



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Divisi3n de Ci3ncias de la Salut
Facultad de Medicina**

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

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

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

Barcelona, Enero 2007

5. DISCUSIÓN

La hemostasia se entiende como una serie de mecanismos que permiten que la sangre fluya a través de las venas y a la vez reparar lesiones que se puedan producir en los vasos evitando o disminuyendo el volumen de sangre que se extravase. A pesar de que en el último siglo se han producido grandes avances en el entendimiento de la fisiología de la hemostasia, aún quedan lagunas para una completa comprensión de la misma.

En esta tesis se ha estudiado la compensación del defecto hemostático derivado de la falta y/o disfunción de factores de coagulación o plaquetas mediante el refuerzo de la vía del FT. Concretamente, esta tesis se ha centrado en el estudio de coagulopatías congénitas y adquiridas (hemofilia A, hemofilia A con inhibidores, cirrosis) y trombocitopatías debidas tanto a función plaquetaria anómala (cirrosis, Síndrome de Bernard Soulier, Trombastenia de Glanzmann), como a un número de plaquetas disminuido. Igualmente, se ha analizado el efecto hemostático que producen tanto un fármaco anticoagulante oral de amplia utilización (como es el acenocumarol), como un agente antiagregante plaquetario (abciximab). Se ha investigado cómo la potenciación de la vía del FT puede reversibilizar el efecto de estos fármacos para el reestablecimiento de la hemostasia. Dadas las características de estos fármacos, sus efectos producen estados comparables a coagulopatías y trombocitopatías adquiridas, respectivamente. Como potenciador de esta vía se ha empleado el principal ligando del FT, el FVIIa. La unión del FT al FVII(a) hace que la reacción de activación del FX por el FVII(a) se produzca de manera 100 veces más eficiente que en ausencia de esta unión (Martin, 1995). Finalmente, se han estudiado los mecanismos de acción que median los efectos hemostáticos del FVIIa y su perfil de seguridad.

A finales de los 80s se desarrolló el rFVIIa como agente baipás para tratar los episodios hemorrágicos en aquellos pacientes hemofílicos que habían desarrollado anticuerpos inhibidores contra el FVIII (en la hemofilia A) o contra el FIX (en la

hemofilia B) (Hedner, 1990). En estas situaciones clínicas el rFVIIa ha demostrado una elevada eficacia terapéutica. Asimismo, la literatura médica evidencia su elevada eficacia en el control de los episodios de sangrado en diversas aplicaciones fuera de la hemofilia, tales como en pacientes con otras coagulopatías, con trombocitopatías (Poon, 1999) o en pacientes con politraumatismos (Martinowitz, 2002). A pesar de ser un fármaco eminentemente potenciador de los mecanismos de la hemostasia, los estudios clínicos indican que el tratamiento con este factor activado raramente se asocia a complicaciones trombóticas, lo que le confiere un perfil de seguridad elevado (Roberts, 2005). Por todo ello, algunos autores lo consideran el “agente hemostático universal” (Hedner, 2000b).

En múltiples ocasiones el conocimiento empírico precede al entendimiento de los mecanismos de acción asociados al tratamiento. Sin embargo, las investigaciones, fuera de su uso aprobado, sobre el posible **efecto hemostático** del FVIIa en pacientes con **coagulopatías** o **trombocitopatías** son difíciles de llevar a cabo en estudios clínicos controlados. En algunos casos esto es debido a la escasa incidencia de estas enfermedades en la población, mientras que en otros se debe a las implicaciones éticas que supondría exponer a los pacientes a riesgos innecesarios sin estudios *in vitro* que avalen la validez del tratamiento. La metodología seguida en esta tesis, basada en los sistemas de perfusión, permite evaluar *in vitro* la interacción de plaquetas con el subendotelio o con proteínas adhesivas aisladas, así como la fibrinoformación en condiciones de flujo. Este sistema, además, permite probar el efecto hemostático de nuevas estrategias *in vitro* o *ex vivo*. La elección de las condiciones experimentales permite simular las condiciones que se dan en diferentes puntos del árbol vascular (Escolar, 2001). La combinación de estas técnicas con el uso de diferentes anticoagulantes posibilita poder estudiar el papel que desempeñan las plaquetas (si se utiliza un quelante del Ca^{++} como el citrato) o plaquetas y sistema de la coagulación cuando se emplea un anticoagulante como la HBPM. En todos los

