

Endotelio y plaquetas: de la biología al tratamiento

COORDINADORES: P. GARCÍA DE FRUTOS. *Barcelona*
J.A. PÁRAMO. *Pamplona*

Resumen del simposio

El papel de las células endoteliales y las plaquetas, decisivas en los procesos de hemostasia y trombosis, será el tema que se abordará en profundidad en el simposio.

El endotelio vascular, la capa monocelular que recubre el interior de los vasos, es un órgano complejo que se encuentra estratégicamente situado en la interfase entre la sangre y los tejidos para responder a diversos estímulos fisiológicos y patológicos. Mientras que el endotelio sano podría considerarse un “barómetro” de salud cardiovascular, la pérdida de funcionalidad endotelial se asocia con numerosas condiciones clínicas relacionadas con fenómenos trombóticos. Encontrar un método de determinación del estado de la función endotelial se ha convertido en un objetivo biomédico de gran interés. El Dr. G. Lip *et al.* (Birmingham, RU) plantean si existen en la actualidad herramientas útiles para determinar la función endotelial, que puedan ser aplicadas con finalidad diagnóstica, pronóstica o terapéutica. Para ello definen el concepto de disfunción endotelial como una alteración de las funciones reguladoras del endotelio, que conllevan un fenotipo proinflamatorio, proliferativo y protrombótico. La función endotelial puede determinarse directamente, con métodos invasivos o no invasivos, o indirectamente, midiendo los niveles circulantes de biomarcadores liberados por las células endoteliales en respuesta a una agresión. Entre los métodos invasivos destacan la capacidad vasodilatadora endotelial mediada por óxido nítrico en respuesta a estímulos farmacológicos (acetilcolina) o la pletismografía, que permite evaluar la función de arterias de resistencia. Entre los métodos no invasivos se puede determinar el flujo y actividad metabólica coronaria mediante tomografía con positrones (PET) o la dilatación de una arteria (generalmente braquial) mediada por flujo (FMD), en respuesta a estímulos químicos o mecánicos, midiendo dicho flujo con ultrasonidos o láser. Sin embargo, son técnicas que requieren equipos y personal especializado, por lo que están restringidas al ámbito de la investigación clínica. Entre los marcadores de disfunción endotelial, el factor von Willebrand (FvW), la endotelina-1 (ET-1), VCAM-1, selectina-E, proteína C-reactiva (PCR) y células endoteliales circulantes (CEC) podrían ser de interés para determinar el grado de disfunción, sin que en el momento actual pueda decirse que existe un marcador “universal” de función endotelial.

Un aspecto que está cobrando cada vez más relevancia clínica es el papel de las micropartículas (MP), fragmentos de membrana liberados tras activación o apoptosis por diversos tipos celulares, como células endoteliales, plaquetas y monocitos, en patologías trombóticas. Las MP poseen actividad procoagulante en su superficie al exponer fosfolípidos, como fosfatidilserina, que activan la coagulación. El Dr. E. Anglés-Cano (Caen, Francia) formula un nuevo papel de las MP a raíz de experimentos recientes de su grupo. Las MP endoteliales expresan también actividad fibrinolítica, ya que tras estimulación puede generarse plasmina en su superficie. Sus trabajos demuestran que activadores y receptores fibrinolíticos, como u-PA y u-PAR, están presentes en la superficie de las MP, lo que favorece la activación del plasminógeno. A través de este mecanismo, las MP podrían jugar un papel fundamental, no sólo en el proceso fibrinolítico, sino también en la inflamación, migración celular y angiogénesis. Un aspecto interesante es que MP con potencial fibrinolítico pueden ser detectadas a nivel de la circulación en pacientes con procesos cardiovasculares y, por lo tanto, usadas en el diagnóstico.

Más allá de su participación fundamental en el proceso hemostático, como primera línea de defensa antihemorrágica tras una lesión vascular, las plaquetas juegan un papel clave en la inflamación, almacenando y liberando numerosos factores proinflamatorios. La Dra. T. Santos (Valencia) revisa este importante aspecto de la participación plaquetaria en la aterotrombosis, incluyendo los procesos de adhesión celular, al interaccionar con un endotelio disfuncionante, así como con células endoteliales progenitoras, el reclutamiento

de células inflamatorias al vaso, la interacción con leucocitos a través de selectina-P, la liberación de quimioquinas como RANTES y de citocinas como CD40L, y su papel en la coagulación y proteólisis. Se presentan evidencias de que las plaquetas intervienen decisivamente en la inflamación y que ésta, a su vez, puede activar las plaquetas. Finalmente, se discute el hecho de que agentes farmacológicos con acciones antiplaquetarias también poseen propiedades antiinflamatorias.

En diversas patologías cardiovasculares, la aplicación de doble terapia anticoagulante/antiagregante, incluso triple terapia antitrombótica, está justificada por la marcada activación plaquetaria y de la coagulación. Sin embargo, su administración no está exenta de complicaciones hemorrágicas. La Dra. M. Heras (Barcelona) discute el papel de la terapia anticoagulante/antiagregante en la prevención secundaria de la cardiopatía isquémica en pacientes con alto riesgo embólico, en prótesis valvulares con cardiopatía isquémica o ACV embólico, y en fibrilación auricular con riesgo embólico, sobre la base de su gran experiencia personal y las recientes recomendaciones y guías clínicas. El tratamiento antitrombótico triple con dicumarínicos/aspirina/clopidogrel está indicado en pacientes con *stent* e indicación para anticoagulación. Se revisan, asimismo, los factores predictores de hemorragia grave que pueden tener un impacto desfavorable en términos de mortalidad y sobre la incidencia de eventos isquémicos. Se concluye que la selección adecuada de pacientes tributarios de doble o triple terapia antitrombótica será, por consiguiente, fundamental para evitar graves complicaciones.

THE EVALUATION OF THE ENDOTHELIUM: RECENT CONCEPTS

A. BLANN, S. APOSTOLAKIS,
E. SHANTSILA, G.Y.H. LIP
*Haemostasis Thrombosis and Vascular Biology Unit,
University Department of Medicine. City Hospital,
Birmingham, UK*

The endothelium is a monolayer of cells uniquely positioned at the interface between the vessel wall and the flowing blood. Structural heterogeneity of endothelium along the vascular tree and complexity of its biological activities exerts multiple important functions for maintenance of vascular homeostasis including the regulation of coagulation and vascular permeability, the modulation of the vessel tone, participation in inflammatory processes, adaptation to haemodynamic changes and many others. Moreover, the endothelium acts as a barrier and thereby controls the adhesion and invasion of immune competent cells.

The integrity of the endothelial monolayer is crucial to preserve these functions. The purpose of the present review is to answer the question whether we currently possess reliable tool(s) to assess endothelial function as well as whether we can apply these approaches for diagnostic and prognostic purposes or disease management. In order to understand the complexity of these questions it is however essential to present the evolution of our knowledge on a structure of endothelium is increasingly appreciated as the most biologically active component of the vascular wall.

The past: fifteen centuries of unappreciation

The endothelium was structurally identified a century ago but only recently it has been recognized as a physiologically distinct organ. Moreover, the concept of a functional vascular wall was overlooked for centuries. Interestingly, Hippocrates and Galen considered that the vasculature consisted of two, unlinked systems: arteries and veins

Indeed, Galen believed that arteries contained air and vital spirits, whereas veins carried blood that was continuously formed in the liver¹. This erroneous theory of the circulation dominated medical science for more than 15 centuries. In the beginning of the 17th century, the English physician William Harvey disproved Galen's theory and was the first scientist in the western world to describe correctly and accurately the systemic and pulmonary circulation¹. Through a series of elegant physiological experiments, he demonstrated that arteries and veins are in fact connected and that blood

is contained within a closed circulation. Harvey first described the anatomy of the cardiovascular system, but technical limitations of his era prevent him from identifying the complexity of the microcirculation and vascular wall structure. Subsequently, compound microscopy enabled the Italian physician Marcello Malpighi to actually observe blood capillaries in 1661¹.

However, the term 'endothelium' was introduced in the scientific literature only two centuries later by the Swiss anatomist Wilhelm His¹. The initial definition of endothelium included the cells lining blood and lymphatic vessels, and mesothelial-lined cavities. Consequently the definition would narrow to include only the inner cell layer of blood vessels and lymphatics¹.

The present: structural and functional complexity

In the 1950s, the use of electron microscopy provided a new powerful insight into the structure of endothelium. It was soon revealed that endothelium structure is actually rather complex and diversity of the endothelial phenotype was demonstrated to be organ-specific^{1,2}. Additionally, the evolution of biochemistry and cellular biology paralleled with recognition that endothelial (ECs) are capable of producing of numerous biologically active substances in response to both mechanical and chemical stimuli. These findings have placed the endothelium in a unique position as a structurally and functionally complex organ^{1,2}.

The structural heterogeneity of ECs makes the definition of the endothelium challenging. Many of the characteristic structural features of the endothelium, such as Weibel-Palade bodies or fenestrae, are not present in every EC^{1,3}. Developmentally, the endothelium arises from mesoderm via the differentiation of hemangioblasts and/or angioblasts. However, other cell lineages may transdifferentiate into ECs. Of note, there are also currently no protein or mRNA markers that are both specifically and uniformly expressed in the endothelium¹. In addition to the structural diversity, from the functional standpoint, the endothelium also displays a remarkable heterogeneity. For example, ECs that line the post-capillary venules are primarily responsible for mediating leukocyte trafficking, whilst arteriolar ECs are critical for the regulation of vasomotor tone³.

In the following sections, we will summarize the main functions of the endothelium. The biological activities of the endothelium are complex and many pathways interact with each other. For instance, the endothelium is largely responsible for the balance between preservation of blood fluidity without clotting and prompt response to vascular injury. Of note, many

biological responses of the endothelium have only been observed in culture, where artificial conditions may dramatically alter the profile of gene expression as compared to the naturally functioning cells. Therefore, caution should be taken in translating these *in vitro* results to *in vivo* biochemical pathways.

