya misión es taponar rápidamente cualquier solución de continuidad producida en el endotelio vascular. Los estudios de Bizzozero publicados en 1882 constituyeron la base inicial de una serie de estudios que han dado lugar a los conocimientos hoy existentes acerca de las funciones plaquetarias en la hemostasia primaria, y de su participación en la coagulación y en la fibrinólisis. Estudios posteriores evidenciaron que las plaquetas, además, intervenían en otro tipo de procesos como la inflamación, la cicatrización de las heridas, la fibrosis, la arteriosclerosis o la diseminación de las neoplasias (71-74).

La estructura de las plaquetas se adapta a la gran variedad de funciones que deben desempeñar, con zonas anatómicas preferentemente dedicadas a cada una de ellas: en la membrana plaquetaria se producen las interacciones con el exterior, el citoesqueleto es el responsable de la contracción celular, los gránulos específicos almacenan sustancias prohemostáticas, procicatrizantes y activadoras de las propias plaquetas y los sistemas membranosos amplifican la superficie plaquetaria y alojan componentes químicos involucrados en la activación. Las plaquetas, además, poseen estructuras anatómicas destinadas a algunas funciones celulares inespecíficas, como el metabolismo energético, una escasa capacidad de síntesis, y mecanismos de endocitosis y exocitosis (75).

Las plaquetas no activadas son elementos discoides biconvexos de 2,9 a 4,2  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,6 a 1,2  $\mu\text{m}$  de grosor, que siguen el modelo geométrico de un elipsoide de revolución oblato. En la sangre periférica de sujetos sanos, el número de plaquetas oscila entre 1,5 y 4 x 10<sup>8</sup> células/ml, con una tasa de producción diaria de 5,5 x 10<sup>7</sup> células /ml/día. La vida media de las plaquetas en circulación, en sujetos normales, es de 7-10 días, desapareciendo de la misma por envejecimiento o por consumo en procesos fisiopatológicos (76). A continuación estudiaremos diferentes aspectos morfológico-funcionales de las plaquetas.

### 1.4.1. MEMBRANA PLAQUETARIA

La membrana constituye el límite o separación de la plaqueta con el exterior, no sólo en su superficie biconvexa principal, sino también en la de los canales intraplaquetarios (77). Está integrada por tres capas: una cubierta exterior o glicocáliz, de 15-20 nm de grosor, que contiene receptores glicoproteicos, entre ellos el complejo Ib-IX, que interacciona con el factor de von Willebrand en el proceso de adhesión, y el complejo IIb-IIIa, que lo hace con el fibrinógeno en la agregación. También presenta otros receptores capaces de iniciar la activación plaquetaria. Las glicoproteínas (GP), además, integran en su estructura química, los principales antígenos plaquetarios de membrana. La segunda capa es una típica unidad de membrana o bicapa fosfolipídica, asimétrica, especialmente rica en ácido araquidónico. En respuesta a la activación, la membrana expone una superficie cargada negativamente, esencial como soporte a los factores de la coagulación (actividad procoagulante), y el ácido araquidónico entra en el metabolismo de los eicosanoides, participando en la transmisión del estímulo recibido en la membrana hacia las regiones celulares efectoras. La capa más interna es el área submembranosa, que está unida a las porciones transmembranosas de algunas glicoproteínas, y contiene filamentos submembranosos que forman parte del citoesqueleto. Es en esta zona, donde se produce la transformación de las señales recibidas en la superficie exterior en los mensajes químicos y alteraciones físicas que activarán a la plaqueta (77).

#### 1.4.1.1. Glicoproteínas, receptores e integrinas

El estudio de las glicoproteínas (GP) plaquetarias, se ha desarrollado mucho en los últimos años, debido a la disponibilidad de técnicas bioquímicas apropiadas para su aislamiento, de técnicas inmunológicas, con las que se han obtenido anticuerpos monoclonales específicos para las mismas, y más recientemente de la biología molecular, que está ayudando a conocer la secuencia de aminoácidos de las glicoproteínas a partir del DNA.

Las glicoproteínas de la membrana de las plaquetas humanas actúan como receptores mediando, entre otras, dos funciones de capital importancia para el mantenimiento de una hemostasia correcta: la adhesión de las plaquetas sobre las superficies vasculares dañadas y la interacción plaqueta-plaqueta o agregación plaquetaria.

El estudio de las enfermedades hemorrágicas congénitas, ha proporcionado en los últimos años, mucha información acerca del funcionalismo plaquetario. En concreto, la caracterización de defectos moleculares a nivel de las GP de membrana, como en el síndrome de Bernard-Soulier o la enfermedad de Glanzmann, ha evidenciado la especificidad funcional de las distintas GP plaquetarias. Las principales funciones de las GP, se exponen en la tabla 2 (78).

**Tabla 2. Funciones de las glicoproteínas de membrana.**

<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Median los procesos de adhesión y agregación plaquetarios</li><li>▪ Actúan como receptores para ligandos extracelulares</li><li>▪ Participan en fenómenos de reconocimiento y fagocitosis</li><li>▪ Confieren a las plaquetas especificidad antigénica</li><li>▪ Median procesos de transporte a través de la membrana</li><li>▪ Actúan como enzimas o antiproteasas</li><li>▪ Contribuyen a la carga eléctrica de la superficie celular</li><li>▪ Unen al complemento</li></ul>
--

Inicialmente existía una tendencia a nombrar las glicoproteínas con una extensión (I, II, III, IV, V o VI), referida al orden de aparición de sus bandas en los geles de electroforésis. Las técnicas electroforéticas aplicadas al estudio de plaquetas en individuos normales y en pacientes con defectos congénitos, permitieron definir los receptores presentes o expresados en cada GP. En la actualidad, muchos de los receptores que intervienen en la adhesión plaquetaria a los componentes del subendotelio, en la agregación plaquetaria, y en la interacción de las plaquetas con otras células, han sido identificados, clonados y secuenciados. Esta información ha permitido definir una nueva clasificación de las GP en función de similitudes genéticas y estructurales. Así, las clásicamente denominadas GP, han sido subclasificadas en distintas familias: integrinas, GP ricas en

leucina, y selectinas. Aunque la notación clásica aún sigue siendo utilizada, parece que va cayendo progresivamente en desuso (79).

Integrinas: Son complejos proteicos heterodiméricos / que intervienen en interacciones de tipo célula-matriz o célula-célula. En la superfamilia de las integrinas, cada receptor heterodimérico está compuesto por una única subunidad y una . Hasta la fecha son conocidas al menos 12 tipos de subunidades y 7 tipos de subunidades . Varios tipos de unidades pueden asociarse con una , aunque parece que no todas las combinaciones son posibles (80;81). La subunidad  $\alpha_1$ , es compartida por unos receptores descritos en los linfocitos T activados, que aparecían al cabo de varias semanas tras la activación *in vitro* con antígenos, y por ello fueron denominados *very late antigens* (VLA). Este grupo incluye los receptores de la membrana plaquetaria para la fibronectina (GPIc-IIa,  $\alpha_5 \beta_1$ ) el colágeno (GPIa-IIa,  $\alpha_2 \beta_1$ ) y la laminina (GPIc\*-IIa,  $\alpha_6 \beta_1$ ). Las integrinas con subunidad  $\alpha_2$  se han identificado predominantemente en leucocitos. Los receptores con la subunidad  $\alpha_3$  constituyen la familia de las citoadhesinas, que incluye los receptores de la membrana plaquetaria para el fibrinógeno (GPIIb-IIIa,  $\alpha_{IIb} \beta_3$ ) y la vitronectina ( $\alpha_v \beta_3$ ). En general las integrinas actúan como mediadoras en los procesos de adhesión celular, por interacción con una amplia variedad de ligandos proteicos extracelulares que contienen la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD). Cada una de las asociaciones presenta especificidad de ligando, pero complica aún más la situación, el hecho de que un ligando pueda interactuar con más de un tipo de integrina. Todo esto apunta a que el proceso de adhesión celular, y en particular la adhesión plaquetaria, es altamente complejo (81-83).

Glicoproteínas ricas en leucina: Esta familia de GP está constituida por proteínas con similitudes estructurales aunque no funcionales. No pertenecen a la familia de las integrinas, y todas ellas presentan una secuencia de 24 aminoácidos con un alto contenido en leucina. En la membrana plaquetaria se distinguen dos GP pertenecientes a esta familia: el complejo GPIb-IX, que es el receptor para el factor de von Willebrand (FvW), y la GPV, cuya función es desconocida pero parece ser que sufre hidrolización tras la activación plaquetaria con trombina (79).

**Tabla 3. Antígenos plaquetarios, de acuerdo con el 5º CD Workshop (87).**

Cluster	Estructura antigénica	Integrina	Función
CD9	p24	No	Desconocida, miembro de la familia de las tetraspaninas
CDw17	Lactosilceramida	No	
CD29	GPIIa	Subunidad $\alpha_1$ de $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$	Receptor de fibronectina Heterodímero con CD49b, e o f
CD31	PECAM-1	No	Molécula de adhesión
CD32	Fc $\gamma$ -R-II	No	Receptor de baja afinidad para IgG
CD36	GPIV	No	Receptor para colágeno, trombospondina, LDL oxidadas y eritrocitos parasitados por plasmodium
CD41	GPIIb	Subunidad $\beta_{IIb}$ de $\alpha_{IIb}\beta_3$	Receptor Fibrinógeno (en combinación con GPIIIa)
CD42a CD42b CD42c CD42d	GPIX GPIb GPIb GPV	No	Partes del complejo del receptor de von Willebrand
CD46	Cofactor de membrana	No	Cofactor para clivaje C3a/C4b
CD47	Polipéptido BRIC-125	No	Receptor asociado a las $\alpha$ -integrinas
CD49b CD49e CD49f	VLA-2 (GPIa) VLA-5 (GPIc) VLA-6 (GPIc)	Subunidad $\alpha_2$ de $\alpha_2\beta_1$ Subunidad $\alpha_5$ de $\alpha_5\beta_1$ Subunidad $\alpha_6$ de $\alpha_6\beta_1$	Receptor del colágeno Receptor de la fibronectina receptor de la laminina
CD51	VNR	Subunidad $\alpha_v$ de $\alpha_v\beta_1$	Cadena del receptor de la vitronectina
CD55	Factor acelerador	No	Acelera C3 y C5 convertasa
CD59	MIRL	No	Inhibe el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana del complemento
CDw60	NeuAc-NeuAc-Gal	No	Gangliósido
CD61	GPIIIa	Subunidad $\beta_3$ de $\alpha_{IIb}\beta_3$ y de $\alpha_{IIIb}\beta_3$	Heterodímero con CD41 o CD51
CD62P	P-selectina	No	Media la interacción con leucocitos
CD63	GP53	No	Proteína de gránulos plaquetarios
CD68	GP110	No	Glicoproteína transmembrana, homóloga a la familia LAMP-1
CD102	ICAM-2	No	Receptor para LFA-1
CD107a CD107b	LAMP-1 LAMP-2	No No	Proteínas de membrana lisosómicas
CDw109		No	GP de superficie unida a GPI

Selectinas: Presentan ciertas similitudes estructurales con los VLA. La más conocida es la P-selectina (*-platelet activation-dependent granule-external membrane-PADGEM* o *-granule membrane protein- GMP-140*) que se encuentra en la cubierta de los gránulos plaquetarios y se expresa en la superficie de las plaquetas una vez activadas y degranuladas. La P-selectina es una proteína de 140 kDa, de cadena única, que se encuentra

no sólo en los gránulos de las plaquetas, sino también en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales; parece mediar la interacción entre leucocitos y plaquetas, así como la adhesión entre leucocitos y células endoteliales (84-86).

Una vez activadas las células, la P-selectina se expresa en la superficie celular, y parte se secreta al plasma. Se ha encontrado que la mayor parte de la P-selectina soluble en plasma (sP-selectina) procede de las plaquetas. Los niveles de sP-selectina no se correlacionan con los de la  $\alpha$ -tromboglobulina, otro producto almacenado en los gránulos, por lo que parece que nos informa de otro aspecto diferente de la fisiología plaquetaria. Entre las patologías en las que se han detectado niveles elevados de sP-selectina se encuentran la púrpura trombótica trombocitopénica, la púrpura trombocitopénica idiopática y la sepsis (88;89).

A continuación, nos referiremos brevemente a algunas de las características de las glicoproteínas y complejos glicoproteicos de la membrana plaquetaria y a sus ligandos de mayor interés.

**Glicoproteína Ia:** Esta GP, está compuesta por una sola cadena glicoproteica que se localiza en la membrana plaquetaria. Su función como receptor para el colágeno, fue descrita por Nieuwenhuis tras el estudio de un paciente con historia de sangrado, cuyas plaquetas carecían específicamente de GPIa. Las plaquetas de este paciente eran normales excepto cuando el agonista empleado era el colágeno. Por otra parte, la interacción de estas plaquetas con el subendotelio en condiciones de flujo era muy reducido debido, esencialmente, a su capacidad para extenderse tras el contacto. Los conocimientos actuales indican que la GPIa es el receptor para el colágeno, o alternativamente, puede estar involucrada en la interacción de las plaquetas con un cofactor de adhesión plaquetario al colágeno, como es el caso de la proteína adhesiva fibronectina (82;90)

**Glicoproteína Ib:** Es la GP con mayor contenido en hidratos de carbono de la membrana plaquetaria, que contribuyen a la carga neta negativa que posee la plaqueta. Con una  $M_r$  aparente de 170.000, consiste en 2 subunidades: la  $\alpha$  (143.000) y la  $\beta$  (22.000),

unidas por puentes disulfuro. Es característico el polimorfismo que presenta la subunidad . Ambas unidades están glicosiladas en su porción externa, siendo la proporción de azúcares mayor en la subunidad , en concreto una porción peptídica denominada glicocalicina. Una propiedad interesante de esta GP, es la habilidad de formar complejos en la membrana plaquetaria. A nivel de la membrana conecta con la GPIX, mientras que en la porción citoplasmática interacciona con una proteína del citoesqueleto llamada *actin binding protein* (ABP). La unión del complejo GPIb-IX a proteínas contráctiles puede ser especialmente importante en el proceso de adhesión plaquetaria. La GPIb juega un papel fundamental en la hemostasia primaria actuando como receptor de contacto de las plaquetas con el subendotelio. Este paso está mediado por el FvW adsorbido al colágeno o a otros componentes del subendotelio. Cuando se une al subendotelio, el FvW adquiere una conformación que permite su interacción con la superficie plaquetaria. También se ha descrito que la GPIb participa en la interacción de las plaquetas con la trombina, ya que algunos anticuerpos anti-GPIb inhiben la agregación y secreción plaquetaria inducidas por la trombina (91-93).

**Glicoproteína Ic-IIa:** Pertenece también a la familia de las integrinas. Se presenta en dos formas  $\alpha_6 \beta_1$  y  $\alpha_5 \beta_1$ . La forma  $\alpha_6 \beta_1$  también es conocida como VLA 6. Se ha demostrado que puede actuar como el receptor de la laminina, al menos en otros tejidos, por lo que se supone que también podría actuar así en las plaquetas. Por el momento es poco conocido el papel que la laminina –proteína de la estructura subendotelial del vaso- pudiera tener en la reactividad de las plaquetas, aunque un estudio reciente señala que la laminina podría, por sí misma, estimular a las plaquetas (94;95).

**Complejo glicoproteico IIb-IIIa:** Es el complejo más abundante en la membrana plaquetaria, pertenece a la familia de las integrinas, y es el lugar de unión de diferentes proteínas adhesivas: fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand, vitronectina, trombospondina y colágeno. Entre ellas, las cuatro primeras proteínas adhesivas tienen en común la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), que median su interacción con este receptor glicoproteico (81;83).



El complejo GPIIb-IIIa juega un importante papel en los procesos de agregación plaquetaria, actuando como receptor del fibrinógeno, molécula que al unirse a la GP IIb-IIIa de las plaquetas activadas, forma un puente entre ellas, favoreciendo la agregación de las mismas. También participa en la etapa de retracción del coágulo, proporcionando un lugar de unión entre el citoesqueleto de las plaquetas activadas (talina y vinculina) en la parte citoplasmática y la membrana plasmática. La unión del fibrinógeno a la plaqueta, requiere la presencia de concentraciones micromolares de calcio extracelular, que son necesarias para la formación del complejo heterodimérico de las glicoproteínas (96;97).

La estructura de la proteína adhesiva, puede determinar la accesibilidad de la secuencia RGD a su lugar de unión en la GPIIb-IIIa de la membrana plaquetaria. De hecho, el sitio de unión del fibrinógeno en la GPIIb-IIIa no está accesible en las plaquetas en reposo, y sólo se expone cuando las plaquetas han sido previamente activadas. La molécula de fibrinógeno contiene diferentes secuencias para interactuar con las plaquetas. La secuencia RGD se encuentra 2 veces en la cadena del fibrinógeno; por otra parte en la porción carboxiterminal de la cadena existe un dodecapéptido que también media la interacción del fibrinógeno con el complejo GPIIb-IIIa. Además este complejo podría participar en el proceso de transmisión del estímulo activante; ya que sirve de puente de unión entre membrana y citoesqueleto, participa en la activación de las fosfolipasas, es una vía de activación de la proteína quinasa C, y del metabolismo del fosfatidil inositol (98-102).

Por tanto, las misiones principales del GPIIb-IIIa en la reactividad de la plaqueta son: el reconocimiento de ligandos extracelulares –en general proteínas adhesivas-, la transmisión del estímulo activante, el control del cambio de forma de las plaquetas, la formación de puentes plaqueta-plaqueta –agregación-, y la mediación de las interacciones de las plaquetas con la matriz extracelular (75;82).

**Glicoproteína IV:** También conocida como GPIIb o CD36. Se han realizado estudios en condiciones de flujo en individuos cuyas plaquetas carecían de GPIV, sugiriendo que si bien la esta GP no es esencial para que se produzca la interacción

plaqueta-colágeno, sí que actúa acelerando el proceso; la GPIV también ha sido propuesta como posible receptor para la trombospondina (103).

#### **1.4.1.2.Receptores no glicoproteicos**

Estos receptores no GP que regulan también la activación y agregación plaquetarias, incluyen receptores para el ADP, la trombina, la serotonina, la adrenalina, y para diferentes prostanoídes.

La adrenalina actúa sobre los receptores adrenérgicos induciendo la agregación plaquetaria sin que exista cambio de forma previo, y a su vez, potencia concentraciones subumbrales de otros agonistas. El ADP se une a las plaquetas en reposo a través de un receptor proteico altamente específico. Esta unión induce la exposición del GPIIb-IIIa en una conformación idónea para que se produzca la agregación plaquetaria a través de puentes de fibrinógeno. Además, el ADP actuaría inhibiendo la adenilciclasa, enzima que interviene en los procesos de inhibición plaquetar por incrementar los niveles de AMPc (104;105).

Entre los lípidos de la membrana plaquetaria, el ácido graso mayoritario es el ácido araquidónico (AA). Tanto el AA como sus metabolitos presentan propiedades pro y antiagregantes mediadas por receptores específicos. Los endoperóxidos prostaglandínicos y el tromboxano A<sub>2</sub> a través de su receptor, inducen la movilización del Ca<sup>++</sup> intraplaquetario. El tromboxano A<sub>2</sub> generado a través de estímulos que activan las fosfolipasas, al unirse a su receptor plaquetario refuerza la acción agregante del estímulo inicial. Por el contrario las prostaglandinas (PG) PGI, PGE y PGD generalmente inducen la activación de la adenilciclasa con aumento del AMPc intraplaquetario, cuya presencia tiene un efecto inhibitorio sobre la función plaquetaria (106).

Es interesante apuntar aquí, que las plaquetas son capaces de responder al efecto de ciertos fármacos, a través probablemente de receptores inespecíficos.

## 1.4.2. CITOESQUELETO PLAQUETARIO

La mayoría de las respuestas de las plaquetas –cambio de forma, transformación interna, secreción, formación del tapón hemostático y retracción del coágulo- pueden ser consideradas como manifestación de una actividad contráctil. En la composición de las plaquetas podemos encontrar proteínas, tales como actina, miosina y tropomiosina, que normalmente participan en el sistema contráctil de las células de la musculatura lisa o esquelética (77).

Se conoce que la actina y la miosina son los componentes más importantes del citoesqueleto plaquetario. La actina, tras polimerizar, participa en los fenómenos de cambio de forma. La asociación de la actina polimerizada con la miosina es capaz de generar una fuerza que puede ser convertida en movimiento externo (extensión) o interno (contracción). Un tercer componente del citoesqueleto plaquetario son los microtúbulos, cuya proteína principal es la tubulina. Ésta polimeriza conformándose como una sola espiral que se dispone por debajo del citoesqueleto de la membrana. Parece ser que los microtúbulos intervienen en el mantenimiento de la forma discoide de las plaquetas no estimuladas, y favorecen la organización y direccionamiento de los movimientos generados por la interacción actina-miosina. Además de las proteínas básicas mencionadas, el citoesqueleto plaquetario contiene otra serie de proteínas ( -actinina, ABP, gelsolina, profilina, talina, trpomiosina, vinculina) (75).