trabajos incluidos en esta tesis, la sangre circulante se expuso a superficies ricas en FT. Como se ha comentado antes, las principales proteínas involucradas en la iniciación de los mecanismos prohemostáticos son **colágeno**, **FVW** y **FT**. Existe abundante información sobre el efecto que ejercen los diferentes tipos de colágeno y el FVW en la reactividad plaquetaria (Baumgartner, 1977; Sakariassen, 1986; Wu, 2000) y está también plenamente aceptado que el FT es el principal iniciador de los mecanismos de coagulación (Mackman, 2006).

La potenciación del complejo FT-FVIIa y su unión a fosfolípidos aniónicos expresados en la membrana de células activadas es de gran importancia en la generación de trombina. Mientras las plaquetas establecen interacciones con las proteínas adhesivas expuestas (colágeno, factor de von Willebrand y fibrinógeno), el FT forma complejos con el FVIIa que activará los mecanismos de la coagulación (Brummel, 2002). En la mayoría de los experimentos de perfusión incluidos en esta tesis, la superficie trombogénica perfundida fue un vaso arterial dañado en el que queda expuesto el subendotelio, rico en las principales proteínas activadoras de la hemostasia, especialmente colágeno y FT, lo que hace posible el estudio de la deposición de plaquetas y la fibrinoformación.

Acción del rFVIIa en coagulopatías congénitas y adquiridas

Utilizando técnicas de perfusión pudimos confirmar resultados previos de nuestro grupo (Ordinas, 1996), donde se demostraba la existencia de un déficit del funcionalismo plaquetario en los pacientes con cirrosis hepática comparado con los donantes sanos. A pesar de que todavía hay autores que cuestionan la existencia de un defecto plaquetario en los pacientes cirróticos (Lisman, 2006), y asocian el defecto de hemostasia primaria a la reducción de hematocrito y a los bajos recuentos plaquetarios, nuestras observaciones indican la presencia de una disfunción plaquetaria evidente tanto en perfiles de agregación anómalos, como en una

deficiente interacción plaquetaria con el subendotelio (Tonda, 2003). Además, dado que la mayoría de factores de la coagulación son de síntesis hepática, los pacientes cirróticos presentan unos niveles de factores disminuidos, lo que conlleva también una deficiente hemostasia secundaria, con una menor activación de la coagulación y por tanto una disminución en la generación de trombina que puede repercutir en una menor activación plaquetaria. En el mismo trabajo pudimos comprobar que la potenciación del complejo FT-FVIIa en sangre de pacientes cirróticos con diferente grado de afectación hepática, produjo un aumento de trombina que conllevó a un aumento de la fibrinoformación sobre el subendotelio dañado. Estas muestras, a pesar de la baja concentración general de factores de la coagulación, alcanzaron valores equivalentes a los que se produjeron en los pacientes sanos.

Continuando con el estudio de las coagulopatías, nuestras observaciones apoyan que el FVIIa puede subsanar la falta de FVIII que se produce en los pacientes con hemofilia A grave, tanto en la hemofilia congénita como en la debida a anticuerpos inhibidores (Tonda, 2007b; Galan, 2001). La potenciación de la vía del complejo FT-FVIIa compensa el déficit hemostático que existe en estos pacientes aumentando la generación de fibrina, la cual consolidará el tapón hemostático en las zonas vasculares dañadas. En estos casos, el complejo FT-FVIIa *bypassea* la falta del FVIII, necesario para que se ensamble el complejo tenasa en la fase de propagación de la activación de la cascada de la coagulación (ver Figura 4 de la justificación genérica), y produce suficiente FXa para que se forme el complejo protrombinasa (Hoffman, 2003). Esto permite que se genere una cantidad de trombina que dará lugar a la formación de mallas de fibrina, consolidando los tapones hemostáticos en las zonas dañadas. De acuerdo con la información proporcionada por nuestros estudios (Tonda, 2007a; Galan, 2001), los efectos beneficiosos del rFVIIa a corto plazo en la hemofilia podrían ser el resultado de promover la generación de fibrina en zonas vasculares dañadas sometidas a

coeficientes de cizalladura bajos-intermedios, en los cuales prevalece la fibrinoformación sobre los eventos plaquetarios (Lisman, 2003).