Endothelium and blood flow

The healthy endothelium is a metabolically active interface between the blood and extravascular tissues. Its intimal surface is anticoagulant and antithrombotic, partly due to the negatively charged glycocalyx, which is made up of glycoproteins, glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, and heparan sulfate⁴. Additionally, healthy endothelium actively produce anticoagulant substances: thrombomodulin, tissue factor pathway inhibitor, tissue activator of plasminogen, as well as constitutively express natural inhibitors of platelet activity: cAMP and nitric oxide (NO). Regulation of the transference of fluidics between intravascular space and tissues is largely dependant of permeability of the endothelium serving as a barrier for loss of fluid through the vessel wall. Moreover, ECs can sense shear stress and respond to its fluctuations via short-term and long-term effects. Alterations in shear stress rapidly modulate the production of vasoactive substances, such as NO, prostacyclin, histamine and endothelin (ET), and regulates macromolecule permeability and endocytosis. Long-term effects mediated by vascular wall shear stress are associated with adaptive vessel growth and angiogenesis. Although it is known that endothelial cells can differentiate various modes of shear forces the details of the mechanisms underlying sensing of blood flow or shear stress changes and resulting in intracellular signaling are still to be discovered. Perhaps the cytoskeleton provides a structural framework to transmit mechanical forces between luminal, abluminal and junctional surfaces of ECs and their interior. It has been also proposed that intracellular calcium and the membrane potential are involved in the mechanical-sensing mechanism of ECs⁵. Nonetheless, biomechanics of the endothelium is an active and challenging field of research, investigating the pathways involved in blood flow-dependent vessel growth and in vascular remodeling.

Vascular tone and flow regulation

The endothelium plays a vital role in the control of vasomotor tone by synthesizing both vasodilating and vasoconstricting factors⁶. Endothelium-dependant vasodilation is largely mediated by prostacyclin and nitric oxide (NO). Prostacyclin is derived

from arachidonic acid metabolism with the enzyme cyclooxygenase being responsible for its synthesis in EC. Prostacyclin produces vasodilation by stimulating adenylate cyclase, which increases cyclic adenosine monophosphate levels in vascular smooth muscle cells (VSMCs). The release of prostacyclin is stimulated by either shear stress or endogenous mediators such as bradykinin, thrombin and serotonin. A second potent vasodilating agent produced by ECs is endothelium derived relaxing factor, which was identified as NO. Nitric oxide is synthesized in the ECs by the reaction of NO-synthase on L-arginine. NO diffuses from the ECs towards the VSMCs where it stimulates soluble guanylate cyclase, which increases cyclic guanine monophosphate (cGMP). This leads to a decrease in intracellular calcium, VSMCs relaxation and subsequently vasodilatation. NO is generated by EC continuously but its production can substantially increase in response to physiologic shear stress and numerous vasoactive substances, including acetylcholine, bradykinin, and thrombin. NO has a very short half life since it is rapidly inactivated in the blood by hemoglobin or superoxide radicals in the vascular wall⁶. Another vasodilating factor released by EC following stimulation by acetylcholine has been described as endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Although its exact biological nature is still miraculous EDHF is considered to be a substance and/or an electrical signal that is generated in the endothelium and can cause transient changes in the membrane potential of VSMCs⁶. When acetylcholine activates M1 muscarinic receptors, NO is released, whereas activation of M2 muscarinic receptors leads to EDHF expression.

To warrant a balanced regulation of vascular tone and ultimately blood flow distribution endothelium is also equipped with several vasoconstrictors. In fact the endothelium can release the most potent of currently known active vasoconstrictive compound, endothelin 1, with a potency 10 times greater than that of angiotensin II. Endothelins are 21-amino acid vasoconstricting peptides, but only endothelin-1 is exclusively expressed by ECs. Three different endothelin receptors (ET_A, ET_B, and ET_C) have been identified. Among them ET_A has higher affinity for endothelin-1 than do the other two isoforms. ET_A is found on VSMCs where it induces vasoconstriction⁷. Finally ECs can indirectly confer to vasoconstriction by producing angiotensin-converting enzyme (ACE)⁸.

Thrombosis and haemostasis

ECs play significant role in both the promotion and the inhibition of coagulation⁹. Platelet activating factor, a potent stimulus for platelet aggregation, is se-

creted by ECs activated by either trauma or exposure to various cytokines. The endothelium also synthesizes von Willebrand factor (vWF), a platelet adhesion protein that is found mainly in the subendothelium and extracellular matrix, areas that do not normally interact with platelets unless exposed by injury. Endothelial cells stimulated by thrombin secrete vWF from storage vesicles called Weibel-Palade bodies. Tissue factor (TF) can also be expressed on activated ECs. Factor VII binds to TF, becomes activated on the EC surface, and remains active only as long as it is bound to TF^{1,9}.

On the other hand, ECs possess many mechanisms to inhibit clotting. One is mediated by the tissue factor pathway inhibitor (TFPI). TFPI is a protein found in plasma and bound to the endothelium. TFPI forms a complex with factor Xa and reversibly inhibits it – hence, preventing thrombin generation. Additionally factor Xa-TFPI complex can inhibit the factor VIIa-TF complex. Endothelium can also prevent excessive coagulation via protein C/protein S pathway. Thrombin binds to the EC receptor thrombomodulin, which activates protein C. Activated protein C reacts with the membrane-bound protein S and inactivates clotting factors Va and VIIIa^{1,9}.

Cell to cell interaction and response to injury

When injured by mechanical or biochemical stimuli, ECs exhibit a spectrum of responses. Acute endothelial responses to injury or inflammatory stimuli occur within the first minutes of stimulation and do not depend on de novo mRNA synthesis. These responses include the release of numerous endothelial derived bio-active compounds such as vasodilators and vasoconstrictors, modulators of platelet function, pro-thrombotic and pro-inflammatory compounds. Local generation of endothelial-derived platelet activating factor and P-selectin plays an important role in the activation and adhesion of circulating polymorphonuclear leukocytes. ECs can also produce leukotrienes (eg, LTB₄), important mediators of inflammation. LTB₄ have a chemotactic effect on neutrophils promoting their migration to tissues and is implicated in the regulation of vascular permeability¹⁰.

Dysfunctional endothelium also produce various chemokines. These low molecular weight chemotactic cytokines create a concentration gradient targeting the damaged area and promote activation of circulating monocytes as well as their adhesion to the endothelial surface and accumulation into the vascular wall⁽¹¹⁾. The process of leukocyte recruitment is comprehensively regulated by different adhesion molecules expressed both on the leukocyte and endothelial membrane. In the early phases of inflammation,

leukocytes transiently adhere to the vessel wall in a process termed “rolling”. Rolling of leukocytes is mediated by a family of adhesion molecules called selectins, expressed both on the leukocyte and endothelial surface. Other adhesion molecules and chemotactic agents act in a complementary way, with selectins stabilizing polymorphonuclear cell adhesion and mediating their transendothelial migration into the inflamed foci¹¹. However, exact details on how leukocytes can migrate through the inter-endothelial junctions are poorly understood. An interesting possibility is that leukocyte adhesion to ECs could trigger intracellular signals that in turn can mediate junction disassembly^{10,11}.

The concept of endothelial dysfunction

In 1980 Furchgott and Zawadzki first observed that vessel rings relax when exposed to substances such as acetylcholine in the presence of an intact endothelium but contract under conditions of endothelial injury¹². Since then our knowledge on the pathophysiology of ED has evolved leading to the currently prevailing theory of atherosclerosis that considers injury of the endothelium as the initial stage of atherogenesis.

The integrative effect of healthy endothelium is the generation of an antithrombotic, anti-inflammatory, antiproliferative, and anticonstrictive vascular environment. Obviously, upon mechanical removal of the endothelium these beneficial effects are eliminated. Interestingly, the very same consequences are observed under the effect of various biochemical and physical factors associated with cardiovascular disease, including hypercholesterolemia and hyperglycemia. Even though these factors do not structurally affect ECs, they do alter EC functionally leading to the development of a prothrombotic, pro-inflammatory, proproliferative, and proconstrictive shift in the vascular environment.

To denote the dynamic nature of these changes, the term endothelial activation has been increasingly suggested in addition to the commonly used term ‘endothelial dysfunction’ (ED). Defining ED is nevertheless challenging¹³. The classic concept of ED involves the impairment of the regulatory function of the endothelium most markedly reflected in the impairment of endothelium-dependent vasorelaxation. The classic view of ED denotes the systemic nature of the condition and now includes disruption in mechanisms of endothelial repair. Hence, ED is best defined as an alteration of the regulatory function of the endothelium that leads to prothrombotic, pro-inflammatory, proproliferative, and proconstrictive activation of ECs with impairment in endothelial repair¹³.

The future: the endothelium in disease management practices

The endothelium as a disease marker

Loss of the functional integrity of the endothelium, is commonly seen in the presence of cardiovascular risk factors. ED may be considered as the initial step of atherogenesis and recognition of ED could be the earliest marker of subclinical cardiovascular disease. Prospective studies demonstrated that impaired NO-mediated vasodilation is a reliable characteristic of ED and an independent predictor of adverse cardiac events¹⁴. Although the number of established techniques can assess NO-mediated vasodilatation none of the existing methods has been proved clinically applicable and most of them are restricted to research facilities. Moreover, the concept of ED does not merely involve reduced NO bioavailability and other endothelial activities can also be affected (eg, changes in permeability, coagulation regulation and proinflammatory shift)¹³. These biological actions are often undervalued in as potential markers of ED.

Measuring endothelial dysfunction

Endothelial function can be assessed directly or indirectly. Direct measurement of ED can be performed invasively or non-invasively and is largely based on quantitative evaluation of endothelium dependent vasodilatation. Indirect measurement of ED is merely based on plasma concentrations of biomarkers released by the injured ECs.

Invasive assessment of endothelial dysfunction

Direct in vivo measurement of endothelial vasomotor activity is currently the 'gold standard' for the assessment of ED. It is performed by estimation the magnitude of the vasodilatation following stimulation with pharmacological compounds that enhance the endothelial release of NO¹⁸. Usually, an invasive technique is applied for the assessment of coronary endothelial function. During coronary angiography, quantitative angiography is performed before and after intracoronary injection of acetylcholine, which triggers NO release from ECs. Acetylcholine causes vasodilatation in the presence of normal endothelial function, whereas in the presence of ED paradoxically results in vasoconstriction^{8,18}. Coronary ED has been proved a powerful predictor of cardiovascular events.

Ex vivo testing can be applied for the study of the endothelium of subcutaneous fat resistance arter-

ies. Arteries are obtained from gluteal or anterior abdominal region biopsies made under local anesthesia and are mounted immediately after biopsy and dissection on an isometric or a pressurized myograph. Comparative studies of the endothelium and non-endothelium relaxation are performed after vessels precontraction (usually with norepinephrine). The advantages of this technique are the direct, precise and reliable assessment of the structural changes of the small arteries. However, this method requires invasive acquisition of tissue. Moreover, it is not yet known whether endothelial function in subcutaneous microvasculature is representative of other vascular beds, in particular, of the cerebral and cardiac circulation^{8,19}.