En la plaqueta en reposo, el citoesqueleto del citoplasma contiene filamentos de actina que representan el 25-40% de la actina plaquetaria total. El resto de la actina se encuentra en forma monomérica, no polimerizada. El hecho de que el citoplasma plaquetario contenga los dos tipos de actina (globular y filamentosa) implica la existencia de mecanismos que regulen su polimerización. La organización de los filamentos de actina, está regulada por su interacción con otras proteínas: la ABP, la -actinina y la tropomiosina. Los filamentos de actina desempeñan un papel estructural, manteniendo la organización de los distintos orgánulos en el citoplasma plaquetario. El citoesqueleto de la

membrana está compuesto básicamente por microfilamentos de actina unidos por ABP, y está distribuido bajo la membrana unido a diversas GP. Entre sus funciones están las de estabilización de la bicapa lipídica, mantenimiento de la forma de la membrana plasmática, regulación de la distribución de las GP y mantenimiento de estas últimas en una conformación favorable para unirse a sus ligandos específicos (107).

Durante la activación plaquetaria, la profilina, que estabiliza la actina-G, es eliminada, facilitándose la incorporación de los monómeros de actina, que construye polímeros dentro del citoplasma. En condiciones favorables, como las que se producen durante la activación plaquetaria, los monómeros polimerizan casi completamente en filamentos. El proceso de polimerización se compone de dos etapas: nucleación y elongación. El proceso de nucleación es lento e implica la presencia de al menos 3 monómeros para la formación de un núcleo de actina. El proceso de elongación es rápido, y consiste en la adición de monómeros de actina al extremo en crecimiento del filamento. Será la unión de proteínas como la ABP, tropomiosina y  $\alpha$ -actinina, las que determinen si los filamentos formados se dirigirán a la periferia o formarán parte del citoesqueleto en los pseudópodos. Los filamentos periféricos producen constricción centralizando los gránulos. La fuerza para esta actividad contráctil es generada por la miosina fosforilada cuando se une a los filamentos de actina polimerizada. El proceso de formación de filamentos cesa cuando al filamento de actina, se incorpora alguna de las proteínas bloqueadoras de la polimerización, como es la gelsolina (107;108).

La correcta regulación del ensamblaje del citoesqueleto es necesaria para los procesos de extensión de pseudópodos, centralización de gránulos, secreción, y retracción del coágulo que, en resumen, caracterizan la función de las plaquetas en la hemostasia primaria (75;107).

### 1.4.3.GRANULOS ESPECÍFICOS

La plaqueta contiene tres tipos de gránulos citoplasmáticos: gránulos  $\alpha$ , gránulos densos y lisosomas, que son liberados al medio extracelular por exocitosis como consecuencia de la estimulación plaquetaria, este proceso se conoce como reacción de liberación. Se ha observado que la cinética de la secreción de los diversos tipos de gránulos es secuencial, dependiendo de la intensidad de activación plaquetaria; la liberación de los gránulos  $\alpha$ , requiere una estimulación menor de las plaquetas que para la liberación de los gránulos densos, y ésta, a su vez es menor que la necesaria para la liberación de los lisosomas (109).

#### 1.4.3.1.Gránulos $\alpha$

La secreción de los gránulos  $\alpha$ , produce la liberación de un número muy abundante de sustancias al medio extracelular, que podrían dividirse en: factores mitógenicos, proteínas plaquetarias específicas, factores de coagulación, proteínas adhesivas, factores de permeabilidad vascular, inhibidores proteolíticos y factores fibrinolíticos. Algunas de estas sustancias tienen implicaciones fisiológicas o fisiopatológicas definidas.

El hecho de que las plaquetas liberen factores de crecimiento, ha hecho que se postulara su papel en la patogénesis de la aterosclerosis, estimulando la proliferación del músculo liso. También liberan las plaquetas la colagenasa, enzima que puede modificar la pared vascular. Recientemente se ha descrito que las plaquetas poseen un receptor específico para el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), que ellas liberan de los gránulos  $\alpha$ ; la interacción del PDGF con su receptor plaquetario ejerce una regulación negativa de la respuesta de la célula, ya que inhibe la agregación y liberación de las plaquetas con trombina(110).

Entre las proteínas específicas de las plaquetas, las más estudiadas son el factor plaquetario 4 (PF4), el PF4 de baja afinidad (LA-PF4), y la  $\beta$ -tromboglobulina ( $\beta$ -TG),

todas ellas con actividad antiheparina. El PF4 se libera de la plaqueta asociado a un transportador proteoglicano, de peso molecular aproximado 350 kDa. El PF4 tiene una gran afinidad de unión con el endotelio vascular y actividad quimiotáctica. La  $\alpha$ -tromboglobulina tiene un peso molecular de 8,8 kDa y presenta bastante homología estructural con el PF4; 42 de los 81 aminoácidos de la  $\alpha$ -TG son idénticos a los del PF4. La homología entre la LA-PF4 y la  $\alpha$ -TG, es aún mayor, ya que sólo son diferentes los 4 últimos aminoácidos del LA-PF4, que desaparecen en la molécula de  $\alpha$ -TG. Se sugiere que las plaquetas liberan LA-PF4, el cual es rápidamente convertido en  $\alpha$ -TG por una proteasa neutra, por la plasmina o la tripsina.. La proteína básica de la plaqueta (PBP), también comparte homología inmunológica con la LA-PF4 y  $\alpha$ -TG, y posee una potente actividad mitogénica, similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (75;111;112).

A pesar de haber sido estudiada con bastante profundidad, la función biológica de las proteínas liberadas por las plaquetas, dista de estar esclarecida. Parece que las actividades mitogénicas y neutralizadoras de la heparina, o de otros glicosaminoglicanos, son las mejor establecidas, pero incluso estas actividades podrían estar relacionadas entre sí, ya que la heparina y otros glicosaminoglicanos inhiben el crecimiento celular y la síntesis de DNA. Además, la actividad mitogénica de la PBP, se inhibe por la heparina. Por ello, es posible que la interacción entre las proteínas liberadas por las plaquetas, con los glicosaminoglicanos relacionados estructuralmente con la heparina en la zona de daño vascular, pueda regular el crecimiento celular del vaso. Adicionalmente, se ha descrito que la unión de la  $\alpha$ -TG a las células endoteliales, puede inhibir la síntesis de prostaciclina vascular(113).

Desde un punto de vista práctico, los niveles de  $\alpha$ -TG o PF4 circulantes, o el cociente  $\alpha$ -TG/PF4 detectado en el plasma, se consideran un índice de la activación plaquetaria *in vivo* (114).

Las plaquetas contienen, también, en los gránulos  $\alpha$ , factores proteicos que podrían participar en el proceso de la coagulación sanguínea, y en los procesos adhesivos plaqueta-plaqueta o plaqueta con otras células. El fibrinógeno y el factor de von Willebrand liberado

por las plaquetas, pueden unirse a la superficie plaquetar y contribuir a los procesos adhesivos plaqueta-plaqueta o plaqueta subendotelio. La trombospondina liberada por las plaquetas, podría actuar en una etapa posterior, participando en los procesos de adhesión de las plaquetas con la matriz subendotelial. El factor V se libera de la plaqueta de una forma activada y podría servir como receptor del factor Xa plasmático en la superficie plaquetaria., aunque el factor V del plasma podría substituir al factor XI plasmático. Recientemente., se ha descrito la capacidad de las plaquetas para liberar también factor IX contenido en los gránulos alfa y en el citoplasma de las plaquetas, aunque su posible significado biológico no es conocido (115;116).

Los gránulos alfa de las plaquetas y los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, contienen una proteína de 140 kDa de peso molecular, denominada PADGEM o GMP 140, que media en los procesos adhesivos entre los neutrófilos y las plaquetas activadas, o entre neutrófilos y las células endoteliales. Al producirse la activación plaquetaria y la secreción de los gránulos alfa, esta proteína se une a la membrana de la plaqueta quedando expuesta al microentorno, mientras se encuentra ausente en plaquetas en reposo. Recientemente, se están utilizando anticuerpos monoclonales de esta proteína y técnicas de citometría de flujo para la detección de plaquetas activadas *ex vivo* (113;117).

#### **1.4.3.2. Gránulos densos**

Los gránulos densos suelen distinguirse fácilmente de los gránulos alfa al microscopio electrónico, por su mayor densidad, debido a la elevada concentración de calcio y fósforo. Estos gránulos densos plaquetarios, contienen nucleótidos de adenina (ADP, ATP), serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) y como hemos dicho, calcio y fósforo, que son también liberados al medio extracelular por la activación plaquetaria (75).

La liberación de los nucleótidos de adenina, tiene importancia fisiopatológica, particularmente la del ADP, que puede inducir la estimulación de otras plaquetas en el microentorno de las plaquetas secretoras, favoreciendo lo que se conoce como reclutamiento plaquetario o reclutamiento del trombo. El ATP por el contrario, antagoniza

la acción proagregante del ADP. La serotonina y el ADP, liberados tienen efectos vasoactivos, produciendo contracción en las arterias dañadas. Adicionalmente, la 5-HT tiene un débil efecto proagregante sobre las plaquetas, y potencia el efecto de otros inductores de la respuesta plaquetaria (118).

### **1.4.3.3. Lisosomas**

La estimulación fuerte de las plaquetas, por ejemplo con altas dosis de trombina, produce la liberación de lisosomas plaquetarios. Estos gránulos contienen actividades hidrolíticas y proteolíticas. Contrariamente al contenido de los gránulos alfa y densos de las plaquetas, que se liberan en su totalidad con inductores fuertes, la liberación del contenido de los lisosomas, es parcial en plaquetas estimuladas máximamente (113).

Otros componentes proteicos importantes desde el punto de vista funcional de la plaqueta, son las proteínas que ligan nucleótidos de guanina o proteínas G y diversas enzimas: fosfolipasas, quinasas, etc... a las que nos referiremos brevemente más adelante, en relación a la secuencia bioquímica de la activación plaquetar (113).



## 1.5. REACTIVIDAD PLAQUETARIA: DEFINICIONES

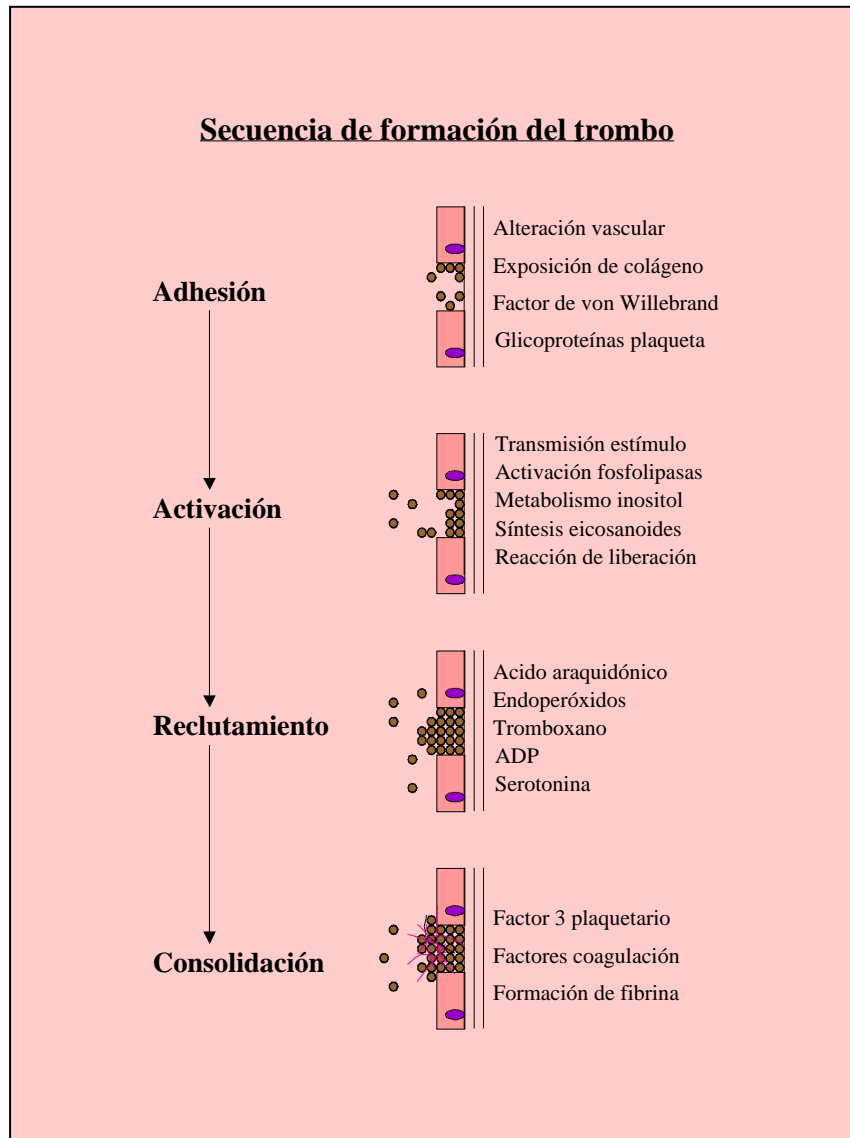
En condiciones normales, la luz de los vasos sanguíneos está cubierta con una monocapa de células endoteliales continua, que es la principal responsable del mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos, y de la reología sanguínea. Si se produce una solución de continuidad en el endotelio, con exposición del colágeno subendotelial, se inician los procesos de la hemostasia primaria, con la interacción entre la plaqueta y la superficie vascular dañada. Esta interacción plaqueta-endotelio juega un papel crítico en el desarrollo de los procesos trombóticos (119).

Durante mucho tiempo se consideraron los vasos sanguíneos como una superficie inerte cuya función era impedir la extravasación de la sangre; actualmente sabemos que el endotelio vascular está dotado de una gran capacidad metabólica y funcional. Las propiedades hematológicas del endotelio se han relacionado con su capacidad para producir un gran número de sustancias biológicamente activas, y diferentes procesos patológicos, se han relacionado con alteraciones en la producción de estas sustancias (120).

Algunas de las sustancias que produce el endotelio, son favorecedoras del proceso trombótico, como el factor activador plaquetario (PAF), el factor de von Willebrand, el factor VIII, el factor tisular, la endotelina-1, el inhibidor de la activación del plasminógeno (PAI) y diferentes moléculas de adhesión. Otras sustancias producidas por el endotelio tienen una función fundamentalmente antitrombótica, y se las considera como sustancias antitrombóticas; entre otras, se han descrito el factor relajante derivado del endotelio (EDFR) actualmente identificado con el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), el ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE), el ácido 15-hidroxi-5,8,11,13-eicosatetraenoico (15-HETE), el activador tisular del plasminógeno (t-PA), el activador de la uroquinasa (u-PA), anticoagulantes del sistema extrínseco (EPI), proteoglicanos, la proteína S, así como las ecto-ADPasas de membrana (120;121).

Cuando se produce una alteración o una ruptura de un vaso, este se contrae, y las

plaquetas interaccionan con sus estructuras subendoteliales, iniciando las etapas de adhesión, agregación, activación y reclutamiento plaquetario. El daño vascular, sirve también como señal para el inicio de la cascada de la coagulación, que dará lugar a la formación de trombina –otro importante inductor plaquetario- que contribuirá a la formación del trombo y de fibrina que facilitará la consolidación del mismo (122).



**Figura 2. Secuencia de formación del trombo (123).**

### 1.5.1. ADHESIÓN

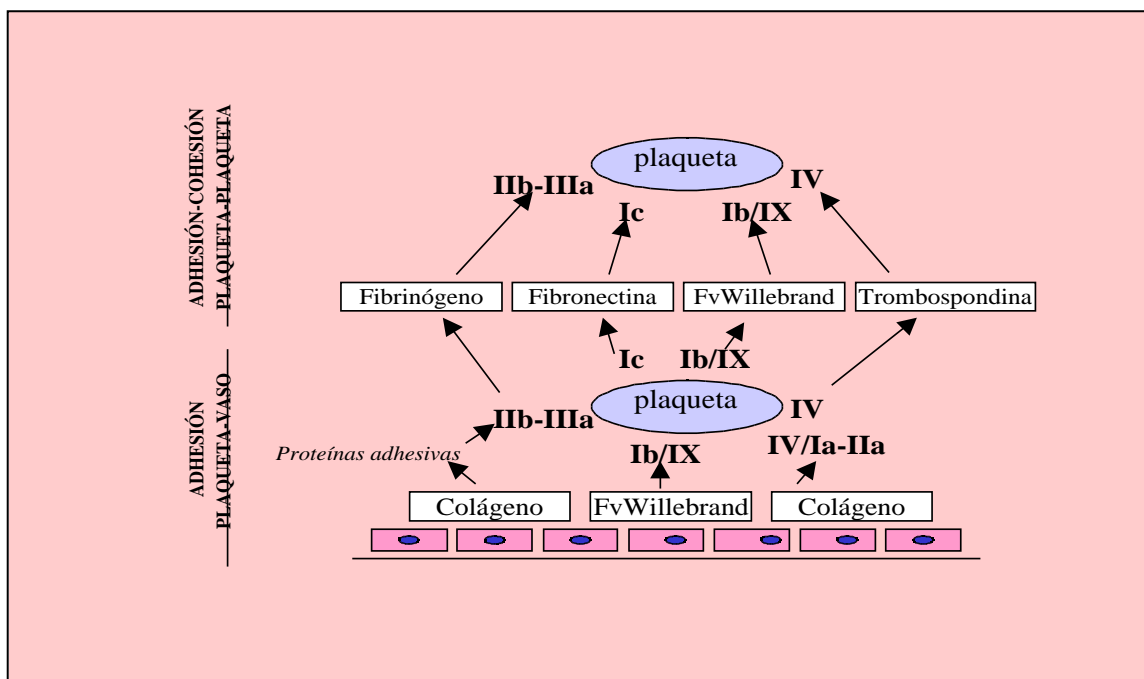
La adhesión de las plaquetas al vaso constituye la primera etapa en la hemostasia primaria. Las plaquetas tienen capacidad para adherirse a varios componentes subendoteliales, como el factor de von Willebrand, el colágeno, la trombospondina, la fibronectina o la laminina, entre otros, y en estos procesos de adhesión participan también varios receptores de la membrana plasmática, a los que nos referiremos más adelante. De todas estas sustancias, al factor de von Willebrand y al colágeno se les atribuye el papel más importante en los procesos adhesivos. El factor de von Willebrand, media la adhesión plaqueta-vaso sin necesidad de una activación plaquetaria previa, mientras que el colágeno subendotelial, además de favorecer el proceso de adhesión plaqueta-vaso, puede activar a las plaquetas y producir una respuesta bioquímica y funcional completa de la célula (124).

En el inicio del proceso de adhesión de las plaquetas al vaso, juega un papel preponderante el complejo glicoproteico de las plaquetas Ib/IX, que se une al factor von Willebrand, sintetizado por el propio endotelio o circulante en el plasma, que a su vez tiene capacidad para unirse al subendotelio. También la glicoproteína IV y el complejo GPIa/IIa, de la membrana plaquetaria, participan en el proceso adhesivo, vía unión al colágeno. Otro complejo glicoproteico, el IIb/IIIa que se expone en la superficie de las plaquetas activadas, podría participar también en el proceso adhesivo, por su capacidad para interaccionar con varias proteínas adhesivas y con el colágeno (125;126).

En relación al colágeno, el concepto actual es que su interacción con la plaqueta, se produce a través de diversas interacciones directas del mismo sobre la membrana plaquetaria, e incluso también, de forma indirecta a través de proteínas adhesivas como el fibrinógeno, la fibronectina o el factor von Willebrand, para las que el propio colágeno y las plaquetas disponen de puntos de unión (126).

Al proceso adhesivo en el que participa el complejo glicoproteico IIb/IIIa, se le ha llamado adhesión secundaria, para diferenciarla de aquella que no requiere una activación

plaquetaria previa. La exposición de IIb/IIIa en la membrana puede tener lugar por la interacción de las plaquetas con varios inductores plaquetarios solubles; también se ha descrito recientemente, que la unión del factor von Willebrand al complejo GP Ib/IX podría producir la exposición de la glicoproteína IIb/IIIa. Una etapa subsiguiente a la adhesión plaqueta-vaso, es la adhesión plaqueta-plaqueta (cohesión). En este proceso, que tiene lugar cuando el vaso se ha recubierto de una monocapa de plaquetas, participan otras glicoproteínas de la membrana plaquetaria, y otras proteínas adhesivas. Estas incluyen la glicoproteína Ib, que interacciona con el factor von Willebrand, la glicoproteína Ic que interacciona con la fibronectina, y la glicoproteína IV que interacciona con la trombospondina (119).



