

Trombosis y función plaquetar

DESARROLLO METODOLÓGICO DE UN MODELO CELULAR IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTICOAGULANTES DE EXTRACTOS O COMPUESTOS BIOACTIVOS NATURALES

S. Fernández-Castillejo, U. Catalán, L. Pons, M. Heras, L. Masana y R. Solà

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosis (CIBERDEM). CENIT. Hospital Universitari St. Joan de Reus. IISPV. Universitat Rovira i Virgili. Reus. Tarragona.

La coagulación es una función de especial interés en las ECV ya que se caracterizan por una reducción del potencial anticoagulante y por un aumento en la producción de mediadores procoagulantes por parte del endotelio, como el *Tissue Factor* (TF), obteniendo un ambiente vascular trombogénico. El biomarcador por excelencia es el TF.

Objetivo: Implementar y optimizar un test *in vitro* de screening rápido, preciso y exacto para evaluar la actividad anticoagulante de diferentes extractos o compuestos bioactivos naturales, en *Human Aortic Endothelial Cells* (HAEC).

Métodos: Células HAEC se incuban durante 16h con los extractos o compuestos a testar y se estimulan con *Tumor Necro-*

sis Factor-α (TNF-α, 10 ng/mL) las 6 h consecutivas. Las concentraciones de los extractos o compuestos seleccionadas fueron previamente testadas como no citotóxicas mediante un ensayo colorimétrico basado en la secreción de LDH. Se determinan los niveles de la proteína transmembrana TF mediante la técnica ELISA, y su expresión génica mediante *Real Time* RT-PCR. Los valores son normalizados en porcentajes para el caso de la proteína (100% es el valor de la estimulación celular con TNF-α) y mediante el método matemático del 2^{-DDCt} para la expresión génica (unidades arbitrarias; UA). Una disminución de los niveles de TF en las HAEC estimuladas, previamente incubadas con el extracto o compuesto problema, indicaría una actividad anticoagulante de éste. La evaluación de la precisión del modelo se realiza mediante el cálculo de la desviación estándar (SD) y de los coeficientes de variabilidad intra e interensayo (CV). La exactitud se evalúa mediante el cálculo de la media del error estándar (SEM). Se inicia el estudio de los efectos anticoagulantes del Resveratrol (compuesto fenólico abundante en el vino tinto) a distintas concentraciones para, posteriormente, utilizarlo como control positivo de experimento por su conocido efecto antitrombótico.

Resultados: El Resveratrol a la máxima concentración testada (100 mM) disminuye la concentración de proteína TF en un 93% de forma dosis-dependiente y un 30% la expresión génica. A partir del cálculo de la precisión, se ha obtenido CV intraensayo inferior a lo esperado en cultivos celulares: CV = 3,87 (< 10%) y SD = 8,59% a nivel de proteína y un CV = 18,39 (< 20%) y SD = 0,126 UA a nivel de expresión génica. Se ha conseguido una exactitud de experimento (SEM) de 6,075% en la cuantificación de proteína y de 0,089 UA, para expresión génica.

Conclusiones: La estandarización de la metodología consigue un modelo celular *in vitro* que nos permite el estudio de los efectos anticoagulantes de extractos o compuestos de forma rápida, precisa y exacta. El Resveratrol, al presentar una reducción importante del TF, puede ser considerado un buen control positivo para este modelo.

LA ACTIVACIÓN DE LAS PLAQUETAS CON TROMBINA INDUCE LA LIBERACIÓN DE MICROPARTÍCULAS RICAS EN PROTEÍNAS PRO-ATEROSCLERÓTICAS

T. Padro^a, R. Suades^{a,b} y L. Badimon^{a,b}

^aCentro de Investigación Cardiovascular. CSIC-ICCC. Hospital de Sant Pau. Barcelona. ^bInstituto de Salud Carlos III. CIBERobn. Patofisiología de la Obesidad y Nutrición.

Antecedentes: Las micropartículas (MPs) circulantes se han asociado a factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, diabetes, e hiperlipemia y el número variable de MPs circulantes se ha relacionado con lesiones vasculares de severidad progresiva. Hasta ahora, sin embargo, se desconoce la relación entre la composición proteica de las MPs y el estado funcional de las células de las que provienen y su relevancia en el proceso aterotrombótico. En este estudio hemos investigado las características y proteoma diferencial de las MPs derivadas de plaquetas activadas con trombina, proceso habitual en las complicaciones aterotrombóticas asociadas a la rotura de placas vulnerables.

Métodos: Las MPs se han obtenido por ultracentrifugación a partir de plaquetas humanas lavadas, activadas o sin activar *in vitro* con trombina (0,5 uNIH/ 4 x 10⁸ plaquetas). Las MPs se han seleccionado por tamaño (0,1-1,0 μ), cuantificado y caracterizado por citometría de flujo. El análisis del proteoma diferencial se ha realizado mediante electroforesis bidimensional y la identificación de proteínas por espectrometría de masas (Maldi-ToF y LC/MS/MS).