Finally, endothelial function can also be assessed invasively in the forearm by using plethysmography. The measurement of forearm blood flow response to vasoactive agents using strain-gauge plethysmography is the 'gold standard' for assessing endothelial function in resistance arteries. Limb blood flow is measured by utilizing venous occlusion plethysmography following intra-arterial infusion of endothelium-independent or endothelium-dependent vasodilator substances. Plethysmography has been utilized in the assessment of the effects of various cardiovascular risk factors on endothelial function and its response to therapeutical intervention¹⁹.

Non-invasive assessment of endothelial dysfunction

The main potential clinical implication of endothelial function evaluation is risk stratification of patients with suspected subclinical cardiovascular disease. Therefore, less invasive methods for the evaluation of endothelial function have been developed. Coronary blood flow and metabolic activity can be quantified with positron emission tomography (PET). Furthermore, the calculation of coronary flow reserve is possible by measuring basal and hyperaemic blood flow after pharmacological stimulation with intravenously injected dipyridamole or adenosine. This technique was also utilised to demonstrate ED in asymptomatic healthy subjects with cardiovascular risk factors including dyslipidaemia and hypertension²⁰. However, the high costs and limited availability render this technique unsuitable for routine endothelial function testing.

The commonest non-invasive method for the investigation of endothelial function is measurement of flow-mediated dilation (FMD) of a selected artery. Infusion of endothelial stimulators (eg, acetylcholine) or increased shear stress (eg, with the test with reactive hyperemia) is employed to judge va-

somotor activity of endothelium. It is presumed that magnitude of FMD reflects NO release by ECs in response to a stimulus applied. FMD is calculated as percentage of changes of an artery diameter (usually brachial or radial artery is used) registered using high-resolution high-frequency ultrasound. FMD has been proven to be an accurate and reproducible tools for investigation of endothelial performance. Its main attraction relates to its non-invasive nature and opportunity to make repeated measurements. Nonetheless, FMD requires specialized and rather expensive equipment and a skilled operator to produce valid, reproducible data. Additionally, a researcher should keep in mind the number of factors that can affect its result. For example, FMD is very sensitive to the environment and the temperature should be maintained at the same levels by air conditioning. A patient should rest in a relaxed position for 15-20 minutes prior the test. All medicines which may affect vascular tone (eg, nitrates, ACE inhibitors, calcium blockers) have to be temporarily stopped in advance. Finally diurnal variations of endothelial activity are well described. These relative disadvantages restrict the use of this method to dedicated clinical research centers. However, new technologies, such as improved imaging, computer analysis of the ultrasound sequences and wall tracking system, are expected to advance this technique, possibly making it a suitable for routine clinical practice²⁰.

Whilst FMD assessment is a popular choice for evaluation of endothelial performance of bigger arteries, laser Doppler flowmetry is a method of choice for assessment of microvascular endothelial function. Coherent light emitted by a laser can not penetrate deeply into the tissues but warrant sufficient resolution to analyze endothelial-dependent dynamics of microcirculation (eg, on arteriolar level). Application of acetylcholine by iontophoresis is often used to investigate endothelium-dependent response. Although the approach is non-invasive and relative non-expensive it also has several limitations. First of all it can be applied on to the surface tissues and techniques where internal tissues are scanned (eg, during surgery) should be considered as invasive. Results of microvascular blood flow measurement may depend on content of melanin in skin and thus should be considered as semi-quantitative. Accordingly changes in the registered 'blood flow' rather than absolute numbers are used for analyses.

Importantly, to obtain valuable results simultaneous measurement of endothelial-independent response (eg, with GTN for FMD and sodium nitroprusside) should always be performed. Finally, reproducibility of the approach chosen should be verified department before it is used.

Plasma and cellular biomarkers of endothelial dysfunction

There two major reasons of plasma elevation of markers characteristic of ED. Firstly, injury to the endothelium may lead to the discharge of various substances from ECs, which are then detectable in the plasma. Secondly, dysfunctional endothelium may up-regulate expression of different proteins, some of which can serve useful markers of endothelial damage/dysfunction¹⁴.

von Willebrand factor (vWF) is released from endothelial Weibel-Palade bodies of dysfunctional ECs. It is considered a reliable measure of endothelial damage and has been found increased in various cardiovascular diseases. Plasma vWF can be measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Of note, although plasma vWF has been proven to be a sensitive prognostic marker of cardiovascular disease lack of specificity limits its clinical applications¹⁴.

The potential role endothelin 1 as a marker of ED has been justified on the basis of its association with strong vasoconstrictor, mitogenic, and pro-inflammatory effects. Additionally, endothelin release is also enhanced by hypoxia, shear stress, pro-inflammatory cytokines, and angiotensin II. Elevated endothelin 1 levels have been found to parallel with ED in hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, heart failure, and acute myocardial infarction^(8,9).

Vascular cell adhesion molecule-1 is a protein expressed on the surface of activated ECs. Part of the protein may be shed into the blood and can be detected as soluble VCAM. Endothelial overexpression of VCAM-1 is an early manifestation of atherosclerosis, but the marker further up-regulated in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. Despite some promising data, soluble VCAM has still not been sufficiently tested in clinical settings to judge its role as a diagnostic or prognostic parameter of cardiovascular disease^{8,15,16}.

E-selectin, is a cell adhesion molecule exclusively expressed by ECs activated by inflammatory stimuli. E-selectin mediates the interaction between leukocytes, platelets and the endothelium. As healthy ECs hardly express E-selectin whilst the molecule actively produced in the settings of endothelial activation: hypertension, diabetes mellitus, coronary artery disease. Moreover, plasma E-selectin levels appear to correlate well with cardiovascular mortality among patients with coronary artery disease¹⁶.

Plasma levels of NO have also been proposed as a potential marker of ED and can be evaluated using gas chromatography or chemiluminescence. However, given that the life span of NO is very short the measurement of stable NO products such NO₂. Addi-

tionally, cGMP, a second messenger closely involved in transferring the signal of NO to VSMCs, can be detected in urine and reflect changes in NO production rates *in vivo*. However, NO and its metabolites may originate from non-endothelial sources. Furthermore, these assays are strongly dependent on nutritional intake, which can vary widely from day to day, rendering these methods impractical for routine use¹⁵.

C-reactive protein (CRP) is a recognized marker of vascular inflammation having a predictive power of long-term prognosis in patients with stable or unstable coronary artery disease and even in apparently healthy men. Several studies have recently shown that elevated CRP levels are closely associated with impaired endothelial vasodilator function. Currently circulating high-sensitivity CRP can be considered not only as the most sensitive and accurate marker of vascular inflammation but also as the only clinically applicable marker of ED^{9,16}.

Normally ECs are extremely rare in the circulation, but under certain pathological conditions ECs can be shed into circulation and detected as circulating endothelial cells (CECs) and serve as a marker of endothelial damage. CECs well correlate to other indices of ED, such as plasma vWf and impaired flow mediated dilation (FMD) and increased various inflammatory, immune, infectious, neoplastic and cardiovascular disease¹⁷. More recently, bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs) have been shown to migrate into damaged endothelium and restore its integrity. In contrast to CECs, cardiovascular risk factors such as diabetes mellitus, hypertension and smoking result in a depletion of EPCs. Consequently, the ratio of EPCs to CECs has been suggested as a potential characteristic of balance of endothelial damage/recovery.

In summary, there is currently no universal marker of ED and it is unlikely that any future biomarker would be able to reliably characterize the universe of endothelial activities. More probably the future directions will be related to characterization of specific aspects of endothelium function (eg, pro- or anticoagulant activity) in the context of the correspondent system in general (eg, haemostatic/coagulant system).

The endothelium as therapeutic target

The endothelium is a highly attractive therapeutic target. It is rapidly and preferentially exposed to systemically administered agents. Nevertheless, an important challenge is to learn how to determine the nature of that ideal state of endothelial activation since the transition between EC function and dysfunction is not al-

ways clear. EC dysfunction usually arises from otherwise adaptive responses that are now excessive and sustained. It is therefore important to avoid over depression of the desired effects and remember that an active endothelium is often a healthy endothelium. Another concern when searching for endothelium based therapies is that ECs vary structurally and functionally based on their location in the vascular tree. Modulation of endothelial function non-specifically in the vasculature could be catastrophic. For instance, blocking monocyte-EC interaction in the coronary circulation could act favorably attenuating atherosclerosis. However the same effect in the pulmonary microcirculation could make the host vulnerable to lethal respiratory tract infections.

Thus, the endothelium due to its strategic, ubiquitous interface position between blood and the surrounding tissue performs a variety of critical responses to both physiologic and pathophysiologic stimuli. Although originally considered as a passive inert vascular lining cell, we now know that the ECs play important roles in the regulation of vascular tone, coagulation, cell proliferation, and immune responses. Our understanding of EC physiology has increased exponentially over the last two decades, but we are only now begging to apply *in vitro* derived knowledge in disease management practices. It seems like the endothelium will remain the center of attention in cardiovascular research for the years to come. Future advances in diagnosis and therapy will rely on increasing our detailed understanding of EC function and structural complexity.

References

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100: 158-73.
2. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007; 100: 1741-90.
3. Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 139-43.
4. Busse R, Fleming I. Vascular endothelium and blood flow. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 2: 43-78.
5. Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 2005; 38: 1949-71.
6. Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int* 2006; 70: 840-53.
7. Nava E, Lüscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J Hypertens Suppl* 1995; 13: S39-48.
8. Nadar S, Blann AD, Lip GY. Endothelial dysfunction: methods of assessment and application to hypertension. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 3591-605.
9. Felmeden DC, Lip GY. Endothelial function and its assessment. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 1319-36.

10. Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 1993; 7: 523-32.
11. Apostolakis S, Papadakis EG, Krambovitis E, Spandidos DA. Chemokines in vascular pathology. *Int J Mol Med* 2006; 17: 691-701.
12. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
13. Herrmann J, Lerman A. The endothelium – the cardiovascular health barometer. *Herz* 2008; 33: 343-53.
14. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 33-47.
15. Kowalska I, Straczkowski M, Szlachowska M, Kinalska I, Prokop J, Bachórzewska-Gajewska H, Stepien A. Circulating E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in men with coronary artery disease assessed by angiography and disturbances of carbohydrate metabolism. *Metabolism* 2002; 51: 733-6.
16. Fichtlscherer S, Zeiher AM. Endothelial dysfunction in acute coronary syndromes: association with elevated C-reactive protein levels. *Ann Med* 2000; 32: 515-8.
17. Watson T, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1079-88.
18. Lind L, Hall J, Johansson K. Evaluation of four different methods to measure endothelium-dependent vasodilation in the human peripheral circulation. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102: 561-7.
19. Joannides R, Bellien J, Thuiliez C. Fundam Clinical methods for the evaluation of endothelial function – a focus on resistance arteries. *Clin Pharmacol* 2006; 20: 311-20.
20. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium* 2008; 15: 157-63.