**Figura 3. Adhesión y cohesión plaquetar.**

A pesar de que se ha avanzado mucho en el conocimiento de los procesos adhesivos de las plaquetas, los mecanismos bioquímicos últimos de la adhesión plaqueta-matriz subendotelial en general o plaqueta-colágeno en particular, están todavía muy abiertos al debate.

### 1.5.2. AGREGACIÓN

La agregación plaquetaria, es un fenómeno que se inicia con la interacción entre un inductor y un receptor específico en la membrana de la plaqueta; esto conduce a una serie de cambios morfológicos y bioquímicos rápidos, que van a tener como consecuencia la formación de un agregado de plaquetas activadas, unidas entre sí bioquímicamente (127).

Si las plaquetas están en suspensión. La primera respuesta morfológica al inductor, es su cambio de forma, que se caracteriza por su transformación de una forma discoidal (células en reposo) a una forma esférica con emisión de pseudópodos y centralización de gránulos (128).

Para que la agregación plaquetaria tenga lugar, es necesario que el inductor exponga el receptor del fibrinógeno en la plaqueta, y que esta proteína se una al mismo en presencia de calcio, formando puentes de unión plaqueta-plaqueta. El receptor para el fibrinógeno en la plaqueta es el complejo glicoproteico IIb/IIIa, que requiere para unirse a esta proteína adhesiva, la presencia de concentraciones micromolares de calcio (127).

El proceso de agregación es la respuesta plaquetaria más estudiada en los últimos 30 años; desde que Born describió la técnica conocida como agregometría óptica, que ha sido amplísimamente utilizada en estudios funcionales, bioquímicos y farmacológicos, en relación a la fisiopatología de la hemostasia y la trombosis. Este método turbidométrico permitió, por ejemplo, el descubrimiento del cambio de forma de las plaquetas –de disco a esfera con pseudópodos- y el hecho de que la agregación plaquetaria, dependiendo de la naturaleza y concentración del inductor *in vitro*, pueda tener una primera fase reversible, sin reacción de liberación y otra segunda fase asociada a la reacción de liberación (129).

Más recientemente se han desarrollado otros métodos de medida de la agregación de las plaquetas, utilizadas principalmente para su estudio en sangre total. Las más utilizadas son los que tienen como fundamento el contaje de plaquetas antes y después de la

estimulación, contando el número de plaquetas que permanecen aisladas, y la agregometría electrónica o de impedancia. En las técnicas de recuento de plaquetas, se utilizan métodos de recuento manuales o contadores automáticos de células en plasma rico en plaquetas o en sangre total (sistema Ultra-F100).

El método de impedancia, inicialmente descrito por Cardinal, valora las variaciones de impedancia a depositarse sobre el mismo las plaquetas agregadas – y otras células sanguíneas- cuando se añade el inductor. Este método presenta una mayor simplicidad técnica que la agregometría óptica, pero los resultados de agregometría óptica y de impedancia, no son siempre paralelos, particularmente en lo que se refiere a estudios farmacológicos (130).

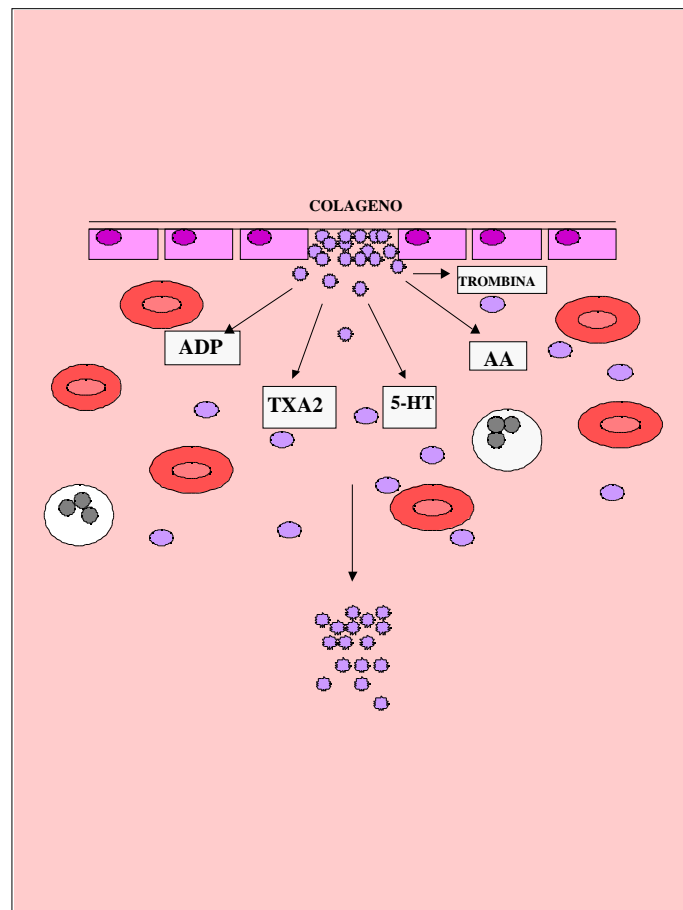
### **1.5.3. RECLUTAMIENTO**

El reclutamiento plaquetario es una etapa importante en la secuencia de la formación del trombo. En esta etapa, las plaquetas activadas por un inductor primario, por ejemplo el colágeno subendotelial, liberan al microentorno celular productos granulares o compuestos metabólicos que interaccionan con otras plaquetas y células del entorno, favoreciendo el crecimiento del trombo.

Varias sustancias liberadas por las plaquetas activadas, pueden contribuir al reclutamiento de otras plaquetas. Entre ellas el eicosanoide plaquetario tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y el ácido araquidónico en forma libre, ambos producidos y liberados al medio extracelular en el curso de la activación plaquetaria; compuestos contenidos en los gránulos de las plaquetas, como la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5HT), y sobre todo la adenosina difosfato (ADP), todas ellas con capacidad inductora de la respuesta plaquetaria (131).

La activación de las plaquetas, tendrá consecuencias clínicas, si los liberados celulares que se producen como consecuencia de la misma, pueden reclutar a otras

plaquetas para favorecer el crecimiento del trombo, y dar lugar así, al fenómeno oclusivo. El procedimiento experimental que se describe y desarrolla en esta tesis, en relación a la interacción eritrocito-plaqueta, permite la evaluación independiente de la activación y del reclutamiento plaquetarios. Es posible que dicho enfoque experimental, ayude a clarificar las diferencias fisiológicas y bioquímicas entre la etapa de activación y el subsiguiente reclutamiento plaquetario (132).



**Figura 4. Reclutamiento plaquetario.**

#### 1.5.4. CONSOLIDACIÓN DEL TROMBO

El daño vascular inicia la cascada de la coagulación, que culmina en la formación de trombina. La trombina producida, por una parte, amplifica la formación del trombo plaquetario –por su acción estimulante de las plaquetas– y por otra, la formación y

polimerización de la fibrina. La interacción de las plaquetas con la fibrina, forma un entramado que consolida el trombo y permite que este resista las altas presiones de flujo intravasculares (133).

#### **1.5.4.1. Actividad procoagulante de las plaquetas**

A la generación de trombina, contribuyen también las plaquetas activadas, generando una actividad procoagulante en su membrana. Esta actividad incrementa la velocidad de dos reacciones secuenciales de la coagulación sanguínea. El principal determinante de esta actividad procoagulante de las plaquetas, es la fosfatidil serina. Este fosfolípido se encuentra, en la plaqueta en reposo, en la capa interna de la bicapa lipídica de la membrana, pero como consecuencia de la activación plaquetaria, se produce un movimiento transmembrana, que hace que se haga disponible en la capa externa. La carga negativa de la fosfatidil serina permite la unión del calcio, y así la superficie de la plaqueta se convierte en una superficie catalítica que favorece una disposición estérica óptima para el acoplamiento enzima-sustrato, que se favorece por la presencia de un cofactor proteico. En la generación de esta actividad, participan las proteinasas dependientes del calcio (calpains), las proteínas de membrana que transportan fosfolípidos entre las bicapas interna y externa, el citoesqueleto de las plaquetas y la formación de microvesículas plaquetarias (134).

La generación de la actividad procoagulante de las plaquetas muestra una especificidad de estímulo. Entre los inductores fisiológicos, el efecto del colágeno es muy pronunciado, mientras que la trombina actúa principalmente como agente sinérgico con el colágeno, o con otras sustancias inductoras de esta actividad. El ionóforo de calcio A23187, induce una fuerte actividad procoagulante en las plaquetas, lo que sugiere un importante papel del calcio citoplasmático en este proceso (134).

La actividad procoagulante, no parece asociada a otros aspectos de la función trombocitaria. Esto se ha comprobado en experimentos realizados con anestésicos locales, como la dibucaína o la tetracaína, que inducen actividad procoagulante, pero por el



contrario, inhiben otros mecanismos de activación plaquetar como la fosfolipasa A2 o la proteína quinasa C; esto sugiere que el metabolismo del ácido araquidónico, la fosforilación de las proteínas, los procesos de secreción o de agregación de las plaquetas no son procesos asociados a la inducción de la actividad procoagulante (135).

## 1.6. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA: SECUENCIA BIOQUÍMICA

Sabemos que las plaquetas circulan en la sangre en un estado quiescente, pero que en respuesta a un daño vascular, en presencia de superficies extrañas, o por la acción de sustancias circulantes activadoras, las plaquetas se activan, se adhieren, cambian de forma, se agregan y segregan productos granulares y metabólicos al medio extracelular, lo que culmina en la formación del tapón hemostático o del trombo vascular. La superficie plaquetar posee receptores de membrana específicos, que reconocen las distintas señales moduladoras, ya sean activadoras y/o inhibidoras.

La interacción de la señal extracelular sobre los receptores actúa sobre los sistemas efectores acoplados a los mismos como son: la adenilato ciclasa responsable de la síntesis de AMPc; la fosfolipasa C, que degrada el fosfatidil inositol para dar lugar a la formación del diacil-glicerol y del inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>); la fosfolipasa A<sub>2</sub> que libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos, e inicia la síntesis de TXA<sub>2</sub>. También se produce una modificación de los niveles de calcio intracelulares, por dos mecanismos: por liberación del ión de sus depósitos en el sistema tubular denso, o por modificación de los canales del calcio que permitirán su entrada del plasma a la célula. Tanto IP<sub>3</sub>, como DAG, AMPc y calcio, actúan como segundos mensajeros en la transmisión del estímulo (136;137).

Todos los procesos que tienen lugar desde que la plaqueta recibe la señal, hasta que se produce su respuesta fisiológica es lo que se conoce como procesos de transmisión del estímulo a los que nos referiremos a continuación.

Se han descrito dos vías principales de transmisión del estímulo: una activante, que utiliza como segundos mensajeros la hidrólisis del fosfatidil inositol por la fosfolipasa C, para generar inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y sn-1,2 diacilglicerol (DG) que actúa directamente inhibiendo la adenilato ciclasa, y otra inhibidora, que utiliza el AMPc como segundo mensajero (138;139).

### 1.6.1. INTERACCION LIGANDO-RECEPTOR

Se han descrito múltiples sustancias que pueden unirse a los receptores plaquetarios e inducir una respuesta, procediendo dichas sustancias de orígenes diversos, como el plasma (trombina, plasmina, catecolaminas), productos vasculares (colágeno, prostaciclina, óxido nítrico), sustancias derivadas de las propias plaquetas (ADP, 5HT, TXA<sub>2</sub>) o de otras células como el factor activador plaquetario (PAF) que sintetizan los leucocitos. En muchos casos, se han identificado los receptores específicos de dichas sustancias.

Una clasificación inicial de dichas sustancias que producen una respuesta plaquetaria, sería la que se basa en el tipo de respuesta obtenido. Así los inductores fuertes serían aquellos capaces de producir una respuesta completa en la plaqueta, como ocurre con la trombina o el colágeno a altas dosis. Los inductores débiles serían aquellos inductores, que requieren que se produzca la reacción de liberación de las plaquetas y/o la activación del metabolismo del ácido araquidónico en la célula, para conseguir una respuesta plaquetaria completa; entre estos estarían el ADP, la epinefrina, la vasopresina y la serotonina. El tercer grupo lo constituyen los antagonistas, entre los que destaca la prostaciclina y el óxido nítrico (137).

Como hemos descrito previamente, varios ligandos pueden unirse a un mismo receptor en la plaqueta, así como un mismo ligando se puede unir a dos receptores distintos, con implicaciones funcionales diferentes.

Los puntos de unión entre el receptor y el inductor plaquetario, son los dominios extracelulares y transmembrana. El dominio citosólico interacciona con enzimas que van a dar lugar a la formación de segundos mensajeros, y con los canales de iones, cuyas actividades vienen reguladas por la ocupación del receptor; en este proceso se requiere la intervención de las proteínas G, que median la interacción entre los receptores y los efectores citosólicos para la generación de segundos mensajeros (140).

### 1.6.2. PROTEINAS G

Las proteínas G son una familia heterodimérica de proteínas de membrana, que son capaces de unir y/o hidrolizar nucleótidos de guanina, y juegan un papel muy importante en la transmisión del estímulo activante, haciendo de puente entre los receptores y las proteínas efectoras en la membrana celular, pudiendo transmitir tanto señales activantes como inhibitoras (141).

Las proteínas G están compuestas por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , funcionando las subunidades  $\beta$  -  $\gamma$ , como un complejo al que pueden unirse diferentes subunidades  $\alpha$  para formar el heterodímero. En la célula en reposo, la subunidad  $\alpha$  contiene GDP, favoreciéndose su asociación con las subunidades  $\beta$  -  $\gamma$ . Cuando se activa el receptor de la célula por el agonista, se inicia la señal para que el GDP de la subunidad  $\alpha$  se sustituya por GTP, produciéndose su activación y favoreciéndose la disociación de las subunidades  $\alpha$  -  $\beta$  -  $\gamma$  y  $\alpha$  - GTP, que ejercen un papel regulador en los sistemas enzimáticos intracelulares, responsables de la producción de segundos mensajeros de la transducción del estímulo activante en las plaquetas. Estos incluyen la fosfolipasa C, la fosfolipasa A<sub>2</sub>, y la adenilciclase. también ejercen un papel regulador sobre los canales iónicos de sodio, potasio y calcio (142;143).

Dos vías metabólicas intracelulares juegan un papel central en la activación de las plaquetas por múltiples agonistas. Ambos se inician con la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana: el metabolismo del PI y el ácido araquidónico (136).

### 1.6.3. METABOLISMO DEL FOSFATIDIL INOSITOL

La interacción del inductor con su receptor en la membrana de la plaqueta, activa la fosfolipasa C, proceso mediado como se ha indicado, por las proteínas G; no requiere una elevación del calcio citoplasmático, y es regulada por nucleótidos de guanina, lo que inicia

la hidrólisis del fosfatidil inositol. El inicio del metabolismo de este fosfolípido también se produce por la apertura de los canales de calcio (144;145).

La vía principal del metabolismo de este fosfolípido, se inicia cuando el fosfatidil inositol-4,5 difosfato ( $PIP_2$ ) es hidrolizado por la fosfolipasa C (PLC). Los productos principales de esta reacción son el inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $IP_3$ ) y el diacil glicerol (DAG). También puede iniciar el metabolismo de este fosfolípido la apertura de los canales de calcio de la plaqueta (146).

La fosfolipasa C es específica para el fosfatidil inositol, induciendo la formación del diacilglicerol (DAG). La actividad fosfolipasa C está presente en el citosol de la célula, y se cree que su activación conduce a su translocación a la membrana de la plaqueta, donde se encuentra su sustrato, el fosfatidil inositol (147).

El  $IP_3$  actúa en la célula incrementando la concentración de calcio citoplasmático libre, liberándolo del sistema tubular denso, lo que es imprescindible para la continuación de la secuencia de activación plaquetaria. Niveles elevados de este ión activan sistemas enzimáticos, dependientes del calcio, que a concentraciones basales permanecen inactivos (148).

El DAG, por su parte, activa a la protein quinasa C (PKC), que fosforila residuos de serina y treonina de varias proteínas plaquetarias. Se ha propuesto que el DAG, formado por la hidrólisis de los fosfolípidos por la fosfolipasa C, actúa como segundo mensajero en el efecto de muchos agonistas de las plaquetas y de otras células (149).

Estos dos procesos: la elevación del calcio citoplasmático y la activación de la PKC, favorecen de un modo independiente, la activación de las plaquetas, y también pueden actuar en la secuencia de transmisión del estímulo, de un modo sinérgico en varias respuestas plaquetarias, como la reacción de liberación. El aumento del calcio iónico en el citoplasma de las plaquetas, juega un papel central en la secuencia de activación de la célula, y está asociado con diversos aspectos de la respuesta celular: cambio de forma,

agregación y secreción. La demostración de que los niveles de calcio citoplásmico juegan un papel importante en la secuencia de activación de las plaquetas, se puso de manifiesto al comprobar que los ionóforos de calcio, reproducen los efectos de los agentes agregantes sobre las mismas, y también por la comprobación de que los inductores producen un aumento del calcio en el citoplasma de la célula. Los niveles de calcio en el citoplasma de las plaquetas, se encuentran a su vez regulados por las tasas de AMPc y de GMPc en la célula, de forma que ante el estímulo de algunas prostaglandinas ( $PGI_2$ ,  $PGE_1$ ,  $PGD_2$ ) se activa la adenilciclase, incrementando la tasa del AMPc, produciendo un aumento del calcio intracelular. Si el estímulo es el óxido nítrico, la enzima activada será la guanilato ciclase, que inducirá un aumento de GMPc y también consecuentemente un incremento del calcio intracelular (150;151).

#### 1.6.4. SINTESIS DE EICOSANOIDES

Denominamos eicosanoides a un amplio grupo de compuestos, heterogéneos en su estructura y con variados efectos biológicos, que en su mayoría derivan de ácidos grasos de 20 átomos de carbono en su cadena, principalmente del ácido araquidónico. Los eicosanoides son sintetizados por distintas células y tejidos, y muestran características específicas de estructura y función, dependiendo de su origen. Son compuestos de bajo peso molecular, que se producen en cantidades muy pequeñas, como consecuencia de un estímulo o perturbación de la célula; son posteriormente liberados al medio extracelular por la célula productora, donde participan en la regulación de varios procesos biológicos, como la inflamación, permeabilidad vascular, regulación del flujo sanguíneo, hemostasia, trombosis...(152).

Desde el punto de vista farmacológico, pueden clasificarse como autacoides, es decir, sustancias que actúan en el microentorno del lugar de producción, y que pueden actuar como activadores o inhibidores de una actividad biológica; esta característica diferencia a los autacoides de las hormonas, que ejercen su acción en un punto distante de donde se producen.

El metabolismo del ácido araquidónico consiste en una secuencia de procesos bioquímicos rápidos, y controlados de forma específica por enzimas, que dan lugar a la producción de cuatro tipos de eicosanoides importantes: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas (153).

La activación plaquetaria induce una liberación de ácido araquidónico, cuya fuente principal es la vía de la fosfolipasa A<sub>2</sub> de la fosfatidilcolina. Otras fuentes de ácido araquidónico son el diacilglicerol y el ácido fosfatídico, resultante de la hidrólisis del inositol vía fosfolipasa C. Se admite generalmente que la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> ocurre posteriormente a una elevación en el calcio citoplásmico, vía síntesis de IP<sub>3</sub> por la fosfolipasa C.

La vía de prostaglandinas y tromboxanos se inicia por la ciclooxigenación del ácido araquidónico para dar lugar al endoperóxido cíclico PGH<sub>2</sub>, siendo la posterior transformación del endoperóxido dependiente de la célula de que se trate. En las plaquetas el endoperóxido se transforma fundamentalmente en tromboxano por la tromboxano sintetasa, o se descompone no enzimáticamente al hidroxiácido de 17 átomos de carbono (HHT) y malondialdehído (MDA). Las plaquetas sintetizan mínimas cantidades de prostaglandinas estables. En cambio las células endoteliales metabolizan el ácido araquidónico por esta vía preferencialmente a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y prostaglandinas estables. Estas vías metabólicas se inhiben, tanto en las plaquetas como en la célula endotelial, por la aspirina, que anula la actividad ciclooxigenasa (154;155).

La oxigenación del ácido araquidónico por la 12-lipooxigenasa plaquetaria, da lugar a la formación de 12-HETE y por la 5-lipooxigenasa de los leucocitos a la síntesis del leucotrieno A<sub>4</sub> (inestable) y a los leucotrienos estables B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>. La 15 lipooxigenasa, oxigena al ácido araquidónico en el carbono 15 para formar un 5,(6) epoxitetraeno inestable. Las lipoxinas, pueden también generarse vía metabolismo transcelular (156;157).

El ácido araquidónico puede también ser metabolizado por una epoxigenasa dependiente del citocromo P-450, que puede insertar un grupo alcoholico en el araquidónico para formar epóxidos con diversas actividades biológicas (158).