Acción del rFVIIa en trombocitopatías y trombocitopenia

El hecho de que potenciar vías alternativas de la coagulación en aquellos casos en que algún factor es deficiente compense el déficit hemostático es perfectamente entendible. Parece más sorprendente que potenciando la coagulación se pueda compensar una disfunción plaquetaria.

El segundo grupo de estudios se ha centrado en las trombocitopatías. El síndrome de Bernard-Soulier y la trombostenia de Glanzmann son dos trombocitopatías congénitas producidas por la falta de alguno de los principales complejos glicoproteicos de membrana, aunque hay casos en que los receptores están presentes pero no son funcionales. En el caso del Bernard-Soulier, está ausente el complejo GPIb-IX-V o alguno de sus componentes, mientras que la trombostenia de Glanzmann se debe a la falta de la GPIIb-GPIIIa (ver Justificación genérica). Estos déficits de receptores plaquetarios se asocian con cuadros de sangrado bien definidos (Weiss, 1978; Nurden, 1991). En nuestro sistema experimental, la potenciación de la coagulación a través del complejo FT-FVIIa mejora el déficit hemostático que se da en las trombocitopatías asociadas a cirrosis, a trombostenia de Glanzmann (Galan, 2003) y al síndrome de Bernard-Soulier (Tonda, 2004b). El mecanismo implicado es la generación de trombina, que da lugar a una gran fibrinoformación sobre la superficie vascular dañada y que precede a la deposición plaquetaria. Por otra parte, es importante resaltar que estos pacientes presentan disfunción plaquetaria, pero conservan intacta la acción procoagulante asociada a la membrana plaquetaria. En apartados anteriores de esta tesis ya se ha mencionado que los fosfolípidos de las membranas de las plaquetas proporcionan el

soporte para que se puedan ensamblar los complejos enzimáticos de la coagulación y dar lugar a la formación de trombina.

Salvo en el caso del Síndrome de Bernard-Soulier, a coeficientes de cizalladura bajos y moderados la interacción plaquetaria no mejoró en presencia de rFVIIa a pesar de la mayor generación de trombina. Esto puede ser debido a que las plaquetas y la fibrina compiten por la superficie dañada estando, a estos coeficientes, favorecida la formación de la malla de fibrina sobre la deposición plaquetaria. De hecho, cabe resaltar que en nuestros experimentos con rFVIIa, muchas de las plaquetas interaccionaban directamente con la malla de fibrina. Tampoco se descarta que la formación de una malla de fibrina estable atrape elementos celulares sanguíneos (eritrocitos, leucocitos, etc.) que pudieran ejercer un efecto mecánico para detener el sangrado. Estudios anteriores ya habían sugerido que otras células sanguíneas podrían tener un efecto mecánico (Turitto, 1980).

Los trabajos aquí presentados también evidencian que favorecer la coagulación podría compensar el déficit de hemostasia primaria producido en condiciones de trombocitopenia severa (<6000 plaquetas/microlitro) mediante la formación de mallas de fibrina estables que ayuden a la detención del sangrado. A pesar de la práctica ausencia de plaquetas, bajo estas condiciones, la adición de FVIIa a los perfusados permitió que se generara trombina y un aumento en la formación de fibrina (Galan, 2003). Tanto en los estudios clínicos realizados en pacientes trombocitopénicos (Kristensen, 1996; Barnes, 2005) como en nuestro sistema, existen bajos recuentos de plaquetas, pero probablemente existen poblaciones de microvesículas, responsables de proporcionar los fosfolípidos necesarios para que se produzcan las reacciones de coagulación. No se descarta que estas microvesículas contengan otros antígenos procedentes de la estirpe celular de la que proceden que puedan ayudar a la formación del trombo. En la literatura hay numerosas referencias relativas a la presencia de microvesículas ricas en FT con un

posible efecto hemostático y protrombótico (Balasubramanian, 2002; Falati, 2003). En esta línea, en un trabajo incluido en esta tesis (Tonda, 2004a) se comprobó que fragmentos de plaquetas inviables (infusible platelet membranes), equivalentes a microvesículas, pueden mejorar la acción hemostática del FVIIa, lo cual abre la posibilidad de combinar dos estrategias terapéuticas diferentes para una mayor eficacia prohemostática.