ENDOTHELIAL MICROPARTICLES IN THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS: DETECTION AND CLINICAL IMPLICATIONS

E. ANGLÉS-CANO

Inserm U919. Serine proteases in neurovascular pathology. GIP Cycecon. Bd H Becquerel. Caen, France

Upon activation by specific stimuli, endothelial cells express tissue plasminogen activator (tPA) or urokinase PA (uPA) depending on their quiescent or migratory phenotype. One of the earliest responses to endothelial cell activation is the shedding of microparticles (MP) that behave as conveyors of biomolecules from the parent cell, e.g. phosphatidylserine and TF. MPs have thus been associated to development of thrombosis in various cardiovascular and inflammatory settings. We recently assigned a new function to microparticles: they can express a profibrinolytic function, thereby complementing their procoagulant activity. We demonstrated (*Blood* 2007,110,2432) that plasmin can be generated on the surface of microparticles derived from TNF- α -stimulated endothelial cells.

Employing many approaches we provided convincing evidence that endogenous uPA and uPAR are present on the microparticle surface and, furthermore, that engagement of uPAR by exogenous uPA on the microparticles enhances plasminogen activation. Plasminogen interacts with the microparticles via its lysine binding sites, and α -enolase is identified as a pivotal receptor in mediating this interaction. Plasmin is capable of degrading fibrin and extracellular matrix proteins, activating various matrix metalloproteases, and participating in cytokine and growth hormone processing. Thus, plasmin not only contributes to fibrinolysis and maintenance of vascular patency, but also is a critical regulator of cell migration and has been implicated in inflammation and angiogenesis. We demonstrated that microparticles and their regulation of plasmin generation are implicated in angiogenesis. We now show that microparticles with fibrinolytic potential are present in circulating blood of patients with cardiovascular accidents and are able to activate fibrin-bound plasminogen and mediate fibrinolysis. Furthermore, microparticles derived from leukocytes also bind and enhance activation of plasminogen, suggesting that microparticles are involved in plasmin generation *in vivo*. Our recent data suggest that plasminogen present at the surface of platelets may be activated by cells or EMP carrying plasminogen activators and participate thereby in clot dissolution.

MÁS ALLÁ DE LA HEMOSTASIA: PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN PROCESOS TROMBOINFLAMATORIOS

M.T. SANTOS, J. VALLÉS,
A. MOSCARDÓ

Hospital Universitario La Fe. Valencia

Las plaquetas activadas interactúan con distintos tipos celulares mediante procesos adhesivos y/o vía productos solubles liberados. Con estos mecanismos, las plaquetas participan en la hemostasia y en la trombosis. También juegan un papel en distintos procesos inflamatorios como la aterosclerosis, la sepsis, la artritis reumatoide, etc. En este artículo nos referiremos principalmente al papel de la plaqueta en procesos tromboinflamatorios.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico y la inflamación es un componente importante de los síndromes coronarios agudos¹. La interacción de las plaquetas con el endotelio y también con los leucocitos representa una importante conexión entre la inflamación y la aterogénesis² (Figura 1). Las

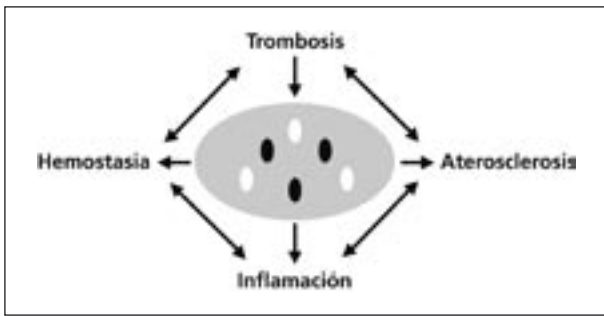


Figura 1. Las plaquetas mediante procesos de adhesión y liberación de sustancias granulares o producidas en el curso de su activación interactúan con otras células sanguíneas y el endotelio, participando como un elemento importante de regulación en la hemostasia, la trombosis, la aterosclerosis y la inflamación, todos ellos procesos multicelulares.

plaquetas son fuente de mediadores inflamatorios y, a su vez, la inflamación del endotelio puede activar a las plaquetas³, creándose mecanismos de retroalimentación entre activación plaquetaria e inflamación en la interfase endotelial aún no totalmente esclarecidos.

El endotelio

El endotelio es una superficie dinámica y compleja que actúa como una interfase entre los vasos sanguíneos y la sangre, manteniendo su fluidez. Posee mecanismos bioquímicos antitrombóticos y fibrinolíticos que pueden ser alterados por la disfunción endotelial, el daño vascular o la formación de una placa de aterosclerosis, transformándose en una superficie trombogénica. La disfunción endotelial induce la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, selectinas (P-selectina, E-selectina), $\alpha\beta3$ o el FvW, que facilita la adhesión de distintos tipos de leucocitos y de las plaquetas al endotelio^{2,4}. Estos procesos adhesivos propician la proximidad física entre diversos tipos de células, lo que constituye un factor importante en la regulación de la activación plaquetaria, la inflamación

del vaso y la generación de trombina, la cual inicia la coagulación sanguínea. Adicionalmente, el endotelio alterado y la activación de los monocitos infiltrados en el endotelio liberan/exponen sustancias biológicamente activas como factores de crecimiento, factores quimiotácticos, citocinas proinflamatorias, metaloproteasas y exponen factor tisular. Estos productos inducen el reclutamiento de leucocitos y de plaquetas, la progresión de la aterosclerosis y sus consecuencias clínicas aterotrombóticas^{2,4}.

El flujo sanguíneo es un importante condicionante de las interacciones y adhesiones celulares al endotelio³. Es conocido que el flujo laminar alterado, como el que tiene lugar en zonas de bifurcación de vaso o por la presencia de una placa de aterosclerosis. La alteración del flujo favorece la inflamación y la secreción de los gránulos Weibel-Palade del endotelio que contiene P-selectina y factor von Willebrand, esenciales para las interacciones iniciales de plaquetas y leucocitos sobre el endotelio⁽⁵⁾. La alteración del flujo también propicia una mayor interacción de las plaquetas con el endotelio y con las células sanguíneas, lo que puede modificar los equilibrios homeostáticos y la influencia en la reactividad de las plaquetas por otras células sanguíneas⁶⁻⁸.

Adhesión y activación plaquetaria

Las plaquetas disponen de receptores de membrana y moléculas expuestas en la activación que median su unión al endotelio y a los leucocitos^{2,4,9,10}. Algunas se muestran en la Figura 2.

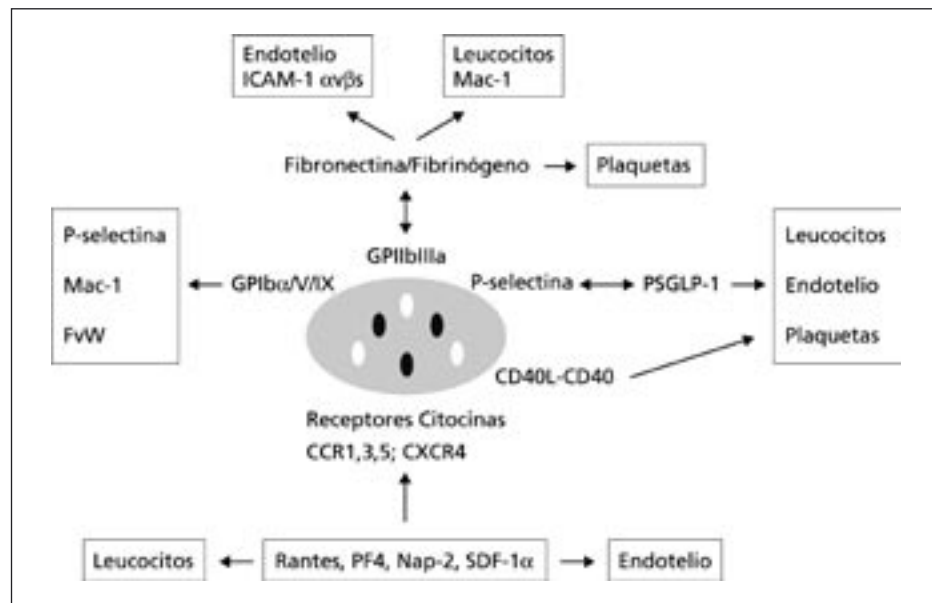


Figura 2. Las plaquetas activadas exponen en su membrana receptores y proteínas adhesivas que participan en las interacciones celulares de las plaquetas con los leucocitos y el endotelio.

Tabla 1. Productos granulares que secretan o exponen las plaquetas activadas

Gránulos densos	
Nucleótidos adenina: ATP, ADP	Nucleótidos de guanina: GTP, GDP
Serotonina, histamina, catecolaminas	Cationes bivalentes
Gránulos α	
Moléculas adhesivas	Factores mitogénicos
P-selectina , PSGL-1 PECAM-1/CD31 GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPVI Trombospondina, vitronectina, fibronectina, FvW	PDGF, EGF, TGF- β , VEGF Factores de la coagulación Fibrinógeno, plasminógeno, plasmina factores V, XI, XIII, FvW proteína S, quininógenos, antitrombina
Quimiocinas	Inhibidores de proteasas
PF4 (CXCL4), (β -TG, NAP-2) (CXCL7)	α_2 -antiplasmina, inhibidor C1
RANTES (CC5L),	PAI-1,
MIP-1 α (CCL3)	TFPI
Ena-78 (CXCL5),	Metaloproteasas
SDF-1 (CXCL12)	MMP-1
MCP-1 (CCL2)	MMP-2
IL-8 (CXCL8)	MMP-9
Citocinas	Lisosomas
IL-1 β	Proteasas
CD40 ligando	Glicosidasas
	Proteínas catiónicas

La interacción de las plaquetas con un endotelio disfuncional o que exponga sus componentes subendoteliales, como el colágeno, inicia la adhesión y activación plaquetaria. La unión de las plaquetas con el FvW vía GPIb/V/IX detiene a las plaquetas sobre el endotelio e inicia la secuencia de activación plaquetaria, induciendo el cambio conformacional de la glicoproteína GPIIb/IIIa a su forma adhesiva, capaz de unir fibrinógeno y otras moléculas adhesivas presentes en el vaso dañado, como la fibronectina o la vitronectina³. La glicoproteína GPIIb/IIIa es el punto final necesario para la agregación plaquetaria y también juega un papel esencial en los procesos adhesivos de las plaquetas con el endotelio o los leucocitos. Cuando GPIIb/IIIa tiene fibrinógeno unido se une al ICAM-1 del endotelio, al colágeno subendotelial o al receptor Mac-1 de los leucocitos. La P-selectina y el FvW endotelial favorecen el rodamiento de las plaquetas sobre el endotelio mediado por la unión con PSGL-1 y GPIb en las plaquetas, respectivamente, produciéndose después la adhesión firme mediada por la GPIIb/IIIa de las plaquetas, formando puentes fibrinógeno con ICAM-1 o $\alpha v \beta 3$ del endotelio si la activación endotelial es permanente⁽²⁻⁴⁾; en otro caso, las plaquetas se desprenden por un mecanismo mediado por ADAMTS 135 .