Los eicosanoides, particularmente los derivados de la ciclooxygenación de los ácidos grasos, son sustancias reguladoras de los procesos de hemostasia y trombosis. En este sentido, la ciclooxygenación del ácido araquidónico en las plaquetas y su conversión a tromboxano A<sub>2</sub> juega un papel importante en la secuencia de activación trombocitaria, y es además, una sustancia proagregante y vasoconstrictora del endotelio (159).

La evidencia de la importancia de esta ruta metabólica en la secuencia de activación de las plaquetas *in vitro*, demostrada ampliamente en la literatura, participa también de un modo importante en la activación de las plaquetas *in vivo*, como se ha puesto de manifiesto por la asociación del tromboxano A<sub>2</sub> con la enfermedad cardiovascular, donde se ha encontrado una elevación de los metabolitos estables de este eicosanoide (11-dehidro-TXB<sub>2</sub> o 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>) en orina de estos pacientes. Apoyan también esta idea diferentes resultados de ensayos clínicos con la aspirina como fármaco antitrombótico, donde se detecta una disminución significativa de la incidencia de accidentes vasculares oclusivos y trombóticos por la inhibición de la ciclooxygenasa con el fármaco (160;161).

El eicosanoide que se produce en mayor cantidad por las células endoteliales es la PGI<sub>2</sub>, que posee propiedades antiagregantes y vasodilatadoras. por ello, Moncada y Vane propusieron la hipótesis de que el balance PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> es importante para el mantenimiento de un estado anticoagulado. Esta hipótesis implicaría que una alteración del balance entre estas dos moléculas podría predisponer a un estado de la vasculatura caracterizado por un asituación proagregante y de vasoconstricción, que conduciría a la aparición de fenómenos oclusivos (162).



### 1.6.5. METABOLISMO TRANSCELULAR DE LOS EICOSANOIDES

Se ha demostrado de forma fehaciente, que en la síntesis de algunos eicosanoides pueden estar implicados más de un tipo de célula, de forma que el ácido graso precursor, metabolitos intermediarios o productos finales del metabolismo del ácido araquidónico de una célula, pueden ser modificados cualitativa o cuantitativamente por otro tipo de célula, lo que constituye una forma de comunicación bioquímica intercelular, que puede ser importante en procesos como la trombosis y la inflamación, donde se produce la coexistencia, en proximidad física, de varios tipos de células (163).

El metabolismo transcelular parece ser un fenómeno bien regulado, en el cual, la transferencia de compuestos metabólicos muestra una especificidad de sustrato, y también de la dirección de la transferencia de compuestos metabólicos. Así, las plaquetas pueden transferir endoperóxidos a las células endoteliales para ser transformados en prostaciclina, mientras que la transferencia recíproca de  $PGH_2$  de las células endoteliales para la síntesis de  $TXA_2$ , no tiene lugar, a pesar de que, por el contrario, el ácido araquidónico libre endotelial, sí puede ser utilizado para su lipooxigenación por las plaquetas (164).

Más evidencias sobre este metabolismo transcelular son los hallazgos que encontraron que los neutrófilos pueden metabolizar *in vitro* el 12-HETE de origen plaquetario por dos vías diferentes, dependiendo del grado de activación de los mismos, así en los neutrófilos estimulados, que poseen activa la 5-lipooxigenasa, se transforma el 12-HETE a 5S,12S-DiHETE, mientras que los neutrófilos no estimulados metabolizan el 12-HETE a 12,20 DiHETE. Se demuestra también que esta cooperatividad metabólica da lugar a la formación de productos biológicos activos, que ninguna de las células puede sintetizar por si mismas, de un modo independiente (165).

Otro ejemplo lo constituye el metabolismo transcelular de leucotrieno  $A_4$ , producido por los leucocitos polimorfonucleares, siendo transformado a distintos leucotrienos  $B_4$  y  $C_4$  por otras células hematológicas, entre ellas los eritrocitos, lo que constituye una

cooperatividad metabólica, ya que son células que carecen de actividad 5-lipooxigenasa para producir por si mismos leucotrienos (166).

Hay que considerar que para que esta transferencia de sustancias vía metabolismo transcelular tenga lugar, se requiere la proximidad física y/o el fuerte contacto entre células. Esto es particularmente importante si ello tiene lugar en un medio plasmático, donde los ácidos grasos libres y/o los intermediarios metabólicos que se transfieren de una célula a otra, podrían ser “secuestrados” por el plasma o transformados de otro modo, ya que es conocido que al menos uno de sus componentes, la albúmina, puede unir ácidos grasos libres, jugando un papel modulador en el metabolismo del ácido araquidónico, y puede reorientar el metabolismo de algunos eicosanoides.

Los estudios de las Dra. Santos y Vallés, demostraron que los eritrocitos intactos, regulan cualitativa y cuantitativamente la síntesis de eicosanoides plaquetarios, una de las vías centrales de la secuencia de activación trombocitaria. Este efecto eritrocitario, demuestra especificidad, tanto de estímulo, como de sustrato. La modulación de los eicosanoides por los eritrocitos, constituye un mecanismo bioquímico de regulación de la actividad plaquetaria por los hematíes (123).

## **1.7. APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF) AL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA**

Desde que las plaquetas fueron identificadas por primera vez en 1881, ha ocurrido un continuo y lento progreso en nuestro conocimiento acerca de su función (167). A pesar de que las plaquetas son unas células fácilmente accesibles para su estudio, si las comparamos con células no circulantes del organismo, existe una remarcable pobreza de tests clínico útiles para el estudio de su función. Los únicos tests clínicos estandarizados para el estudio de la función plaquetaria son el tiempo de sangría y los estudios de agregometría, los cuales presentan limitaciones importantes (168). Otros tests empleados para el estudio de la función plaquetaria en el ámbito de la investigación clínica incluyen: determinaciones plasmáticas de factor plaquetario 4 (PF4), -tromboglobulina ( -TG), y p-selectina soluble; mediciones en plasma y en orina de los metabolitos del tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), y el método de Wu y Hoak para la detección de agregados plaquetarios circulantes (169). Recientemente se han publicado un número creciente de estudios que han empleado técnicas de citometría de flujo para el estudio de la función plaquetaria, aunque a pesar de las ventajas que presenta, aún persisten múltiples problemas metodológicos, que deben ser resueltos (170).

### **1.7.2. PRINCIPIOS DE LA CITOMETRIA DE FLUJO (CMF)**

La citometría de flujo realiza de forma rápida, la medición de características específicas de un número elevado de células. Antes del análisis citométrico, las células en suspensión son marcadas con un anticuerpo monoclonal fluorescente. En el citómetro de flujo, las células suspendidas atraviesan una cámara de flujo, a una velocidad de 1.000 a 10.000 células por minuto, a tra vés del foused beam de un laser. Después de la activación fluorescente del fluóforo a una determinada longitud de onda, un detector procesa la fluorescencia emitida y las propiedades de light scattering de cada célula (171).

Los estudios clínicos que emplean la citometría de flujo para analizar plaquetas lavadas o plasma rico en plaquetas, son potencialmente susceptibles de activación espúrea, como resultado de los procedimientos de separación requeridos. La introducción de la citometría en sangre total por Shattil y col., ha sido un importante avance hacia la aplicación de la citometría de flujo en el ámbito clínico (170;172).

En ausencia de un agonista plaquetario exógeno, la CMF en sangre total determina el estado de activación de las plaquetas circulantes, medida por la unión de anticuerpos monoclonales (MoAb) dependientes de la activación. Además del estudio de la función plaquetaria in vivo, la inclusión de un agonista exógeno en el ensayo, permite el análisis de la reactividad de las plaquetas circulantes in vitro.

Las ventajas de la citometría de flujo en sangre total son las siguientes. Las plaquetas son analizadas directamente en su entorno fisiológico de sangre total, incluyendo glóbulos rojos y blancos, los cuales interfieren con la activación plaquetaria. La mínima manipulación de las muestras previene la activación artefactual in vitro y la pérdida potencial de subpoblaciones plaquetarias. Se puede estudiar tanto el estado de activación de las plaquetas circulantes, como su reactividad. La citometría de flujo, permite la detección de un amplio espectro de modificaciones en los antígenos de superficie de la membrana plaquetaria, dependientes de la activación de la misma. Además, una subpoblación, tan pequeña como el 1% de plaquetas parcialmente activadas, puede ser detectada por este método. Otra ventaja es que se requiere un volumen mínimo ( $\sim 2\mu$ ) siendo esto de interés en pacientes anémicos. Las plaquetas de pacientes con trombocitopenias severas también pueden ser analizadas de forma eficaz. Otra ventaja añadida es que no emplea radioactividad, lo que sí hacen los radioinmunoensayos que detectan PF4 o -tromboglobulina (173;174).

Entre las desventajas de la citometría de flujo, se encuentran las siguientes: los citómetros de flujo son instrumentos caros de comprar y mantener; para un estudio clínico, la preparación de la muestra es complicada y se requiere un operador especializado; además para evitar la activación plaquetaria ex vivo, las muestras deben ser procesadas dentro de

un plazo corto de tiempo; la CMF sólo mide la función de las plaquetas circulantes, mientras que los estudios plasmáticos de PF4 o  $\beta$ -tromboglobulina, y los análisis en plasma y orina de los metabolitos del tromboxano A<sub>2</sub>, también reflejan la activación plaquetaria en la pared capilar y la de plaquetas recientemente aclaradas de la circulación. Así, en estados donde las plaquetas sean rápidamente aclaradas, o hiperadherentes a la pared vascular o a circuitos extracorpóreos, la CMF puede no detectar evidencia de activación plaquetaria. Por ejemplo, durante la circulación extracorpórea, la CMF muestra sólo una modesta activación plaquetaria, mientras los análisis de PF4 o  $\beta$ -tromboglobulina son consistentes con una marcada activación de las plaquetas (173;174).

## **1.7.2. ANALISIS DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA**

El proceso de activación plaquetaria es una respuesta mediada por receptores a una variedad de estímulos específicos originados ya desde proteínas activadas de la cascada de la coagulación (p.ej trombina), proteínas de la matriz subendotelial (p.ej colágeno), o mediadores específicos tales como ADP, epinefrina o PAF. Las señales mediadas por el receptor conducen a flujos iónicos, hidrólisis del fosfoinositol y fosforilación proteica, que regula la reorganización del citoesqueleto, el cambio de forma celular, la redistribución de las glicoproteínas, expresión de superficie procoagulante y la reacción de liberación (175).

### **1.7.2.1. Parámetros de CMF de activación plaquetaria**

Una de las respuestas más tempranas en la fase inicial de la activación plaquetaria, es un aumento en el  $Ca^{++}$  citosólico, que puede ser medido como la alteración de la intensidad de fluorescencia del marcador intracelular ión-sensible Fluo-3 o Indo-1. Sin embargo, estos flujos de  $Ca^{++}$  son rápidamente revertidos, lo que hace el análisis cuantitativo difícil. Otro evento inducido tempranamente por los agonistas, es la polimerización de la G-actina a largos filamentos de F-actina durante la reorganización del citoesqueleto. Un aumento del contenido de F-actina puede ser detectado con derivados faloídnicos fluorescentes tras la permeabilización plaquetaria. Una vez que se reorganiza el citoesqueleto celular tras la

activación, las plaquetas pierden su forma discooidal, y este cambio de forma reversible, está asociado con cambios en las características de *cellular forward* y *right angle light scattering*. La citometría de flujo de estos cambios es, sin embargo, altamente dependiente de los instrumentos ópticos y del tipo de análisis de datos empleados, de forma que es difícil de estandarizar como parámetro de activación plaquetaria (176).

La activación plaquetaria *in vitro* está asociada con un descenso del número de complejos GPIb/IX en la superficie plaquetaria, que son redistribuidos en el sistema canalicular abierto de las plaquetas. Por otro lado, la activación plaquetaria conduce a un aumento en el número de complejos GPIIb/IIIa en la superficie de la plaqueta, debido a una redistribución desde los *pooles* intracelulares como son las organelas (storage organelle membranes). La expresión de la superficie procoagulante, es el resultado de un mecanismo flip-flop en los fosfolípidos aniónicos (predominantemente fosfatidilserina) de la capa interior a la exterior, de la bicapa lipídica, formando un substrato de unión para el complejo protrombinasa. Este cambio puede ser detectado empleando anticuerpos para los factores de coagulación Va o VIIIa, o mediante la unión de anexina-V marcada con fluorocromo (177-180).

Tras la activación plaquetaria, los complejos GPIIb/IIIa de la superficie plaquetaria, sufren cambios conformacionales generando neoepítomos detectables usando anticuerpos monoclonales tales como el PAC-1. La unión de ligandos específicos tales como el fibrinógeno al GPIIb/IIIa siguiendo la activación, resulta en la generación de sitios de unión inducidos por el ligando (ligand-induced binding sites-LIBS) y sitios de unión inducidos por el receptor (receptor-induced binding sites-RIBS) en este receptor de superficie que pueden ser detectados además usando anticuerpos monoclonales capaces de reconocer estos epítomos inducidos por la activación (181;182).

Han sido caracterizados tres glicoproteínas de membrana en los lisosomas plaquetarios: el antígeno CD63 o proteína de membrana integral del lisosoma, la LAMP-1 y la LAMP-2. Y tres proteínas de membrana asociadas a los gránulos alfa, la p-selectina, GMP-33 y GPIIb/IIIa. Tras la activación plaquetaria, la p-selectina y el GMP-33 son

expresadas en la membrana plasmática por fusión de la membrana del gránulo alfa con la membrana plasmática. El GMP-33, una glicoproteína de membrana de 33,000 Dalton, es específica de las plaquetas. Se ha sugerido que la membrana de los gránulos alfa contiene otros receptores adicionales, que están además presentes en la membrana de las plaquetas: CD-9, PECAM-1 (CD31), GPIV (CD36), y pequeñas cantidades del complejo GPIb/IX/V. Sin embargo, se requiere un análisis cuidadoso para detectar bajos niveles de expresión de estos antígenos, que pueden ser difíciles de separar de señales artefactuales y depende de los instrumentos y de los fluorocromos. Los gránulos densos muestran tras la activación plaquetaria tres proteínas de membrana, la CD63, la LAMP-2 ambos asociados a los lisosomas, y la p-selectina, asociada fundamentalmente a los gránulos alfa. Marcadores específicos de los gránulos densos, aún no se han detectado, sin embargo, la liberación de los gránulos densos puede ser determinada por un descenso en la tinción mepacrina (183-187).

#### **1.7.2.2. Analisis de la activación plaquetaria *in vivo***

Un proceso trombótico *in vivo*, caracterizado por un aumento de deposición de plaquetas en lugares de lesión vascular o activación endotelial, puede llevar directamente a un número aumentado de plaquetas activadas en la circulación. Un fenotipo plaquetario activado puede además reflejar defectos metabólicos intrínsecos, así ocurre en la diabetes. Para prevenir una activación plaquetaria artefactual, que puede ocurrir durante la venopunción, transporte o almacenamiento de la sangre, las muestras de sangre total pueden ser estabilizadas empleando antagonistas de la activación plaquetaria o usando fijadores en los casos en que la realización del análisis citométrico no es factible en un corto período de tiempo (170;174).

El más bajo límite de detección de la activación plaquetaria empleando técnicas de citometría de flujo, con anticuerpos contra el GPIIb/IIIa activado o contra la p-selectina, es de un 1%, en una población de plaquetas estimuladas o no estimuladas. Sin embargo, en diferentes alteraciones clínicas con activación plaquetaria *in vivo*, la fracción de plaquetas circulantes activadas puede incluso ser más baja y en estos casos, este tipo de análisis no es

lo suficientemente sensible para detectar una activación plaquetaria *in vivo*. Recientemente se ha demostrado en un estudio animal, que las plaquetas degranuladas circulantes, rápidamente pierden su p-selectina de superficie *in vivo*, pero ésta continúa circulando, probablemente en un estado de activación. Si esto se extrapolara a los humanos, las plaquetas degranuladas podrían no ser detectables por anticuerpos anti-p-selectina, durante todo el tiempo que estén circulando. Sin embargo, la expresión transitoria de antígenos de superficie, no es única para la p-selectina. En particular, la unión del fibrinógeno revierte incluso más rápidamente cuando las plaquetas se desactivan y vuelven a un estado de descanso *in vitro*. Consecuentemente, la expresión de algunos, o posiblemente todos los neoepítomos asociados con la activación del complejo GPIIb/IIIa podrían ser reversibles. El tiempo que específicamente cada marcador de activación permanece siendo expresado en la superficie plaquetaria *in vivo* aún no ha sido determinado adecuadamente. Así, cual de los marcadores de activación de los que hemos hablado, son más útiles para determinados ámbitos clínicos, es aún materia de debate. De forma similar, la sensibilidad relativa de la citometría de flujo para la detección de activación plaquetaria, comparada a métodos tales como la determinación plasmática de  $\beta$ -tromboglobulina, PF4 o metabolitos del tromboxano A2 en plasma u orina, parece ser altamente dependiente de la patología así como de la metodología empleada. Especialmente, la sólo recientemente introducida técnica de CMF en sangre total, espera una evaluación diagnóstica (170;188-190).

### **1.7.2.3. Análisis de la reactividad plaquetaria *in vitro***

Un efecto “priming”, es decir, una respuesta aumentada a una determinada estimulación, ha sido discutida como una potencial manifestación indirecta de un bajo grado de preactivación plaquetaria en los síndromes protrombóticos. Tal fenómeno de “priming”, puede ser analizado basándonos en la estimulación *in vitro* de plaquetas con bajas cantidades predefinidas de agonista. Agonistas estandarizados, como el ADP, permiten una graduación altamente reproducible en la activación *in vitro*. Los ensayos pueden realizarse bajo condiciones no agregantes, en sangre total diluída, permitiendo el análisis de incluso un mayor grado de activación plaquetaria, independientemente de las pérdidas celulares selectivas. La activación *in vitro* facilita el análisis citométrico de la



activación plaquetaria comparado con el análisis de las sólo mínimamente alterado fenotipo, correlacionandolo con la activación *ex vivo*. La inestabilidad plaquetaria limita significativamente el análisis de la activación plaquetaria *in vitro*, que requiere acortar lo máximo posible el tiempo desde la venopunción al análisis (170;173;174).

#### **1.7.2.4. Estudios indirectos relacionados con la función plaquetaria**

Unión a leucocitos: la expresión de CD62P (p-selectina) por parte de las plaquetas activadas, juega un papel fundamental en la adhesión heterotípica de las plaquetas a los leucocitos y así, tanto a neutrófilos como a monocitos, se pueden unir a través de receptores como sialil-CD15 en lugares de trombosis, en la lesión vascular. El fibrinógeno unido a plaquetas, interactuando con los receptores del neutrófilo CD11c/CD18, conduce a una mayor activación neutrofílica. Más aún, el CD102 (ICAM-2) que es expresado de forma constitutiva en las plaquetas en descanso y en las activadas a un nivel similar, es un ligando potencialmente importante para la integrina-2 leucocitaria CD11a/CD18. Una activación de neutrófilos y un aumento concomitante del recambio plaquetario durante el síndrome séptico, puede tener una importante relevancia fisiopatológica para las interacciones plaqueta-neutrófilo. Los agregados plaqueta-neutrófilo, o plaqueta-monocito, analizados empleando técnica multicolor, representan importantes parámetros diagnósticos que deben ser evaluados (191-193).

Micropartículas: las micropartículas plaquetarias son vesículas que expresan glicoproteínas específicas de las plaquetas, que derivan de las membranas plasmáticas de las plaquetas como resultado de la activación celular. Debido a su actividad procoagulante, estas micropartículas representan un indicador importante de complicaciones trombóticas. La concentración de micropartículas determinada por citometría de flujo es un indicador de la activación plaquetaria, en patologías vasculares. Un gran problema en el análisis de las micropartículas, aún, es la discriminación de las plaquetas basada en características de *light scattering*, lo que resulta difícil para la estandarización entre diferentes instrumentos (194-196).

## 1.8. INTERACCION ERITROCITOS-PLAQUETAS

Existe una creciente evidencia de que el proceso de trombosis es un fenómeno multicelular, en el que si bien, la plaqueta tiene un papel central, su función se ve modulada por otras células sanguíneas. En este capítulo revisaremos las evidencias, tanto clínicas como experimentales, que demuestran el papel de los eritrocitos en la modulación de los procesos de trombosis y/o hemostasia.

### 1.8.1. ESTUDIOS CLINICOS

Fue Duke, en 1910, el primero en sugerir una posible participación de los eritrocitos en el sistema hemostático, al describir la existencia de una prolongación del tiempo de sangría en los pacientes con anemia, que se normalizaba después de la transfusión de hematíes (197). Hellem et al., retomaron el tema en 1961, confirmando la observación de Duke, al observar que el tiempo de sangría, en efecto, se encontraba alargado en pacientes anémicos, y que este se reducía después de una transfusión de eritrocitos lavados, a pesar de que el número de plaquetas en los pacientes se redujo un 20% (198).