Otro de los objetivos de esta tesis ha sido el estudio de la compensación medicamentosa de fármacos antitrombóticos. El envejecimiento de la población junto con el aumento de la incidencia de enfermedades cardiovasculares, hace que cada vez haya más individuos que siguen tratamientos profilácticos (primarios o secundarios) para evitar eventos de carácter trombótico. En la actualidad existen diversas estrategias terapéuticas destinadas a evitar la progresión de estas complicaciones. Entre los fármacos de elección se encuentran los fármacos hipolipemiantes, los inhibidores de la coagulación (p. ej.: acenocumarol, warfarina, etc.) y otros con un efecto antiagregante plaquetario (p. ej.: anticuerpos anti glicoproteína IIb/IIIa (abciximab), clopidogrel, aspirina, etc.). La monitorización de estos fármacos no siempre es fácil o inmediata, y un exceso de tratamiento puede provocar desequilibrios hemostáticos que deriven en complicaciones hemorrágicas. Concretamente, en esta tesis se ha estudiado el efecto del acenocumarol y del abciximab. El acenocumarol es un fármaco anti-vitamina K, y por tanto disminuye la síntesis y los niveles en sangre de los factores de coagulación vitamina K-dependientes.

En nuestro sistema experimental *ex vivo* e *in vitro*, la potenciación de la vía del FT mediante FVIIa demostró ser eficiente para revertir el efecto de los fármacos anticoagulantes (acenocumarol) y antiagregantes plaquetarios (abciximab) (Galan, 2001; Galan, 2003). Debido a las características de los fármacos estudiados, los mecanismos de acción implicados en este efecto serían similares a los observados en

la cirrosis (para el acenocumarol) y la trombostenia de Glanzmann (para el abciximab). Estas observaciones podrían tener implicaciones clínicas ya que apuntan al rFVIIa como posible fármaco de “rescate” de las hemorragias debidas a este tipo de fármacos. No obstante, la comprobación final de este efecto debería venir de estudios clínicos específicos que ayuden a determinar su eficacia *in vivo*.

En relación a los mecanismos de acción del complejo FT-FVII:

El papel del FT como iniciador de los **mecanismos de la coagulación** ha sido motivo de numerosos estudios. Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad la posible participación del FT en la **hemostasia primaria**.

Para obtener mayor información sobre los mecanismos por los cuales la potenciación de la vía del FT ejerce un efecto hemostático beneficioso y para determinar si las plaquetas pueden interactuar con el FT, en esta tesis, además de las técnicas convencionales de perfusión, se introdujo una modificación en la técnica de perfusión en cámara plana descrita por Sakariassen (Sakariassen, 1983). Esta variación consiste en utilizar un material plástico (PVDF) más maleable que el Thermanox como soporte de proteínas purificadas, lo que permite la evaluación *en face* de las superficies perfundidas y un posterior procesamiento de las mismas para su valoración en cortes transversales (*cross-section*), visualizando la interacción plaquetaria directamente sobre la superficie (Tonda, 2007a).

En estos experimentos, realizados con sangre anticoagulada con HBPM y en condiciones de coeficiente de cizalladura bajo/medio, pudimos comprobar que el FT induce adhesión plaquetaria además de iniciar los mecanismos de coagulación. Ya en 1996 Orvim y col. sugirieron que la interacción plaquetaria al FT estaba mediada por una interfase previa de fibrina (Orvim, 1994) Estas observaciones sugerían que la fibrina generada sobre el FT precedía a la formación del trombo plaquetario. En contraste con el artículo citado, en nuestros experimentos las

plaquetas interaccionaron directamente con el FT y la malla de fibrina generada fue moderada. Fue solo en presencia de rFVIIa cuando los depósitos de fibrina mostraron un aumento significativo y las plaquetas se depositaron sobre las mallas de fibrina. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados anteriormente presentados, e indican que, en presencia de FT y a coeficientes de cizalladura bajos, el efecto más constante del rFVIIa es un aumento de la generación de trombina seguida de una gran formación de fibrina sobre la zona vascular dañada, con plaquetas adhiriéndose al fibrinógeno/fibras de fibrina (Tonda, 2003; Galan, 2003).