La adhesión permanente de las plaquetas a zonas de activación del endotelio contribuye al desarrollo de le-

siones crónicas; y si la placa se rompe, a trombosis. Existen estudios experimentales que indican que las plaquetas se adhieren al vaso antes de la adhesión de leucocitos y en ausencia de lesión aterosclerosa manifiesta. En sistemas experimentales se ha comprobado que este proceso adhesivo de las plaquetas induce expresión de genes inflamatorios en el endotelio y que el bloqueo de receptores adhesivos en las plaquetas reduce la lesión aterosclerótica en distintos modelos experimentales de ratón¹¹.

El contacto de las plaquetas con el colágeno subendotelial o la generación de trombina iniciada por la exposición de factor tisular en el endotelio dañado desencadena la secuencia de activación plaquetaria. Ésta tiene lugar con la participación de complejos mecanismos de transmisión de señales, que conducen a la activación del receptor integrina GPIIb/IIIa, cambios estructurales en la membrana y en el citoesqueleto¹², liberación de los gránulos citoplasmáticos, activación de la fosfolipasa A₂ citosólica¹³, síntesis de eicosanoides derivados de la ciclooxigenación y lipooxigenación del

ácido arquidónico (AA)⁷ y desarrollo de la actividad procoagulante en las plaquetas. A su vez, la liberación por las plaquetas activadas de los componentes de sus gránulos y de otras sustancias metabólicas al medio extracelular inicia la etapa de reclutamiento de otras plaquetas al trombo, unos efectos potenciados por la interacción eritrocito-plaqueta, que de este modo contribuye indirectamente al proceso aterotrombótico^{7,14,15}. Adicionalmente, los productos de los gránulos alfa secretados por las plaquetas activadas son ricos en citocinas, factores de crecimiento y sustancias quimiotácticas que juegan un papel importante en el reclutamiento de células inflamatorias al vaso^{4,9} (Tabla 1).

En condiciones fisiológicas estos procesos, en la interfase del endotelio, altamente regulados y multicelulares, evitan eficazmente la hemorragia y los leucocitos actúan en defensa del huésped. Sin embargo, en condiciones patológicas esta regulación puede fallar, pudiendo dar lugar a una diátesis hemorrágica, a la progresión de la aterosclerosis o a la trombosis.

Interacción de las plaquetas con las células progenitoras endoteliales

También puede jugar un papel en los equilibrios homeostáticos la capacidad de las plaquetas para unir

células endoteliales progenitoras (CEP, CD34+). Las plaquetas sirven de puente entre el endotelio y las CEP, que carecen de la capacidad de unión directa, particularmente a flujos altos. Adicionalmente, las plaquetas son capaces de orquestar la diferenciación de las CEP a células endoteliales maduras, favoreciendo la reparación endotelial y la reendotelización¹⁶ o a macrófagos y células espumosas, lo que favorecería la aterosclerosis¹⁷. La unión de células CD34+ a las plaquetas inmovilizadas en el vaso se reduce por el tratamiento con anticuerpos dirigidos a PSGLP-1, integrinas β_2 y β_1 y la P-selectina plaquetaria⁴. La presencia de coagregados plaqueta-CD34+ se incrementan en procesos tromboinflamatorios, como el síndrome coronario agudo¹⁸.

La interacción plaqueta-leucocito

Las plaquetas activadas, además de unirse a leucocitos adheridos al vaso, se unen a leucocitos circulantes y los reclutan al vaso dañado. Estas uniones están mediadas por P-selectina-PSGL-1, que subsiguientemente se refuerzan por uniones entre GPIIb/IIIa-fibrinógeno y GPIb α en plaquetas con Mac-1 (CD11b/CD18) en los leucocitos². La liberación de sustancias por las plaquetas activadas como los eicosanoides y el contenido de los gránulos alfa^{4,9} (Tabla 1), y también del ADP y ATP liberados de los gránulos densos, activa los receptores P2Y4 y P2Y6 de los leucocitos¹⁹ e induce modificaciones en los leucocitos que incluyen la exposición de factor tisular, sustancias con actividad quimiotáctica y proinflamatoria y capacidad para unirse al endotelio, por sí mismos o mediada por su unión a las plaquetas. A su vez, los leucocitos pueden modificar algunos aspectos de la bioquímica y la función de las plaquetas. Esto puede tener lugar vía componentes de su metabolismo oxidativo, compuestos liberables de los gránulos azurofílicos, como la catepsina G o la elastasa, mediadores lipídicos (PAF, eicosanoides), o por la síntesis de óxido nítrico²⁰.

Productos liberados o expuestos por plaquetas

Como se ha comentado, las plaquetas activadas liberan productos metabólicos y numerosas sustancias contenidas en sus gránulos, algunas indicadas en la Tabla 1. Entre ellas, nos referiremos brevemente a algunas que consideramos con una función en la tromboinflamación más consolidada en la literatura.

P-selectina

Entre las sustancias liberadas y expuestas en la membrana de las plaquetas activadas es importante la P-

selectina por su papel en los procesos adhesivos con el endotelio, los leucocitos y las células endoteliales progenitoras, como se ha comentado. La P-selectina es un ligando específico para la P-selectina glicoproteína-1 (PSGL-1), un receptor glicoprotéico de alta afinidad presente en leucocitos (monocitos, neutrófilos y linfocitos), el endotelio y las propias plaquetas. La PSGL-1 juega un papel importante en las interacciones célula endotelial-leucocito y leucocito-plaqueta²¹. En el endotelio, la unión vía P-selectina de leucocitos se cree que es el mecanismo por el que los leucocitos circulantes se detienen y ruedan sobre el endotelio mediante asociaciones-disociaciones de la superficie, para posteriormente anclarse de forma más firme mediante otros mecanismos adhesivos²¹. La interacción plaqueta-leucocito vía P-selectina inicia transmisión de señales activantes en los leucocitos, la activación de la integrina Mac-1 (CD11b/CD18)²² y la exposición de factor tisular y de fosfatidil serina en los leucocitos, que contribuye a la coagulación²³. Adicionalmente, la estimulación plaquetaria con agonistas fuertes induce la liberación de micropartículas que contienen P-selectina, que pueden interactuar con células que expresan PSGL-1 como monocitos, endotelio o las propias plaquetas. También las micropartículas que expresan PSGL-1 y TF pueden interactuar con P-selectina del endotelio²⁴.

Citocinas y quimiocinas

Las citocinas y quimiocinas liberadas de los gránulos alfa de las plaquetas son muy numerosas e inducen el reclutamiento y la diferenciación de otras células vasculares y hematológicas¹⁰; algunas de ellas se muestran en la Tabla 1. Adicionalmente, mediante la secreción de estas sustancias, algunas como CXCL4, CXCL7 y CC5L, con efectos bactericidas, las plaquetas participan en la defensa del huésped y reaccionan ante la colonización del endotelio por virus, bacterias y hongos⁹.

Una citocina particularmente importante en la inflamación es la IL-1 β , ya que induce la activación de las células endoteliales, la expresión de proteínas adhesivas (ICAM-1, $\alpha v\beta 3$) y la liberación de proteínas quimiotácticas (IL-6, IL-8, MCP-1), promoviendo la adhesión de monocitos y neutrófilos al endotelio².

También interesante por su implicación tromboinflamatoria es el CD40L. Se encuentra en el citoplasma de plaquetas en reposo y se libera y expone en la membrana plaquetaria con la activación, de la que se desprende, dando lugar a un fragmento soluble estable (sCD40L). CD40L induce una respuesta inflamatoria en el endotelio, promoviendo la generación de radicales de oxígeno y la expresión endotelial de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y factor tisular.

lar, que favorece la tromboinflamación²⁵. CD40L también actúa en otras células que expresan CD40, como monocitos, macrófagos y las propias plaquetas. CD40 induce la expresión de Mac-1 en leucocitos y su reclutamiento, así como la formación de neointima en el endotelio dañado²⁶. El bloqueo de la unión CD40L-CD40 en animales de experimentación inhibe la formación de la placa de ateroma y la acumulación de lípidos en el endotelio⁽⁴⁾. En humanos, niveles elevados de sCD40L se han asociado a un mayor riesgo de eventos vasculares²⁷.

Las quimiocinas son citocinas con propiedades quimiotácticas que, dependiendo de la posición de cisteínas en el N-amino terminal, se clasifican en distintas familias: CXCL, CCL, CX3CL y XCL1/2; estas quimiocinas también señalizan sobre las propias plaquetas mediante receptores transmembrana unidos a proteínas G tipo CXCR y CCR. En plaquetas, estos receptores incluyen CCR1, CCR3, CCR4, CXCR4 y CX3CR110. En terminología más clásica, ejemplos de quimiocinas CXCL son PF4, proteína básica (PB), β -tromboglobulina, NAP-2 o IL-8; y de quimiocinas CCL: RANTES, MCP-3, etc.

Las más abundantes en las plaquetas son CXCL4 (PF4) y CXCL7 (transformación de PB a β -TG y a la forma activa de ésta, el NAP-2). De CXCL7 sólo Nap-2 tiene actividad quimiotáctica¹⁰. En cambio, el PF4 tiene efectos más marcados: induce la expresión de E-selectina en células endoteliales, promoviendo la adhesión y degranulación de los neutrófilos, la activación de los monocitos y su diferenciación a macrófagos y células espumosas^{9,28}.

La quimiocina RANTES (CCL5) se libera de los gránulos alfa de las plaquetas activadas y se expresa en la membrana. Participa en la interacción plaqueta-leucocito y en la atracción de leucocitos al vaso dañado. Se ha sugerido su participación en la progresión de la aterosclerosis, ya que promueve la síntesis de MCP-1 por los monocitos, acumulación de macrófagos y crecimiento de la íntima²⁹. No obstante, el papel de las quimiocinas en la aterosclerosis está, actualmente, lejos de ser establecido.