Estudios clínicos más recientes, confirman también esta asociación entre el tiempo de sangría y el hematocrito. Así, Livio *et al.*, encontraron una correlación lineal inversa y significativa, entre ambos parámetros en pacientes urémicos, y también en otro grupo de pacientes cuya anemia no estaba asociada a la uremia. Esta elevada correlación entre hematocrito y tiempo de hemorragia en pacientes urémicos ha sido descrita también por Fernandez *et al.* en pacientes con más de 100.000 plaquetas/ $\mu$ l, y por Small *et al.*, que incluyen en su estudio tanto sujetos anémicos como policitémicos. Más recientemente se ha referido de nuevo la existencia de esta relación en un grupo heterogéneo de 569 pacientes hematológicos, con alteraciones hemorrágicas. Todo ello avala una clara asociación clínica entre hematíes y hemostasia (199-202).

Hemos referido ciertas evidencias de una relación entre eritrocitos y hemostasia. A continuación, mostraremos ciertas observaciones clínicas que sugieren una participación de los eritrocitos en los fenómenos trombóticos.

En este sentido, se ha descrito en pacientes con cardiopatía isquémica la presencia de un hematocrito elevado. También se ha referido en la literatura un mayor riesgo de aparición de fenómenos trombóticos, tanto venosos como arteriales, en pacientes con policitemia vera, y de un aumento en la incidencia de infarto cerebral en pacientes con hematocritos elevados (203-205). El aumento del hematocrito se ha correlacionado con el grado de oclusión carotídea, la aterosclerosis coronaria y el tamaño del infarto (206).

Asimismo, se ha descrito un acortamiento del tiempo de sangría y un aumento de la adhesión de las plaquetas al vidrio, en pacientes con infarto de miocardio –aspectos que dependen del hematocrito. También se ha referido la existencia de una relación directa entre el hematocrito y la presión sanguínea, y se ha postulado que el hematocrito podría constituir por sí mismo un factor de riesgo primario de trombosis (207;208).

Se ha planteado también una relación entre los eritrocitos y el vasoespasmo cerebral, particularmente en la hemorragia subaracnoidea. Se sugiere que entre los posibles efectores de esta acción eritrocitaria pudieran encontrarse la hemoglobina, los peróxidos lipídicos –que se han encontrado elevados en el plasma de pacientes con hemorragia subaracnoidea-, o el óxido nítrico, importante sustancia vasodilatadora que se encuentra disminuído en esta entidad (209).

Todos estos datos de la literatura, sugieren evidencias de la participación de los eritrocitos en la hemostasia y en los procesos vasculares trombóticos.

### **1.8.2. ESTUDIOS EXPERIMENTALES**

Se ha demostrado en diferentes sistemas experimentales que describiremos a

continuación, la influencia de los eritrocitos sobre el proceso trombótico. En este sentido, Born et al. refieren el papel esencial de los eritrocitos en la hemostasia experimental, valorada por ellos en tubos de plástico perforados; encontrando que ésta no tiene lugar cuando se perfunde a través de este conducto sólo plasma rico en plaquetas, pero sí se produce en presencia de eritrocitos, y que la formación de este tapón hemostático, se reduce si se tratan los eritrocitos con clorpromacina, sustancia que entre otros efectos estabiliza las membranas eritrocitarias (210).

Se ha descrito posteriormente un incremento en la trombogénesis en sistemas experimentales de perfusión sobre endotelio de conejo, por la presencia de eritrocitos. Se comprobó, además, una disminución en el efecto de la aspirina sobre la adhesión plaquetaria, en presencia de eritrocitos, lo que sugiere un papel de los eritrocitos en favorecer la adhesión de las plaquetas al endotelio, y podrían modificar el efecto de las drogas antitrombóticas como la aspirina (211;212).

Más recientemente utilizando animales de experimentación vivos, encuentran que el volumen del trombo hemostático aumenta entre 3 y 6 veces al modificar el hematocrito entre el 25 y el 50%, dependiendo de las condiciones de flujo locales (213).

### **1.8.3. MECANISMOS DE PARTICIPACION DE LOS ERITROCITOS EN LA TROMBOSIS**

El efecto de los eritrocitos favoreciendo la formación del trombo, se ha atribuído en general, a mecanismos físicos y también a mecanismos bioquímicos, aunque estos últimos se encuentran tradicionalmente han sido menos explorados. En este sentido habría que considerar la contribución de los eritrocitos a las propiedades hemorreológicas de la sangre, particularmente a la viscosidad sanguínea; su efecto sobre la difusividad de las plaquetas –favoreciendo el contacto plaqueta-endotelio- y también, la acción directa de los eritrocitos sobre los distintos aspectos de la función de las plaquetas.

### 1.8.3.1. Aspectos hemorreológicos y mecánicos

La reología es un componente importante a tener en cuenta en la formación de los trombos sanguíneos, y también de la placa de ateroma, sobre la cual se puede formar un trombo mural. En este último caso, la importancia del papel del flujo sanguíneo, se infiere por el carácter focal de la formación de las alteraciones vasculares, que tienen lugar, en general, en zonas de flujo sanguíneo alterado y/o en zonas de bifurcación de los vasos. Las alteraciones hemodinámicas, también pueden contribuir a la denudación del endotelio, que es asimismo, un factor importante en el inicio de las enfermedades vasculares (214).

La viscosidad sanguínea es uno de los parámetros hemorreológicos más importantes, que depende de la viscosidad plasmática, del número de leucocitos, del hematocrito y de distintas propiedades físicas de los hematíes. La viscosidad sanguínea se define como el cociente entre la fuerza de cizallamiento (“*shear stress*”) y la velocidad de cizallamiento (“*shear rate*”), y varía con la velocidad del flujo; a baja velocidad de flujo, aumenta la viscosidad de la sangre por la formación de un apilamiento (“*rouleaux*”) de eritrocitos, mientras que a velocidades de flujo elevado, disminuye la viscosidad sanguínea por la desaparición de estos “*rouleaux*” (215).

La formación de este apilamiento o agregación eritrocitaria, es un proceso dinámico y reversible, que tiene lugar cuando macroproteínas del plasma actúan como puente de unión entre los eritrocitos, proceso que depende, entre otras cosas, del hematocrito, tamaño y deformabilidad eritrocitaria, de las fuerzas de cizallamiento y del equilibrio entre las fuerzas de atracción y repulsión entre las células. El flujo y la viscosidad sanguíneas determinan condiciones que afectan el comportamiento de las plaquetas. Por ejemplo, la velocidad del flujo sanguíneo, determina el número de plaquetas que pasa por un determinado punto del árbol vascular, y también, el tiempo de que disponen las plaquetas para interactuar con el endotelio, y la fuerza y frecuencia de esta interacción; también condiciona las colisiones de las plaquetas entre sí, y con otros elementos formes de la sangre (216).

La adherencia de las plaquetas al vaso, depende de la viscosidad sanguínea, y ésta aumenta marcadamente por la presencia de eritrocitos. Por lo tanto, los eritrocitos pueden, mediante estos mecanismo físicos, influir en el movimiento y en la distribución de las plaquetas en un sistema de flujo. Si las plaquetas fuesen las únicas células de la sangre, circularían por el centro del vaso y se producirían pocas colisiones entre sí o con el endotelio, pero la presencia de los eritrocitos, células grandes que ocupan por su tamaño el centro del conducto, fuerza a las plaquetas a circular más próximas a la periferia del vaso, favoreciendo la interacción plaqueta-endotelio. Además, el movimiento irregular de los eritrocitos, por su geometría, facilita la colisión de los mismos con las plaquetas, y el que se establezca un movimiento radial de las mismas en dirección a las paredes del vaso sanguíneo, facilitando el contacto plaqueta-vaso. Este efecto es el que se conoce como difusividad de las plaquetas (217).

El aumento de la difusividad de las plaquetas incrementa, además de las interacciones plaqueta-endotelio, las colisiones celulares en la sangre entre sí favoreciendo el contacto célula-célula. Este efecto parece ser dependiente de las condiciones de flujo, del hematocrito, del tamaño eritrocitario y de su deformabilidad. La participación física de los eritrocitos en la difusividad de las plaquetas, se ha puesto de manifiesto en distintos tipos de sistemas experimentales de flujo, utilizando materiales sintéticos, vidrio recubierto de proteínas, o tejidos endoteliales de animales de experimentación. El aumento de difusividad de las plaquetas, favorece los procesos de adhesión-agregación y es dependiente del hematocrito, del tamaño, y en menor medida de la deformabilidad eritrocitaria. Un aumento del tamaño, o una disminución de la deformabilidad eritrocitaria, aumenta la difusividad de las plaquetas hacia el endotelio (218;219).

La geometría del vaso, también contribuye a las condiciones hemorreológicas, y puede condicionar la aparición del fenómeno trombótico. En efecto, alteraciones del flujo sanguíneo ocasionadas por ramificaciones de los vasos, placas de ateroma o trombosis murales, pueden producir zonas de remolinos o de estancamiento de sangre, que facilitan el contacto célula-célula y la generación de factores plasmáticos procoagulantes que contribuyen a la trombosis. Las alteraciones de flujo, a su vez producen modificaciones en

las fuerzas de cizallamiento: si estas son altas, podrían inducir una activación directa de las plaquetas, y si por el contrario son muy bajas, pueden predisponer a que se produzca más fácilmente la coagulación de la sangre (220).

Por lo tanto, los eritrocitos podrían, mediante estos mecanismos físicos, favorecer la trombogénesis, regulando aspectos de la adhesividad plaquetaria, por ejemplo, el número de plaquetas que llegan y que se separan del endotelio, su activación directa por fuerzas de cizallamiento, o incrementando la frecuencia de las colisiones plaqueta-plaqueta y la eficiencia de las mismas para formar un trombo. También se sugiere que las plaquetas podrían activarse por la propia colisión con los eritrocitos, quedando unidas a la superficie de los mismos; de este modo, las plaquetas inicialmente unidas al glóbulo rojo, podrían actuar como punto de anclaje para la formación de un trombo plaquetario (221;222).

### **1.8.3.2. Efectos de los eritrocitos sobre los sistemas tromborreguladores del vaso**

Una característica importante del endotelio, es su capacidad para limitar o revertir el acúmulo de plaquetas sobre un vaso dañado. Este proceso se conoce como tromborregulación, y por lo que hasta ahora se conoce, está basado en tres sistemas reguladores: los eicosanoides, especialmente la prostaciclina, el óxido nítrico, y las ecto-ADP-asas. Los eritrocitos podrían favorecer los procesos trombóticos, por su capacidad para inactivar dos de estas defensas: la prostaciclina y el óxido nítrico, desconociéndose si los eritrocitos afectan o no a las ecto-ADP-asas (223).

La prostaciclina es una sustancia antiagregante y vasodilatadora, que al incubarse con sangre total, se une fundamentalmente a los eritrocitos, los cuales a continuación la degradan e inactivan. Así, se ha demostrado que la presencia de eritrocitos, reduce el efecto inhibidor de esta sustancia en plaquetas estimuladas con colágeno (224).

El óxido nítrico (NO) es también una sustancia vasodilatadora, con efecto antiagregante plaquetario, que se libera de las células endoteliales en respuesta a diversos estímulos, como la acetilcolina o la bradiquinina. Uno de los inhibidores más efectivos in

vitro del NO es la hemoglobina ya sea libre, o cuando está contenida en los eritrocitos. En este sentido, Houston et al., encontraron que el efecto inhibitor del NO sobre la agregación de las plaquetas, desaparece en presencia de un número de eritrocitos que sea superior al 10%; este efecto es probablemente debido a que el NO, que es un gas, es fácilmente permeable al interior de la célula, siendo allí inactivado por la hemoglobina. Este efecto eritrocitario, es posible que neutralice una gran parte del efecto antiplaquetario del NO, y contribuya al efecto protrombótico de los eritrocitos. No obstante, teniendo en cuenta que los eritrocitos, circulan preferentemente por el centro del vaso, el NO vascular podría seguir inhibiendo la adhesión de las plaquetas al endotelio, y por tanto prevenir la indicación del trombo. Cabría pensar, que este efecto inhibitor de los eritrocitos y de la hemoglobina sobre el EDRF/NO vascular, pudiese tener especial relevancia en patologías que presentan hemolisis vascular, y donde se detecta una alta incidencia de trombosis, como por ejemplo, en la hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) o en procesos asociados a la hemorragia y el vasoespasmo, como la hemorragia subaracnoidea (225-227)

### **1.8.3.3. Efectos de los eritrocitos sobre la función plaquetaria**

Hellem et al., demostraron el efecto incrementador de los eritrocitos sobre la adhesividad plaquetaria al vidrio. posteriormente se confirmó este hallazgo y se hizo extensible a la adhesividad de las plaquetas al endotelio de animales de experimentación o a otras superficies sintéticas. Además de favorecer los procesos adhesivos de las plaquetas, se ha referido que los eritrocitos favorecen la agregación espontánea de las mismas, y la inducida por diferentes inductores fisiológicos (198;228;229).

Otros autores, encuentran que los eritrocitos disminuyen la progresión de un trombo plaquetario preformado, en un sistema de flujo a baja velocidad, y sugieren que los eritrocitos podrían de este modo, por una parte, aumentar la adhesión y agregación plaquetaria inicial, y reducir, posteriormente, mediante un efecto mecánico, el crecimiento masivo del trombo para evitar la embolización. También existen autores que, contrariamente a lo anteriormente referido encuentran que los eritrocitos reducen, o no modifican la agregación plaquetaria. Un factor común de estos estudios, es que en todos



ellos se utiliza el método de impedancia o agregometría electrónica, como método para la evaluación del efecto de los eritrocitos. Estos resultados discordantes podrían deberse a una limitación de dicho método, ya que eritrocitos y leucocitos pueden interferir físicamente con las plaquetas en el electrodo (230) (231).

#### **1.8.3.4. Mecanismos bioquímicos de la interacción eritrocito-plaqueta.**

Los mecanismos bioquímicos que regulan la interacción eritrocito-plaqueta, podrían clasificarse fundamentalmente, en dos grupos: a. el eritrocito libera una sustancia proagregante al microentorno celular, y b. el eritrocito elimina del mismo un compuesto antiagregante favoreciendo, por tanto, una mayor respuesta de las plaquetas.

##### a. Liberación por los eritrocitos de sustancias activadoras para las plaquetas:

Entre los mecanismos bioquímicos por los que el eritrocito podría potenciar la función de las plaquetas, hay que considerar en primer lugar, la liberación por los hematíes de adenosin difosfato (ADP). La liberación de ADP por los eritrocitos, se atribuye generalmente, a la lisis eritrocitaria y a la subsiguiente liberación del nucleótido al medio extracelular. Este concepto tiene su origen en la observación de que los eritrocitos incrementan la adhesividad de las plaquetas al vidrio, y posteriormente, el mismo grupo de investigadores, encontraron que la fracción activa de un lisado eritrocitario analizada por cromatografía, era el ADP; por tanto estos autores concluyeron que la liberación de ADP por daño celular, podría jugar un papel fisiológico en la hemostasia y la trombosis. A pesar de que la liberación de ADP por lisis eritrocitaria es una idea generalmente admitida en la actualidad, también existen dudas razonables de que la lisis eritrocitaria y la liberación de ADP por este mecanismo, sea la única vía bioquímica por la que los eritrocitos potencian la función de las plaquetas (198;232).

Apoyan dichas dudas el hecho de que se encontró un efecto similar por parte de las membranas eritrocitarias que de las células enteras, a pesar de que estas membranas tienen un 0.1% del ADP de los eritrocitos intactos. Por tanto, aunque los datos de la literatura establecen que el ADP eritrocitario es un mecanismo bioquímico que participa en el efecto

de los eritrocitos sobre las plaquetas, no parece consistente que sea el único mecanismo involucrado (211).

b. Eliminación por el eritrocito de una sustancia antiagregante:

Se ha propuesto la posibilidad de que el efecto protrombótico de los eritrocitos pudiese estar mediado por la liberación de un inhibidor plaquetario por parte de las propias plaquetas durante su activación. Así, la adenosina, un inhibidor de la agregación plaquetaria, podría formarse en el microentorno de las plaquetas activadas por la degradación del ADP y del ATP, y la adenosina así formada podría ser eliminada rápidamente del microentorno celular por los eritrocitos. de este modo los eritrocitos actuarían de un modo protrombótico, favoreciendo la reactividad plaquetaria (233).

Las plaquetas también producen óxido nítrico que ejerce un efecto inhibidor sobre la reactividad plaquetaria, que a su vez es inhibido por los eritrocitos. Cabe, por tanto considerar que el efecto inhibidor de estos compuestos antiagregantes pudiese contribuir a su efecto estimulador de la reactividad plaquetaria (225;226).

Las Dras. T. Santos y J. Vallés, han investigado y profundizado en los mecanismos bioquímicos de la interacción eritrocito-plaqueta, demostrando con la utilización de un sistema experimental de activación –reclutamiento los siguientes hallazgos: Se comprueba que los eritrocitos intactos incrementan tanto la activación como el reclutamiento plaquetario, por incremento en la liberación de gránulos alfa, gránulos densos y por el incremento en la síntesis y liberación de eicosanoides. Los eritrocitos intactos regulan cualitativa y cuantitativamente la síntesis de eicosanoides plaquetarios: incrementan la movilización de los ácidos araquidónico y eicosapentanoico, y modulan la ciclooxigenación y la lipooxigenación de estos ácidos grasos. Estos efectos eritrocitarios demuestran especificidad, tanto de estímulo, como de sustrato. Adicionalmente, los eritrocitos incrementan la tasa de estos ácidos grasos en forma libre, que podrían ser utilizados por otras células próximas vía metabolismo transcelular. También detectaron que la interacción eritrocito-plaqueta resulta en un aumento de nucleótidos de adenina en el microentorno celular, particularmente de ADP y ATP, posiblemente liberados por los hematíes por un

mecanismo aún no esclarecido, pero en ausencia de lisis celular. El hecho de que los eritrocitos incrementen la activación de las plaquetas incluso en presencia de aspirina, eliminación metabólica de ADP y/o inhibición proteolítica, demuestra la existencia de mecanismos bioquímicos adicionales reguladores de esta interacción celular, aún no esclarecidos (234).

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Como hemos mencionado en la introducción, la sepsis y el síndrome de disfunción multiorgánico (SDMO) son la principal causa de morbilidad y mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos. La sepsis grave se caracteriza a nivel inmunológico, por la liberación de una cascada de mediadores inflamatorios sistémicos, que contribuyen al desarrollo de la disfunción orgánica. Las plaquetas están involucradas en la defensa inflamatoria inespecífica, y la activación del sistema plaquetario puede jugar un papel en la patogénesis del SDMO, de hecho, en estos pacientes han sido observadas anormalidades en la función plaquetaria. Se ha puesto en relación la activación plaquetar multicausal, en la sepsis, la trombosis de la microvasculatura, y el paro circulatorio (*circulatory arrest*) que ocurre en los órganos más frecuentemente involucrados en el síndrome de disfunción multiorgánica.

Sabemos también, que la formación del trombo es un proceso multicelular, en el que participan no sólo las plaquetas sino también otras células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos) y las células endoteliales, así como diferentes productos liberados por estas células (citoquinas...), que modularán dicho fenómeno trombótico.

Hemos diseñado dos estudios que analizan aspectos diferentes del mismo tema, y cuyos objetivos a continuación describimos.

### **2.1. ESTUDIO 1: “Análisis de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y fracaso multiorgánico, empleando técnicas de citometría de flujo, y su relación con parámetros clínicos y evolutivos”.**

1. La función plaquetaria es fuertemente dependiente de las glicoproteínas expuestas en la superficie de las plaquetas activadas. El empleo de las técnicas de citometría de flujo en sangre total, recientemente descritas, nos permitirán detectar el grado de exposición de

los marcadores de activación plaquetaria P-selectina y PAC-1. Además podremos determinar cuántas de las plaquetas de estos pacientes se encuentran libres y cuántas están formando parte de agregados plaquetares, profundizando así en la interacción plaqueta-plaqueta.

2. El conocimiento de las interacciones entre las plaquetas y otras células inflamatorias, nos permite profundizar en el papel fisiopatológico de estas interacciones. Nosotros mediremos por técnicas de citometría de flujo en sangre total, las interacciones entre plaquetas y leucocitos, por medio de la determinación de los agregados leucoplaquetares.
3. Se determinará la relación que pudiera existir entre los diferentes marcadores de activación plaquetaria descritos en los dos puntos anteriores, y diferentes parámetros clínicos y de evolución de los pacientes, tanto referidos al grado de disfunción multiorgánico, medible por diferentes sistemas de puntuación, como a la mortalidad de dichos pacientes. Estudiaremos la bondad de estos marcadores de activación plaquetaria como predictores de evolución.
4. El desarrollo de este estudio posibilitará la validación de una técnica recientemente descrita, la citometría de flujo en sangre total, según un protocolo modificado en nuestro laboratorio, para el estudio plaquetario en el ámbito de la sepsis, así como la posible utilización en la práctica clínica de dicha técnica.