Resultados: En MPs derivadas de plaquetas activadas con trombina (T-MPs) se han identificado 42 proteínas diferenciales debido a alteraciones en sus niveles de detección (22 aumentos/9 disminuciones) o en perfil proteómico de las diferentes formas de una misma proteína (11 modificaciones). El patrón diferencial de la T-MPs incluye a proteínas que participan en procesos de citoquinesis (24%), proteínas asociadas a la membrana plaquetar (21%), proteínas de señalización (21%), del metabolismo celular (9%) y derivadas del plasma (17%). Las MPs, son portadoras de proteínas relevantes en procesos de adhesión y agregación plaquetar. Comparado con MPs derivadas de plaquetas control no activadas (C-MPs), las T-MP presentan: *a)* un aumento del 50-200% en el contenido de proteínas como cofilina y gelsolina, que regulan la dinámica de formación de fibras actina y de inhibidores de proteinasas como la alfa-2-macroglobulina, *b)* alteraciones en el perfil proteómico, que sugieren una variación en el nivel de fosforilación, de proteínas como la cadena ligera de la forma reguladora de la miosina (MRLC) y la proteína de señalización 14-3-3. En las T-MPs, la cadena gamma del fibrinógeno, ligando específico del complejo GPIIb/IIIa y la proteína de membrana trombospodina, que participa en mecanismos moleculares y celulares claves en trombosis y arteriosclerosis, presentan cambios significativos en la distribución de sus isoformas. Además, el nivel de trombospodina se encuentra más de 10 veces aumentado ($p < 0,05$) respecto al de las C-MPs.

Conclusiones: La trombina induce activación plaquetar y desencadena la liberación de MPs con un complejo perfil proteómico. Las T-MPs son transportadoras de proteínas que pueden estar involucradas funcionalmente en la formación de trombos oclusivos y en la progresión de lesiones arterioscleróticas.

PERFÍL TROMBOGÉNICO ASOCIADO A LA OBSTRUCCIÓN CORONARIA. DIFERENCIAS DE GÉNERO

J.P. Saez de Lafuente^a, Y. Saez^b, M. Vacas^b, M. Santos^b, J.D. Sagastagoitia^c, E. Molinero^c, E. Sabino^d y J.A. Iriarte^b

^aEscuela Universitaria de Enfermería de la Universidad del País Vasco UPV/EHU. ^bFundación para la Investigación y Docencia de las Enfermedades Cardiovasculares. FIDEC.

^cDepartamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco UPV/EHU.

^dDepartamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco UPV/EHU.

Objetivo: Analizar las posibles diferencias entre las concentraciones de marcadores trombogénicos asociados a la obstrucción coronaria en hombres y mujeres.

Pacientes y métodos: Hemos estudiado 502 pacientes (251 hombres y 251 mujeres) consecutivos, con una edad media de $63,94 \pm 11,26$ y $66,08 \pm 10,58$ años respectivamente. A todos ellos se les realizó coronariografía, bien por presentar un episodio coronario agudo o para descartar enfermedad coronaria. Al ingreso en el hospital, se procedió a la extracción de una muestra de sangre para determinar los niveles de lipoproteína (a) [Lp (a)] por ELISA, fibrinógeno (Von Clauss), proteína C reactiva (inmunoturbidimetría- Tina Quant)) y dímero D (Dímero-D Elisa VIDAS, Biomerieux). **Análisis estadístico:** Las variables paramétricas se expresaron en medias y desviaciones estándar, las no paramétricas en medianas y rangos intercuartílicos (primer cuartil-tercer cuartil) debido a que la distribución de valores presentaba una asimetría importante. Para valorar las diferencias en los niveles de los diferentes factores

estudiados según la presencia o ausencia de obstrucción significativa, se utilizó el test de la t de Student para las variables paramétricas y el test de la U de Mann-Whitney para las variables no paramétricas.

Resultados: En la comparación global de los niveles de marcadores en los dos grupos la Lp (a) ($p < 0,004$) y el fibrinógeno ($p < 0,001$) presentaron diferencias significativas. El 80,47% de los hombres presentaron enfermedad obstructiva coronaria de al menos un 50% en un vaso, mientras que en las mujeres fue del 59,36%. En los hombres con obstrucción coronaria, el dímero-D fue el único marcador que presentó valores significativamente más altos ($p < 0,032$) que el grupo de hombres con red coronaria normal, mientras que en las mujeres con obstrucción lo fueron la PCR ($p < 0,004$), la Lp (a) ($p < 0,001$) y el fibrinógeno ($p < 0,045$). Cuando se compararon por sexo los grupos con red coronaria normal, el nivel de fibrinógeno fue más alto en las mujeres ($p < 0,045$), mientras que en los grupos con obstrucción lo fueron el fibrinógeno ($p < 0,001$) y la Lp (a) ($p < 0,001$).

Conclusiones: 1. La lipoproteína (a) ha demostrado ser el factor diferenciador en el perfil aterogénico asociado a la obstrucción coronaria entre hombres y mujeres. 2. Proyecto subvencionado por la 6ª Convocatoria del Programa de Ayudas a Proyectos Sociales de la Bilbao Bizkaia Kutxa (BBK). I + D + I en Acción Social.