Mediadores lipídicos en las interacciones celulares

La liberación de ácido araquidónico de las plaquetas y de los productos de su metabolismo por lipooxigenación o ciclooxigenación constituye la base de lo que se conoce como metabolismo transcelular. El metabolismo transcelular tiene lugar entre las distintas células de la sangre, y entre éstas y las células endoteliales. En este proceso, el ácido araquidónico, compuestos de su metabolismo intermediario o productos finales específicos de una célula son transformados por otra

en productos específicos de la segunda, o en nuevos compuestos que ninguna de las dos células puede sintetizar de un modo independiente. Ejemplos de esta cooperatividad metabólica en la síntesis de mediadores lipídicos se han descrito entre plaquetas y células endoteliales, plaqueta-neutrófilo, plaqueta-eritrocito, célula endotelial-neutrófilo y neutrófilo-eritrocito. Esta cooperatividad metabólica se refiere a productos que median la trombosis (TxA₂, PGI₂) o la inflamación, como los leucotrienos y lipoxinas^{6,30}. Los efectos beneficiosos de las dietas ricas en ácidos ω 3 podrían actuar, en parte, por esta vía al sustituir el AA de las células por el eicosapentanoico, con propiedades más antitrombóticas, ya que el TxA₂ no tiene propiedades agonistas para las plaquetas, mientras que la PGI₂ mantiene sus propiedades antiplaquetarias^{6,7,30}. Experimentalmente se ha asociado el bloqueo del receptor del leucotrieno B₄, proinflamatorio, a la reducción de reestenosis del *stent*, la reducción del contenido de macrófagos en la lesión y a menores niveles de metaloproteasas 2 y 9³¹. Los lípidos biológicamente activos en las micropartículas también pueden participar en el metabolismo transcelular del ácido araquidónico³². Otros mediadores lipídicos con potencial capacidad para influir en la aterosclerosis son los isoprostanos, una familia de isómeros de prostaglandinas generados por mecanismos catalizados por radicales libres a partir del AA³³. Su producción elevada se asocia a procesos aterotrombóticos y, aunque no activan directamente a las plaquetas, potencian el efecto de otros agonistas³⁴.

Aspectos farmacológicos

Desde un punto de vista farmacológico, la reducción del riesgo clínico de recurrencia en pacientes con patología vascular por el tratamiento con fármacos antiagregantes como aspirina y/o clopidogrel es prueba convincente del papel relevante del papel de las plaquetas en la trombosis. Adicionalmente, los fármacos antiplaquetarios han mostrado efectos en la reducción de la inflamación sistémica³⁵ y de marcadores de inflamación en pacientes con patología vascular^{36,37}. Un aspecto negativo de la inhibición farmacológica de las plaquetas es el posible incremento de procesos infecciosos en pacientes tratados³⁸.

La síntesis de TxA₂ juega un papel importante en la trombosis, y también puede influir en el desarrollo de la aterosclerosis. En este sentido, en modelos experimentales se ha comprobado que la inhibición del TxA₂ plaquetario o el bloqueo del receptor de TxA₂ retrasa el desarrollo de aterosclerosis⁴¹. Últimamente está teniendo una amplia repercusión en la literatura el hecho de que exista una variabilidad individual en el efecto antiplaquetario de la aspirina, también deno-

minado “resistencia a aspirina”. En un estudio reciente encontramos, no sin cierta sorpresa, que la aspirina no inhibe apropiadamente la síntesis de TxA_2 en un 34% de los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) en las primeras 24 horas de la aparición del evento, y que presentan, por tanto, una elevada incidencia de resistencia a aspirina monitorizada por su diana farmacológica específica, la síntesis de TxA_2 . Adicionalmente, esta falta de inhibición se traduce en una mayor extensión del daño miocárdico monitorizado por troponina y otros marcadores biológicos⁴².

Las estatinas son fármacos con efectos antiinflamatorios y antioxidantes que han demostrado un beneficio clínico en la regresión de la placa de ateroma y en la inflamación monitorizada por niveles de proteína C reactiva³⁷. También ha demostrado un notable beneficio en pacientes con SCA, un momento donde coexisten trombosis e inflamación³⁹. Adicionalmente, las estatinas han mostrado un efecto inhibitorio de la función plaquetaria, aunque todavía no bien caracterizado⁴⁰. El efecto beneficioso de las estatinas en los pacientes con SCA se pensó que sería independiente de la síntesis de TxA_2 , ya que es esencial tratar a todos los pacientes con SCA con aspirina. No obstante, teniendo en cuenta el estudio previo⁴², propusimos la hipótesis de que el tratamiento con atorvastatina de los pacientes con SCA pudiese reducir la síntesis de TxA_2 . Nuestros resultados indican que la atorvastatina reduce la resistencia a la aspirina mediada por la síntesis de TxA_2 y sus consecuencias funcionales agregatorias y secretoras en estos pacientes⁴³. Por este mecanismo, además de sus conocidos efectos hipolipemiantes, antiinflamatorios y antioxidantes, las estatinas podrían también contribuir a la reducción de la inflamación endotelial mediada por activación de las plaquetas.

Conclusiones y perspectivas de futuro

Aunque el papel esencial de las plaquetas en la trombosis/hemostasia esta bien consolidado y disponemos de fármacos antiplaquetarios capaces de reducir la recurrencia trombótica, el mayor conocimiento de los mecanismos reguladores de la interacción de las plaquetas con las células sanguíneas y el endotelio es muy probable que proporcione en el futuro nuevas dianas para el tratamiento tromboinflamatorio.

También parece establecido que las plaquetas son un elemento importante en la inflamación. Como hemos comentado, existe una pléyade de posibilidades bioquímicas de la participación de las plaquetas en la inflamación demostradas *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación, y es posible que fármacos con alguna acción antiinflamatoria puedan aportar beneficios clínicos adicionales.

Finalmente, hay que tener en cuenta que tanto los mecanismos de hemostasia/trombosis como de inflamación patológica/defensa del huésped se basan en delicados equilibrios que se alteran por la presencia de factores de riesgo de aterosclerosis, por lo que los aspectos de prevención siguen siendo esenciales.

Agradecimientos

Grupo de investigación financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (PI07/0463), Programas Redes (Red RENEVAS RD06/0026) y Fundación Mutua Madrileña 2006.

Bibliografía

- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
- Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3378-84.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8: 1227-34.
- May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: s5-10.
- Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008; 111: 5271-81.
- Marcus AJ. Platelets: their role in hemostasis, thrombosis and inflammation. In: Gallin JI, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. pp. 77-95.
- Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest* 1991; 87: 571-80.
- Vallés J, Santos MT, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *J Clin Invest* 1993; 92: 1357-65.
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177-89.
- Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1920-7.
- Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002; 196: 887-96.
- Santos MT, Moscardó A, Valles J, Martínez M, Pinon M, Aznar J, et al. Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganization, alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation, and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets. *Circulation* 2000; 102: 1924-30.
- Moscardó A, Vallés J, Piñón M, Aznar J, Martínez-Sales V, Santos MT. Regulation of cytosolic PIA2 activity by PP1/PP2A serine/threonine phosphatases in human platelets. *Platelets* 2006; 17: 405-15.
- Vallés J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martínez-Sales V, Portoles M, et al. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, ADP release, and recruitment. *Blood* 1991; 78: 154-62.
- Vallés J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Piñón M, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance

- alpha(Ib)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin *ex vivo*. *Blood* 2002; 99: 3978-84.
16. Langer HF, May AE, Vestweber D, De Boer HC, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 136-43.
 17. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J* 2006; 20: 2559-61.
 18. Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kogel A, et al. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur Heart J* 2009; 30: 584-93.
 19. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97: 587-600.
 20. Santos MT, Vallés J, Aznar J, Moscardó M, Piñón M. Las plaquetas y su interacción con hematíes y leucocitos. Implicaciones funcionales y farmacológicas. *Haematologica* 2001; 86 (Supl 1): 125-32.
 21. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of p-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81: 1-7.
 22. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: p-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999; 93: 876-85.
 23. Furie B. P-selectin and blood coagulation: it's not only about inflammation any more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 877-8.
 24. Barry OP, Pratico D, Savani RC, Fitzgerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; 102: 136-44.
 25. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Mullerberghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.
 26. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, et al. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol* 2008; 172: 1141-52.
 27. Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001; 104: 2266-8.
 28. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005; 96: 612-6.
 29. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003; 9: 61-7.
 30. Marcus AJ. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: pathophysiologic significance of transcellular metabolism. *Blood* 1990; 76: 1903-7.
 31. Hlawaty H, Jacob M-P, Louedec L, Letourneur D, Brink C, Michel J-B, et al. Leukotriene receptor antagonism and the prevention of extracellular matrix degradation during atherosclerosis and in-stent stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 518-24.
 32. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, Fitzgerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99: 2118-27.
 33. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 279-86.
 34. Pratico D, Smyth EM, Violi F, Fitzgerald GA. Local amplification of platelet function by 8-epi prostaglandin F-2 alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem* 1996; 271: 14916-24.
 35. Winning J, Reichel J, Eisenhut Y, Hamacher J, Kohl M, Deigner HP, et al. Anti-platelet drugs and outcome in severe infection: clinical impact and underlying mechanisms. *Platelets* 2009; 20: 50-7.
 36. Antonino MJ, Mahla E, Bliden KP, Tantry US, Gurbel PA. Effect of long-term clopidogrel treatment on platelet function and inflammation in patients undergoing coronary arterial stenting. *Am J Cardiol* 2009; 103: 1546-50.
 37. Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24-38.
 38. Blasco-Colmenares E, Perl TM, Guallar E, Baumgartner WA, Conte JV, Alejo D, et al. Aspirin plus clopidogrel and risk of infection after coronary artery bypass surgery. *Arch Intern Med* 2009; 169: 788-96.
 39. Patti G, Pasceri V, Colonna G, Miglionico M, Fischetti D, Sardella G, et al. Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-ACS randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1272-8.
 40. Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 2005; 96: 24F-33F.
 41. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, et al. Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004; 114: 784-94.
 42. Vallés J, Santos MT, Fuset MP, Moscardó A, Ruano M, Pérez F, et al. Partial inhibition of platelet thromboxane A(2) synthesis by aspirin is associated with myonecrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007; 99: 19-25.
 43. Santos MT, Fuset MP, Ruano M, Moscardó A, Vallés J. Atorvastatin on platelet TxA₂ synthesis in aspirin-treated patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2009 (En prensa).