## **2.2. ESTUDIO 2: “Modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes en la sepsis: análisis *in vitro* del papel regulador de las interleuquinas (IL) 1 $\beta$ , 6 y 10, sobre dicha reactividad”.**

1. Como hemos descrito anteriormente, el proceso trombótico es un fenómeno multicelular, en el que diferentes tipos celulares pueden modular la función plaquetar.

De forma tradicional se ha minusvalorado el papel que juega el eritrocito en la modulación de la trombogénesis. Estudiaremos el efecto de la interacción eritrocito-plaqueta, en un sistema experimental ya descrito, que se ha demostrado eficaz para el estudio de la reactividad plaquetaria. Dicho sistema evalúa el efecto de los eritrocitos sobre la liberación de gránulos densos plaquetares (activación), y sobre la capacidad proagregante de los liberados celulares (reclutamiento). Analizaremos el papel de los eritrocitos procedentes de pacientes sépticos sobre la reactividad plaquetar.

2. Los avances en biología molecular e inmunología, han permitido el análisis de los diferentes mediadores inflamatorios involucrados en el síndrome de respuesta inflamatorio sistémico disparado por la sepsis. Parte importante de esta cascada la constituyen diferentes sustancias (citoquinas) liberadas por los leucocitos. El papel que juegan dichas citoquinas en el proceso trombótico, no está lo suficientemente estudiado. Hemos seleccionado a las interleuquinas 1 , IL-6 e IL-10, para estudiar *in vitro* su efecto sobre la agregación plaquetaria, estudiada por agregometría óptica.
3. El concepto de trombosis como fenómeno multicelular, nos invita a profundizar en sus mecanismos reguladores. Asimismo, empleando el sistema experimental descrito para el estudio de la interacción eritrocito-plaqueta sobre la reactividad plaquetar, analizaremos, la modulación que las interleuquinas 1 , IL-6 e IL-10, ejercen sobre la capacidad protrombótica de los eritrocitos.

# **3. MATERIAL Y MÉTODO**



### **3. MATERIAL Y MÉTODO**

#### **3.1. MATERIAL Y METODO EMPLEADO EN EL ESTUDIO 1: “Análisis de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y fracaso multiorgánico; relación con parámetros clínicos y evolutivos”**

##### **3.1.1. DEFINICIÓN DE PACIENTES**

La casuística para la elaboración de nuestro estudio ha sido obtenida del estudio de un grupo de 68 pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital General Universitario Vall d’Hebron de Barcelona, entre los meses de Enero de 1999 y Enero del 2000. Dicha UCI es una unidad de medicina intensiva polivalente que dispone de 32 camas, en un hospital de tercer nivel. Los grupos de estudio los han constituido: un grupo de 23 pacientes con criterios de sepsis grave, y otro grupo de 23 pacientes diagnosticados en el momento del estudio de sepsis no grave; el grupo control lo han conformado 22 pacientes de UCI, sin evidencia de infección. Previamente a la realización de este estudio, se han establecido las normalidades de las técnicas para nuestro laboratorio, en base al análisis de muestras de 20 donantes sanos, con estudio de hemograma y bioquímica normales, y ausencia de ingesta de fármacos que pudieran afectar a la función plaquetaria –fundamentalmente AAS y AINEs- en los 15 días previos.

##### **3.1.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN**

Para las definiciones de sepsis no grave y de sepsis grave, emplearemos los criterios publicados tras la Conferencia de Consenso de la “American College of Chest Physicians” y la “Society of Critical Care Medicine” , en 1992 (2).

###### **3.1.2.1. Criterios de inclusión**

A.Grupo de sepsis no grave: presencia de respuesta sistémica a la infección, manifestada por dos o más de las siguientes condiciones –que deben representar una alteración aguda con respecto a la basal, en ausencia de otras causas que la justifiquen-.

1. Temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  ó  $<36^{\circ}\text{C}$ .
2. Frecuencia cardíaca  $> 90$  latidos / minuto.
3. Frecuencia respiratoria  $> 20$  respiraciones / minuto  
o  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg.
4. Leucocitosis  $> 12000$  células /  $\mu\text{l}$ , o leucopenia  $< 4000$  células, o  $> 10\%$  bandas.

B.Grupo de sepsis grave: si a los criterios anteriores se añaden evidencia de disfunción orgánica, hipoperfusión tisular, o hipotensión arterial sistémica. La hipotensión arterial se define como una presión arterial sistólica menor o igual a 90 mmHg, o una disminución mantenida en la presión arterial sistólica a pesar de una adecuada restitución de líquidos y en ausencia de agentes antihipertensivos, así como si fuera necesario el uso de drogas vasopresoras para mantener una presión sistólica sobre 90 mmHg. Las alteraciones de la perfusión tisular pueden incluir, pero no están limitadas, a la acidosis láctica, oliguria ( $<20$  ml/h) o alteración aguda del estado mental.

C.Grupo control: lo constituyen pacientes ingresados en nuestra UCI, que no presentan evidencia de infección, presentan características epidemiológicas comparables a los pacientes de los grupos de estudio, con el mismo grado de monitorización, y ausencia de criterios de exclusión.

### **3.1.2.2.Criterios de exclusión**

1. Pacientes menores de 18 años.
2. Mujeres embarazadas.
3. Pacientes terminales.

4. Pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).
5. Pacientes con neutropenia no atribuible al proceso séptico (<1000 PMN/ $\mu$ l).
6. Pacientes transplantados.
7. Pacientes que han recibido fármacos en investigación durante los 30 días anteriores o 10 semividas (el que fuera menor), antes de ser incluidos en el estudio.
8. Alteraciones de la hemostasia conocidas previamente a la sepsis.

### 3.1.2.3. Momento de inclusión

- Los pacientes del grupo control se incluyeron en las primeras 24 horas de su ingreso en UCI. En ninguno de ellos existía evidencia clínica de sepsis. Aquellos pacientes que en los siguientes 2 días tras ser incluidos en el estudio, se sospechó o confirmó la presencia de infección, fueron excluidos del estudio.
- Los pacientes con sepsis no grave fueron incluidos en las primeras 24 horas tras su ingreso en UCI. Los pacientes con criterios de sepsis grave, fueron incluidos para estudio en las primeras 24 horas tras instaurarse los criterios de gravedad.

### 3.1.3. SISTEMÁTICA DE TRABAJO Y CONTROL EVOLUTIVO

A todos los pacientes incluidos en el grupo de estudio y a los incluidos en el grupo control, se les aplicó de forma prospectiva un protocolo sistematizado de recogida de datos que se define a continuación:

- a. **Datos de filiación del paciente:** nombre, edad, sexo, número de historia clínica, fecha de ingreso hospitalario, fecha de ingreso en la UCI, fecha del inicio del proceso séptico y horas de evolución del mismo.

b. **Datos epidemiológicos** en el momento de inclusión del estudio, valorando:

**b.1. Patología de base:**-quirúrgica: pacientes ingresados en el postoperatorio de cirugía programada o urgente, o aquellos en los que el motivo de ingreso se relacionó con la presencia de cirugía previa.

-médica: el resto de los pacientes.

**b.2. Motivo de ingreso en UCI.**

**b.3. Lugar de adquisición de la infección:**

-extrahospitalaria: cuando las manifestaciones clínicas de la infección ocurrieron antes o durante las primeras 48 horas de hospitalización.

-intrahospitalaria: cuando las manifestaciones clínicas de la infección ocurrieron después de las 48 primeras horas del ingreso en el hospital, o en las primeras 48 horas de ingreso en UCI, en los pacientes procedentes de hospitalización convencional.

-intra-UCI: se incluyeron en este grupo, aquellas infecciones demostradas después de las primeras 48 horas de ingreso en UCI.

**b.4. Foco de la infección:** se definió en función de la sospecha clínica de infección y del aislamiento del microorganismo en dicho lugar. En aquellos casos en los que no se aisló microorganismo en el supuesto foco, se consideró éste, cuando los datos clínicos y las exploraciones complementarias resultaron evidentes.

c. **Estado de salud:** se valoró mediante la puntuación del índice APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) durante las primeras 24 horas de inclusión en el estudio.

d. **Datos clínicos en relación con la sepsis:** se recogieron en el momento de inclusión en el estudio, la tensión arterial sistólica (mmHg), temperatura central (°C), frecuencia cardíaca (latidos/minuto), frecuencia respiratoria

(respiraciones/minuto), diuresis (ml/H) y nivel de conciencia, puntuado según la Glasgow Coma Score (GCS). En los pacientes que recibían tratamiento con fármacos sedantes, se consideró una puntuación de Glasgow igual a la previa al inicio de los fármacos, siempre y cuando no existiera evidencia de deterioro neurológico. Asimismo, hemos recogido la presencia o no de sedación, necesidad de ventilación mecánica, utilización de técnicas de depuración extrarrenal, el uso de drogas vasoactivas (dopamina, dobutamina, noradrenalina) así como su dosis, y el tratamiento antibiótico empleado.

- e. **Datos analíticos en relación con la sepsis:** se recogieron las determinaciones de laboratorio realizadas rutinariamente en nuestro centro consideradas más relevantes en los pacientes sépticos. Los controles analíticos se realizaron con una periodicidad no inferior a 24 horas, e incluían: leucocitos en sangre periférica ( $10^9$  células / $\mu$ l), presencia de formas jóvenes o desviación a la izquierda, creatinina en sangre (mg/dL), relación PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, plaquetas ( $10^9$  células / $\mu$ l), tiempo de protrombina (%), INR, bilirrubina total (mg/dL).
- f. **Datos microbiológicos:** la verificación de la sepsis se llevó a cabo con la recogida de datos microbiológicos, realizándose hemocultivos y cultivos de diferentes muestras biológicas, en función del foco de sepsis sospechado. Se realizaron las exploraciones complementarias necesarias en cada caso para llegar al diagnóstico del foco de infección (estudios radiológicos, gammagráficos, bacteriológicos e histológicos). Cuando los cultivos resultaron positivos, se identificó al microorganismo, y se definieron cuatro grupos diferentes: 1. sepsis por microorganismos gramnegativos. 2. Sepsis por microorganismos grampositivos. 3. Sepsis polimicrobiana, definida por el aislamiento de dos o más microorganismos en una misma muestra y 4. Sepsis sin confirmación microbiológica, cuando todos los cultivos realizados resultaron negativos.
- g. **Control evolutivo:** los pacientes fueron controlados durante su estancia

completa en UCI. Asimismo se recogió la mortalidad de los pacientes durante su ingreso, o aquellos que fueron dados de alta de UCI antes del día 28 de inicio de la sepsis, fueron controlados hasta dicho día.

- h. **Síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA):** se valoró la presencia de SDRA en el momento de inclusión o el desarrollo del mismo durante la evolución del cuadro séptico. El SDRA se definió como una relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$  independientemente de la PEEP, infiltrados bilaterales en la radiografía de tórax, y presión de oclusión de la arteria pulmonar  $< 18$  mmHg o ausencia de signos clínicos de insuficiencia ventricular izquierda (235).
- i. **Síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO):** para valorar la disfunción multiorgánica con relación a la sepsis, se recogió en el momento de inclusión en el estudio el número de órganos disfuncionantes y el grado de disfunción de cada uno de ellos, según el índice SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assesment) (236).
- j. **Factores que pueden afectar a la función plaquetaria:** con especial interés recogeremos aquellos datos epidemiológicos, clínicos, analíticos o de tratamiento, que puedan interferir con la función plaquetaria. Así, factores de riesgo cardiovascular, que se han reconocido como potencialmente modificadores de la función plaquetaria, como la hipertensión arterial, diabetes mellitus o dislipemias, el hábito tabáquico, el empleo en los 15 días previos de fármacos que pudiesen afectar al metabolismo plaquetario (antiinflamatorios no esteroideos,...), requerimiento de transfusiones de hemoderivados los días previos al estudio, la perfusión de altas concentraciones de lípidos, ya fuera nutrición parenteral como el fármaco sedante rico en aceite de soja Diprivan® (237).

### 3.1.4. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

En todos los estudios de citometría de flujo realizados, hemos intentado seguir las indicaciones del European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Cytometric Characterisation of Platelet Function (238).

#### 3.1.4.1. Tipo de muestra

El análisis de CMF de la función plaquetaria, es realizado en pequeños volúmenes de sangre total obtenida de sangre venosa, mediante un catéter central o periférico; hay que desechar los volúmenes que ceban las vías, siendo esto especialmente importante cuando la muestra se obtiene de una vía larga. La muestra es aceptable independientemente del recuento de plaquetas. No consideramos como válidas las muestras provenientes de sangre arterial, pues se ha demostrado que los hallazgos citométricos presentan una mayor activación plaquetar en sangre arterial con respecto a la sangre venosa (239). Asimismo, la muestra de los individuos sanos, se ha realizado mediante punción venosa. Hemos rechazado a aquellos individuos que no estuvieran en ayunas las 12 horas previas a la extracción, pues se ha demostrado que la lipemia postprandial eleva la expresión de membrana de la P-selectina, aunque no afecta a otros marcadores (240;241).

La muestra de sangre total para el estudio plaquetario por CMF, presenta numerosas ventajas con respecto al más tradicional estudio en muestra de plasma rico en plaquetas (PRP), ya que, por un lado, el estado de activación plaquetaria está modulado metabólicamente por la presencia de eritrocitos y leucocitos, y por otro lado, para obtener la muestra de PRP se requieren diferentes manipulaciones, entre ellas la centrifugación, que activaría de forma espúrea las plaquetas; asimismo, está contraindicado para el estudio plaquetario, la lisis eritrocitaria –empleada para el estudio de otras células por CMF- ya que la liberación de altas cantidades de ADP, induciría una activación plaquetaria espúrea (242).

### **3.1.4.2. Recogida de la muestra**

Debido a la alta inestabilidad plaquetaria, la recogida de sangre para el estudio de la función plaquetaria, la hemos realizado de una forma cuidadosa y estandarizada. Debe realizarse de forma que se evite el estásis venoso, es decir, sin la compresión de un *smark* que induciría la activación espúrea de las plaquetas que sufren dicho estásis. Asimismo, la aguja debe ser de un calibre mayor o igual a 21 gauge. Se ha demostrado además, de forma consistente, que el empleo cuidadoso de tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) es un método correcto de obtención de la muestra, no resultando en una activación plaquetaria artefactual (243).

### **3.1.4.3. Anticoagulación plasmática**

El citrato sódico 0,129 M, es actualmente el anticoagulante más frecuentemente empleado para el análisis plaquetario, aunque una falta de *buffering*, y la dificultad para el control de la osmolaridad pueden ser un problema en los ensayos funcionales. El EDTA y la heparina, deben ser evitados, debido a sus efectos en la estructura de las glicoproteínas y a la activación plaquetaria espúrea. Además, el EDTA resulta en un edema de las plaquetas tiempo-dependiente, así como genera cambios en los receptores GPIIb/IIIa de la superficie plaquetaria (244;245).

## **3.1.5. MATERIAL PARA EL ANÁLISIS CITOMÉTRICO**

### **3.1.5.1. Tampones para incubación de anticuerpos y lavados**

El tampón salino-fosfato (phosphate saline buffer-PBS) es el tampón recomendado para la incubación y lavado de las muestras, y es el que hemos empleado. La albúmina de suero bovino (bovine serum albumin-BSA) podría ser añadida para reducir la unión no específica y la pérdida de anticuerpos, pero en detrimento, pudiera facilitar la contaminación bacteriana. En estudios de activación plaquetaria un tampón alternativo es el



tampón de Tyrode modificado, pues es rico en glucosa y  $Mg^{++}$  (246).

### 3.1.5.2. Fijadores

El empleo de fijación, presenta muchas ventajas en el entorno clínico donde no existe un acceso inmediato a un citómetro de flujo. La fijación previene la subsecuente activación plaquetaria artefactual *in vitro*. Los fijadores que no inducen una destrucción de epitopos o aumento de autofluorescencia, pueden ser empleados antes de la tinción, de forma que se aumenta la estabilidad de la muestra. El paraformaldehído (PFA) a concentraciones 0.5-1%, es el reactivo típicamente empleado en soluciones para la fijación plaquetaria. Hay que tener cuidado para evitar la exposición de plaquetas a altas concentraciones de paraformaldehído, ya que éste es hiperosmolar (238).

Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que la fijación de la muestra puede resultar en una activación espúrea, que da lugar a un aumento de la expresión de los marcadores de activación plaquetaria, entre otros la P-selectina, el PAC-1 y los agregados leucoplaquetarios. Por tanto, nos proponemos realizar nuestro estudio de marcadores de activación plaquetaria, en muestras no fijadas, y realizando las mínimas manipulaciones sobre la muestra; así como realizando el estudio citométrico en un plazo de tiempo nunca superior a los 10 minutos desde la extracción de la muestra. De esta manera, y apoyándonos en estudios publicados recientemente, con este método en sangre total, sin fijación, pretendemos que nuestros resultados traduzcan de una manera fiable el grado de activación de las plaquetas (247-249).

### 3.1.5.3. Anticuerpos monoclonales

Debido a que diferentes epítomos reflejan diferentes aspectos de la activación plaquetaria, es preferible emplear un panel de anticuerpos monoclonales (MoAbs), que además nos permitirá obtener un perfil de comportamiento correspondiente a la condición patológica que estudiaremos, expandiendo nuestro conocimiento de los cambios antigénicos en la superficie plaquetaria, así como de las interacciones plaqueta-plaqueta y

leucocito-plaqueta. Los anticuerpos monoclonales son preferibles a los policlonales en estudios en sangre total, ya que pueden saturar de forma más eficaz todos los epítomos específicos, y resultan en una menor unión inespecífica. Por tanto los anticuerpos monoclonales son más fácilmente estandarizables (250).

Nosotros hemos elegido el siguiente panel de anticuerpos monoclonales, procedentes todos de Becton Dickinson (B-D, San Jose, CA):

#### **3.1.5.3.1. CD61 (Anti-GPIIIa o Anti-Integrina $\beta_3$ )**

Reconoce una proteína de 110 kDa, conocida como GPIIIa, subunidad del complejo GPIIb/IIIa y del receptor de la vitronectina (VNR). Lo empleamos como marcador panplaquetario, pues se encuentra en la superficie de todas las plaquetas, tanto de las activadas, como de las en reposo. El complejo GPIIb/IIIa y el VNR, son integrinas, es decir, complejos glicoproteicos heterodiméricos que están implicados en la adhesión celular. Con el antígeno CD41 (GPIIb o Integrina  $\text{IIb}$ ), el antígeno CD61 forma el complejo GPIIb/IIIa, que actúa como receptor para el fibrinógeno, factor de von Willebrand (vWf), fibronectina, y vitronectina, en plaquetas activadas. Con el antígeno CD51 (cadena de la VNR ó  $\text{v}$ ), el antígeno CD61 forma la VNR, que media la adhesión independiente de la activación, de la plaqueta a la vitronectina, vWf, fibrinógeno y trombospondina. El antígeno CD61, se ha descrito también en células endoteliales, megacariocitos, y en algunas líneas celulares leucémicas (251).

#### **3.1.5.3.2. CD42a (Anti-GPIX)**

Reconoce a una proteína de 17 a 22 kDa, que es una no-integrina, que forma parte del complejo receptor del factor de von Willebrand GPIb/IX/V. Se expresa en la superficie de todas las plaquetas, tanto en reposo como activadas, y lo emplearemos como marcador panplaquetario, cuando estudiemos los marcadores PAC-1 y CD62P, ya que el empleo del CD61 (anti-GPIIIa), al formar parte del receptor GPIIb/IIIa, podría estar interfiriendo el estudio del PAC-1. Sabemos que la activación plaquetaria induce un descenso en la

expresión de superficie del receptor GPIIb/IX/V, pero este descenso es insuficiente como para resultar en una plaqueta negativa (252).

### **3.1.5.3.3. CD62P (P-selectina)**

El antígeno CD62P, también es conocido como “platelet activation-dependent granule-external membrane (PADGEM) protein”, ó proteína de membrana de los gránulos (GMP-140), ya que es un polipéptido de cadena única de 140 kDa. El antígeno CD62P es un miembro de las selectinas, familia de moléculas de adhesión, y media la adhesión de las plaquetas activadas a los neutrófilos y monocitos. El antígeno CD62P es una proteína de membrana asociada con los gránulos alfa de las plaquetas, los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, y de los megacariocitos. Se expresa en el interior de los gránulos alfa de las plaquetas en reposo. Una vez que se activa la plaqueta y ocurre la secreción de gránulos, la membrana de los gránulos alfa se fusiona a la membrana plasmática exterior de la plaqueta, y el antígeno CD62P será expresado en la superficie plaquetaria (253).