Estamos convencidos de que cantidades mínimas de FVIIa pueden generarse durante los estudios con sangre sin anticoagular, y que el FVIIa generado sería el responsable de los depósitos iniciales de fibrina observados en estudios anteriores (Orvim, 1994). El uso de HBPM en nuestro sistema previno una excesiva activación del sistema de coagulación (Zwaginga, 1990) y permitió el estudio de la actividad proadhesiva intrínseca de la preparación de FT hacia las plaquetas, la cual no parece ser dependiente de la deposición de fibrinógeno o de la generación de fibrina. Estas observaciones podrían tener relevancia en la clínica, ya que una gran proporción de pacientes con riesgo de padecer eventos isquémicos reciben HBPM como profilaxis o como tratamiento de complicaciones trombóticas (Hirsh, 2005).

Nuestros estudios inmunocitoquímicos de la superficie rica en FT expuesta a flujo sanguíneo indican que la unión de FVW precede a la deposición de fibrinógeno/formación de fibrina, sugiriendo que el FVW podría mediar en la interacción inicial con FT, mientras que el fibrinógeno/fibrina desempeñan un papel más relevante en la progresión del trombo.

En todos nuestros experimentos con sangre anticoagulada con HBPM, el mecanismo de acción del rFVIIa a coeficientes de cizalladura bajos y moderados (250s^{-1} y 600s^{-1} respectivamente) parece ser un aumento de la generación de trombina en la zona dañada, lo que produce una gran fibrinoformación que precede la deposición

plaquetaria. Otro mecanismo sugerido por Lisman y sus colaboradores (Lisman, 2003) defiende que el FVIIa ejerce su acción en los pacientes hemofílicos a través de una potenciación del inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI), pero no encuentran el mismo efecto en pacientes cirróticos (Lisman, 2001; Lisman, 2002), lo que deja abierto el debate en relación a los mecanismos de acción del FVIIa.

En uno de los trabajos incluidos en esta tesis, el pretratamiento de la superficie a perfundir con un anticuerpo anti-factor tisular disminuyó la generación de trombina, y como consecuencia la fibrina formada sobre el subendotelio perfundido. El hecho de que no pudiesemos bloquear completamente la fibrinoformación puede atribuirse a fuentes circulantes de FT. Distintos autores han demostrado la existencia de FT circulante asociado a células portadoras de FT como p. ej. los leucocitos y las microvesículas (Biro, 2003; Conde, 2003). Últimas investigaciones apuntan que incluso las plaquetas podrían contener ciertas cantidades de FT (Lopez-Vilchez, 2007).. El origen, transporte y función de este FT sigue siendo motivo de discusión (Morel, 2004), aunque podría tener relevancia en fenómenos trombóticos. La perfusión de sangre con rFVIIa sobre segmentos pretratados con anti-FT indujo un cierto aumento de la fibrinoformación, pero en absoluto comparable al obtenido en ausencia del anticuerpo anti-FT. Esto demuestra una indudable dependencia de la presencia de FT en la zona vascular dañada para que se produzca el efecto beneficioso del rFVIIa y justifica la necesidad de una fuente circulante de FT. Aunque algunos autores han sugerido un mecanismo de acción del rFVIIa a altas dosis independiente de la presencia de FT (Monroe, 1997; Hoffman, 2003), cabe mencionar que estos no consideran la posibilidad de que haya micropartículas ricas en FT en sus sistemas experimentales o que las propias plaquetas actúen de transportadoras de FT. Además, gran parte de estos estudios han sido realizados en condiciones estáticas sin tener en cuenta la reología sanguínea. Así, los mecanismos de acción asociados al rFVIIa siguen siendo motivo de discusión y estudio.