INDICACIONES ACTUALES PARA LA TERAPÉUTICA COMBINADA ANTIAGREGANTE/ ANTICOAGULANTE

M. HERAS

Jefe de Sección de Cardiología Clínica.

Servicio de Cardiología. Hospital Clínic. Barcelona

La activación de la coagulación y la agregación plaquetaria son dos procesos que causan una gran parte de las enfermedades cardiovasculares. Es importante entender cuál de ellos es predominante en cada enfermedad para poder escoger el tratamiento óptimo. No obstante, hay diversas situaciones en las que coexisten ambas activaciones, por lo que es obligado asociar fármacos para inhibir los dos procesos. En este caso, el riesgo de complicaciones hemorrágicas aumenta y es fundamental conocer el riesgo/beneficio de cada tra-

tamiento en cada subgrupo de pacientes, para escoger la combinación con un mejor perfil de eficacia y tolerabilidad.

En líneas generales, el tratamiento anticoagulante está indicado cuando predomina el problema de estasis, como es en la fibrilación auricular, trombosis intraventricular o prótesis valvulares, mientras que el tratamiento antiagregante se utiliza para la prevención y el tratamiento de la aterotrombosis coronaria, asociada a aumentos de la velocidad de cizallamiento por estenosis arteriales y donde las plaquetas juegan un papel básico.

Como se ha dicho anteriormente, algunos pacientes tienen más de una enfermedad cardiovascular. La mayoría de las veces es una cardiopatía isquémica asociada a valulopatía, fibrilación auricular o procesos embólicos previos. En esta ponencia vamos a discutir las indicaciones actuales para el tratamiento combinado anticoagulante y antiagregante, según las últimas recomendaciones de las sociedades científicas.

Tratamiento antitrombótico doble

Se refiere a la utilización simultánea de dicumarínicos y aspirina a dosis bajas (75-100 mg/24 h) o clopidogrel 75 mg/24 h, en caso de intolerancia a la aspirina. Esta asociación se ha recomendado en las siguientes situaciones:

Prevención secundaria de la cardiopatía isquémica en pacientes con alto riesgo embólico

Diversos estudios demostraron que el tratamiento anticoagulante en pacientes que habían tenido un infarto de miocardio era eficaz en la prevención secundaria, ya que reduce el reinfarcto y la mortalidad. Así pues, la aspirina se podría sustituir por dicumarínicos en pacientes con infarto de miocardio y trombo intraventricular, o en presencia de fibrilación auricular o en los portadores de prótesis mecánicas. Otros estudios han evaluado también la eficacia y seguridad del tratamiento anticoagulante asociado a aspirina. Un metanálisis que incluye a más de 10.000 pacientes con infarto de miocardio previo demostró que la asociación de aspirina y dicumarínicos era eficaz y segura; en los casi 4.000 pacientes con un INR de 2,0-3,0 el tratamiento combinado evitó tres eventos mayores y hubo una hemorragia mayor por cada 100 pacientes tratados en comparación con los que sólo tomaron aspirina¹. La asociación de ximelagatran, un inhibidor directo oral de la trombina, con aspirina se utilizó en el estudio ESTEEM, que incluyó a 1.833 pacientes con un infarto de miocardio reciente. El trata-

miento combinado a los 6 meses redujo la aparición de muerte, reinfarcto y necesidad de revascularización urgente en un 24% en comparación con aspirina sola; las hemorragias mayores fueron de 0,8% y del 1,9% para el grupo de aspirina o tratamiento combinado, respectivamente². No obstante, ximelagatran provocó alteraciones hepáticas y el fármaco no llegó a ser comercializado. En este momento se están evaluando en ensayos de fase II o III diversos inhibidores orales del FX y FII; estos fármacos tienen un efecto anticoagulante más previsible y uniforme, son de prescripción más simple y no necesitan control, por lo que es probable que en el futuro puedan jugar un papel importante en sustitución de los dicumarínicos.

En resumen, la combinación de anticoagulante con aspirina parece ser una buena opción terapéutica para la reducción de eventos isquémicos y embólicos en pacientes con infarto de miocardio y riesgo elevado de embolia. La recomendación para estas indicaciones se recoge en la Tabla 1³.

Prótesis valvulares con cardiopatía isquémica asociada o/y AVC embólico

Las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología recomiendan la asociación de fármacos antiplaquetarios en los pacientes que tienen enfermedad arterial asociada, particularmente aquellos con cardiopatía isquémica⁴ y en los que han tenido un episodio embólico estando bien anticoagulados y con un INR adecuado a la prótesis. En estos casos es indispensable hacer un estudio exhaustivo del posible foco embolígeno para aplicar el mejor tratamiento⁵.

En pacientes con prótesis mecánicas y colocación de *stent* intracoronario, además del tratamiento dicumarínico, debe asociarse aspirina y clopidogrel (ver apartado **Stent coronario**). Debido al incremento del riesgo hemorrágico, esta combinación debe reducirse al mínimo tiempo posible y se recomienda utilizar *stents* metálicos y evitar los fármacoactivos siempre que ello sea posible^{6,7}. En la Tabla 1 se resumen las recomendaciones para el tratamiento antitrombótico combinado en pacientes portadores de válvulas mecánicas.

Fibrilación auricular con riesgo embólico moderado y alto y cardiopatía isquémica

La incidencia de embolia en la fibrilación auricular depende del número y la gravedad de los factores de riesgo de cada paciente; la Tabla 2A muestra la clasificación de los mismos y en la Tabla 2B se describe la indicación de tratamiento antitrombótico según el riesgo⁸. De acuerdo a estas recomendaciones, cualquier paciente con algún factor de riesgo alto o más de uno

de riesgo moderado debe recibir dicumarínicos con un INR entre 2,0 y 3,0 para la prevención de embolia.

Los pacientes con cardiopatía isquémica crónica deben recibir aspirina 100 mg/d para la prevención secundaria de nuevos eventos cardiovasculares. Hay amplia evidencia de que esta dosis es suficiente para reducir la muerte, el reinfarto y el accidente cerebrovascular en aproximadamente un 25%⁹. Por lo tanto, en pacientes con fibrilación auricular no valvular asociada a cardiopatía isquémica, se indica la asociación de dicumarínicos y aspirina, siempre que el riesgo de hemorragia sea bajo (Tabla 1).

Tratamiento antiagregante doble en el stent coronario

El *stent* es una malla metálica que se expande sobre una placa aterosclerosa arterial con el objetivo de reducir la estenosis luminal y prevenir la reestenosis. En los síndromes coronarios agudos se produce una ruptura de la placa con trombosis añadida; el paciente acude con dolor y características clínicas de alto riesgo, con troponinas positivas y cambios

Tabla 1. Recomendaciones de las guías de práctica clínica de la ESC/SEC para el tratamiento antitrombótico combinado en cardiología

Recomendaciones	Clase	Nivel
Infarto Agudo De Miocardio		
Anticoagulante oral con el INR recomendado cuando esté clínicamente indicado (fibrilación auricular, trombo en el VI, válvula mecánica)	I	A
Anticoagulante oral (con un INR de 2-3) además de aspirina a dosis bajas (75-100 mg) en pacientes con alto riesgo de eventos tromboembólicos	Ila	B
Anticoagulante oral además de aspirina y clopidogrel (implantación reciente de <i>stents</i> además de indicación de anticoagulación oral)*	Ilb	C
Anticoagulante oral además de clopidogrel o aspirina (implantación reciente de <i>stents</i> además de indicación de anticoagulación oral y riesgo elevado de sangrado)	Ilb	C
Válvulas mecánicas		
Anticoagulante oral (con un INR adecuado a la prótesis) más aspirina a dosis bajas (75-100 mg) en pacientes con enfermedad coronaria u otra enfermedad aterosclerosa importante	Ila	C
Anticoagulante oral (con un INR adecuado a la prótesis) más aspirina a dosis bajas (75-100 mg) en pacientes que han tenido una embolia a pesar de anticoagulación adecuada, tras investigación exhaustiva de las causas	Ila	C
Anticoagulante oral (con un INR adecuado a la prótesis) además de aspirina y clopidogrel en pacientes con implantación reciente de <i>stents</i>	Ilb	C
Fibrilación auricular		
Anticoagulante oral además de clopidogrel o aspirina después de intervencionismo coronario percutáneo para la prevención de isquemia miocárdica	Ilb	C

ESC: European Society of Cardiology; SEC: Sociedad Española de Cardiología

Para la definición de clase de recomendación y nivel de evidencia ver referencias 3, 5 y 8

*Las guías del ACC/AHA recomiendan el triple tratamiento antitrombótico con una indicación 1 y evidencia C (referencia 18)

Tabla 2A. Clasificación de los factores de riesgo de embolia en pacientes con fibrilación auricular

Factor riesgo debil	Factor riesgo moderado	Factor riesgo alto
· Sexo femenino	· Edad ≥ 75 años	· AVC, AIT o embolia sistémica
· Edad 65-74 años	· Hipertensión arterial	· Estenosis mitral
· Enfermedad coronaria	· Insuficiencia cardiaca	· Válvula protésica mecánica
· Tirotoxicosis	· Fracción eyección < 35%	
	· Diabetes mellitus	

AVC: accidente vascular cerebral; AIT: accidente isquémico transitorio

Tabla 2B. Recomendaciones de las guías de práctica clínica de la ESC/SEC para el tratamiento antitrombótico en pacientes con fibrilación auricular según el riesgo de embolia

Tipo de riesgo	Tratamiento recomendado
· Sin factores de riesgo	· Aspirina 81-325 mg/d
· 1 factor riesgo moderado	· Aspirina 81-325 mg/d, o dicumarínico (INR 2,0-3,0)
· Riesgo alto o >1 factor riesgo moderado	· Dicumarínico (INR 2,0-3,0)

ESC: European Society of Cardiology; SEC: Sociedad Española de Cardiología

en el ECG. El tratamiento de estas lesiones con *stents* intracoronarios activa la agregación plaquetaria, ya que se colocan en zonas con fuerzas de cizallamiento altas (arterias de pequeño diámetro) y sobre sustratos muy trombógenos. Actualmente, se indica la revascularización coronaria percutánea en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST³ y también en los pacientes de alto riesgo sin elevación del ST¹⁰. Datos actuales muestran que se implanta un *stent* en casi el 90% de los procedimientos de revascularización coronaria percutánea¹¹. Los estudios iniciales con *stents* metálicos determinaron que el mejor tratamiento antitrombótico para reducir las complicaciones de muerte, reinfarto y trombosis del *stent* era la doble antiagregación, en comparación con la asociación de anticoagulante y antiagregante. En el estudio de Schöming los pacientes tratados con dicumarínicos y aspirina tuvieron un 6,2% de eventos isquémicos adversos y un 6,5% de hemorragias graves en comparación con el 1,2% de eventos isquémicos en los que tomaron aspirina y ticlopidina, que además no produjo ninguna hemorragia grave¹².