### **3.1.5.3.4. PAC-1**

Este anticuerpo reconoce como epítipo el complejo glicoproteico GPIIb/IIIa (IIb<sub>3</sub>) de las plaquetas activadas, es decir, el receptor plaquetario para el fibrinógeno. El complejo GPIIb/IIIa es un miembro de la familia de los receptores proteicos adhesivos heterodiméricos encontrados en una variedad de tipos celulares, denominada integrinas. El GPIIb/IIIa está localizado en la superficie de las plaquetas en reposo. La activación plaquetaria induce un cambio conformacional, dependiente de los flujos de calcio, en el GPIIb/IIIa que produce la exposición de un LIBS (ligand binding site). Cuatro macromoléculas adhesivas son capaces de interactuar con la forma activada de GPIIb/IIIa: el fibrinógeno, la fibronectina, el factor de von Willebrand (vWf), y la vitronectina. La unión del fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa activado es requerida para la agregación plaquetaria. El PAC-1 se une exclusivamente a plaquetas activadas, reconociendo de forma específica el receptor GPIIb/IIIa activado. Aproximadamente unos 45000-50000 receptores GPIIb/IIIa, aparecen en la superficie plaquetaria tras su activación. El PAC-1 inhibe la

agregación plaquetaria mediada por el fibrinógeno (254).

### 3.1.5.3.5. CD45

Es un marcador panleucocitario, que nos permite localizar a todos los glóbulos blancos de la muestra estudiada, con el objetivo de determinar los agregados leucoplaquetarios. Reconoce antígenos leucocitarios humanos pertenecientes a la familia T200, que poseen entre 180 y 220 kdaltons (kDa), y se encuentran en linfocitos, monocitos, granulocitos, eosinófilos y basófilos, en sangre periférica, y juega un papel en la transducción de señales, así como en la modificación de las señales de otras células de superficie (255).

### 3.1.5.4. Selección de fluorocromos / conjugados

Actualmente existen en el mercado anticuerpos monoclonales que ya se encuentran conjugados con un fluorocromo (FITC, PE, PerCP). Alternativamente se podrían conjugar al FITC o a la biotina, siguiendo los métodos de Rinderknecht o de Shattil respectivamente, pero el uso de anticuerpos que ya se encuentran conjugados, elimina el requerimiento para la adición de anticuerpos secundarios, además de evitar procedimientos que consumirían tiempo, que en nuestro caso de estudio de muestras no fijadas, resultaría en una activación artefactual *in vitro* de las plaquetas. Además, el empleo de anticuerpos secundarios resulta en un aumento de la fluorescencia inespecífica, así como en una disminución de la sensibilidad del ensayo (242;256).

En nuestro estudio, basándonos en las recomendaciones del Protocolo de Consenso para la caracterización por citometría de flujo de la función plaquetaria (238), hemos empleado la siguiente combinación de anticuerpos/fluorocromos:

- CD61-PerCP
- CD45-FITC
- CD62P-PE

- PAC-1-FITC
- CD42a -PerCP

### **3.1.5.5. Citómetro de flujo**

Disponemos para la realización de nuestro estudio de un citómetro FACScalibur™ (Becton-Dickinson), con 2 láseres de argón y diodo rojo, respectivamente, que permite la utilización de 4 colores simultáneamente mediante el parámetro de fluorescencia adicional FL-4. El software utilizado ha sido el CELLQuest™, que permite el análisis cuantitativo de los datos, así como el análisis logarítmico y combinaciones lógicas de múltiples regiones analizadas. Asimismo, realiza compensaciones en base a la información obtenida. Todos los datos de la manipulación permanecen electrónicamente documentados.

## **3.1.6. PROCESADO DE LA MUESTRA**

### **3.1.6.1. Preparación de la muestra**

Debemos seguir todas las indicaciones comentadas en el apartado anterior destinadas a disminuir en todo lo posible la activación plaquetaria espúrea, así como a minimizar la formación de agregados plaquetarios artefactuales, ya que si las plaquetas están agregadas, la cantidad de antígeno por plaqueta expresado se encuentra disminuido, pudiendo falsear los resultados de la CMF. Esto se debe a que la CMF mide la cantidad de fluorescencia por partícula individual, independientemente de si la partícula es una única plaqueta, o un agregado de un número desconocido de plaquetas. Resumiendo, la sangre debe ser extraída de una vía venosa, después de haber desechado los volúmenes de cebado de dicha vía, recogida a través de una aguja de calibre mayor o igual a 21 gauge, mediante un tubo Vacutainer® (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) anticoagulado con citrato sódico, mezclándolo con cuidado; evitaremos maniobras bruscas, ya sea de lavado, centrifugado, vortexado o agitado, pues se ha demostrado que son las que inducen un mayor grado de activación espúrea. Debemos preparar previamente los reactivos, para evitar retrasos en el

procedimiento, y para atemperar los anticuerpos, pues la temperatura fría de los mismos podría inducir una activación *in vitro* de las plaquetas. Recogeremos todos los datos en relación a la extracción, que se efectuará en la misma franja horaria del día, entre las 09:30 y 11:00 a.m., pues se ha descrito un ritmo circadiano en cuanto a la reactividad plaquetaria *in vitro* (257). Desde que se realiza la extracción de la muestra hasta que se inicia su procesado, no deben pasar más de 10 minutos.

### **3.1.6.2. Marcaje de la muestra**

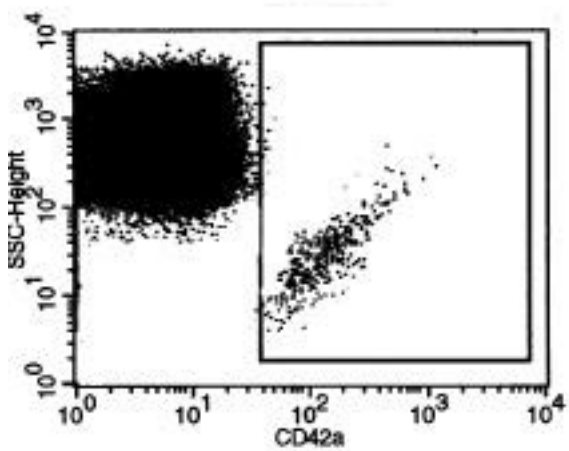
Para el estudio de la expresión de antígenos de activación plaquetaria *ex vivo*, emplearemos sangre total anticoagulada con citrato sódico 0.129 M, sin fijación. En un primer paso, una muestra de 50  $\mu$ l de sangre total es diluída con tampón PBS por un factor 1:10. En un segundo paso, la muestra es incubada con anticuerpos monoclonales marcados a concentraciones de saturación, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente la incubación es finalizada con una dilución de PBS a una razón 1:20. Las células se encuentran en este momento listas para el análisis de citometría de flujo. Las progresivas diluciones realizadas, son también importantes para minimizar la formación de agregados espúreos.

### **3.1.6.3. Paneles de anticuerpos**

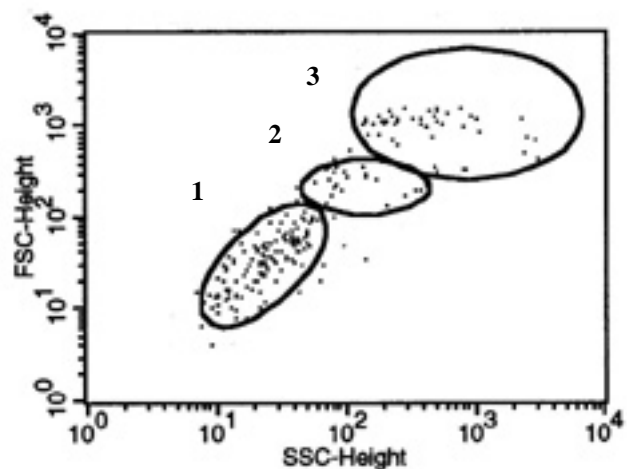
En cada paciente estudiamos dos muestras de sangre periférica, que incubaremos con dos grupos de anticuerpos. Por un lado, empleando las características de SSC/FSC, podremos determinar la población de plaquetas libres y la de agregados plaquetares. El análisis tri-color de CD42a, CD62P y PAC-1, nos permitirá estudiar el grado de expresión de los marcadores de activación plaquetaria: P-selectina y receptor del fibrinógeno activado, tanto en la población de plaquetas libres, como en la de agregados plaquetares. Asimismo, el análisis bi-color de CD45 y CD61, nos permitirá el estudio de los agregados leucoplaquetarios. A continuación detallaremos cada uno de estos análisis.

### 3.1.6.3.1. Análisis de los agregados plaquetarios

Nuestro método es una modificación de diferentes métodos descritos, por Ault, Rinder y Jy (258;259). De la muestra de sangre total procesada según las indicaciones anteriores, y marcada con CD42a, CD62P y PAC-1, obtenemos el histograma 1, en el cual aparecen todas las células sanguíneas, pudiendo identificar con el marcador CD42a a todas las plaquetas presentes. A continuación, un nuevo histograma 2, puede ser obtenido, y las plaquetas pueden ser separadas en 3 poblaciones diferentes en función de sus características de FSC y SSC. Las plaquetas libres están representadas por la población densa que aparece en el bitmap 1, y los agregados plaquetarios se muestran en el bitmap 3. La población intermedia (bitmap 2) se refiere a microagregados plaquetarios. Nos centraremos en la población de plaquetas libres y en la de los agregados plaquetarios, ya que el papel de los microagregados plaquetarios está por el momento poco definido. Podremos calcular el porcentaje de agregados plaquetarios con respecto a las plaquetas totales (AP/P).



P

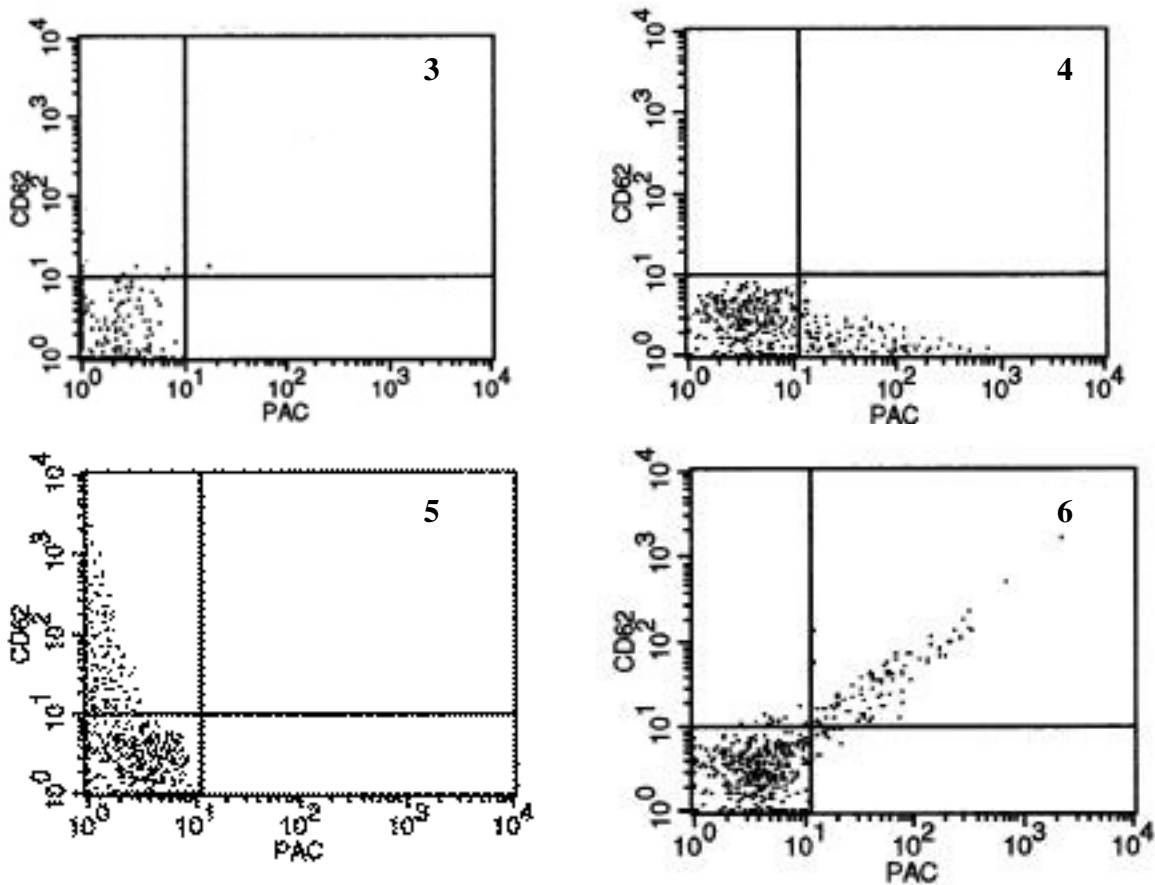


**Histograma 1:** de los diferentes tipos celulares detectados por el citómetro según sus características de *side scattered light*, separamos en la ventana **P** a las células que presentan el anticuerpo monoclonal CD42a, correspondiente a la población total de plaquetas.

**Histograma 2:** analiza la población plaquetaria, según sus características de *forward scattered light* y *side scattered light*, determinando tres poblaciones de plaquetas diferentes, en los *bitmaps* 1, 2 y 3, que corresponden a plaquetas libres, microagregados y agregados plaquetarios.

### 3.1.6.3.2. Análisis de la expresión de CD62P y de PAC-1

A partir del histograma 2, podemos analizar para el total de las plaquetas, o para cada subpoblación de plaquetas (estudiaremos las subpoblaciones formadas por plaquetas libres y agregados plaquetarios), el porcentaje de expresión de células positivas para los marcadores de activación CD62P o PAC-1, asimismo, podremos analizar cuando estos antígenos son expresados simultáneamente (260;261).

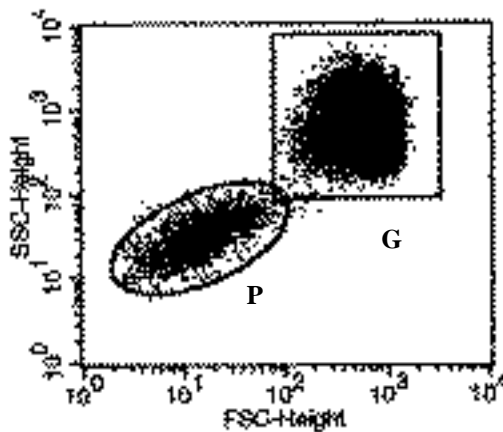


**Histogramas 3,4, 5 y 6:** muestran diferentes perfiles de expresión plaquetar de los marcadores CD62P y PAC-1. El histograma 3, analiza una población de plaquetas con mínima activación. El histograma 4 refleja la activación predominante del marcador PAC-1, mientras que en el histograma 5, es el marcador de secreción plaquetar CD62P el que se detecta activado. El histograma 6 analiza una población de plaquetas en la que se demuestra una activación simultánea de ambos marcadores en la superficie de la plaqueta.



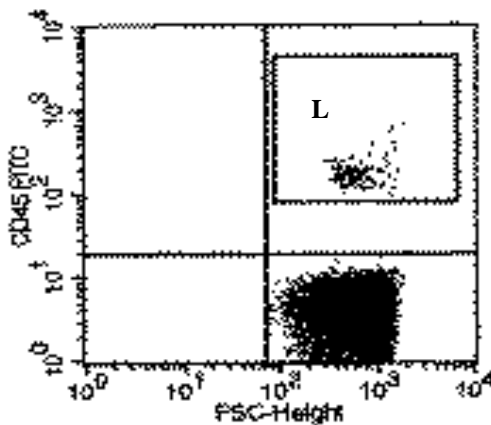
### 3.1.6.3.3. Análisis de los agregados leucoplaquetarios

Según una modificación del método de Li N, Goodall AH *et al.* (247) de la muestra incubada con CD45 y CD61, obtenemos el histograma 7 en el que glóbulos rojos, blancos y agregados leucoplaquetarios se hallan separados de las plaquetas libres, en función de sus características de *light-scattering*. Los eventos de la ventana **G**, son posteriormente discriminados por el parámetro CD45, identificando a los leucocitos según se muestra en el histograma 8. Los eventos CD45+ son separados en el histograma 9, según presenten además el antígeno CD61. Estos eventos son agregados leucoplaquetarios, y se expresan en relación al total de leucocitos (ALP/L).

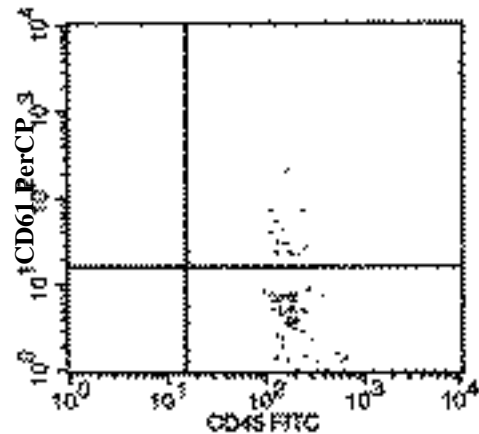


además el antígeno CD61. Estos eventos son agregados leucoplaquetarios, y se expresan en relación al total de leucocitos (ALP/L).

**Histograma 7:** discrimina a la población de plaquetas libres-P- según sus características de *side scattered light* y *forward scattered light*, y a la población de celular de mayor tamaño -G-, formada por eritrocitos y leucocitos.



**Histograma 8:** analiza la ventana **G**, formada por eritrocitos y leucocitos, identificando a estos últimos -L- mediante el marcador panleucocitario CD45.



**Histograma 9:** analiza la población total de leucocitos, discriminando a aquellos que están unidos a plaquetas, y por tanto expresan al mismo tiempo que el CD45, un marcador panplaquetario, como es el CD61.

### **3.1.7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**

#### **3.1.7.1. Porcentaje de células positivas**

Este método se basa en la cuantificación de una pequeña subpoblación de plaquetas “positivas” por expresar antígenos asociados a la activación plaquetar, que se expresan habitualmente con una densidad baja, en comparación con la fluorescencia negativa de la población plaquetar predominante. Este método de expresión de los resultados, presenta la ventaja de tener una alta sensibilidad para la detección de una expresión aumentada de antígenos por parte de una pequeña subpoblación plaquetaria. En adición al problema de determinar correctamente la fluorescencia no específica –falsos positivos-, el método es altamente dependiente de la sensibilidad del instrumento y de los reactivos empleados, cuando estamos midiendo antígenos que se expresan con una baja densidad (238).

#### **3.1.7.2. Intensidad de fluorescencia media**

Cuando estamos midiendo la expresión aumentada o disminuída de antígenos que se expresan de forma homogénea, el método del porcentaje de células positivas no sería el idóneo, y se emplea el cálculo de la intensidad de fluorescencia media (IFM) (238).

### **3.1.8. TABULACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Todos los datos necesarios para la valoración estadística de los resultados, se tabularon en una base de datos Microsoft Access. Los datos fueron introducidos en dicha base de datos por bloques informativos que se resumen a continuación:

- Datos de filiación y epidemiológicos
- Datos de laboratorio relacionados con la infección
- Datos relacionados con el fracaso multiorgánico
- Determinaciones citométricas de marcadores de activación plaquetaria

### 3.1.9. MÉTODO ESTADÍSTICO

Para comprobar si los diversos parámetros cuantitativos analizados seguían una distribución normal, se utilizó la prueba de Kolmogorow-Smirnoff. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD) cuando la distribución era normal y como mediana (intervalo) cuando no lo eran. Para el estudio de la asociación entre dos variables cualitativas se aplicó la prueba de Chi-cuadrado, o del test exacto de Fischer en los casos necesarios (si los efectivos esperados eran menores de 5).

Para comparar las medias de dos muestras de distribución normal se aplicó la t de Student. En el caso de no seguir una distribución normal, el test aplicado ha sido la prueba de la U de Mann Whitney. La comparación de dos o más muestras se analizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) en los casos que seguían una distribución normal, y el test de Kruskal-Wallis en los que no la seguían.

La existencia de correlación lineal entre los distintos parámetros cuantitativos estudiados se determinó mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson cuando la población seguía una distribución normal, y con el Coeficiente de Correlación de Spearman cuando la distribución no era normal. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS (versión 7.5). El nivel de significación estadística aceptado fue del 5% ( $p < 0.05$ ).

## **3.2.MATERIAL Y MÉTODO PARA EL ESTUDIO 2:”Modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes en la sepsis: análisis *in vitro* del papel regulador de las interleuquinas (IL) 1 $\beta$ , 6 y 10, sobre dicha reactividad”**

### **3.2.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA**

#### **3.2.1.1. Selección de donantes**

El estudio de la modulación de la reactividad plaquetaria por eritrocitos y leucocitos, lo hemos realizado en los mismos grupos que definimos anteriormente, es decir, hemos estandarizado la técnica en voluntarios sanos (n=8), y posteriormente hemos estudiado a pacientes con sepsis no grave, y con sepsis grave con diferentes grados de fracaso multiorgánico. El número de pacientes incluido ha sido de 7 en el grupo de la sepsis no grave y de 7 en el de la sepsis grave y fracaso multiorgánico. Los criterios de inclusión y los de exclusión son los mismos descritos previamente, y lo mismo ocurre con los parámetros clínicos y analíticos recogidos.