Un correcto mantenimiento de la hemostasia es dependiente de las condiciones reológicas que se producen en el sistema vascular (Baumgartner, 1980). Un ejemplo plenamente aceptado es el que se produce en zonas estenosadas, zonas de alto riesgo trombótico, donde los índices de cizalladura incrementan considerablemente. Tras la ruptura de una placa aterosclerótica, el FT queda expuesto a la sangre circulante y este mecanismo desencadena la trombosis aguda. Gracias a modelos de perfusión, sabemos que en una arteria estenosada que está expuesta a elevados índices de cizalladura, la formación de fibrina disminuye y se favorecen los eventos plaquetarios (Weiss, 1995). Además, un índice de cizalladura elevado incrementa el número de plaquetas desagregadas, hecho que tiene un efecto negativo en la acumulación plaquetaria (Wu, 1997). No obstante, los mecanismos exactos que producen la oclusión vascular no han sido totalmente dilucidados. Por el contrario, en el territorio venoso disminuyen los índices de cizalladura y se favorecen fenómenos de coagulación y no tanto la generación de trombo primario (Baumgartner, 1980).

Técnicamente, los sistemas de perfusión convencionales se muestran más limitados a la hora de estudiar los mecanismos a altos coeficientes de cizalladura, ya que necesitan un volumen de muestra superior. Por eso, para el estudio de los mecanismos hemostáticos a alto índice de cizalladura se empleó el PFA-100™ con cartuchos modificados para exponer sangre de donantes sanos o pacientes hemofílicos a colágeno sólo o una mezcla de colágeno y factor tisular (Tonda, 2007a).. Esta composición de proteínas es similar a la que se produce en los sitios de daño vascular y ruptura de la placa aterosclerótica. La utilización de este sistema permitió reportar un déficit de funcionalismo plaquetario en los pacientes hemofílicos que no se evidencia a coeficientes de cizalladura bajos y moderados (Tonda, 2007b). Además, este sistema nos permitió demostrar que el FT ejerce una acción hemostática a altos coeficientes de cizalladura, a los que la generación de fibrina no está favorecida, corroborando así las

observaciones del grupo de Nemerson, que apuntaban al FT como determinante de la trombogenicidad de las lesiones trombóticas tras la ruptura espontánea o mecánica de la placa ateromatosa (Toschi, 1997).

En relación a los efectos secundarios asociados a la potenciación del complejo FT-FVII:

Como se ha comentado, a pesar de ser un fármaco prohemostático, los estudios clínicos indican que el tratamiento con rFVIIa raramente se asocia a complicaciones trombóticas (Roberts, 2005). Nuestros datos proporcionan información indirecta de los posibles efectos secundarios asociados al rFVIIa. El rFVIIa causa un aumento de la fibrinoformación en estudios realizados con sangre de donantes sanos a coeficientes de cizalladura bajos, pero no provoca un acortamiento de los tiempos de oclusión en el PFA-100. Esto indica que las complicaciones trombóticas asociadas a rFVIIa, de producirse, podrían ser más frecuentes en áreas vasculares sometidas a coeficientes de cizalladura moderados y menos frecuentes en áreas sometidas a coeficientes de cizalladura elevados. Si extrapolamos nuestros resultados al territorio vascular podríamos inferir que, de producirse episodios trombóticos por tratamiento con rFVIIa, éstos serían más destacados en el territorio venoso y tendrían un efecto limitado en zonas del territorio arterial o zonas estenosadas, donde el coeficiente de cizalladura es superior.

Esta tesis doctoral presenta evidencias claras de que la potenciación de la vía del FT mediante FVIIa puede tener utilidad clínica para compensar déficits hemostáticos debidos tanto a coagulopatías como a trombocitopatías, y aporta mecanismos de acción específicos que lo apoyan. Asimismo, nuestro trabajo indica que el rFVIIa puede emplearse como fármaco de “rescate” de tratamientos anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios. El descubrimiento de que el FT tiene

propiedades proadhesivas para las plaquetas abre un nuevo campo de estudio en el entendimiento de las enfermedades cardiovasculares y apunta al FT y al complejo FT-FVIIa como una posible diana terapéutica sobre la que actuar tanto para potenciar su efecto prohemostático o como estrategia inhibidora.