Posteriormente se desarrollaron los *stents* farmacológicos, que son mejores en la prevención de la reestenosis y que se utilizan en las situaciones en que ésta es muy prevalente, como en pacientes diabéticos, vasos de pequeño calibre, lesiones largas y en bifurcaciones. Debido a su reendotelización tardía, las guías recomiendan que el tratamiento antiagregante doble se mantenga entre 6 y 12 meses para evitar trombosis del *stent*, mientras que para los *stents* metálicos es de un mes⁶. Datos muy recientes han desmentido una falsa alarma sobre el exceso de trombogenicidad y aumento de mortalidad en pacientes tratados con *stents* farmacológicos. Su seguridad y mayor eficacia en comparación con los *stents* metálicos se han confirmado en 262,700 pacientes registrados en el National Cardiovascular Data Registry¹³.

Por tanto, para pacientes con indicación de tratamiento anticoagulante crónico y que requieran la implantación de un *stent*, es mejor escoger un *stent* metálico, siempre que sea posible, ya que la doble antiagregación se administra sólo durante 30 días.

Tratamiento antitrombótico triple

Se refiere a la utilización simultánea de dicumarínicos, aspirina (100 mg/24h) y clopidogrel 75 mg/24 h.

Esta asociación está indicada en pacientes tratados con un *stent* intracoronario que, además, tengan indicación de anticoagulación por valvulopatía, prótesis valvular, fibrilación auricular, trombosis intraventricular o embolia previa. El objetivo es evitar los eventos tromboembólicos, pero tiene un riesgo obvio, que es la hemorragia, y por tanto debe aplicarse cuando

sea estrictamente necesaria y durante el menor tiempo posible.

Las indicaciones de este tratamiento triple se basan en el consenso de expertos, ya que hasta ahora no se dispone de estudios bien diseñados para conocer su eficacia y seguridad. Todos los datos actuales provienen de estudios retrospectivos. Orford *et al.* describieron por primera vez en 66 pacientes tratados con aspirina, clopidogrel y warfarina durante 6 meses la incidencia de hemorragias, que fue del 9,2%, mientras que no se produjo ninguna muerte ni trombosis del *stent*⁷. Nguyen, en una muestra de 800 pacientes, evaluó retrospectivamente los eventos isquémicos y embólicos en el grupo de pacientes con tratamiento triple (n = 580) en comparación con los pacientes que solamente recibieron anticoagulante y un antiagregante (n = 220). No demostró ninguna diferencia durante el seguimiento en relación a reinfarto o isquemia recurrente ni en la incidencia de hemorragias graves, que fue similar en ambos grupos¹⁴. Ruiz-Nodar *et al.* evaluaron la incidencia de hemorragia grave, eventos cardiovasculares mayores y muerte de cualquier causa en una muestra de 426 pacientes con fibrilación auricular y *stent* que continuaron con el tratamiento antitrombótico triple en comparación con tratamiento antiagregante doble (n = 174), con un amplio seguimiento. Su estudio demostró que no hubo diferencias significativas en las hemorragias graves, mientras que el tratamiento antitrombótico triple redujo de forma significativa tanto los eventos isquémicos como la muerte¹⁵. Nuestro grupo ha evaluado el riesgo de hemorragia grave y no grave en 33 pacientes con indicación de anticoagulación e implantación de *stent* durante el periodo de tiempo que tomaron triple tratamiento antitrombótico en comparación con el periodo en el que se mantuvieron con dicumarínicos más aspirina. El seguimiento incluye 53 pacientes/mes en tratamiento triple en comparación con 869 pacientes/mes en tratamiento doble. Se observó un exceso de hemorragias no graves durante el periodo en triple tratamiento, aunque las hemorragias graves fueron iguales en ambos periodos de tratamiento, y tampoco hubo diferencias respecto a los eventos embólicos¹⁶.

Sarafoff *et al.* estudiaron 515 pacientes con anticoagulación que recibieron un *stent* farmacológico. Durante el seguimiento 306 siguieron con anticoagulación por criterios clínicos y ecocardiográficos predefinidos, mientras que 209 continuaron sólo con doble antiagregación. El objetivo primario era el combinado de muerte, infarto, trombosis del *stent* o accidente cerebrovascular. Durante los dos años de seguimiento no hubo diferencias en la incidencia de eventos tromboticos ni hemorrágicos entre ambos grupos. Los autores señalan la importancia de identificar los pacientes que van a precisar tratamiento an-

ticoagulante para poder ofrecer la mayor eficacia con el menor riesgo¹⁷.

Así pues, en este momento las recomendaciones de las diferentes guías de práctica clínica para el tratamiento de pacientes con indicación de anticoagulación e implante de *stents* intracoronarios son dispares y reflejan cuándo fueron escritas y la falta de estudios prospectivos sobre este problema específico. La guía del American College of Cardiology/American Heart Association sobre infarto de miocardio con elevación del ST¹⁸ recomienda para pacientes con *stent* y necesidad de anticoagulación mantener un INR 2,0-2,5, aspirina 75-81 mg/d y clopidogrel 75 mg/d, con nivel de evidencia 1C; esta recomendación figura con asterisco en la Tabla 1, y es claramente diferente a las recomendaciones de la ESC.

Complicaciones hemorrágicas

Estudios recientes han revelado la importancia de las hemorragias graves en el pronóstico de los pacientes con síndrome coronario agudo, ya que pueden triplicar la incidencia de muerte y de nuevos eventos isquémicos, tanto miocárdicos como cerebrales. Los predictores clínicos de hemorragia grave son también factores de riesgo para nuevos eventos isquémicos y son: edad avanzada, sexo femenino, hipertensión, anemia e insuficiencia renal¹⁹. Por lo tanto, estas características clínicas deben tenerse en cuenta en el momento de orientar el tratamiento del paciente y antes de prescribir el tratamiento anti-trombótico.

Conclusiones

La asociación de tratamiento anticoagulante con antiagregación está indicada en pacientes con elevado riesgo embólico asociado a cardiopatía isquémica. La revascularización coronaria percutánea con *stents* requiere tratamiento antiagregante doble durante un mes para los *stents* metálicos y 12 meses para los farmacoactivos. El tratamiento anti-trombótico triple está indicado en pacientes que precisan anticoagulación y han sido revascularizados con *stent* coronario; debido al riesgo hemorrágico de esta combinación es fundamental seleccionar el tipo de *stent* y excluir a pacientes con riesgo hemorrágico elevado.

Bibliografía

1. Andreotti F, Testa L, Biondi-Zoccai GGL, Crea F. Aspirin plus warfarin compared with aspirin alone after an acute coronary syndrome: an updated and comprehensive metaanalysis of 25.307 patients. *Eur H J* 2006; 27: 519-26.
2. Wallentin L, Wilcox RG, Weaver WD, Emanuelsson H, Godwin A, Nyström P, et al; ESTEEM Investigators. Oral ximelagatran for secondary prophylaxis after myocardial infarction: the ESTEEM randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 362: 789-97.
3. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomström-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. The Task Force on the Management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008; 29: 2909-45.
4. Turpie AG, Gent M, Laupacis A, Latour Y, Gunstensen J, Basile F, et al. A comparison of aspirin with placebo in patients treated with warfarin after heart valve replacement. *N Engl J Med* 1993; 329: 524-9.
5. Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease. The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur H J* 2007; 28: 230-68.
6. Silber S, Albertsson P, Avilés FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, et al. Guidelines for Percutaneous Coronary Interventions. A Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur H J* 2005; 26: 804-47.
7. Orford JL, Fasseas P, Melby S, Burger K, Steinbuhl SR, Holmes DR, et al. Safety and efficacy of aspirin, clopidogrel, and warfarin after stent placement in patients with an indication for anticoagulation. *Am Heart J* 2004; 147: 463-7.
8. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: full text. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Europace* 2006; 8: 651-745.
9. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative metaanalysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
10. Bassand JP, Hamm C, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Avilés FF, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-elevation acute coronary syndromes. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur H J* 2007; 28: 1598-660.
11. Ferreira-González I, Permayner-Miralda G, Marrugat J, Heras M, Cuñat J, Civeira E, et al. MASCARA (Manejo del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado) study. General findings. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61: 803-16.
12. Schömig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schühlen H, Blasini R, Hadamitzky M, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996; 25: 334: 1084-9.
13. Douglas PS, Brennan JM, Anstrom KJ, Sedrakyan A, Eisenstein EL, Haque G, et al. Clinical effectiveness of coronary stents in elderly persons: results from 262,700 Medicare patients in the American College of Cardiology-National Cardiovascular Data Registry. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 1629-41.
14. Nguyen MC, Lim YL, Walton A, Lefkowitz J, Agnelli G, Godman SG, et al. Combining warfarin and antiplatelet therapy after coronary stenting in the Global Registry of Acute Coronary Events: is it safe and effective to use just one antiplatelet agent? *Eur Heart J* 2007; 28: 1717-22.
15. Ruiz-Nodar JM, Marín F, Hurtado JA, Valencia J, Pinar E, Pineda J, et al. Anticoagulant and antiplatelet therapy use in 426 patients with atrial fibrillation undergoing percutaneous coronary intervention and stent implantation implications

- for bleeding risk and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 818-25.
16. Guasch E, Sionis A, Reverter JC, Andrea R, Loma-Osorio P, Freixa X, et al. Safety issues of adjunctive clopidogrel in patients discharged after percutaneous coronary intervention with stent placement and requiring oral anticoagulation. *Int J Cardiol* 2009 Jan 26. [Epub ahead of print]
 17. Sarafoff N, Ndrepepa G, Mehilli J, Dörrler K, Schulz S, Iijima R, et al. Aspirin and clopidogrel with or without phenprocoumon after drug eluting coronary stent placement in patients on chronic oral anticoagulation. *J Intern Med.* 2008; 264: 472-80.
 18. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, et al. 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for Society Endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Guidelines: Developed in Collaboration With the Canadian Cardiovascular College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: A Report of the American. *Circulation* 2008; 117: 296-328.
 19. Subherwal S, Bach RG, Chen AY, Gage BF, Rao SV, Newby LK, et al. Baseline risk of major bleeding in non-ST-segment-elevation myocardial infarction: the CRUSADE (Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress Adverse outcomes with Early implementation of the ACC/AHA Guidelines) Bleeding Score. *Circulation* 2009; 119: 1846-9.