#### **3.2.1.2.Tipo de muestra**

Realizaremos el estudio en sangre venosa, obtenida mediante un catéter central o periférico, desechando los volúmenes que ceban las vías, especialmente en el caso de sangre obtenida de vías largas. No consideramos muestras provenientes de sangre arterial, pues los hallazgos citométricos demuestran cierto grado de activación basal (239). Asimismo, las muestras obtenidas de los individuos sanos se han realizado mediante punción venosa. Para este tipo de estudios necesitamos para considerar la muestra aceptable, que ésta tenga >100.000 plaquetas/ $\mu$ l. Hemos rechazado a aquellos individuos que no estuvieran en ayunas las 12 horas previas a la extracción, pues se ha demostrado que la lipemia postprandial afecta al funcionalismo plaquetar (262). Asimismo, las extracciones se han realizado siempre entre las 9:00 y las 10:00 a.m., probado que existe un ritmo circadiano en la intensidad de agregación plaquetaria (257).

### 3.2.1.3.Extracción de la muestra

La extracción de la muestra requiere los cuidados descritos en el capítulo anterior, que son universales para el manejo de sangre cuando en ella se van a estudiar las plaquetas, y que están destinados a eliminar las posibles fuentes de activación espúrea de las mismas. En este caso el volumen extraído será de 22.5 ml de sangre, que anticoagularemos con citrato sódico.

### 3.2.1.4.Separación de las células sanguíneas

Las plaquetas se aíslan de la sangre citratada por centrifugación diferencial a 200 x g, durante 10 minutos a 22°C, separándose el plasma rico en plaquetas (PRP) del precipitado de hematíes y leucocitos. El PRP procedente de las muestras anticoaguladas con citrato, se ajusta a un número de plaquetas entre  $1.5-3.5 \times 10^8$ /ml, con plasma pobre en plaquetas autólogo, y se mantiene tapado a temperatura ambiente, 22°C, en atmósfera de aire con 5% de CO<sub>2</sub>, para evitar variaciones de pH y mantener por más tiempo la reactividad de las plaquetas estable (263).

Después de separar el PRP, se elimina por aspiración, la capa superior rica en leucocitos (“buffy coat”), que se desecha y se vuelve a centrifugar el tubo a 2500 x g, durante 10 minutos, a 4°C, obteniendo plasma pobre en plaquetas (PPP), y un precipitado del que nuevamente eliminamos por aspiración la capa superior rica en leucocitos. Los eritrocitos los obtendremos de una sola aspiración en la zona central del concentrado de hematíes de cada tubo; este pipeteado tiene que realizarse suavemente, para evitar en lo posible el daño físico a las células (263).

### 3.2.1.5.Lavado de los eritrocitos

Se obtiene sangre total (ST) anticoagulada con citrato sódico 0,129 M, en tubos de Vacutainer de 5 ml. La ST se centrifuga a 200x g (10 min; 22°C) para obtener el plasma

rico en plaquetas (PRP). El PRP sobrenadante se separa y del remanente de células se eliminan cuidadosamente por aspiración: los restos del PRP, los leucocitos, y la primera capa de glóbulos rojos (GR), para asegurarse que los hematíes no tienen contaminación de otras células.

A continuación se resuspenden los hematíes con 3 ml de tampón PBS (*phosphate buffered saline*)-Glucosa (NaCl 130,9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,50 mM, glucosa 83 mM, pH 7,2). La resuspensión se lleva a cabo añadiendo poco a poco el PBS y moviendo la muestra con suavidad para evitar la microhemólisis. Luego se decanta a otro tubo de 10 ml de prolipropileno, y se completa hasta 7 ml el volumen de PBS. Esta suspensión de GR se centrifuga 10 minutos a 288 x g a temperatura ambiente, obteniéndose un precipitado de hematíes. Se aspira el sobrenadante y sobre el precipitado de GR se añaden 7 ml de PBS-Glucosa y se resuspende la muestra suavemente; la suspensión se centrifuga 10 minutos a 1450 x g. Se aspira el sobrenadante y el precipitado de hematíes estaría preparado para utilizarse durante aproximadamente 1 hora.

### **3.2.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS**

#### **3.2.2.1. Equipos**

Agregómetro de cuatro canales (Chrono-log Corp, Pa, USA), Software Chrono-log (Chrono-log Corp, Pa, USA); centrífuga Eppendorf (Brinkman Instruments, NY, USA); centrífuga DPR-600 (Damon IEC Division, Mass, USA); baño de agua termostaticado (Izasa, Valencia, España); pH-meter (Crison Instruments, Barcelona, España); Coulter MD18 (Coulter Co., USA), balanza Sartorius BA 1105 (Sartorius-Instruments Ltd, Surrey, USA).

#### **3.2.2.2. Materiales**

Barras agitadoras magnéticas cubiertas de teflón y cubetas de agregación plaquetaria de vidrio siliconadas (Crhono-log Corporation, PA, USA); pipetas Pasteur automáticas y puntas desechables Gilson (Gilson Medical Electronics, Francia); sistema Vacutainer® de extracción de sangre y tubos anticoagulados con citrato sódico (Becton Dickinson, CA, USA); tubos desechables de prolipropileno de varios tamaños (Eurotubo, Deltalab; Afora); tubos Nunc de 5 ml (Nunc, Inter Med, Dinamarca).

### **3.2.2.3.Reactivos**

Serotonina J-125 RIA (DBV Diagnostica-Biotech Europa); chrono-par collagen (Crhono-log Corp, PA, EEUU); crhono-par ADP (Crhono-log Corp, PA, EEUU); chrono-par ac.araquidónico (Chrono-log Corp, PA, EEUU); tampón Michaelis (Diagnostica Stago, Francia), tampón PBS (Becton Dickinson, CA, USA), seroalbúmina humana (Grifols, España); imipramina (Sigma Chemical, Mo, USA); tritón X-100 (Sigma Chemical, Mo, USA); interleuquinas humanas recombinantes 1, 6 y 10 (Becton-Dickinson, CA, USA); dichas interleuquinas humanas recombinantes se suministran con una garantía de pureza >95%, siendo sus niveles de endotoxina <0.1 ng/μg.

### **3.2.3.SISTEMA EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN Y RECLUTAMIENTO PLAQUETARIOS.**

A continuación detallaremos el sistema experimental que nos permite el estudio de la modulación de la reactividad plaquetaria por eritrocitos y leucocitos. Dicha reactividad plaquetaria se determina por la respuesta de las plaquetas, plaquetas más eritrocitos ó sangre total, a un agonista; la respuesta será medida en función de la activación y del reclutamiento plaquetario. Este sistema experimental ha sido desarrollado por las Dras. T. Santos y J. Vallés, y posteriormente empleado para el estudio del papel de los eritrocitos en los procesos trombóticos de pacientes con factores de riesgo cardiovascular, así como en la monitorización de la eficacia del tratamiento antiagregante plaquetario (264-269).

Entendemos por etapa de activación, aquella en la cual las plaquetas interaccionan con un *inductor primario*, como el colágeno contenido en las estructuras subendoteliales o la trombina generada por la activación de la cascada de la coagulación.

Las plaquetas activadas por el inductor primario, liberan al medio extracelular compuestos granulares (ADP, ATP, 5HT, proteínas, etc) y productos originados como consecuencia de su activación p.ej metabolitos del ácido araquidónico (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, ácido libre, etc) o microvesículas, que pueden interaccionar con otras plaquetas y células del microentorno. La mezcla de estas sustancias liberadas, presenta un componente final proagregatorio, y se podría considerar como un *inductor fisiológico secundario*, que promueve la etapa de reclutamiento o crecimiento del trombo. Por lo tanto, estas etapas iniciales de la reactividad trombocitaria, la activación y el reclutamiento, se inician por sustancias diferentes.

### **3.2.3.1. Procedimiento experimental**

La figura 4 muestra de forma esquemática el procedimiento experimental para evaluar de forma independiente los dos aspectos de la reactividad plaquetaria (activación y reclutamiento), así como su modulación por otras células sanguíneas, tratando de reproducir en el laboratorio las etapas iniciales de la hemostasia y la trombosis.

### **3.2.3.2.Inductores de la activación plaquetaria**

Utilizamos el colágeno como inductor plaquetario, ya que es una sustancia particulada, a diferencia de los otros inductores, y la centrifugación del sistema generador, impide su transferencia al *sistema de ensayo*, con lo que no interfiere el estudio de la capacidad proagregante del liberado del *sistema generador*.

Previamente, hemos realizado agregaciones estándar en PRP, estimulando con colágeno, ADP y ácido araquidónico, para comprobar la integridad de estas tres vías de activación plaquetaria, que se pueden ver afectadas por diferentes patologías, y por



diferentes fármacos. Especial atención requiere la preparación de los agentes inductores. La suspensión comercial de colágeno, se distribuye en alicuotas que se almacenan en la nevera (2-5°C), y se diluye con una solución glucosada isotónica (pH 2.7) inmediatamente antes de la realización de cada experimento, para obtener una concentración final de 1 µg/ml. El ADP se diluye con suero fisiológico de forma que en el momento de su utilización, la concentración final sea de 3 mM. El ácido araquidónico se prepara disuelto en suero fisiológico, y alicuotado como una solución stock 50 mM, de forma que al utilizarlo, su concentración final sea de 1 mM. Tanto el ADP como el ácido araquidónico, se almacenan hasta su utilización en pequeñas alicuotas a una temperatura de -20°C.

### 3.2.3.3. Sistema generador

Los *sistemas generadores* se preparan de la siguiente manera: el volumen final será de 0.5 ml, conteniendo 0.3 ml de PRP más 0.2 ml de un concentrado de eritrocitos, y en las muestras de plaquetas solas, en ausencia de eritrocitos, se compensa el volumen de los eritrocitos con 0.2 ml de PPP. Cuando el sistema generador es de sangre total, se emplean 0.4 ml de sangre total citratada y 0.1 ml de tampón Michaelis. Es importante conocer los recuentos celulares, y que estos estén en rangos fisiológicos. Hemos trabajado con recuentos plaquetares entre 250.000 y 350.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>, ajustando la muestra de PRP con PPP autólogo, según una tabla dilucional (263).

En el *sistema generador*, las plaquetas –en presencia o ausencia de otras células sanguíneas- se preincuban 10 minutos en un baño de agua a 37°C. En el minuto 9 de preincubación, se añade a cada sistema generador 2 µl de imipramina, inhibidor de la recaptación de serotonina. La imipramina se prepara disolviendo 0.00634 gr de imipramina en 4 ml de suero fisiológico, manteniéndola en hielo hasta el momento de utilizarla, a una dilución 1/8.

Pasados los 10 minutos de preincubación, se añade como inductor plaquetario primario, colágeno a una concentración final 1 µg/ml, se mezcla durante 10 segundos, con

tres inversiones, y se centrifuga rápidamente (10000-13000 x g) durante 50 segundos, para obtener un sobrenadante que contiene el liberado celular.

En este sobrenadante pueden realizarse determinaciones bioquímicas de las sustancias liberadas (activación) y/o valorar su actividad biológica utilizándolo como inductor de otras plaquetas en el *sistema de ensayo* (reclutamiento). La respuesta de las plaquetas en el sistema de ensayo se monitoriza por agregometría óptica, 1 minuto después de la activación del sistema generador.

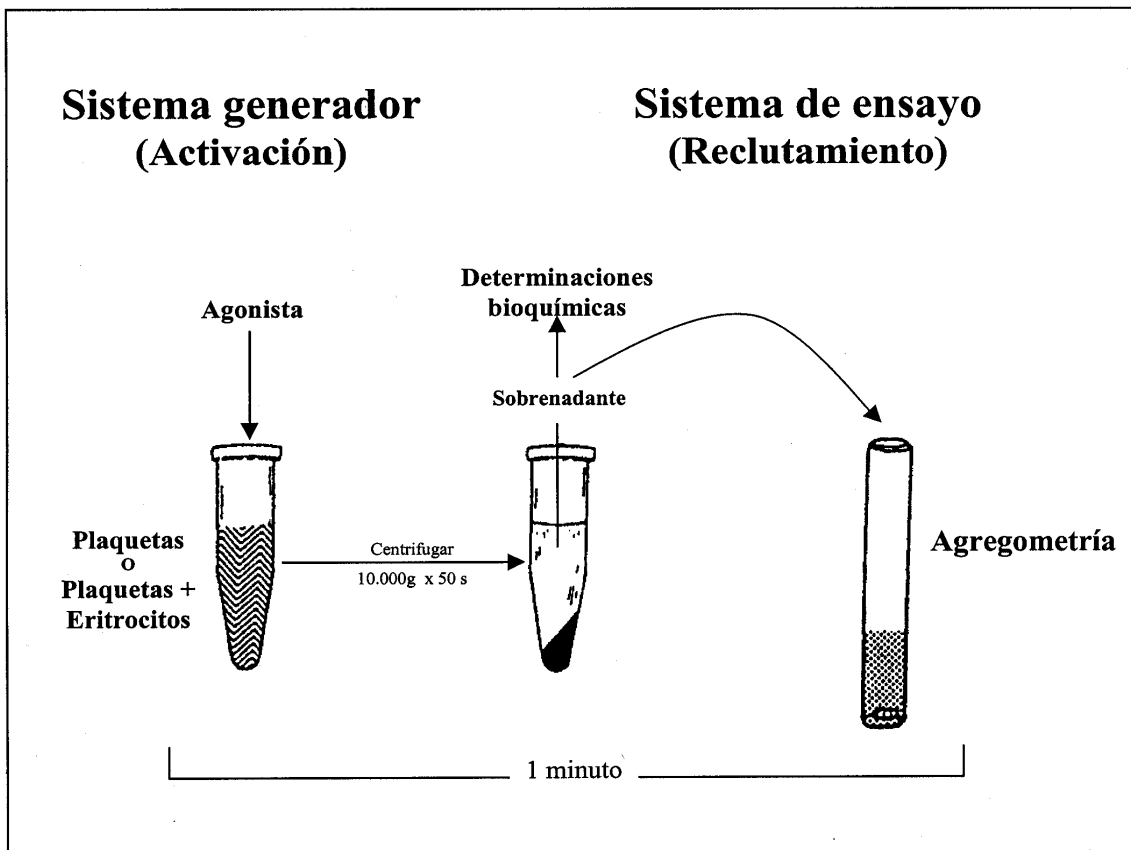


Figura 4. Esquema del procedimiento experimental para estudio de la activación y reclutamiento plaquetar.

#### 3.2.3.4. Sistema de ensayo

El *sistema de ensayo* consiste en tubos de agregometría con 125  $\mu$ l de PRP, 100 $\mu$ l de tampón Michaelis al que se ha añadido calcio 2,75 mM, de forma que obtengamos una concentración final de calcio en la muestra 1 mM. El estudio de agregometría óptica de los sistemas de ensayo, se realiza siguiendo el método inicialmente descrito por Born. Los sistemas de ensayo conteniendo PRP, se agitan en la cubeta del agregómetro siliconada con una barrita de hierro recubierta de teflón y siliconada, a 1000 rpm y 37°C. Se ajusta la transmitancia del aparato con un PPP con los mismo aditivos que el PRP, de modo que la diferencia de transmitancia entre el PRP y el PPP sea del 100%. En el aparato de que disponemos, un lumiagregómetro Chrono-log de cuatro canales, esto se realiza de forma automática.

#### **3.2.3.4.1. Agregometría óptica de los sistemas de ensayo**

A continuación se añade el inductor de la agregación consistente en una alícuota (50  $\mu$ l) del sobrenadante del sistema generador, con lo que se inicia un aumento de transmitancia en el detector de PRP a medida que las plaquetas se agregan. Estas variaciones se registran en un ordenador con Software Chrono-log, obteniendo una curva de agregación, que grabamos en la memoria del ordenador. La cuantificación de la curva de agregación se realiza por la medida de la intensidad máxima de agregación ( $I_{max}$ ) que puede expresarse en milímetros, o por la variación máxima de transmitancia, que puede expresarse en porcentaje (%) (270).

Nos referiremos a la actividad reclutadora, como la capacidad de una alícuota de los sobrenadantes de estimulación del sistema generador para inducir una respuesta proagregante en el sistema de ensayo. Como hemos indicado anteriormente, en todos los sujetos y antes de iniciar el estudio, se valora la agregabilidad de las plaquetas al colágeno, ADP y ácido araquidónico, para comprobar que responden con normalidad. Asimismo, se realizan estudios de control, estimulando diferentes sistemas generadores con los solventes (solución salina, glucosada, o tampones), que en ningún caso generaron agregación de los sistemas de ensayo.

### **3.2.3.4.2. Determinación de serotonina (5HT) en el sobrenadante de estimulación de los sistemas generadores, por radioinmunoensayo (RIA)**

El estudio de la activación, lo realizaremos guardando una muestra del sobrenadante del sistema generador tras su centrifugación, a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior realización de un test de radioinmunoensayo (RIA), que determine la serotonina (5HT) liberada. Esta serotonina, será una medida del grado de activación plaquetar, que se expresa como un ratio entre la serotonina liberada en cada experimento y la serotonina total que poseen la muestra de plaquetas. Esta serotonina total se determina de la siguiente manera: a una muestra de 150  $\mu\text{l}$  de PRP, diluída con 100  $\mu\text{l}$  de PPP, se le añaden 25  $\mu\text{l}$  de tritón X-100, de forma que tras 10'' en el vórtex, se lisan todas las plaquetas y se libera toda la serotonina contenida en ellas. Esta serotonina se determina por RIA, y dicho valor constituye la referencia para ese estudio, expresándose la liberación de 5HT en forma de porcentaje (%).

### **3.2.4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS INTERLEUQUINAS (IL) 1 $\beta$ , 6 Y 10 SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA**

Para la realización de este estudio, hemos tomado muestras de individuos sanos, donantes voluntarios, que no habían tomado medicación alguna en los últimos 15 días, prestando especial atención a aquellos fármacos que pudieran interferir en la función plaquetaria. Se ha realizado la extracción sanguínea y la separación celular como se describió en apartados anteriores. La muestra de plasma rico en plaquetas (PRP) con un recuento entre 250.000 y 350.000 células por  $\text{mm}^3$ , se reparte en alícuotas de 500  $\mu\text{l}$ , y se les incorpora según el experimento, 50  $\mu\text{l}$  de interleuquina 1, 6 o 10, en concentraciones crecientes 10 y 1000 ng/ml. Además hemos estudiado muestras control, que fueron incubadas con la solución rica en seroalbúmina humana, y libre de endotoxina, que se emplea como solvente de las interleuquinas. La razón de dichas dosis es que concentraciones de 10 ng/ml, se detectan en pacientes neoplásicos que reciben diferente inmunoterapias, mientras que las concentraciones de 1000 ng/ml, se demuestran en procesos sépticos graves.

Las muestras de plasma rico en plaquetas, a las que se han añadido la interleuquina, se incuban inmediatamente en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, el PRP se introduce en tubos de vidrio siliconados, que incluyen un imán agitador de teflon, y se realiza la agregometría estándar, según la técnica descrita por Born. El inductor empleado ha sido ADP 3. El resultado se expresa como un porcentaje, que refleja la diferencia de transmitancia entre el PRP y el PRP agregado parcialmente por el inductor.

### **3.2.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS INTERLEUQUINAS (IL) 1 $\beta$ , 6 Y 10 SOBRE LA MODULACIÓN DE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA POR LOS HEMATÍES**

Hemos realizado previamente el estudio de la modulación de la reactividad plaquetaria por los hematíes, en individuos sanos, y en pacientes sépticos. El presente estudio, analiza cómo la incubación previa de los hematíes con las interleuquinas 1 , 6 o 10, interfiere en su modulación sobre la reactividad plaquetaria.

Como en los apartados anteriores, se ha obtenido la sangre de donantes sanos, y se ha realizado la extracción sanguínea y la separación celular según los protocolos descritos. A continuación, se procede al lavado de los eritrocitos según la técnica descrita anteriormente, y se distribuyen en alicuotas de 200  $\mu$ l. A dichas alicuotas se le añaden según el experimento, 40  $\mu$ l de interleuquina 1 , 6 o 10, con unas concentraciones finales 0, 10 y 1000 ng/ml, y se incuba la preparación durante 30 minutos. Al cabo de dicho tiempo, se lavan nuevamente los hematíes, y se mezclan con PRP para formar sistemas generadores. Dichos sistemas generadores siguen el protocolo de estudio de la activación y reclutamiento plaquetario desarrollado en el apartado 3.2.3.

### **3.2.6.MÉTODO ESTADÍSTICO**

Para la valoración estadística de los resultados hemos utilizado el paquete estadístico SPSS (versión 7.5). Se ha aplicado la t de pares a muestras de los mismos sujetos en dos circunstancias diferentes y la t de Student para la comparación de muestras de dos grupos de sujetos. Otros métodos estadísticos se describen apropiadamente en el texto. Se ha considerado una significación estadística si  $p < 0,05$ .